

Title	牛副腎皮質層におけるシトクロームP-450 (P-45011 β とP-450scc) の局在とステロイド産生との関係について
Author(s)	八木, 潤子
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/33790
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名・(本籍)	や 八	ぎ 木	じゆん 潤	こ 子
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	6 2 2 3	号	
学位授与の日付	昭 和 58 年 12 月 1 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	牛副腎皮質層におけるシトクローム P-450 (P-450 _{11β} と P-450 _{scc}) の局在とステロイド産生との関係について			
論文審査委員	(主査)			
	教 授	倉智	敬一	
	(副査)			
	教 授	山野	俊雄	教 授 田川 邦夫

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

副腎皮質は組織学的に 3 層構造を呈し、球状層からは鉱質コルチコイドホルモンが、束状・網状層からは糖質コルチコイド及び性ステロイドが分泌されていることが知られている。そのステロイド生合成機構を生化学的に解明するため球状層と束状・網状層との 2 層に分け、分光学的滴定実験と水酸化酵素活性の測定を行い、それぞれにおけるシトクローム P-450 の局在と、P-450_{11β} 及び P-450_{scc} の含量比及び specific activity について検討した。

(方法ならびに成績)

牛副腎を私たちの改良した thermo-module element を取りつけたマイクロームを用いて、球状層と束状・網状層の 2 層に、すばやく分離した。2 層のそれぞれがよく分離されている事は、組織像にて確認した。それぞれの層より細胞分画法を用い、ミトコンドリアとマイクロソーム標品を得た。球状層のミトコンドリア内シトクローム P-450 は 0.66 nmol / mg prot. で束状・網状層では 1.22 nmol / mg · prot. で有意に差があった。マイクロソームは、それぞれ 0.43, 0.38 nmol / mg · prot. で、両者に差はなかった。

ミトコンドリア標品にメチラポンを加え、滴定すると、Type II 型 difference spectrum が得られ、濃度が約 0.1 μM ~ 数 μM までは、428 nm に山、410 nm に谷を持つ Type II 型 spectrum を示すが、数 μM を超えるあたりからその peak が移動し、10 μM 以上からは、425 nm に山、390 nm に谷を持つ Type II 型 spectrum が得られた。山と谷の吸収差をメチラポン濃度に対して図示すると 2 相性を示した。はじめの difference spectrum は、P-450_{11β} 基質 deoxycorticosterone (DOC) を加える

と現われなくなるので、P-450_{11β} 基質free型に基づく difference spectrum と考えられる。Type II型 difference spectrum は P-450 scc の基質結合の強いことから考えて、P-450 scc 基質結合に由来するものと考えられる。事実、副腎皮質ミトコンドリアよりP-450scc を精製したが、これは分光的に high spin 型を示し、cholesterol 結合型であった。メチラボン滴定をすると、得られたスペクトルは、前述の側鎖切断酵素 cholesterol 結合型と考えられるミトコンドリアのメチラボン滴定のスペクトルと一致した。

同様の実験を DOC, 11-deoxycortisol を用いて行った。これらの substrate induced difference spectra は、Type Iを示し、両層とも、それぞれの基質に対する affinity に差がないことが判明した。

超音波処理したミトコンドリアを用い、11β-水酸化酵素活性を、DOCと11-deoxycortisol を基質として測定した。これらも前述の affinity 同様、両層の間に差を認めなかった。

(総括)

改良したマイクロームを用いることによって、球状層と束状・網状層のミトコンドリアを、新鮮でかつ純度高く得ることができた。

その含有シトクローム P-450の specific content は、束状・網状層が球状層よりも約2倍高く、total content は約30倍高かった。

ミトコンドリア内シトクローム P-450が、11β-水酸化酵素 substrate free型と、側鎖切断酵素 cholesterol 結合型の2種類と考えると、メチラボン滴定の実験により、球状層と束状・網状層のミトコンドリア内の、側鎖切断酵素及び11β-水酸化酵素の濃度比は、ほぼ両層とも1:1であった。

DOCを基質にした場合、両層における11β-水酸化活性は差はなく、また分光におけるKsにも差がなかった。基質11-deoxycortisol に対しても同様の結果が得られた。

したがって、副腎皮質ミトコンドリアの球状層と束状・網状層のP-450には、総量比に大きな差があるが、基質結合に関しては著しい差は見出せなかった。

論文の審査結果の要旨

本論文においては、副腎皮質各層のステロイド生合成系の生化学的性質の比較研究を行なっている。改良型マイクロームを用い牛副腎皮質を Zona Glomerulosa と Zonae Fasciculata-Reticularis に分けそれぞれのミトコンドリアを新鮮で純度高く大量に得た。

その Cytochrome P-450 の specific content は前者より後者は約2倍高かった。メチラボン滴定実験により、両層の側鎖切断酵素と11β-水酸化酵素の濃度比などを定量化する方法が考案された。それに基づく、両酵素の比は、約1:1であることがわかった。11β-水酸化酵素の活性と基質に対するKsも定量化され、両層に著明な差のないことがわかった。これらの方法と結果は今後のステロイド生合成の研究に対し、価値あるものと認められる。