

①

学位論文

$\Delta^4$ -3-ケトステロイド5 $\beta$ -還元酵素に関する研究

学位申請者 大 西 芳 秋

## 謝辞

本研究に際し、御懇篤なるご指導と御校閲を賜った広島大学歯学部口腔外科学第二講座下里常弘教授に深厚なる謝意を表します。また、本研究を進めるに進めるに際し、終始御指導、御教示を頂いた本学口腔生化学講座奥田九一郎教授に深謝致します。同時に御助言、御校閲頂いた本学口腔細菌学講座杉中秀壽教授に心から御礼申し上げます。

本研究を進めるに際し終始御指導頂いた本学口腔生化学講座能城光秀助教授に感謝の意を表します。また本研究に協力して頂きました九州大学医学部大村恒雄教授、諸橋憲一郎博士ならびに東洋醸造(株)美崎英生博士、林満男博士に感謝致します。最後に、本学口腔外科学第二講座の諸氏ならびに本学口腔生化学講座の方々に感謝致します。

謝意

御懇篤なるご指導

1. バイオテクノロジーの発展

謝意

2. 分子生物学的解析

謝意

材料ならびに方法

1. 口腔マイクロバイオーム

2. 培養条件による増殖

3. 培養条件による増殖

4. 培養条件による増殖

5. 培養条件による増殖

6. 培養条件による増殖

## 目次

略語	1
序言	2
解析方針	4
1・免疫化学的解析	
概要	5
材料ならびに方法	5
1. 特異抗体の作製	
2. ELISAおよびWestern blotting	
3. 酵素活性吸収実験	
結果	6
2・タンパク化学的解析	
概要	13
材料ならびに方法	13
1. ペプチド化およびアミノ酸シーケンス	
結果	14
3・分子生物学的解析	
概要	23
材料ならびに方法	23
1. cDNAライブラリーの作成	
2. 特異抗体によるcDNAスクリーニング	
3. クローン化されたcDNAプローブによるスクリーニング	
4. Northern blottingおよびSouthern blotting	
5. DNAシーケンス	
6. COS細胞におけるタンパク発現実験	

結果	26
4・調節機構についての研究	
概要	38
材料ならびに方法	38
1. 酵素活性について	
2. 酵素タンパク量について	
3. mRNA量について	
結果	38
考察	43
総括	46
試薬	47
参考文献	48

## 略語

cdNA:complementary DNA  
mRNA:messenger RNA  
ELISA:enzyme-linked immunosorbent assay  
PBS:phosphate buffered saline  
TBS:Tris-buffered saline  
TBST:Tris-buffered saline, 0.05%Tween 20  
Tris:trishydroxymethylaminomethane  
Kpi:potassium phosphate buffer  
Eqb.:equilibrate  
SDS:sodium dodecyl sulfate  
PAGE:polyacrylamide gel electrophoresis  
TFA:trifluoroacetate  
GLC:gas liquid chromatography  
HPLC:high performance liquid chromatography

## 序言

コレステロールは細胞内において細胞膜，オルガネラ膜などの構成成分をなしており，細胞の生存上，不可欠な物質である。コレステロールの80～90%は肝臓において胆汁酸に代謝され，胆汁中に排泄される。一方副腎，性腺においてコレステロールはステロイドホルモンに転換され様々な生理作用を及ぼした後，肝臓などで代謝され尿中に排泄される。これら異化過程の反応は，種々の酵素によって触媒されている。そのうち $\Delta^4$ 二重結合の還元は， $\Delta^4$ -3-ケトステロイド5 $\beta$ -還元酵素により触媒される反応で，ステロイド骨格の4位の二重結合をA/Bcisに飽和する反応である（図1）。

この反応を触媒する $\Delta^4$ -3-ケトステロイド5 $\beta$ -還元酵素は，Berseusらにより見いだされ<sup>1),2)</sup>，奥田らによりラット肝より高度に精製され<sup>3)</sup>，酵素化学的諸性質が明らかにされた<sup>3-5)</sup>。しかしその構造ならびに活性発現調節機構は充分解明されていない。そこで著者はこれらの点を明らかにするために本酵素タンパクを用いてタンパク化学的解析を行うとともにまた本酵素に対する特異的抗体を作製し免疫化学的研究を行った。次にこれをプローブとして本酵素のcDNAクローンを単離し，その塩基配列を決定しこれより本酵素の全一次構造を明らかにした。また本酵素のcDNAを用いて分子生物学的研究を行った。

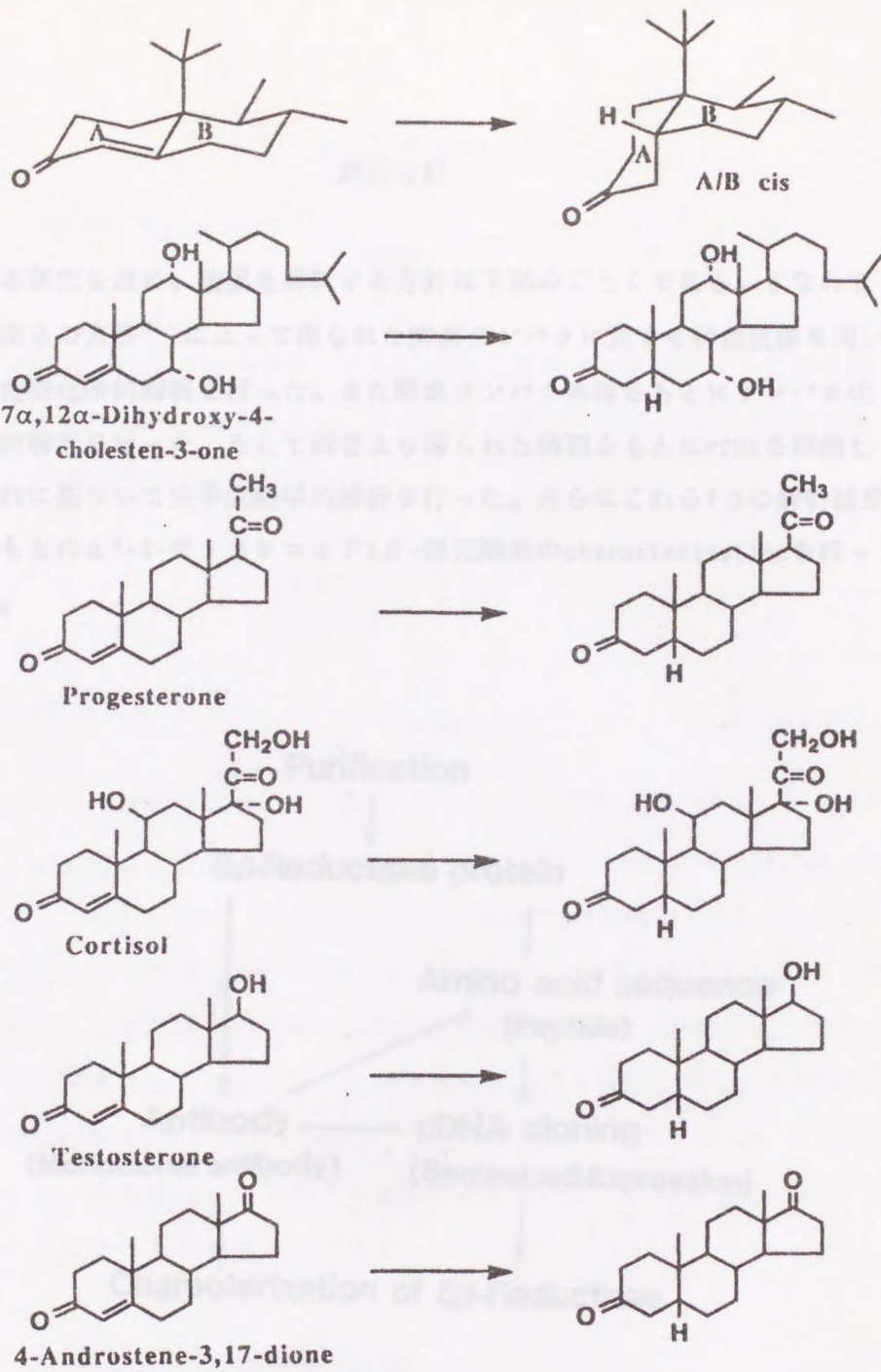


図1.  $\Delta^4$ -3-ケトステロイド  $5\beta$ -還元酵素の酵素反応

## 解析方針

本研究を進め、結果を解析する方針は下図のごとくである。すなわち奥田らの方法<sup>3)</sup>によって得られた酵素タンパクに対する特異抗体を用いて免疫化学的解析を行った。また酵素タンパク本体をもとにタンパク化学的解析を行った。そして両者より得られた情報をもとにcDNAを単離しこれに基づいて分子生物学的解析を行った。さらにこれら3つの解析結果をもとに $\Delta^4$ -3-ケトステロイド5 $\beta$ -還元酵素のcharacterizationを行った。

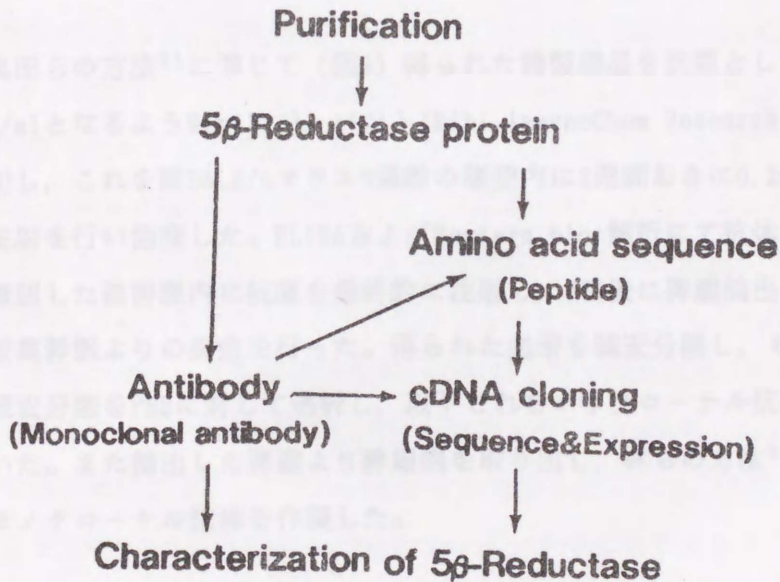


図2. 本研究における解析方針



## 1・免疫化学的解析

### 概要

本酵素に対するモノクローナル抗体ならびにポリクローナル抗体を作成した。さらにこのモノクローナル抗体を用いたWestern blot解析によって臓器分布について検討した。

### 材料ならびに方法

#### 1. 特異抗体の作製

奥田らの方法<sup>3)</sup>に準じて(図3)得られた精製標品を抗原として、250  $\mu$ g/mlとなるようRibiアジュバント(Ribi ImmunoChem Research, Inc.)と混和し、これを雌BALB/cマウス8週齢の腹腔内に2週間おきに0.2mlずつ2回注射を行い免疫した。ELISAおよびWestern blot解析にて抗体価の上昇を確認した後静脈内に抗原を最終的に注射し、3日後に脾臓摘出、ならびに腋窩静脈よりの採血を行った。得られた血清を硫酸分画し、その50%飽和硫酸分画をPBSに対して透析し、以下これをポリクローナル抗体として用いた。また摘出した脾臓より脾細胞を取り出し、林らの方法<sup>6)</sup>に従ってモノクローナル抗体を作製した。

#### 2. ELISAおよびWestern blotting

Godingの方法<sup>7)</sup>に従って行った。

### 3. 酵素活性吸収実験

HPLCハイドロキシアパタイトカラムにより精製した2mgのモノクローナル抗体をアフィゲル10(BIO RAD)0.6mlに結合させ、本酵素精製標品と4°Cで1時間混合したのち遠心し上清に残存している酵素活性を測定した。酵素活性は古胡らの方法<sup>5)</sup>に準じて行った。

### 結果

今回得られたモノクローナル抗体Mab-5 $\beta$ を用いたWestern blot解析の結果を図4に示した。精製標品, cytosolそれぞれ分子量37,000の位置にMab-5 $\beta$ と反応するバンドを検出した。さらにMab-5 $\beta$ を用いて酵素活性吸収実験を行ったところ図5に示すように、Control IgGと比較してMab-5 $\beta$ は明らかに本酵素活性を吸収することを認めた。これらのことよりMab-5 $\beta$ は $\Delta^4$ -3-ケトステロイド5 $\beta$ -還元酵素を特異的に認識していることが判明した。なおMab-5 $\beta$ のクラスチェックを行ったところIgG2aであることがわかった。また本抗体を用いて解析を行うにあたり、Western blot解析におけるMab-5 $\beta$ の検出感度を検討した。5 $\mu$ gから1.6ngまでの様々な量の精製標品についてWestern blot解析を行ったところ図6に示されるようにMab-5 $\beta$ は本酵素を10ngのオーダーまで検出できることが判明した。

次に $\Delta^4$ -3-ケトステロイド5 $\beta$ -還元酵素の生体内における臓器分布を検討するために、Mab-5 $\beta$ を用いて各臓器についてWestern blot解析を行った(図7)。本酵素と同じ基質に作用する5 $\alpha$ -還元酵素が存在すると報

告されている肝，副腎，脳，腎臓，卵巣，前立線および精巣について<sup>8)</sup>調べたところ，肝臓にのみ約 $10\mu\text{g}/\text{mg}$  cytosol proteinの濃度で本酵素が検出されたが他の臓器からは検出されなかった。

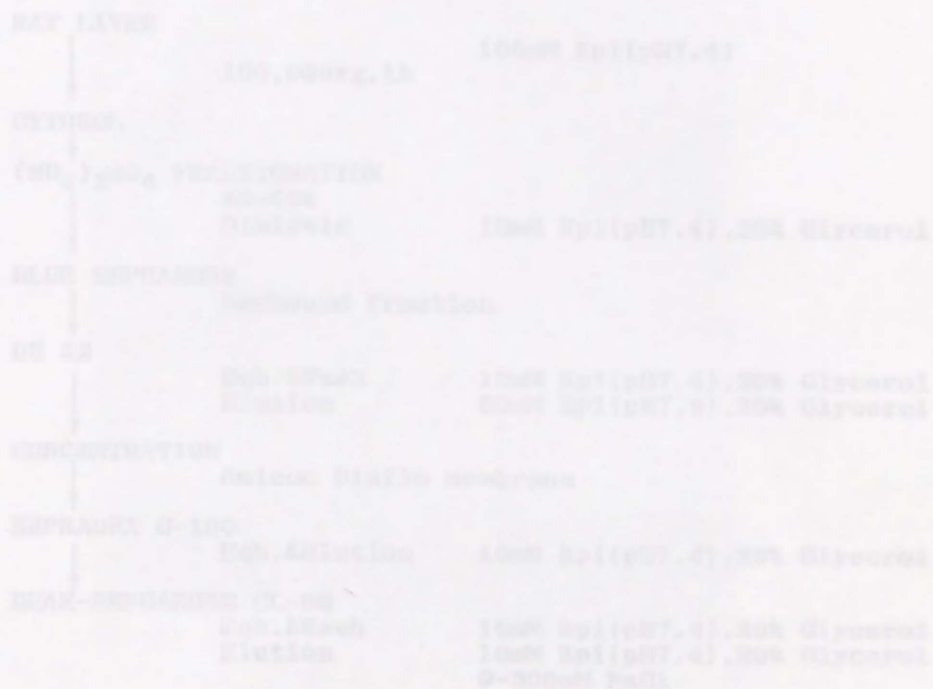


図1.  $\alpha$ -D-グルコース1-6-リン酸-還元酵素の細胞内分布 (凍結乾燥法による)

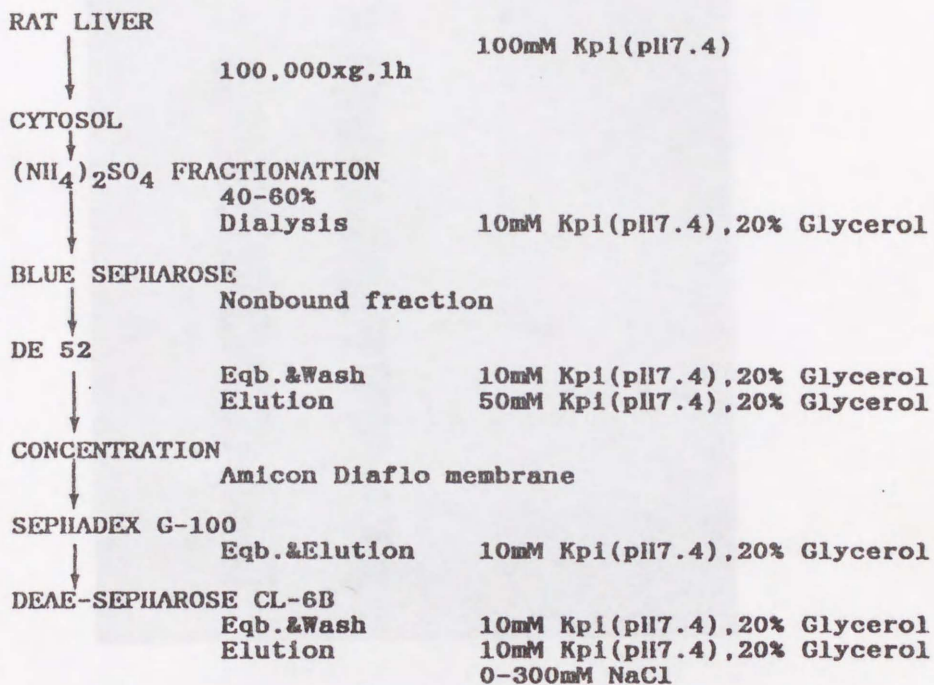


図3.  $\Delta^4$ -3-ケトステロイド5 $\beta$ -還元酵素の精製  
 (奥田らの方法<sup>3)</sup>)

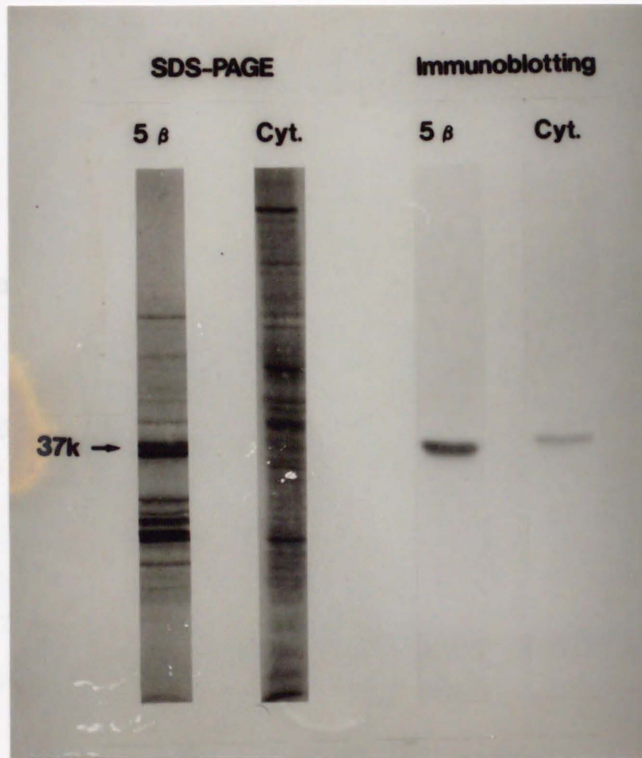


図4. Mab-5 $\beta$ を用いたWestern blot解析

5 $\beta$  : 5 $\beta$ -還元酵素の部分精製標品

Cyt. : ラット肝cytosol

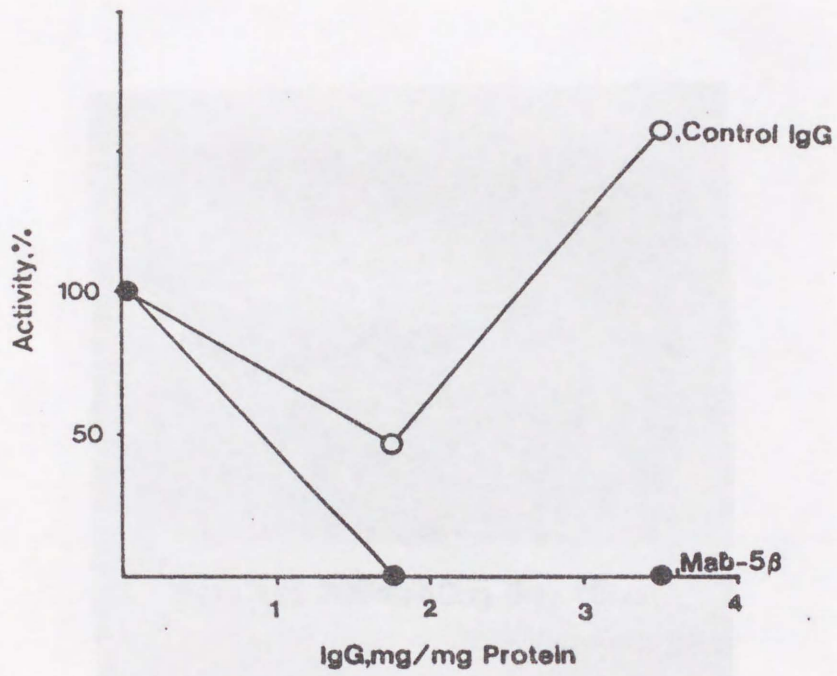


図5. Mab-5 $\beta$ による5 $\beta$ -還元酵素の酵素活性の吸収



図6. 5 $\beta$ -還元酵素の精製標品対する  
Mab-5 $\beta$ を用いたWestern blot解析

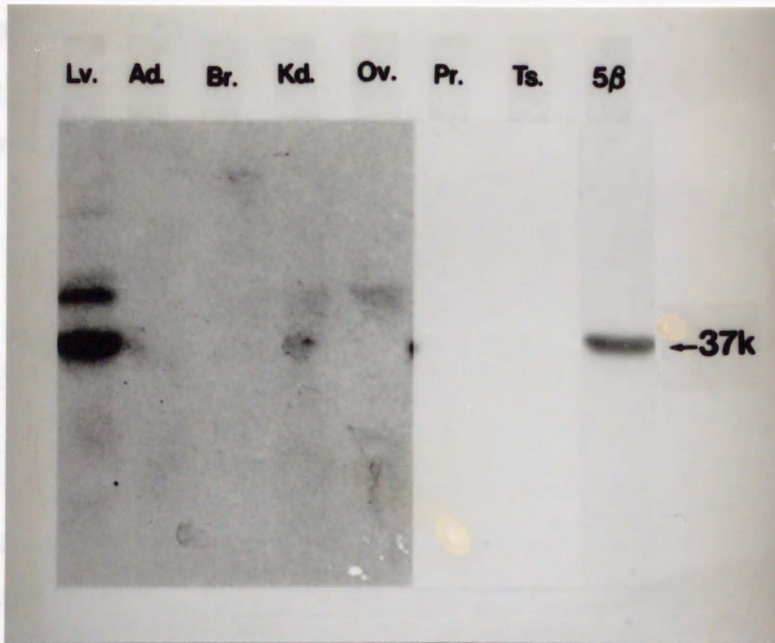


図7. Mab-5 $\beta$ を用いたWestern blot解析による  
5 $\beta$ -還元酵素の臓器分布

Lv: 肝臓    Ad: 副腎    Br: 脳  
Kd: 腎臓    Ov: 卵巣    Pr: 前立腺  
5 $\beta$ : 5 $\beta$ -還元酵素の精製標品



## 2・タンパク化学的解析

### 概要

本酵素をタンパク化学的に純粋に精製し、タンパク分解酵素により消化した後、得られたペプチドフラグメントについてアミノ酸配列を決定し、タンパク内部の部分的な一次構造を明らかにした。

### 材料ならびに方法

#### ペプチド化およびアミノ酸シーケンス

図2の方法で得られた標品を用いて図8に示した手順に従って行った。さらに精製するためにFPLC ProRPCR5/10 (Pharmacia) 逆相カラムにかけ0.01%TFA/アセトニトリル20-60%の直線濃度勾配的に溶出した。この溶媒系においては酵素活性は失われてしまうため、モノクローナル抗体Mab-5 $\beta$ を用いこれとの反応性を指標として本酵素タンパク量を定量した。得られた標品を6M Guanidine-HCl/0.6M Tris-Cl (pH8.6) に懸濁し、 $\beta$ -Mercaptoethanolを30 $\mu$ l加えて25°C3時間反応させ、さらに80mgのIodoacetateを加えて15分間反応させ酵素タンパクの還元アルキル化を行った。この標品の脱塩濃縮を行うためにHPLC逆相カラムAsahipack C4P-50 (Asahi Chemical Industry CO., LTD) にかけ、0.1%TFA/アセトニトリル溶媒系を用い後者の濃度を20から80%まで直線的に増加させて溶出した。溶出された標品を2M Urea/0.01M Tris-Cl (pH9.6) に懸濁し、38pmolのLysilendopeptidase (和光純薬 株) を加えて30°C20時間反応させ、

HPLC逆相カラムNUCLEOSIL 5C18 (GL Scienceより供与) にかけて0.05% TFA/アセトニトリル5-80%の溶媒系を用い直線濃度勾配的にペプチドフラグメントを溶出した。溶出された全てのフラクションについて質量分析を行った。質量分析はJEOL SX-102を用いイオン化モードはFAB(Fast atom bombardment), イオン加速電圧は10kVもしくは5kV, 一次ビームとしてXeを用い, 試料にはマトリックスとしてGlycerol/Thioglycerol/3-N-Benzylalchol(1:1:1)を加えて測定した。この結果より6つのフラクションについてSHIMADZU PSQ-1 systemにてアミノ酸シーケンスを行った。

## 結果

本酵素の一次構造を明らかにするために, マニュアルエドマン分解法ならびに気相自動アミノシーケンサーによってN末端アミノ酸より配列決定を試みたが<sup>9), 10)</sup>本酵素のN末端アミノ酸を検出することはできなかった。そこでタンパクの内部構造よりアミノ酸配列決定を行うことにした。まず得られた本酵素の精製標品をタンパク化学的にさらに高度に純粋にするために, FPLC ProRPC HR/10逆相カラムを用いて精製した。その時のクロマトプロファイルを図9に, それより溶出された各フラクションのWestern blot解析の結果を図10に示した。これらの結果よりF1フラクションにのみ本酵素が単一に溶出されることが判明したため, このフラクションを還元アルキル化処理し, HPLC C4逆相カラムにかけた。その溶出プロファイルおよびそれぞれのフラクションのSDS-PAGEを図11, 図12に示す。CM3のフラクションにカルボキシメチル化された本酵素タンパクが溶出された。このフラクションをLysilendopeptidase処理しHPLC C18逆

相カラムにてペプチドフラグメントの精製を行った結果、図13に示すようなクロマトプロファイルが得られた。得られた各フラクションの質量分析の結果より適当な長さを持つと考えられるペプチドK6, K10, K15, K16, K17, K19のフラクションを選び、それぞれのアミノ酸配列を決定した。得られた結果は図14に示す通りである。

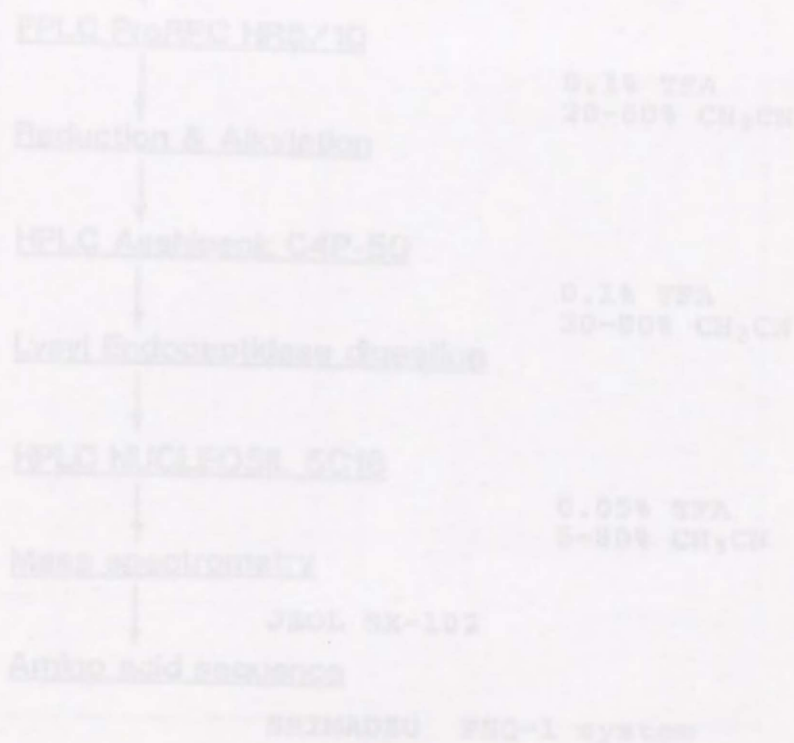
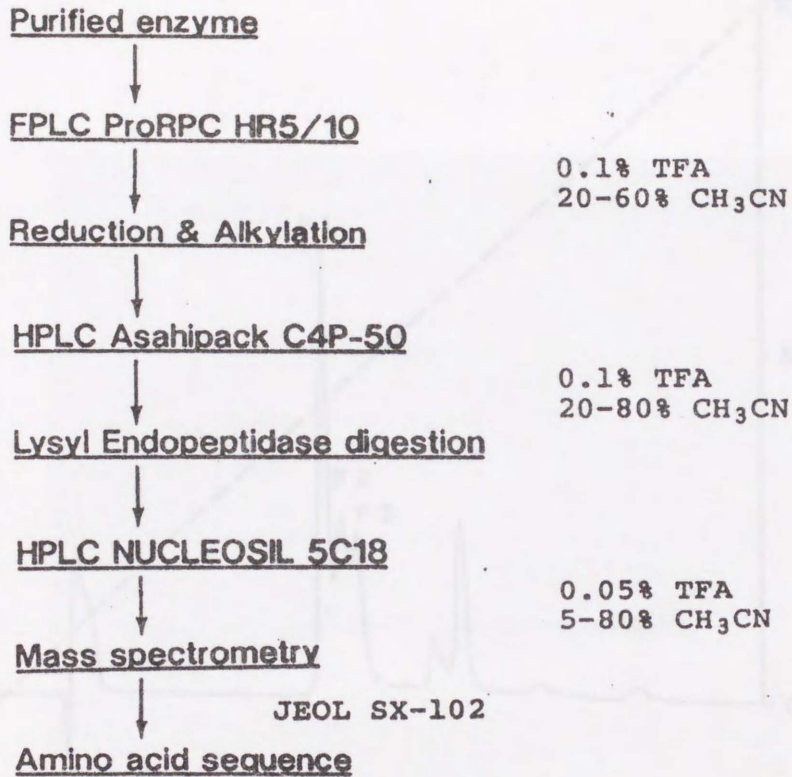


図13. 1-4074-アミノ酸ペプチドの精製と分析

ペプチドK6, K10, K15, K16, K17, K19



SHIMADZU PSQ-1 system

図8. ペプチドフラグメントの精製ならびに  
アミノ酸シーケンス

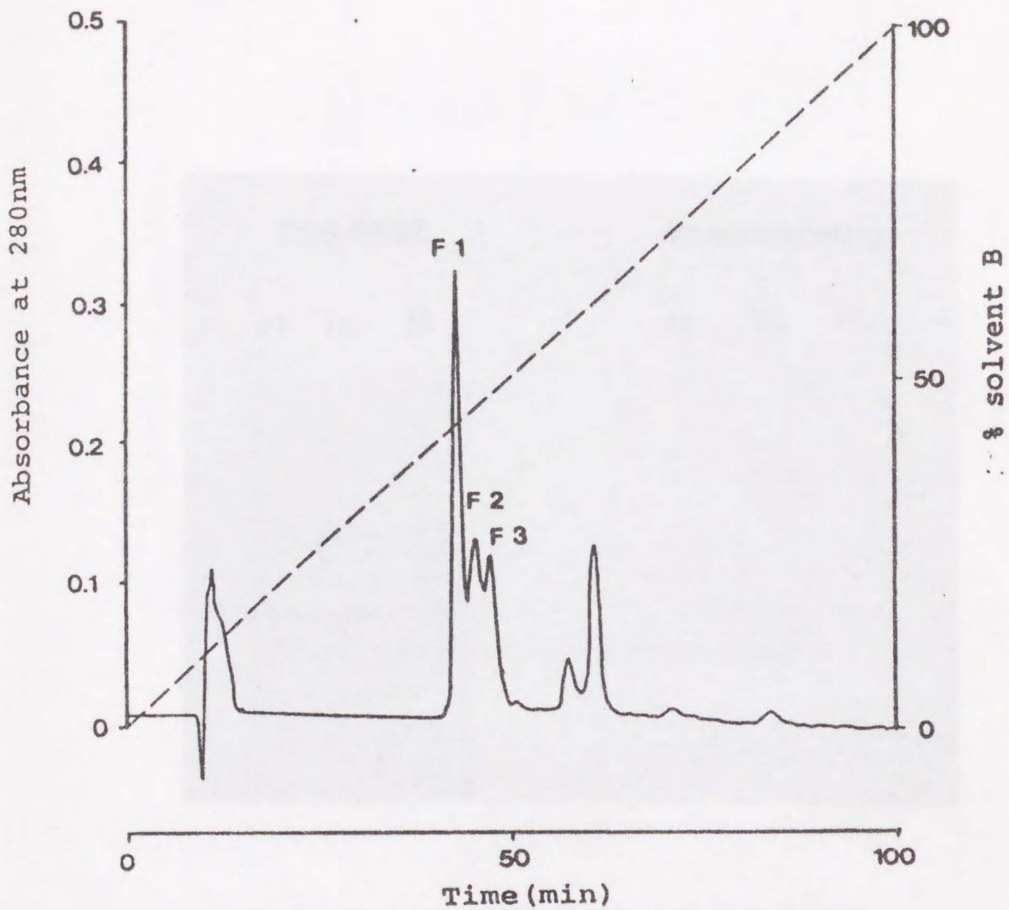


図9. FPLC ProRPC HR5/10のクロマトプロファイル

Solvent A: TFA/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN(0.1:79.9:20)

Solvent B: TFA/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN(0.1:39.9:60)

Range of Absorbance: 0.5

Flow rate: 0.35ml/min



図10. FPLCのクロマトグラフィーにより得られたフラクションのSDS-PAGEおよびWestern blot解析

図11. FPLC Apparatus CAP-1000 (4.7 x 7.5 x 7.5 cm)  
 Solvent A: TPA/H<sub>2</sub>O/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.5:19.5:80)  
 Solvent B: TPA/H<sub>2</sub>O/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.1:19.9:80)  
 Range of Absorbance: 0.24  
 Flow rate: 0.5ml/min

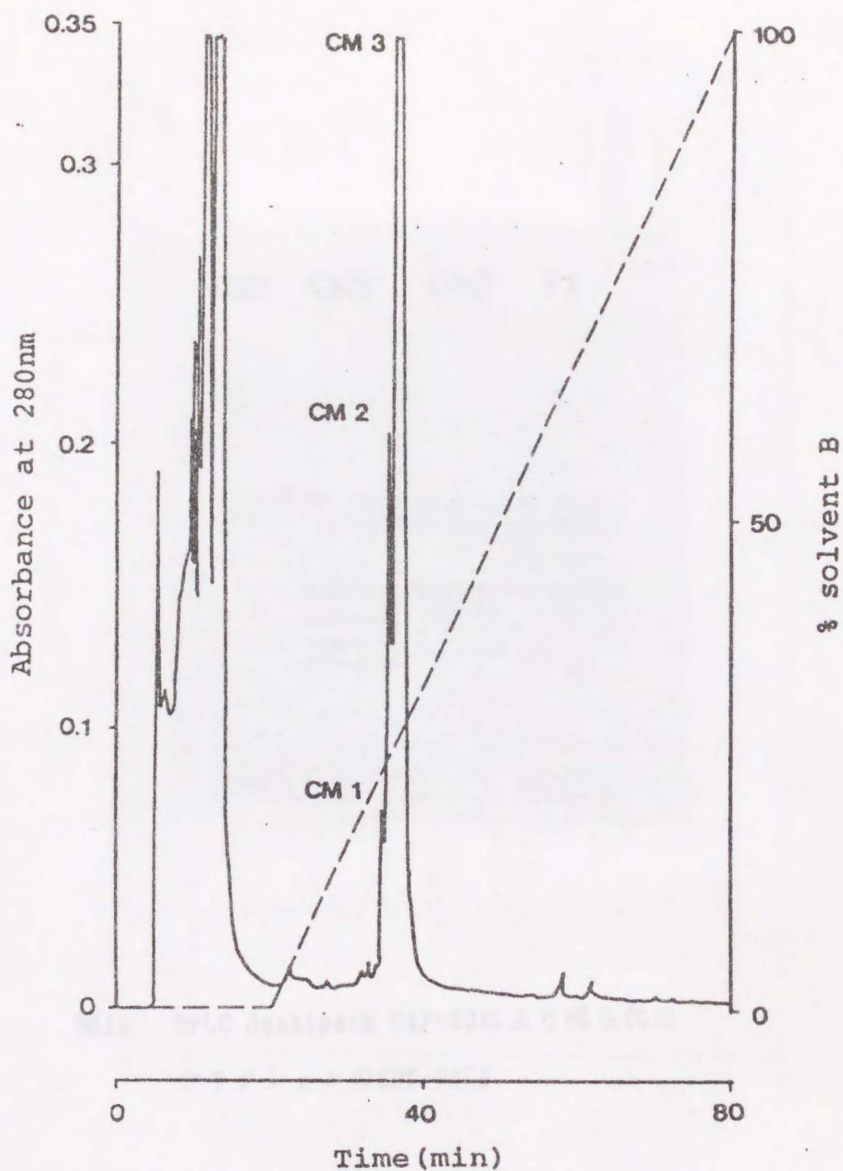


図11. HPLC Asahipack C4P-50のクロマトプロファイル

Solvent A: TFA/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN(0.1:79.9:20)  
 Solvent B: TFA/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN(0.1:19.9:80)  
 Range of Absorbance: 0.34  
 Flow rate: 0.5ml/min

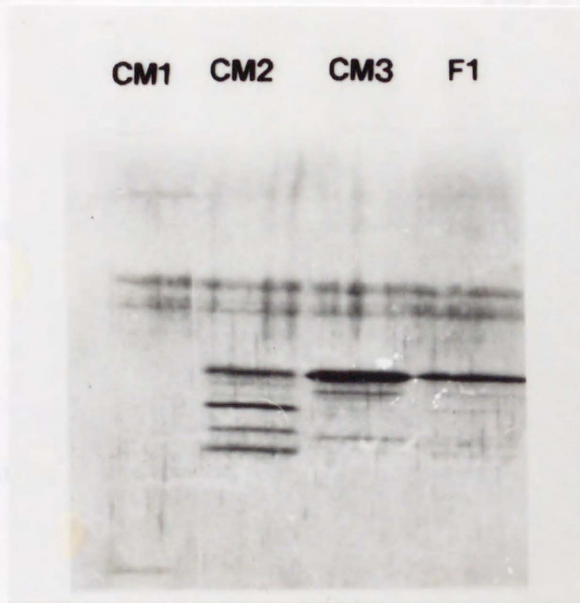


図12. HPLC Asahipack C4P-50により得られた  
フラクションのSDS-PAGE

図12. HPLC Asahipack C4P-50によるフラクションのSDS-PAGE

Asahipack C4P-50 column (4.6mm x 150mm)  
 Solvent A: TFA/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN (0.05:99.95:0.00)  
 Solvent B: TFA/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN (0.05:15.95:84.00)  
 Range of absorbance: 0.33  
 Flow rate: 0.5ml/min



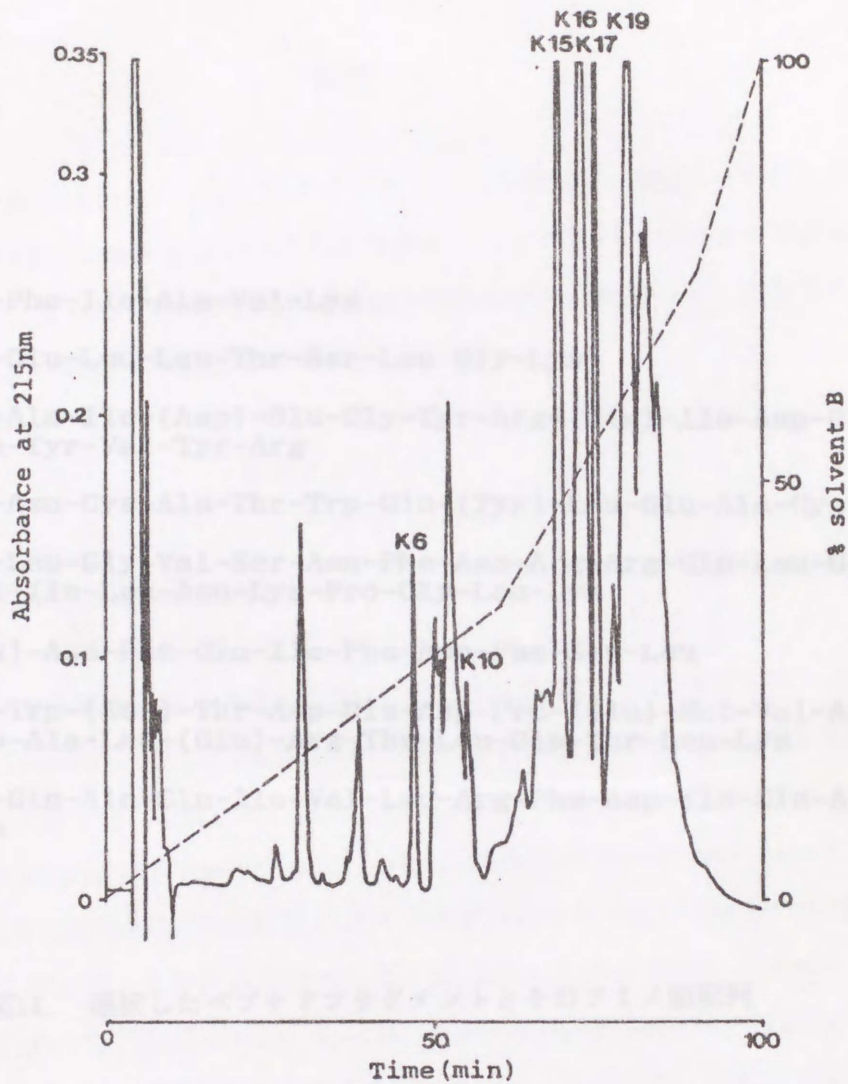


図13. HPLC NUCLEOSIL 5C18によるペプチドフラグメントの精製

NUCLEOSIL 5C18 column (4.0x150mm, GL Science)  
 Solvent A: TFA/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN (0.05:94.95:5)  
 Solvent B: TFA/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN (0.05:19.95:80)  
 Range of Absorbance: 0.32  
 Flow rate: 0.5ml/min

- K6 Thr-Phe-Ile-Ala-Val-Lys
- K10 Asp-Glu-Leu-Leu-Thr-Ser-Leu-Gly-Lys
- K15 Thr-Ala-Ile-(Asp)-Glu-Gly-Tyr-Arg-(His)-Ile-Asp-Gly  
-Ala-Tyr-Val-Tyr-Arg
- Ser-Asn-Cys-Ala-Thr-Trp-Glu-(Tyr)-Leu-Glu-Ala-Cys-Lys
- K16 Ser-Leu-Gly-Val-Ser-Asn-Phe-Asn-Arg-Arg-Gln-Leu-Glu  
-Val-Ile-Leu-Asn-Lys-Pro-Gly-Leu-Lys
- K17 (Glu)-Asn-Phe-Gln-Ile-Phe-Asp-Phe-Ser-Leu
- K19 Leu-Trp-(Ser)-Thr-Asp-His-Asp-Pro-(Glu)-Met-Val-Arg  
-Pro-Ala-Leu-(Glu)-Arg-Thr-Leu-Gln-Thr-Leu-Lys
- Thr-Gln-Ala-Gln-Ile-Val-Leu-Arg-Phe-Asp-Ile-Gln-Arg-Gly  
-Leu

図14. 選択したペプチドフラグメントとそのアミノ酸配列

### 3・分子生物学的解析

#### 概要

本酵素cDNAをラット肝cDNAライブラリーより単離し、DNAシーケンスおよびCOS細胞におけるタンパク発現実験によって単離されたcDNAの確認を行った。さらにこのCOS細胞にて発現されたタンパクを用いて、本酵素のコレステロールに対する活性を検討した。

#### 材料および方法

##### 1. cDNAライブラリーの作成

cDNAの合成は、ラット肝よりPoly(A)<sup>+</sup>RNAを調製し<sup>11)</sup>、プライマーとしてoligo(dT), random hexanucleotides, 合成DNA(5' GCCACCTTTTCTCTGATGGCC3')を使用しcDNA合成kit(Amersham)を用いて行った。合成されたcDNAに80  $\mu$ molのS-Adenosylmethionine, 20unitsのEcoRI Methylase(TAKARA)を加えて37°Cで1時間反応させてメチル化を行った。フェノール抽出およびエタノール沈澱を行った後、phosphorylated EcoRI linker d(pGGAATTCC)(TAKARA)1  $\mu$ g, T<sub>4</sub> DNA ligase(TOYOBO)20units, 66  $\mu$ mol ATPを加えて15°C12時間反応させライゲーションを行った。70°C10分間加熱し反応を停止後、EcoRI 20unitsを加えて37°C1時間反応させた。フェノール抽出を行い、その上清をSephacryl CL-4B(Pharmacia)にかけサイズ分画を行った。できるだけ大きいサイズのフラクションのcDNA 0.1  $\mu$ gを、 $\lambda$ gt11,  $\lambda$ ZAP(Stratagene)1  $\mu$ gとライゲーションさせた。さらに、

Gigapack II Gold(Stratagene)を用いてin vitroパッケージングを行った。

## 2. 特異抗体によるcDNAスクリーニング

初めに $\lambda$ gt11 cDNAライブラリーをポリクローナル抗体を用いてスクリーニングした。ファージの感染、プレーティングおよび発現したタンパクのプロットはGloverの方法に従った<sup>12)</sup>。プロットされたニトロセルロースフィルターを3% Gelatin, TBSにて37°C2時間ブロッキングし、20  $\mu$ g/mlのポリクローナル抗体を含むTBSと4°C12時間反応させた。TBSTにてフィルターを洗浄後、 $[^{125}\text{I}]$ -Anti-mouse Ig(Amersham)をTBSで1000倍希釈した溶液と20°C2時間反応させた。フィルターをTBSTで洗浄し風乾後、-80°Cでオートラジオグラフィーを行った。陽性プラークを拾いさらにスクリーニングを繰り返してクローニングを行った。

## 3. クローン化されたcDNAプローブによるスクリーニング

25ng cDNA insertを25  $\mu$  Ci  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTPを用いて標識した。標識にはオリゴラベリングキット(Pharmacia)を使用した。これをプローブとしてcDNAライブラリーをスクリーニングした<sup>11)、12)</sup>。

## 4. Northern blottingおよびSouthern blotting

cDNAをプローブとする場合の標識は3.と同様に行った。Oligonucleo-

A A T

tides(5' TTIACIGCGAT AAIGT TT3')をプローブとした場合は、50ngの

T G C

DNAと $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  50 $\mu\text{Ci}$ を混合し、10units  $T_4$  Kinase(TOYOBO)を加えて37°C1時間反応させ標識を行った。ハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件はManiatisらの方法<sup>11)</sup>に従った。

#### 5. DNAシーケンス

Sanger法に従い $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{dCTP}$ , Sequenase DNA sequencing kit (TOYOBO)を用いて行った。Sequence strategyはM13mp18, M13mp19にサブクロニングを行うForced cloningとサブクロニングされたプラスミドをExonuclease III消化して行うStepwise subcloningを併用した。なおStepwise subcloningにおけるdeletion mutantの作成にはKilo-Sequence用Deletion Kit(TAKARA)を使用し、二本鎖プラスミドDNAを鋳型としてシーケンスを行った<sup>11)</sup>。

#### 6. COS細胞におけるタンパク発現実験

発現ベクター-pSVL(Pharmacia)にcDNA insertをライゲーションして構築したベクターをDEAE-Dextran法<sup>11)</sup>によってCOS細胞にトランスフェクトした。48-72時間培養した後、細胞をかき集めてホモジナイズし卓上マイクロ遠心機にて10,000rpm 10分間遠心しその上清をWestern blottingならびに酵素活性測定に用いた。

## 結果

Lysilendopeptidase処理により得られたK6ペプチドのアミノ酸シーケンスならびに質量分析の結果を図15ならびに図16に示してある。このペプチドは比較的縮重度の低いアミノ酸を多く含んでいたものでこれに対応する合成DNAを図16に示すようなデザインで作成した。この合成DNAおよび特異抗体をプローブとして用いて本酵素のcDNAクローニングを行った。クローニングの過程は図17に示した。まずoligo(dT)プライミングにより作製した $\lambda$ gt11ライブラリーをポリクローナル抗体を用いてスクリーニングした。約100,000個のプラークより8個のポジティブプラーク $\lambda$ 2,  $\lambda$ 4,  $\lambda$ 5,  $\lambda$ 7,  $\lambda$ 9,  $\lambda$ 11,  $\lambda$ 12,  $\lambda$ 13を得た。各々のクローンについて先に作成した合成DNAをプローブとしてSouthern blot解析を行ったところ $\lambda$ 4を除く全てのクローンに対して、1.8kbpの位置にハイブリダイズするバンドを検出した(図18)。したがって $\lambda$ 4以外のクローンは本酵素の翻訳領域を少なくとも一部は含んでいることが確認された。この1.8kbpのcDNA insertをプローブとしてラット肝poly(A)<sup>+</sup>RNAのNorthern blot解析を行ったところ、約3.5kbの位置にバンドが検出された(図19)。このことより本酵素のmRNAのサイズは約3.5kbであることが分かった。このmRNAのサイズと比較して得られたポジティブクローンは小さかったため、さらに $\lambda$ 11のinsertをプローブとして $\lambda$ ZAPライブラリーをスクリーニングした。得られたポジティブクローンZ8は3'側に約100bp長いクローンであったので、 $\lambda$ 11ならびにZ8のシーケンスを行った(図20)。DNAシーケンスより導かれたタンパクの分子量は34,000となり、精製標品の分子量よりかなり小さい値となった。またCOS細胞に本cDNAのcoding regionをトランスフェクトしたところ本酵素タンパクの発現はみられなかった。

以上の事実から本cDNAクローンは不完全なクローンであると思われたので、Primer ExtendedライブラリーおよびRandom Hexaprimingライブラリーを入11 insertをプローブとしてリスクリーニングした。8個のポジティブクローンH23-1, H23-2, H23-3, H241, H252, E23, E24, E43を得、このうち最も長いcoding regionを持っていると思われるH241について解析を行った(図20)。また本cDNAを図21に示したようにpSVL発現ベクターに組み込んで、COS細胞にトランスフェクトしたところ本酵素の抗体と反応するタンパクが発現していることが確認できた(図22)。さらにこの発現されたタンパクの酵素活性をアンドロステジオンを基質として調べてみたところ明らかに酵素活性を示すことを認めた(比活性: 2.5pmol/min/mg protein)(図23)。ところで古胡らは、従来本酵素と異なるとされていたコルチゾン5 $\beta$ -還元酵素は、本酵素と同一であることを酵素化学的研究から明らかにしている<sup>5)</sup>。そこで本cDNAより発現した酵素のコルチゾンに対する活性を検討したところ、明らかに酵素活性が認められた(比活性: 2.8pmol/min/mg protein)。図24に $\Delta^4$ -3-ケトステロイド5 $\beta$ -還元酵素cDNAの全シーケンスを示す。全長3189bpで、Poly A tailは欠けており約2000bpの3'非翻訳領域を持っていた。これより導かれた本酵素タンパクは327のアミノ酸より構成され分子量は37376であった。また下線で示してあるようにペプチドより求めたアミノ酸配列を全て含んでいた。

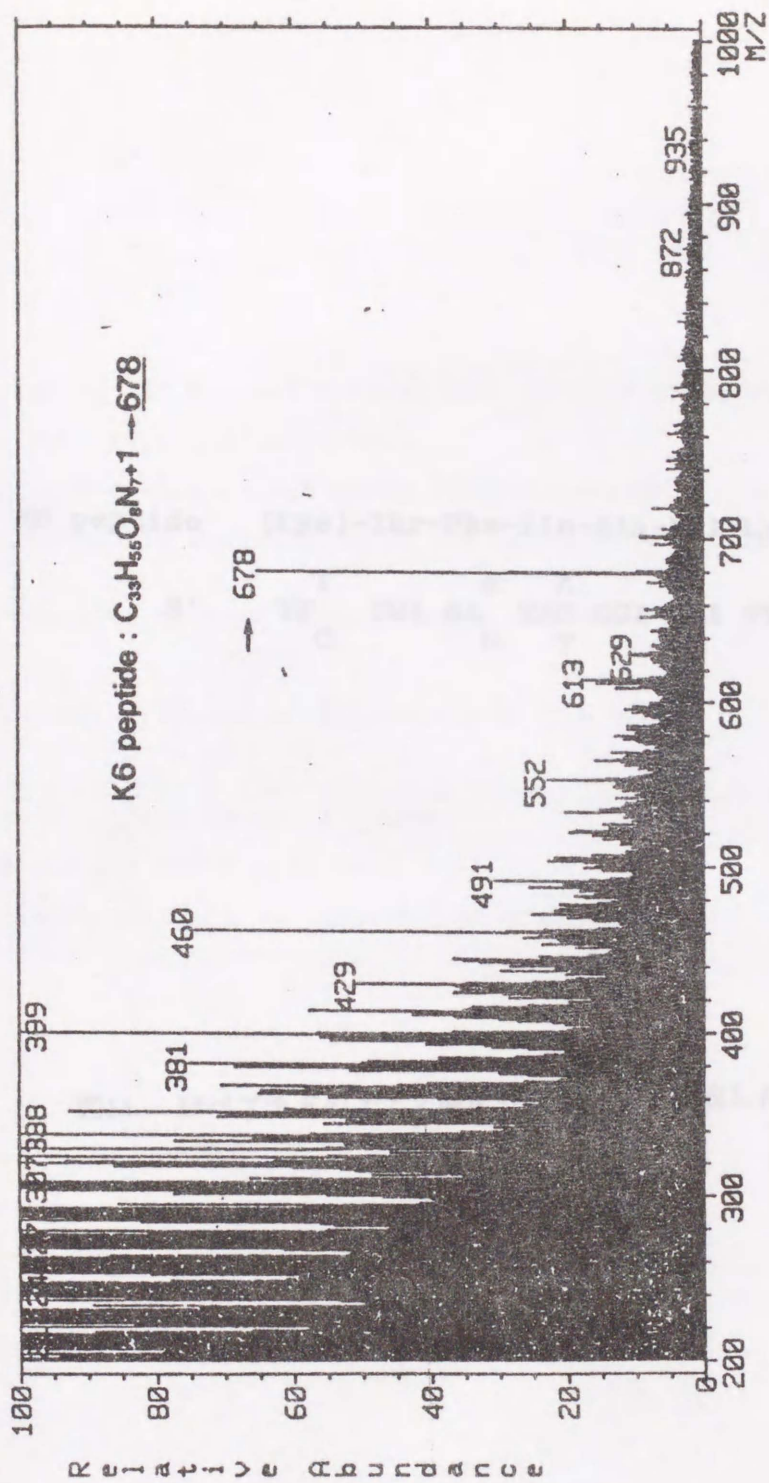


図15. K6ペプチドの質量分析



K6 peptide (Lys)-Thr-Phe-Ile-Ala-Val-Lys

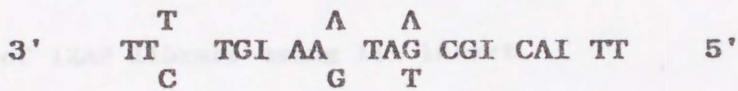


図16. K6ペプチドのアミノ酸配列に基づいて作成した合成DNA

Screening of Rat Liver  $\lambda$ gt11 cDNA library using specific Antibodies

↓  
 $\lambda$ 2,  $\lambda$ 4,  $\lambda$ 5,  $\lambda$ 7,  $\lambda$ 9,  $\lambda$ 11,  $\lambda$ 12,  $\lambda$ 13.

↓  
Southern blot analysis using oligonucleotide  
and  
Northern blot analysis using  $\lambda$ 11 insert (mRNA size:3.5kb)

Rescreening of  $\lambda$ ZAP library using  $\lambda$ 11 insert

↓  
Z8

↓  
Sequence analysis and Expression in COS cells

Rescreening of Primer Extended library and Random Hexanucleotides  
Primed library using  $\lambda$ 11 insert

↓  
H23-1, H23-2, H23-3, H241, H252, E23, E24, E43

↓  
Sequence analysis and Expression in COS cells

図17. cDNAの単離と確認

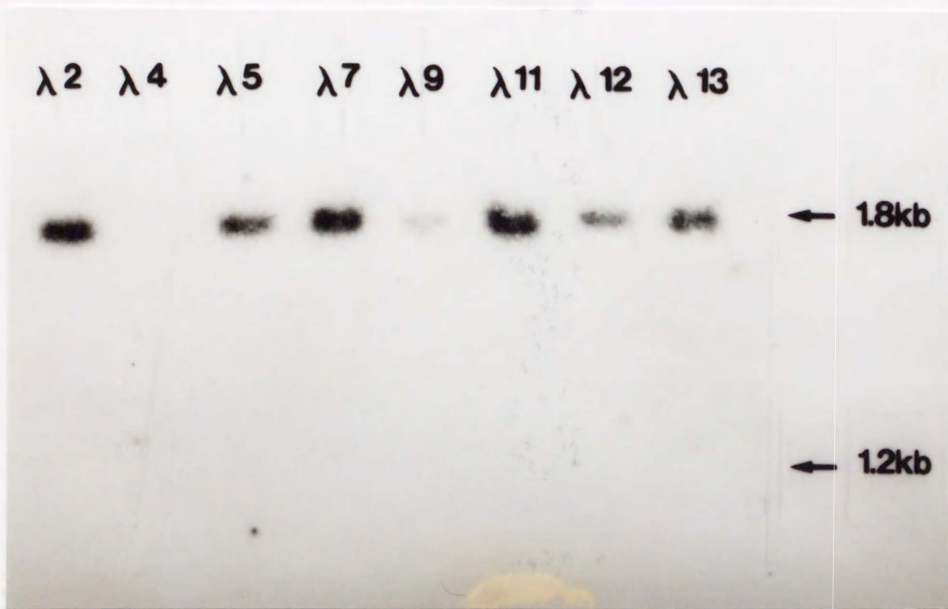


図18. K6合成DNAプローブを用いたSouthern blot解析による  
単離したcDNAの確認

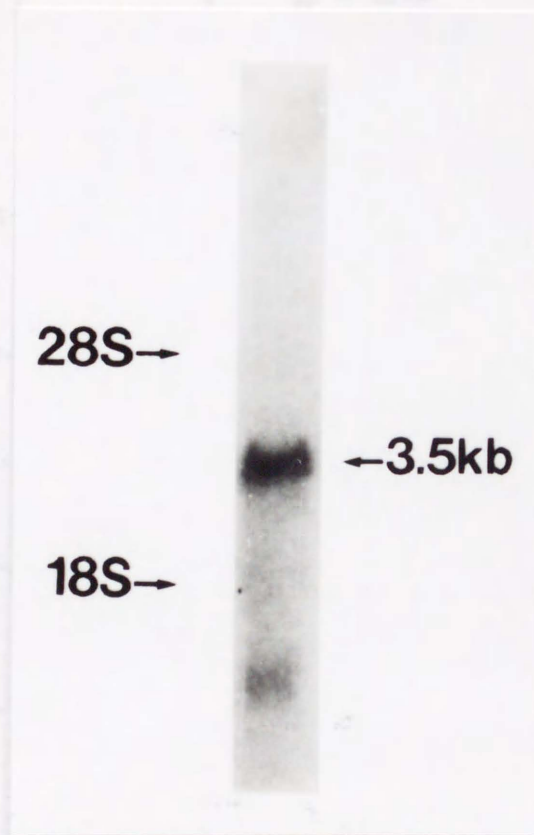


図19. 単離されたcDNA insertをプローブとして用いた  
ラット肝mRNAのNorthern blot解析

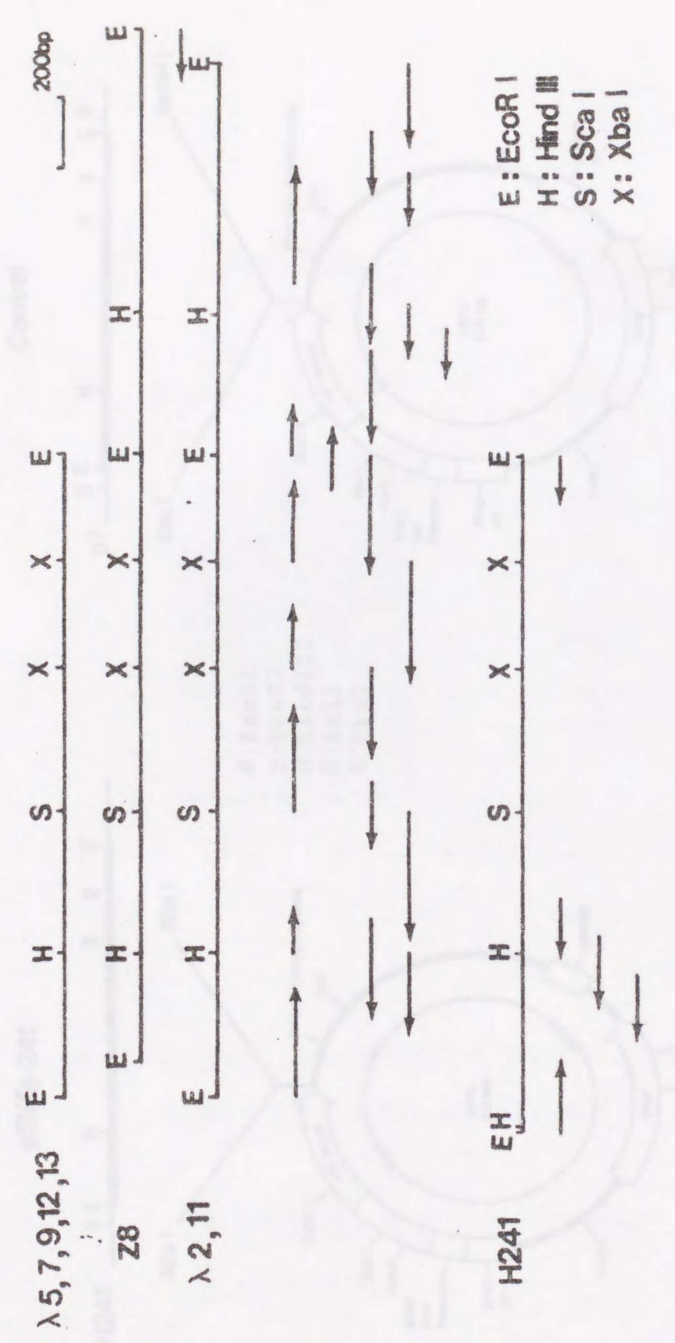
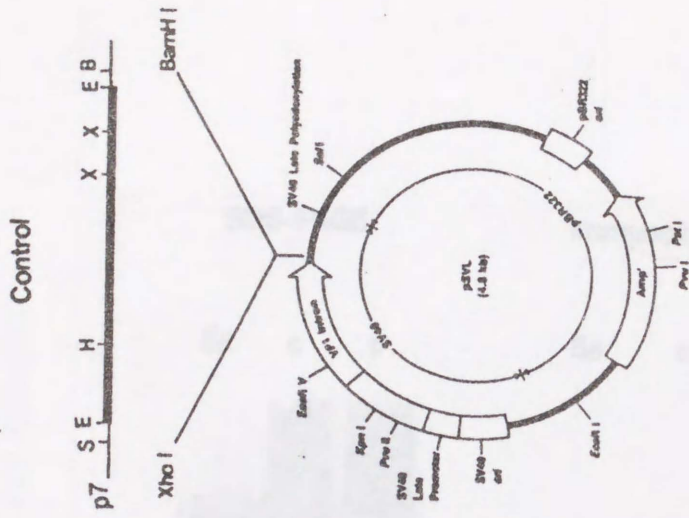


図20. 単離された主なcDNAのRestriction mapとSequence strategy



B: BamHI  
E: EcoRI  
M: HindIII  
S: Sall  
X: XbaI

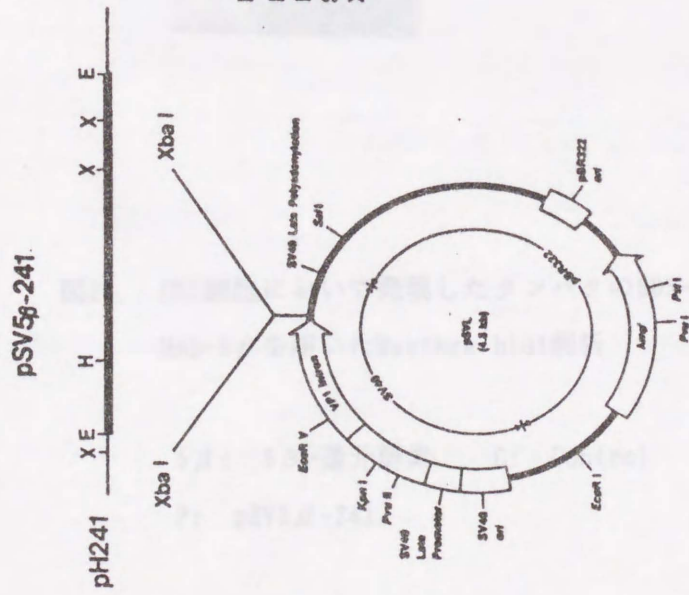


図21. 発現ベクターの構築

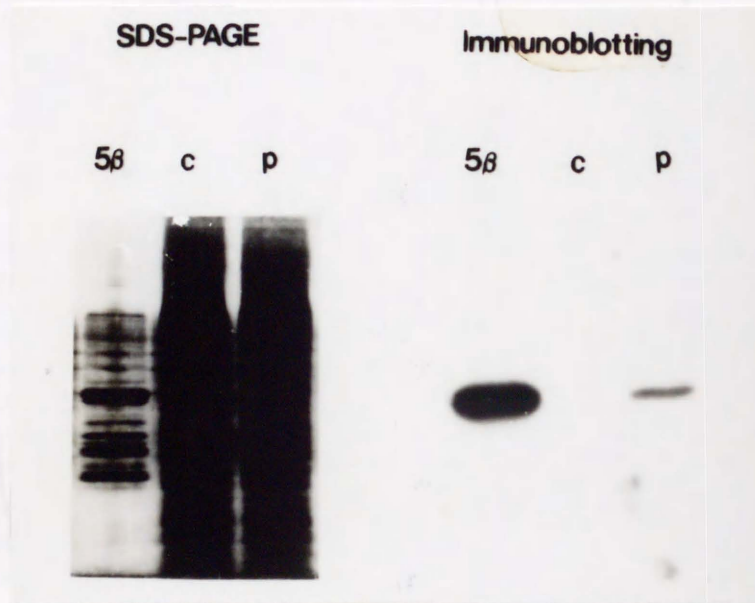


図22. COS細胞において発現したタンパクのSDS-PAGEおよび  
Mab-5 $\beta$ を用いたWestern blot解析

5 $\beta$ : 5 $\beta$ -還元酵素 C: Control

P: pSV5 $\beta$ -241

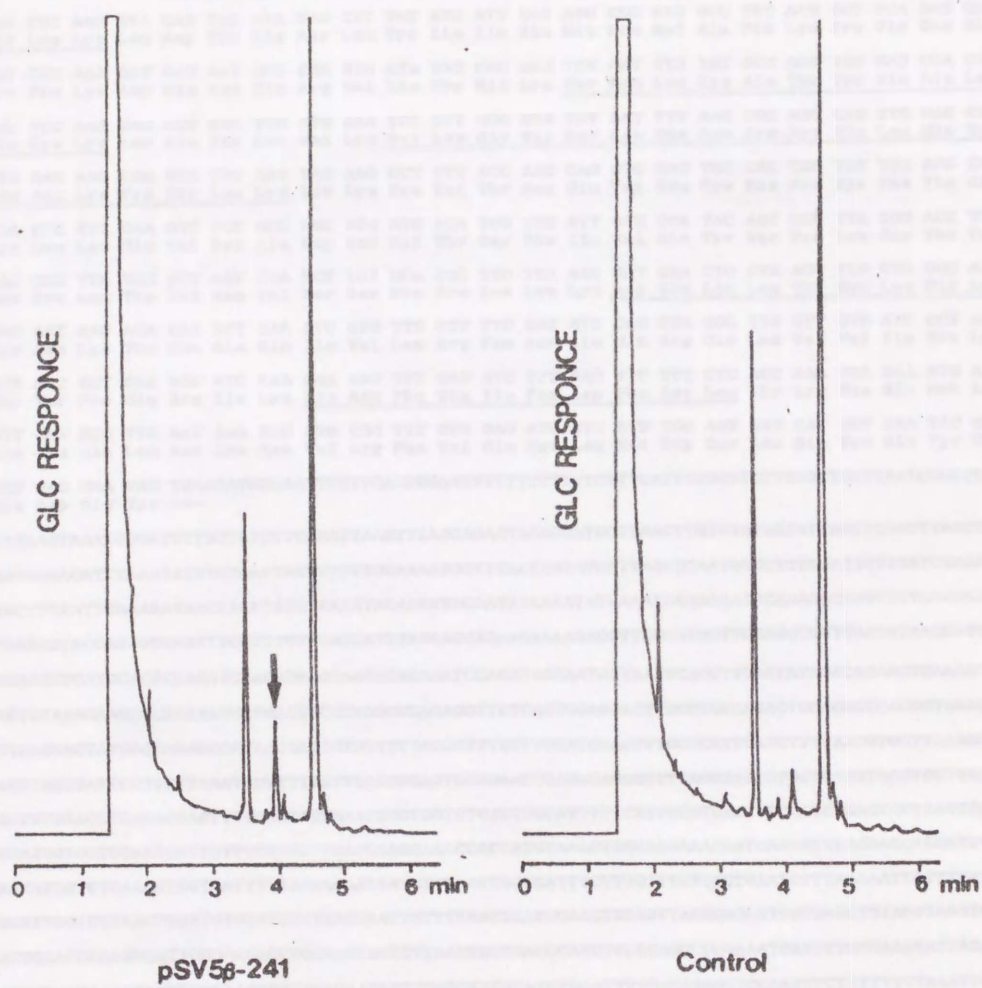


図23. COS細胞において発現したタンパクによる反応産物の確認

↓ :  $5\beta$ -還元酵素の反応産物である $5\beta$ -アンドロスタンジオン



1	TTCAGAAATCACTACTTGAAGCTTCAGATCCCTTCTCTACAATG Met Asn Leu Ser Thr Ala Asn His His Ile																			70
1																				10
71	CCC CTA AAT GAT GGT AAC AGC ATT CCG ATC ATC GGG CTT GGA ACC TAC TCA GAC CCT AGA CCG GTA CCT GGC	142																		
11	Pro Leu Asn Asp Gly Asn Ser Ile Pro Ile Ile Gly Leu Gly Thr Tyr Ser Asp Pro Arg Pro Val Pro Gly	34																		
143	AAG ACC TTT ATA GCA GTG AAG ACA GCT ATT GAG GAG GGG TAC CCG CAT ATT GAT GGG GCC TAC GTC TAC CGA	214																		
35	Lys Thr Phe Ile Ala Val Lys Thr Ala Ile Asp Glu Gly Tyr Arg His Ile Asp Gly Ala Tyr Val Tyr Arg	58																		
215	AAT GAA CAT GAA GTC GGT GAG GCC ATC AGA GAA AAG GTG GCA GAA GGG AAG GTA AAG AAG GAA GAG ATT TTC	286																		
59	Asn Glu His Glu Val Gly Glu Ala Ile Arg Glu Lys Val Ala Glu Gly Lys Val Lys Arg Glu Glu Ile Phe	82																		
287	TAC TGT GGA AAG TTA TGG AGT ACA GAC CAT GAT CCA GAG ATG GTC CGC CCA OCC CTG GAA AGG ACC CTG CAG	358																		
83	Tyr Cys Gly Lys Leu Trp Ser Thr Asp His Asp Pro Glu Met Val Arg Pro Ala Leu Glu Arg Thr Leu Gln	106																		
359	ACC CTC AAG CTA GAT TAC ATA GAC CTT TAT ATC ATT GAG ATG CCC ATG GCC TTT AAG CCT GGA GAG GAA TTT	430																		
107	Thr Leu Lys Leu Asp Tyr Ile Asp Leu Ser Ile Ile Glu Met Pro Met Ala Phe Lys Pro Gly Glu Glu Phe	130																		
431	TAT CCT AAA GAT GAG AAT GGC CGA GTG ATA TAC CAC AAA TCA AAT CTG TGT GCC ACG TGG GAG OCA CTG GAA	502																		
131	Tyr Pro Lys Asp Glu Asn Gly Arg Val Ile Tyr His Lys Ser Asn Leu Cys Ala Thr Trp Glu Ala Leu Glu	154																		
503	GCT TGC AAA GAC GCT GGC TTG GTG AAA TCC CTT GGG GTG TCT AAT TTT AAC CGC AAG CAG CTG GAG GTC ATC	574																		
155	Ala Cys Lys Asp Ala Ile Leu Val Lys Ser Leu Gly Val Ser Asn Phe Asn Arg Arg Gln Leu Glu Val Ile	178																		
575	TTG AAC AAG CCA GGA CTC AAG TAC AAC CCT GTC ACC AAC CAG GTG GAG TGC CAC CGG TAT TTC ACC CAG ACA	646																		
179	Leu Asn Lys Pro Gly Leu Lys Tyr Lys Pro Val Thr Asn Gln Val Glu Cys His Pro Tyr Phe Thr Gln Thr	202																		
647	AAA CTC CTT GAA GTT TCT GCC AGC AGC ATG ACA TCG TTC ATT GTC GCA TAC AOC CGC TTA GGG ACC TGT COC	718																		
203	Lys Leu Leu Glu Val Ser Ala Ser Ser Met Thr Ser Phe Ile Val Ala Tyr Ser Pro Leu Gly Thr Cys Arg	226																		
719	AAC CCG TTA TGG GTG AAT GTA TCT TCT CCA CCG TTG TTA AAG GAT GAA CTC CTA ACC TCG CTG GGG AAA AAG	790																		
227	Asn Pro Leu Trp Val Asn Val Ser Pro Leu Leu Lys Ser Pro Leu Leu Lys Asp Val Thr Ser Leu Gly Lys Lys	250																		
791	TAC AAT AAG ACA CAA GCT CAA ATT GTG TTG COT TTC GAC ATC CAG CGA GGG TTG GTT GTC ATC CCT AAA AGT	862																		
251	Tyr Asn Lys Thr Gln Ala Gln Ile Val Leu Arg Phe Asp Ile Gln Arg Gly Leu Val Val Ile Pro Lys Ser	274																		
863	ACT ACC CTT GAA AGG ATC AAA GAA AAC TTT CAG ATC TTT CAG TTC TCT CTC ACC AAA GAA GAA ATG AAG GAC	934																		
275	Tyr Thr Pro Glu Arg Ile Lys Glu Asn Phe Glu Ile Phe Asp Phe Ser Leu Thr Lys Glu Glu Met Lys Asp	298																		
935	ATT GAA GCC TTG AAT AAA AAC GTG CGC TTT GTG GAG ATG CTC ATG TGG AGT GAT CAT CCT GAA TAC CCA TTT	1006																		
299	Ile Glu Ala Leu Asn Lys Asn Val Arg Phe Val Glu Met Leu Met Trp Ser Asp His Pro Glu Tyr Pro Phe	322																		
1007	CAT GAC GAA TAC TGAACATGAAAATTTCTTCAAGTGGAGTTTTTTTTTTTGTCTTTTCATTCGGGATCTTGAGCTGATTAATCCCTCCAGTGC	1097																		
323	His Asp Glu Tyr ***	326																		
1098	TAGAAATAAATGGGGTCTTGTACTCTTCAQATTAAGTTGAGCAGAATACACCATGCTTAACTTGTGTATAGTATTAATTCAACTTAGCTCTGATG	1192																		
1193	AAGAGAAGATTTAAATATATCTAAATAATTTTGTGGAAAAATGCTTTACTAGTATCTTTAGCTCAATGTGTCTTAGATTGTGTATGGAAATTACCG	1287																		
1288	AACTTTAATTCAAAAATAACAAAATATATAAAATACAGATACAATATAAAAATATAAAATACAAAAATATAAAAAAAGTCTTAAACCCAGGAGTCT	1382																		
1383	TGAGACTACCATAGGGAGTTTGTATTTGTTTAGCATTAGCAGACAAACAAAAGAGGTTGOCATGCTTCCAGGTGCTGACCATAACCATGACCCAA	1477																		
1478	ACAAGTCAATGACACAAGATGACACAGCCAAAGACACAAATCCACATACCAATATTAATGCACCTTGAGTATAGACAGAAGTGAAGTCTAGAA	1572																		
1573	AGTCTAAAGAAGAACATAAAOACAGATGTCGCGGGGCTAGAGGTTCTCACTGGAGGACTTGCCCTGGCAGACTGGAGACCCAGGTTGAGGGTGTGG	1667																		
1668	GTGAGGACTATCAGCAAAGCCATAACGATTTCTGTTTTTACCCTTTGTTTTCCATCCAGTGTGCCCATTCAGCTTTTAAATGTGCTGAAAGACAGAC	1762																		
1763	AGTTACCGATTCCTTCTTAAATTTGTTTTGTTCAAGGCAAGTGGGAATTAGACAGGGTCTCAAGTGTCTGCTCATGTAGCTGCTTACAAACTT	1857																		
1858	GCTGTGCAAGCTGACACCAAGTTTGAATTTGAACTTCAACCCCTGCTCTCTTCCATTTTTTCATGGCCCTGAGCTTCCACCTGACTGGTAAGTCCCACTT	1952																		
1953	GTACTGTGCTGTAAATCATTTCTGCCACTTCAACAAGAAACCACCATGTAAAAGTGGCAAGAAACAATCAATATATACAACCAAGATTTGTATAC	2047																		
2048	AATATGCTCTGAAGATGTTGATTTTTAAAGAAATGATATTTAAATAGCCATTTCTTTCTTTCTTCTGAAATCTTAAAAATATTTTATTTATGT	2142																		
2143	GCATTTGTTAGCTGCATGTGTATCTATGAGGAATTTTGAACCTCATGGAAGTGTACAGACAGTGTGTAGCTGTAGTAGGTTGCTGGGA	2237																		
2238	ATTGAACCCAAAGTCAATTTGGGAAGAGCTCAAGTCTCTTAACTGCTGAGCCATCTCCCAAGCCCAAAATGAAATTTGGGAATACTAGAGATAA	2332																		
2333	AGCTTTGTAAAGTATTTTTAAAGATCTTAAAGAAATTTGAGGATACGTATCTGAAATTTGACAAAAGCTGCAAGTCTTTTTTTTTAAATTTGATTTT	2427																		
2428	TAAAAATTTATTTACATTTCAAAATTTATCCCTCTCCCTGGGTTCCCATCCACAGACCTCCCTATCTCATCCCCCTCTCCCTTCTTCTATGAGA	2522																		
2523	GTGTTCAACCACCTACCCACTCTCCCTCTCCCTGCCCTGACATTCCCTTACACTAGGGGGTGGAGTCTTGGCAGGACCAAAGGCCCTCTCCCT	2617																		
2618	CCATTGTGCCCAACAAGGCCATCTCTGCTACATAGGCAGTGGAGCCATGGGCTGTCCATGTGTCTCTCTGGATGGTGGTTTATGCTCCCTGGG	2712																		
2713	AGCTCTGGTTGGTTGGTTCTGTTGTTATGGGTTGCAACCCCTTCAGCTCTTTAATCCTTTCTCTAATCTCTCCATTGGGGACCCCTGTTCTCAG	2807																		
2808	TTCTATGGTTGGCTGTGAGCATCCACCTGTGTATTGTTCATGCTCTGOCAGAGCCCTCAAGGAAATCAGGCTCTGTTCAGCAGACACAAGTAA	2902																		
2903	TTTTAGCGTATATAAAATTTTTAAAAAGTGAATAAATGATTACAACCTGTATCTATTTTTAAATTCATCTGAAATACAGTACATTTGTTTATATTAGAT	2997																		
2998	CACCTCCAAAGGCTGAGAGATCTCTAATATATTTAAATCAGAGAAATCAATGOCGAAAGAGAATAAGTTTTGAGAATTTACACTTAAAAATGTG	3092																		
3093	ATCAACATGAACCATTTTTGTTCAATCTGTTCAATATTGTTAAACAATGCTGTTCTCTGGAAAATTTTTTATTCACATGAATTAATAAAATATAA	3187																		
3118	TG																			

図24.  $\Delta^4$ -3-ケトステロイド5 $\beta$ -還元酵素cDNAの全塩基配列

#### 4・調節機構についての研究

##### 概要

Rafterら(1985)は本酵素に雌雄差があることを報告している<sup>4)</sup>。そこで本研究で得られましたモノクローナル抗体ならびにcDNAを用いて、雌雄差をもとに活性発現の調節機構について検討した。

##### 材料ならびに方法

##### 1. 酵素活性について

古胡らの方法<sup>5)</sup>に従って行った。

##### 2. 酵素タンパク量について

Mab-5 $\beta$ を用いたWestern blot解析により行った。

##### 3. mRNA量について

本酵素cDNAを用いたNorthern blot解析により行った。

##### 結果

Cytosolにおいて本酵素活性のみを測定することはできないため、奥田

らの精製法（図3）に従ってBlue Sepharoseカラムクロマトグラフィーの段階までの部分精製を行って得られた標品を用いて測定した。表1に示すように雄の方が雌よりも2-3倍高い酵素活性を示した。次にMab-5 $\beta$ を用いて20 $\mu$ gのcytosolについてWestern blot解析を行ったところ、本酵素タンパク量には明らかに酵素活性に対応した雌雄差が認められた（図25）。ところが本酵素cDNAを用いて雌雄各々5 $\mu$ gのpoly(A)<sup>+</sup>RNAについてNorthern blot解析を行ったところ、mRNAには酵素活性で見られたような雌雄差は存在しなかった（図26）。

	pmol/min/ $\mu$ g
Male	50.9
Female	19.3

表1: 雌雄マウス肝における5 $\beta$ -還元酵素活性

♂      ♀

. pmol/min/mg	
Male	50.9
Female	19.3

表1. 雌雄ラット肝における5 $\beta$ -還元酵素活性

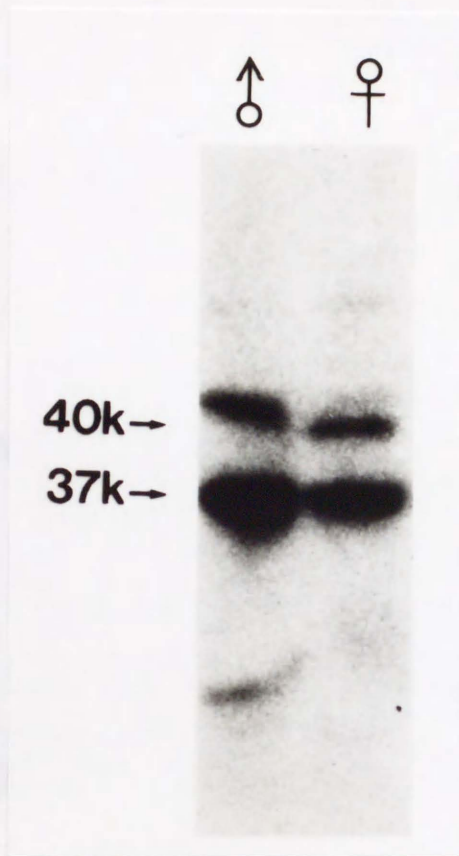


図25. 雌雄ラット肝のMab-5 $\beta$ を用いたWestern blot解析

Figure 26 shows Northern blot analysis of rat liver cDNA inserts. The blot is divided into two main sections: 5 $\beta$ -Reductase and  $\beta$ -Actin. Each section has two lanes labeled with male (♂) and female (♀) symbols. On the left side of the blot, two horizontal arrows point to specific bands, labeled '28S' and '18S'. The 5 $\beta$ -Reductase section shows a prominent dark band in the male lane and a much fainter band in the female lane. The  $\beta$ -Actin section shows two dark bands in both the male and female lanes, indicating equal loading of the samples.

図26. 雌雄ラット肝のcDNA insertを用いたNorthern blot解析

## 考察

$\Delta^4$ -3-ケトステロイド5 $\beta$ -還元酵素はステロイド核の4位の二重結合をA/Bcisに還元する重要な働きをしており、生体におけるステロイドホルモンの代謝ならびにコレステロールよりの胆汁酸生合成に関与している。しかしその重要性にもかかわらず本酵素タンパクはきわめて不安定であるため、1984年奥田らがグリセロール存在下で酵素タンパクを安定化して精製に成功するまでは単一標品は得られず、構造ならびに活性発現調節機構は不明のまま残されてきた。本論文において著者はこれらの問題を解決するためにタンパク化学的、免疫化学的ならびに分子生物学的研究を行い以下の結果を得た。

本研究に先だつてまずタンパク一次構造をマニュアルエドマン分解法ならびに気相自動アミノ酸シーケンサーにてN末端アミノ酸の一次構造決定を試みたが、本酵素のN末端アミノ酸を検出することはできなかった。この結果より、多くのcytosolタンパク同様<sup>13), 14)</sup>、本酵素のN末端アミノ酸も封鎖されている可能性が示唆された。そこでタンパク内部構造よりアミノ酸配列決定を行うためリジルエンドペプチダーゼにてペプチド化し、得られたペプチドのうち6個のフラグメントについてそのアミノ酸配列を決定した。さらにこれらを基にして作製した合成DNA、ならびに本酵素に対する特異抗体をプローブとして用いてcDNAクローニングを行った。得られた本酵素のcDNAクローンの塩基配列を決定し、それより本酵素の全一次構造を明らかにした。このようにして求められた一次構造の中に、本酵素をタンパク化学的処理することにより得られたペプチドのシーケンスを全て含んでいたことから、得られたcDNAが正しく本酵素タンパクをコードしていることが確認された。このことはさらにCOS細胞

を用いたタンパク発現実験によっても確認された。

先にTomkinsは肝cytosol画分を硫酸分画すると50-70%飽和画分に、コルチゾンに対してのみ活性を認めたことよりコルチゾン 5 $\beta$ -還元酵素と $\Delta^4$ -3-ケトステロイド5 $\beta$ -還元酵素は異なるものと報告した<sup>15)</sup>。それに基づいてIUB酵素命名委員会は、これら二つの酵素は異なるものであるとして前者にはEC 1.3.1.3.、後者にはEC 1.3.1.23.と異なるEC番号を与えた<sup>16)</sup>。しかしその後古胡らは酵素化学的ならびに酵素反応速度論的研究より両者は同一酵素タンパクであると示唆した<sup>5)</sup>。本研究においてcDNAによりCOS細胞で発現させ得られた酵素タンパクは、アンドロステンジオンのみならずコルチゾンに対しても酵素活性を示すことを明らかにした。このように単一のcDNAより発現したタンパクが両者の活性を示したことから両酵素が同一の酵素であることを確定的に証明するものである。

さらに本酵素が果たす役割について臓器分布をもとに検討した。Mab-5 $\beta$ を用いて各臓器についてWestern blot解析を行ったところ、本酵素は肝臓にのみ検出された。アンドロゲンにおいては5 $\beta$ -conformationをとるものはその生理活性をもっていない。これらのことより本酵素は4位の二重結合の還元を行うことにより、ステロイドホルモンの不活化ならびにコレステロールの胆汁酸への代謝を行っていると推測され、なお他の臓器で合成されたステロイドホルモンもコレステロールと同様に $\Delta^4$ 二重結合の還元は肝臓において行われると推測される。

このようにして本酵素のcDNAならびにモノクローナル抗体が得られたことにより、本酵素活性発現の調節機構に関する研究が分子生物学レベルで可能となった。本酵素には雌雄差があるとRafterらは報告しているが<sup>4)</sup>、このことは著者によっても追試確認された。すなわち酵素活性は雄が雌よりも2-3倍高く、Mab-5 $\beta$ を用いてWestern blot解析を行って



るとこの酵素活性の差は酵素タンパク量の差に基づいていることがわかった。さらにNorthern blot解析によりmRNA量を検討したところ、先に見られたような雌雄差は認められなかった。このことから本酵素の活性発現の調節にはPosttranslationalな機構が存在することが示唆された。

1. 本酵素に特異的なモノクローナル抗体の生成を達成した。
2. 本酵素のcDNAクローニングが完了していることが示唆された。
3. 本酵素をインビトロ化学的に純粋なものとし、サブストラートをより正確に決定した。
4. 本酵素のcDNAクローニングを行いその全長を決定した。
5. cDNAレベルにおけるサブストラート特異性を示す\*3-オキシステロイド5 $\alpha$ -還元酵素とコルチゾン5 $\alpha$ -還元酵素は同じ酵素であることを分子生物学的に証明した。
6. 本酵素が肝に発現していることを示した。
7. 本酵素の活性発現はPosttranslationalに調節されていることが示唆された。

## 総括

$\Delta^4$ -3-ケトステロイド5 $\beta$ -還元酵素の免疫化学的解析, タンパク化学的解析および分子生物学的解析を行ったことにより以下の知見を得た。

1. 本酵素に特異的なモノクローナル抗体Mab-5 $\beta$ を作成した。
2. 本酵素のN末端アミノ酸は封鎖されていることが示唆された。
3. 本酵素をタンパク化学的に純粋なものとし, ペプチド化することによりタンパクの内部構造を決定した。
4. 本酵素のcDNAクローニングを行いその全構造を決定した。
5. COS細胞におけるタンパク発現実験を行い $\Delta^4$ -3-ケトステロイド5 $\beta$ -還元酵素とコルチゾン5 $\beta$ -還元酵素は同じ酵素であることを分子生物学的に証明した。
6. 本酵素が肝に局在していることを示した。
7. 本酵素の活性発現はPosttranslationalに調節されていることが示唆された。

## 試薬

[<sup>125</sup>I]-Anti-mouse IgはAmersham, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP, [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]dCTPはDuPont/NEN Research Productsを使用した。分子生物学関係の試薬はTOYOBO, TAKARA, BRLのものを使用した。その他の試薬は和光純薬 (株), 半井化学工業 (株), 片山化学工業 (株)より購入した。

### 参考文献

- 1) Berseus, O., Danielsson, H., and Kallner, A. (1965): Synthesis and metabolism of cholest-4-ene-7 $\alpha$ , 12 $\alpha$ -diol-3-one and 5 $\beta$ -cholestane-7 $\alpha$ , 12 $\alpha$ -diol-3-one. J. Biol. Chem. 240, 2396-2401
- 2) Berseus, O. (1967): Conversion of cholesterol to bile acids in rat: purification and properties of a  $\Delta^4$ -3-ketosteroid 5 $\beta$ -reductase and 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase. Eur. J. Biochem. 2, 493-502
- 3) Okuda, A., and Okuda, K. (1984): Purification and characterization of  $\Delta^4$ -3-ketosteroid 5 $\beta$ -reductase. J. Biol. Chem. 259, 7519-7524
- 4) Mode, A., and Rafter, I. (1985): The sexually differentiated  $\Delta^4$ -3-ketosteroid 5 $\beta$ -reductase of rat liver. J. Biol. Chem. 260, 7137-7141
- 5) Furuebisu, M., Deguchi, S., and Okuda, K. (1987): Identification of cortisone 5 $\beta$ -reductase as  $\Delta^4$ -3-ketosteroid 5 $\beta$ -reductase. Biochim. Biophys. Acta 912, 110-114
- 6) Hayashi, S., Omura, T., Watanabe, T., and Okuda, K. (1988): Immunochemical evidence for the catalysis of Vitamin D<sub>3</sub> 25-hydroxylation and Testosterone 16 $\alpha$ -hydroxylation by homologous form of cytochrome P-450 in rat liver microsomes. J. Biochem. 103, 853-857
- 7) Goding, J. W. (1986): Monoclonal antibodies: principles and practice. 143-218, Academic Press, New York
- 8) 大島 博幸(1984):ステロイドホルモンの生物化学(日本比較内分泌学会編). 93-129 学会出版センター, 東京

- 9) Edman, P. (1950): Preparation of phenyl thiohydantoin from some natural amino acids. Acta. Chem. Scand. 4, 277-282
- 10) Findlay, J. B. C., and Geisow, M. J. (1989): Protein Sequencing 1-99, IRL Press, Oxford, England
- 11) Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis T. (1989): Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York
- 12) Glover, D. M. (1985): DNA Cloning Vol. 1, 49-78, IRL Press, Oxford England
- 13) Wold, F. (1981): In vivo chemical modification of proteins Annu. Rev. Biochem. 50, 783-814
- 14) Wold, F., and Moldave, K. (1984): Posttranslational modification Methods Enzymol. 107, 3-261
- 15) Tomkins, G. M. (1957): The enzymatic reduction of  $\Delta^4$ -3-ketosteroids. J. Biol. Chem. 225, 13-24
- 16) Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (1984) in Enzyme Nomenclature, 68-72, Academic Press, New York