

Title	Dissociation of hydroxylase and lyase activities by site-directed mutagenesis of the rat P45017 α
Author(s)	北村, 雅哉
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38535
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

氏 名	北 村 雅 哉
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 0 9 1 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 5 年 9 月 17 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 名	Dissociation of hydroxylase and lyase activities by site-directed mutagenesis of the rat P450 _{17α} (ラット P450 _{17α} における Site-directed mutagenesis を用いた hydroxylase 活性と lyase 活性との解離実験)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 奥 山 明 彦 (副査) 教 授 岡 本 光 弘 教 授 谷 澤 修

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

ラット P450_{17 α} はひとつの酵素で hydroxylase と lyase という2つの異なる活性を持つステロイド合成の key enzyme である。その立体構造および酵素活性の調節機構については多くの研究がなされてきたが、他の P450 と同様、精製の困難さから蛋白の側からの研究は困難であった。そこでこのラット P450_{17 α} の遺伝子を cloning し、その変異体を作り、その活性の解析によってラット P450_{17 α} の立体構造を検討した。

[方 法]

1. Gene Rat Leydig cell の cDNA library から bovine P450_{17 α} の gene を probe に cloning されたラット P450_{17 α} を PCMV 4 に入れたものを野生型として用いた。基質結合部位として疑わしいとされている Tyr³³⁴を Phe に、Arg^{346, 357, 361, 363}を Ala または Lys に変えた変異体を recombinant circle polymerase chain reaction(RCPCR)によって作成し、下記の発現実験に付した。2. 発現実験 COS 1 細胞に lipofectin を用いて P450_{17 α} の野生型及び変異体を transfect し、48時間後 [4-¹⁴C]progesterone(hydroxylase 活性の基質)または17 α -[4-¹⁴C] hydroxyprogesterone (lyase 活性の基質)を培地に加え、37°C, 1 h の incubation のあと培地を ethyl acetate で抽出、ethyl acetate と chloroform の 1:3 溶液で TLC plate 上で展開、生成物の放射活性 peak を scanner で定量、分析した。3. Northern Blot transfect された細胞より精製した total RNA にラット P450_{17 α} cDNA の EcoRI fragment (306-842) を probe に Northern blot を行い RNA レベルで変異体においても野生型と同じく発現が行われていることを確認した。

[成 績]

Tyr³³⁴phe に変えた変異体 (Tyr³³⁴phe) では hydroxylase 活性、lyase 活性とも野生型と変化なく、Arg³⁶¹ala, Arg³⁶¹lys には hydroxylase 活性、lyase 活性とも全く認められなかった。Arg³⁴⁶, Arg³⁵⁷, Arg³⁶³を Ala に置換したところ部分活性が得られたが、その hydroxylase 活性、lyase 活性比は k_{cat} で各々 11.8, 2.5, 0.4 で、Arg³⁴⁶ala において lyase 活性が特異的に阻害された。つぎに Arg³⁴⁶, Arg³⁵⁷, Arg³⁶³を Lys に置換したところ

Arg³⁵⁷, Arg³⁶³では野生型とほとんど変わらない活性が得られたが, Arg³⁴⁶lys は Arg³⁴⁶ala より両活性ともさらに低い活性しか得られなかった。

[総括]

Analogueの実験より基質であるステロイドはC3, C17のカルボニル基または水酸基でP450_{17α}と結合しうるといわれている。Arg³⁴⁶を反応性に乏しいアミノ酸であるAlaに変えたところ, lyase活性が特異的に阻害されたことから, Arg³⁴⁶はhydroxylase活性の基質であるprogesteroneとlyase活性の基質である17α-hydroxyprogesteroneとの唯一の相違点であるC17の水酸基での結合に関与していると考えられる。Arg³⁶¹はArg³⁶¹alaがhydroxylase, lyaseいずれの活性も完全に失ったことから, 両者の基質の共通の活性基であるC3で基質に結合しているものと推測される。Arg³⁵⁷, Arg³⁶³はLysに変えても活性が得られたことから, Arg³⁴⁶, Arg³⁶¹とは異なり, 直接P450_{17α}との結合に関与しているというよりはその陽電荷で両者の結合の安定化に寄与していると推測された。

論文審査の結果の要旨

ラットP450_{17α}はひとつの酵素でhydroxylaseとlyaseという2つの異なる活性を持つステロイド合成のkey enzymeである。その立体構造および酵素活性の調節機構について分子生物学的解析を行った。

Rat Leydig cellのcDNA libraryからbovine P450_{17α}をprobeにラットP450_{17α}をcloningし, その基質結合部位として疑わしいアミノ酸を変えた変異体をRCPCRをもちいて作成, COS1細胞にこれをtransfectし, 酵素活性の発現を解析した。Analogueの実験より基質であるステロイドはC3, C17のカルボニル基または水酸基でP450_{17α}と結合しうるといわれている。Arg³⁴⁶を反応性に乏しいアミノ酸であるAlaに変えたところ, lyase活性が特異的に阻害されたことから, Arg³⁴⁶はhydroxylase活性の基質であるprogesteroneとlyase活性の基質である17α-hydroxyprogesteroneとの唯一の相違点であるC17の水酸基での結合に関与していると考えられた。Arg³⁶¹をAlaに変えたところhydroxylase, lyaseいずれの活性も完全に失ったことから, 両者の基質の共通の活性基であるC3で基質に結合しているものと推測された。Arg³⁵⁷, Arg³⁶³はLysに変えても活性が得られたことから, 直接P450_{17α}との結合に関与しているというよりはその陽電荷で両者の結合の安定化に寄与していると推測された。

以上, 蛋白の側からの解析が困難であったP450_{17α}の構造解析を分子生物学的手法を用いて明かにしたことは学位論文に値する。