



Title	ウシ副腎のチトクロムP-450 $11\beta$ およびチトクロムP-450sccに対するモノクローナル抗体の作製と副腎皮質の免疫組織化学的研究
Author(s)	菅野, 幸子
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/35277">https://hdl.handle.net/11094/35277</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">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)	菅野 幸子
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 7645 号
学位授与の日付	昭和 62 年 3 月 26 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	ウシ副腎のチトクロム P-450 <sub>11<math>\beta</math></sub> およびチトクロム P-450scc に対するモノクローナル抗体の作製と副腎皮質の免疫組織化学的研究
論文審査委員	(主査) 教授 谷口 直之 (副査) 教授 田川 邦夫 教授 遠山 正弥

## 論文内容の要旨

## [目的]

副腎皮質ミトコンドリアにあるチトクロム P-450<sub>11 $\beta$</sub>  (以下 P-450<sub>11 $\beta$</sub>  と略す) は、ミネラロコルチコイドやグルココルチコイドなどステロイドホルモンの生合成に関与し、デオキシコルチコステロンを基質として、11位、18位、19位の水酸化反応を触媒する酵素である。副腎皮質の球状層細胞から分泌されるアルドステロンも、P-450<sub>11 $\beta$</sub>  によって生合成されることが明らかになっている。本研究では、このように多くの反応を触媒する P-450<sub>11 $\beta$</sub>  の活性中心の構造と機能についての知見を得、かつ本酵素の副腎皮質各層における局在を明らかにする目的で、本酵素に対するモノクローナル抗体を作製した。また、コレステロールの側鎖切断反応を触媒するチトクロム P-450scc (以下 P-450scc と略す) に対するモノクローナル抗体も作製し、これらの抗体を用いて、その性状を調べ、副腎皮質の免疫組織化学的研究を行なった。

## [方法]

ウシ副腎皮質ミトコンドリアから精製した P-450<sub>11 $\beta$</sub>  と P-450scc に対するモノクローナル抗体は、Kohler, Milstein らの方法に従って作製した。抗体産生ハイブリドーマの検出、力価の測定、イムノグロブリンのクラス・サブクラスの同定は E L I S A により、また、抗原蛋白質の特異的検出は Western blotting により行なった。P-450<sub>11 $\beta$</sub>  活性の抗体による阻害は、再構成系を用いて測定した。免疫組織化学的検索は、ペルオキシダーゼを用いた間接型酵素抗体法により行ない、光顕および電顕レベルで観察した。

## [結果]

力値の異なる、抗P-450<sub>11 $\beta$</sub> モノクローナル抗体を7種単離した。5種はIgG<sub>1</sub>、2種はIgG<sub>2b</sub>であり、IgGはすべてκ鎖を有していた。つぎに、Western blottingを行なったところ、7種の抗体はすべて精製したP-450<sub>11 $\beta$</sub> と反応し、P-450sccとは反応しなかった。また、この7種の抗体は、ウシ副腎皮質ミトコンドリアの蛋白質のうち、精製したP-450<sub>11 $\beta$</sub> と同じ移動度の蛋白質1つだけと反応した。また、1種の抗体(MA b 258)は、ラット副腎ミトコンドリア蛋白質のうち、精製したP-450<sub>11 $\beta$</sub> と同じ移動度の蛋白質と反応し、この抗体は、ラットのP-450<sub>11 $\beta$</sub> と交差性を示すことが示唆された。そこで、種々の動物の副腎ミトコンドリアについて、Western blottingを行なったところ、MA b 258は、モルモットおよびヒトの副腎ミトコンドリアでは、ウシのP-450<sub>11 $\beta$</sub> と同じ移動度の蛋白質と反応するのに対して、ブタの副腎ミトコンドリアでは分子量約47,000の蛋白質1つのみと反応し、ウサギ副腎ミトコンドリアでは分子量約55,000の蛋白質とのみ反応性を示した。このことは、ラット、モルモット、ヒトのP-450<sub>11 $\beta$</sub> は分子量約50,000、ブタは分子量約47,000、ウサギは分子量約55,000の蛋白質であることを示唆している。つぎに、P-450<sub>11 $\beta$</sub> 活性に及ぼす抗体の影響を調べたところ、1種の抗体(MA b 42718)は、デオキシコルチコステロンの11位、18位および19位の水酸化活性をそれぞれ約50%阻害した。

P-450sccについても、特異的なモノクローナル抗体3種を単離した。これらのモノクローナル抗体を用いて、免疫組織化学的染色を行なったところ、光顕的には球状層の細胞が弱陽性を、束状層と網状層の細胞が強陽性を呈した。また、電顕的には、ミトコンドリア内膜が染色されることを認めた。

#### [総括]

- 1) ウシ副腎P-450<sub>11 $\beta$</sub> に特異的なモノクローナル抗体を7種、P-450sccに特異的な抗体3種をそれぞれ単離し、その性質を調べた。
- 2) ウシ以外の動物種のP-450<sub>11 $\beta$</sub> と交差性を示すモノクローナル抗体を得た。この抗体を用いたWestern blottingの結果、ラット、ブタ、モルモット、ヒト、ウサギのP-450<sub>11 $\beta$</sub> の分子量が示唆された。
- 3) P-450<sub>11 $\beta$</sub> 活性を約50%阻害する抗体が得られた。
- 4) モノクローナル抗体を用いて、副腎皮質の免疫組織化学的染色を行なった結果、両酵素が皮質の球状層、束状層、網状層に存在していること、また、ミトコンドリア内膜に局在していることを確めた。

#### 論文の審査結果の要旨

副腎皮質ミトコンドリアに存在するチトクロムP-450<sub>11 $\beta$</sub> は、デオキシコルチコステロンを基質として、11位、18位、19位の水酸化反応を触媒する酵素である。本酵素に対して特異性の高いモノクローナル抗体を作製することは、同定、定量、精製などに有効な手段になると思われるが、いまだ作製されていなかった。著者はウシ副腎皮質チトクロムP-450<sub>11 $\beta$</sub> とチトクロムP-450sccに対するモノクローナル抗体を作製し、その性質を調べた。

その結果、ウシ以外の動物種と交差性を示す抗体が得られ、精製が困難な動物種のチトクロムP-450<sub>11 $\beta$</sub> の分析が可能となった。

またこのモノクローナル抗体を用いて、本酵素の活性に及ぼす影響や、組織内分布・局在性を確めるなど、本酵素の生化学的、組織学的研究に道を開いたといえる。したがって、本論文は充分学位に値するものと評価する。