



Title	ステロイド代謝酵素系の研究
Author(s)	中村, 裕
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/32847
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名・(本籍)	なか 中	むら 村	ゆたか 裕
学位の種類	薬	学	博士
学位記番号	第	5067	号
学位授与の日付	昭和55年9月13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	ステロイド代謝酵素系の研究		
論文審査委員	(主査) 教授 青沼 繁		
	(副査) 教授 岩田平太郎 教授 鎌田 皎 教授 三浦 喜温		

論 文 内 容 の 要 旨

緒 言

ステロイドホルモンは、副腎で生合成され血中に分泌されてホルモンとしての働きをした後、肝臓で代謝されて、尿あるいは胆汁を経由して排泄される。従って、その生合成及び異化に関する酵素系は、極めて複雑であり、水酸化酵素、加水分解酵素、脱水素酵素、異性化酵素及び抱合酵素等の関与が知られている。このようなステロイドホルモンの生合成系を含めた代謝酵素系についての知見を深めることから、将来、諸種のステロイドホルモンの生合成や、代謝の異常等の原因の解明や、又、治療のためにも何らかの足がかりが得られるかも知れないと考えられたので、副腎のステロイドホルモンの合成系の中から、ステロイド 11β -、 18 -水酸化酵素系を、又、肝での *testosterone* や *androstenedione* の水酸化に関与するミクロソームの酵素系を選んでその性質を検討した。

(A) 副腎のステロイド 11β -、 18 -水酸化酵素系

(a) 細胞内分布

11β -水酸化酵素は、ミトコンドリア画分に存在する事が知られていたが、 18 -水酸化酵素の細胞内分布は検べられていなかったので検討した結果、主に、ミトコンドリア画分に活性がある事が明らかとなった。(第I表)又、この時、上清画分をミトコンドリアに添加すると水酸化酵素活性が強く促進され、上清に活性化因子の存在が認められた。

(b) Liver factor (LF)

副腎の上清に存在する因子と同様な作用を示す因子が肝の上清にも存在し、又、加熱処理(100℃7')にも安定であることがわかったので入手し易い肝からの精製を試みた。即ち、ラット肝ホモジ

第 I 表

11 β - AND 18-HYDROXYLASE ACTIVITIES IN RAT-ADRENAL SUBCELLULAR FRACTIONS

Reaction medium contained 1 mg 11-deoxycorticosterone (dissolved in 0.1 ml propylene glycol), 100 mg adrenal tissue preparation, 0.8 mg TPN, 3 mg potassium glucose 6-phosphate, 1 Kornberg unit of glucose-6-phosphate dehydrogenase, 8 mM MgCl₂, 40 mM Tris buffer (pH 7.4) in a volume of 5 ml. Incubation was carried out for one hour at 37° in a Dubnoff type incubator with constant shaking. Gas phase: O₂-CO₂ (95:5) mixture.

Subcellular fraction	Products	
	18-OH-DOC* (ng)	Corticosterone (11-Hydroxylated) (μ g)
Whole homogenate	323	383
Nuclear fraction	42	40
Mitochondrial fraction	85	85
Microsomal fraction	2	2
Soluble fraction	2	2
Nuclear fraction plus soluble fraction	140	160
Mitochondrial fraction plus soluble fraction	285	330
Microsomal fraction plus soluble fraction	85	95
Mitochondrial fraction plus heated soluble fraction**	158	160

* 18-Hydroxy-11-deoxycorticosterone (18 \rightarrow 20 hemiketal).

** Heated in boiling water bath for 6 min.

ネートの 5,000 \times g 上清を加熱処理し、続いてトリクロル酢酸で処理して得られる沈殿を TEAE-cellulose カラムクロマトグラフィー, DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィー, Sephadex G-50カラムクロマトグラフィーで精製した。こうして精製した標品は、ミトコンドリアの11 β -, 18-水酸化酵素活性を強く促進する (第 II 表)

第 II 表

Stimulating effect of various LF preparations on steroid 11 β - and 18-hydroxylase activities in acetone dried rat adrenal mitochondria.

LF preparations	18-OH-DOC + Corticosterone	
None	0	20 μ g
Boiled liver ex. TCA* precipitate	2 mg	130
DEAE cellulose purified LF	40 μ g	160

* TCA; trichloroacetic acid.

又, LFはトリプシン,あるいはPronaseとインキュベーションすると失活するので蛋白質と考えられたが,精製したLFの吸収スペクトルは,図1に示すように極めて特徴的なUV吸収スペクトルを持つが,これは,その構成アミノ酸にもtryptophanを含まないので,tyrosineやphenylalanine

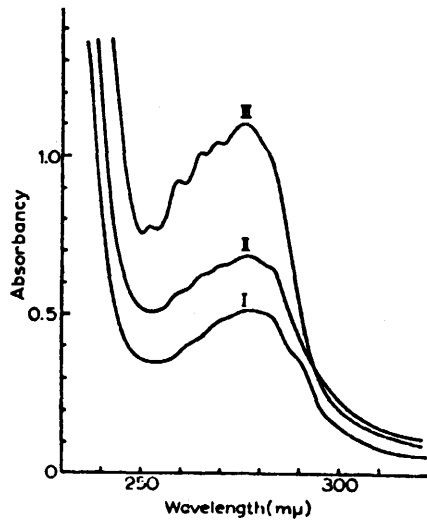


図1 Absorption spectra of several liver factor preparations obtained at various purification stages I, TEAE preparation: II, DEAE preparation: III, Sephadex preparation (see text).

に基づくものと考えられる。

(c) Soluble fraction component (SF)

LFの存在下、ミトコンドリアにラット副腎の上清を添加すると、更に活性の上昇が認められた(第III表)ので、副腎上清にLF以外に、もう一つ別の因子(SF)の存在が推定された。

第III表

Stimulation of steroid 11 β - and 18-hydroxylase activities in rat adrenal mitochondria by adrenal soluble fraction component.

	18-OH-DOC	Corticosterone
Mito. [*]	28 μ g	33 μ g
Mito. + soluble fr. ^{**}	102	120
soluble fr. ^{**}	0	0
Lyophilized Mito. ^{***}	23	28
Lyophilized Mito. ^{***} + soluble fr.	65	80

^{*}Mito: Mitochondria(30 mg tissue corresponding).

^{**}30 mg tissue corresponding.

^{***}3 mg

DEAE cellulose purified LF(100 μ g) was added in all incubations.

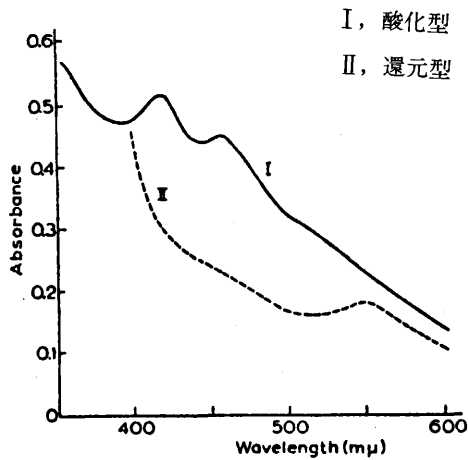


図2 SFの吸収スペクトル

そこでSFを、副腎ホモジネート 5,000×g 上清から、硫酸アンモニウム40~80%飽和沈殿、DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィー、ハイドロキシルアパタイトカラムクロマトグラフィーで精製し、図2に示すような特有の吸収スペクトル(λ max 275, 325, 416 nm)を有する褐色の標品を得た。SFはNa₂S₂O₄で還元すると、上記のλ max は消失し、新たに550nm付近にλmaxが現れる。これらの性質は、鈴木等がウシ副腎より部分精製した11β-水酸化酵素系の構成成分の1つである非ヘム鉄蛋白質とよく類似している。なお、精製したSFはミトコン

ドリアの11β-, 18-水酸化酵素活性を強く促進するが、大過剰のSFを添加した時にはLFの促進効果は弱くなる(IV表)。

第IV表

Stimulating effect of SF on steroid 11β- and 18-hydroxylase activities in rat adrenal mitochondria.

SF*	LF**	18-OH-DOC	Corticosterone
0	100 μg	30 μg	35 μg
0.02	--	80	95
0.10	--	150	180
0.02	100	121	150
0.10	100	180	195

Lyophilized rat adrenal mitochondria(4 mg) was incubated with or without SF and LF under usual condition.

*The quantity of SF was expressed as the absorbance at 416 nm.

**DEAE cellulose purified preparation.

(d) SF-reductase

次に、凍結乾燥した副腎ミトコンドリアを 0.01 M Tris 緩衝液で抽出すると、更に1つの構成成分が抽出された(第V表)。

この成分を DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィー、ハイドロキシルアパタイトカラムクロマトグラフィーで精製すると、フラビン蛋白質に特徴的な吸収を持つ活性物質が得られた(図3)。SFにこの標品とNADPHを加えるとSFは速やかに還元され、あらかじめNa₂S₂O₄で還元した時と類似のスペクトルを示す。即ち、この標品はNADPHから電子をSFに渡して還元する働きを持つ

第 V 表

RESOLUTION OF MITOCHONDRIAL ENZYMES INTO TWO COMPONENTS

Enzyme preparation	Hydroxylated steroid (μg)	
	18-Hydroxydeoxy-corticosterone	Corticosterone
L-R-Mito*	96	116
R-Mito _{ex} **	6	4
R-Mito _{res} ***	2	2
R-Mito _{ex} +R-Mito _{res}	84	110

*Lyophilized rat-adrenal mitochondria (3 mg).

**Extract from 3 mg of lyophilized rat-adrenal mitochondria.

***Extracted residue of 3 mg of lyophilized rat-adrenal mitochondria.

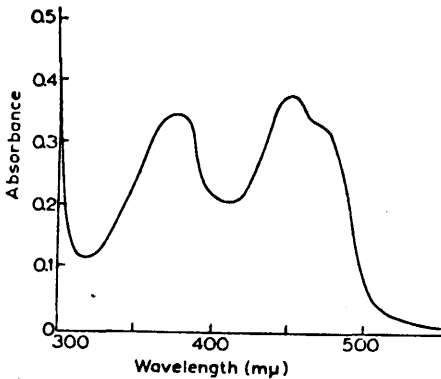


図3 SF-reductase のスペクトル吸収

ているので、SF-reductase と名付けた。

こうして副腎ステロイド 11β -、18-水酸化酵素系の構成成分として、SF, SF-reductase, ミトコンドリア残渣 (Mito res.) 及び LF (LF そのものは副腎由来ではないが、類似の物質が副腎上清中に存在する) を各々分ける事ができたので、次に各々の因子の役割を知るため再構成を試みた。

即ち、ラットの場合と同様の方法でブタ副腎からも SF-reductase, SF, 及びミトコンドリア残渣を調製し、ラット副腎のこれら因子と組合わせて 11β -18-水酸化酵素系を再構成した。ブタ副腎のミトコンドリア残渣を使用した時は、他の構成成分はラット

あるいはブタ由来に関係なく、生成する corticosterone/18-OH-DOC の比は、7.1~7.7 になった。又、ラット副腎のミトコンドリア残渣を使用した時には、SF 及び SF-reductase は、ラットあるいはブタ由来に関係なく、corticosterone/18-OH-DOC の比は大よそ 1.1 前後となる (第 VI 表)。即ち、水酸化の位置を決める酸素はミトコンドリア残渣中にあり、SF, 及び、SF-reductase は、単に NADPH から電子をミトコンドリア残渣中の成分に渡す電子伝達系の役目をしている事が明らかになった。

以上の実験から、 11β -、18-水酸化酵素系の各成分のつながりを図 4 のように仮定した。

その後の実験より、現在では、ミトコンドリア残渣中にはチトクローム P-450 が存在している事が

第VI表

RECONSTITUTION OF RAT AND PORCINE ADRENAL STEROID HYDROXYLASE SYSTEM

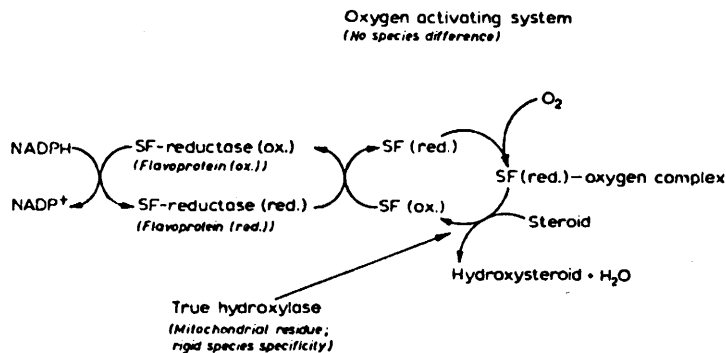
Enzyme preparation	Hydroxylated steroid (μg)		B/A
	18-Hydroxydcoxy-corticosterone (A)	Corticosterone (B)	
L-R-Mito* (2 mg) + R-SF** (0.1)	242	275	1.14
L-R-Mito _{res} (3 mg) + R-SF (0.1)	40	47	1.17
L-R-Mito _{res} (3 mg) + R-SF (0.1) + R-SF-reductase*** (60 μg)	340	368	1.08
L-R-Mito _{res} (3 mg) + P-SF** (0.1) + P-SF-reductase**** (150 μg)	46	438	1.05
L-P-Mito (100 mg) + P-SF (0.1)	46	330	7.2
L-P-Mito _{res} (50 mg) + P-SF (0.1)	15	113	7.6
L-P-Mito _{res} (50 mg) + P-SF (0.1) + P-SF-reductase (150 μg)	35	248	7.1
L-P-Mito _{res} (50 mg) + R-SF (0.1) + R-SF-reductase (60 μg)	22	167	7.7

* L-R-Mito:: lyophilized rat-adrenal mitochondria.

** The quantities of rat SF (R-SF) and porcine SF (P-SF) are expressed as the absorbance at 416 m μ . L-R-Mito_{res}: lyophilized extracted residue of lyophilized rat-adrenal mitochondria. L-P-Mito: lyophilized porcine adrenal mitochondria. L-P-Mito_{res}: lyophilized extracted residue of lyophilized porcine adrenal mitochondria.

*** R-SF-reductase: rat SF-reductase.

**** P-SF-reductase: porcine SF-reductase.



⊠ 4 Postulated mechanisms of action of steroid 11 β - and 18-hydroxylase system.

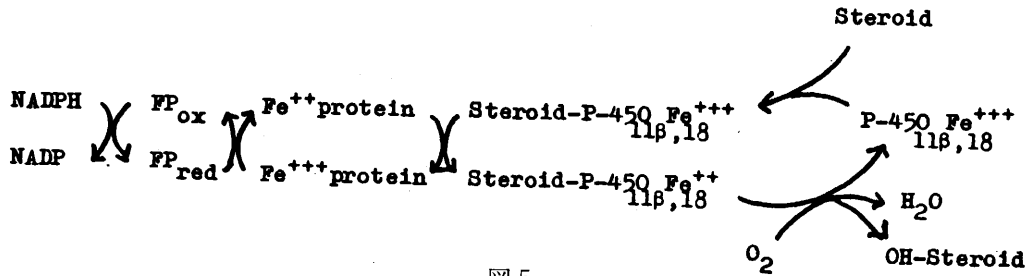


図 5

明らかとなっており、 11β -、 18 -水酸化酵素系の作用の様式は、図5のように考えられている。

即ち、チトクロームP-450 11β , 18Fe^{+++} がまずステロイドと結合し、次に、その結合物が電子伝達系から電子を受取ってステロイドP-450- Fe^{++} となり、これが酸素と反応してOH-ステロイド、 H_2O 及び P-450- Fe^{+++} を生成し、P-450- Fe^{+++} は再びステロイドと結合して次々と水酸化反応を続ける。

なお、LFの関与についてはここでは不明であるが、先にも述べたようにSFが過剰にある時にはLFの作用は弱くなり、又、図5に示したようなP-450を不溶化した系では、界面活性剤やリン脂質の存在が必要となっているので常に添加してあり、従って、LFの関与が必要でなくなっているが、生理的な条件下では恐らく、LFも 11β -、 18 -水酸化酵素系の活性制御因子の1つとして働いているものと考えられる。

(b) ラット肝ミクロソームのステロイド水酸化酵素系について

(Phenobarbital の induction 作用を中心として)

これまでラット肝ミクロソーム(Ms)のandrostendione やtestosterone 水酸化酵素活性については種々検討されてきており、そのほとんどがチトクロームP-450系で触媒される事、他の薬物等の代謝酵素系と性質がよく似ているので、同じP-450がステロイドの代謝及び異物代謝双方を触媒するのだろうと言われている。ところが、これまでの報告は必ずしも検討の条件が充分でなかったり不正確なものがあったりしたので、まず基本的な代謝物とphenobarbital (PB) 投与が及ぼす影響について検討した。

(a) Androstenedione (Δ^4 -A-dione) 水酸化酵素活性

これまで、ラット肝Msには、 Δ^4 -A-dioneの水酸化活性としては 6β -、 7α -、 16α -が主で、外に、 6α -、 15α -、 18 -位等も水酸化されると言われてきたが、 16β -位の水酸化酵素活性については、ほとんど報告がない。又、PB投与の影響の検討もされているが、その場合も、 6β -、 7α -、 16α -水酸化のみが検討されたにすぎない。ところが、PB前処置ラット肝Msを Δ^4 -A-dioneとインキュベートした時の最も多いUV吸収性の代謝物は図6に示す通りIVで、この代謝物は正常ラット肝Msと Δ^4 -A-dioneをインキュベートした時には、ほとんど生成しなかった。従ってIVはPB前処置ラット肝Msに特徴的な代謝物である。IVは、

- ① TLC上の移動度が 16α -OH- Δ^4 -A-dioneより若干小さい
- ② マススペクトルは M^+ , 302($\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_3$)

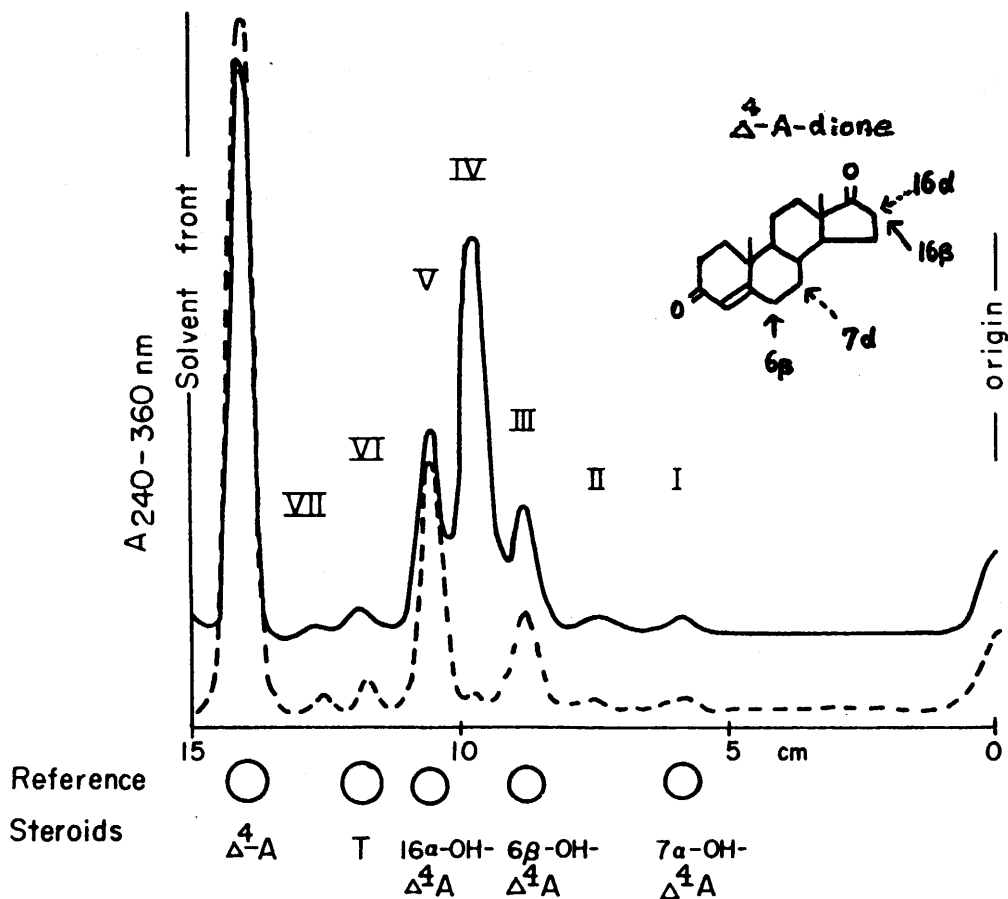


図6 正常ラット肝Ms(---)あるいはPB前処置ラット肝Ms(—)と Δ^4 -A-dioneをインキュベートした時の抽出物のTLC-Scannogram 展開溶媒, CH_2Cl_2 : acetone (4:1V/V)

- ③ Blue tetrazolium 反応は陽性 (Ketol の存在を示す)
- ④ NaBH_4 還元で 16β -OH-testosteroneを与える
- ⑤ 不安定で容易に異性化し若干極性の低いIVへと変化する

以上の性質より、次のように同定した。IV; 16β -OH- Δ^4 -A-dione, IV a; 16-Keto-testosterone
 正常ラット肝Msを Δ^4 -A-dioneとインキュベートした時の生成物は 16α -OH- Δ^4 -A-dioneが最も多く、次いで 6β -OH- Δ^4 -A-dioneが多い。外に、 7α -OH- Δ^4 -A-dione、及びtestosteroneも若干生成する。一方、PB投与ラット肝Msでは 16β -OH- Δ^4 -A-dione (IV)が最も大量に生成し、 16α -OH- Δ^4 -A-dioneは 16β -体の $\frac{1}{2}$ 位しか生成しない。即ち、PB前処置ラット肝Msには、正常ではほとんどなかった 16β -水酸化酵素活性が最も強くなる。これは、これまで認められていなかった新知見である。

(b) Testosterone 水酸化酵素活性

Δ^4 -A-dione 16β -水酸化酵素活性がPBで誘導されてくるので、次に、testosteroneにもこの酵素が作用し得るか否かを検討した。まず、正常ラット肝 Ms での testosterone の主な代謝物は 16α -OH-T (I), 2α -OH-T (IV), 6β -OH-T (II) 及び Δ^4 -A-dione である。一方、PB 投与ラット肝 Ms では、その外に 16β -OH-T (III), 16β -OH- Δ^4 -A, 16α -OH- Δ^4 -A, 7α -OH-T が生成してくる。

正常ラット肝 Ms と testosterone をインキュベートした時の主な水酸化の位置は、これまでの報告によれば 16α -、 6β -、 7α -、 2β -とされている。又、最近、Wentzel 等は 2α -水酸化も起る事を報告しているが、他の水酸化酵素活性との比較がされていなかった。従ってこれまでは 2α -水酸化活性がどの程度重要なのかはわからなかったが、図7で見る限り 16α -水酸化酵素活性に次ぐ強さで存在し、かなり重要な活性である事がわかる。PB 投与ラット肝 Ms の testosterone 代謝酵素系の特徴は、1つは 16β -水酸化酵素活性が誘導されてきている事であり、もう1つは Δ^4 -A-dione とその代謝物の和がふえている点である。後者は PB 投与により、testosterone から Δ^4 -A-dione への反応が促進されている事を意味する。正常ラット肝 Ms では 2β -OH-T はほとんど生成しないので、 2β -OH-T が生成したと言うこれまでの報告は誤りである可能性が強い。

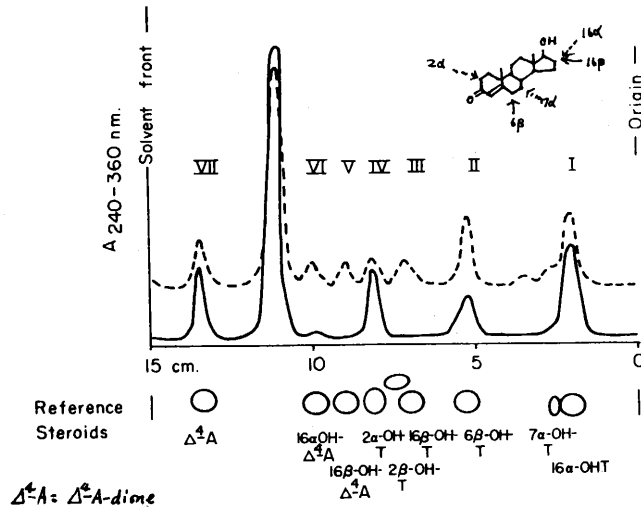


図7 正常ラット肝 Ms (---) あるいは PB 前処置ラット肝 Ms (—) と testosterone をインキュベートした時の生成物の TLC-scannogram 展開溶媒, CH_2Cl_2 :acetone (4:1 V/V)

次に、epitestosterone (17α -hydroxy-4-androsten-3-one) の代謝物について検討した所、正常ラット肝 Ms では 16α -OH-epiT (V) と Δ^4 -A-dione (IX) が主な生成物であり、外に若干、 6β -OH-epi-T らしい化合物が生成する。一方 PB 投与ラット肝 Ms における最も著しい差異は Δ^4 -A-dione 及びその代謝物 (16α -OH- Δ^4 -A-dione, 16β -OH- Δ^4 -A-dione, 6β -OH- Δ^4 -A-dione) の生成量が増加している点と、 16β -OH-epi-T の生成が正常ラット肝 Ms ではほとんど認められないのに、PB 投与ラット肝 Ms では 16α -OH-epi-T に次ぐ主要な代謝物の1つになっている点である。PB で誘導された 16β -水酸化酵素は Δ^4 -A-dione のみならず、testosterone、及び epitestosterone をも水酸化する。

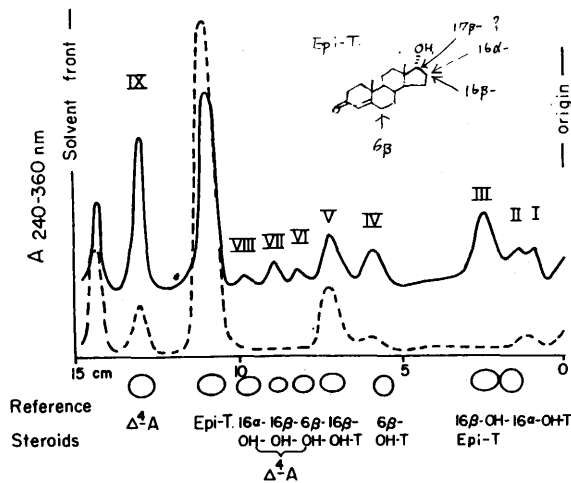


図8 正常ラット肝 Ms (---) あるいは PB 前処置ラット肝 Ms (—) と Epitestosterone をインキュベートした時の生成物の TLC-scannogram 展開溶媒, CH_2Cl_2 :acetone (4:1 V/V)

第Ⅶ表

Androstenedione formation from epitestosterone in
phenobarbital pretreated rat liver microsomes

Co factors	Gas phase	Androstenedione formed n moles/mg protein/min
NAD (3 mg)	air	0
NADP (3 mg)	air	0
NADPH-generating system	air	1.74
NADPH-generating system	evacuated	0
NADPH-generating system	$\text{CO}:\text{O}_2$ (4:1)	0.50

Phenobarbital pretreated rat liver microsomes

(4.8 mg protein) were incubated with NAD, NADP or NADPH-generating systems as described in method.

(d) Epitestosterone から Δ^4 -A-dione 生成反応の機構の検討

C_{19} -ステロイドの17位の水酸基の Ketone への酵素的な酸化はこれまで脱水素酵素で触媒されると言われてきており, この反応に酸素添加酵素が関与するという報告はほとんどなかった。しかし最近, Shi verich が肝 Ms から可溶化したチトクローム P-450 が testosterone から Δ^4 -A-dione の生成を触媒すると報告している。

Epi-T から Δ^4 -A-dione の生成が PB 前処置で著しく増加するが, 通常 PB で誘導されるのはチトクローム P-450 系の酸素添加酵素系が多いので, まずこの反応の補酵素要求性を検討した所, NAD, NADP を添加しても epi-T から Δ^4 -A-dione の反応は進行せず, NADPH の添加と酸素が必要な事がわかった (第Ⅶ表)。又, この反応は一酸化炭素で阻害されるので, チトクローム P-450 系の酸素添加酵素による反応と考えられた。もし, 酸素添加酵素によって epi-T から Δ^4 -A-dione の反応が進行

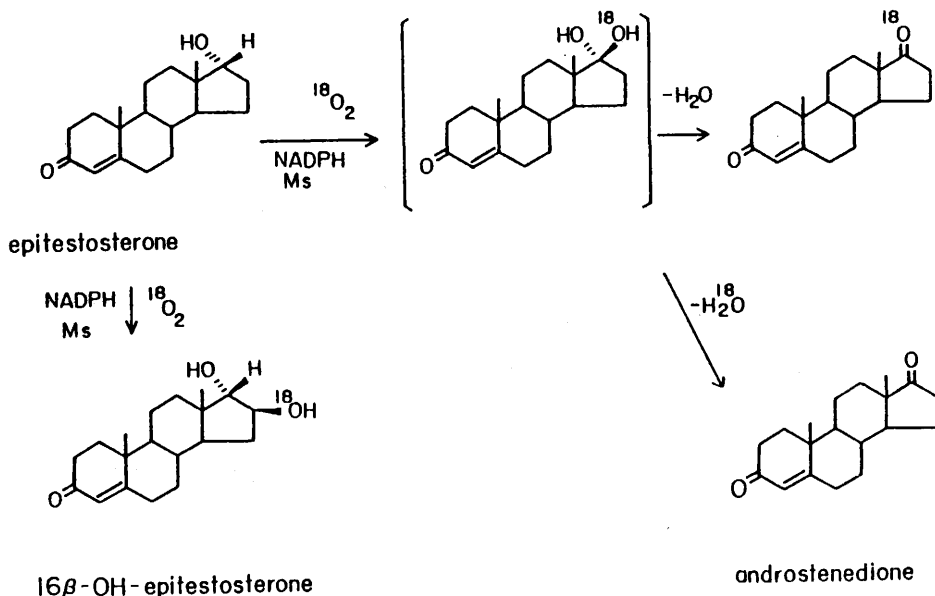


図9 酸素添加酵素による epi-T から Δ^4 -A-dione を生成する反応の予想される機構

するのなら、途中で少なくとも1度は気相の酸素が epi-T の中に取り込まれるだろうと推定され、その場合、反応機構として図9のような scheme が考えられた。即ち、まず epi-T の 17β -位に水酸化が起り不安定な中間体 17α -, 17β -gem-diol が生成する。続いてこのものの脱水が起って Δ^4 -A-dione を生成する機構である。もし、インキュベーションの際に気相を $^{18}\text{O}_2$ に置換しておくと、 Δ^4 -A-dione の 17 位に ^{18}O が取込まれるはずなので、この点をマススペクトルで検討した所、生成した Δ^4 -A-dione の中には ^{18}O が大よそ 5.5% 取込まれていたが、同時に、単離した 16β -OH-epi-T 中には ^{18}O が約 70% 含まれていた (図10)。もし、 17α -, 17β -gem-diol から脱水する際に、双方から均等に脱水するなら生成した Δ^4 -A-dione 中の ^{18}O 含量は 35% になるはずであるが、実際は 55% の ^{18}O の取込みが認められたのだから、脱水は 17α -, 17β -の双方から均等に起るのではなく、 17α -OH 基が立体選択的進行するもと考えられた。

以上、ステロイドの肝 Ms における代謝系について要約すると、次のようになる。

- ① PB 投与により、androstenedione, testosterone, 及び epitestosterone の 16β -水酸化酵素活性が選択的に誘導されて著しく上昇する。
- ② 正常ラット肝 MS の testosterone 水酸化酵素活性の主なものは、 16α -, 2α -, 6β -水酸化酵素活性であり、外に androstenedione 生成活性も存在する。
- ③ Epitestosterone から、androstenedione を生成する酵素活性が PB 前処置により著しく誘導されるが、この酵素は 17α -hydroxy steroid oxidoreductase ではなく、NADPH 酸素を必要とする酸素添加酵素である。その作用機構について検討した結果、一度 17β 位に水酸化が起り、その後 17α -水酸基が立体選択的に脱水して androstenedione を生成すると考えられた。

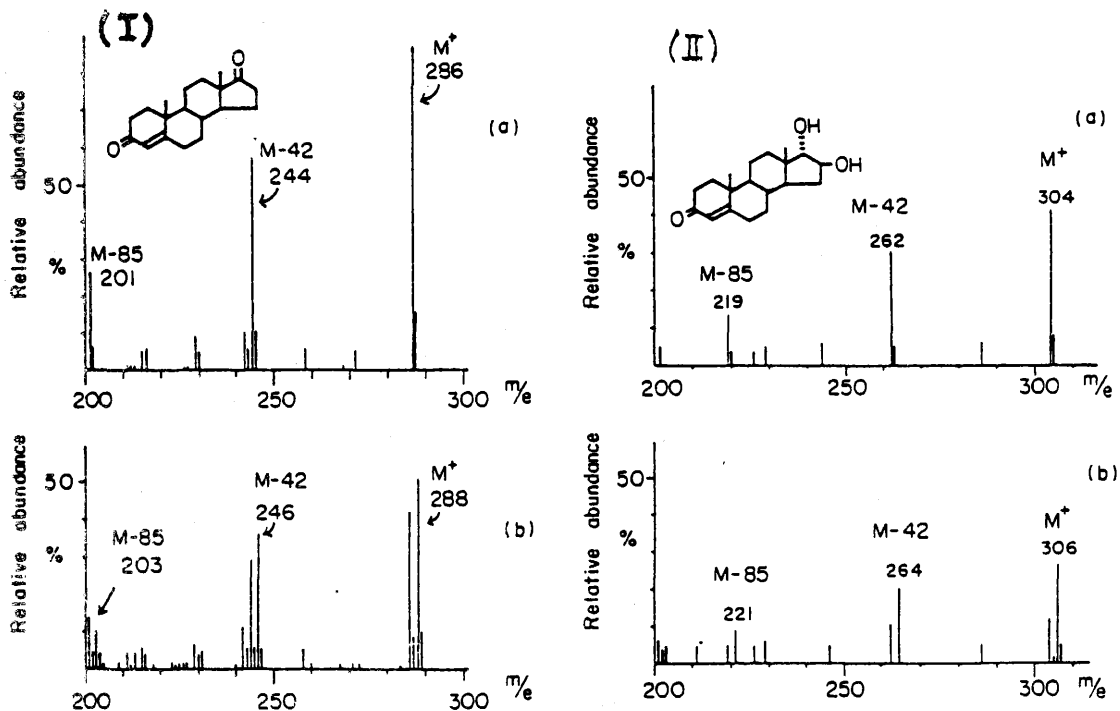


図10 16β-OH-epi-T 及び Δ⁴-A-dione のマススペクトル

I a, epi-TとPB前処置ラット肝 Ms とのインキュベーションにより生成した Δ⁴-A-dione

II a, 16β-OH-epi-T の標準品

I b及び II b, 気相を¹⁸O₂:He(1:9)に置換してPB前処置ラット肝 Ms とインキュベートした時に生成した Δ⁴-A-dione 及び16β-OH-epi-T

これまでPBの酵素誘導作用については、比較的选择性が低く種々の酵素活性を上昇させる作用があるとされてきているが、少なくとも androstenedione 16β-水酸化酵素活性の誘導に関する限り選択性は非常に高い。従って、この酵素の誘導の研究を進める事は、PBの酵素誘導作用の選択性、P-450種の多様性、等々の問題の解決のため役立つものと考えられる。

論文の審査結果の要旨

ステロイドホルモンの生合成系を含めた代謝酵素系についてその生合成、代謝異常等の原因の解明、治療のための足がかりを得る目的で副腎のステロイドホルモンの合成系の中から、ステロイド11β-, 18-水酸化酵素系を、又、肝での testosterone や androstenedione の水酸化に関与するミクロソームの酵素系を選んでその性質を検討し、Liver factor (LF) Soluble fraction component (SF), (SF), SF-reductase を抽出し、それぞれの存在の意義を再構成によって確め、一方 phenobarbital の酵素誘導作用について androstenedione 16β-水酸化酵素活性の誘導に関する限り、選択性が非常

に高いことを認めた。

よって、薬学博士として価値ある論文と認める。