Osaka University Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | 牛副腎皮質ミトコンドリア・シトクロムP−45011β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 | 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、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

【41】

| | |
|---|---|
| 氏名・（本籍） | 和田　晃（わだ　あきら） |
| 学位の種類 | 医学博士 |
| 学位記番号 | 第　7232　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<br>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－$450_{11\beta}$再構成系によるアルドステロン合成** |
| 論文審査委員 | （主査）<br>教授　田川　邦夫<br>（副査）<br>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－$450_{11\beta}$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－$450_{11\beta}$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-$450_{11\beta}$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ンおよびアドレノドキ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－$450_{11\beta}$，10 μMアドレノドキシン，0.3 μMアドレノドキシン還元酵素，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℃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）$^{3}$HラベルしたコルチコステロンをシトクロムP－$450_{11\beta}$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$^{3}$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－$450_{11\beta}$再構成系と反応させた場合にも〔$^{3}$H〕アルドステロンの生成がみられた。

5）シトクロムP－$450_{11\beta}$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－$450_{11\beta}$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－$450_{11\beta}$ 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－ヒドロキシコル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－ヒドロキシコル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－$450_{11\beta}$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－$450_{11\beta}$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－$450_{11\beta}$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合成にシトクロムP－$450_{11\beta}$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－$450_{11\beta}$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。