



Title	牛副腎皮質ミトコンドリア・シトクロムP-45011 $\beta$ 再構成系によるアルドステロン合成
Author(s)	和田, 晃
Citation	大阪大学, 1986, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/35218">https://hdl.handle.net/11094/35218</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について</a>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)	わ	だ	あきら
	和	田	晃
学位の種類	医	学	博 士
学位記番号	第	7 2 3 2	号
学位授与の日付	昭和 61 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	医学研究科 生理系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当		
学位論文題目	牛副腎皮質ミトコンドリア・シトクロム P-450 <sub>11β</sub> 再構成系による アルドステロン合成		
論文審査委員	(主査) 教 授	田川 邦夫	
	(副査) 教 授	鎌田 武信	教 授 和田 博

## 論 文 内 容 の 要 旨

### (目 的)

アルドステロンは鉱質ステロイドとして体液の電解質のバランスおよび血圧の調節に重要である。副腎皮質におけるアルドステロン合成について多くの研究がなされてきたがその酵素的性質については明らかではない。副腎皮質ミトコンドリアには2種のシトクロム P-450, すなわち P-450<sub>scc</sub>と P-450<sub>11β</sub>が存在し, 後者はデオキシコルチコステロンの11β位水酸化をおこなってアルドステロンの前駆体であるコルチコステロンを生成することにより, アルドステロン生合成の初期の段階に関与することが考えられている。さらに本酵素は11β位の水酸化の他, 18位の水酸化反応をもおこなうことが知られており, コルチコステロンの18位の酸化物であるアルドステロンの合成の最終段階においても本酵素の関与が推察される。そこで精製したシトクロム P-450<sub>11β</sub>を用いてアルドステロン合成系を再構成し, 本反応系について生化学的に検討した。

### (方法ならびに成績)

1) シトクロム P-450<sub>11β</sub> は, 牛副腎皮質ミトコンドリアより須原らの方法に若干の改良を加え精製した。これと, 牛副腎皮質より精製したアドレノドキシシンおよびアドレノドキシシン還元酵素とからステロイド水酸化系を再構成した。

2) 反応は, 0.6 ないし 1.0 μMシトクロム P-450<sub>11β</sub>, 10 μMアドレノドキシシン, 0.3 μMアドレノドキシシン還元酵素, NADPH再生系および基質としてコルチコステロンまたは, 18-ヒドロキシコルチコステロンを含む30mMトリス塩酸緩衝液 (pH7.4) 中でおこない, 最終液量は 1 ml, 反応温度は 37℃とした。

3) 反応は等量の冷メタノールを加えて停止し、2 nmol のコルチゾールを内部標準として加えたのち、4 mL の二塩化メチレンで生成物を抽出した。生成物の同定ならびに定量には、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を使用した。

4)  $^3\text{H}$ ラベルしたコルチコステロンをシトクロム P-450<sub>11 $\beta$</sub>  再構成系と反応させ、生成物を HPLC で分析すると、アルドステロンおよび 18-ヒドロキシコルチコステロンに一致する位置に放射活性ピークを検出した。生成物がアルドステロンであることは、種々の展開液を用いた薄層クロマトグラフィーおよびガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリーにて確認した。また  $^3\text{H}$ ラベルした 18-ヒドロキシコルチコステロンをシトクロム P-450<sub>11 $\beta$</sub>  再構成系と反応させた場合にも [ $^3\text{H}$ ]アルドステロンの生成がみられた。

5) シトクロム P-450<sub>11 $\beta$</sub>  再構成系によるアルドステロン合成速度は、反応系に副腎皮質ミトコンドリアの脂溶性抽出物を添加することにより、約 10 倍まで増加した。本抽出物を薄層クロマトグラフィーにて分画し、コルチコステロンを基質としたシトクロム P-450<sub>11 $\beta$</sub>  再構成系に加え、アルドステロン合成に対する影響を調べた結果、抽出物中のリン脂質が本反応を促進することが明らかとなった。

6) シトクロム P-450<sub>11 $\beta$</sub>  0.6 nmol, リン脂質である dilauroyl phosphatidylcholine 100 nmol を含む再構成系について、コルチコステロンを基質としたときの V<sub>max</sub> および K<sub>m</sub> を求めた。アルドステロン合成については、それぞれ 0.83 nmol/min/nmol P-450, 5.8  $\mu\text{M}$ , 18-ヒドロキシコルチコステロン合成については、2.1 nmol/min/nmol P-450, 8.6  $\mu\text{M}$  であった。また 18-ヒドロキシコルチコステロンを基質にした場合、V<sub>max</sub> は 0.34 nmol/min/nmol P-450, K<sub>m</sub> は 340  $\mu\text{M}$  であった。

#### (総括)

牛副腎皮質ミトコンドリアより精製したシトクロム P-450<sub>11 $\beta$</sub>  は、コルチコステロンからのアルドステロン生成を触媒することが見出された。また、コルチコステロンの 18 位水酸化体である 18-ヒドロキシコルチコステロンも、シトクロム P-450<sub>11 $\beta$</sub>  再構成系によりアルドステロンに変換される。さらにシトクロム P-450<sub>11 $\beta$</sub>  再構成系によるアルドステロン合成はリン脂質の添加により著明に促進されることが明らかとなった。以上の結果は生体におけるアルドステロン合成速度を充分説明できる再構成系を構築することが可能であることを示している。このことは副腎皮質組織におけるアルドステロン生成にシトクロム P-450<sub>11 $\beta$</sub>  が深く関与することを示唆するものであり、さらに本再構成系は今後、アルドステロン分泌の調節機構の解明にも役立つと考えられる。

### 論文の審査結果の要旨

アルドステロンは重要なステロイドホルモンであるが、その生合成系についてはこれまでほとんど解明されていなかった。これは本ステロイドの副腎での生成量が他の副腎皮質ステロイドホルモンに比べ非常に少なく、その同定、定量が困難であったことに起因する。著者は RI, HPLC, GC-MS を用いてコ

ルチコステロンからのアルドステロンへの変換を測定し、副腎皮質ミトコンドリアよりアルドステロン合成酵素系を単離することを試みた。そしてその結果、副腎皮質ミトコンドリアに存在するシトクロム P-450<sub>11 $\beta$</sub>  水酸化系が、コルチコステロンおよび18-ヒドロキシコルチコステロンからのアルドステロン合成を触媒すること、また本再構成系にリン脂質を加えると、アルドステロン合成活性を著明に増加することがあきらかとなった。

以上のように本研究は、アルドステロン合成系の最終ステップを初めてあきらかとしたものであり、今後アルドステロン合成、分泌の調節機構の解明にも役立つと考えられる。従って学位に値すると評価される。