



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	大阪大学, 1983, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33790
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)	八木潤子
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 6223 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 ₁₁ β と P-450sc) 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、球状層からは鉄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-450₁₁β 及び P-450sc 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 を取りつけたミクロトームを用いて、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、ミトコンドリアとミ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。ミクロソームは、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-450₁₁β 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-450 scc 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。メチラポン滴定をすると、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ポ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)

改良したミクロト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、メチラポ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 を基質とした場合、両層における 11β-水酸化活性は差ではなく、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。改良型ミクロト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。メチラポン滴定実験により、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。それに基づくと、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。