

副腎皮質ミクロソームのチトクロム P-450 の 構造と機能に関する研究*

田頭浩子

広島大学大学院生物圏科学研究科

Studies on the structures and functions of adrenal microsomal cytochrome P-450

Hiroko TAGASHIRA

*Graduate School of Biosphere Sciences, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima 739, Japan*

要 旨

副腎皮質はコレステロールを出発基質として、鉱質コルチコイド、糖質コルチコイド及び副腎性ホルモンの3種類のステロイドホルモンを合成分泌する。細胞内のミトコンドリア内膜と小胞体膜には、4種類のP-450とその電子伝達系が局在し、コレステロールはこれらP-450による特異的水酸化反応を受けてステロイドホルモンへ変換される。精製P-450の反応の再構成系での解析は、界面活性剤あるいはリン脂質存在下のミセル系で行われてきたが、副腎皮質のP-450は疎水性の高い膜タンパク質であり、可溶化状態では酵素標品が不安定で失活しやすいために反応の詳細な解析が困難であった。そこで、オルガネラ膜類似の環境であるリポソーム膜系でのP-450の反応解析が必要とされてきた。この論文は、副腎皮質ミクロソームのP-450 (C21) と P-450 (17 α , lyase) の2種のアイソザイムをそれぞれ人工膜脂質に組み込んだプロテオリポソームを用いて解析したP-450の構造と機能に関する研究をまとめたものである。

本論文の第I編ではP-450の膜トポロジーについて論述した。肝ミクロソームP-450の場合は、N末端のペプチド部分のみを膜に挿入し、基質結合部位を含むタンパク質分子の大部分が細胞質側に露出した膜への結合様式が提出されている。しかし、このモデルではP-450が脂質二重層の疎水性領域に濃縮された脂溶性基質を代謝するという現象を説明しにくい。

精製したウシ副腎ミクロソームのP-450 (C21) と、モルモット副腎ミクロソームのP-450 (17 α , lyase) をコール酸透析法で人工膜リポソームに組込んだプロテオリポソームとミクロソームを用いて、両P-450の膜内における存在様式を解析した。レーザーフラッシュ偏光解消法によるミクロソームおよびリポソーム膜中の両P-450の回転運動の解析結果では、これらのP-450の回転緩和時間が、1本のアンカーペプチドだけで膜に結合している膜タンパク質に比べて非常に遅いことから、

これらの P-450 分子はかなりのタンパク質部分を膜中に挿入して存在することが示された。トリプシンを用いてタンパク質分解を行うと、リポソーム膜を可溶化した状態では、両 P-450 標品は、電気泳動では確認できない低分子量のペプチド断片に分解されたのに対して、ミクロソームやリポソーム膜中の P-450 (C21) は比較的高分子量の 3 つのフラグメントに分解され、P-450 (17 α , lyase) は全く分解されなかった。P-450 (C21) のペプチドフラグメントを精製してトリプシンによる切断部位を同定すると共に、限定分解後の膜中の P-450 (C21) 標品の分光学的性質、酵素活性、安定性などを解析した。緑膿菌の結晶 P-450 (cam) の立体構造に基づいて、これらの実験結果を説明するため、P-450 (C21) 分子のかなりのタンパク質部分が膜中に組込まれているモデルを提示した。膜中ではトリプシンで切断を受けない P-450 (17 α , lyase) も P-450 (C21) と同様に、膜中にタンパク質分子のかなりの部分が挿入された結合様式をとっているものと考えられる。

第 II 編では、P-450 の機能に関して、P-450 (17 α , lyase) が触媒する連続的水酸化反応について論述した。P-450 (C21) はコルチコイド生合成に必須なステロイド 21 位水酸化反応を触媒する。P-450 (C21) については既に反応機構の詳細な解析が膜再構成系でなされている。一方、P-450 (17 α , lyase) の膜中の反応の解析はほとんどされていなかった。P-450 (17 α , lyase) はプロゲステロンを基質として 17 α 位水酸化反応を触媒してコルチコイド生成経路の基質である 17 α -ヒドロキシプロゲステロンを生じると共に、C17-C20 側鎖切断反応を触媒して副腎性ホルモンのアンドロステンジオンを生成する。P-450 (17 α , lyase) のこのような活性調節機構を解明するためには、まずアンドロステンジオン合成経路を解析しなければならない。

P-450 (17 α , lyase) によるアンドロステンジオン合成反応には 3 つの機構が考えられる。第 1 は、プロゲステロンから 1 段階のみの水酸化反応によってアンドロステンジオンを生じる機構である。第 2 の機構ではプロゲステロンから 1 段階の水酸化反応で生じた代謝中間体が、一旦酵素から解離して反応溶液中に蓄積した後、再び酵素に結合してアンドロステンジオンへ変換される。第 3 の機構は、酵素から解離しない反応中間体を經由して 2 段階の連続的な水酸化反応によってプロゲステロンからアンドロステンジオンを生じる機構である (連続的水酸化反応)。放射性基質を用いた同位体希釈効果の実験結果から、P-450 (17 α , lyase) は中間体を酵素の活性中心から解離することなく、プロゲステロンをアンドロステンジオンへ変換していることが示され、第 2 の機構は否定された。第 1 と第 3 の機構のいずれによってアンドロステンジオンが生成されるかを決定するには、反応中間体の有無を明らかにしなければならない。

連続的水酸化反応においては、酵素・基質複合体で生じる反応中間体は微量なため、定常状態下での解析では検出不可能である。酵素が基質に対して過剰に存在する条件下で、P-450 (17 α , lyase) の活性中心に生じる 1 段階水酸化反応毎の生成物を追跡することにより初めて可能となる。この反応を解析するために、0.1 秒の時間精度のあるラピッドクエンチング装置を製作し、P-450 (17 α , lyase) が触媒するプロゲステロンからアンドロステンジオンを生じる反応を解析した。反応生成物としては 17 α -ヒドロキシプロゲステロンとアンドロステンジオンのみが観測され、17 α -ヒドロキシプロゲステロンが連続的水酸化反応の中間体であることが示された。代謝反応の時間経過を、17 α -ヒドロキシプロゲステロンを代謝中間体とした連続的水酸化反応の反応機構に当てはめて解析した結果、理論曲線と実測値は非常によく一致を示したことから、P-450 (17 α , lyase) は 17 α -ヒドロキシプロゲステロンを反応中間体とする連続的水酸化反応により、アンドロステンジオンを生成していることが証明された。

副腎皮質において、P-450 (17 α , lyase) の活性が 17 α -ヒドロキシプロゲステロン合成とアンドロステンジオン合成のどちらに傾くかで、最終的に分泌されるステロイドホルモンの量比が決まる。

このように、P-450 (17 α , lyase) はステロイドホルモン生合成経路の分岐点に位置していることから、その反応機構の解析は重要な生理的意義を持っている。17 α -ヒドロキシprogesteroneは、P-450 (17 α , lyase) から解離した場合には、P-450 (C21) によって代謝されて糖質コルチコイドへと変換されるが、酵素から解離するよりも速く2段階目の水酸化反応が連続的に起これば、側鎖切断されてアンドロステンジオンへと変換される。このようなP-450 (17 α , lyase) の反応調節機構として、反応中間体である17 α -ヒドロキシprogesteroneの酵素からの解離と側鎖切断反応の間の競争を仮定できる。定常状態下では、P-450 (17 α , lyase) による17 α -ヒドロキシprogesterone生成活性とアンドロステンジオン生成活性は異なるpH依存性を示した。広いpH範囲で反応迅速停止法を用いて連続的水酸化反応を解析した結果、側鎖切断反応の反応速度だけがpHの上昇に伴って低下した。定常状態において観測された至適pHの差異は側鎖切断反応の反応速度の変化によることが証明された。P-450 (17 α , lyase) の反応速度に影響を与える要因として、NADPH-P-450還元酵素からの電子伝達の効率が考えられる。反応系中の還元酵素濃度を減少させて電子伝達の効率を低下させ、連続的水酸化反応に対する影響を反応迅速停止法を用いて解析した。反応中間体の解離速度は還元酵素濃度の変化に影響されなかったが、側鎖切断反応の反応速度は還元酵素濃度の減少に伴って低下し、17 α -ヒドロキシprogesteroneに対するアンドロステンジオンの相対的な生成量が減少した。以上の結果から、P-450 (17 α , lyase) による連続的水酸化反応は、還元酵素からの側鎖切断反応のための電子伝達によって調節されることが明らかになった。

反応迅速停止法から求めたP-450 (17 α , lyase) の各水酸化反応の速度は、いずれの値も定常状態法で観測された反応速度よりも非常に速い値を示した。反応迅速停止法から得られた速度定数を定常状態法の数式に代入して、最終生成物の酵素からの解離速度を算出したところ、最終生成物の解離速度は17 α 位水酸化反応の反応速度に比べてかなり遅かった。このことは触媒部位からの最終生成物の解離速度が定常状態における反応速度に大きく影響していることを示唆している。