



Title	Cloning and Expression of Cytochrome P450 (11beta) of Porcine Adrenal Cortex
Author(s)	孫, 鉄軍
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39043
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	孫 鉄 軍
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 1 7 6 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 7 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科生理系専攻
学 位 論 文 名	Cloning and Expression of Cytochrome P450 (11 β) of Porcine Adrenal Cortex (ブタ副腎皮質のアルドステロン合成酵素P450のクローニング)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 岡本 光弘 (副査) 教 授 谷口 直之 教 授 中村 敏一

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

ウシの副腎皮質から精製されたP450 (11 β) はP450電子伝達系成分との再構成系において、デオキシコルチコステロン (DOC) の11 β -水酸化反応と18-水酸化反応を触媒するのみならず、コルチコステロン(B)のアルドステロン (ALDO) への変換も触媒する事が報告されている。このことは、P450 (11 β) cDNA を COS-7 細胞に導入して発現させることにより確認された。一方ラット、マウス、ヒトの副腎皮質にはP450 (11 β) ファミリーに属する2種類のP450があり、その1つは11 β -水酸化酵素であり他方はALDO合成酵素であることが、酵素精製とcDNAクローニングによって確かめられた。したがって現時点では、副腎皮質ステロイドホルモン(コルチコステロイド)生合成過程は哺乳動物種によって2種類に分類されると考えられている。つまり、ウシの副腎皮質では単一のP450 (11 β) が糖質コルチコイドと鉱質コルチコイドの生合成の最終段階の反応を行うが、ラットやヒトでは11 β -水酸化酵素とALDO合成酵素が分化している。

副腎皮質のミトコンドリアを用いた実験と精製した酵素を用いた実験とから、ブタではウシと同様に、単一種のP450 (11 β) が11 β -水酸化反応とALDO合成反応を行うことが示唆されているが、このことはcDNAクローニングによって確認されていない。本研究はブタ副腎のP450 (11 β) cDNA をクローニングしその性質を明らかにすることにより、哺乳動物種のコルチコステロイド生合成過程の分子進化についての知見を得る事を目的とする。

【方法ならびに成績】

屠殺後15分以内に入手したブタの副腎皮質から常法にしたがってcDNAライブラリーを作成し、ウシP450 (11 β) cDNA断片を用いてスクリーニングした。2x10⁶個のファージライブラリーから4個の、比較的長いインサートをもつクローンが得られた。これらのインサートDNAの部分塩基配列を決定したところ、これらはすべてP450 (11 β) mRNAに由来するものであること、しかし全長cDNAではなく5'-末端が欠失していることが分かった。そこで得られたクローンの部分塩基配列と副腎mRNAを用いて、RT-PCR法によって5'-末端のcDNA断片を作成し、これらの断片からコード領域の全長を含むcDNAを構成した。得られたcDNAの全塩基配列を決定した。

ブタP450 (11 β) は503個のアミノ酸残基から成るタンパク質であり、NH₂-末端に24残基から成るミトコンドリアへの移行のためのエクステンションペプチドを持つ。そのアミノ酸配列はウシP450 (11 β)、ラットP450 (11 β)、ラットP450 (aldo)、ヒトP450 (11 β) とそれぞれ82%、61%、67%、71%のホモロジーを持つ。とくにヘム結合領域と

ステロイド（基質）結合領域におけるホモロジーが高い。

ブタP450 (11 β) の酵素活性を確認するため、cDNA を COS-7 細胞に導入した。細胞をイムノブロット法で分析したところ、翻訳されたタンパク質がミトコンドリアで発現していることが確認された。細胞を DOC とインキュベートし、培地中に産生されたステロイドを抽出後 HPLC 法で分析した。その結果、DOC から B (11 β -水酸化産物)、18 (OH) DOC (18-水酸化産物)、18 (OH) B (11,18-水酸化産物)、と ALDO が産生していた。生成物の量比は、ウシ P450 (11 β) による物と良く類似していた。

【総括】

1. ブタの副腎皮質に局在する P450 (11 β) の cDNA をクローニングし、この酵素の一次構造を明らかにした。
2. cDNA を COS 細胞に導入して発現させた。発現した酵素はステロイド 11-水酸化活性、18-水酸化活性と ALDO 合成活性を持っていた。
3. 種々の哺乳動物の中、ウシとブタでは単一の P450 (11 β) が DOC から ALDO まで全過程を触媒する。一方ラット、マウス、ヒトでは 11-水酸化酵素と ALDO 合成酵素が分化している。

論文審査の結果の要旨

副腎皮質に存在する P450 は糖質コルチコステロイド、鉱質コルチコステロイドの生合成系の反応を触媒する。このステロイド合成の最終段階はミトコンドリアの P450 (11 β) によって触媒されるが、動物種によってウシのように 1 つの酵素が 11 β 位の水酸化（糖質コルチコステロイドの合成）と 18 位（鉱質コルチコステロイドの合成）の水酸化の両方を触媒する場合と、ラット、マウス、ヒトのようにそれぞれ異なる酵素が触媒する場合があることが知られている。本研究はブタ副腎の P450 (11 β) の cDNA をクローニングしその性質を明らかにすることにより哺乳動物種のコルチコステロイド生合成過程の分子進化についての知見を得ることを目的になされたものである。

ブタ副腎の P450 (11 β) の cDNA を単離して塩基配列を決定した。ブタ副腎には単一種の P450 (11 β) が存在していた。すでにクローニングされている他の動物種の P450 (11 β)、P450ald の塩基配列と比較することにより、本酵素はウシの P450 (11 β) ともっとも高いホモロジーを有することが示された。COS-7 細胞でブタ副腎 P450 (11 β) を発現し、デオキシコルチコステロンを基質として反応生成物を分析したところ、コルチコステロンの他アルドステロンも合成されることがわかった。すなわちブタはウシと同様に単一種の P450 (11 β) が糖質コルチコステロイド、鉱質コルチコステロイド両方の生合成を触媒することが示された。

本研究は哺乳動物種によって副腎コルチコステロイド合成過程が 2 種類に分類されること、ブタ、ウシでは 1 種類の酵素があること、ラット、ヒトでは P450 (11 β)、P450ald が分化していることを示したものであり、学位論文として充分値すると認められる。