



Title	ウシ副腎皮質アドレノドキシンとNADPH-アドレノドキ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innラベル法による研究
Author(s)	三浦, 済
Citation	大阪大学, 1981, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32914
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	三浦 洋
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ンと NADPH-アドレノドキシン還元酵素およびシトクロム P-450sec との相互作用に関するスピニ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→アドレノドキシン還元酵素→アドレノドキシン→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-450sec 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、アドレノドキシンと NADPH-アドレノドキシン還元酵素、(以下、AdR と略する) およびシトクロム P-450sec (以下、P-450sec 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ンを、二種のスピニ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) によってスピニラベルした。(I) による標識化では、アドレノドキシン 1 分子あたり二つの部位が標識されたのに対し、(II) では 1 分子あたり一つの部位が標識された。いずれの場合も、標識スピニルの EPR スペク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→アドレノドキシン→シトクロム c の電子伝達活性は、アドレノキシンの(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ンの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(τ_c)を求めた。すなわち、10mMリン酸カリ緩衝液中の τ_c は、 2.1×10^{-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、 τ_c は 1.9×10^{-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ンが過剰量共存すると τ_c は 1.5×10^{-9} secとかなり小さくなり、しかも、クロルメロドリンのみが共存する場合の τ_c (1.4×10^{-9} sec)とほとんど同じである。クロルメロドリンには、アドレノドキシン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見出している。すなわち、(1)鉄イオウ中心は、アドレノドキシン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ンに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とあった、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ン)に対してプロットすると、モル比が約1.0のところで飽和する滴定曲線が得られた。したがって、アドレノドキシンと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ミクロコンホー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ンに、P-450scc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-450scc/アドレノドキシン)に対してプロットすると、モル比が約1.0のところで飽和する曲線が得られ、アドレノドキシンとP-450scc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ミクロコンホー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) アドレノドキシンを、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) アドレノドキシンの鉄イオウ中心は、そのタンパク構造維持に寄与している。
 - b) アドレノドキシンとアドレノドキシン還元酵素は、1:1の複合体を形成する。
 - c) アドレノドキシンとシトクロムP-450scc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、アドレノドキシンの鉄イオウ中心付近のミクロコンホー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する電子伝達成分（アドレノドキシン還元酵素→アドレノドキシン→シトクロムP-450scc）間の相互作用を調べたものである。スピノ標識法を巧妙に適用することによってアドレノドキシン還元酵素とアドレノドキシン、アドレノドキシンとP-450scc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ン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。