

Title	ウシ副腎皮質アドレノドキシシンとNADPH-アドレノドキシシン還元酵素およびシトクロムP-450sccとの相互作用に関するスピララベル法による研究
Author(s)	三浦, 洸
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/32914">http://hdl.handle.net/11094/32914</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

[45]

氏名・(本籍)	三 浦 洸
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 5169 号
学位授与の日付	昭和56年2月24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	ウシ副腎皮質アドレノドキシニンとNADPH-アドレノドキシニン還元酵素およびシトクロムP-450 <sub>scc</sub> との相互作用に関するスピラベル法による研究
論文審査委員	(主査) 教授 山野 俊雄 (副査) 教授 萩原 文二 教授 田川 邦夫

## 論文内容の要旨

### [目的]

副腎皮質ミトコンドリアには、NADPH→アドレノドキシニン還元酵素→アドレノドキシニン→シトクロムP-450 から成る電子伝達系が存在しており、ステロイド水酸化反応を触媒している。とくに、このステロイド水酸化反応によるコレステロールの側鎖切断(side chain cleavage)は、コレステロールから種々のステロイドホルモンが合成される際の第一段階であり、かつ律速段階であって、個体のステロイドホルモン系の均衡保持のための役割を果している。このステロイド水酸化系の基質特異性を決定するのはシトクロムP-450であり、コレステロール側鎖切断反応には、シトクロムP-450<sub>scc</sub>が関与することが知られている。この系における電子伝達や、触媒能発現には、各成分間の会合と相互作用が不可欠であって、その相互作用を調べることは、電子伝達機構、触媒作用機構を知る上で意義深い。本研究では、以上の観点から、アドレノドキシニンとNADPH-アドレノドキシニン還元酵素、(以下、AdRと略する)およびシトクロムP-450<sub>scc</sub> (以下、P-450<sub>scc</sub>と略する)との相互作用を調べた。

### [方法ならびに成績]

ウシ副腎皮質アドレノドキシニンを、二種のスピラベル試薬すなわちN-(1-オキシル-2,2,5,5-テトラメチル-3-カルボニルピロリニル)イミダゾール(以下(I)と略)およびN-(1-オキシル-2,2,6,6-テトラメチル-4-ピペリジニル)マレイミド(以下(II)と略)によってスピラベルした。(I)によるスピラベル化では、アドレノドキシニン1分子あたり二つの部位がスピラベルされたのに対し、(II)では1分子あたり一つの部位がスピラベルされた。いずれの場合も、スピラベルスピンのEPRスペクトルは典型的なタンパク

質結合型のパターンを示した。NADPH→AdR→アドレノドキシシ→シトクロム c の電子伝達活性は、アドレノキシシの(I)または(II)による標識化によって低下しなかった。(I)によって標識したアドレノドキシシのEPRスペクトルを種々の条件下に測定し、標識スピンのみかけの回転相関時間( $\tau_c$ )を求めた。すなわち、10mMリン酸カリ緩衝液中の $\tau_c$ は、 $2.1 \times 10^{-9}$  secであったのに対し、タンパク変性剤である塩酸グアニジン(7M)を共存させても、 $\tau_c$ は $1.9 \times 10^{-9}$  secで、塩酸グアニジンが存在しない時に比べて変化は少い。しかし、塩酸グアニジン(6M)の他に、強力なSH試薬クロルメロドリが過剰量共存すると $\tau_c$ は $1.5 \times 10^{-9}$  secとかなり小さくなり、しかも、クロルメロドリのみが共存する場合の $\tau_c$ ( $1.4 \times 10^{-9}$  sec)とほとんど同じである。クロルメロドリには、アドレノドキシシの鉄イオウ中心を除く作用があることを考慮すると、上の結果は次の二つのことを示唆している。すなわち、(1)鉄イオウ中心は、アドレノドキシシの構造維持に寄与している、(2)標識スピンの運動性は鉄イオウ中心によって影響を受けやすく、したがって、おそらく、標識スピンは鉄イオウ中心近くに位置している。

(I)または(II)によってスピン標識したアドレノドキシシにAdRを共存させると、EPRスペクトルに、より遅い回転をするスピンによる成分の出現が観測された。このより遅く回転する成分のもともあった、より速い回転成分に対する比を両タンパク質のモル比(AdR/標識アドレノドキシシ)に対してプロットすると、モル比が約1.0のところでは飽和する滴定曲線が得られた。したがって、アドレノドキシシとAdRは1:1の複合体を形成し、それに伴い、標識スピン周辺、したがって、鉄イオウ中心付近のマイクロコンホメーションが変化することが示唆される。同様に、(I)でスピン標識したアドレノドキシシに、P-450<sub>sec</sub>を共存させて、EPRスペクトルを測定したところ、標識スピンの回転運動がより阻害された成分が出現した。この遅い回転成分のより速い成分に対する比を両タンパク質のモル比(P-450<sub>sec</sub>/アドレノドキシシ)に対してプロットすると、モル比が約1.0のところでは飽和する曲線が得られ、アドレノドキシシとP-450<sub>sec</sub>の1:1の複合体形成が示唆される。また、標識スピンの運動性の変化から、複合体形成により、標識スピン周辺、したがって、鉄イオウ中心付近のマイクロコンホメーション変化がひきおこされることも示唆される。

#### [総括]

- 1) アドレノドキシシを、その活性を低下させることなくスピン標識することができた。
- 2) この標識スピンをプローブとして、そのEPRスペクトルを種々の条件下に測定することによって、以下のことが示唆された。
  - a) アドレノドキシシの鉄イオウ中心は、そのタンパク構造維持に寄与している。
  - b) アドレノドキシシとアドレノドキシシ還元酵素は、1:1の複合体を形成する。
  - c) アドレノドキシシとシトクロムP-450<sub>sec</sub>も1:1の複合体を形成する。
  - d) 上記二種の複合体形成に伴い、アドレノドキシシの鉄イオウ中心付近のマイクロコンホメーション変化がひきおこされる。

## 論文の審査結果の要旨

本論文は副腎皮質ステロイドホルモン生合成の第一段階のコレステロール側鎖切断反応に関与する電子伝達成分（アドレノドキシ還元酵素→アドレノドキシ→シトクロムP-450<sub>scc</sub>）間の相互作用を調べたものである。スピン標識法を功妙に適用することによってアドレノドキシ還元酵素とアドレノドキシ、アドレノドキシとP-450<sub>scc</sub>の二種の2者複合体形成を明らかにすると同時に、それら複合体におけるアドレノドキシの結合部位は二つの複合体において共通であることを示した。この結果は、電子伝達機構として、3者複合体形成による伝達ではなく、二つの2者複合体によるshuttling機構を支持するものである。本論文はコレステロール側鎖切断反応、ステロイドホルモン生合成機構と関連して充分評価できる論文と考えられる。