

Title	チトクロムP-45011 β が触媒するアルドステロン合成系の調節因子
Author(s)	大西, 平
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35278
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

【 3 】

氏名・(本籍)	大 西 平
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 7642 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	チトクロムP-450 _{11β} が触媒するアルドステロン合成系の調節因子
論文審査委員	(主査) 教授 岡本 光弘 (副査) 教授 谷口 直之 教授 田川 邦夫

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

副腎皮質ミトコンドリアのチトクロムP-450_{11β}は、デオキシコルチコステロンやデオキシコルチゾールの11β位水酸化反応などコルチコステロイド生成における多様な反応を触媒する。さらに、アルドステロン(ALDO)の合成も本酵素が触媒すると考えられている。本酵素は、副腎皮質の三層にわたって存在する。一方ALDOは、球状層から特異的に分泌される。このことから本酵素の多様な活性に対する特異的な調節機構の存在が示唆される。さらにALDOは、種々のホルモン刺激によってもその分泌が調節されており、その際にも本酵素活性に対する調節が関与することも考えられる。そこでP-450_{11β}活性に対する調節因子の有無を検討した。

〔 方 法 〕

1. ミトコンドリアを用いたALDO合成活性、及びP-450_{11β}の層局在

無傷ミトコンドリアは、ウシ・ブタ・ラットから球状層及び束・網状層の二層に分けて調製した。コルチコステロン(B)からのALDO及び18ヒドロキシコルチコステロン(18-OH-B)の生成は、リンゴ酸を呼吸基質として反応させ、生成物をHPLCを用いて定量した。このミトコンドリアを1%コール酸で可溶化した標品の酵素活性を測定する場合には、ウシ副腎皮質から精製した電子伝達成分及びNADPH再生系を加えて反応させた。

P-450_{11β}の層局在を検討するためには、二層に分けたミトコンドリアをSDS-PAGE後、抗P-450_{11β}単クローン抗体によるイムノプロット法を用いた。

2. P-450_{11β}活性に及ぼすリン脂質の影響

ウシ副腎皮質から精製したP-450_{11β}及び電子伝達成分を種々のリン脂質共存下で再構成しALDO合成活性を測定した。

3. P-450_{11β}活性に特異的な影響を及ぼす蛋白因子の精製

ウシ副腎皮質に存在する分子量約16,000の蛋白質がP-450_{11β}によるALDO合成を特異的に阻害することを見出した。この蛋白因子をイオン交換カラム, ゲル濾過カラム, 及びイオン交換HPLCを用いて精製した。

[結 果]

1. ウシ及びブタの副腎皮質球状層から調製した無傷ミトコンドリアは, ALDO合成活性を有するが, 束・網状層のものは, ALDO合成を行わない。ミトコンドリアを可溶化するとALDO合成活性は, 両層のミトコンドリアで同様に認められた。イムノブロット法で検出されるバンドは両層のミトコンドリアで差異はなかった。このことからALDO合成活性の層分化は, 合成酵素(P-450_{11β})の層局在によるものでなく, 活性調節の差異によるものであることが示唆された。一方ラットにおいては, ALDO合成は可溶化したミトコンドリアを用いても束・網状層では認められず, イムノブロット法で検出されるバンドも球状層において束・網状層のものより分子量の小さいバンドが特異的に認められた。このことからラットではALDO合成に特異的な酵素分子種が球状層にのみ存在する可能性も残されている。
2. PC, PEは300 μMの濃度までALDO, 18-OH-B合成をともに促進した。一方CL, PI, PSは10 μM程度で18-OH-B合成を強く促進したがALDO合成の促進はこの濃度ではやや弱く, 30~100 μMで最大効果が得られた。リン脂質を副腎皮質ミトコンドリアでの存在比で混合したものをP-450_{11β}再構成系に加えた場合は, 可溶化したミトコンドリアと同程度のALDO, 18-OH-B合成活性を示した。
3. ALDO合成を阻害する蛋白因子は, 紫外部吸収スペクトル, アミノ酸組成, 電気泳動的性質, phosphodiesterase活性の促進効果などからカルモデュリン(CaM)であると同定された。CaMをP-450_{11β}再構成系に加えると, Bからの18-OH-B合成活性を2~3倍に促進し同時にALDO合成活性を90%阻害した。最大効果はP-450_{11β}とほぼ等量のCaMを添加することにより得られた。この効果はCa²⁺依存性で, 1 μMのCa²⁺を添加するとほぼ最大の効果が得られた。電子伝達成分の存在下にP-450_{11β}にCaMを加えるとI型差スペクトルが認められ, P-450_{11β}-CaMの分子間相互作用も示唆された。

[総 括]

1. 再構成されたP-450_{11β}がミトコンドリアに匹敵するALDO合成能を有し, また両層から可溶化したミトコンドリアがともにALDO合成活性を有することから, ALDO合成酵素が球状層にのみ局在するという仮説は, ウシ及びブタでは否定された。
2. P-450_{11β}のALDO合成活性は, リン脂質及びCaMにより選択的に調節されることが明らかとなった。このことは, ALDO合成の生理的な調節系においてもP-450_{11β}が調節の標的となっている可能性を示唆している。

論文の審査結果の要旨

副腎皮質ミトコンドリアのチトクロムP-450_{11 β} は、コルチコステロンの合成のみならず、アルドステロンの合成も触媒する。この酵素は副腎皮質の三層にわたって存在するが、アルドステロンは球状層のみから分泌される。本論文は、P-450_{11 β} によるアルドステロン合成活性が蛋白因子であるカルモデュリンによって選択的に阻害されることを報告している。このことは、アルドステロン合成の層分化がP-450_{11 β} の活性調節に基づくという可能性を示すとともに、アルドステロン合成系の調節機構を解明する上でも意義深いものと考えられる。したがって本論文は、十分学位に値するものと評価する。