

Title	ACTH作用機構に関する考察, (1) ラット副腎ミトコンドリア分画のステロイド合成に及ぼすcyclic AMPおよびCa <sup>+</sup> の効果, (2) ラット副腎ミトコンドリア分画におけるcyclic AMP- dependent protein kinaseについて
Author(s)	長谷川, 恭一
Citation	大阪大学, 1977, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/31773">https://hdl.handle.net/11094/31773</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">ご参照ください</a> 。

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	はせがわ きょういち 長谷川 恭一
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 3841 号
学位授与の日付	昭和52年3月18日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	ACTH作用機構に関する考察, (1)ラット副腎ミトコンドリア分画のステロイド合成に及ぼす cyclic AMP および $Ca^{+}$ の効果, (2)ラット副腎ミトコンドリア分画における cyclic AMP - dependent protein kinase について
論文審査委員	(主査) 教授 西川 光夫 (副査) 教授 和田 博 教授 松本 圭史

### 論文内容の要旨

#### 〔目的〕

副腎皮質ステロイド合成に対する ACTH の作用機構に関して、ミトコンドリア分画がその律速段階をつかさどることが知られている。一方、ステロイドホルモンを過剰産生する副腎皮質腫瘍には、臨床上、外因性 ACTH に反応するものと反応しないものとが認められる。これらの摘出された腫瘍の切片にて、*in vitro* でステロイド合成を行なわせると、その ACTH および cyclic AMP に対する反応が、*in vivo* の ACTH に対する反応と一致し、さらにこれらの組織のミトコンドリア分画によるステロイド合成の cyclic AMP に対する反応もまた、上の所見と一致する成績が得られた。この知見より、本研究では、ACTH の作用機構として、細胞内伝達物質である cyclic AMP のミトコンドリアに対する作用に注目し、ラット副腎ミトコンドリア分画のコレステロール側鎖切断に対する cyclic AMP および  $ca^{++}$  の効果、さらに、同分画の cyclic AMP - dependent protein kinase について検討し、ACTH 作用機序について考察を加えた。

#### 〔方法ならびに成績〕

(A)ラット副腎ミトコンドリア分画のステロイド合成に対する cyclic AMP の効果

(1) Sprague-1) Dawley 系雄ラットから副腎を摘出し、ミトコンドリア分画を調製した。同分画標品は、電子顕微鏡観察により、純粋な成分よりなることが確認された。この分画を、cholesterol-4-<sup>14</sup>C を基質として、20 mM tris-HCl buffer (pH 7.4), 11.5 mM NaCl, 15.4 mM KCl, 70 mM sucrose, 10 mM sodium succinate を含む反応液中で、37°C, 30 分間反応させ、生成された pregnenolone-4-<sup>14</sup>C, および progesterone-4-<sup>14</sup>C を、薄層クロマトグラフィー (2 回) にて分離精製し測

測定した。この反応液に cyclic AMP ( $5 \times 10^{-5} \sim 5 \times 10^{-4}$  M) を加えると、上記ステロイドの合成が増加することが認められた。

(2) 反応液に  $\text{CaCl}_2$  (1 mM) を添加することにより、さらに低濃度の cyclic AMP ( $5 \times 10^{-6} \sim 5 \times 10^{-5}$  M) が有効であった。

(3) cyclic AMP ( $5 \times 10^{-6}$  M) のステロイド合成促進作用は、反応液の  $\text{Ca}^{++}$  濃度の変動 ( $10^{-6} \sim 10^{-3}$  M) により著明に影響を受けた。

(B) ラット副腎ミトコンドリア分画の cyclic AMP- dependent protein kinase について

(1) 本酵素活性測定は、各細胞内分画を、histone, ATP-  $\gamma$ - $^{32}$ P とともに、4.1 mM phosphate buffer (pH 6.5), 10 mM magnesium acetate, 0.3 mM EGTA, 10 mM sodium fluoride を含む反応液中で、cyclic AMP を適宜加え、30°C で5分間反応させ、蛋白にとりこまれた $^{32}$ P を測定した。従来活性の存在が認められている可能性およびミクロソーム分画の他に、ミトコンドリア分画にも cyclic AMP に反応する protein kinase 活性が認められた。

(2) ミトコンドリア分画に認められた protein kinase 活性が他の分画の混入によるものか否かを検討するため、各分画の標識酵素活性 ( $21\alpha$ -hydroxylase, G 6 P- DH,  $\beta$ -glucuronidase,  $11\beta$ -hydroxylase) を測定し、protein kinase 活性と比較した。ミクロソームおよび可溶性分画の混入は否定的であったが、リゾソームの標識酵素として測定した  $\beta$ -glucuronidase 活性は若干認められた。

(3) 上記リン酸化反応を histone を加えずに行なうこと、ミトコンドリア分画は、それ自体の蛋白にリン酸をとりこむことが認められた。この反応は短時間で終了し、そのリン酸とりこみ総量は cyclic AMP によって増加しなかった。

(4) リン酸化されたミトコンドリア蛋白を、SDS- polyacrylamide ゲルにて電気泳動を行なうと、著明にリン酸化され、cyclic AMP に影響されないピークと、その陽極側に泳動され、cyclic-AMP によりリン酸化の増加する部分とがみられた。

[総括]

ラット副腎ミトコンドリア分画による、外因性コレステロールからのステロイド合成反応は、cyclic AMP により促進され、この cyclic AMP に対する反応性は、反応液中の  $\text{Ca}^{++}$  濃度に影響された。

同分画には固有の cyclic AMP- dependent protein kinase が存在し、この酵素により同分画自体の蛋白がリン酸化されることが示された。

以上認められたラット副腎ミトコンドリア分画の代謝動態に対する cyclic AMP の作用は、これを一連の反応として考えるとき、ACTH の作用機構の一つの新しいとらえ方を示唆するものと思われる。

### 論文の審査結果の要旨

ACTH は cyclic AMP を細胞内伝達子として、その作用を発揮していると考えられている。しか

し、cyclic AMP がどのような機序でステロイド産生を促進しているかはわかっていない。本研究は、臨床上観察され、手術によって得られた ACTH 反応性ならびに不反応性腫瘍の試験管内実験の成績にもとづき、cyclic AMP がミトコンドリア分画に直接作用し、ステロイド合成を刺激する可能性を示唆した。これは副腎皮質細胞での cyclic AMP の作用形式としては全く新しいとらえ方であり、ACTH の作用機構の解明に一つの方法を示したものとして評価される。