

ラットミトコンドリア極長鎖アシル-CoA デヒドロゲナーゼ cDNA のクローニングと 大腸菌における発現

上野 一郎

信州大学医学部附属病院中央検査部

Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of cDNA Encoding the Precursor of Rat Mitochondrial Very-Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase, and Expression of the Mature Enzyme in *E. coli*

Ichiro UENO

Central Clinical Laboratories, Shinshu University Hospital

cDNA covering the entire coding region of rat very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase obtained from a λ gt11 cDNA library prepared from clofibrate-fed rats was cloned and sequenced. The cDNA for the enzyme covered 2117 bp and encoded 655 amino acid sequences, consisting of a 40-amino acid leader peptide and a 615-amino acid mature enzyme. The amino acid sequence of the mature enzyme at the amino terminal side had a high similarity with those of long-chain, medium-chain and short-chain acyl-CoA dehydrogenases, but the enzyme had a longer tail composed of about 170 amino acid residues at the carboxy terminal side.

The enzyme was expressed in *E. coli* with the use of full length cDNA covering the mature enzyme structure for confirmation of the cDNA sequence. The expressed mature enzyme was very similar to rat liver enzyme in respect of its molecular and catalytic properties. But the enzyme expressed using truncated cDNA clone at carboxy terminus had no enzyme activity.

The results indicate the carboxy terminus plays an important role in the conformation of the enzyme.
Shinshu Med J 41: 131-143, 1993

(Received for publication November 27, 1992)

Key words: very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase cDNA, expression, homology of the dehydrogenase family

極長鎖アシル-CoA デヒドロゲナーゼ cDNA, 酵素発現, デヒドロゲナーゼファミリーの相同性

I 緒 言

脂肪酸 β 酸化系は動植物界に広く存在し、生命維持のための主要なエネルギー産生源となっている。これまで β 酸化系はミトコンドリアにのみ局在していると考えられていたが、1976年 Lazarow と de Duve¹⁾によりペルオキシソームにも存在することが示された。その後、Hashimoto²⁾によりペルオキシソーム β 酸化系

が特有の酵素より構成されていることが明らかにされた。

近年、脂肪酸酸化系異常に関する研究が進展し、ペルオキシソーム系においては、Zellweger 症候群をはじめとする細胞小器官欠損症や adrenoleukodystrophy などの単独酵素欠損症が³⁾⁴⁾、またミトコンドリア系については、時には小児突然死を伴うミトコンドリア諸酵素の欠損症が多数報告されている⁵⁾。

このようなことから脂肪酸 β 酸化系諸酵素について再検討が行われた結果、ラット肝臓ミトコンドリアに新しい酵素が存在することが明らかにされた。すなわち、新しいアシル-CoA デヒドロゲナーゼ⁶⁾と以後の3段階の反応を触媒するヒドラターゼ/デヒドロゲナーゼ/チオラーゼ3頭酵素⁷⁾である。

ミトコンドリアにおける β 酸化系の初発酵素であるアシル-CoA デヒドロゲナーゼには、基質とする脂肪酸の炭素鎖長に対する親和性から、短鎖、中鎖、長鎖の3種類のデヒドロゲナーゼが存在していることが知られていた⁸⁾。今回検討を行った新しい酵素は、これらの酵素とは分子的、触媒的諸性質が異なっており、その基質特異性から極長鎖アシル-CoA デヒドロゲナーゼ (very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase, VLCAD) と命名されている⁶⁾。

本研究ではラットのこの新しい酵素に対するcDNAのクローニングを行い、その構造解析を行った。その結果、本酵素のサブユニットは短鎖、中鎖、長鎖アシル-CoA デヒドロゲナーゼのそれより大きく、N-末端側はこれら酵素の全領域ときわめて類似した一次構造を有しているが、C-末端側の一次構造はまったく関連がないことが分かった。また、クローニングされたcDNAを用い大腸菌で発現させたところ、発現した酵素はラット肝臓から精製した酵素と分子的、触媒的諸性質が一致していた。一方、そのC-末端領域欠損酵素を発現させたところ、この領域が酵素の高次構造と触媒能にとって重要な役割を有することが明らかにされた。

II 材料および方法

A ラット極長鎖アシル-CoA デヒドロゲナーゼ (rat very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase, RVLCAD) cDNA のクローニング

1 抗RVLCADウサギIgGを用いたイムノスクリーニング

Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) や抗高脂血症薬剤であるクロフィブレートは、ラット肝臓で本酵素を誘導することが知られている⁹⁾。クロフィブレートを投与したラット肝臓より作製した λ gt11 cDNAライブラリーを*E. coli* Y1090株に感染させ、LB (Luria-Bertani) 寒天培地に塗布した。37°Cで6~8時間インキュベーションした後、プラークを形成した培地に、あらかじめ10mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG; Sigma Chemical Co.,

Missouri, U. S. A.) を含浸し乾燥させたニトロセルロースメンブラン (アマシャムジャパン, 東京) をのせ、さらに4時間インキュベーションした。プロットイングしたメンブランを常法に従い、1次抗体として抗RVLCADウサギIgG、2次抗体としてアルカリホスファターゼ標識抗ウサギIgG ヤギ血清 (和光純薬, 大阪) を用いて発色させ、陽性プラークを拾った。この陽性プラークについて上記操作を繰り返し、2次、3次のスクリーニングを行った。

2 陽性ファージDNAの精製

3次スクリーニングで陽性のファージを*E. coli* Y1090株に感染させ、10mM 硫酸マグネシウムを含むLB培地で4~6時間大量培養した。培養後遠心し、ファージを含む上清にDNase I とRNase A (ペーリンガーマンハイム山之内, 東京) を1 μ g/ml 加え、菌由来の核酸を分解した。これに終濃度で0.5M NaCl と5%ポリエチレングリコール6,000を加え氷上に30分放置した後、遠心によりファージを回収した。回収されたファージはプロテナーゼKバッファー (10mM Tris-HCl pH7.5/5mM EDTA) で懸濁し0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS) で可溶性後、25 μ g/ml のプロテナーゼKで37°C30分間インキュベーションしてファージ蛋白質を分解した。この反応液を等量のフェノール/クロロホルム (1:1) で抽出した後、その上清に等量の2-プロパノールを加えファージDNAを沈殿させた。これを遠心し得られたDNAベレットを80%エタノールで洗浄した後、減圧乾燥させ10mM Tris-HCl, pH7.5/1mM EDTA バッファーに溶解した。

3 精製ファージDNAのサブクローニング

ファージDNAを*EcoRI*で1時間消化し、1%アガロースゲルで電気泳動してインサートcDNAの塩基長を調べた。このインサートcDNAをpTZ18Uベクター (東洋紡, 大阪) の*EcoRI* サイトにサブクローニングし、*E. coli* JM101株にトランスフォームした後、形質転換菌を一晩培養してアルカリSDS法によりプラスミドを回収した。

4 RVLCAD cDNA クローンの塩基配列の決定

初回のイムノスクリーニングで得られた中で最長のクローンはRVL-52であった。これは酵素の全長をカバーしていないと考えられたので再度DNAスクリーニングを行ったところ、RVL-57が得られた (Fig. 1)。塩基配列の決定にはこれら2つのクローンを用いた。クローンの*Sph I*, *Pst I* 消化断片のほか、exonuclease

極長鎖アシル-CoA デヒドロゲナーゼ cDNA

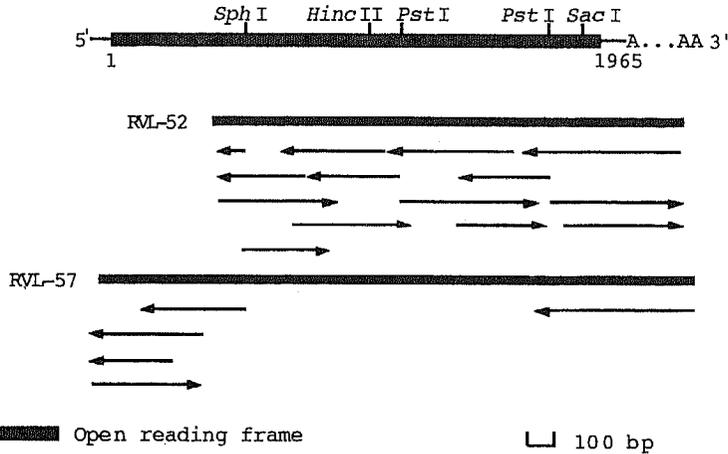


Fig. 1 Restriction endonuclease map and sequencing strategy of rat very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase (RVLCAD) clones

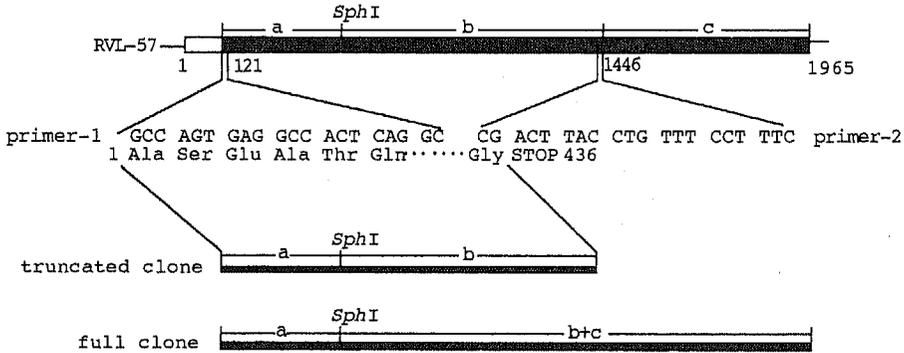


Fig. 2 Scheme for the construction of expression vectors with RVLCAD truncated and full clones

III (宝酒造, 京都) で両方向より適当な長さで削った消化断片を調製し, これらを M13mp18 ベクター (宝酒造, 京都) に組換え 1 本鎖 DNA としたものを塩基配列決定の材料とした。塩基配列の決定はダイデオキシ法⁹⁾に基き, 蛍光プライマーを使用して 373A DNA シーケンサー (アプライド・バイオシステムズ・ジャパン, 東京) を用いて行った。塩基配列の結果は遺伝子解析ソフト GENETYX (ソフトウェアデベロプメント, 東京) により解析した。さらに, 同ソフトでクローンの制限酵素地図の作成とデータベースを用いたホモロジー検索を行った。

5 RVLCAD のペプチド断片のアミノ酸配列の解析
クローニングされた RVLCAD の cDNA を確かめるため, 精製ラット肝臓酵素のアミノ酸組成および酵

素を部分的に水解して得られたペプチド断片のアミノ酸配列と, cDNA の塩基配列より推定された酵素の構造とを比較した。精製肝臓酵素のアミノ酸組成は塩酸加水分解後, アミノ酸分析装置 PICO・TAG (日本ミリポア・リミテッド, 東京) を用いて分析した。ペプチド断片のアミノ酸配列の決定には, 精製肝臓酵素を V8 プロテアーゼやリシルエンドペプチダーゼ (宝酒造, 京都) で部分的に水解し, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)¹⁰⁾ を行った後, polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブラン (日本ミリポア・リミテッド, 東京) にプロットングしたものを用いた。解析には, 477A ペプチドシーケンサー (アプライド・バイオシステムズ・ジャパン, 東京) を使用した。

B RVLCAD cDNA クローンの大腸菌における発現

RVLCADの大腸菌における発現にはProtein Fusion and Purification Systemキット(New England Biolabs Inc., Massachusetts, U. S. A.)を用いた。本キットの基本的な原理は、目的蛋白質をマルトース結合蛋白質とのフュージョン蛋白質として発現させ、これをアミロースレジンアフィニティカラムで精製した後、フュージョン蛋白質をファクターXaにより融合部位で切断し、さらに精製分離を行うものである。

1 発現ベクターの構築

発現ベクターを2種類構築した(Fig. 2)。1つは他のアシル-CoA デヒドロゲナーゼとホモロジーの高い領域(アミノ酸残基1-436, Fig. 2 a+b)のみをコードする発現ベクターである(短縮クローン)。このクローンは成熟酵素のN-末端をコードする20塩基と、他のアシル-CoA デヒドロゲナーゼとのホモロジーが終わるC-末端側下流の反対鎖20塩基に終始コドン付加した合成ヌクレオチドをプライマーとし、RVL-57を鋳型としてPolymerase Chain Reaction (PCR) 法¹⁾によりこの領域を増幅させることにより得た。プライマーの合成にはPCR-MATE (アブライド・バイオシステムズ・ジャパン, 東京)を使用した。また、鋳型の増幅にはGeneAmp PCR Reagentキット(宝酒造, 京都)で反応液を調製し、サーマルサイクラー(宝酒造, 京都)を用いて95°C 1分, 55°C 2分, 72°C 3分の条件で25サイクル行った。得られた全長1,326 bpのPCR産物をpMAL-c発現ベクター(キット添付)の*Stu* I-*Hind* IIIサイトに挿入し、短縮クローンの発現ベクターを構築した。なお、PCRを用いて得た増幅領域の塩基配列は元のクローンと一致していることを確認して以後の実験に使用した。他の1つは成熟酵素の全翻訳領域(アミノ酸残基1-615, Fig. 2 a+b+c)をカバーする発現ベクターである(全長クローン)。上記短縮クローンの*Sph* Iサイト下流(b)を全翻訳領域をカバーしているRVL-57の*Sph* Iサイト下流(b+c)と組換え、全長クローンの発現ベクターを構築した。

2 RVLCAD クローンの発現

発現ベクターpMAL-cに組み込まれたクローンを*E. coli* TB 1株にトランスフォームし、この菌を0.2%グルコースと50 μ g/mlのアmpiシリンを含むLB培地5mlで一晩培養した。この菌体を同培地500mlに移し、吸光度(660nm)で0.5付近まで培養し、その後

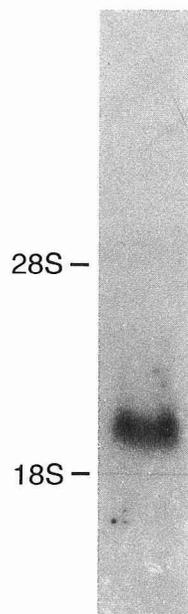


Fig. 3 Northern blot analysis of RVLCAD mRNA

Twenty μ g of total RNA from rat liver was used. ³²P-labelled RVL-52 clone was used as a probe.

0.3mM IPTGを添加して対数増殖期の終わりまで振とう培養した。

3 発現酵素の精製

遠心により菌体(湿重量1.25g)を回収し、素早く50mlのLysisバッファー(10mM sodium phosphate, 30mM NaCl, 10mM 2-mercaptoethanol (2-ME), 10mM EDTA, 10mM EGTA, 0.2% Tween20, pH7.0)で懸濁した。また、プロテアーゼの作用を抑えるために1mM benzamidineと1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)を同懸濁液に添加した。なお、酵素安定化のため酵素精製に用いるすべての溶液に終濃度で10 μ M FAD, 0.1% hexamethylphosphoric triamide, 2mM 2-ME, 1mM EDTAを加えた。

直ちに氷冷下でソニケーションを2~3分行った後、5M NaClを1/10量加え遠心し抽出液を得た。抽出液を総蛋白質濃度が2mg/ml以下になるように0.2% Tween 20を含むカラムバッファー(10mM sodium phosphate, 0.5M NaCl, 1mM NaN₃, 10mM 2-ME, 1mM EGTA, pH7.0)で希釈し、あらかじめ同バッファーで平衡化したアミロースレジンアフィニティカラム

極長鎖アシル-CoA デヒドロゲナーゼ cDNA

-21 AATTCGGCGCGGCTTTGGAG

```

1  ATG CAG TCG GCC CGG ATG ACC CCG AGT GTG GGG CGA CAA CTG CTG CGG CTG GGG GCC CGA AGC TCG CGG TCT GCT GCG CTT CAG GGA CAA
-40 Met Gln Ser Ala Arg Met Thr Pro Ser Val Gly Arg Gln Leu Leu Arg Leu Gly Ala Arg Ser Ser Arg Ser Ala Ala Leu Gln Gly Gln
91  CCC CGS CCT ACC TCT GCC CAG CGA CTT TAT GGC AGT GAG GCC ACT CAG GCA GTT CTG GAA AAG CCA GAG ACC CTC TCC TCT GAT GCT TCC
-10 Pro Arg Pro Thr Ser Ala Gln Lys Leu Tyr Ala Ser Glu Ala Val Leu Glu Lys Pro Glu Thr Leu Ser Ser Ala Ser Ala Ser
181 ACC AGA GAA AAA CCT GCC ACG GCG GAA TCT AAG TCT TTT GCT GTG GGA ATG TTC AAA AGC CAG CTT ACC ACC GAC CAG GTG TTC CCA TAC
21 Thr Arg Glu Lys Pro Ala Arg Ala Glu Ser Lys Ser Phe Ala Val Gly Met Phe Lys Gln GCG CAG Thr Thr Thr Asp Gln Val Phe Pro Tyr
271 CCA TCT GTG CTC AAT GAA GGA CAG ACA CAA TTT CTC AAA GAG CTG GTG GGA CCA GTG GCC CGG TTC TTT GAA GAA GTG AAT GAC CCT GCC
51 Pro Ser Val Leu Asn Glu Gly Gln Thr Gln Phe Leu Lys Glu Leu Val Gly Pro Val Ala Arg Phe Phe Glu Glu Val Asn Asp Pro Ala
361 AAG AAT GAC TCC TTG GAG AAG GTG GAG GAG GAC ACT TTG CAG GGA CTC AAA GAA CTG GGG GCA TTT GGT CTG CAA GTA CCC AGC GAG CTG
81 Lys Asn Asp Ser Leu Glu Lys Val Glu Glu Asp Thr Leu Gln Gly Leu Lys Glu Leu Gly Ala Phe Gly Leu Gln Val Pro Ser Glu Leu
451 GGT GGT TTG GGC CTC TCT AAT ACC CAG TAC GCT CGC TTG GCA GAG AIT GTG GGC ATG CAT GAC CTT GGT GTT AGC GAT ACC CTG GGA GCC
111 Gly Gly Leu Gly Leu Ser Asn Thr Gln Tyr Ala Arg Leu Ala Glu Ile Val Gly Met His Asp Leu Gly Val Ser Val Thr Leu Gly Ala
541 CAT CAG ACC ATC GGT TTC AAA GGC ATC TTG CTC TAT GGC ACA AAG GCC CAG AAG GAA AAA TAC CTC CCC AGA GTG GCA TCC GGG CAG GCT
141 His Gln Ser Ile Gly Phe Lys Gly Ile Leu Lys Ser Thr Lys Ala Gln Lys Glu Lys Tyr Leu Thr Lys Ala Ser Gly Val Ala Ser Gly Gln Ala
631 TTG GCG GCT TTC TGC CTG ACT GAG CCC TCG AGC GGG TCC GAT GTG GCC TCT ATC CGA AGC TCA CCT GTA CCT ACC CCC TGT GGA AAG TAT
171 Leu Ala Ala Phe Cys Leu Thr Glu Pro Ser Ser Gly Ser Asp Val Ala Ser Ile Arg Ser Ser Ala Val Pro Ser Pro Cys Gly Lys Tyr
721 TAT ACT CTC AAC GGA AGC AAG ATC TGG ATC AGT AAT GGG GGT CTG GCA GAC AIT TTC ACT GTC TTT GCC AAA ACG CCA AIT AAA GAT GCA
201 Tyr Thr Leu Asn Gly Ser Lys Ile Trp Ile Ser Asn Gly Gly Leu Ala Asp Ile Phe Thr Val Phe Ala Lys Thr Pro Ile Lys Asp Ala
811 GCC ACG GCG GCC GTG AAA GAG AAG ATC ACA GCT TTC GTA GTG GAA CCG AGC TTT GGA GGG GTT ACC CAT GGG CTC CCC GAA AAG AAG ATG
231 Ala Thr Gly Ala Val Lys Glu Lys Ile Thr Ala Phe Val Val Glu Arg Ser Phe Gly Gly Val Thr hr His Gly Leu Pro Glu Lys Lys Met
901 GGC ATC AAG GCA TCT AAC ACA TCA GAG GTG TAC TTT GAT GGA GTC AAG GTG CCA GCA GAG AAT GTG CTA GGA GAA GTG GGA GAT GGC TTC
260 Gly Ile Lys Ala Ser Asn Thr Ser Glu Val Tyr Phe Asp Gly Val Lys Val Pro Ala Glu Asn Val Leu Gly Glu Val Gly Asp Gly Phe
991 AAG GAT GCT GTC AAC ATC CTC AAC AAC GGA AGA TTT GGG ATG GCT GCA ACC CTA GCA GGC ACC ATG AAA GCC ATC AIT GCC AAG GCG GTT
291 Lys Val Ala Val Asn Ile Leu Asn Asn Gly Phe Gly Met Ala Ala Thr Leu Ala Gly Thr Leu Ala Glu Tyr hr Lys His Gly Leu Val Glu Ala Val
1081 GAT CAT GCT ACT AAC CGT ACC CAG TTT GGG GAC AAA AIT CAC AAC TTT GGG GTG ATC CAG GAA AAG CTG GCT CGG ATG GCT AIT CIG CAG
321 Asp His Ala Thr Asn Arg Thr Gln Phe Gly Asp Lys Ile His Asn Phe Gly Val Ile Gln Glu Lys Leu Ala Arg Met Ala Ile Leu Gln
1171 TAT GTG ACT GAG TCC ATG GCT TAC ATG CTG AGT GCC AAC ATG GAC CAG GGA TTC AAA GAC TTC CAG ATA GAA GCT GCC ATC AGC AAA ATC
351 Tyr Val Thr Glu Ser Met Ala Tyr Met Leu Ser Ala Asn Met Asp Gln Gly Phe Lys Asp Phe Gln Ile Glu Ala Ala Ile Ser Lys Ile
1261 TTT GGC TCG GAG GCG GCC TGG AAA GTG ACA GAT GAG TGC ATC CAG ATA MET GGG GGC ATG GGC TTC ATG AAG GAA CCA GGG GTA GAG CGT
381 Phe Gly Ser Glu Ala Ala Trp Lys Val Thr Asp Glu Cys Ile Gln Ile Met Gly Gly Met Gly Phe Met Lys Glu Pro Gly Val Glu Arg
1351 GTG CTC CGA GAT AIT CGA ATC TTC CCG ATC TTT GAA GGG ACA AAT GAC AIT CTT CGA CTG TTT GTG GCT CTA CAA GGC TCC ATG GAC AAA
411 Val Leu Arg Asp Ile Arg Ile Phe Arg Ile Phe Glu Gly Thr Asn Asp Ile Leu Arg Leu Phe Val Ala Leu Gln Gly Cys Met Asp Lys
1441 GGA AAG GAA CTC ACG GGA CTT GGT AAT GCC CTA AAG AAT CCT CTT GGA AAT GTT GGC CTC CTC ATA GGA GAA GCA AGC AAA CAG CTG AGG
441 Gly Lys Glu Leu Thr Gly Leu Gly Asn Ala Leu Lys Asn Pro Leu Gly Asn Val Gly Leu Leu Ile Gly Leu Ala Ser Lys Gln Leu Arg
1531 CCG CCG ACA GGG AIT GGC AGT GGT CTG AGT CTC TCG GGA AIT GTC CAC CCA GAG TTG AGT CCG AGT GGT GAA CTG GCA GTG CAG GCT CTG
471 Arg Arg Thr Gly Ile Gly Ser Gly Leu Ser Leu Ser Gly Ile Val His Pro Glu Leu Ser Arg Ser Gly Glu Leu Ala Val Gln Ala Leu
1621 GAA CAA TTT GCC ACT GTA GTG GAG GCG AAG CTG ATG AAG CAC AAG AAA GGG AIT GTC AAT GAA CAG TTC CTG CTG CAG CGA CTG GCA GAT
501 Glu Gln Phe Ala Thr Val Val Glu Ala Lys Leu Met Lys His Lys Lys Gly Ile Val Asn Glu Gln Phe Leu Leu Gln Arg Leu Ala Asp
1711 GGA GCC AIT GAC CTC TAC GCC ATG GTG GTG GTT CTC TCC AGA GCC TCA AGA TCC CTG AGT GAG GGC TAC CCG ACA GCA CAG CAT GAG AAA
531 Gly Ala Ile Asp Leu Tyr Ala Met Val Val Leu Ser Arg Ala Ser Arg Ser Leu Ser Glu Gly Tyr Pro Thr Ala Gln His Glu Lys
1801 ATG CTC TGT GAT AGT TGG TGC AIT GAG GCT GCA ACA CCG AIT CGA GAA AAC ATG GCC AGC CTT CAG TCC AAC CCT CAG CAG CAG GAG CTC
561 Met Leu Cys Asp Ser Trp Cys Ile Glu Ala Ala Thr Arg Ile Arg Glu Asn Met Ala Ser Leu Gln Ser Asn Pro Gln Gln Gln Glu Leu
1891 TTT CGT AAC TTC AGA AGT ATC TCC AAG GCC ATG GTG GAG AAT GGT GGC CTG GTC ACC AGT AAC CCC CTT AGA GTC TGA AGACTCCTAATACAGG
591 Phe Arg Asn Phe Arg Ser Ile Ser Lys Ala Met Val Glu Asn Gly Gly Leu Val Thr Ser Asn Pro Leu Arg Val TER
1984 CCTAGCACAGTGTGTGCTTCTCTATGCGCAACACAGGCCCCCTTCATGGGGCACTGGAGTACTTACTGCTTAAGGACATAAAATTTTCTACCAAAAAAAAAAAAAA 2096

```

Fig. 4 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of RVLCAD cDNA

Underlines represent the amino acid sequences confirmed by direct peptide sequencing of the fragments obtained after partial hydrolysis with V8 protease and lysylendopeptidase. The putative poly (A) addition signal, AATAAA, is indicated by a double underline. Nucleotides are numbered at the left end of lines, taking the A residue of the initiator methionine codon as 1. Residues in the 5' non-coding region are indicated by negative numbers. Amino acid residues are numbered in the same manner taking the first residue of the mature enzyme (Ala) as 1. Residues in the presequence are given negative numbers.

```

RVLCAD -40 MQSARMTPSVGRQLLRGARSRSRALQGQPRPTSAQRLYASEATQAVLEKPELSSDAS
RLCAD -30 MAARLLRLSLRVLSA
RMCAD -25 MAALRR

RVLCAD 21 TREKPARAESKSFVGMFKGQLTTDQVFPYPSVLNEGQTQFLKELVGPVAFREEVNDPA
RLCAD -15 RSATLPPPSARCSHSGAEARLETPSAKKLTDIGIRRFSSSEHDFRESVRKFFQEEVTPY
RMCAD -18 GYKVLRSVSHFECRAQHTKPSLKQEPGLGFSFELTEQQKEF-----QTIARKFAREELIP
RSCAD -26 MAMAAALLARAGGSLGRALRARDWRRLHTVYQSVLEPETHQMLRQTCRDFAEKELVPIAA

RVLCAD 81 KND--SLEKVEEDTLQGLK---ELCAFGLQVSELCGLQLSNTQYARLAEIVGMHDLGVS
RLCAD 46 HEEWEKAGEVSRELWEKAG---KQGLGINIAFKHGGIG--GDLLSTAVTWEEQAYSNCTG
RMCAD 38 VAP--DYDKSGEYPPFLIKRAWELGLINTHTPESSCGLGLGTFDACLITBELAYGCTGVQ
RSCAD 35 QLD--KEHLFPTSQVKKMG---ELGLLAMDVPEELSACLDCLAYSIALPEISRGCSTG

RVLCAD 136 VTLGAHQSIGFKGILLYGCTKAOKEYLPRVASQALAAFLCLTEPSSGSDVASIRSSAVPS
RLCAD 102 PGFSLHSDIVMPYIANYCTKEGIEQFIPQMTACKCIGAIAMTEFGAGSDLOGVRTNA--K
RMCAD 96 TAIEAN--SLGQMPVI IACNDQOKKKYLGRMTEQPMMAQYCVTEPESAGSDVACIKTKA--E
RSCAD 90 VIMSVNNSLYLGPILKFCSSQOKQOWITPFINCDKIGCFALSEEGNCS--AGAA--STTAR

RVLCAD 196 PCGKYTLNCSKIINTSNGGLADIFTVFAKTPIKDAATGAVKEKITAIVVRSFSGVTHGL
RLCAD 160 RSGSDWILNGSKVFTINGWLSDLVIIVVA---VTNREARSPAHGSLFLVENGMKCFITKGG
RMCAD 153 KKGDEYVINGCKMWTNGGKANWY--EVLTRSNPDPKVPASKAFTGFTIVADTPCIHIGK
RSCAD 148 EEGSDWVINGTKAWIINSWEASATVVEASTDRSRQNG-----ISAFVMPPTPELTLGK
                                     ▼
RVLCAD 256 PEKMGIKASNTSEVYFDGKVPANVLDGVEVDGFKVAVNIINNGRFGMATLACTMKAI
RLCAD 217 KLHKMGKAKQDTAELFFEDVRLPASALGGENKGFYVLMOELPQERLLIADLAISACEFM
RMCAD 211 KELNMQQRCSDIRGITTFEDVRVPKENVLDGECACFKIAMGAFDRTRPTVAGAVCLAQRA
RSCAD 203 KEDKLCIRASSTANLTFEDCRIPKENLDGEPGMGEKIAMQTLDMGRIGIASQALTAQAS
                                     ▼
RVLCAD 316 IAKAVDHATNRTQFGDKIHNFVIOEKLARMAILOQVTESMAYMLSA--NMDQGFDFQ-I
RLCAD 277 FEETRNIVRQRKAFCKTVAHTQTVQHKLAELKTNICVT--RAFVDS--LQLHETKRLDLS
RMCAD 271 LDEATKYALDRKTFCKLLVEHOGVSFLAEMA--MKVELARLSYQRAAWEVDSGRNTY--F
RSCAD 263 LDCAVKYAENRHAFCAPLTKLQNIQFKLADMA--LALESARLLTWRAA--MLKDNKPFPT-K
                                     ▼
RVLCAD 374 EAAISKIFGSBAAWKVTECTOIMGGMGFMKEPGVERVLRDIRLFRTEGCTINDILRLFVA
RLCAD 334 SASMAKYWASELONTVAYQCQLHGGWGYMWEYPIAKAYVDARVQPIVGGTNEIMKELTA
RMCAD 329 -ASIAKAFAGDIANQLATDAVQIFGCGYGFNTYEPVEKLMRDAKTYQIYEGTAQIQRLITA
RSCAD 320 ESAMAKLASEAATAISHQAIQLGCMGYVTMPAERYRDARTELYEGTSELORLVIA

RVLCAD 434 LQGCMDKGKELTGLGNALKNPLGNVGLLIGEASKQLRRRTGIGSGLSLSGIVHPELSRSG
RLCAD 394 RQIVSDS 400
RMCAD 388 REHIEKYKN 396
RSCAD 380 GHLLRSYRS 388

RVLCAD 494 ELAVQALEQFATVVEAKLMKHKGIVNEQFLLQRLADGAIDLAMVVVLSRASRSLSEGY
RVLCAD 554 WCIEAATRIRENMASLQSNPQQQELFRNFRSISKAMPTAQHEKMLCDSVENGGVTSNPLRV

```

615

Fig. 5 Comparison of amino acid sequences of four rat acyl-CoA dehydrogenases

Rat very-long-chain, long-chain, medium-chain and short-chain acyl-CoA dehydrogenases are abbreviated as RVLCAD, RLCAD, RMCAD and RSCAD, respectively. Residues shared by more than three of four enzymes are framed. Amino acid residues are numbered at the left end of lines, taking the first residue of the individual mature enzyme as 1. Residues in the presequence are given negative numbers. Amino acids assumed to be an α -proton subtractor in the catalytic reaction of RMCAD and RSCAD are marked by (▼), and that of RLCAD by (▽). RVLCAD has an α -proton subtractor (E) at the same region as those of RMCAD and RSCAD.

ム (2.3×5cm) にアプライした。カラムを洗浄した後、吸着したフュージョン蛋白質を10mM マルトースを含むカラムバッファーで溶出した。活性画分に蛋白質質量として1/100量のファクター Xa を加え、室温で6時間作用させフュージョン蛋白質を融合部位で切断した。この反応を1mM PMSF で停止させた後、ポリエチレングリコール6,000の0.1g/ml から0.25g/ml の分画を遠心により集めた。回収した沈殿を10mM potassium phosphate, pH7.5/0.2% Tween20に溶解し同バッファーで平衡化したホスホセルロースカラムにアプライした。続いて0.2% Tween20を含む potassium phosphate の濃度勾配溶出(10~200mM, pH7.5)を行い活性画分を回収した。

蛋白質定量はLowry¹²⁾の方法の変法¹³⁾により行った。酵素活性はパルミトイル-CoA を基質に phenazine methosulfate を電子伝達中間体とし、2,6-dichloroindophenol を還元する方法¹⁴⁾で行った。SDS-PAGE¹⁰⁾は10%ゲルを用いて行い、イムノブロット解析は Towbin ら¹⁵⁾の方法に従った。

III 結 果

A RVLCAD cDNA のクローニング

1 RVLCAD cDNA の塩基配列の決定

最初にクローン RVL-52の塩基配列を決定した。RVL-52の *Sph* I および *Pst* I の制限酵素断片と RVL-52の deletion mutant を用いた。塩基配列の決定部位、その方向および制限酵素地図を Fig. 1に示す。この結果、3'側にポリ-A を持つ1,680bp のクローンの塩基配列が決定された。

塩基配列の結果と精製肝臓酵素のサブユニットの大きさから、RVL-52は酵素の全翻訳領域をカバーしていないことが予測されたので、本酵素の mRNA のサイズをノーザンブロット¹⁶⁾により確認した。全 RNA をラット肝臓より acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform (AGPC) 法¹⁷⁾により抽出し、1%ホルムアルデヒドアガロースゲルで電気泳動した。プローブとして、³²P で標識した RVL-52を用いた。その結果、本酵素の mRNA のサイズは約2.3kb と推定された (Fig. 3)。

そこで、RVL-52のクローンの5'上流から *Sph* I サイトまでの87bp をプローブとして、再度 cDNA ライブラリーよりスクリーニングを行った。その結果、酵素の全長をカバーする2,117bp のクローン (RVL-57) が得られ (Fig. 1), 塩基配列が決定された。ま

た、それから推定される本酵素のアミノ酸配列を Fig. 4に示す。

2 RVLCAD のアミノ酸組成および配列の解析

塩基配列から推定される本酵素のアミノ酸組成と、精製ラット肝臓酵素をアミノ酸分析装置を用いて分析した結果はほとんど一致していた。さらに、精製ラット肝臓酵素およびそれをプロテアーゼで部分水解して得られた8つのペプチド断片のアミノ酸配列をペプチドシーケンサーにより決定したところ、塩基配列より推定されたアミノ酸配列と Fig. 4の下線で示した部分が一致していた。

3 他のアシル-CoA デヒドロゲナーゼとのホモロジー検索

核酸および蛋白質のデータベースを使用しランダム検索を行った結果、本酵素のサブユニットのアミノ酸配列はラット短鎖 (RSCAD), 中鎖 (RMCAD), 長鎖アシル-CoA デヒドロゲナーゼ (RLCAD) およびイソバレリル-CoA デヒドロゲナーゼと高いホモロジーを有することが分かった。

Fig. 5に本酵素と他の3つのアシル-CoA デヒドロゲナーゼとのホモロジー検索の結果を示す。本酵素のアミノ酸残基98から433番目の領域は、他の3つの酵素と高いホモロジーが認められた。

一方、C-末端側約170アミノ酸残基は、他の3つのアシル-CoA デヒドロゲナーゼとホモロジーを認めなかった。

B RVLCAD cDNA クローンの大腸菌における発現

1 発現酵素の精製

成熟酵素の全翻訳領域を持つクローンを pMAL-c 発現ベクターに組み込み、*E. coli* TB1細胞での発現を酵素活性と SDS-PAGE によるフュージョン蛋白質の増加で調べたところ、IPTG 誘導後4時間で発現は最大となり、菌全体の蛋白質量の10%から20%程度の発現量が得られた。

RVLCAD の各精製段階における SDS-PAGE とイムノブロット解析の結果を Fig. 6の A, B に示す。菌体を直接 SDS-PAGE のサンプルとして処理した場合、フュージョン蛋白質と推定されるポリペプチドの著明な増加が認められた。ところが、菌体からの酵素抽出液を SDS-PAGE のサンプルとして用いると、フュージョン蛋白質 (レーン2, a) のほかその分解産物と推定されるもう一つの大きなバンド (レーン2, b) が認められた。これらのバンドは、最終精製品を示すレーン5の a', b' にそれぞれ対応した。酵素抽出液を

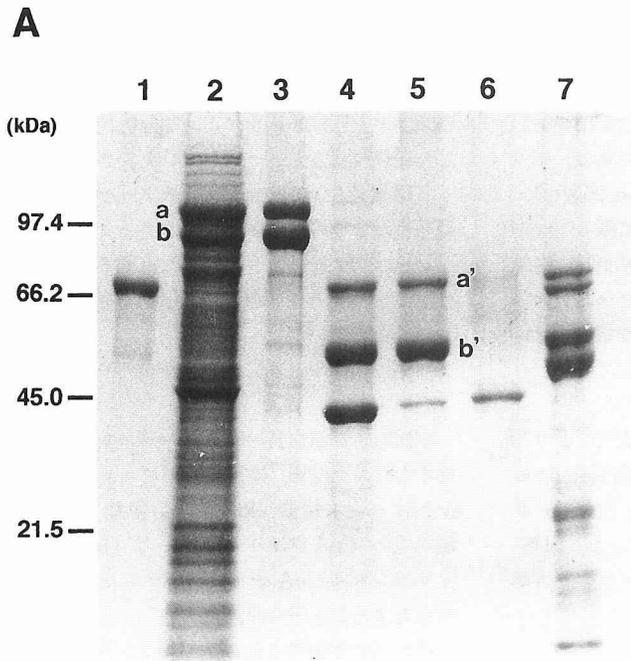


Fig. 6 Analysis of the expressed RVLCAD

(A) SDS-PAGE; (B) immunoblot analysis. Lane 1, rat liver enzyme (71 kDa); lane 2, extract; lane 3, amylose resin affinity column chromatography; lane 4, factor Xa digestion; lane 5, phosphocellulose column chromatography; lane 6, maltose binding protein (42 kDa); lane 7, rat liver enzyme treated with trypsin.

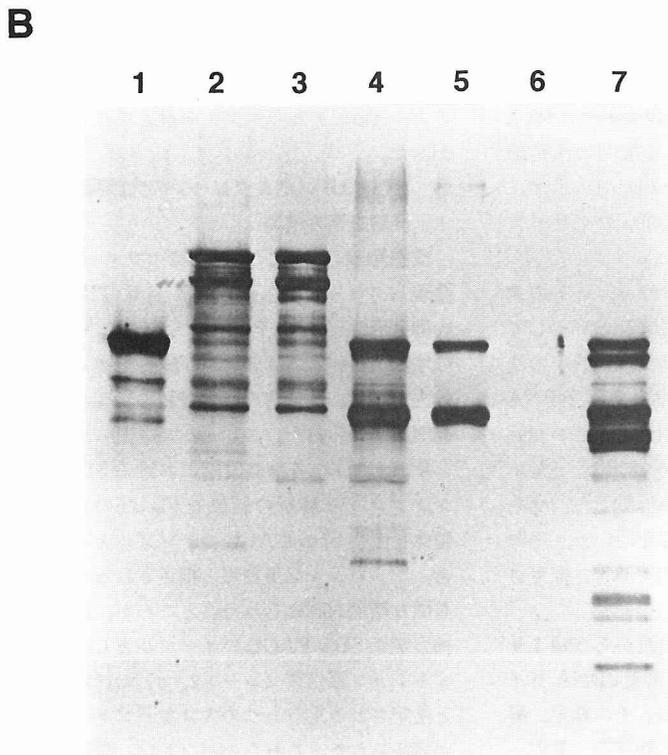


Table 1 Purification of the expressed RVLCAD

Step	Total activity	Total protein	Specific activity
	units	mg	units/mg
Extract	125	125	1.0
Amylose resin	96	15.6	6.2
Factor Xa	86	15.6	5.5
Phosphocellulose	56	6.0	9.3

The bacterial pellet of 1.25g was used.

保存しておいても分解産物の著明な増加が認められなかったことから、分解産物の生成は菌体破碎時の菌由来プロテアーゼによるモディフィケーションのためと推定される。そこで、Lysis バッファーに含まれている EDTA, EGTA 以外に金属、セリン、チオール、酸性プロテアーゼに対する低分子インヒビター 8 種類 (ロイペプチン, アンチパイン, キモスタチン, ペプスタチン A, ベスタチン, ホスホラミドン, E-64, 塩化第 2 水銀) を添加したが、十分な分解産物生成阻害効果は認められなかった。経験的に菌体破碎から遠心による抽出液調製までの時間短縮が望ましいと推定された。以下発現酵素精製の過程, アミロースレジニアフィニティクromatグラフィー, ファクター Xa によるフュージョン蛋白質の融合部の切断, ホスホセルロースカラムromatグラフィーによる最終酵素標品の精製の順に, SDS-PAGE とイムノプロットの結果を Fig. 6 のレーン 3 から 5 に示す。レーン 5 より発現酵素のサブユニットの分子量は肝臓酵素と同じ 71 kDa のほかに, プロテオリティックモディフィケーションを受けた推定分子量 53 kDa の蛋白質が存在した。

また, 発現酵素精製のプロトコールを Table 1 に示す。菌体湿重量 1.25 g から酵素活性 125 単位の菌体抽出液が得られ, 以下ホスホセルロースカラムromatグラフィーによる精製まで行った結果, 酵素活性の回収率 45%, 比活性 9.3 units/mg の精製酵素標品が得られた。なお, ファクター Xa 作用前後では著しい活性の変化は認められなかったことから, フュージョン蛋白質も融合部位切断後の本酵素とほぼ同等な活性を有していると考えられた。

2 発現酵素の諸性質

発現酵素がプロテオリティックモディフィケーションを受けていることから, 肝臓より精製した酵素を用いプロテオリティックモディフィケーションについて

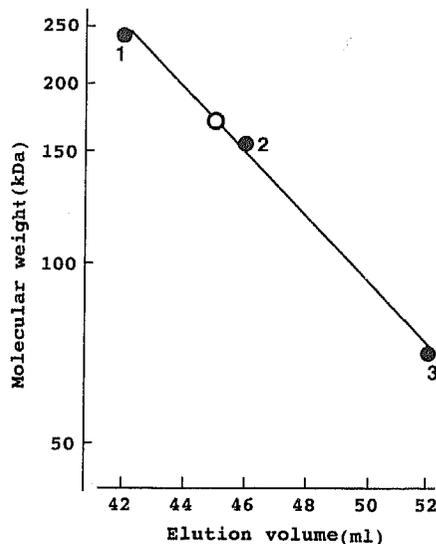


Fig. 7 Estimation of molecular weight by molecular sieve

An Ultrogel AcA34 column (1.5x45cm: LKB product) was used. The buffer used was 10mM potassium phosphate, pH7.5, containing 0.2% Tween 20, 0.5M KCl, 0.1% hexamethylphosphoric triamide, 2mM 2-mercaptoethanol, 1mM EDTA. The following standards (●) were used for calibration of the column: 1, rabbit muscle pyruvate kinase (Mr=237,000); 2, rabbit muscle lactate dehydrogenase (Mr=140,000); 3, pig heart malate dehydrogenase (Mr=70,000). The position of the peak of the expressed RVLCAD activity is indicated (○).

検討を行った。肝臓酵素はトリプシン, キモトリプシン, リシルエンドペプチダーゼ, V8プロテアーゼでプロテオリティックモディフィケーションを受け, 71 kDa のサブユニットがほとんど消失し SDS-PAGE でダイフロントにまで移動する多くのペプチド断片が生じる。この標品について種々の酵素精製操作を繰り返してもペプチド相互の解離が認められず, 酵素活性はやや減少するものの未変性酵素の分子量はほとんど変わらないことが確かめられた (未発表)。Fig. 6 のレーン 7 に, 精製肝臓酵素をトリプシンで処理したパターンを示す。

大腸菌で発現された酵素の精製標品は SDS-PAGE とイムノプロット解析の結果 (Fig. 6) およびゲル濾過の結果 (Fig. 7) から, プロテオリティックモディ

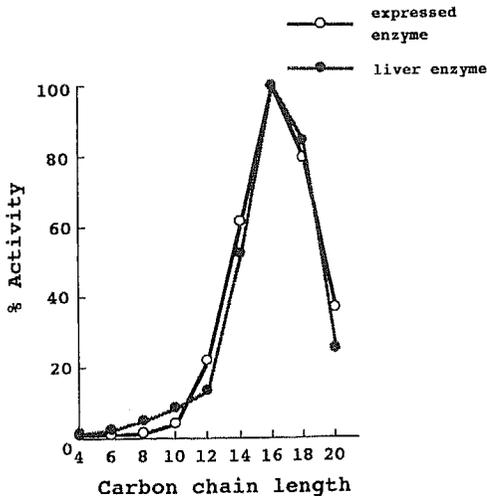


Fig. 8 Carbon chain length specificities of the expressed RVLCAD and rat liver enzyme

フィケーションを受けたサブユニットが含まれてはいるが、肝臓酵素にはほぼ近似した158kDaの分子量を有しかつダイマーを形成していると推定された。

ホスホセルロースカラムクロマトグラフィーやポリエチレングリコール沈殿などでの酵素の挙動は、発現酵素と肝臓酵素とに大きな差異は認められなかった。

一方、最終精製品の比活性が9.3units/mgで精製肝臓酵素の12.3units/mgに比べ若干低い、これは発現酵素の標品がプロテオリティックモディフィケーションを受けているためと考えられた。

本酵素の吸収スペクトルを測定した結果、発現した酵素は270nm, 375nm, 450nmに最大吸収を有し、その吸光度比は5.7:0.67:1であった。さらにFADの450nmにおけるモル吸光係数を $11,300M^{-1}cm^{-1}$ としてFADの含有量を推定したところ、酵素1モルに対しFADが2モルの割合で含まれていた。

さらに、精製肝臓酵素と発現した酵素について基質特異性を検討した結果、発現酵素は精製肝臓酵素とほとんど同じ基質特異性を示した (Fig. 8)。

3 C-末端欠損酵素の発現

極長鎖アシル-CoA デヒドロゲナーゼは、そのcDNAの構造解析の結果 (Fig. 5), 同じファミリーの短鎖, 中鎖, 長鎖アシル-CoA デヒドロゲナーゼと比べ、C-末端側に約170のアミノ酸残基を有していた。このC-末端側の機能を調べるため、その領域を欠損したcDNA (Fig.2 a+b) をpMAL-c発現ベクター

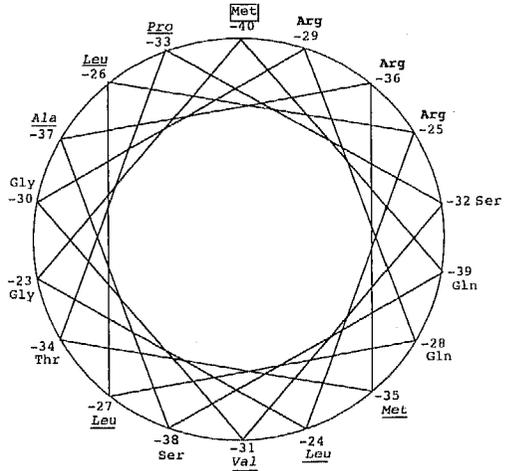


Fig. 9 Helical wheel analysis of the presequence from ⁻⁴⁰Met to ⁻²³Gly of RVLCAD

Positively charged residues are indicated by bold letters, whereas hydrophobic residues by italic with underline.

に組み込み大腸菌での発現を試みた。SDS-PAGEやイムノブロット解析の結果からC-末端欠損酵素の発現が確認され、発現量は全長のcDNAを発現させた場合とほぼ同程度であった。しかし、菌体抽出液には酵素活性が認められなかったため、以下の精製ステップはSDS-PAGEとイムノブロットにより蛋白質の挙動を確認しながら行った。その結果、精製された発現蛋白質のサブユニットのサイズはSDS-PAGEで49kDa、ゲル濾過で求めた未変性蛋白質の分子量は55kDaと推定され2量体を形成していなかった。また、発現蛋白質とFADの結合は認められなかった。

IV 考 察

A RVLCADの1次構造

得られたクローンをを用いて発現させた成熟酵素は、分子量やサブユニットの大きさ、そして2量体形成など分子的性質および基質特異性などの触媒的性質が精製肝臓酵素と同一であった。また、アミノ酸配列の結果 (Fig. 4) から、本酵素の成熟サブユニット上流には40アミノ酸残基が存在していた。一般的に、ミトコンドリア酵素のリーダーペプチドは酸性アミノ酸は比較的多く、セリンのほか塩基性および疎水性アミノ酸に富んでおり、これらが両親媒性の α -ヘリックスを構成しミトコンドリア内への輸送シグナルとなつて

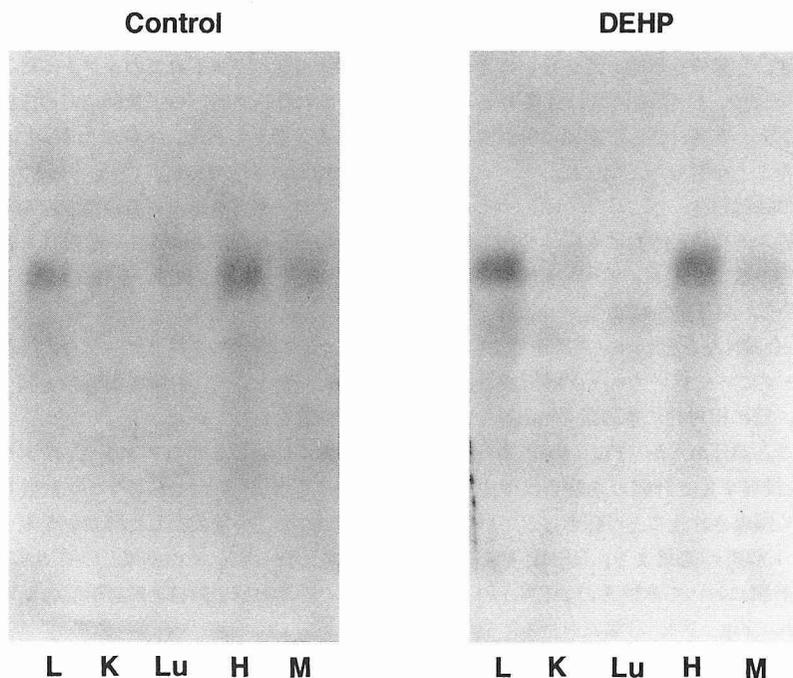


Fig. 10 Northern blot analysis of RVLCAD mRNA in various organs
Twenty μ g of total RNA prepared from various organs of the control and DEHP-fed rats was used. 32 P-labelled RVL-57 clone was used as a probe. Abbreviations are: L, liver; K, kidney; Lu, lung; H, heart; M, muscle.

いると考えられている¹⁸⁾¹⁹⁾。本酵素の40アミノ酸残基も同様なアミノ酸組成を示し、両親媒性の α -ヘリックス構造を形成しているため、シグナルペプチドとしての役割を持っていると考えられた (Fig. 9)。

以上の結果より、本酵素は655アミノ酸残基を持つ前駆体ポリペプチドとして遊離ポリゾーム上で生合成され、リーダーペプチドによるミトコンドリア局在化の際プロテオリティックプロセッシングを受けて、615アミノ酸残基を持つ分子量66,381の成熟サブユニットになると考えられた。

一方、本酵素はミトコンドリアの破壊により部分的に可溶化されるが、完全に可溶化するためには界面活性剤の存在が必要とされている⁹⁾。そこで、本酵素とミトコンドリア内膜との相互作用を検討するため全翻訳領域にわたりハイドロパシーを解析したところ、膜内在性蛋白質に特有な配列は認められなかった。この結果は、肝臓酵素の可溶化の状況ともよく一致していた。

B RVLCADの活性中心

本酵素は、他のアシル-CoA デヒドロゲナーゼとのホモロジー検索の結果 (Fig. 5) より、アミノ酸残基98から433番目に高いホモロジーを認め、この領域にFADや基質との結合部位の存在が示唆された²⁰⁾。Kimら²¹⁾は、X線解析によりRMCADの376番目のグルタミン酸残基が直接触媒的に脱プロトン反応に関与していることを明らかにし、RSCADも同じ位置にグルタミン酸残基を確認している (Fig. 5, ▼)。また、RLCADではこの位置のアミノ酸はグリシンになっているが、構造をモデル解析したところ261番目のグルタミン酸が活性中心になっていることが明らかにされた (Fig. 5 ▽)。本酵素はこの重要な役割を果たすグルタミン酸残基がRMCADと同じ422番目に位置することより、この部位が触媒反応の活性中心であると推定された。

C C-末端側約170アミノ酸残基の役割

本酵素が他の3つのアシル-CoA デヒドロゲナーゼ

とホモロジーのないC-末端側179アミノ酸残基を欠損した酵素を発現させたところ、酵素活性やFADとの結合は認められず、2量体を形成していないことが分かった。このことより、C-末端領域は酵素の高次構造の維持とFADとの結合、さらに酵素の触媒能に不可欠な部分であることが明らかとなった。

D RVLCADの臓器局在

本酵素は、肝臓以外の他の臓器にも広く分布していることが酵素活性の測定とイムノブロット解析で示されている⁶⁾。そこで、AGPC法によりラット肝、腎、肺、心、筋より全RNAを抽出し、³²Pで標識したRVL-57をプローブにノーザンブロット解析を行ったところ、肝、心、筋に相対的に本酵素のmRNAが多く発現していることが分かった (Fig. 10)。また、ラットにDEHPを投与すると肝臓の本酵素は他の臓器の酵素に比べよく誘導されることが認められている⁶⁾。ノーザンブロット解析の結果より、DEHPを2週間投与すると特に肝臓において本酵素のmRNAの著明な増加が認められ (Fig. 10)、肝臓における本酵素の増加は主として転写レベルで調節されていると考えられた。

V 結 語

ラットミトコンドリア内に局在する新しい酵素である極長鎖アシル-CoA デヒドロゲナーゼ (very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase, RVLCAD) cDNAのクローニングを行い塩基配列を決定した。推定アミノ酸を解析したところ、本酵素のサブユニットは655アミノ酸残基の前駆体として合成され、N-末端側に

はミトコンドリア局在化シグナルに特有なアミノ酸配列を持つ40残基のリーダーペプチドが存在していた。前駆体ポリペプチドはこのシグナルによりミトコンドリア内に輸送され、分子量66,381の成熟サブユニットになると考えられた。本酵素のN-末端側はすでに報告されている他の短鎖、中鎖、長鎖アシル-CoA デヒドロゲナーゼときわめて高い類似性を示し、触媒反応の活性中心となるグルタミン酸残基も共通の部位に存在することから、同じスーパーファミリーに属していた。

また、本酵素の全長クローンを大腸菌で発現させ精製を行ったところ、肝臓精製酵素と同一の分子的、触媒的性質を有していた。

本酵素は他の3つのアシル-CoA デヒドロゲナーゼに比べC-末端側に約170のアミノ酸残基を持っていた。そこでこの部分を欠損した酵素を発現させその構造と機能を検討した。その結果、C-末端側約170アミノ酸残基は酵素の構造維持と触媒機能の発現に不可欠であった。

VI 謝 辞

本研究について終始御指導をいただきました本学生化学教室の橋本隆教授、青山俊文助教、上條岳彦先生に深く感謝致します。また、本研究を行う機会を与えて下さり、かつ多々ご援助を賜りました金井正光信州大学名誉教授に感謝の意を表します。

本論文の要旨は、第64回日本生化学会 (1991年10月、東京) で発表した。

文 献

- 1) Lazarow PB, de Duve C: A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proc Natl Acad Sci USA* 73: 2043-2046, 1976
- 2) Hashimoto T: Individual peroxisomal β -oxidation enzymes. *Ann NY Acad Sci* 386: 5-12, 1982
- 3) Lazarow PB, Moser HW: Disorders of peroxisome biogenesis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds), *The metabolic basis of inherited disease*. 6th ed, pp 1479-1509, McGraw-Hill Inc, New York, 1989
- 4) Moser HW, Moser AB: Adrenoleukodystrophy (X-linked). In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds), *The metabolic basis of inherited disease*. 6th ed, pp 1511-1532, McGraw-Hill Inc, New York, 1989
- 5) Coates PM, Tanaka K: Molecular basis of mitochondrial fatty acid oxidation defects. *J Lipid Res* 33: 1099-1110, 1992
- 6) Iwai K, Uchida Y, Orii T, Yamamoto S, Hashimoto T: Novel fatty acid β -oxidation enzymes in rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 267: 1027-1033, 1992

- 7) Uchida Y, Izai K, Orii T, Hashimoto T: Novel fatty acid β -oxidation enzymes in rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 267: 1034-1041, 1992
- 8) Ikeda Y, Okamura K, Tanaka K: Purification and characterization of short-chain, medium-chain, and long-chain acyl-CoA dehydrogenases from rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 260: 1311-1325, 1985
- 9) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467, 1977
- 10) Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970
- 11) Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N: Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354, 1985
- 12) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951
- 13) Markwell MAK, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE: A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 87: 206-210, 1978
- 14) Furuta S, Miyazawa S, Hashimoto T: Purification and properties of rat liver acyl-CoA dehydrogenase and electron transfer flavoprotein. *J Biochem (Tokyo)* 90: 1739-1750, 1981
- 15) Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354, 1979
- 16) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning, a laboratory manual*. 2nd ed, pp 7. 37-7. 52, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989
- 17) Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987
- 18) Roise D, Theiler F, Horvath SJ, Tomich JM, Richards JH, Allison DS, Schatz G: Amphiphilicity is essential for mitochondrial presequence function. *EMBO J* 7: 649-653, 1988
- 19) Roise D, Horvath SJ, Tomich JM, Richards JH, Schatz G: A chemically synthesized pre-sequence of an imported mitochondrial protein can form an amphiphilic helix and perturb natural and artificial phospholipid bilayers. *EMBO J* 5: 1327-1334, 1986
- 20) Matsubara Y, Indo Y, Naito E, Ozasa H, Glassberg R, Vokley J, Ikeda Y, Kraus J, Tanaka K: Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNAs encoding the precursors of rat long chain acyl-coenzyme A, short chain acyl-coenzyme A, and isovaleryl-coenzyme A dehydrogenases. *J Biol Chem* 264: 16321-16331, 1989
- 21) Kim JJP, Wang M, Djordjevic S, Paschke R: The three dimensional structure of acyl-CoA dehydrogenases. In: Coates PM, Tanaka K (eds), *New developments in fatty acid oxidation: Prog Clin Biol Res* 375, pp 111-126, Wiley-Liss Inc, New York, 1992

(4. 11. 27 受稿)