



Title	Molecular cloning and expression of cDNAs encoding rat aldosterone synthase : variants of cytochrome p450 (11 $\beta$ )
Author(s)	松川, 直道
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37982">https://hdl.handle.net/11094/37982</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	まつ かわ なお みち 松 川 直 道
博士の専攻分野の名称	博 士 ( 医 学 )
学位記番号	第 1 0 1 9 1 号
学位授与年月日	平成 4 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科 内科系専攻
学位論文名	<b>Molecular cloning and expression of cDNAs encoding rat aldosterone synthase : variants of cytochrome p450 (11<math>\beta</math>)</b> (ラットアルドステロン合成酵素の構造決定と酵素機能の解明)
論文審査委員	(主査) 教 授 荻原 俊男 (副査) 教 授 宮井 潔 教 授 岡本 光弘

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### (目 的)

高血圧の成因の一つとしてステロイド代謝系が重要と考えられているが、アルドステロン (aldo) 合成酵素と cytochrome P450 (11 $\beta$ ) との分子生理学的な関係は未だ不明である。牛副腎皮質 P450 (11 $\beta$ ) は 1 種類の酵素が DOC の 11 位及び 18 位の水酸化のみならず、コルチコステロン (B) から aldo 合成も行うが、ラット副腎では 2 種類の異なる P450 (11 $\beta$ ) が存在し、アルドステロン合成に関与している可能性がある。ヒトにおいても先天性副腎過形成の患者の検討からアルドステロン合成には 2 種類の酵素 (CMO I, CMO II) の関与が示唆される。我々は既に DOC より B 合成を触媒するラット副腎 P450 (11 $\beta$ ) の c DNA クローニングに成功しているが、本研究においては、DOC より aldo 合成までを触媒する新たな酵素 P450 (11 $\beta$ , aldo) の c DNA のクローニングを行いその一次構造を決定し、本酵素の機能を解明することを目的とした。

#### (方 法)

＜ラット P450 (11 $\beta$ , aldo) の全塩基配列決定＞低食塩高カリウム含有食を与えた雄 Sprague-Dawley rat の副腎皮質より AGPC 法, oligo (dT) カラムにより調製した mRNA を cDNA とし, vector- $\lambda$ gt10 によりライブラリーを作製した。ラット P450 (11 $\beta$ ) に対する c DNA の 5' 末 400 bp をプローブとしてスクリーニングを行い, positive クローンを pUC118 に subcloning して dideoxy-nucleotide chain termination 法にて全塩基配列を決定した。

＜one-sided PCR を用いた 5' 末端の構造確認＞ATP 存在下で terminal deoxynucleotidyl transferase を作用させて cDNA の 5' 末に poly (A) の tail を付加する。前述の実験で決定したシーケンス

をもとに合成した primer と、(T) を17個もった anchored primer との間で one-sided PCR を行い未知構造の 5' 末を増幅しその構造を決定した。

〈発現実験〉 mismatch をもった 5' 側 primer 及び1857-1881 間に一致した 3' 側 primer 間で PCR を行い P450 (11 $\beta$ ) の signal peptide を持つ P450 (11 $\beta$ , ald) の fragment を得た。この fragment を vector pSL に挿入し、同様に bovine adrenodoxin reductase および adrenodoxin fragment も p S VL に挿入した。125  $\mu$ F, 450V の electroporation により  $5 \times 10^6$  の COS-7 cell に対し各 DNA を transfection し、200 nmol の DOC を基質として含んだ medium 中で24時間 incubate 後、産生されたステロイドを HPLC にて解析した。

#### (結 果)

- (1) アルドステロン合成酵素 P450 (11 $\beta$ , ald) の全塩基配列を決定した。全長は約2.7 kbp よりなり1.5 kbp の coding region をもつ。mature protein は476 個のアミノ酸よりなり分子量は54,282 Da であった。また、signal peptides の構造が異なる2種類の variants が存在した。本酵素とラット P450 (11 $\beta$ )、ウシ P450 (11 $\beta$ )、ヒト CYP (11 $\beta$ -1) のアミノ酸一致率は各々81%、63%、67%であり、ステロイド結合部位、ヘム結合部位は保存されていた。
- (2) 発現実験の結果 P450 (11 $\beta$ , ald) が DOC より B, 18 OH-B, ald を合成し、その量はのおの6.13, 3.39, 0.89 nmol/24hr/dish であったが19 OH-DOC の産生は認めなかった。P450 (11 $\beta$ ) は DOC を基質としたとき、その11位、18位、19位の水酸化を行うが18 OH-B, ald は産生しない。このことより P450 (11 $\beta$ , ald) は従来の P450 (11 $\beta$ ) とは異なる新しい酵素であることが判明した。

#### (総 括)

ラット副腎では DOC から ald までの合成段階に、homology の高い2種類の P450、即ち P450 (11 $\beta$ ) 及び P450 (11 $\beta$ , ald) が関与していることを証明した。これらは多機能酵素で、その作用は一部一致するが、アルドステロン合成の最終段階に関与するのは P450 (11 $\beta$ , ald) であった。さらに P450 (11 $\beta$ , ald) の c DNA の核酸配列を決定し、本酵素には signal peptides の異なる2種類の variants が存在することを明らかにした。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、従来その存在が証明されていなかったアルドステロン (ald) 合成酵素 P450 (11 $\beta$ , ald) をラット副腎皮質ライブラリーより c DNA クローニングし、全塩基配列を解読し、構造を決定した。ラット P450 (11 $\beta$ , ald) は約2.79 kb よりなり1.59 kb の coding region を持つ。476 個のアミノ酸よりなる mature protein の分子量は54,282 Da であり、ヘム結合部位、ステロイド結合部位が認められた。さらに、その酵素機能を解明するために、本遺伝子を導入した COS 細胞をデオキシコルチコステロン (DOC) を基質として含んだメディウム中で培養し産生されたステロイドを解析した。その結果コルチ

コステロン (B), 18 OH-B, aldo が合成され 19 OH-DOC の産生は認められないことより P450 (11  $\beta$ , aldo) はアルドステロン合成の最終段階に関与する全く新しい酵素であることが明らかになった。以上より本研究は、アルドステロン合成酵素 P450 (11  $\beta$ , aldo) の存在を初めて明らかにし、従来不明であったアルドステロン合成機構を解明した点で重要な研究であり、学位の授与に値するものと考えられる。