

Title	牛副腎皮質ミトコンドリア・シトクロムP-45011 β 再構成系によるアルドステロン合成
Author(s)	和田, 晃
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35218
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照 ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

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 _{11β} 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_{scc}と P-450_{11 β} が存在し、後者はデオキシコルチコステロンの 11 β 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 11 β 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_{11 β} 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_{11 β} 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 μ Mシトクロム P-450_{11 β} , 10 μ Mアドレノドキシシン, 0.3 μ M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 (pH 7.4) 中でおこない、最終液量は 1 ml, 反応温度は 37 $^{\circ}$ C 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のコレ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) ^3H ラベルしたコレチコステロンをシトクロム P-450_{11 β} 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-ヒドロキシコレ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 ^3H ラベルした18-ヒドロキシコレチコステロンをシトクロム P-450_{11 β} 再構成系と反応させた場合にも [^3H]アルドステロンの生成がみられた。

5) シトクロム P-450_{11 β} 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、コレチコステロンを基質としたシトクロム P-450_{11 β} 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_{11 β} 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、コレチコステロンを基質としたときのVmaxおよびKm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 μM , 18-ヒドロキシコレチコステロン合成については、2.1 nmol/min/nmol P-450, 8.6 μM であった。また18-ヒドロキシコレチコステロンを基質にした場合、Vmaxは 0.34 nmol/min/nmol P-450, Kmは 340 μM 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_{11 β} は、コレ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、コレチコステロンの18位水酸化体である18-ヒドロキシコレチコステロンも、シトクロム P-450_{11 β} 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_{11 β} 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合成にシトクロム P-450_{11 β} 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て非常に少なく、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_{11 β} 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。