

精巢20 β -ヒドロキシステロイド
脱水素酵素の精製と諸性質

星薬科大学
図書館



0000061042

大 野 修 司

精巢20 β -ヒドロキシステロイド 脱水素酵素の精製と諸性質

目次

第一章 緒論	1
第二章 精巢 20β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素活性の検出とその分布	
第一節 実験の部	5
第二節 幼若ブタ精巢サイトソールによる反応生成物の同定	10
第三節 精巢 20β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素活性の分布	14
第四節 考察	16
第三章 幼若ブタ精巢より 20β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素の精製, 純化 とタンパク化学的性質	
第一節 実験の部	18
第二節 20β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素の精製	21
第三節 20β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素精製標品の純度	30
第四節 20β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素のタンパク化学的性質	33
第五節 考察	36
第四章 20β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素が触媒する酸化・還元両反応に おける酵素化学的諸性質	
第一節 実験の部	39
第二節 20β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素の触媒する還元反応におけ る酵素化学的性質	45
第三節 20β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素の触媒する酸化反応におけ る酵素化学的性質	60
第四節 考察	71

第五章	幼若ブタ精巣 20β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素精製標品が触媒する $3\alpha/\beta$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素活性	
第一節	実験の部	76
第二節	精製 20β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素が触媒する $3\alpha/\beta$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素活性の検出と同定	80
第三節	$3\alpha/\beta$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素活性に対する諸性質と 20β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素活性との比較	83
第四節	考察	91
第六章	精巣サイトソール画分中に存在する $3\alpha/\beta$ -, 20α -および 20β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素活性の成育に伴う変動	
第一節	実験の部	94
第二節	ブタ精巣サイトソール画分中の $3\alpha/\beta$ -, 20α -および 20β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素活性の成育に伴う変動	98
第三節	モルモット精巣サイトソール画分中の $3\alpha/\beta$ -, 20α -および 20β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素活性の成育に伴う変動	104
第四節	考察	106
第七章	総括	109
	謝辞	114
	引用文献	115

主な略語

Steroids

- 1) corticosterone, 11β , 21 -dihydroxy-4-pregnene-3,20-dione
- 2) cortisol, 11β , 17α , 21 -trihydroxy-4-pregnene-3,20-dione
- 3) cortisone, 17α , 21 -dihydroxy-4-pregnene-3,11,20-trione
- 4) deoxycorticosterone, 21 -hydroxy-4-pregnene-3,20-dione
- 5) deoxycortisol, 17α , 21 -dihydroxy-4-pregnene-3,20-dione
- 6) 17α -hydroxypregnenolone, 3β , 17α -dihydroxy-5-pregnen-20-one
- 7) 17α -hydroxyprogesterone, 17α -hydroxy-4-pregnen-3-one
- 8) pregnenolone, 5-pregnen- 3β -ol-20-one
- 9) progesterone, 4-pregnene-3,20-dione
- 10) 5α -DHT, 5α -androstan- 17β -ol-3-one

Enzymes

- 1) 20α -HSD, 20α -ヒドロキシステロイド脱水素酵素,
 20α -hydroxysteroid dehydrogenase [EC 1.1.1.149]
- 2) 20β -HSD, 20β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素,
 20β -hydroxysteroid dehydrogenase
([EC 1.1.1.53] ; from Streptomyces hydrogenans)
- 3) $3\alpha/\beta$ -HSD, 3α および 3β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素,
 3α - and 3β -hydroxysteroid dehydrogenase
- 4) glucose-6-P-DH, glucose-6-phosphate dehydrogenase
[EC 1.1.1.49]
- 5) isocitric-DH, isocitric dehydrogenase [EC 1.1.1.42]
- 6) NAD^+ -Kinase, $\text{ATP} \rightarrow \text{DPN}$ transphosphatase [EC 2.7.1.23]

Pyridine nucleotides

- 1) β -NADPH, β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; reduced

form

- 2) α -NADPH, α -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; reduced form
- 3) β -3'-NADPH, β -nicotinamide adenine dinucleotide 3'-phosphate; reduced form
- 4) β -NADH, β -nicotinamide adenine dinucleotide; reduced form
- 5) α -NADH, α -nicotinamide adenine dinucleotide; reduced form
- 6) β -NADP⁺, β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
- 7) α -NADP⁺, α -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
- 8) β -3'-NADP⁺, β -nicotinamide adenine dinucleotide 3'-phosphate
- 9) β -NAD⁺, β -nicotinamide adenine dinucleotide
- 10) α -NAD⁺, α -nicotinamide adenine dinucleotide
- 11) [4-³H]NAD⁺, [4-³H] β -nicotinamide adenine dinucleotide
- 12) [4-pro-R-³H]NADPH, [4-prochirallity-R-³H] β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; reduced form
- 13) [4-pro-S-³H]NADPH, [4-prochirallity-S-³H] β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; reduced form

Buffer solutions

- 1) KPB, Potassium phosphate buffer
- 2) PBS, Phosphate buffered saline

Chemical substances

- 1) DTT, dl-dithiothreitol
- 2) EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid
- 3) ATP, adenosine-5'-triphosphate
- 4) POP, 2,5-diphenyloxazole
- 5) POPOP, 2,2'-p-phenylen-bis(5-phenyloxazole)

- 6) SDS, sodium dodecylsulfate
- 7) Tris, tris(hydroxymethyl)aminomethane
- 8) metyrapone (SU 4885), 2-methyl-1,2-bis(3-pyridyl)-1-propanone
- 9) aminoglutethimide, α -ethyl- α -(p-aminophenyl)gluterimide
- 10) spironolactone, 17 α -hydroxy-7 α -mercapto-3-oxo-17 α -pregn-4-ene-21-carboxylic acid γ -lactone
- 11) o,P'DDD (mitotan), 1-(o-chlorophenyl)-1-(p-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane
- 12) SU 8000, 3-(6-chloro-3-methyl-2-indenyl)pyridine
- 13) SU 10603, 3-(1,2,3,4-tetrahydro-1-oxo-7-chloro-2-naphthyl)pyridine
- 14) SKF 525A, 2-(dimethylamino)ethyl-2,2-diphenylvalerate
- 15) cyanoketone, 2 α -cyano-17 β -hydroxy-4,4,17 α -trimethylandroster-5-en-3-one
- 16) ketoconazole, (cis-1-acetyl-4-[4-[[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-imidazole-1-yl)methyl-1,3-dioxolane-4-yl]]-methoxy]phenyl]pyperadine
- 16) DAB, 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride
- 17) BSA, bovine serum albumin

その他

- 1) HPLC, high performance liquid chromatography
- 2) GC, gas chromatography
- 3) MS, mass spectrum
- 4) NMR, nuclear magnetic resonance
- 5) TLC, thin layer chromatography
- 6) PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis

精巣におけるアンドロゲン (C_{19} -ステロイド) の生合成は主として、間質細胞中で行われており、ミトコンドリア内においてチトクローム P-450 (コレステロール側鎖切断酵素) により cholesterol が C_{21} -ステロイドである pregnenolone に変換されることにより開始される。pregnenolone から testosterone への生合成は、小胞体内でチトクローム P-450 (17α -ヒドロキシラーゼ/ C_{17-20} -リアーゼ), Δ^5 - 3β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素/ Δ^5 - Δ^4 イソメラーゼおよび 17β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素により触媒され、その合成経路の違いにより pregnenolone から dehydroepiandrosterone (C_{19}) を経由する Δ^5 経路と、pregnenolone から progesterone (C_{21}), androstenedione (C_{19}) を経由する Δ^4 経路とが存在する。このように、チトクローム P-450 以外に、酸化還元酵素の一種で水酸基とカルボニル基間の立体特異的相互変換を触媒するピリジンヌクレオチド依存性のヒドロキシステロイド脱水素酵素の存在は、男性ホルモン生合成において重要な役割を担っているが、精巣中にはこれ以外に、主にアンドロゲンの生合成調節に関与していると考えられている 20α -ヒドロキシステロイド脱水素酵素 (20α -HSD; [EC 1.1.1.149]) の存在が以前から知られている。 20α -HSD は C_{21} -ステロイドの 20 位のケト基を α 配位 (S 配位) に還元する酵素で、ラット精巣サイトソール画分中に存在することが報告されたのをはじめ、^{1,2)} 哺乳類中では成熟ブタ精巣サイトソール画分、³⁾ ウシ精巣サイトソール画分⁴⁾ に、また、精巣以外の臓器中にも存在し、成熟ブタ副腎サイトソール画分、⁵⁾ ラット卵巢サイトソール画分⁶⁾ など、現在では種々の動物のステロイド産生臓器中に存在することが報告され、⁷⁾ 一部を除き精製純化され、酵素化学的諸性質の検討が行われている。

これに対し、 C_{21} -ステロイドの 20 位のケト基を β 配位 (R 配位) に還元する酵素である 20β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素 (20β -HSD; [EC 1.1.1.53]) に関しては、その触媒作用により生成すると考えられる 20β -ヒドロキシステロイドが幼若ウシ精巣、⁸⁾ ラット精巣、⁹⁾ ヒト精巣 (ミクロソーム画分)¹⁰⁾ およびヒト卵巢¹¹⁾ 中に検出されることから、その存在が示唆されているが、これまでその詳細に関する報告はない。

高等動物の精巣における 20α -および 20β -HSDのアンドロゲン生合成との関連や生理的意義は、現在のところ完全に明らかにされているとはいえないが、Inano らにより、これらの酵素反応により生成すると考えられる $17\alpha, 20\alpha$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one, $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one がチトクローム P-450 (17α -ヒドロキシラーゼ/ C_{17-20} -リアーゼ) 活性の阻害をすること,¹²⁾ また、中陳らにより、これらのステロイドの中では 20β -ヒドロキシ- Δ^5 -ステロイドである $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-5-pregnen-3 β -ol および 20β -hydroxy-5-pregnen-3 β -ol が最も強力にチトクローム P-450 (17α -ヒドロキシラーゼ/ C_{17-20} -リアーゼ) 活性を阻害することが報告され、¹³⁾ 20α -HSDのみならず 20β -HSDもアンドロゲン生合成調節に関与していることが示唆された。

また、最近になって、 20β 位に水酸基を有するステロイドである $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one が、数種の雌の硬骨魚中の卵成熟作用を持つことが報告され、¹⁴⁻¹⁶⁾ Nagahama と Adachi はこのステロイドがアマゴ中の卵成熟刺激ホルモンであることを報告した。¹⁷⁾ さらに雄のアマゴ中では精子放出期にこの $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one の量が増加することから、¹⁸⁾ 性腺における 20β -HSDの存在が示唆された。また、Stacey と Sorensen は、正常な金魚の水層中にこのステロイドを添加することにより精子の増量が認められるが、臭覚器官を切除した金魚ではその効果が見られないことを報告し、本ステロイドにはフェロモン様の作用があることを示唆した。¹⁹⁾ このように、 20β -HSDは魚類の生殖腺中でも生理的に重要な役割を演じていると考えられている。

一方、動物種以外に原核細胞中にも種々のステロイド代謝を触媒する酵素が存在することが知られ、 20β -HSDは1958年 Hübener らにより Streptomyces hydrogenans 中から精製され、以後、諸性質が調べられている。²⁰⁻²⁶⁾ 1960年代後半から1970年代になって、本酵素が 20β -HSD活性のみならず、 3α -HSD活性を持つこと、²⁷⁾ 続いて $3\alpha/\beta$ -HSD活性を持つことが報告され、²⁸⁾ さらに、それらの活性が同一触媒部位により触媒されているという報告が次々となされ

たことから,²⁹⁻³¹⁾ 近年 polyfunctional enzyme として注目をあびるようになった。また、ごく最近になって、タンパク質の一次構造も明らかにされている。³²⁾

本論文では、哺乳類であるブタの幼若期の精巣中に高い 20β -HSD活性が存在することを第二章においてはじめて明らかにし、 20β -HSD活性の細胞内局在性、動物種間の分布について検討し、第三章において幼若ブタ精巣から、哺乳類中では初めて 20β -HSD酵素タンパク質の精製を行った。また、第四章において 20β -HSD精製標品を用いて酵素化学的諸性質を検討し、ブタ精巣 20α -HSDおよび *S. hydrogenans* 由来の 20β -HSDとの比較をした。さらに第五章では、ブタ精巣 20β -HSDが *S. hydrogenans* 由来の 20β -HSDと同じ $3\alpha/\beta$ -HSD活性を持つ polyfunctional な $3\alpha/\beta$, 20β -HSDであることを明らかにし、 $3\alpha/\beta$ -HSD活性に対する酵素化学的諸性質の検討を通じて 20β -HSD活性との関連性について考察を加えた。また、第六章ではブタ精巣およびモルモット精巣を用いて成育に伴う $3\alpha/\beta$ -, 20α - および 20β -HSD活性の変動についてそれぞれ検討し、 $3\alpha/\beta$ -HSDには少なくとも二種の異なる分子種が存在するが、その幼若期型にのみ 20β -HSD活性が存在することを明らかにした。また、これらの結果より、高等動物中の本酵素活性の生理的存在意義について考察を加えた。

第二章 精巣 20β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素活性の検出とその分布³³⁾

ブタ精巣サイトソール画分中には、補酵素NADPH存在下、特異的に 17α -hydroxyprogesterone の C_{20} 位のカルボニル基を 20α ($20S$)-水酸基へと還元する 20α -ヒドロキシステロイド脱水素酵素 (20α -HSD) 活性が存在することが知られている。³⁾ 最近になって、養豚場において去勢時に幼若ブタ精巣(生後2週齢)を入手する機会を得て、サイトソール画分中の 20α -HSD活性の検討を行った際に、成熟期の精巣と比較して幼若期の精巣中に 20α -HSD活性とは異なり 20β -HSD活性と考えられる新たな比較的高い酵素活性の存在を見い出した。

本章では、幼若ブタ精巣中の 20β -HSD活性の存在を明らかにする目的で、幼若ブタ精巣サイトソール画分を使用し、補酵素NADPH存在下、 17α -hydroxyprogesterone を基質としたときの主代謝物である $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one を同定した。また、幼若ブタ精巣細胞を分画し、 20β -HSD活性の細胞内局在を検討した。さらに、成熟ブタをはじめ他の動物の精巣サイトソール画分について、 20β -HSD活性および 20α -HSD活性を測定し、それぞれを比較検討した。

第一節 実験の部

実験材料および試薬 幼若ブタ精巣 幼若ブタ(生後2週齢)の精巣は、養豚場で去勢時に得た。成熟ブタ(生後1年齢)の精巣は屠殺場より得た。いずれも、得られた精巣は氷冷下、 0.15 M KCl - 0.5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 中で実験室へ移送し、直ちに使用した。また、その他の精巣は、マウス(ICR種; 生後7週, C3H種; 生後10週), ラット(Wistar種; 生後7週), モルモット(Hartley種; $320-410\text{ g}$), ウサギ(New Zealand white種; $2.2-2.5\text{ Kg}$), イヌ(成熟雑種), ヒト(前立腺癌患者; 70歳)より得た。

放射能標識ステロイド $[4-^14\text{C}]17\alpha$ -hydroxyprogesterone (1.85 GBq/mmol)

は New England Nuclear社製 (Lot: 1319-151) を使用した。

標準ステロイド 17α -hydroxyprogesterone, $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one, $17\alpha, 20\alpha$ -dihydroxy-4-pregnen-3-oneはいずれも Sigma社製を使用した。

ピリジヌクレオチド β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (β -NADP⁺), β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form (β -NADPH) はいずれも Sigma社製を使用した。

酵素 glucose-6-phosphate dehydrogenase [EC 1.1.1.49] (Type XV) は Sigma社製 (Lot: 13F-8190) を使用した。

その他の試薬 glucose-6-phosphate はSigma社製を使用した。HPLC用 ethyl acetate は和光純薬工業製, n-hexane は Cica-Merck社製をそれぞれ使用した。その他の試薬は市販の特級品を使用した。

精巣細胞分画および精巣サイトソール画分(可溶性画分)の調製 幼若ブタ精巣の重量を測った後上皮を取り除き, 氷冷下4.5倍量の0.25 M sucrose-2 mM potassium phosphate buffer (KPB) -0.1 mM EDTA (pH 7.4) 中, ガラス-テフロンホモジナイザー (多量の場合は Warring blender) を用いてホモジナイズし, ミトコンドリア画分 (800 ×g; 10 min-9000 ×g; 30 min, 沈殿), ミクロソーム画分 (9000 ×g; 30 min-105000 ×g; 60 min, 沈殿), およびサイトソール画分 (105000 ×g; 60 min, 上清) は, それぞれ常法に従い遠心分離により作成した (Fig.2-1.)。

また, 精巣サイトソール画分の簡略調製法として, 幼若ブタ精巣を氷冷下4.5倍量の 0.15 M KCl-0.5 mM EDTA中でホモジナイズし, 9000 ×gで30 min遠心分離を行った。上清をさらに105000 ×gで60 min遠心分離を行い, この上清をサイトソール画分とした。得られた各画分はいずれも使用するまで-20℃で分割保存した。

酵素活性の測定法 放射能標識ステロイド, $[4-^14C]17\alpha$ -hydroxyproges-

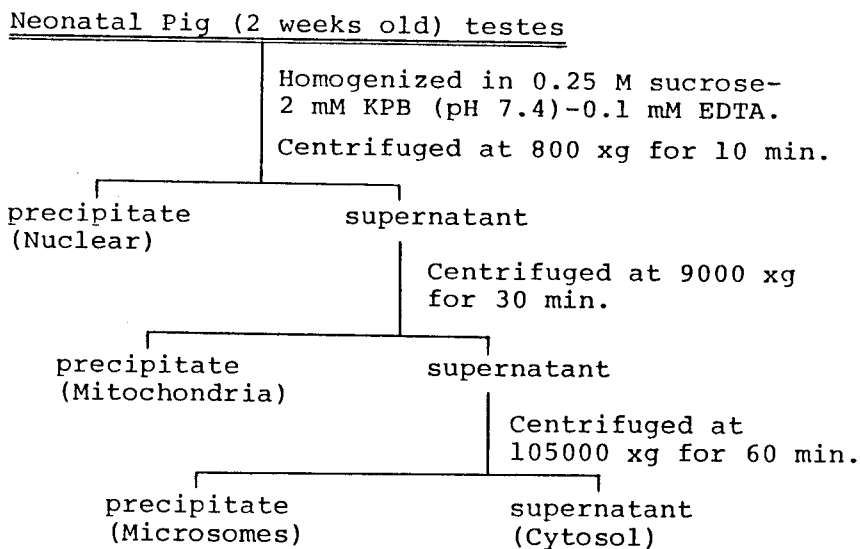


Fig.2-1. Preparation of Subcellular Fractions from Neonatal Pig Testes

terone (370 Bq/20 nmol/10 μ l ethanol) を基質として、幼若ブタ精巣の各画分を50 mM KPB (pH 7.4) 中で37°C, 3 minプレインキュベーションをした後、補酵素NADPH (240 nmol) を加えることにより反応を開始した。全量1.0 ml, 37°C, 一定時間のインキュベーションを行った後、反応溶液に10 mlの CH_2Cl_2 を加え激しく攪拌し反応を止めると同時にステロイドの抽出を行った。水層を除去し、 CH_2Cl_2 層を無水 Na_2SO_4 で乾燥させた後、40°C, N_2 気流中で蒸発乾固した。

次に、TLC (Kodak 13181 silicagel; 2×8 cm, solvent; benzene/acetone (8/2 v/v)) を行い、基質と反応生成物とを分離した。ラジオオートグラフィー (Fuji X-ray film: Rx) を行い放射活性のあるそれぞれのスポットの位置を確認した後、TLCプレートを切り取り直接シンチレーションバイアル中に入れ、トルエン系シンチレーターを用いて液体シンチレーションカウンターでその放射能を測定した。

20 β -HSDおよび20 α -HSDの活性は、TLC上の代謝物である 17 α , 20 β -di-

hydroxy-4-pregnen-3-one または $17\alpha, 20\alpha$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one の生成量 (^{14}C の放射能) から次式に従い算出した。

$$20\beta(\alpha)\text{-HSD活性} = \frac{\text{目的生成物の放射能}}{\text{TLC上の全放射能}} \times \text{加えた基質(nmol)} \\ \times \frac{1}{\text{インキュベーション時間 (min)}} \times \frac{1}{\text{酵素タンパク質 (mg)}} \\ (\text{nmol/min/mg})$$

また、回収率は次式に従い算出し、比活性を補正した。

$$\text{回収率(\%)} = \frac{\text{TLC上の全てのスポットの放射能}}{\text{加えた基質の放射能}} \times 100$$

代謝物の分離法 代謝物である $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one の同定の目的で、 17α -hydroxyprogesterone (5 mg/1.25 ml methanol) を基質として幼若ブタ精巣サイトソール画分 (88 mg protein) をNADPH-再生系 (NADP⁺; 5 μmol , glucose-6-phosphate; 125 μmol , glucose-6-phosphate dehydrogenase; 25 unit, MgCl_2 ; 12.5 μmol) の存在下、25 mlの50 mM KPB (pH 7.4) 中で37℃, 8 hrのインキュベーションを行った。インキュベーションの後、反応溶液に CH_2Cl_2 を加え激しく攪拌し反応を止めると同時にステロイドの抽出を行った。水層を除去し、 CH_2Cl_2 層を無水 Na_2SO_4 で乾燥させた後、40℃, N_2 気流中で蒸発乾固した。

次に TLC (Kodak 13181 silicagel(10×20 cm), solvent; benzene/acetone (8/2 v/v)) を行い、基質と反応生成物とを分離した。紫外線下で標準 $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one と一致する部分を切り取り、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (1/1; v/v) でステロイドを抽出し、さらに O'Hara らの方法^{3,4)}に従いHPLCを

用いて精製した。

代謝物分析法 ガスクロマトグラフィー (GC) Shimadzu GC-4CM PF,
カラム: SE-30 (3%)/Chromosorb WAN DMCS (0.3×200 cm, temp; 270°C, flow
rate; 40 ml/min, detector; FID) で測定した。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) Shimadzu LC-6A, カラム: Merck
Lichrospher Si-100 (0.4×25 cm), 溶媒: ethyl acetate/n-hexane (3/7;
v/v), 流速: 3 ml/min, 検出: 250 nm, で測定した。

質量分析スペクトル (MS) JEOL JMS-D300 により通常の electron ioni-
zation (EI) 法で測定した。

核磁気共鳴スペクトル (¹H-NMR) JEOL JNM-FX100, 溶媒: CDCl₃ で測定した。

タンパク定量法 タンパク質はLowry改良法³⁵⁾に従い, 標準品としてウシ
血清アルブミン (Armour社製, Fraction V; 1 mg/ml) を使用して定量した。

液体シンチレーターの作成 2,5-diphenyloxazole (PPO; 0.4%, w/v),
2,2'-p-phenylene-bis-(5-phenyloxazole) (POPPOP; 0.01%, w/v) のトルエン溶
液として使用した。

放射能の測定 PACKARD Tri-Carb 460C 液体シンチレーションカウンター
により測定した (¹⁴C, 10 min)。

第二節 幼若ブタ精巣サイトソールによる反応生成物の同定

幼若ブタ精巣サイトソール画分による 17α -hydroxyprogesteroneの代謝

幼若ブタ精巣サイトソール画分 (0.398 mg protein) を 17α -hydroxyprogesterone (20 nmol/10 μ l ethanol) を基質として β -NADPH (240 nmol) 存在下 50 mM KPB (pH 7.4) 中 37°C, 30 min のインキュベーションを行い, 代謝物を TLC (silicagel, benzene/acetone (8:2, v/v)) で分離した後, ラジオオートグラフィーを行った. Fig.2-2. に結果を示したように, コントロール (プレート B) と比較して TLC プレート A 上には, 基質である 17α -hydroxyprogesterone (スポット b, Rf: 0.72) の他に少なくとも3種の代謝物が存在し, スポット d (Rf: 0.29) は既知の 20α -HSD による反応生成物である $17\alpha, 20\alpha$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one と, また, 主代謝物と予想されるスポット c (Rf: 0.39) は $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one の標準品とそれぞれ一致した. またその他に, かなり極性が小さい未知代謝物 (スポット a) の生成も確認された.

代謝物の同定

17α -hydroxyprogesterone を基質とした場合の TLC 上の主代謝物を $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (1/1, v/v) で溶出し, HPLC で精製した. この代謝物の一部を取り, TLC, GC および再度 HPLC により標準 $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one との比較同定を試みた. TLC 上の Rf 値は 0.39, benzene/acetone (8/2, v/v) および 0.72, CHCl_3 /ethyl acetate/ethanol (25/2/1, v/v) であった. また, GC の retention time は 11.4 min で, HPLC では 8.8 min であり (Fig.2-3.), そのいずれも $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one の標準品ステロイドと一致した.

また, 別の一部を取り ^1H -NMR および MS による分析結果を得た. ^1H -NMR スペクトルは δ 0.85 (3H, s, 18- CH_3), δ 1.19 (3H, s, 19- CH_3), δ 1.18 (3H, d, J=6 Hz, 21- CH_3), δ 4.02 (1H, J=6 Hz, 20-H) および δ 5.72 (1H, br, 4-H) を認めた. MS では, m/e 332 に分子イオン $[\text{M}^+]$ ピーク, m/e 314 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$,

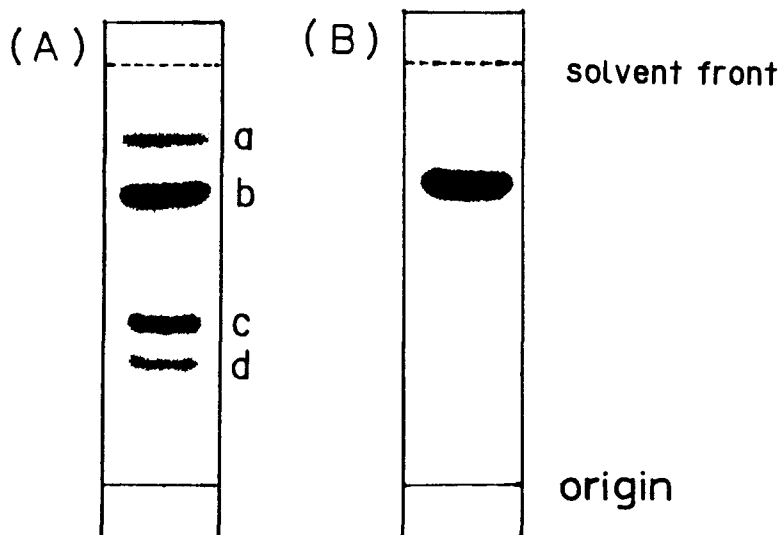


Fig.2-2. Radioautograms of Radioactive Metabolites on the TLC from [4-¹⁴C]17 α -Hydroxyprogesterone by Neonatal Pig Testicular Cytosol

[4-¹⁴C]17 α -Hydroxyprogesterone (370 Bq/20 nmol/10 μ l ethanol) was incubated with (A) or without (B) cytosol (2.0 mg) in the presence of β -NADPH (240 nmol) in 1 ml of 50 mM KPB (pH 7.4) for 30 min at 37°C.

TLC was carried out using silicagel plates (Kodack, 13181), developed with benzene/acetone (8/2, v/v), Radio-active metabolites detected on the radioautography as dark spots. Each spots were assigned by standard steroids which detected under UV light.

a) unknown, b) 17 α -hydroxyprogesterone, c) 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one, d) 17 α ,20 α -dihydroxy-4-pregnen-3-one

m/e 287 [M-CH₃CHOH]⁺およびm/e 269にそれぞれフラグメントイオンピークを得た (Fig.5.A). これらの結果はいずれも 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one の標準品と一致した. また, C₂₀の水酸基の立体配位は, NMRの比較, さらに Lauwers らの報告³⁶⁾に基づき, MSにおける標準ステロイド (17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one および 17 α ,20 α -dihydroxy-4-pregnen-3-one) の [M-H₂O]⁺/[M]⁺, [M-CH₃CHOH]⁺/[M]⁺の比から再確認をした (Fig.2-4.).

以上の分析結果に基づき, 幼若ブタ精巣サイトソール画分による主な代謝物は 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one であることを認めた.

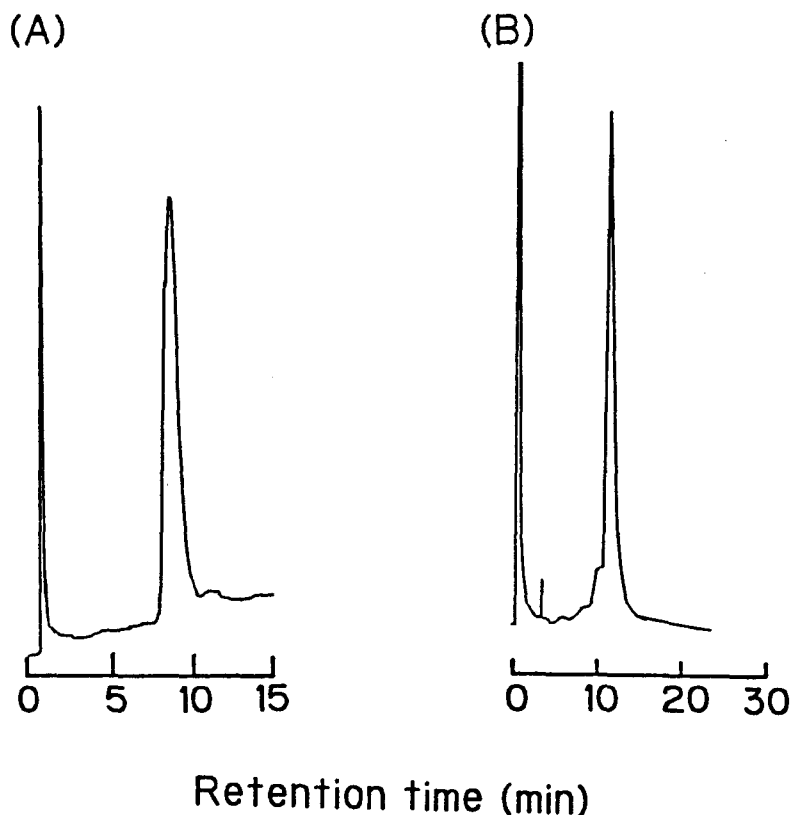


Fig.2-3. Chromatograms by High Performance Liquid Chromatography (A) and by Gas Chromatography (B) of the Purified Main Metabolite from 17α -Hydroxyprogesterone by Neonatal Pig Testicular Cytosol

The sample extracted with CH_2Cl_2 was applied to each chromatography. The retention times of the sample were 8.8 min on HPLC (A) and 11.4 min on GC (B), each of them was agreement with the authentic $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one.

The HPLC was performed on Shimadzu LC-6A and chromatogram was recorded on Shimadzu C-RIB. The conditions for HPLC are: column, Merck Lichrospher Si-100 (0.4×25 cm); flow rate, 3 ml/min; mobile phase, ethylacetate/n-hexane (3/7, v/v); temperature, 25°C ; wave length, 250 nm. While the GC was performed on Shimadzu GC-4CM PF and the chromatograms were recorded on Shimadzu R-11. The conditions for GC are: column, SE-30 (3%)/chromosorb WANDMCS (0.3×200 cm); flow rate, 40 ml/min; mobile phase, N_2 ; temperature, 270°C ; detector, FID.

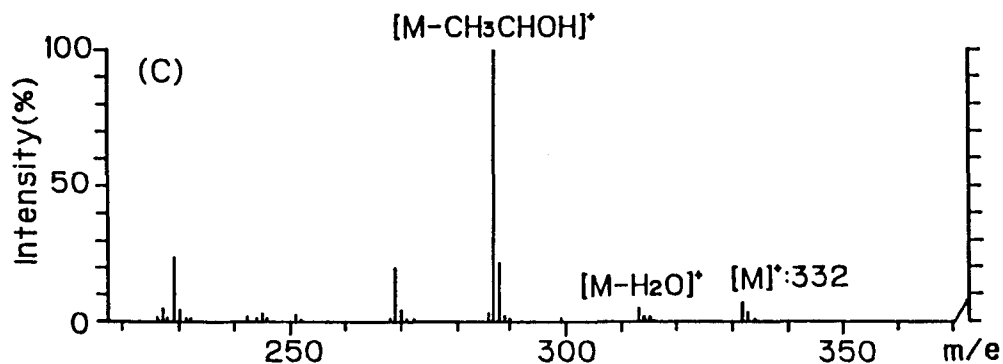
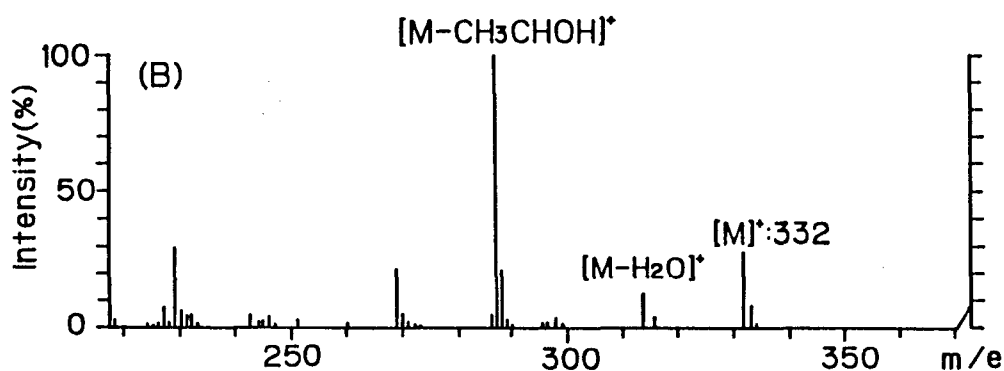
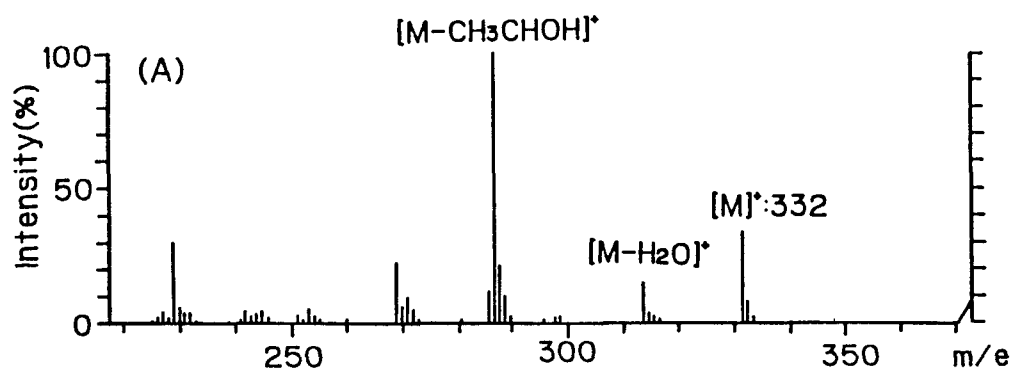


Fig.2-4. Electron Impact Mass Spectrum of the Main Metabolite Detected on the TLC (Rf: 0.39) from 17 α -Hydroxyprogesterone by Neonatal Pig Testicular Cytosol (A), Authentic 17 α ,20 β -Dihydroxy-4-pregnen-3-one (B), and Authentic 17 α ,20 α -Dihydroxy-4-pregnen-3-one (C)

第三節 精巢 20β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素活性の分布

幼若ブタ精巢における 20β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素活性の細胞内局在

幼若ブタ精巢 (223 g) をホモジナイズし遠心分離により細胞を分画した結果、各画分のタンパク量は、ミトコンドリア画分; 1.07 g, ミクロソーム画分; 2.90 g, およびサイトソール画分; 12.12 gであった。

細胞分画した各画分 (0.7–2.4 mg protein) について [$4\text{-}^{14}\text{C}$] 17α -hydroxyprogesterone (370 Bq/20 nmol/10 μ l ethanol) を基質とし, β -NADPH (240 nmol) 存在下, 37°C, 30 minインキュベーションし 20β -HSD活性を測定した結果をTable 2-1. に示した。

幼若ブタ精巢中の全 20β -HSD活性 (840 nmol/min) のうち, 93.5%がサイトソール画分に存在し, ミクロソーム画分には4.6%, ミトコンドリア画分にはわずか1.9%のみが存在し, 20β -HSDがサイトソール画分中に存在する酵素であることが示唆された。

Table 2-1. Subcellular Distribution of 20β -HSD of Neonatal Pig Testis

Subcellular fraction	Protein (mg)	20β -HSD		
		Specific activity (pmol/min/mg)	Total activity (nmol/min)	(%)
Cytosol	12120	64.9	786	93.5
Microsomes	2900	13.4	39	4.6
Mitochondria	1070	14.0	15	1.9

Subcellular fractions were obtained by conventional differential centrifugation of homogenate from decapsulated neonatal pig testes (223 g). [$4\text{-}^{14}\text{C}$] 17α -hydroxyprogesterone (370 Bq/20 nmol/10 μ l ethanol) was incubated with each of the subcellular fractions (0.7–2.4 mg) in the presence of β -NADPH (240 nmol) in 1.0 ml of 50 mM KPB (pH 7.4) for 30 min at 37°C.

各種動物間における酵素活性の比較

[4-¹⁴C]17 α -hydroxyprogesterone (370 Bq/20 nmol/10 μ l ethanol) を β -NADPH (240 nmol) 存在下, 各種動物精巣サイトソール画分 (1.5–2.1 mg protein) とインキュベーションし, 20 β -HSDおよび20 α -HSD活性を測定した結果をTable 2-II.に示した.

20 α -HSD活性は各種動物の精巣中に広く存在し種による差があまり認められなかったのに対し, 20 β -HSD活性は幼若ブタに特異的であり, その他にモルモット, ラットにもわずかに検出されたが, その比活性は成熟ブタの比活性より低い値であった. さらに同じブタ精巣の場合でも, 幼若期と成熟期とでは20 β -HSDの比活性に約20倍の差があり, 20 β -HSD活性が幼若期の精巣中に特異的に存在することが示唆された. また, 20 α -HSDと20 β -HSDの間に比活性の相関は全く認められなかった.

Table 2-II. 20 β -HSD and 20 α -HSD Activities in the Testicular Cytosol Fraction from Various Animal Species

Species	Enzyme activities (pmol/min/mg)	
	20 β -HSD	20 α -HSD
pig (neonatal) ^{a)}	64.9	23.9
pig (mature) ^{b)}	3.7	14.9
mouse (ICR)	1.5	23.9
mouse (C3H)	N.D. ^{c)}	33.0
rat	1.1	15.3
guinea pig	2.1	24.9
rabbit	N.D.	24.7
dog	1.4	13.0
human (a patient with prostate carcinoma)	N.D.	8.6

a) Obtained at castration from immature (2 weeks old) pig.

b) Obtained from adult (about 1 year old) pig.

c) Not detected: The enzyme activity was below the limit of detection.

[4-¹⁴C]17 α -hydroxyprogesterone (370 Bq/20 nmol/10 μ l ethanol) was incubated with the cytosol fraction from various animal species (1.5–2.1 mg) in the presence of β -NADPH (240 nmol) in 1.0 ml of 50 mM KPB (pH 7.4) for 30 min at 37°C.

第四節 考察

ブタ精巣中には 20α -HSDが存在し、その活性はサイトソール画分中に局在しており、NADPHおよびNADH依存性酵素であることが知られている。³⁾ ブタ精巣サイトソール画分をNADPH存在下 17α -hydroxyprogesterone とインキュベーションすると、主代謝物として $17\alpha, 20\alpha$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one がTLCプレート上に ($R_f=0.29$ 付近, benzene/acetone (8/2, v/v)) 確認されるが、生後約2週間の去勢時に得られるブタ精巣のサイトソール画分を同条件下でインキュベーションすると、TLCプレート上 $R_f=0.29$ の代謝物の他に、 R_f 値がわずかに異なる ($R_f=0.39$ 付近) 多量の代謝物の存在が認められることから、幼若期のブタ精巣中には既知の 20α -HSDとは異なる高い酵素活性の存在が示唆された。この代謝物をTLC, HPLCで精製し、それらの R_f 値と retention time, およびGCでの retention time の比較、また、 $^1\text{H-NMR}$ の結果から 20-H およびその他の pregnane 骨格に基づく特有のスペクトルが検出され、いずれも $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one の標準品と一致したこと、また、MSによる代謝物の開裂のパターン、フラグメントイオンピーク強度 m/e 287と322および m/e 314と322とのそれぞれの比から、明らかにこの代謝物は $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one であると同定され、生後2週齢の幼若ブタ精巣サイトソール画分中には、既知の 20α -HSD活性の他に、より高い 20β -HSD活性が存在することが認められた。

また、幼若ブタ精巣細胞分画中の 20β -HSD活性はそのほとんどがサイトソール画分中に存在し、ミクロソーム、ミトコンドリア画分中にはほとんど存在しないことを認め、 20β -HSDがサイトソール画分に局在する酵素であることが推察された。また、この結果はブタ精巣 20α -HSDがサイトソール画分に局在する酵素であるとする Sato らの報告³⁾と共通し、両酵素間の類似性が示唆された。

20α -HSDは、ブタ精巣のみならず、種々の動物のステロイド産生臓器中に存在することが報告されている。⁷⁾ また、 20β -HSDと 20α -HSDはいずれもサイト

ソール画分に局在する酵素であるため、種々の動物の精巣サイトソール画分中の酵素活性を比較することにより 20β -HSDの種特異性を検討した。 20α -HSD活性は実験に用いた種の間でほとんど差は認められなく、全ての動物種に存在したが、 20β -HSD活性は種による差が大きく、ブタに存在する他にはモルモットなど数種にきわめて低い活性が認められたに過ぎず、両酵素間に比活性の相関が認められなかったことから、 20α -HSDと 20β -HSD活性間には生理的な存在意義に差があることが考えられる。また、 20β -HSD活性は同じブタの間でも幼若期と成熟期とでは大差が認められたことから、 20β -HSDはブタ精巣中では幼若期に特異的に存在する酵素であると考えられる。

一方、 20α -HSDおよび 20β -HSD活性が精巣に存在しアンドロゲン代謝にどの様に関与しているかは明らかではないが、両活性ともアンドロゲン生合成に直接関与しているチトクローム P-450 (17α -ヒドロキシラーゼ/ C_{17-20} -リアーゼ)の代謝物または基質である 17α -hydroxyprogesterone を基質とし、同じ NADPHを補酵素とする反応を触媒することから、間接的にアンドロゲン生合成調節に関与している可能性が考えられる。

小括

- 1) ブタ精巣サイトソール画分中には既知の 20α -HSD活性の他に、同じ 17α -hydroxyprogesterone を基質とし、NADPH存在下その20位のカルボニル基の還元を触媒する 20β -HSD活性が存在する。
- 2) 幼若ブタ精巣細胞分画物中の活性測定の結果より、 20β -HSD活性全体の93%以上がサイトソール画分に局在する。
- 3) 精巣中の 20α -HSD活性は種による差が比較的少ないのに対し、 20β -HSD活性は幼若ブタに特異的に高く存在し、その他成熟ブタ、モルモット、ラットなどにもきわめて低く存在する。

第三章 幼若ブタ精巣より 20β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素の精製純化とタンパク化学的性質³⁷⁾

高等動物中において 20β -ヒドロキシ- C_{21} -ステロイドの産生については、これまでに幼若ウシ精巣,⁸⁾ ラット精巣,⁹⁾ ヒト精巣,¹⁰⁾ およびヒト卵巣,¹¹⁾ 中で報告されており、いずれも 20α -HSDのみならず 20β -HSDが存在することを示唆しているが、 20β -HSDについてその詳細は明らかにされていない。第二章では哺乳類であるブタの幼若期の精巣サイトソール画分中に特異的に多量の 20β -HSD活性が存在することを明らかにしたが、哺乳類における 20β -HSDについてそのタンパク化学的あるいは酵素化学的諸性質を検討するうえで酵素タンパク質の精製、純化は不可欠である。本章では、幼若ブタ精巣サイトソール画分を原料として 20β -HSDの精製純化を試みた。そして、各種電気泳動およびHPLCを用いた精製純度の検定および分子量、等電点などブタ精巣 20β -HSDのタンパク化学的諸性質の検討を行った。

第一節 実験の部

実験材料および試薬 幼若ブタ精巣サイトソール画分 第二章に述べたものを使用した。

放射能標識ステロイド $[4-^{14}\text{C}]17\alpha$ -hydroxyprogesterone は、第二章に述べたものを使用した。

標準ステロイド 17α -hydroxyprogesterone は、第二章に述べたものを使用した。また、 20β -hydroxy-4-pregnen-3-one は Sigma社製を使用した。

ピリジンヌクレオチド β -NADPH および β -NADP⁺ は、第二章に述べたものを使用した。

カラム支持体 DEAE-cellulose は Whatman社製 DE-32 を使用した。また、Sephadex G-25, Sephadex G-100 および Sephadex G-150 は Pharmacia社製、

Matrex gel red A は Amicon社製をそれぞれ使用した。

電気泳動用試薬 N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine (TEMED), ammonium persulfate (APS), N,N'-methylene bis-acrylamide (BIS), acrylamide は、いずれも和光純薬工業製、電気泳動用試薬を使用した。

その他の試薬 Ampholine (pH 3.5-10; 40%, w/w) および (pH 4-6; 40%, w/w) は LKB-Producter Ab.社製を使用した。blue dextran は Pharmacia社製、BSAは Armour社製、Ovalbumin は Sigma社製、Chymotrypsinogen-A および Myoglobin は Schwarz/Mann社製をそれぞれ使用した。その他の試薬は、市販の特級品を使用した。

酵素活性測定法 20β -HSDおよび 20α -HSD活性は $[4-^{14}\text{C}]17\alpha$ -hydroxyprogesterone (370 Bq/20 nmol/10 μ l ethanol) を基質として第二章に述べた方法により求めた。

等電点電気泳動法 pH 3.5-10 または pH 4-6 の Ampholine (carrier ampholyte) を用い 0-50% (w/v) のショ糖密度勾配中 (1/3-1%, w/v, Ampholine 濃度勾配) で Vesterbergの方法³⁸⁾に従い行った。

部分精製した 20β -HSD溶液を110 mlカラム (加藤祥一商店製) の中央付近に注入して4℃, 定電圧300 V, 24 hr泳動した (24 hrで電流変化はなくなった)。試料の分離を確実にするためにさらに20時間通電を継続した後, 3 mlずつ分画し, 溶出液のpH, 280 nmにおける吸光度および 20β -HSD活性を測定した。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 法 20β -HSDの各精製ステップにおける標品について, Sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel電気泳動法³⁹⁾ (12% acrylamide gel, 10×14.5 cm, 0.1 cm thick, pH 8.8, 定電流25 mA) に従い行った。標準タンパク質は, Low molecular weight calibration kit (phosphorylase b (M.W. 94000), BSA (67000), ovalbumin (43000), carbonic anhydrase (30000), soybean trypsin inhibitor (20100),

α -lactalbumin (14400), Pharmacia社製)を使用した。

染色はメタノール50%, 酢酸10%を含む 0.025% Coomassie blue R-250溶液で行い, 脱色はメタノール25%を含む酢酸0.7%溶液で行った。

ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動 ディスク電気泳動は20 β -HSD精製標品について Ornstein⁴⁰⁾および Davis⁴¹⁾の方法に従い, pH 8.3の7%ポリアクリルアミドゲル (0.05% Triton X-100を含む)を使用し, 4℃でゲル (0.5×5.5 cm)あたり2 mAの電流を通じて泳動した。染色はメタノール50%, 酢酸10%を含む, 0.025% Coomassie blue R-250溶液で行い, 脱色はメタノール25%を含む酢酸0.7%溶液で行った。

ポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動 20 β -HSD精製標品について, Wrigley⁴²⁾の方法に従い, 2% Ampholine (pH 3.5-10; LKB社製)を含む5%ポリアクリルアミドゲル (0.05% Triton X-100を含む)を使用し, 4℃でゲル (0.5×10 cm) 当たり1 mAの電流で30 min通電した後, 80 V定電圧で17 hr通電し泳動した。泳動後のゲルは, 10% trichloroacetic acid (TCA) を用い, 12 hrごとに外液を交換しながら4日間洗浄し, Ampholine を除去した。また染色および脱色は, ポリアクリルアミドゲル電気泳動と同様に行った。

20 β -HSDタンパク質のHPLC 20 β -HSD精製標品について, Waters 650 Advanced Protein Purification System, column: Protein Pack G-DEAE (1×5 cm) により精製標品の純度検定の目的でHPLCを行った。

吸収スペクトルの測定 20 β -HSDの吸収スペクトルは, 日立228型分光光度計を使用し, 室温で波長域230-450 nmのスペクトルを測定した。

糖タンパクの定性 20 β -HSD精製標品について, フェノール硫酸法⁴³⁾に従い酵素分子中の糖の定性を行った。

第二節 20 β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素の精製

幼若ブタ精巢サイトソール画分を0.1N HClでpH 5.5とし、沈殿を取り除いた後、硫酸アンモニウム沈殿を行った。以後 DEAE-Cellulose, Sephadex G-150, Matrex gel red A, 再び DEAE-Cellulose によるカラムクロマトグラフィーを行い、さらに等電点電気泳動を適用して各種電気泳動ゲル上単一成分とした。

全精製過程は4℃あるいは氷冷下で行った。

pH5.5沈殿および硫酸アンモニウム分画

ブタ精巢サイトソール画分（タンパク質4.0 g）中に微量混在するミクロソーム画分を取り除く目的で、サイトソール画分に0.1 N HClを加えてpH 5.5に調整した後、遠心分離して沈殿を取り除き上清を得た。得られた上清は直ちに 0.1 N NaOHでpH 7.4に調整した後、硫酸アンモニウム粉末を35%飽和になるまで加えた。硫酸アンモニウムを加えている間、アンモニア水を加えることにより溶液のpHをおよそ7.0に保った。遠心分離（8000 \times g, 20 min）の後、その上清に70%飽和になるまで硫酸アンモニウムを加え、1 hr攪拌した後、8000 \times g, 20 minの遠心分離を行いその沈殿を得た。

硫酸アンモニウム35-70%飽和による沈殿には全酵素活性の98%以上が含まれ、比活性はおおよそ2.5倍上昇した。

DEAE-Celluloseカラムクロマトグラフィー

硫酸アンモニウム35-70%沈殿を 20 mM KPB-0.1 mM EDTA (pH 7.4) に懸濁させ、脱塩を目的として、あらかじめ 3 mM KPB-0.1 mM EDTA (pH 7.4)で平衡化した Sephadex G-25 (3.1 \times 44 cm) に適用し、硫酸アンモニウムを取り除くと共にKPB濃度を3 mMとした。280 nmの吸光度に基づくタンパク質溶出部分 (84 ml)を集め、3 mM KPB-0.1 mM EDTA (pH 7.4)で平衡化したDEAE-Celluloseカラム (2.6 \times 50 cm) に吸着させ、3 mM KPB および 100 mM KPB-0.1 mM EDTA (pH 7.4) それぞれ300 mlでの直線濃度勾配により溶出させた結果、fr.37-42

(48 ml) および fr. 44-48 (35 ml) の2つのピークに 20β -HSD活性が認められた (Fig. 3-1.).

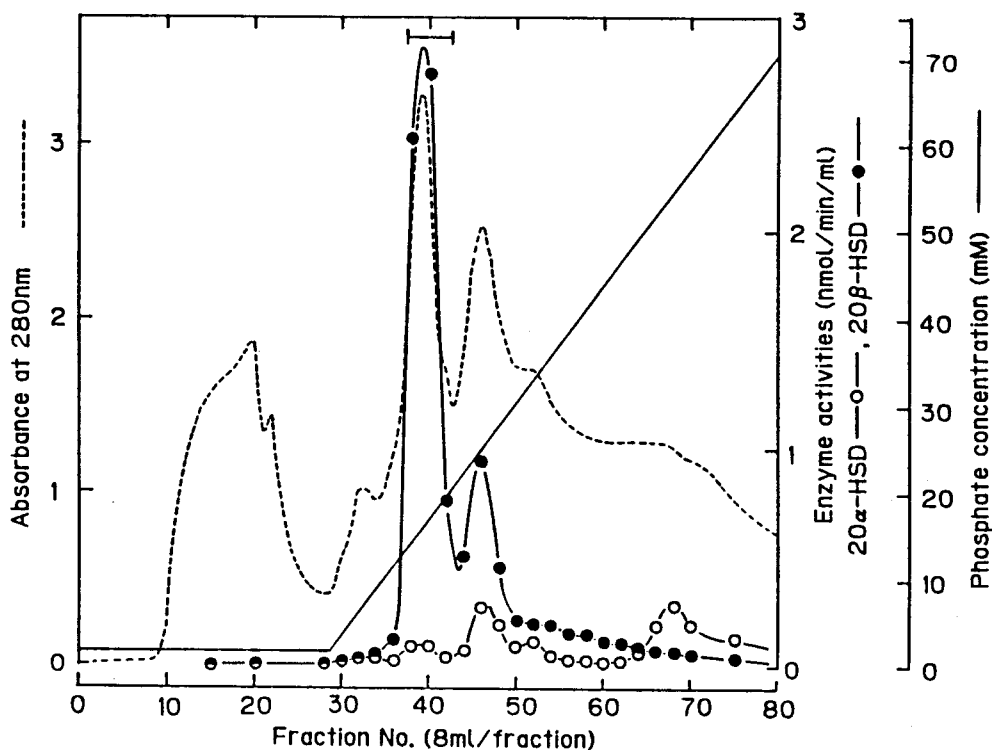


Fig.3-1. DEAE-Cellulose Column Chromatography of the Testicular 20β -HSD from Neonatal Pig

The fraction (1.56 g) from the 35 to 70% ammonium sulfate step was applied to a DE-32 column (2.6×50 cm) and eluted with a linear concentration gradient of KPB (pH 7.4) from 3 to 100 mM containing the 0.1 mM EDTA, and fractions of 8 ml were collected. Proteins were monitored by measuring absorption at 280 nm, and aliquots were assayed for enzyme activities. The fractions containing major 20β -HSD activity (indicated by a bar) were pooled and applied to the next purification step.

Sephadex G-150 カラムクロマトグラフィー

DEAE-cellulose によるクロマトグラフィーより得られた 20β -HSD活性を含む2つの画分のうち、 20α -HSD活性の混在が少なくリン酸塩濃度15 mMで溶出された画分を集め、Diaflo membrane PM10 (Amicon社製)を用いて限外濾過により5 mlに濃縮した。次に100 mM KPB-0.1 mM EDTA (pH 7.4) で平衡化したSephadex G-150カラム (2.7×92 cm) でゲル濾過をした。ゲル濾過により 20β -HSD活性はおおよそ間隙容積 (V_0) の2倍付近に溶出された (Fig. 3-2.)。

Matrex gel Red A カラムクロマトグラフィー

Sephadex G-150 によるゲル濾過の 20β -HSD溶出部分を集め、緩衝液を10 mM KPB-0.1 mM EDTA (pH 7.4) におきかえる目的で、予め10 mM KPB-0.1 mM EDTA (pH 7.4) で平衡化したSephadex G-25カラム (3.1×42 cm) に適用した。280 nmの吸光度に基づく 20β -HSD溶出部分を集め、10 mM KPB-0.1 mM EDTA (pH 7.4) で平衡化したMatrex gel Red Aカラム (1.5×10 cm) に適用した。溶出は10 mM KPB-0.1 mM EDTA (pH 7.4), 300 mlで行った後、10 mM KPBおよび1 M KCl/100 mM KPB-0.1 mM EDTA (pH 7.4), それぞれ120 mlによる直線濃度勾配, 続いて1 M KCl/100 mM KPB-0.1 mM EDTA (pH 7.4), 100 mlにより行った。 20β -HSD活性はそのほとんどがゲルに吸着されずに素通り部分に認められた (Fig. 3-3.)。

2-nd. DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィー

Matrex gel Red Aカラムクロマトグラフィーの素通りより得られた 20β -HSD活性を含む画分を予め3 mM KPB-0.1 mM EDTA (pH 7.4) で平衡化したSephadex G-25 カラム (3.1×42 cm) に適用し、緩衝液を3 mM KPB-0.1 mM EDTA (pH 7.4) とした。280 nmの吸光度に基づく 20β -HSD 溶出部分を集め、予め3 mM KPB-0.1 mM EDTA (pH 7.4) で平衡化したDEAE-celluloseカラム (1.8×21 cm) に吸着させ、3 mM KPBおよび100 mM KPB-0.1 mM EDTA (pH 7.4), それぞれ200 mlによる直線濃度勾配により溶出した。 20β -HSDは鋭い1本のピークとし

て、リン酸塩濃度 15 mM に溶出された (Fig. 3-4.).

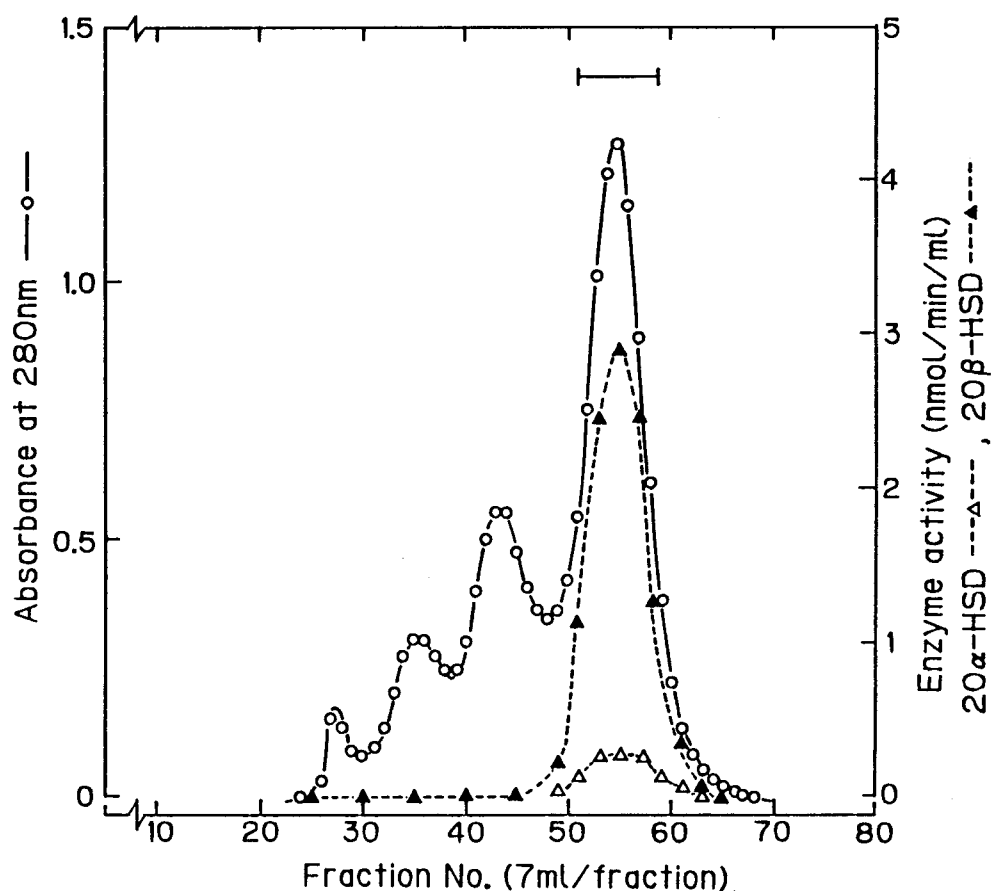


Fig.3-2. Sephadex G-150 Column Chromatography

The fractions containing the 20 β -HSD activity (101 mg) from a DEAE-cellulose column chromatography was applied to a Sephadex G-150 column (2.7 \times 92 cm), and was eluted with 100 mM KPB (pH 7.4), and fractions of 7 ml were collected. Proteins were monitored by measuring absorption at 280 nm, and aliquots were assayed for enzyme activities. The fractions containing major 20 β -HSD activity (indicated by a bar) were pooled and applied to the next purification step.

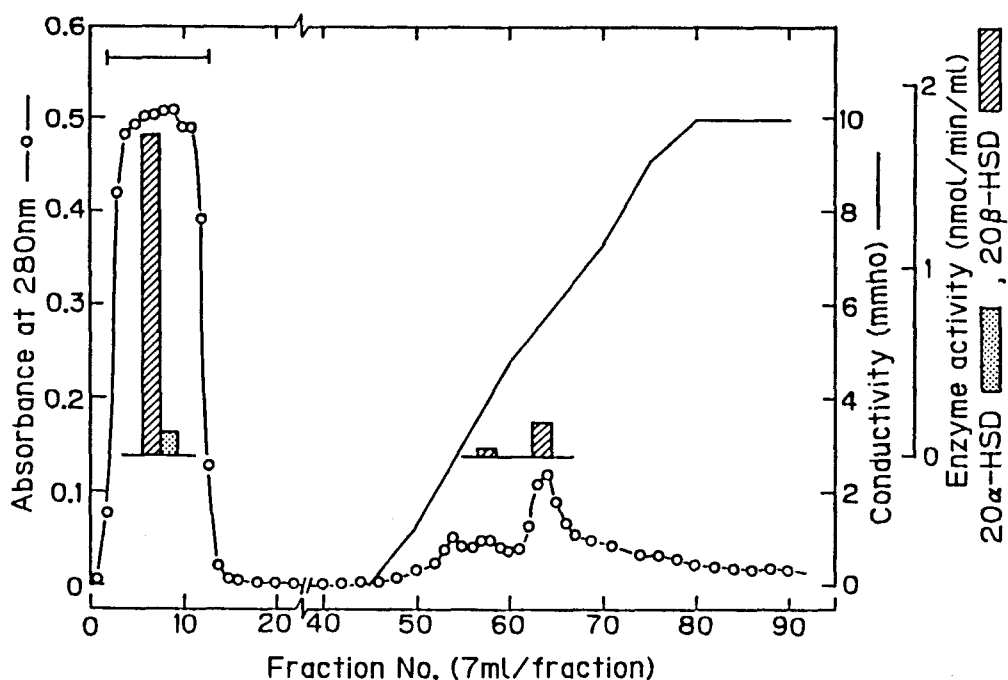


Fig.3-3. Affinity Chromatography Using Matrex Gel Red A

The 20β -HSD fraction (54 mg) from a Sephadex G-150 gel filtration was applied to an affinity column using Matrex gel Red A (1.5×10 cm), and was eluted with 10 mM KPB-0.1 mM EDTA (pH 7.4), fr.1-42; linear gradient from 10 mM KPB to 1 M KCl in 100 mM KPB (pH 7.4)-0.1 mM EDTA, fr.43-75; and 1 M KCl in 100 mM KPB (pH 7.4)-0.1 mM EDTA, fr.76-90, and fractions of 7 ml were collected. Proteins were monitored by measuring absorption at 280 nm, and aliquots were assayed for enzyme activities. The fractions containing major 20β -HSD activity (indicated by a bar) were pooled and applied to the next purification step.

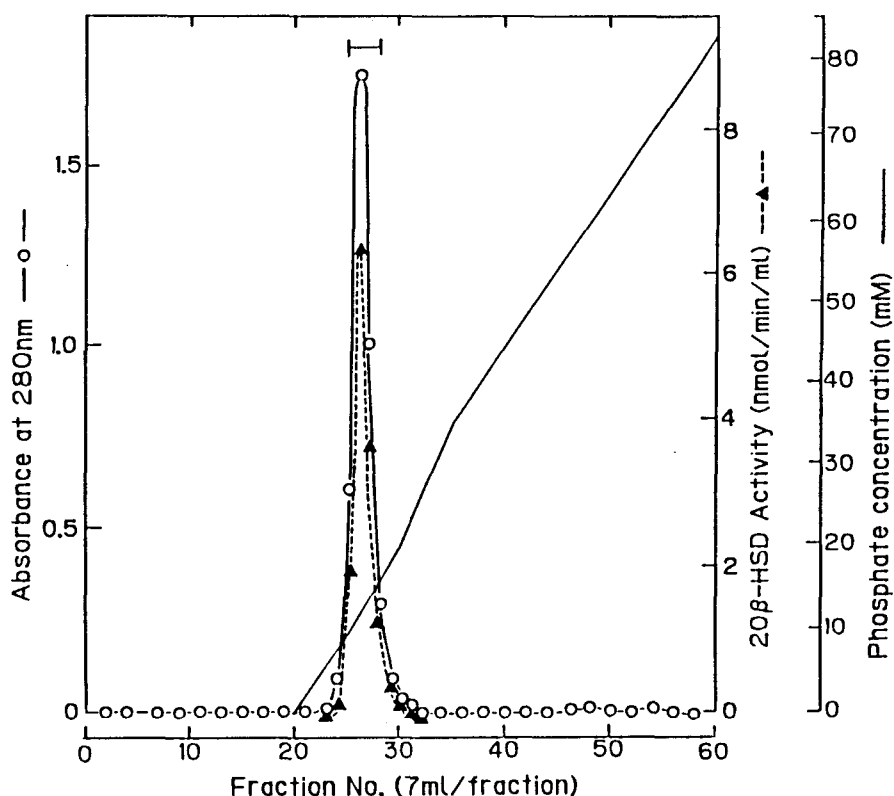


Fig.3-4. Re-Chromatography Using DEAE-Cellulose Column

The 20β -HSD fractions (36 mg) showed at breakthrough on an affinity gel chromatography was applied to a second DEAE-cellulose (DE-32) column (1.8×21 cm) and eluted with a linear concentration gradient of KPB (pH 7.4) from 3 to 100 mM containing the 0.1 mM EDTA, and fractions of 7 ml were collected. Proteins were monitored by measuring absorption at 280 nm, and aliquots were assayed for enzyme activities. The fractions containing major 20β -HSD activity (indicated by a bar) were pooled and applied to the next purification step.

等電点電気泳動

最終の精製ステップとして、DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーから得られた 20β -HSD画分を1/3量ずつ carrier ampholyte (Ampholine, pH 4-6; LKB社製) により110 mlカラムで44 hr (300 V) の等電点電気泳動を行った。 20β -HSDはシャープな1本のピークとして溶出された (Fig. 3-5.). 20β -HSD溶

出液は共存する Ampholine, ショ糖などを取り除く目的で, 3 mM KPB (pH 7.4) に対して十分に透析し, あらかじめ 3 mM KPB-0.1 mM EDTA (pH 7.4) で緩衝化した DEAE-celluloseカラム (1.6×14 cm) に吸着させ, 3 mM KPBおよび50 mM KPB-0.1 mM EDTA (pH 7.4), それぞれ100 mlによる直線濃度勾配により溶出し 20 β -HSDを回収して最終精製標品を得た.

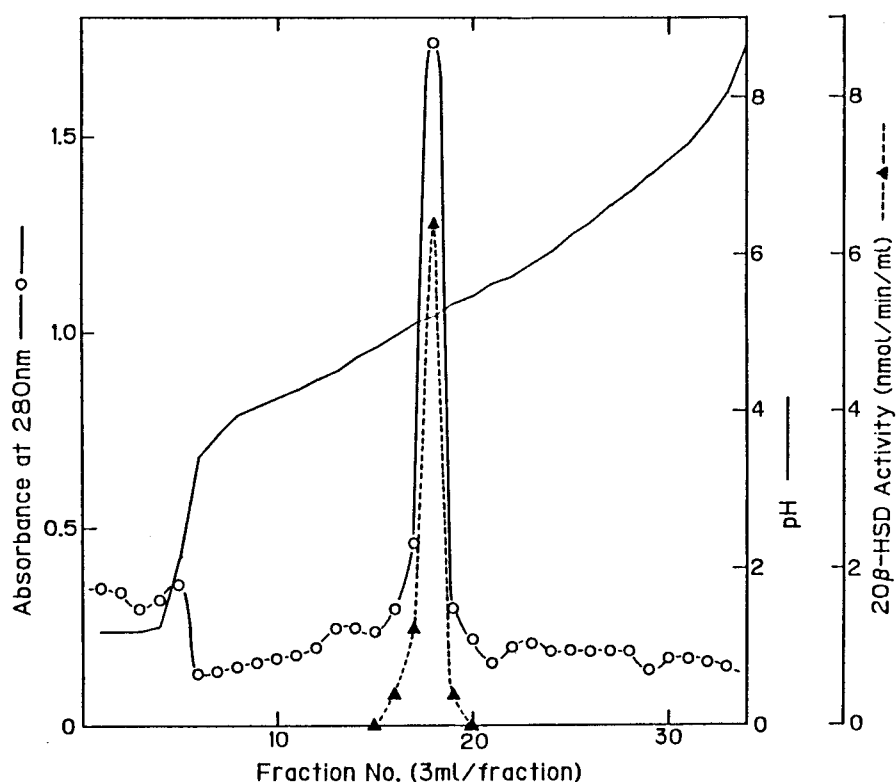


Fig.3-5. Elution Profile of 20 β -HSD by Density Gradient-Isoelectric Focusing

The enzyme preparation (26 mg) from a 2-nd. DEAE-cellulose column chromatography was divided in three portions. Isoelectric focusing (sample: 8 mg each) was carried out in 110 ml glass column with Ampholine (pH 4-6) at 300 V for 44 hr. After the isoelectric focusing, fractions of 3 ml were collected, and absorption at 280 nm and pH were measured. Aliquots were assayed for enzyme activity. The fractions containing major 20 β -HSD activity (indicated by a bar) were pooled as the purified enzyme.

精製過程における収量，収率，比活性，および純度

20 β -HSDは，幼若ブタ精巣サイトソール画分（タンパク質4.0 g）からおよそ50倍に精製され，回収率は28%であった．精製の全過程の収量，収率，比活性をTable 3-I.に要約した．

また，20 β -HSD精製各ステップの標品についてSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った結果を（Fig. 3-6.）に示した．（B）の幼若ブタ（生後2週）精巣サイトソールから2-nd. DEAE-cellulose によるカラムクロマトグラフィー溶出液の（G）までに共存するタンパク質は徐々に取り除かれ，最終精製標品（H）では，SDS-ポリアクリルアミドゲル上で単一バンドとして認められた．

さらに電気泳動の結果から，成熟ブタ（A）および幼若ブタ（B）精巣サイトソール画分中の20 β -HSDに相当するバンドは，成熟時と比較して幼若時に濃いことを認めた．

Table 3-I. Purification of 20 β -HSD from Pig Testicular Cytosol

Purification step	Protein		20 β -HSD activity		
	(mg)	(%)	S.A. ^{a)} (nmol/min/mg)	T.A. ^{b)} (nmol/min)	(%)
Cytosol	4000	100	0.08	328	100
35 to 70% (NH ₄) ₂ SO ₄ Ppt.	1561	39.0	0.21	323	98.5
DEAE-cellulose	100.8	2.5	2.59	261.5	79.7
Sephadex G-150	54.2	1.4	3.34	181.0	55.2
Matrex gel red A	35.7	0.89	4.23	151.0	46.0
DEAE-cellulose	26.1	0.65	5.12	133.6	40.7
Isoelectric focusing	22.5	0.56	4.08	91.8	28.0

a) S.A. : Specific enzyme activity, b) T.A. : Total enzyme activity

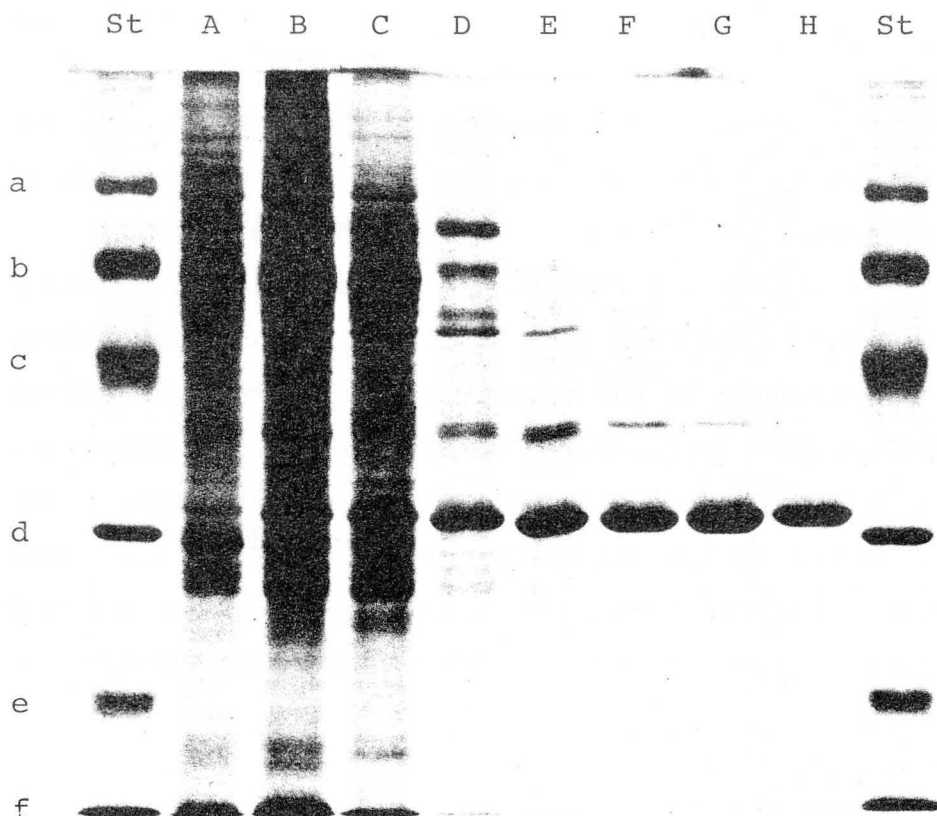


Fig.3-6. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Each Fractions on the Purification Step

Samples are testicular cytosol from mature pig ($44\mu\text{g}$, Lane A), testicular cytosol from neonatal pig ($42\mu\text{g}$, Lane B) and each samples from 35-70% ammonium sulfate precipitate ($46\mu\text{g}$, Lane C), DE-32 ($6.6\mu\text{g}$, Lane D), Sephadex G-150 ($5.4\mu\text{g}$, Lane E), Matrex gel Red A ($5.1\mu\text{g}$, Lane F), second DE-32 ($6.6\mu\text{g}$, Lane G), and isoelectric focussing ($4\mu\text{g}$, Lane H). Both sides are standard protein mixture. The electrophoresis were carried out on 12% polyacrylamide gel ($10.5 \times 14.5 \times 0.1\text{ cm}$), 25 mA, and the gel was stained with Coomassie blue R-250. The standard proteins (molucular weight in parentheses) for molecular markers are: a) Phosphorylase b (94000), b) Bovine serum albumin (67000), c) Ovalbumin (43000), d) Carbonic anhydrase (30000), e) Soybean trypsin inhibitor (20100), f) α -Lactalbumin (14400).

第三節 20β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素精製標品の純度

20β -HSD最終精製標品は、前節においてSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（12%ゲル，pH 8.8）上単一バンドとして認められたが（Fig. 3-6.参照），その他にタンパク質の価電に基づき分離するポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動（7%ゲル，pH 8.3，0.05% Triton X-100 存在下），および等電点の差に基づき分離するポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動（5%ゲル，Ampholine pH 3.5-10）のいずれにおいても Coomassie blue R-250 染色の下で単一バンドとして認められた（Fig. 3-7.）。さらに， 20β -HSD最終精製標品（21.5 mg）を3 mM KPB（pH 7.4）-0.1 mM EDTA に対して透析し，予め同緩衝液で平衡化した HPLC システム（Waters 650 Advanced Protein Purification System, Column; Protein Pack G-DEAE (1×5 cm, Waters)）に適用し，3 mM KPB-0.1 mM EDTA（pH 7.4）および 100 mM KPB-0.1 mM EDTA（pH 7.4）の直線濃度勾配により溶出させたクロマトグラムをFig. 3-8.に示したが， 20β -HSD精製標品は単一ピークとして溶出し，この結果からも精製標品の純度が高いことが示唆された。

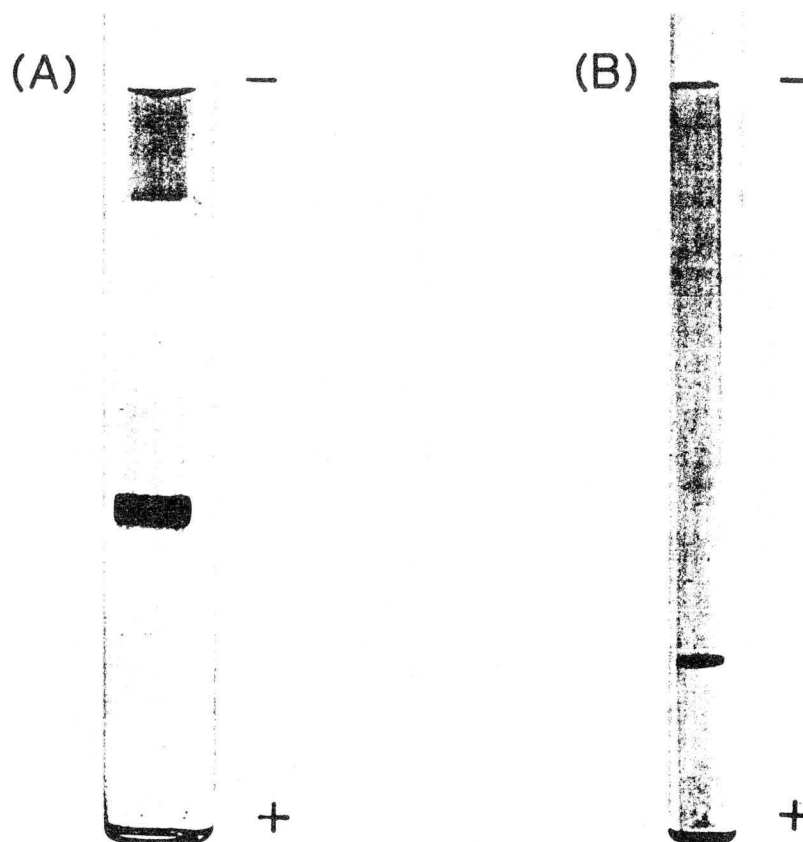


Fig.3-7. Polyacrylamide Gel Disk-Electrophoresis (A), Isoelectric Focusing on Polyacrylamide Gel (B) of Purified 20β -HSD

Disk-electrophoresis was carried out on 7% polyacrylamide gel ($0.5\phi \times 5.5$ cm) at 4°C , 2 mA/tube, pH 8.9, and was applied the $7\mu\text{g}$ of purified 20β -HSD in the presence of Triton X-100 (0.05%). Isoelectric focusing was carried out on 4.5% polyacrylamide gel ($0.5\phi \times 10$ cm) including Ampholine (pH 3.5-10) at 4°C , 80 V, 17 hr, and was applied the $5\mu\text{g}$ of purified enzyme preparation in the presence of Triton X-100 (0.05%). Each gels were stained with Coomassie blue R-250.

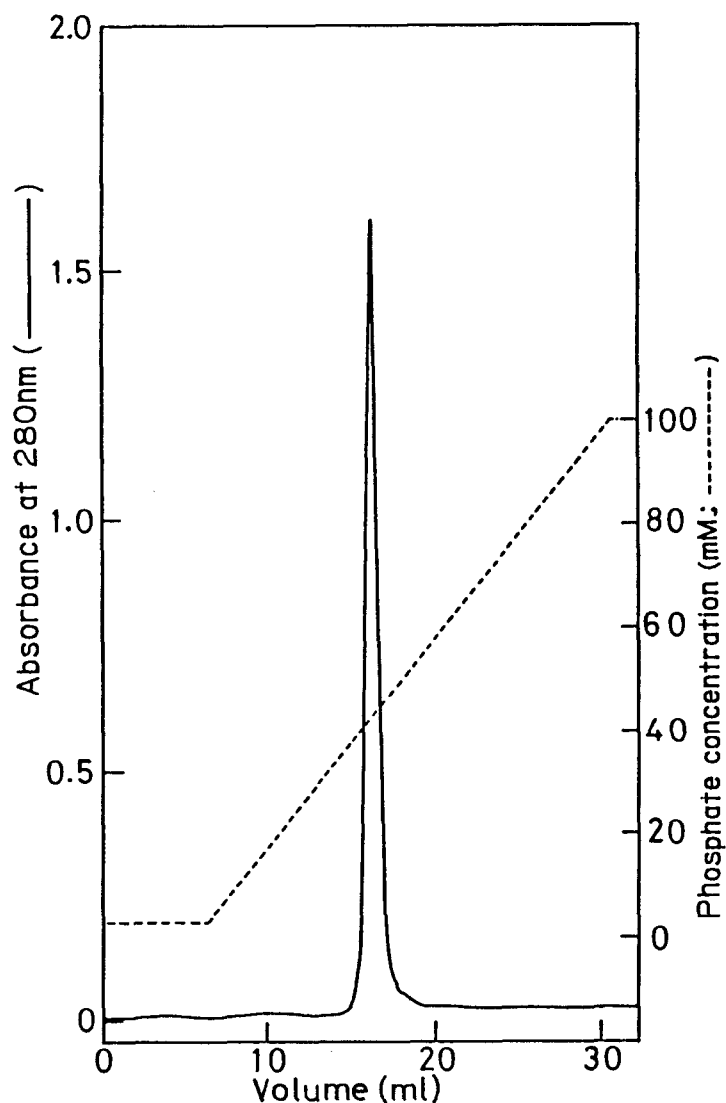


Fig.3-8. HPLC Chromatogram of Purified 20 β -HSD on the Column of Protein Pack G-DEAE

The purified 20 β -HSD preparation (0.9 mg) from isoelectric focusing was applied to HPLC system (Waters 650 Advanced Protein Purification System). The conditions are: column, Waters Proteinpak G-DEAE (1 \times 5 cm); flow rate, 0.6 ml/min; wavelength, 280 nm. An elution was carried out with 3 mM KPB-0.1 mM EDTA (pH 7.4) over 10 min then linear gradient from 3 mM KPB to 100 mM KPB (pH 7.4) containing 0.1 mM EDTA over 30 min and then 100 mM KPB (pH 7.4)-0.1 mM EDTA over 10 min.

第四節 20 β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素のタンパク化学的性質

分子量

20 β -HSDの分子量は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法および Sephadex G-100 を用いたゲル濾過法の2種の方法により検討した。

まずSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に従い、精製20 β -HSD標品 (1.3 μ g) および標準タンパク質 (low molecular weight calibration kit, Pharmacia社製) を12%ポリアクリルアミドゲル (10 \times 14.5 \times 0.1 cm), pH 8.8, 定電流15 mAで泳動し、泳動されたタンパク質の移動度 (Rf値) をそれぞれ求めた (Fig.3-6.参照)。各タンパク質のRf値を分子量の対数値に対してプロットした結果、Fig.3-9.-(A) が得られ、20 β -HSDの移動度から分子量は約30500と推定された。

ゲル濾過法では、Sephadex G-100 カラムクロマトグラフィーを利用した。Blue Dextran (分子量約200万) を3 mg/2.5 ml水溶液とし、あらかじめ50 mM KPB (pH 7.4) で平衡化したSephadex G-100 カラム (1.9 \times 74 cm) でゲル濾過し、280 nmにおける吸光度により検出して、カラムの間隙容積 (Vo) を求めた。また、同じ条件で、BSA (M.W. 67000; 1.25 mg/2.5 ml) 50 mM KPB (pH 7.4, 以下同じ), ovalbumin (M.W. 43000; 2 mg/2.5 ml), chymotrypsinogen-A (M.W. 25000; 2 mg/2.5 ml), myoglobin (M.W. 17800; 2 mg/2.5 ml) をゲル濾過し、それぞれの溶出体積 (Ve) を求めた。それぞれのタンパク質に対する Ve/Vo値を分子量の対数値に対してプロットした結果をFig.3-9.-(B)に示した。精製20 β -HSD標品 (2.5 ml) のVe値から分子量は約30500と推定され、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による場合と一致した。

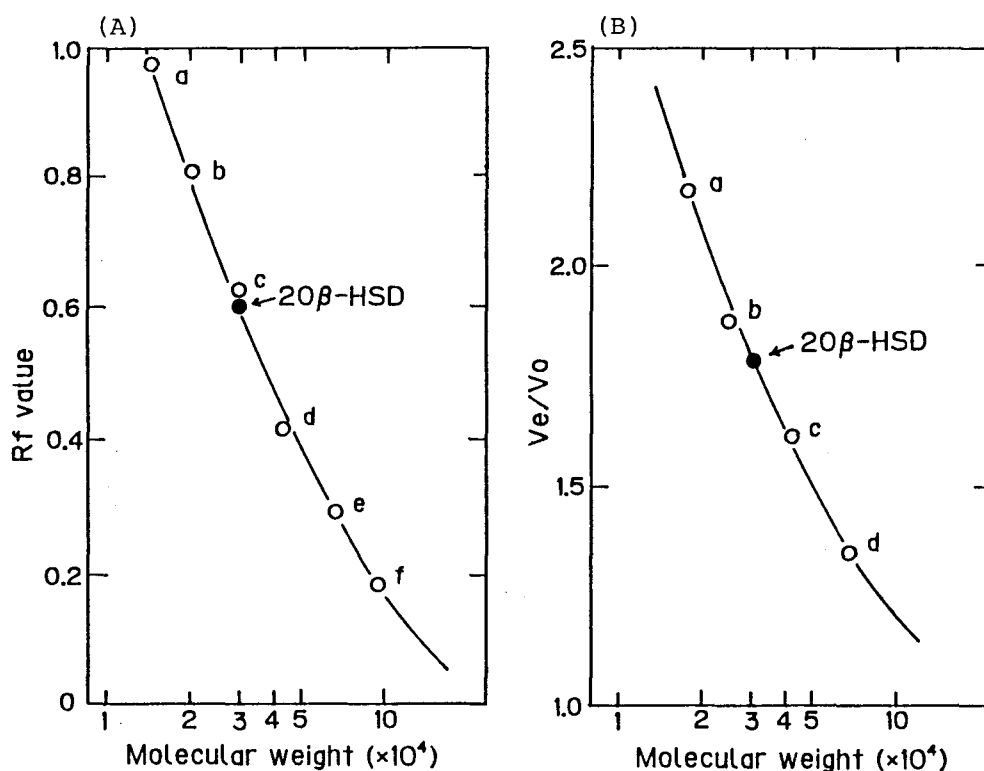


Fig.3-9. Molecular Weight Estimations by SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (A) and by Gel Filtration (B)

Electrophoretic pattern of SDS-PAGE was shown in Fig.3-6. Standard proteins (molecular weight in parentheses) are: a) α -lactalbumin (14400), b) soybean trypsin inhibitor (20100), c) carbonic anhydrase (30000), d) ovalbumin (43000), e) bovine serum albumin (67000); f) phosphorylase (94000). While the purified 20 β -HSD (1.0 mg/2.5 ml) was applied to a column of Sephadex G-100 (1.9×74.3 cm) and eluted with 50 mM KPB (pH 7.4), and fractions of 3.3 ml were collected. Proteins were monitored by measuring absorption at 280nm. Protein standards were applied to the same column and determined the elution volumes (V_e). The void volume (V_o) was determined as the elution volume of blue dextran. Standard proteins (molecular weight in parentheses) are: a) myoglobin (17800), b) chymotrypsinogen A (25000), c) ovalbumin (43000), d) bovine serum albumin (67000).

等電点

等電点は等電点電気泳動 (Fig.3-5.) より測定し, その等電点 (pI) は5.2であることを認めた.

吸収スペクトル

20 β -HSDの50 mM KPB (pH 7.4) 溶液 (30 μ M および 15 μ M) を試料とし, 同緩衝液を対照として25℃で 230-450 nm の吸収スペクトルを測定した. 20 β -HSDは271 nmに極大, 250 nmに極小吸収を持ち, 280および290 nmに小さな肩を持つスペクトルを示した. また, モル吸光係数 $\epsilon_{271\text{nm}}$ は35800, $\epsilon_{250\text{nm}}$ は28200, $\epsilon_{280\text{nm}}$ は32800 および $\epsilon_{290\text{nm}}$ は21900 (いずれも $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) であった.

糖タンパクの定性

フェノール硫酸法により糖は検出されず, 本酵素はその分子中に糖を有しないことが推定された.

第五節 考察

20 β -HSD活性はブタをはじめとする数種の動物の精巢中に存在し、幼若時の精巢中で特異的なステロイドの産生に関与していることが考えられるが、この20 β -HSDの諸性質の検討、および関連酵素との比較を行う上で精製は必要不可欠である。そこで特異的に高い20 β -HSD活性が存在する幼若期のブタ精巢サイトソール画分を原料とし、硫酸分画、カラムクロマトグラフィーなど合計6ステップにより精製を行った。

サイトソール画分から硫酸アンモニウム35-70%飽和による沈殿を集めた結果、全タンパク質の約60%が取り除かれ、かつ活性の98%以上が回収されることから、20 β -HSD精製の第一手段として非常に有効な方法であると考えられる。また続く DEAE-Cellulose カラムクロマトグラフィーでは、20 β -HSD活性はリン酸塩濃度15および26 mMの2つのピークに分かれて溶出した。15 mMに溶出したメインピークには高い20 β -HSD活性が認められたが、後で溶出したタンパク質ピーク中では20 β -HSD活性は低く同時に20 α -HSD活性の混在が認められた。さらに Sephadex G-150, Matrex gel red A, および DEAE-cellulose カラムでの再クロマトグラフィーによりSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上わずかな夾雑物が存在する程度まで精製され、この時点で比活性はサイトソールの約60倍、回収率は40%と比較的高収率であった。また最終精製段階として等電点分画法を用いた結果、minor 成分を取り除くことができたが、この操作により20 β -HSDの比活性は逆に低下した。この酵素活性低下の一つの理由として、20 β -HSDの等電点が結果的にpH 5.2であったことから弱酸性下に長時間曝露されるために酵素活性の失活が起こったと考えられる。

20 β -HSD最終精製標品は、HPLCによりクロマトグラム上鋭い一本のピークとして溶出し、さらに、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上単一バンドとして認められた。また、酵素タンパク質非変性下での価電の差に基づくディスク電気泳動、等電点の差に基づくポリアクリルアミド等電点電気泳動上、多少のテーリングはあったがいずれも単一バンドとして認められ、20 β -HSD精製標品

の純度の高いことが示唆された。一方、このテーリングは非イオン性界面活性剤である Triton X-100 (0.05%) をゲル中に添加することにより消失したが、ポリアクリルアミドゲル中への Triton X-100 添加が電気泳動による分子量やタンパク価電変化の検出に影響を及ぼさないことは、Hearing らにより報告されており、⁴⁴⁾ 添加に基づく 20β -HSD 精製標品の電気泳動上の移動度変化も認められなかった。また、0.05% の Triton X-100 の酵素反応系への添加で 20β -HSD はなお、非存在下の 80% 以上の酵素活性を示すことを認めている (第四章)。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上で成熟ブタ精巣サイトソールと幼若ブタ精巣サイトソールに基づくパターンとを比較すると、精製にともない明らかとなった 20β -HSD のタンパク質バンドとの位置の比較から判断して幼若時には酵素タンパク質の存在比が高く、成熟時にはその存在比が低くなることが考えられ、第二章で認めた成育に伴う比活性の変動の現象は、酵素活性の消失ではなくサイトソール画分中の 20β -HSD タンパク質含量が低下することに基づいていると考えられる。

20β -HSD の分子量は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、Sephadex G-100 を用いたゲル濾過のいずれの方法からも同じ 30500 である結果が得られ、フェノール硫酸法による糖質の定性反応が陰性であったことから、 20β -HSD 酵素タンパク質は既知のブタ精巣 20α -HSD より分子量がおおよそ 4000-5000 程度小さい単純タンパク質であると考えられる。また、多くのタンパク質にみられる 280 nm 付近の吸収極大を持たず、271 nm に比較的弱く幅広い吸収極大を持つ特徴ある吸収スペクトルを示し、分子中に持つチロシンなどの芳香族アミノ酸含量が低いタンパク質であることも考えられる。

小括

- 1) 20β -HSDは幼若ブタ精巣サイトソールから硫酸沈殿，イオン交換クロマトグラフィー，ゲル濾過，等電点電気泳動などにより精製され，SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動，ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動，ポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動において単一成分であることを認めた。
- 2) 分子量はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動，ゲル濾過の二種の方法で測定し，いずれの方法からもほぼ同じ値が求められ，分子量はおよそ30500であると推測された。
- 3) フェノール硫酸反応により 20β -HSDは分子中に糖を持たない単純タンパク質であることが予想された。
- 4) 20β -HSDの等電点は5.2であり，270 nmに吸収極大を持つこと，およびモル吸光係数が他のタンパク質に比べて小さいことなどから芳香族アミノ酸含量があまり高いことが示唆された。

第四章 20 β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素が触媒する酸化・還元両反応における酵素化学的諸性質^{37, 45, 46, 47)}

第三章では、哺乳類における20 β -HSDとして初めて幼若ブタ精巣からその酵素タンパク質の精製を行った。また、各種電気泳動法による精製純度の検定についても記述した。一方、20 β -HSDは原核細胞である *Streptomyces hydrogenans* 中に存在することが以前からよく知られており、²⁰⁾ 単離、結晶化が行われている。^{21, 24)} また、各種動物のステロイド産生臓器中には、同じC₂₁-ステロイドを基質とし20位のカルボニル基の還元を触媒する20 α -HSDが存在し、⁷⁾ 特にブタ精巣中の20 α -HSDは精製されその諸性質も十分に調べられている。³⁾

本章ではこれら類似点を持つ諸酵素との比較を目的に、20 β -HSD精製標品についてその還元および酸化触媒活性に対する酵素化学的諸性質の検討を行った。

第一節 実験の部

実験材料および試薬 精製20 β -HSD 20 β -HSDの精製は、最終段階における酵素の失活を避ける目的で、第三章の方法に多少変更を加えて行った。すなわち、最終段階に用いた等電点電気泳動による分画の代わりに部分精製酵素標品を1 mM KPB-0.1 mM EDTA (pH 7.4) に対して透析し、予め同緩衝液で平衡化した hydroxylapatite カラム (1.5×5 cm) に適用した。このカラムクロマトグラフィーで20 β -HSDは素通り部分に溶出し、この標品は第三章で行った各種電気泳動的にも単一のバンドとして認められた。この方法による最終精製標品の比活性は 5.1 nmol/min/mg proteinであった。また、20 β -HSD精製標品は50 mM KPB-0.1 mM EDTA (pH 7.4) 中で使用するまで-20℃で保存した。

ブタ副腎ミトコンドリア画分及びミクロソーム画分 成熟ブタ副腎から常法に従いミトコンドリア画分を得た。また Cinti らの方法⁴⁸⁾ によりミクロソーム画分を得た。

P-450 および P-450 reductase 幼若ブタ精巣より Nakajin と Hall の方法⁴⁹⁾に従って得られたものを使用した。

放射能標識化合物 [4-³H]NAD⁺ (74 GBq/mmol)は Amersham社製 (Lot: RC-3921) を使用した。[4-¹⁴C]17 α -hydroxyprogesterone は第二章に述べたものを使用した。その他 [4-¹⁴C]progesterone (2.12 GBq/mmol; Lot: 1319-279), [4-¹⁴C]pregnenolone (2.12 GBq/mmol; Lot: 1227-080), [4-¹⁴C]11-deoxycorticosterone (2.17 GBq/mmol; Lot: 1022-183), および [4-¹⁴C]cortisol (2.04 GBq/mmol; Lot: 965-167) は、いずれも New England Nuclear社製を使用した。

[4-¹⁴C]cortisone, [4-¹⁴C]17 α ,21-dihydroxyprogesterone, [4-¹⁴C]17 α -hydroxypregnenolone および [4-¹⁴C]corticosterone は以下に示すように酵素反応により作成し、基質として使用した。

[4-¹⁴C]cortisone の作成: [4-¹⁴C]cortisol とブタ副腎ミクロソーム画分 (11 β -HSD)⁵⁰⁾を β -NAD⁺存在下で30 minインキュベーションした生成物をTLC (展開溶媒; benzene/acetone (1/1, v/v)) で分離後, CH₂Cl₂/CH₃OH (1/1, v/v) で抽出し、標準ステロイドで希釈して基質とした。

[4-¹⁴C]17 α ,21-dihydroxyprogesterone の作成: [4-¹⁴C]17 α -hydroxyprogesterone とブタ副腎ミクロソーム画分 (チトクローム P-450; 21-hydroxylase)⁵¹⁾をNADPH-再生系 (第二章参照) 存在下で30 minインキュベーションした生成物をTLC (展開溶媒; benzene/acetone (2/1, v/v)2回展開) で分離後, CH₂Cl₂で抽出し、標準ステロイドで希釈して基質とした。

[4-¹⁴C]17 α -hydroxypregnenolone の作成: [4-¹⁴C]pregnenoloneをチトクローム P-450 (17 α -hydroxylase/lyase),⁵²⁾ P-450 reductase とNADPH-再生系存在下で30 minインキュベーションした生成物をTLC (展開溶媒, ethylacetate/n-hexane (3.5/6.5, v/v)) で分離後, CH₂Cl₂で抽出し、標準ステロイドで希釈して基質とした。

[4-¹⁴C]corticosterone の作成: [4-¹⁴C]11-deoxycorticosterone をMg²⁺存在下, ブタ副腎ミトコンドリア画分 (11 β -hydroxylase)⁵³⁾とNADPH-再生系

存在下で30 minインキュベーションした生成物をTLC (展開溶媒; benzene/acetone (8/2, v/v)) で分離後, CH_2Cl_2 で抽出し, 標準ステロイドで希釈して基質とした。

また, 20β -水酸化ステロイドである $[4-^{14}\text{C}]17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one および $[4-^{14}\text{C}]20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one は以下に示すように酵素反応により作成したものを使用した。

$[4-^{14}\text{C}]17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one の作成: $[4-^{14}\text{C}]17\alpha$ -hydroxyprogesterone および 20β -HSD精製標品を, NADPH-再生系存在下で 60 minインキュベーションした生成物をTLC(展開溶媒, benzene/acetone (8:2, v/v))で分離後, CH_2Cl_2 で抽出し標準ステロイドで希釈して基質とした。

$[4-^{14}\text{C}]20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one の作成: $[4-^{14}\text{C}]$ progesterone および 20β -HSD精製標品を, NADPH-再生系存在下で60 minインキュベーションした生成物をTLC(展開溶媒, benzene/acetone (8/2, v/v)) で分離後, CH_2Cl_2 で抽出し標準ステロイドで希釈して基質とした。

標準ステロイド 17α -hydroxyprogesterone, progesterone, pregnenolone, 11-deoxycorticosterone, cortisol, cortisone, $17\alpha, 21$ -dihydroxyprogesterone (Reichstein's substance S), 17α -hydroxypregnenolone, corticosterone, $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one, $17\alpha, 20\alpha$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one, $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-5-pregnen-3 β -ol, $17\alpha, 20\alpha$ -dihydroxy-5-pregnen-3 β -ol, 20β -hydroxy-4-pregnen-3-one, 20α -hydroxy-4-pregnen-3-one, 20β -hydroxy-5-pregnen-3 β -ol, 20α -hydroxy-5-pregnen-3 β -olはいずれもSigma社製を使用した。

ピリジンヌクレオチド 還元型ピリジンヌクレオチド; β -NADPH, β -NADH, α -NADPH, β -3'-NADPH, α -NADHおよび酸化型ピリジンヌクレオチド; β -NADP⁺, β -NAD⁺, β -3'-NADP⁺はいずれも Sigma社製を使用した。

酵素 glucose-6-phosphate dehydrogenase [EC 1.1.1.49] (Type XV; Lot: 13F-8190), isocitric dehydrogenase [EC 1.1.1.42] (Type VI; Lot: 126F-8075), NAD⁺-kinase [EC 2.7.1.23] (Lot: 35F-7160) はいずれも Sigma社製を

使用した。

その他の試薬 adenosine-5'-triphosphate (ATP), isocitric acid, glucose-6-phosphate, DL-dithiothreitol (DTT), metyrapone (SU 4885), aminogluthethimide および spironolactone はいずれも Sigma社製を使用した。また, o,P'DDD (mitotan) は Aldrich社製。SU 8000 および SU 10603は Ciba社製。SKF 525A は Smith-Kline社製。cyanoketone は Winthrop, NY社製。Ketoconazole は協和発酵工業社製。L-cysteine は東京化成工業製をそれぞれ使用した。その他の試薬は市販の特級品を使用した。

酵素活性測定法 放射能標識ステロイドによる測定 還元反応では, [4-¹⁴C]17 α -hydroxyprogesterone または [4-¹⁴C]progesterone, 酸化反応では, [4-¹⁴C]17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one または [4-¹⁴C]20 β -hydroxy-4-pregnen-3-one, また, 還元反応における基質特異性の検討には, それぞれ対応した放射能標識ステロイドのいずれも 370 Bq/20 nmol/10 μ l ethanol を基質として第二章に述べた方法に従い測定した。

分光光学的方法による測定 日立-228型分光光度計を用い, 酸化反応についてのみ行った。石英セル (1 cm path, 1 ml) 中, 20 β -hydroxy-4-pregnen-3-one (50 nmol/10 μ l ethanol) を基質として, 20 β -HSDを50 mM KPB (pH 7.4) 中で37 $^{\circ}$ C, 3 minのプレインキュベーションをし, 340 nmにおける吸光度値の変化がないことを確認した上で補酵素としてNADP⁺ (250 nmol) を加えることにより反応を開始した (全量1.0 ml)。反応開始後から5 min, 340 nmの吸光度変化を記録し, その傾き ($\Delta A_{340nm}/T(\text{min})$) から次式に従い活性を算出した。

$$20\beta\text{-HSD活性} = \frac{\Delta A_{340nm}}{T(\text{min})} \times \frac{1}{\epsilon \text{ (M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})} \times \frac{1}{\text{層長 (cm)}} \times 10^6 \times \frac{1}{\text{タンパク (mg)}}$$

$$\epsilon_{340nm} = 6200 \text{ (M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) : \text{NADPH}$$

[4-Pro-R-³H]NADPHと[4-Pro-S-³H]NADPHの作成 NADPHのニコチンアミド基の4位に存在する二種の水素原子のうち的一方を³H標識した[4-Pro-R-³H]NADPHまたは[4-Pro-S-³H]NADPHを以下に示すように酵素反応的に作成し、補酵素として使用した (Fig.4-1.).

[4-Pro-R-³H]NADPHの作成: 50 mM KPB (pH 7.0)中, [4-³H]NAD⁺ (1.26 MBq /17 nmol) を ATP (10 mM), MgCl₂ (1 mM) 存在下 NAD⁺-kinase (1 unit) と 37℃, 30 minインキュベーションし, β-NADP⁺で希釈して[4-³H]NADP⁺を作成した. この[4-³H]NADP⁺ (62.9 KBq/60 nmol) を glucose-6-phosphate (5 mM), glucose-6-phosphate dehydrogenase (0.2 unit), MgCl₂ (0.5 mM) 存在下37℃でインキュベーションし, [4-Pro-R-³H]NADPHを作成した.⁵⁴⁾

[4-Pro-S-³H]NADPHの作成: [4-Pro-R-³H]NADPHの場合と同様に[4-³H]NADP⁺を作成した後, isocitric acid (5 mM), isocitricdehydrogenase (0.2 unit), MgCl₂ (0.5 mM) 存在下 37℃でインキュベーションし, [4-Pro-S-³H]NADPHを作成した.⁵⁵⁾

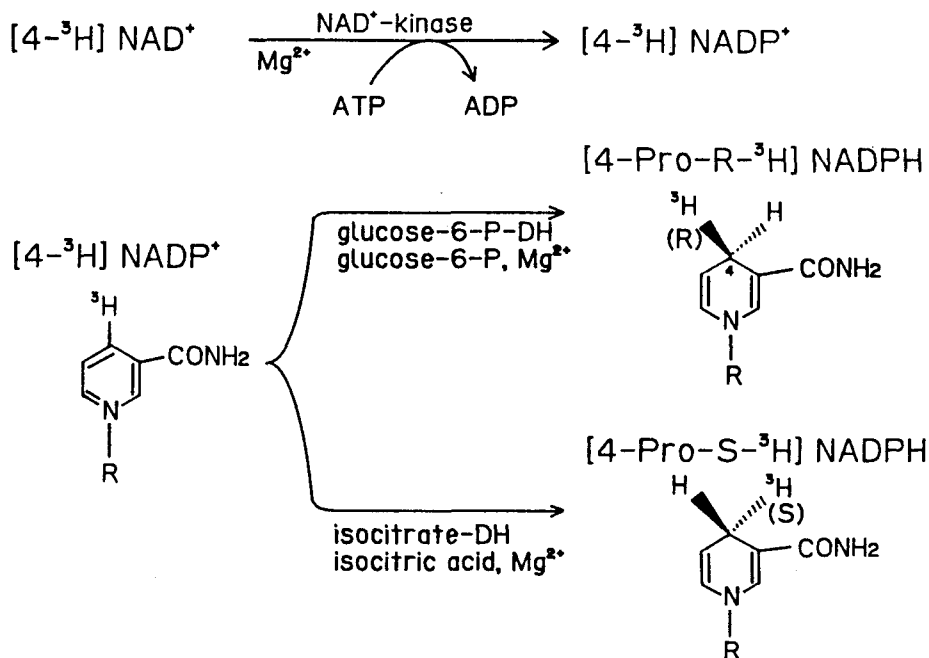


Fig.4-1. Method for Preparation of [4-pro-R-³H]NADPH and [4-pro-S-³H]NADPH from [4-³H]NAD⁺

活性化エネルギーの測定 還元反応では、基質として $[4-^{14}\text{C}]17\alpha\text{-hydroxyprogesterone}$ または $[4-^{14}\text{C}]progesterone$ ($370\text{ Bq}/5\text{ nmol}/10\mu\text{l ethanol}$) を $2-10\mu\text{M}$ になる様に加え、補酵素 $\beta\text{-NADPH}$ (250 nmol) 存在下、 $15^\circ\text{C}-45^\circ\text{C}$ の間でインキュベーションし、酵素活性を測定して各温度における V_{max} 値を Lineweaver-Burk のプロットにより算出した。各々の V_{max} 値を反応速度定数に近似し、この値の対数値を縦軸に、温度の逆数値を横軸にとり、Arrhenius プロットの傾きから次式に従い活性化エネルギーを算出した。

$$k = Ae^{-E_a/RT} \rightarrow \log k = \frac{-E_a}{2.303 \cdot R} \cdot \frac{1}{T} + \log A$$

(Arrheniusの式)

$$\rightarrow E_a = \frac{2.303 \cdot R \cdot T_2 \cdot T_1}{T_2 - T_1} \times \log \frac{k_2}{k_1}$$

$$\rightarrow E_a = \frac{2.303 \cdot R \cdot T_2 \cdot T_1}{T_2 - T_1} \times \log \frac{V_{\text{max}2}}{V_{\text{max}1}}$$

(E_a : 活性化エネルギー, k : 反応速度定数)

また、酸化反応では基質として $[4-^{14}\text{C}]20\beta\text{-hydroxy-4-pregnen-3-one}$ または $[4-^{14}\text{C}]17\alpha,20\beta\text{-dihydroxy-4-pregnen-3-one}$ ($370\text{ Bq}/5\text{ nmol}/10\mu\text{l ethanol}$)、補酵素として $\beta\text{-NADP}^+$ (250 nmol) を用い、同様の方法で活性化エネルギーを算出した。

第二節 20 β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素の触媒する還元反応における 酵素化学的性質

活性測定の基礎的検討

[4- 14 C]17 α -hydroxyprogesterone (370 Bq/20 nmol/10 μ l ethanol) を基質とし、 β -NADPH (240 nmol) を補酵素として酵素活性を測定し、20 β -HSD活性のタンパク質量、あるいはインキュベーション時間に対する直線性を検討した。Fig.4-2.-(A)に示したように20 β -HSD活性はインキュベーション時間に対して、酵素量44 μ gの条件下、0-60 minまで高い直線性が認められた(相関係数 $r=0.9959$)。また、Fig.4-2.-(B)よりタンパク質量に対しては 0-65 μ g/mlまで高い直線性を示した ($r=0.9847$)。

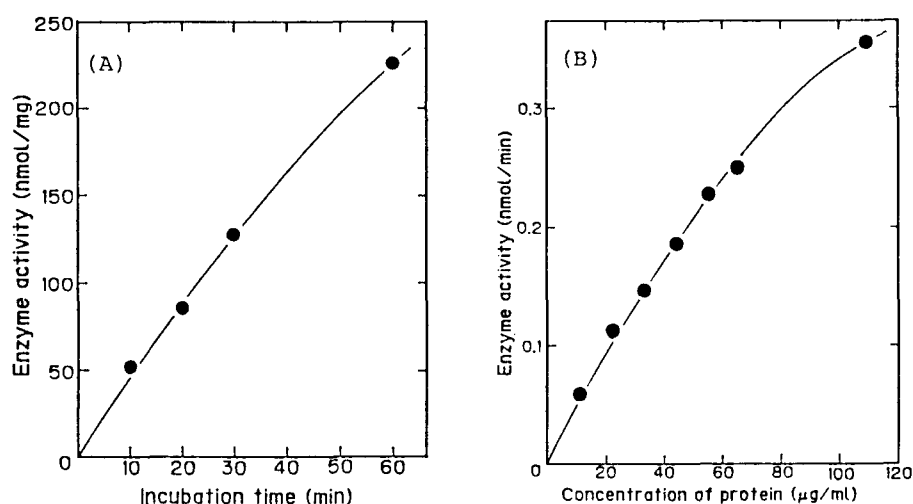


Fig.4-2. Time Course (A) and the Activity as a Function of the Amount of Protein (B) for Reduction of 17 α -Hydroxyprogesterone to 17 α ,20 β -Dihydroxy-4-pregnen-3-one Catalyzed by 20 β -HSD

(A): [4- 14 C]17 α -hydroxyprogesterone (370 Bq/20 nmol/10 μ l ethanol) was incubated with 20 β -HSD (44 μ g) in the presence of β -NADPH (240 nmol) in 1.0 ml of 50 mM KPB (pH 7.4) at 37 $^{\circ}$ C, and the 20 β -HSD activity versus incubation time is plotted.

(B): [4- 14 C]17 α -hydroxyprogesterone (370 Bq/20 nmol/10 μ l ethanol) was incubated with various amounts of 20 β -HSD in the presence of β -NADPH (240 nmol) in 1.0 ml of 50 mM KPB (pH 7.4) for 30 min at 37 $^{\circ}$ C, and the 20 β -HSD activity versus the protein concentration is plotted.

イオン強度の影響

KPB (pH 7.4) 濃度 50–700 mM および KCl濃度 0–1500 mMについて 20β -HSD活性への影響を検討した。

まず、終濃度 50–700 mMの KPB (pH 7.4) を用いて反応溶液を調製し、 20β -HSD活性におよぼすイオン強度の影響を検討した結果をFig.4-3.-(A)に示した。 20β -HSD活性は、KPB濃度 100 mM 付近でわずかに低下するがそれ以上では再び上昇することが認められた。

一方、反応溶液 (50 mM KPB, pH 7.4) 中に、終濃度 0–1.5 Mの KClを加え、 20β -HSD活性に及ぼすイオン強度の影響を検討した結果をFig.4-3.-(B)に示したが、 20β -HSD活性は、100 mM付近で低下、それ以上では上昇し、KPBを用いた場合とほぼ同一の結果が得られた。

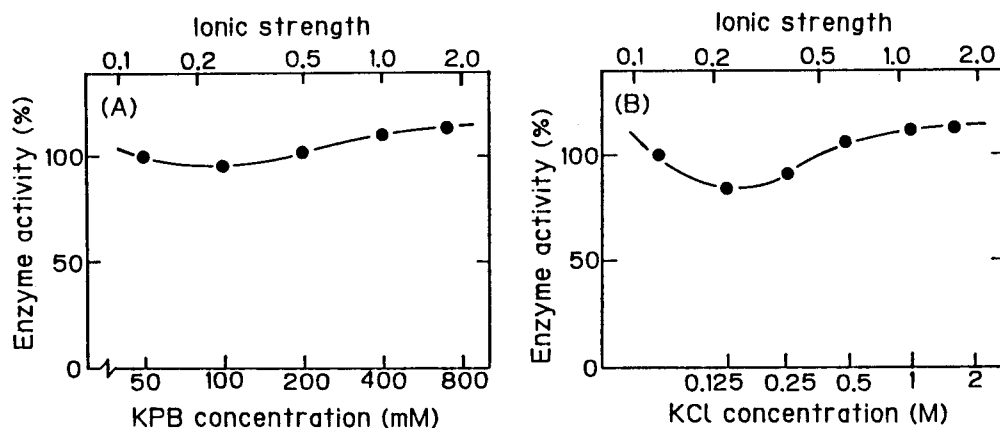


Fig.4-3. Effect of Ionic Strength of the Incubation Mediums on 20β -HSD Activity

Ionic strength of the buffer was adjusted with (A): molar concentration of KPB (pH 7.4) or with (B): addition of KCl in 50 mM KPB (pH 7.4). $[4-^{14}\text{C}]17\alpha$ -hydroxyprogesterone (370 Bq/20 nmol/10 μ l ethanol) was incubated with 20β -HSD (44 μ g) in the presence of β -NADPH (240 nmol) in 1.0 ml of the buffer for 30 min at 37°C.

至適pH

pH 4.0-5.5は $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$ bufferを, pH 5.5-8.5は KPBを用いて反応系のpHを変化させ, 補酵素として β -NADPHまたは β -NADH (240 nmol) を用いた場合について $[4-^{14}\text{C}]17\alpha$ -hydroxyprogesterone (370 Bq/20 nmol) を基質として通常の方法で酵素活性を測定し, pHの変化に基づく 20β -HSD活性の影響を検討した. Fig.4-4.にその結果を示したが, 補酵素として β -NADPHを用いた場合の至適pHは5.5であったのに対し, β -NADHを用いた場合には6.0であり両者に差が認められた. また, β -NADHを用いた酵素活性はpH 6.0で, β -NADPHを用いた酵素活性はpH 5.5で完全に消失した. さらに, pH 4.5-8.5の全pH域で, β -NADHに対して β -NADPHを補酵素にした場合の比活性が高い結果が得られた.

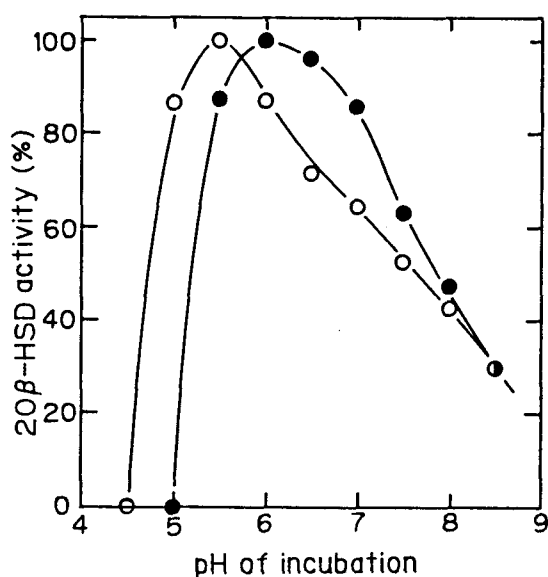


Fig.4-4. Optimum pH for 20β -HSD in the Case of Using β -NADPH or β -NADH as the Cofactor

The incubation buffers used were 50 mM acetate buffer (pH 4.0-5.5), 50 mM KPB (pH 5.5-8.5) and 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5-10.5). $[4-^{14}\text{C}]17\alpha$ -hydroxyprogesterone (370 Bq/20 nmol/10 μ l ethanol) was incubated with 20β -HSD (44 μ g) in the presence of β -NADPH (○) or β -NADH (●) (240 nmol) in 1.0 ml of the buffer described above for 30 min at 37°C.

安定pH

pH 4.0-5.5は $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$ bufferを, pH 5.5-8.5は KPBを, またpH 8.5-10.5は Tris-HCl bufferをそれぞれ用いて, 20β -HSDを各緩衝液 (100 mM) 中 37°C で30 min前処理した後, 各溶液に1 M KPB (pH 7.4)を終濃度300 mM となるように加えて反応系のpHを7.4とした. この酵素溶液について β -NADPH (240 nmol) 存在下 $[4-^{14}\text{C}]17\alpha$ -hydroxyprogesterone (370 Bq/20 nmol) を基質として通常の方法で酵素活性を測定し, 20β -HSDの安定なpH域を調べた結果をFig.4-5.に示した. 20β -HSDはアルカリ性側ではかなり安定であるのに対し, 酸性側では不安定であった. また, pH 4.5-5.0による処理で, 酵素活性はほぼ完全に消失しているのに対し, さらに酸性側であるpH4.0の処理では 20β -HSD活性がある程度保たれる結果が得られた.

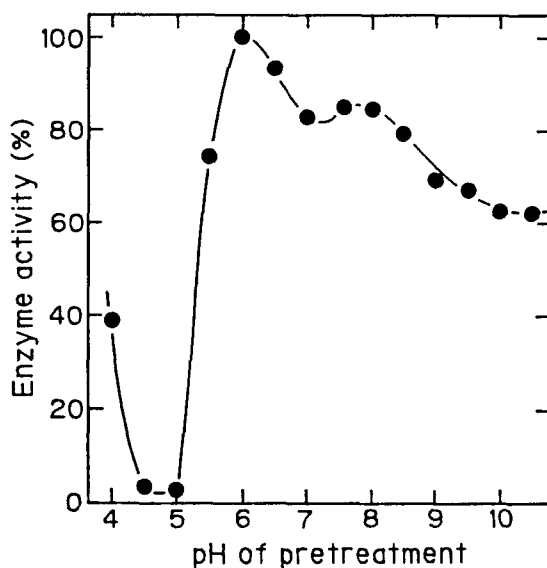


Fig.4-5. pH Stability of 20β -HSD

The buffers used were 50 mM acetate buffer (pH 4.0-5.5), 50 mM KPB (pH 5.5-8.5) and 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5-10.5). 20β -HSD (44 μg) was incubated for 30 min in various pH's buffer systems at 37°C . The mixture treated was readjusted to pH 7.4 by 200 mM KPB and incubated with $[4-^{14}\text{C}]17\alpha$ -hydroxyprogesterone (370 Bq/20 nmol/10 μl ethanol) in the presence of β -NADPH (240 nmol) for 30 min at 37°C .

至適温度

20 β -HSD活性を50 mM KPB (pH 7.4) 中, β -NADPH (240 nmol) 存在下 [4-¹⁴C]17 α -hydroxyprogesterone (370 Bq/20 nmol) を基質として25℃-65℃の各温度でインキュベーションすることにより測定した結果をFig.4-6.に示した.

その結果, 20 β -HSD活性はインキュベーション温度45℃-50℃で高い活性を示すことが認められた.

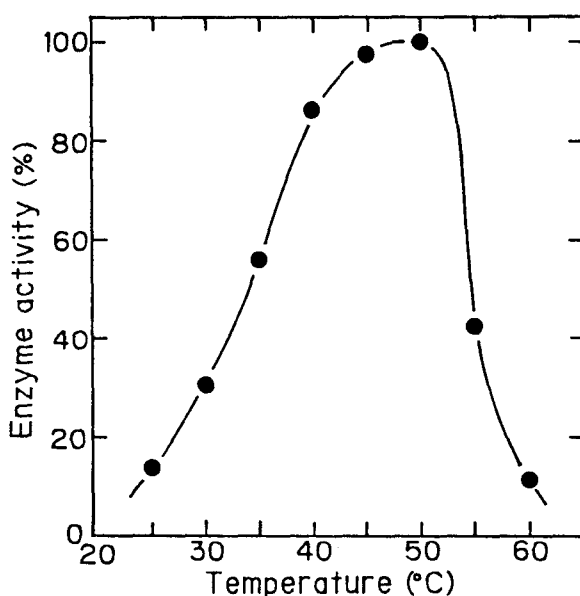


Fig.4-6. Optimum Temperature for 20 β -HSD Activity

[4-¹⁴C]17 α -Hydroxyprogesterone (370 Bq/20 nmol/10 μ l ethanol) was incubated with 20 β -HSD (44 μ g) in the presence of β -NADPH (240 nmol) in 1.0 ml of 50 mM KPB (pH 7.4) for 30 min at various temperature from 25 to 60℃.

熱安定性

20 β -HSDを50 mM KPB (pH 7.4) 中, 25℃-65℃の各温度で30分間加熱処理し、一度冷却した後に β -NADPH (240 nmol) 存在下[4-¹⁴C]17 α -hydroxyprogesterone (370 Bq/20 nmol) を基質として37℃で酵素活性を測定することにより熱安定性を調べた結果をFig.4-7.に示した.

20 β -HSD活性は、30 minの熱処理に対し45℃付近まで耐熱性があり、その後失活が起こり55℃ではほぼ完全に失活した。

また、通常のインキュベーション温度である37℃、および本酵素活性に対する至適温度である45℃で 0-24 hr、また、30 minの処理でわずかな失活が認められた50℃での0-16 hrの処理に対する20 β -HSD活性の経時的变化を測定した結果をFig.4-8.に示した。20 β -HSD活性は37℃、24 hrの処理でなお73%の活性を示し、45℃、24 hrの処理でも41%の活性を認め、50℃、16 hrおよび55℃、0.5 hrの処理ではほぼ完全に消失した。

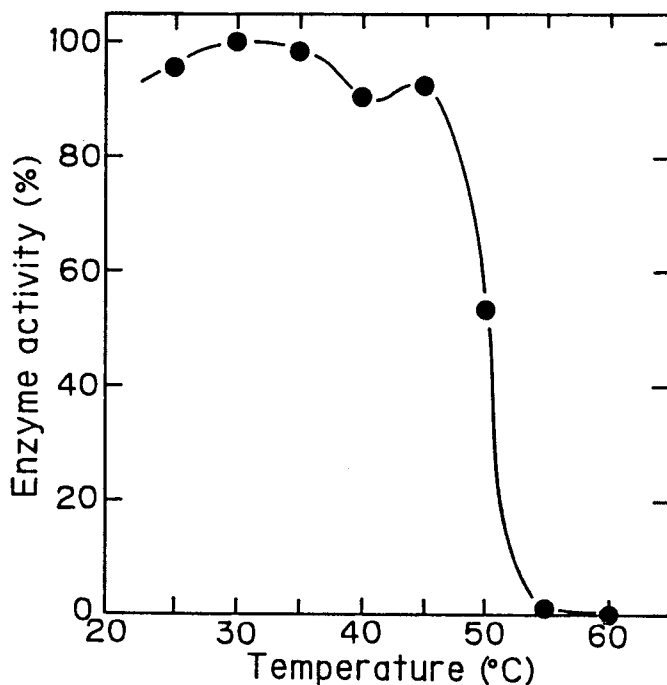


Fig.4-7. Heat-Stability for 20 β -HSD Activity

20 β -HSD (44 μ g) in 50 mM KPB (pH 7.4) were pre-incubated under the condition of various temperature for 30 min. The mixtures were incubated with [4- 14 C]17 α -hydroxyprogesterone (370 Bq/20 nmol/10 μ l ethanol) in the presence of β -NADPH (240 nmol) for 30 min at 37°C.

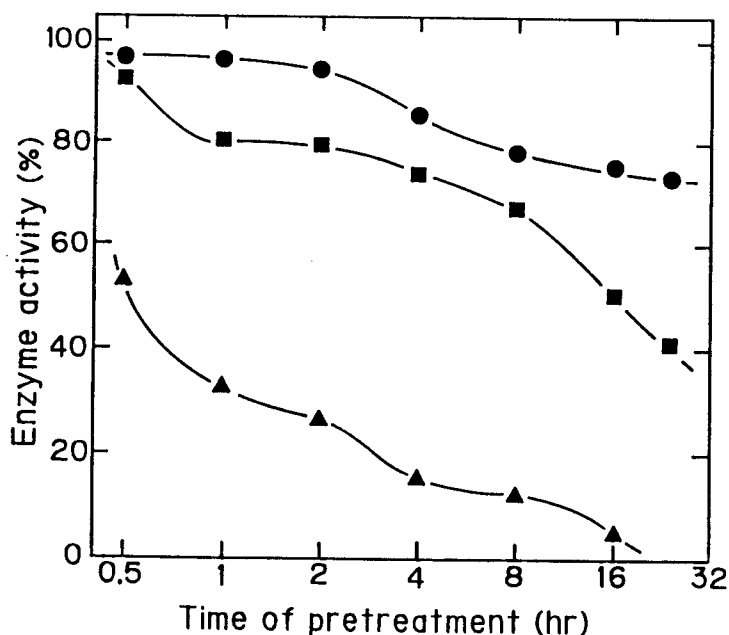


Fig.4-8. Heat-Stability for 20 β -HSD Activity

20 β -HSD (44 μ g) in 50 mM KPB (pH 7.4) were pre-incubated under the condition of 37°C (●), 45°C (■) and 50°C (▲) for several times from 0.5 to 24 hr. Each mixtures treated were incubated with [4-¹⁴C]17 α -hydroxyprogesterone (370 Bq/20 nmol/10 μ l ethanol) in the presence of β -NADPH (240 nmol) for 30 min at 37°C.

金属その他の影響

20 β -HSD反応溶液中に、種々の金属イオン（主に2価）をすべて塩化物で加えたのをはじめ、EDTA-2Na および還元性物質である DTT, cysteineなどを 10^{-2} – 10^{-3} M程度添加して、 β -NADPH (240 nmol) 存在下[4-¹⁴C]17 α -hydroxyprogesterone (370 Bq/20 nmol) を基質として通常の方法で酵素活性を測定し、各種物質が20 β -HSD活性に及ぼす影響について検討した結果をTable 4-1. に示した。20 β -HSD活性は、Cu²⁺ および Hg²⁺イオンの添加により強い活性阻害が認められたが、その他の金属イオンや還元性物質などによる際だった影響はほとんど認められなかった。

その他に、基質ステロイドの溶媒であるアルコールとして ethanol; 1-20% (v/v), methanol; 1-20% (v/v) の影響を、また、非イオン性界面活性剤である Triton X-100; 0.005-0.05% (v/v) の影響も同様にして検討した。その結果、20 β -HSD活性は、methanol, ethanol の添加により徐々に低下し、通常のインキュベーション時の濃度1%では methanol と ethanol 間の差はほとんど認められなかったが高濃度になるに従い ethanol を添加した場合より methanol を添加した場合の方が高い活性を示した。ethanol を添加した場合の残存20 β -HSD活性は通常のインキュベーション時の濃度1%に対して、それぞれ 90.2% (5% ethanol, v/v), 68.3% (10%, v/v), 22.6% (20%, v/v) であった。また、Triton X-100 (0.005-0.05%) の存在により20-30%の活性低下が認められた。

Table 4-I. Effect of Divalent Cations and Other Reagents on the Enzyme Activity of Testicular 20 β -HSD

Addition	20 β -HSD activity(%) ^{a)}	Addition	20 β -HSD activity(%)
None	100	Sr ²⁺	92.4
Mn ²⁺	109	Pb ²⁺	87.6
Ca ²⁺	104	Cd ²⁺	78.9
Fe ³⁺	102	Co ²⁺	76.8
Sn ²⁺	101	Cu ²⁺	15.6
Mg ²⁺	98.1	Hg ²⁺	2.3
Ba ²⁺	95.6	EDTA-2Na	98.5
Ni ²⁺	95.0	Cysteine	92.2
Fe ²⁺	93.8	DTT	74.6
Zn ²⁺	93.7		

a) Expressed as the percentage of remaining activity.

[4-¹⁴C]17 α -Hydroxyprogesterone (370 Bq/20 nmol/10 μ l ethanol) and β -NADPH (240 nmol) were incubated with 20 β -HSD (44 μ g) in the presence of various divalent cations or other reagents (1 mM) in 1.0 ml of 50 mM KPB (pH 7.4) for 30 min at 37°C.

All of the metal-ions used were of chloride form and their final concentration is 1 mM.

基質特異性と反応動力学的定数

20位にケト基を持つ代表的な9種のC₂₁ステロイドの放射能標識体: [4-¹⁴C] 17 α -hydroxyprogesterone, [4-¹⁴C]progesterone, [4-¹⁴C]pregnenolone, [4-¹⁴C]17 α -hydroxypregnenolone, [4-¹⁴C]11-deoxycorticosterone, [4-¹⁴C]corticosterone, [4-¹⁴C]17 α ,21-dihydroxyprogesterone, [4-¹⁴C]cortisol および [4-¹⁴C]cortisone (いずれも 370 Bq/20 nmol/10 μ l ethanol) をそれぞれ20 β -HSD還元反応の基質として用いて, β -NADPH (240 nmol) 存在下, 酵素活性を測定した. また, この中で[4-¹⁴C]17 α -hydroxyprogesterone (2.0-10.0 μ M), [4-¹⁴C]progesterone (2.0-10.0 μ M), [4-¹⁴C]pregnenolone (5.0-20.0 μ M) および [4-¹⁴C]11-deoxycorticosterone (2.0-10.0 μ M) を基質とし, NADPH-再生系存在下で37 $^{\circ}$ C, 20 minインキュベーションし, 酵素活性を測定して各々の基質に対する K_m値とV_{max}値を Lineweaver-Burk のプロットより算出した結果をTable 4-II.に示した.

20 β -HSDは, その還元反応に 17 α -hydroxyprogesteroneをはじめ 11-deoxycorticosterone, progesterone, pregnenolone,などを基質とするが, cortisone, cortisol, corticosterone のように11-カルボニル基または11-水酸基を持つグルココルチコイドは基質としなかった. また, いずれの場合も20 α -HSD活性は認められなかった. さらに, 各ステロイドのV_{max}値を比較すると, 17 α -hydroxyprogesterone が最大であるが, K_m値も同様に大きく, V_{max}/K_m値は progesterone の方が 17 α -hydroxyprogesterone に比べて大きいことを認めた.

また, 17 α -hydroxyprogesterone, 11-deoxycorticosterone, progesterone, pregnenolone に対する Lineweaver-Burk プロットの相関係数は r=0.9856-0.9998であり, いずれも高い直線性が認められた.

補酵素要求性と反応動力学的定数

20 β -HSD還元反応の補酵素として β -NADPH, β -NADHをはじめ, 2'のリン酸が3'に結合した β -3'-NADPH, β 位のニコチンアミド基が α 位に結合した α -

Table 4-II. Kinetic Parameters of Testicular 20 β -HSD
against Substrates

Substrate	20 β -HSD activity (nmol/min/mg)	K _m (μ M)	V _{max} (nmol/min/mg)	V _{max} /K _m
17 α -Hydroxyprogesterone	4.18	9.4	9.6	1.02
Deoxycorticosterone	3.42	8.6	6.2	0.72
Progesterone	3.06	1.5	4.4	2.93
Pregnenolone	2.66	4.0	2.9	0.73
Deoxycortisol	2.11			
17 α -Hydroxypregnenolone	0.39			
Cortisone	N.D. ^{a)}			
Cortisol	N.D.			
Corticosterone	N.D.			

a) Not detected : The enzyme activity was below the limit of detection.

Each [4-¹⁴C]Steroid (370 Bq/20 nmol/10 μ l ethanol) was incubated with 20 β -HSD (44 μ g) in the presence of β -NADPH (240 nmol) in 1.0 ml of 50 mM KPB (pH 7.4) for 30 min at 37°C. Michaelis constant (K_m) and maximum velocity (V_{max}) are obtained by Lineweaver-Burk plot, and correlation coefficients for plots are r=0.9998 (17 α -hydroxyprogesterone), r=0.9985 (deoxycorticosterone), r=0.9941 (progesterone) and r=0.9856 (pregnenolone).

NADPH および α -NADHの5種類を用い、濃度を変化させて加え、[4-¹⁴C]17 α -hydroxyprogesterone (370 Bq/20 nmol/10 μ l ethanol) を基質として50 mM KPB (pH 7.4) 中でインキュベーションした。各補酵素に対する用量-反応曲線を Fig.4-9.に示した。

まず、補酵素が非存在下では20 β -HSD活性は認められなかった。また、 β -NADPH以外にも α -NADHを除く β -NADH、 α -NADPH、 β -3'-NADPHは何れも高濃度添加により20 β -HSDの補酵素となり得た。

また、いずれも20 nmolの [4-¹⁴C]17 α -hydroxyprogesterone を基質とした条件下で、Lineweaver-Burk のプロットより各補酵素に対する見かけのK_m値、V_{max}値を算出した結果をTable 4-III.に示した。V_{max}値は β -NADHを用いた場合

が最も高かったが、 K_m 値も非常に大きく、 V_{max}/K_m 値は最も大きかった β -NADPHに比べ、およそ1/30であった。この V_{max}/K_m 値から、 β -NADPHが最も20 β -HSDの補酵素として適していることが予想された。

また、それぞれの補酵素に対する Lineweaver-Burk のプロットは $r=0.9922-0.9974$ であり、いずれも高い直線性が認められた。

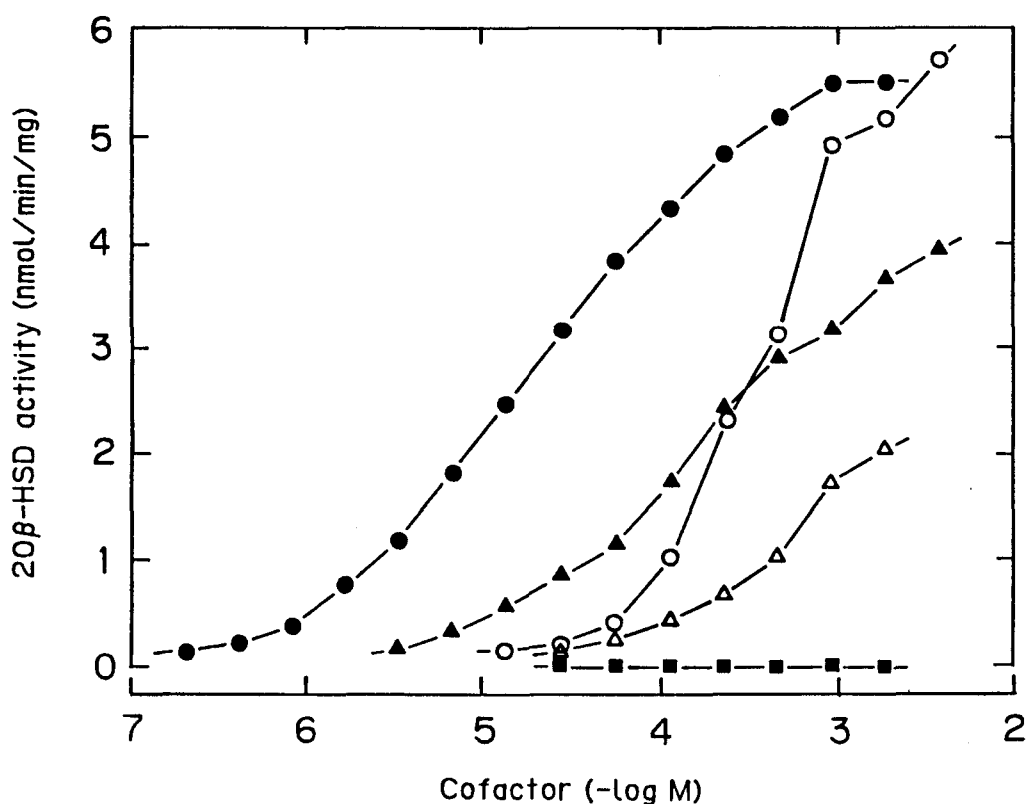


Fig.4-9. Effect of Various Concentrations of Pyridine Nucleotide Cofactors on 20 β -HSD Activity.

[4- 14 C]17 α -Hydroxyprogesterone (370 Bq/20 nmol/10 μ l ethanol) was incubated with purified 20 β -HSD (44 μ g) in 1.0 ml of 50 mM KPB (pH7.4) in the presence of various concentration of cofactor for 30 min at 37 $^{\circ}$ C. Cofactors are β -NADPH (●), β -NADH (○), α -NADPH (▲), β -3'-NADPH (△) and α -NADH (■).

Table 4-III. Kinetic Parameters of Testicular 20 β -HSD
against Cofactors

Cofactor	K _m (μ M)	V _{max} (nmol/min/mg)	V _{max} /K _m ($\times 10^{-3}$)
β -NADPH	17.0	5.0	290
α -NADPH	85.2	3.0	35
β -NADH	1003.0	9.8	9.8
β -3'-NADPH	179.2	1.2	6.7
α -NADH	—	—	N.C. ^{a)}

a) N.C. : not calculated

[4-¹⁴C]17 α -Hydroxyprogesterone (370 Bq/20 nmol/10 μ l ethanol) was incubated with 20 β -HSD (44 μ g) in the presence of various concentration of cofactor in 1.0 ml of 50 mM KPB (pH 7.4) for 30 min at 37°C.

Correlation coefficients for Lineweaver-Burk plots are r=0.9974 (β -NADPH), r=0.9960 (α -NADPH), r=0.9922 (β -NADH) and r=0.9972 (β -3'-NADPH).

補酵素との水素原子授受に関する立体特異性

[4-¹⁴C]17 α -hydroxyprogesterone (16.7 Bq, 1000 dpm/20 nmol/10 μ l ethanol) を基質として、酵素反応により作成した[4-Pro-R-³H]NADPH または [4-Pro-S-³H]NADPH (およそ62.9 KBq) を補酵素とし、50 mM KPB 中で37°C, 1 hrのインキュベーションを行い、代謝物中の³Hの放射能を比較した。また、¹⁴Cの放射能より20 β -HSDの比活性、および代謝物中の³Hの放射能を測定し、その結果をTable 4-IV.に示した。また、³Hの放射能は反応生成ステロイドnmolあたりのdpm数で表示した。

20 β -HSD活性は、補酵素として[4-Pro-S-³H]NADPH を用いた場合には [4-Pro-R-³H]NADPH の場合に比べおよそ35%の活性低下が認められた。また [4-Pro-S-³H]NADPH を補酵素とした場合の代謝物中の³Hの dpm数は [4-Pro-R-³H]NADPHの場合に比べおよそ20倍であり、両者の間に有意な差が認められ、このときの ³H/¹⁴C はおよそ120で十分に大きいことから、20 β -HSDはその還元反応に

補酵素 β -NADPH のニコチンアミド基の 4-Pro-S 水素を選択特異的に利用することを認めた。

Table 4-IV. Stereospecificity of Hydrogen Transfer from NADPH to $17\alpha, 20\beta$ -Dihydroxy-4-pregnen-3-one

Cofactor	Exp. No.	20β -HSD activity (nmol/min/mg)	$^3\text{H}/\text{nmol}^{\text{a)}$ (dpm)	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$
[4-Pro-R- ^3H] NADPH	1	3.56	135.2	3.1
	2	3.93	122.4	2.5
	3	3.95	112.6	2.8
	mean	3.81	123.4	2.8
		± 0.13	± 6.5	± 0.2
[4-Pro-S- ^3H] NADPH	1	2.64	1816.4	106.2
	2	2.22	2497.4	133.1
	3	2.39	2491.2	122.8
	mean	2.42	2268.3	120.7
		± 0.12	± 226.0	± 7.8

a) dpm of tritium per nmol product of $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one

各種ステロイド代謝酵素阻害物質の阻害効果

ステロイドホルモン生合成に関与している一連の水酸化酵素、側鎖切断酵素および脱水素酵素に対する阻害物質として知られている各種化合物をとりあげ、ブタ精巣 20β -HSD に及ぼす阻害効果を検討した。なお、各種阻害物質の酵素反応溶液への添加は試料のエタノール溶液を反応溶液 1.0 ml 中に $5\mu\text{l}$ までとし、基質溶媒添加量 ($10\mu\text{l}$) を加えて酵素反応溶液のエタノール濃度が 1.5% (v/v) を越えないように調製した。各種阻害物質の 20β -HSD 活性に及ぼす阻害効果を Table 4-V. に示したが、その結果 20β -HSD は spironolactone, SU 10603 およ

び cyanoketone により比較的強く阻害され、その50%阻害濃度 (IC_{50}) はそれぞれ26, 27および44 μM であった。これらの阻害物質による阻害効果はいずれも競合的阻害であり、その阻害定数 (K_i) は spironolactone に対して11.2 μM (Fig.4-10), SU 10603 に対して22.3 μM および cyanoketone に対して42.8 μM であった。また, ketoconazole も高濃度で20 β -HSD活性の阻害を示し、その IC_{50} は0.1 mMであった。

Table 4-V. Effect of Various Inhibitors on
20 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Activity
from Neonatal Pig Testes

Addition	20 β -HSD activity (% of inhibition)	
	10 μM^a	50 μM^a
None ^{b)}	0	0
Spironolactone	27.2	62.5
SU 10603	16.2	73.4
Cyanoketone	17.8	52.4
Ketoconazole	10.9	34.3
Metirapone	1.6	23.9
SKF 525A	0.8	10.5
Aminoglutethimide	2.2	6.9
o,p'DDD	0	9.9
SU 8000	0	6.0

a) Final concentration of inhibitor b) Enzyme activity of 20 β -HSD without inhibitor was 5.1 nmol/min/mg protein.

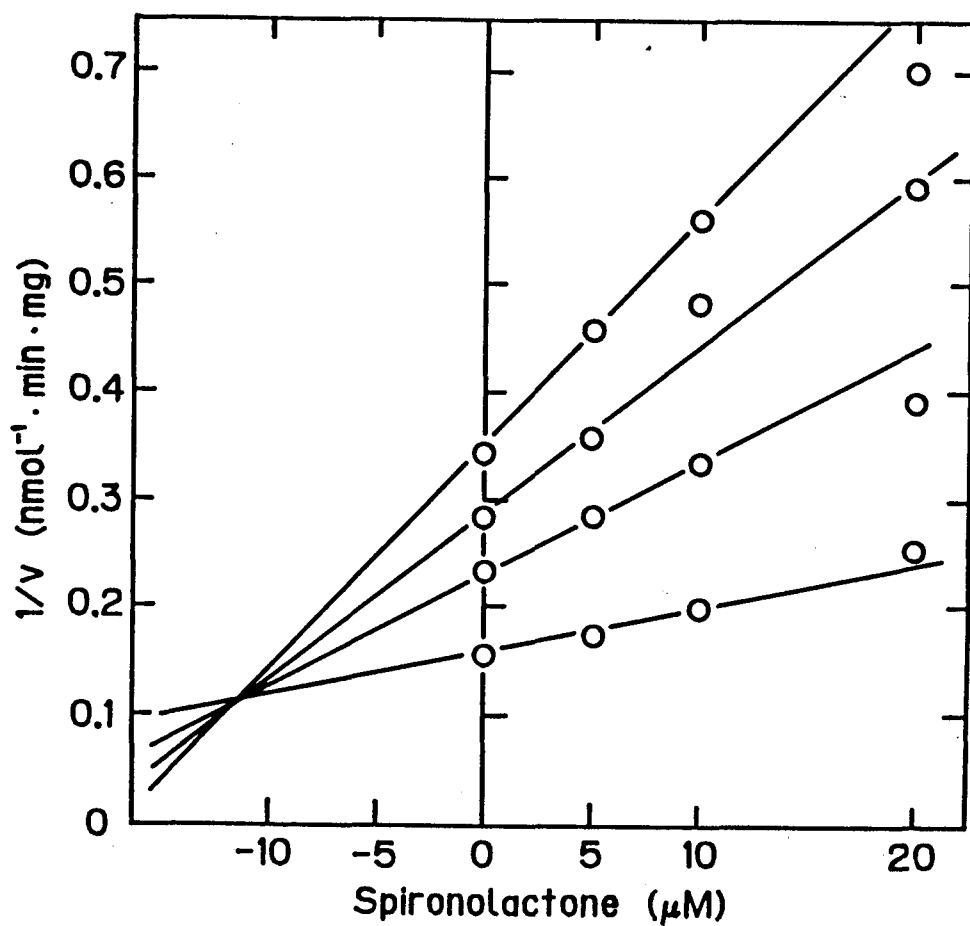


Fig.4-10. Inhibition of 20β -HSD Activity by Spironolactone

$[4-^{14}\text{C}]17\alpha$ -Hydroxyprogesterone (2.5 , 3.3 , 5.0 and $10 \mu\text{M}$) was incubated under a standard condition without or with spironolactone (5 , 10 and $20 \mu\text{M}$) and the result was expressed with the Dixon plot.

第三節 20 β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素の触媒する酸化反応における酵素化学的性質

酸化反応の確認

[4- 14 C]17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (370 Bq/20 nmol/10 μ l ethanol) を基質とし, 20 β -HSD (44 μ g) を β -NADP $^+$ (250 nmol) 存在下37 $^{\circ}$ C, 30 minインキュベーションすると, 代謝物として[4- 14 C]17 α -hydroxyprogesterone が生成することをTLC上で確認した. また, 20 β -HSD非存在下では全く17 α -hydroxyprogesterone を生成しないことから20 β -HSDが他の一般的な酸化還元酵素と同様に還元反応のみならず酸化反応も触媒することを認めた. さらに, [4- 14 C]20 β -hydroxy-4-pregnen-3-one (370 Bq/20 nmol /10 μ l ethanol) を基質とし, 20 β -HSD (44 μ g) を β -NADP $^+$ (250 nmol) 存在下37 $^{\circ}$ C, 30 minインキュベーションした場合には, 同様に [4- 14 C]progesterone の生成が確認された (Fig.4-11.-A, B). しかしながら, 両者間の生成量には明らかに差が認められ 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one を基質とした反応の 17 α -hydroxyprogesterone の生成量は 20 β -hydroxy-4-pregnen-3-one を基質とした反応の progesterone の生成量より極端に少なかった. また, この現象は分光光学的にも観察され, β -NADP $^+$ (250 nmol) 存在下 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (20 nmol/10 μ l ethanol) を基質とした反応は, 20 β -hydroxy-4-pregnen-3-one (20 nmol/10 μ l ethanol) を基質とした反応に比較して340 nm, 30 minの測定で, わずかな吸光度変化が得られただけであった (Fig.4-11.-C, D).

一方, [4- 14 C]17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one および [4- 14 C]20 β -hydroxy-4-pregnen-3-one をそれぞれ基質とした場合に, 20 β -HSD量に対する酵素活性の関係を測定した結果をFig.4-12. に示した. 20 β -HSDが触媒する酸化反応において, 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one を基質とした反応は, 20 β -hydroxy-4-pregnen-3-one を基質にした場合に比べ, およそ1/50量の酵素添加で酵素活性を示した. また, 20 β -HSD酵素タンパク質 8.7×10^{-4} mgで反応は

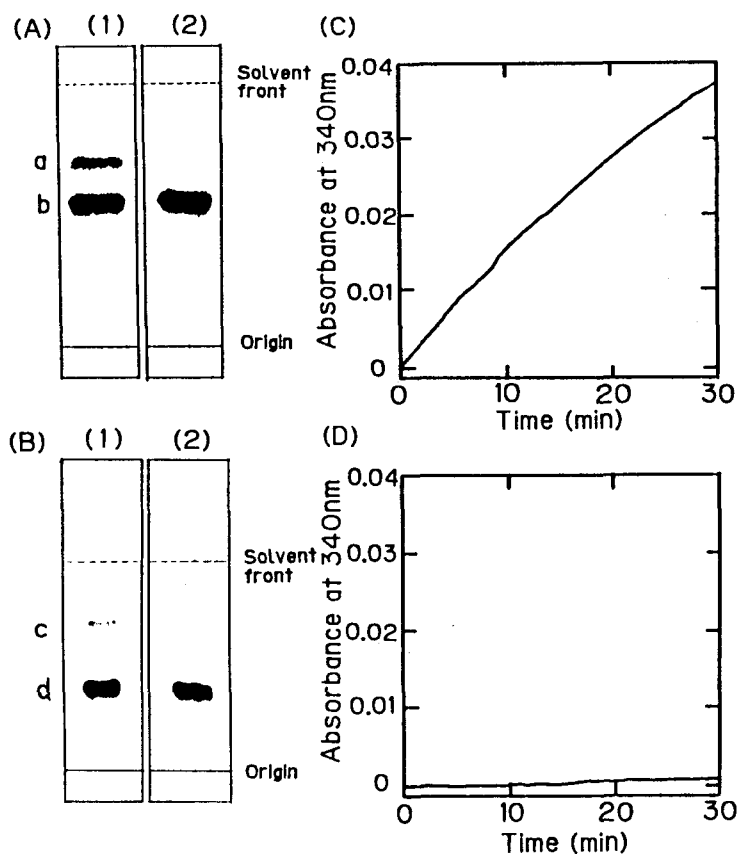


Fig.4-11. Reverse Catalytic Activities of 20β-HSD: Detection of the Metabolites on the TLC and Time Course of the Reaction

[4-¹⁴C]20β-hydroxy-4-pregnen-3-one (A) or [4-¹⁴C]17α,20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one (B) (370 Bq/20 nmol/10 μl ethanol) was incubated with β-NADP⁺ (250 nmol) in the presence (1) or absence (2) of 20β-HSD (44 μg) in 1.0 ml of 50 mM KPB (pH 7.4) for 30 min at 37°C. TLC was carried out using a silicagel plate (Kodack 13181), and developed with benzene/acetone (8/2, v/v). Radioactive metabolites detected by radioautographies are indicated as dark spots. Assigned spots are: progesterone (a), 20β-hydroxy-4-pregnen-3-one (b), 17α-hydroxyprogesterone (c) and 17α,20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one (d).

20β-hydroxy-4-pregnen-3-one (C) or 17α,20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one (D) (20 nmol/10 μl ethanol) was incubated in the quartz cuvette (1 cm path, 1.0 ml) with purified 20β-HSD (89 μg) in the presence of β-NADP⁺ (250 nmol) in 1.0 ml of 50 mM KPB (pH 7.4) at 37°C. The absorbance at 340 nm was continuously monitored over 30 min.

飽和に達し、タンパク質添加量が 20β -HSD活性と比例する領域は $1.09 \times 10^{-4} \text{ mg}$ - $4.36 \times 10^{-4} \text{ mg}$ と非常に小さかった。またそのために、この条件下での 17α , 20β -dihydroxy-4-pregnen-3-one を基質とした定量的な酵素活性測定は困難であることを認めた。

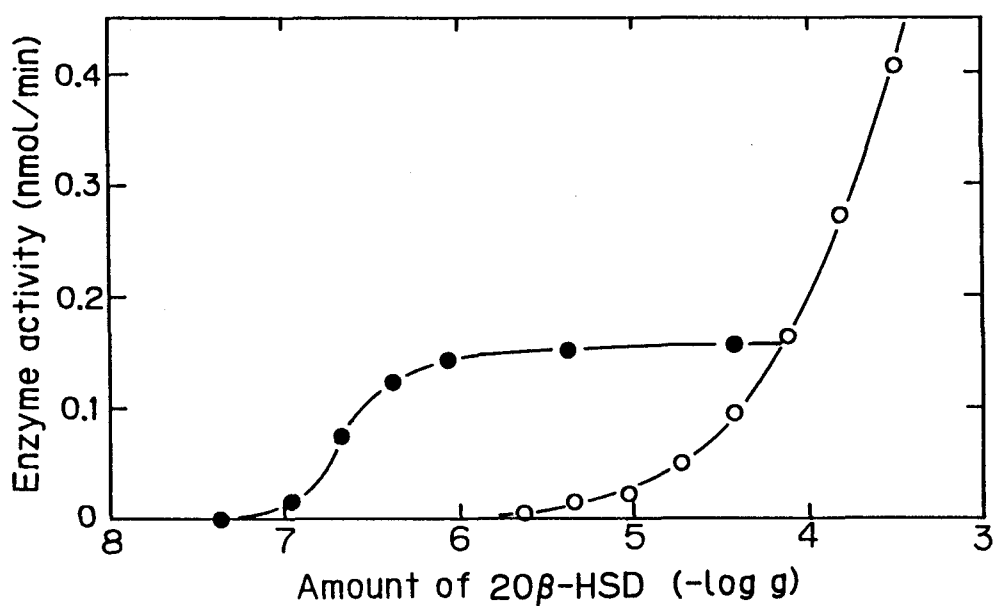


Fig.4-12. Reverse Catalytic Reaction (Oxidation) of 20β -HSD as a Function of the Amount of Enzyme

$[4-^{14}\text{C}]17\alpha, 20\beta$ -Dihydroxy-4-pregnen-3-one (●) or $[4-^{14}\text{C}]20\beta$ -hydroxy-4-pregnen-3-one (○) ($370 \text{ Bq}/20 \text{ nmol}/10\mu\text{l}$ ethanol) was incubated with various amount of purified 20β -HSD in the presence of β -NADP⁺ (250 nmol) in 1.0 ml of 50 mM KPB (pH 7.4) for 30 min at 37°C .

酸化反応と還元反応との活性化エネルギーの比較

20 β -HSDが触媒する酸化・還元両反応を比較する目的で活性化エネルギーを測定した。

還元反応では [4- 14 C]17 α -hydroxyprogesterone (370 Bq/20 nmol/10 μ l ethanol) および [4- 14 C]progesterone (370 Bq/20 nmol/10 μ l ethanol), また酸化反応では [4- 14 C]20 β -hydroxy-4-pregnen-3-one (370 Bq/20 nmol/10 μ l ethanol) を基質とした反応について検討した。[4- 14 C]17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one については, 活性測定が困難であるため行わなかった。

15 $^{\circ}$ C - 45 $^{\circ}$ Cで基質, 20 β -HSD (44 μ g), β -NADPHまたは β -NADP $^{+}$ (250 nmol) 存在下, 30 minインキュベーションし, 20 β -HSDの比活性から Lineweaver-Burk のプロットにより各温度における V_{\max} 値を算出した。添加酵素量を全て一定とし, V_{\max} 値を反応速度定数 (k) に近似し, 縦軸に $\log V_{\max}$, 横軸に絶対温度の逆数を取り Arrhenius プロットを作成した (Fig.4-13.). また, Arrheniusプロットより算出した各反応の活性化エネルギーの値をTable 4-VI. に示した。

基質として, 20 β -hydroxy-4-pregnen-3-one を用いた酸化反応の活性化エネルギーは, その逆反応である progesterone を用いた還元反応より小さく, pH 7.4の条件下ではステロイドの酸化反応の方が還元反応に比べ, より小さなエネルギーで反応が進むことが示唆された。さらに, 17 α -hydroxyprogesterone および progesterone を用いた両還元反応を比較すると, 17 α -hydroxyprogesterone を用いた反応の活性化エネルギーの方が小さいことを認めた。

また, 各反応の Arrhenius プロットは $r=0.9834-0.9950$ で何れも高い直線性を示した。

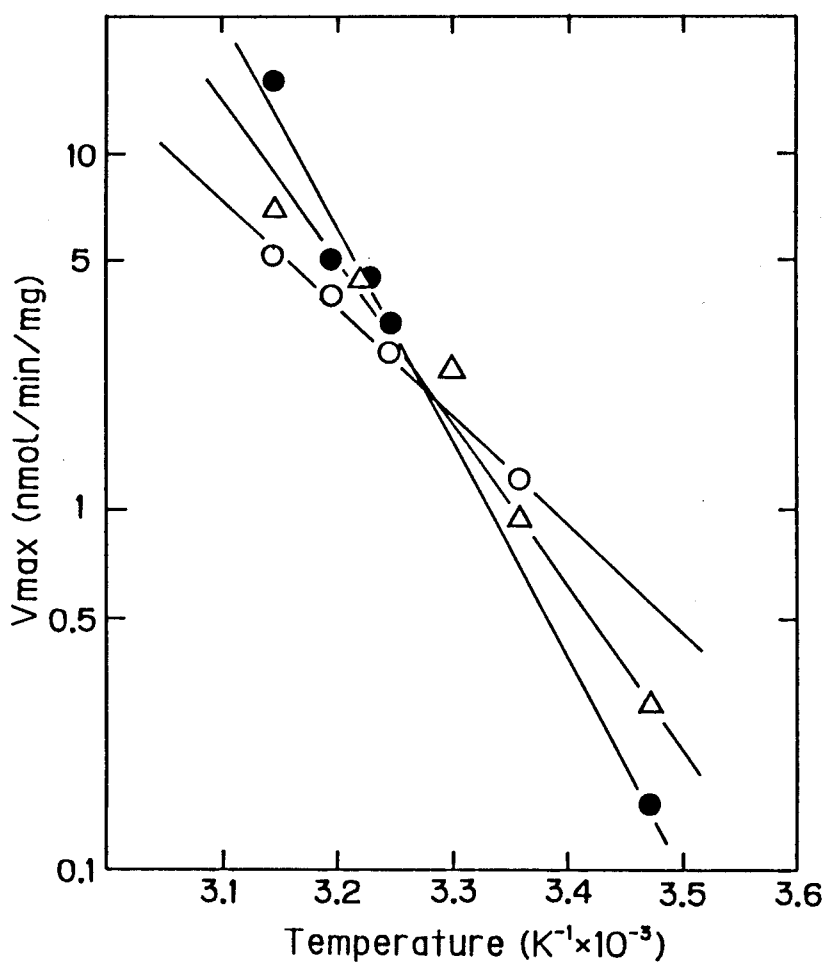


Fig.4-13. Arrhenius Plots of 20β -HSD Reactions

Arrhenius plots were obtained from using progesterone (●) and 17α -hydroxyprogesterone (Δ) for the reduction reaction, and 20β -hydroxy-4-pregnen-3-one (○) for the oxidation reaction of 20β -HSD as the substrate.

Each $[4-^{14}C]$ steroid (2–10 nmol) was incubated with 20β -HSD ($22\mu g$) in the presence of 250 nmol of β -NADPH (on the reduction reaction) or β -NADP⁺ (on the oxidation reaction) in 1.0 ml of 50 mM KPB for 30 min at various temperature between 15°C and 45°C. The reaction rate constants were approximated from the rate of Vmax, and the correlation coefficients of each plot are: $r = -0.9936$ (progesterone), $r = -0.9950$ (20β -hydroxy-4-pregnen-3-one) and $r = -0.9834$ (17α -hydroxyprogesterone).

Table 4-VI. Kinetic Parameters and Activation Energies of 20 β -HSD

Substrate	Cofactor	K _m (μ M)	V _{max} (nmol/min/mg)	A.E. ^{a)} (Kcal/mol)
20 β -hydroxy-4-pregnen-3-one	β -NADP ⁺	31.4	11.1	13.8
progesterone	β -NADPH	1.54 ^{b)}	4.43 ^{b)}	27.0
17 α -hydroxyprogesterone	β -NADPH	9.42 ^{b)}	9.62 ^{b)}	20.0

a) activation energy; Activation energy was estimated from Arrhenius plots.

b) Data were quoted from substrate specificity which previously described.

Various concentration of [4-¹⁴C]20 β -hydroxy-4-pregnen-3-one (370 Bq/10 μ l ethanol) were incubated in the presence of NADP⁺ (250 nmol) in 1.0 ml of 50 mM KPB (pH 7.4) at 37°C, 30 min. The Michaelis constant (K_m) and maximum velocity (V_{max}) are obtained by Lineweaver-Burk plot. The correlation coefficient of the plot is 0.999. For activation energies, various concentration of [4-¹⁴C]substrates were incubated in the presence of NADP⁺ or NADPH (250 nmol) in 50 mM KPB (pH 7.4) at various temperature (15-45°C), 30 min, and the V_{max} values were obtained by Lineweaver-Burk plots with correlation coefficients from 0.956 to 0.999.

分光光学的酵素活性測定の基礎的検討

20 β -HSDが触媒する酸化反応は補酵素として主に安定な酸化型ピリジンヌクレオチド (β -NADP⁺) を用い、 β -NADP⁺から β -NADPHへの変換に基づく340 nmの吸光度変化を記録することにより酵素活性測定を試みた。

まず、20 β -hydroxy-4-pregnen-3-one (50 nmol/10 μ l ethanol) を基質とし、20 β -HSD (77 μ g) を用いた場合に、インキュベーション時間 (反応開始後0.5-30 min) に対する340 nmの吸収変化を連続的に測定した結果を Fig.4-14.-(A)に示した。340 nmにおける吸収変化は、測定時間 0-5 minにおいて高い直線性を示すことを認めた。また、酵素反応開始後3 minにおける吸光度変化の傾きから計算した20 β -HSD活性と酵素添加量との関係をFig.4-14.-(B)に示した。

0-184.8 μ gのタンパク量変化に対して20 β -HSD活性は高い直線性 ($r=0.9990$)を示すことを認めた。

さらに、以上の条件下での酵素活性は、放射能標識ステロイド [4- 14 C]20 β -hydroxy-4-pregnen-3-one (370 Bq/50 nmol/10 μ l ethanol) を基質とし、 β -NADP $^{+}$ (250 nmol) を補酵素として測定した20 β -HSD活性とほぼ等しい値であることを認めた。

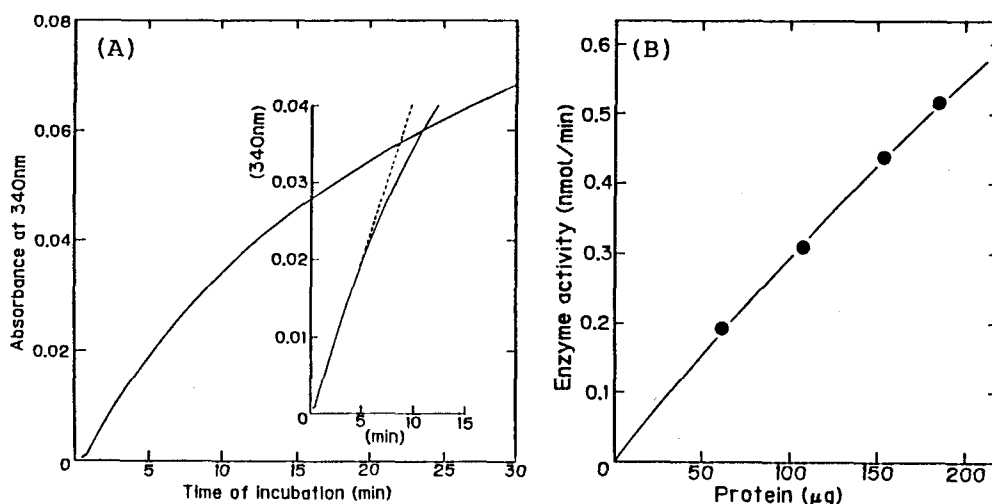


Fig.4-14. Time Course (A) and the Activity as a Function of the Amount of Protein (B) for Oxidation of 20 β -Hydroxy-4-pregnen-3-one to Progesterone Catalyzed by 20 β -HSD in Spectrophotometrical Assay

(A): 20 β -Hydroxy-4-pregnen-3-one (50 nmol/10 μ l ethanol) was incubated with 20 β -HSD (77 μ g) in a quartz cuvette (1 cm path, 1 ml) in the presence of β -NADP $^{+}$ (250 nmol) in 1.0 ml of 50 mM KPB (pH 7.4) for 0 to 30 min at 37 $^{\circ}$ C. The absorbance at 340 nm was continuously monitored. (B): 20 β -hydroxy-4-pregnen-3-one (50 nmol/10 μ l ethanol) was incubated with several amounts of 20 β -HSD in a cuvette in the presence of β -NADP $^{+}$ (250 nmol) in 1.0 ml of 50 mM KPB (pH 7.4) at 37 $^{\circ}$ C.

The change in absorbance at 340 nm versus time was continuously monitored. The correlation coefficient is obtained at $r=0.9990$.

至適pH

pH 5.5-8.5は KPB (100 mM), pH 8.5-10.5は Tris-HCl buffer (100 mM) を用い酵素反応系のpHの変化に基づく 20β -HSDの酸化触媒活性変化を Fig.4-15.に示した. 酵素活性は β -NADP⁺ (250 nmol) を補酵素とし, 20β -hydroxy-4-pregnen-3-one (50 nmol/10 μ l ethanol) を基質として分光光学的方法により測定した. 20β -HSD酸化触媒活性はpH 7.5付近で最大となり, このときの比活性はpH 6.0における比活性のおよそ2倍の値であった.

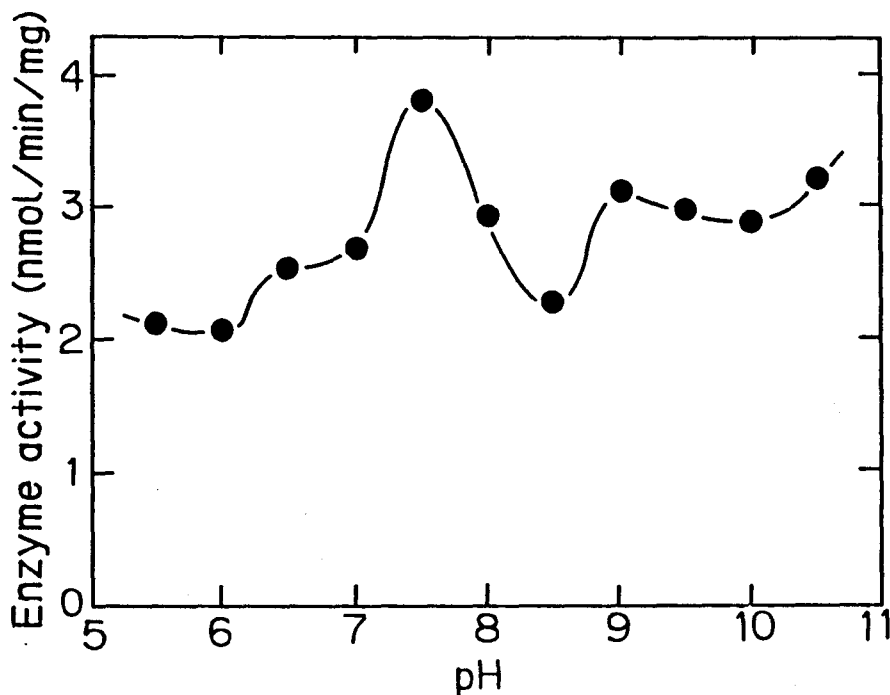


Fig.4-15. Optimum pH for Oxidation Reaction of 20β -HSD

Incubation buffers used were 100 mM KPB (pH 5.5-8.5) and 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5-10.5). 20β -Hydroxy-4-pregnen-3-one (50 nmol/10 μ l ethanol) was incubated with 20β -HSD (77 μ g) in a quartz cuvette (1 cm path, 1 ml) in the presence of β -NADP⁺ (250 nmol) in 1.0 ml of various pH's buffer systems described above at 37°C. The change in absorbance at 340 nm versus time was continuously monitored.

基質特異性

progesterone または pregnenolone の20位が α または β 位に水酸化された誘導体8種 (いずれも50 nmol/10 μ l ethanol) を基質とし, 1.0 mlの50 mM KPB (pH 7.4) 中20 β -HSD (77 μ g), β -NADP⁺ または β -NAD⁺ (250 nmol) 存在下, 37℃で分光光学的測定法により20 β -HSD酸化触媒活性を測定した結果をTable 4-VII. に示した.

20 β -HSDは, 通常基質として用いる 20 β -hydroxy-4-pregnen-3-one の他, 20 β -hydroxy-5-pregnen-3 β -ol (20 β -hydroxy-4-pregnen-3-oneを基質とした場合に対し, 38.3%), 20 α -hydroxy-5-pregnen-3 β -ol (同, 22.1%) および 17 α ,20 α -dihydroxy-5-pregnen-3 β -ol (同, 8.7%) を基質とすることができたが, その他のステロイドには酵素活性は認められなかった. また, 20 α -hydroxy-4-pregnen-3-one を基質とした反応については分光光学的方法による測定のほかに, 同条件下で37℃, 30 minインキュベーションした代謝物をTLC上で分離し, UVランプ(254 nm)下でステロイドの検出を行ったが20位が酸化されたprogesteroneは検出されず, 20 β -HSDの基質とはならないことを確認した.

さらに β -NADP⁺ (250 nmol) を補酵素とし, [4-¹⁴C]20 β -hydroxy-4-pregnen-3-one (5–25 μ M) を基質として, Lineweaver-Burk のプロットより算出した20 β -HSDの 20 β -hydroxy-4-pregnen-3-one に対する K_m 値は31.4 (μ M), V_{max} 値は11.1 (nmol/min/mg), $r=0.9996$ であった.

Table 4-VII. Substrate Specificity for Oxidation Reaction of 20 β -HSD

Substrate	(Cofactor)	Activity ^{a)} (nmol/min/mg)	%
20 β -hydroxy-4-pregnen-3-one	(NADP ⁺)	3.13	100
	(NAD ⁺)	2.25	71.8
20 α -hydroxy-4-pregnen-3-one	(NADP ⁺)	N.D. ^{b)}	—
20 β -hydroxy-5-pregnen-3 β -ol	(NADP ⁺)	1.20	38.3
20 α -hydroxy-5-pregnen-3 β -ol	(NADP ⁺)	0.69	22.1
17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one	(NADP ⁺)	N.D.	—
17 α ,20 α -dihydroxy-4-pregnen-3-one	(NADP ⁺)	N.D.	—
17 α ,20 β -dihydroxy-5-pregnen-3 β -ol	(NADP ⁺)	N.D.	—
17 α ,20 α -dihydroxy-5-pregnen-3 β -ol	(NADP ⁺)	0.27	8.7

a) Each substrate (50 nmol/10 μ l ethanol) was incubated in the quartz cuvette (1 cm path, 1 ml) with purified 20 β -HSD (77 μ g) in the presence of NADP⁺ or NAD⁺ (250 nmol) in 1.0 ml of 50 mM KPB (pH 7.4) at 37°C, and the change in absorbance at 340 nm versus time was continuously monitored.

b) Not detected: The enzyme activity was below the limit of detection with spectrophotometrical assay.

補酵素要求性

補酵素として、 β -NADP⁺ (0.06–960 μ M), β -3'-NADP⁺ (30–1920 μ M) および β -NAD⁺ (60–960 μ M) を用い、20 β -hydroxy-4-pregnen-3-one (50 nmol/10 μ l ethanol) を基質として分光光学的方法により20 β -HSD活性を測定し、酸化反応における補酵素要求性について検討した結果をFig.4-16.に示した。

20 β -HSDは実験に用いた各種ピリジンヌクレオチド中、 β -NADP⁺を最も低い濃度で補酵素とすることができ、補酵素となり得る濃度範囲は大きいことを認めたが、その他に β -3'-NADP⁺、 β -NAD⁺も比較的高濃度の添加により補酵素となり得た。とくに、60 μ M以上の濃度範囲では β -3'-NADP⁺を反応溶液中に添加した場合の方が β -NADP⁺を添加した場合より高い酵素活性が得られた。

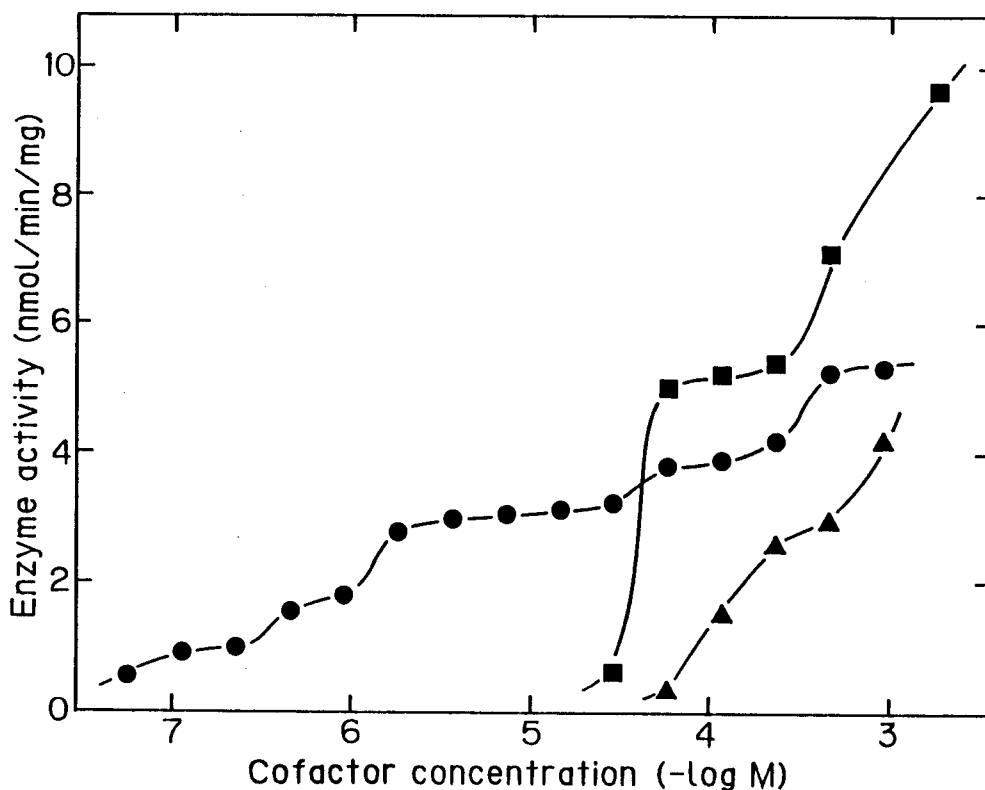


Fig.4-16. Cofactor Requirement for Oxidation Reaction of 20 β -HSD

Cofactors used are β -NAD⁺ (●), β -3'-NAD⁺ (■) and β -NAD⁺ (▲). Enzyme assays were carried out in the quartz cuvette (1 cm path, 1 ml) with 20 β -Hydroxy-4-pregnen-3-one (50 nmol/10 μ l ethanol) and 20 β -HSD (77 μ g) in the presence of various concentration of cofactors in 1.0 ml of 50 mM KPB (pH 7.4) at 37°C. The change in absorbance at 340 nm versus time was continuously monitored.

第四節 考察

20 β -HSDと20 α -HSDは、いずれも精巣サイトソール画分に存在し、同じ基質ステロイドのC₂₀位のカルボニル基の還元を触媒する酵素であり類似性が考えられる。20 β -HSD活性はさらに、動物以外で原核細胞種である *S. hydrogenans* 中に存在するが、これらの酵素との酵素化学的諸性質の比較検討を行った。

まず20 β -HSD還元触媒活性は、タンパク質量、インキュベーション時間に対して十分な直線性が認められ、反応溶液中のエタノール量、およびKPBの濃度などを含め定量的な測定が可能であることを認めた。

本酵素は比較的基質特異性が低く、17 α -hydroxyprogesterone に対して基質特異性が高いブタ精巣由来の20 α -HSD³⁾との違いが明らかになった。また、*S. hydrogenans* 由来の20 β -HSDが、副腎皮質ホルモン系である cortisone, cortisol, corticosterone などのグルコルチコイドを基質としやすい²³⁾のに対し、ブタ精巣の20 β -HSDはこれら11位にカルボニルや水酸基を持つステロイドは全く基質としないことから基質特異性に関して大きく異なっていることを明らかにした。また本酵素は 17 α -hydroxyprogesterone に対して最も高い V_{max}値を示したが同時にK_m値も大きく、逆に V_{max}/K_m 値は progesterone が最も大きいことを認め、ブタ精巣20 β -HSDは生理的な基質として progesterone を要求することも考えられる。

補酵素要求性に関し、精巣20 β -HSDは β -NADHや他のピリジンヌクレオチドに対して β -NADPHを最も補酵素としやすいことが明らかになり、*S. hydrogenans* 由来の20 β -HSDが特異的に β -NADHを要求し β -NADPHは非常に効果が弱い報告²⁴⁾との違いが示唆されたが、ラット、¹⁾ ブタ³⁾およびウシ⁴⁾精巣中に局在する20 α -HSDはいずれも β -NADPHを最も要求し、精巣20 β -HSDとの類似性が認められた。また、 β -3'-NADPH および α -NADPHなどは生理的なピリジンヌクレオチドではないが、高濃度添加により補酵素となり得た。しかし、 α -NADHは補酵素となり得ず、 β -NADHは補酵素とはなり得るが非常にK_m値が大きいことより、リン酸の存在が重要であること、また β -3'-NADPHのようにリン

酸が結合していても3'の位置では補酵素となりにくく、2'のリン酸が酵素との結合に重要であると考えられる。

20 β -HSDの至適pHは使用する補酵素により若干異なり、 β -NADPH、 β -NADHに対してそれぞれ5.5、6.5であった。また、 β -NADHを用いた場合に比較的幅広い至適pH域が認められたが、 β -NADPHを用いた場合には常に β -NADHより高い活性が得られ、これらの結果はウシ精巣の20 α -HSDに関する報告⁴⁾と類似していた。また、至適pHが弱酸性であり、基質 17 α -hydroxyprogesterone の還元速度が反応系のH⁺濃度に依存していた。

20 β -HSDが触媒する還元反応では、補酵素上のニコチンアミド基の4位に存在する水素原子を基質ステロイドのC₂₀位に転移するが、このとき使われる水素原子の補酵素上の立体特異性はこの種のステロイド代謝酵素においては厳密であると考えられている。本実験結果より、ブタ精巣20 β -HSDは β -NADPHの4-pro-S水素原子を17 α -hydroxyprogesteroneの還元を利用し、 β -NADHの4-pro-S水素を用いる *S. hydrogenans* の20 β -HSDと同じ立体選択特異性⁵⁶⁾を持つことが判明した。4-pro-S水素を還元を利用するその他の酵素としては、ヒト胎盤⁵⁷⁾およびブタ精巣⁵⁸⁾の17 β -HSD、*Pseudomonas testosteroni*,⁵⁷⁾ ニワトリ・トサカ⁵⁹⁾およびラット性嚢⁶⁰⁾由来の3 α -HSD、*P. testosteroni* 由来の3 β -HSD⁶¹⁾が知られている。一方、ラット卵巢⁶²⁾およびブタ精巣⁶³⁾20 α -HSD、ラット肝臓3 α -HSD⁶⁴⁾は4-pro-R水素原子を還元を利用する。20 α -HSDと20 β -HSDとではその還元を利用される補酵素上の水素原子が異なり、4-pro-S位の水素原子は α 面に転移し、4-pro-R位の水素原子は β 面に転移するとする Akhtar らの報告⁶⁵⁾と一致した。また、反応系に加えた [4-³H]NAD⁺ 中の³Hの放射能に対し、代謝物中の³Hの放射能が極端に低く、かつ [4-pro-R-³H]NADPH に比べ [4-pro-S-³H]NADPH を補酵素とした場合におよそ35%の活性低下が認められたが、この現象はいずれも同位体効果による影響と考えられ、本酵素反応において補酵素上の水素原子転移が律速段階になっていると考えられる。

代表的なステロイド代謝酵素阻害物質による阻害効果において、20 β -HSD活性はアルドステロンの拮抗薬として知られる spironolactone,⁶⁶⁾ チトクロー

ム P-450 (17 α -ヒドロキシラーゼ/C₁₇₋₂₀-リアーゼ) および 3 β -HSDの阻害物質として知られる, それぞれ SU 10603⁶⁷⁾ および cyanoketone⁶⁸⁾ により 10⁻⁵M オーダーで阻害効果が認められた. spironolactone および cyanoketone はともにその構造中にステロイド骨格を有している化合物であり, 特に spironolactone は17位からの側鎖がラクトン環になっているが基本的には pregnane 骨格であり17 α 位にCH₂基が配位している. また, cyanoketone は androstene 骨格であるが17 α 位にCH₃基を有するステロイドであり, とともに20 β -HSDの基質である 17 α -hydroxyprogesterone との競合阻害が考えられる. また, チトクローム P-450の関与するオキシゲナーゼすべてに阻害を示すといわれる ketoconazole⁶⁹⁾ も10⁻⁴Mオーダーでは20 β -HSD活性を阻害することが観察されが, チトクローム P-450 (17 α -ヒドロキシラーゼ/C₁₇₋₂₀-リアーゼ)に対する阻害効果⁷⁰⁾と比較すると100倍以上の高濃度であった.

ブタ精巣20 α -HSDは逆反応(酸化反応)を触媒しないが,³⁾ 20 β -HSDは酸化型ピリジンヌクレオチド存在下で, 20 β 位に水酸基を有するステロイドである 20 β -hydroxy-4-pregnen-3-one および 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one に対して酸化反応を触媒した. しかし, 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one に対する逆反応は 20 β -hydroxy-4-pregnen-3-one と比較して代謝物生成量が少ないことを認めた. また, 精巣20 β -HSDは非常に少量の酵素により鋭敏に 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one の酸化を触媒したが, 酵素量と活性との比例はごく範囲の狭い領域でのみ得られ, また, 酵素活性が飽和に達した時でもその代謝量は 20 β -hydroxy-4-pregnen-3-one を基質とした場合に比べ非常に少なかった. この結果より, 20 β -HSDが触媒する 17 α -hydroxyprogesterone と 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one との酸化還元反応の平衡は, 還元反応の方向に大きく傾いていることが考えられる. 一方, progesterone と 20 β -hydroxy-4-pregnen-3-one との酸化還元反応において, 逆(酸化)反応の活性化エネルギーは, 還元反応のおよそ半分であり, 20 β -HSDが触媒する逆反応は発エルゴン反応であることが示唆された.

20 β -HSD酸化反応は 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one を基質とした場

合に、通常の酵素量では直ちに反応が飽和に達してしまうが、 20β -hydroxy-4-pregnen-3-one を基質とすることにより分光光学的測定法で、タンパク質量 $0-184.8\mu\text{g}$ 、 $0-5$ 分間の測定に対し高い直線性が認められ、かつ、放射能標識ステロイドを基質とした酵素活性測定値とほぼ一致することから、 20β -HSD酸化触媒活性は分光光学的方法を用いた酵素活性測定が可能であることを認めた。

精製 20β -HSDは β -NADP⁺存在下 20β -hydroxy-4-pregnen-3-oneを基質とする酸化触媒活性を示したが、 20α -hydroxy-4-pregnen-3-oneは基質とならなかった。一方、酵素活性は 20β -hydroxy-4-pregnen-3-oneよりかなり低いが、 20β -HSDは5-en-3 β -ol系ステロイドを用いた場合にのみ 20α -ヒドロキシステロイドを基質とする結果が得られ、精製 20β -HSDがC₂₀位以外の酸化還元反応を触媒している可能性も考えられる。

小括

- 1) 還元反応における 20β -HSD活性は、 $[4-^{14}\text{C}]17\alpha$ -hydroxyprogesterone、および β -NADPHを用い、タンパク質量、インキュベーション時間に対して十分な直線性が認められ、定量的な活性測定が可能であることを認めた。
- 2) 20β -HSD活性に対して反応系のイオン強度は顕著な影響を与えないことを認めた。
- 3) 20β -HSDの還元反応における至適pHは反応に使用する補酵素により異なり、 β -NADPHの場合5.5、 β -NADHの場合6.0であった。また、 20β -HSDは酸性側ではpH4.5-5.0、30 minで酵素活性が消失しアルカリ側では比較的安定であることを認めた。
- 4) 20β -HSDは各温度30 minの処理に対して45℃まで耐性があり、50℃、4 hrおよび55℃、30 minで完全に失活した。また、至適温度は45℃であることを認めた。

- 5) 重金属イオン Cu^{2+} , Hg^{2+} により強く酵素活性が阻害された。またSH化合物添加による著しい酵素活性変化は認められず、この点で 20α -HSDと異なった。
- 6) 20β -HSDの基質として 17α -hydroxyprogesterone, progesterone, pregnenolone, 11-deoxycorticosterone がなり得ることを認めたが, cortisone, cortisol, corticosterone は基質とならなかった。また、最も高い V_{\max} 値は 17α -hydroxyprogesterone に認められたが同時に K_m 値も大きく、 V_{\max}/K_m 値は progesterone が最も大きいことを認めた。
- 7) 補酵素には β -NADPH が最適であり、 β -NADH, α -NADPH, β -3'-NADPH なども補酵素となり得たが、 α -NADHは補酵素とならないことを認めた。
- 8) 20β -HSDは、その還元反応において、還元型ピリジンヌクレオチド中のニコチンアミド基の4-pro-S水素を利用することを認めた。
- 9) 20β -HSDは代表的なステロイド代謝酵素阻害物質の中で、spironolactone, SU 10603 および cyanoketone により 10^{-5}M オーダーで阻害されることを認めた。
- 10) ブタ精巣 20β -HSDは還元反応の他に酸化反応も触媒することを認めた。
- 11) 20β -HSDが触媒する酸化反応と還元反応とで活性化エネルギーを比較したところ酸化反応の値がより小さいことを認めた。
- 12) 20β -hydroxy-4-pregnen-3-one を基質とし、 β -NADP⁺ を補酵素として β -NADPH 生成に伴う340 nmの吸収変化を測定することにより 20β -HSD活性の定量的な測定が可能であることを認めた。
- 13) 酸化反応の至適pHは7.5に認められ、アルカリ側ではpH 10.5まで比較的高い活性が認められた。
- 14) 酸化反応における補酵素として、 β -NADP⁺をはじめ β -NAD⁺, β -3'-NADP⁺ も補酵素となり得ることを認めた。
- 15) 酸化反応における基質は 20β -hydroxy-4-pregnen-3-one が適しており、 17α , 20β -dihydroxy-4-pregnen-3-one も基質となり得るがタンパク質量変化に対する直線領域が小さく、実験系の基質として適さないことを認めた。

第五章 幼若ブタ精巣 20β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素精製標品が触媒する $3\alpha/\beta$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素活性⁷¹⁾

第四章ではブタ精巣 20β -HSDに対する種々の酵素化学的性質の検討を行ったが、これらの結果より本酵素は既知の *Streptomyces hydrogenans* 由来の酵素およびブタ精巣中の 20α -HSDとはその性質がかなり異なることを明らかにした。また、精巣 20β -HSDは C_{20} 位のカルボニル基と 20β -水酸基間の酸化還元両反応を触媒したが、酸化反応における基質特異性の結果から 20β 位以外の酸化還元反応を触媒している可能性が考えられた。

一方、*S. hydrogenans* の 20β -HSDは、最近になって 3α および 3β -HSD活性を同一の触媒部位に持つ polyfunctional enzyme であることが報告された。²⁸⁾ 本章ではブタ精巣 20β -HSDが prokaryotic cell の 20β -HSDと同じように $3\alpha/\beta$ -HSD活性を持つことを見だし、それらの活性部位について考察を加えた。

第一節 実験の部

実験材料および試薬 精製 20β -HSD 精製 20β -HSD標品は第四章に述べた方法により精製した標品 (1.33 mg/ml) を使用した。さらに、第三章に用いた方法で HPLC (column: Protein Pack G-DEAE, 1×5 cm) を行いそのピークを回収した後、実験に用いた。

放射能標識化合物 $[4-^{14}\text{C}]5\alpha$ -dihydrotestosterone (5α -DHT; 1.9 GBq/mmol) はNEN社製 (Lot: 2466-150) を、また $[4-^3\text{H}]\text{NAD}^+$ (74 GBq/mmol) は第四章に述べたものをそれぞれ使用した。

標準ステロイド 5α -androstan- 17β -ol-3-one (5α -DHT), 5β -androstan- 17β -ol-3-one (5β -DHT), 5α -androstan-3,17-dione (androstanedione), 5β -androstan-3,17-dione, 5α -androstan- 3α -ol-17-one (androsterone), 5α -androstan- 3β -ol-17-one (epiandrosterone), 5α -androstan- $3\alpha,17\beta$

-diol, 5α -androstande- 3β , 17β -diol, 5β -androstande- 3α , 17β -diol, 5β -androstande- 3β , 17β -diol, 5β -androstande- 3α -ol-17-one, 5β -androstande- 3β -ol-17-one, 5α -pregnane-3,20-dione, 17α -methyl- 5α -androstande-17 β -ol-3-one, 5α -ol-androstande-17 β -ol-3-one, 4-androstene-3,17-dione (androstenedione), 4-androstande-17 β -ol-3-one (testosterone), 5-androstande-3 β -ol-17-one (dehydroisandrosterone), 5-androstene-3 β , 17β -diol (androstenediol), 5-androstande-17 β -ol-3-one, cholic acid, deoxycholic acid はいずれも Sigma社製, 4-pregnen-17 α -ol-3,20-dione (17 α -hydroxyprogesterone) は第二章に述べたものを, 4-pregnene-3,20-dione (progesterone), 5-pregnen-3 β -ol-20-one (pregnenolone), 4-pregnen-20 β -ol-3-one は第四章に述べたものをそれぞれ使用した。

ピリジンヌクレオチド β -NADPHは第二章に述べたものを, β -NADH, β -3'-NADPH, α -NADPH, α -NADH, β -NADP⁺, β -3'-NADP⁺ および β -NAD⁺ は第四章に述べたものを, α -NADP⁺ および α -NAD⁺ は Sigma社製をそれぞれ使用した。

酵素類 NAD⁺-kinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, isocitric dehydrogenase はいずれも第四章に述べたものを使用した。

その他の試薬 glucose-6-phosphate, isocitric acid および adenosine-5'-triphosphate (ATP) は第四章に述べたものを使用した。また, trimethylsilyl (TMS)-imidazoleは東京化成工業社製を使用した。その他の試薬は市販の特級品を使用した。

酵素活性の測定法 $3\alpha/\beta$ -HSD活性は Hitachi 228型 spectrophotometerを用いて分光光学的方法により測定した。還元反応では 5α -DHT (50 nmol/10 μ l ethanol) を, また酸化反応では 3α -HSD活性として 5α -androstande- 3α , 17β -diol (50 nmol/10 μ l ethanol) をそれぞれ基質とし, 石英セル (1 cm path, 1 ml) を用いて1.0 mlの50 mM KPB (pH 7.4) 中で37℃, 3 minのブレインキュベーションを行った。反応は β -NADPH または β -NADP⁺ (いずれも250 nmol) を加えることにより開始し, 37℃で340 nmの吸光度変化を連続的に記録し, そ

の傾きより第四章に述べた式を用いて酵素活性を算出した。β-NADPHのモル吸光係数は $6200[\text{cm} \cdot \text{mol}]^{-1}$ を使用した。このような条件の下で3α/β-HSD活性は測定時間0-10 minの間で、また20β-HSD精製標品 0-212.8 μgに対して高い直線性 ($r=0.9972$) を示した。

二次元-TLCによる3α/β-HSD活性の検出 20β-HSDによる5α-DHTの代謝物を二次元TLCで分離し3α/β-HSD活性の検出を行った。

[4- ^{14}C]5α-DHT (300 Bq/50 nmol/10 μl ethanol) を基質とし、精製20β-HSD (66.5 μg) をNADPH-再生系 (glucose-6-phosphate; 5 μmol, glucose-6-phosphate dehydrogenase; 1 unit および MgCl_2 ; 0.5 μmol) 存在下、1.0 mlの50 mM KPB (pH 7.4) 中37℃で30 minインキュベーションを行った。反応は10 mlの CH_2Cl_2 を加え激しく攪拌することにより停止させ、同時にステロイドを有機層に抽出した。水層を取り除き、無水硫酸ナトリウムにより脱水した後、 N_2 気流中40℃蒸発乾固した。次に残渣をTLC-プレート (Kodack 13181, 10×10 cm) にスポットし、展開溶媒 benzene/acetone (8/2) 続いて benzene/ethyl acetate (2/1) による二次元TLCを行い基質と生成物とを分離した。また、代謝物はラジオオートグラフィー (Fuji X-ray film, RX) で検出し、同時に展開した標準ステロイド(ヨウ素蒸気中で発色) とRf値を比較した。

ガスクロマトグラフィーによる3α-および3β-HSD活性の同定 TLC-プレート上で検出された主代謝物の同定にはガスクロマトグラフィーを用いた。5α-DHT (2 mg/0.4 ml ethanol) および精製20β-HSD (1 mg) をNADPH-再生系存在下、40 mlの50 mM KPB (pH 7.4) 中37℃で5 hrインキュベーションした。代謝物は二次元TLCの場合と同様の操作によりTLC-プレート (Merck; Kieselgel 60 F254, 10×20 cm) 上に帯状にスポットし、benzene/acetone (8/2, v/v) を展開溶媒として2回展開した。ヨウ素蒸気中で代謝物を検出した後、5α-androstane-3α/β, 17β-diol に相等する部分の薄層板を切り取り、 CH_2Cl_2 でステロイドを溶出した。溶出ステロイドは一度乾固した後、室温で TMS-imidazole を用い

てTMS化⁷²⁾し、ガスクロマトグラフィー (Shimadzu GC-4CM PF, column; OV-1 (1%) on Gaschrom Q (0.3×200 cm), 240°C, flow rate; 40 ml/min, detector; FID) を行った。なお、代謝物は同様の処理を施した標準ステロイドの retention time と比較して同定した。

[4-pro-R-³H]NADPH および [4-pro-S-³H]NADPH の作成 放射能 (³H) 標識 NADPH は第四章に述べた方法に多少変更を加えて作成した。[4-³H]NAD⁺ (636 KBq/8.6 nmol) をATP (5 μmol) および NAD⁺ (150 nmol) 存在下、0.65 mlの 50 mM KPB (pH 7.0)-0.8 mM MgCl₂中、NAD⁺-kinase (6 units)と37°C, 30 min インキュベーションすることによりリン酸化し、この混合物を二分割してそれぞれ [4-pro-R-³H]NADPH および [4-pro-S-³H]NADPH の作成に用いた。なお、[4-pro-R-³H] および [4-pro-S-³H]NADPH は第四章に述べた方法により作成し実験に用いた。

補酵素NADPHからのH原子授受に関する立体特異性 [4-pro-R-³H]NADPH または [4-pro-S-³H]NADPH (いずれも一試験管当り総NADPH量として25 nmol) を含む溶液を [4-¹⁴C]5α-DHT (16.7 Bq, 1000 dpm/50 nmol) および精製 20β-HSD (44.5 μg) と 1.0 mlの50 mM KPB (pH 7.0) 中37°C, 30 min インキュベーションした。代謝物はTLCで分離し、基質中の放射能 (¹⁴C) を利用してラジオオートグラフィーを行うことにより検出した。5α-androstane-3α,17β-diol および 5α-androst-ane-3β,17β-diol に相等する部分の薄層板を切取り、直接シンチレーションバイアルに入れ1 mlの methanol を加えてステロイドを薄層板より溶出させた後、トルエン系シンチレーターを加えて¹⁴Cおよび³Hの放射能を液体シンチレーションカウンターで同時測定した。

第二節 精製 20β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素が触媒する $3\alpha/\beta$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素活性の検出と同定

$3\alpha/\beta$ -HSD活性の検出と同定

ブタ精巢 20β -HSD精製標品は、 5α -DHTを基質としNADPH-再生系の存在下、少なくとも3種の代謝物へと触媒する活性を持つことが、 $[4-^{14}\text{C}]5\alpha$ -DHTを用いた 20β -HSDの代謝物の benzene/acetone (8/2, v/v) および benzene/ethyl acetate (2/1, v/v) を展開溶媒とする二次元TLC上で確認された(Fig.5-1.). 2つのマイナースポットについては明らかではないが、主代謝物に基づくスポットは 5α -DHTの 3α -および 3β -水酸化体である 5α -androsterone- $3\alpha,17\beta$ -diol および 5α -androsterone- $3\beta,17\beta$ -diol のいずれともRf値が一致した。しかし、本実験に用いたTLCの条件では、これら2種の 3 -ヒドロキシステロイドをさらに分離することはできず、この方法での 3α -および 3β -HSD活性の同定は不可能であった。

しかし、 5α -androsterone- $3\alpha,17\beta$ -diol と 5α -androsterone- $3\beta,17\beta$ -diol との分離・同定は、これら2種のステロイドの水酸基を trimethylsilyl (TMS) 化した後、ガスクロマトグラフィー法を適用することにより可能となった。TLC-プレート上、基質 5α -DHTからの主代謝物として認められたステロイドの TMS-誘導体はガスクロマトグラム上2つのピークに分離し、標準ステロイドとの retention time の比較より、これらのピークはそれぞれ 5α -androsterone- $3\alpha,17\beta$ -diol (8.08 min) および 5α -androsterone- $3\beta,17\beta$ -diol (10.01 min) と同定された (Fig.5-2.). また、 3α -ヒドロキシ体に対する 3β -ヒドロキシ体の生成比はクロマトグラム上のピーク面積比より計算し、その値はおおよそ1.39であった。

以上より、ブタ精巢 20β -HSDは補酵素NADPH存在下 5α -DHTを基質とする 3α -および 3β -HSD活性を持ち、その比活性の割合は 3α -HSD/ 3β -HSDがおおよそ4/3であることを認めた。

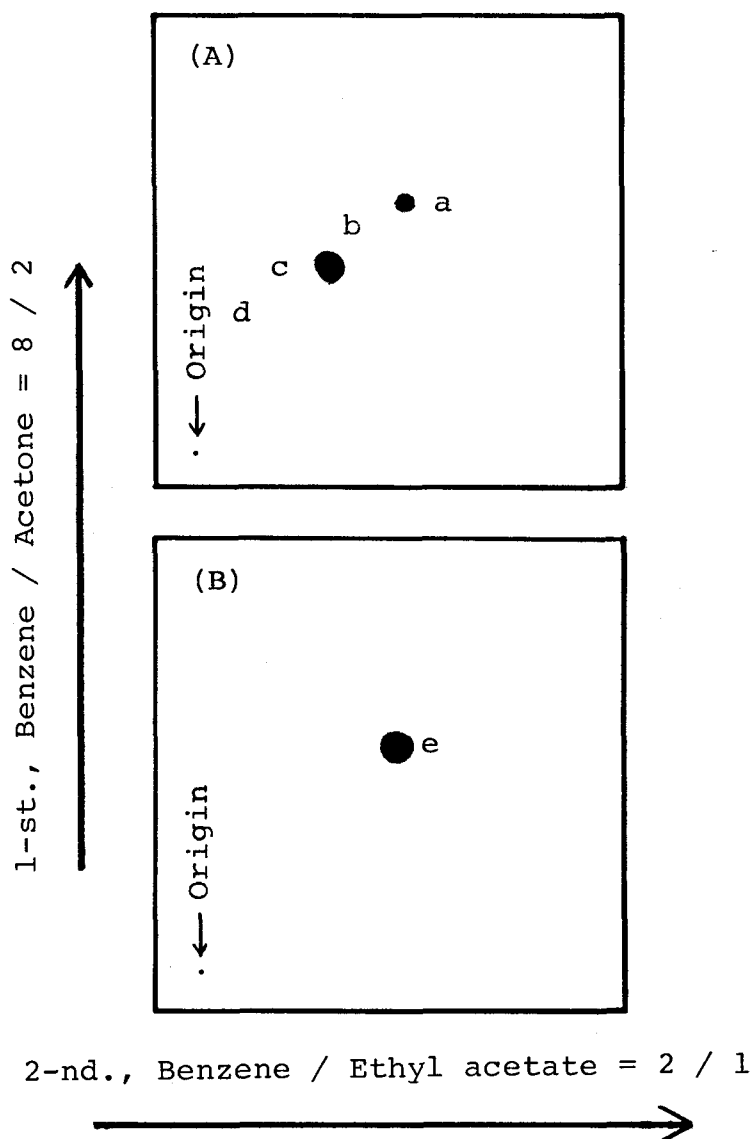


Fig.5-1. Radioautograms Obtained by TLC on Radioactive Metabolites from $[4-^{14}\text{C}]5\alpha\text{-DHT}$

$[4-^{14}\text{C}]5\alpha\text{-DHT}$ (370 Bq/50 nmol/10 μl ethanol) was incubated in the presence of purified $20\beta\text{-HSD}$ (67 μg): (A), or in the absence of the enzyme: (B) with NADPH-generating system. Dark spots are assigned as (a,e): $5\alpha\text{-DHT}$, (b): unknown metabolite 1, (c): $3\alpha\text{-}$ or $3\beta\text{-hydroxy-}5\alpha\text{-androstane-17}\beta\text{-ol}$ and (d): unknown metabolite 2, which are estimated by comparison the migration with non-radioactive standard steroids.

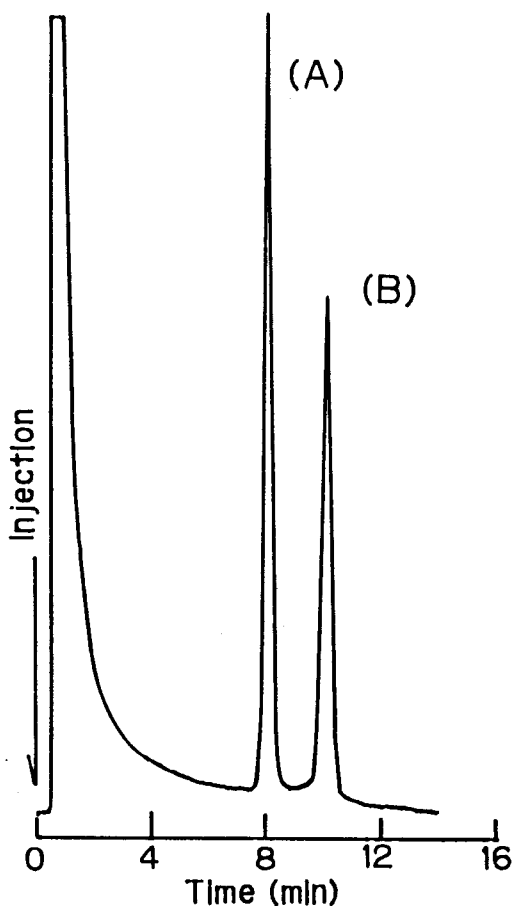


Fig.5-2. Gas Chromatography of Main-Metabolite from 5α -DHT

5α -DHT (2 mg/400 μ l ethanol) was incubated with purified 20β -HSD (1 mg) in the presence of NADP⁺ (10 μ mol), G-6-P (200 μ mol), G-6-P-DH (40 unit) and $MgCl_2$ (20 μ mol) in 40 ml of 50 mM KPB (pH 7.4) for 5 hr at 37°C. Metabolites were developed on the TLC (Merck, Kiesergel 60F254; 10 \times 20 cm) with benzene/acetone (8/2, v/v, twice). The main metabolite eluted with CH_2Cl_2 from the TLC-plate was silylated with TMS-imidazole at room temperature. Gas chromatography was performed under the condition of; column: OV-1 (1%) on Gaschrom Q (0.3 \times 200 cm), temperature; 240°C (column) and 270°C (injector), detector: FID, carrier gas: N_2 (40 ml/min). Peaks assigned are; (A): 5α -androstane- 3α , 17β -diol (B): 5α -androstane- 3β , 17β -diol.

第三節 $3\alpha/\beta$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素活性に対する諸性質と 20β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素活性との比較

基質特異性

還元型補酵素である β -NADPH (250 nmol) 存在下, 1.0 mlの50 mM KPB (pH 7.4)中, おもに C_3 位にカルボニル基を持つ種々の C_{19} ステロイド (50 nmol/10 μ l ethanol) を基質として, 精製 20β -HSD (35.6 μ g) が触媒する $3\alpha/\beta$ -HSD活性の基質特異性を検討した結果をTable 5-I. に示した. 20β -HSDは 5α -DHTのみならず種々の C_{19} ステロイドの還元を触媒したが, 通常生体内に存在すると考えられるステロイドの中では, 5α -DHT, 5α -pregnane-3,20-dione, および 5α -androsterone-3,17-dione に対して高い比活性が得られた. また, 20β -HSD は 4-ene 構造を有するステロイドや 5β -ジヒドロステロイドに比較して 5α -ジヒドロステロイドに対して特異性が認められた. さらに, 5α -DHTを基質として得られた $3\alpha/\beta$ -HSDの比活性は, 同じ条件で測定した本酵素の 20β -HSD 活性に対して, 17α -hydroxyprogesterone のおよそ10倍, progesterone のおよそ15倍の値であった. また, 5α -pregnane-3,20-dione に対する比活性は progesterone と比較しておよそ17倍高い値であった.

一方, 酸化型補酵素である NADP⁺ (250 nmol) 存在下, 20β -HSD精製標品が触媒する酸化反応における基質特異性を検討した結果をTable 5-II. に示したが, ステロイドの酸化を触媒する反応では逆の還元反応に比べて比較的ステロイドの構造に対する特異性が高かった. 実験に用いたステロイドの中では 5α -androsterone-3 α ,17 β -diol が最も 20β -HSDの基質となりやすく, その他, 種々の 3α -または 3β -水酸基を持つ 5α -または 5β -ジヒドロステロイドを基質としたが, 3α -ヒドロキシステロイドは 3β -ヒドロキシステロイドより, また, 5α -ジヒドロステロイドは 5β -ジヒドロステロイドよりそれぞれ基質となりやすい傾向が認められた. さらに, 17β -水酸基や 5-ene 構造を有するステロイドの 3β -水酸基に対する酵素活性は非常に小さいか, または全く検出できなかった.

Table 5-1. Substrate Specificity of 20 β -HSD on the Reaction of Steroid Reduction

Steroids ^{a)}	S.A. ^{b)} (nmol/min/mg)	%	K _m (μ M)	V _{max} (nmol/min/mg)	V _{max} /K _m
5 α -androstan-17 β -ol-3-one (5 α -DHT)	46.0	100	1.79	172.6	96.4
5 β -androstan-17 β -ol-3-one (5 β -DHT)	15.2	33.0	1.90	149.9	78.9
5 α -androstan-3,17-dione (androstanedione)	33.2	72.2	8.45	363.1	43.0
5 β -androstan-3,17-dione	14.7	32.0			N.E. ^{c)}
5 α -androstan-3 α -ol-17-one (androsterone)	27.1	58.9			N.E.
5 α -androstan-3 β -ol-17-one (epiandrosterone)	22.2	48.3			N.E.
5 α -pregnan-3,20-dione	50.6	110.0	1.60	98.4	61.5
17 α -methyl-5 α -androstan-17 β -ol-3-one	91.1	198.0			N.E.
5 α -ol-androstan-17 β -ol-3-one	45.5	98.9			N.E.
4-androstene-3,17-dione (androstenedione)	7.2	15.7			N.E.
4-androsten-17 β -ol-3-one (testosterone)	9.7	21.1			N.E.
5-androsten-3 β -ol-17-one (dehydroisoandrosterone)	23.4	50.9			N.E.
4-pregnen-17 α -ol-3,20-dione (17 α -hydroxyprogesterone)	3.9	8.5	9.42	9.6	1.02
4-pregnene-3,20-dione (progesterone)	3.0	6.5	1.54	4.4	2.86

Kinetic parameters were determined from Lineweaver-Burk plots. a) Trivial names given in parentheses. b) Specific activity; Assays were carried out with steroid (50 μ M), NADPH (250 μ M) and 20 β -HSD (36.5 μ g) in 50 mM KPB (pH 7.4) at 37°C. c) Not examined.

Table 5-II. Substrate Specificity of 20 β -HSD on the Reaction of Steroid Oxidation

Steroids ^{a)}	S.A. ^{b)} % (nmol/min/mg)	Km (μ M)	Vmax (nmol/min/mg)	Vmax/Km
5 α -androstande-3 α ,17 β -diol	51.8 100	0.72	22.6	31.4
5 α -androstande-3 β ,17 β -diol	1.2 2.3			N.E. ^{c)}
5 β -androstande-3 α ,17 β -diol	19.0 36.7			N.E.
5 β -androstande-3 β ,17 β -diol	12.4 24.0			N.E.
5 α -androstan-3 α -ol-17-one (androsterone)	25.2 48.6	3.20	59.4	18.6
5 α -androstan-3 β -ol-17-one (epiandrosterone)	9.1 17.6			N.E.
5 β -androstan-3 α -ol-17-one	4.2 8.2			N.E.
5 β -androstan-3 β -ol-17-one	6.4 12.4			N.E.
cholic acid	N.D. ^{d)}			
deoxycholic acid	N.D.			
5 α -androstan-17 β -ol-3-one (5 α -DHT)	N.D.			
5 β -androstan-17 β -ol-3-one (5 β -DHT)	N.D.			
17 α -methyl-5 α -androstan-17 β -ol-3-one	N.D.			
5 α -ol-androstan-17 β -ol-3-one	N.D.			
5-androstene-3 β ,17 β -diol (androstenediol)	N.D.			
5-androsten-17 β -ol-3-one	N.D.			
4-androsten-17 β -ol-3-one (testosterone)	0.92 1.8			N.E.
5-pregnen-3 β -ol-20-one (pregnenolone)	N.D.			
4-pregnen-20 β -ol-3-one	3.1 6.0			N.E.

Kinetic parameters were determined from Lineweaver-Burk plots. a) Trivial names given in parentheses. b) Specific activity; Assays were carried out with steroid (50 μ M), NADP⁺ (250 μ M) and 20 β -HSD (36.5 μ g) in 50 mM KPB (pH 7.4) at 37°C.

c) Not examined. d) Not detected; Enzyme activity was not detected under the assay condition.

補酵素要求性

通常存在する β -NADP(H), β -NAD(H) の他に2'位のリン酸が3'位に結合したものの、および、ニコチンアミド基が α 位に結合した種々のアナログ体を用いてブタ精巣20 β -HSDの3 α / β -HSD活性に対する補酵素要求性について検討した。

ステロイドの還元反応では5 α -DHT (50 nmol/10 μ l ethanol), 酸化反応では5 α -androsterone-3 α ,17 β -diol (50 nmol/10 μ l ethanol) をそれぞれ基質とし, 1.0 mlの50 mM KPB (pH 7.4) 中20 β -HSD精製標品 (35.6 μ g) と各種補酵素 (250 nmol) 存在下測定した3 α / β -HSD活性, および, いずれも50 nmolの基質存在下で Lineweaver-Burk のプロットより求めた各種補酵素に対する見かけの Km, Vmax およびその比をTable 5-III. に示した. Vmax/Km の値から判断すると5 α -DHTの還元には β -NADPH が, また, 5 α -androsterone-3 α ,17 β -diol の酸化には β -NADP⁺ が最も補酵素として適していることが示唆された. しかしながら, α -NADP⁺ および α -NAD⁺ を除くその他のピリジンヌクレオチドも比較的高濃度の添加により20 β -HSDの3 α / β -HSD活性に対する補酵素となり得た.

Table 5-III. Cofactor Requirement for 3 α / β -HSD Activity Catalyzed by 20 β -HSD

Cofactors		Relative activity ^{a)} (%)	Km (μ M)	Vmax (nmol/min/mg)	Vmax/Km
Reduced form	β -NADPH	100	7.2	115.9	16.2
	α -NADPH	64.8	328.0	141.8	0.43
	β -3'-NADPH	79.2	452.8	275.2	0.61
	β -NADH	36.5	284.8	79.0	0.28
	α -NADH	8.0	126.1	19.7	0.16
Oxidized form	β -NADP ⁺	100	14.8	46.1	3.11
	α -NADP ⁺	N.D. ^{b)}			N.C. ^{c)}
	β -3'-NADP ⁺	4.5	5.1	3.9	0.76
	β -NAD ⁺	103.5	88.2	50.6	0.57
	α -NAD ⁺	N.D.			N.C.

Kinetic parameters were determined from Lineweaver-Burk plots. a) Assays were performed in 5 α -DHT (50 μ M; for reduced form) or 5 α -androsterone-3 α ,17 β -diol (50 μ M; for oxidized form), 20 β -HSD (36.5 μ g) and pyridine nucleotide cofactor (250 μ M) in 1 ml of 50 mM KPB (pH 7.4) at 37°C. b) Not detected. c) Not calculated; Enzyme activity was not detected under the range of cofactor concentration (3.75–250 μ M).

補酵素NADPHからのH原子授受に関する立体特異性

精巣20 β -HSDが触媒する3 α / β -HSD活性（還元触媒活性）について，[4-¹⁴C]5 α -DHT と [4-pro-R-³H]NADPH または [4-pro-S-³H]NADPH とインキュベーションした結果をTable 5-IV. に示した．20 β -HSD存在下，[4-pro-R-³H]NADPHと比較して，[4-pro-S-³H]NADPHを5 α -DHTとインキュベーションした場合にその代謝物である 5 α -androsterone-3 α ,17 β -diol および 5 α -androsterone-3 β ,17 β -diol 中への³Hの放射能の取り込みが認められた．1 nmolの代謝物生成に伴う³Hの取り込みdpm数を比較すると，[4-pro-S-³H]NADPH は [4-pro-R-³H]NADPHを補酵素として用いた場合に比較しておよそ13.2倍大きかった．これらの結果から，精巣20 β -HSDが持つ 3 α -および 3 β -HSDのいずれの活性も，補酵素 NADPH のニコチンアミド基上の 4-pro-S 水素を選択特異的に利用し代謝物中に導入していることが示唆された．

Table 5-IV. Stereospecificity of Hydrogen Transfer from NADPH to 3 α / β -Hydroxy-5 α -androsterone-17 β -ol by 20 β -HSD

cofactor	³ H/nmol product (dpm)	3 α / β -HSD activity (nmol/min/mg)	ratio of ³ H/ ¹⁴ C
[4- <u>pro</u> S- ³ H] NADPH	438.2 (\pm 4.34)	32.1 (\pm 0.12)	22.2 (\pm 0.49)
[4- <u>pro</u> R- ³ H] NADPH	33.3 (\pm 0.30)	31.9 (\pm 0.05)	3.0 (\pm 0.04)

3 α / β -HSD activities were determined by assays using [4-¹⁴C]5 α -DHT (50 nmol) as the substrate in 50 mM KPB (pH 7.0).

至適pH

$3\alpha/\beta$ -HSD活性に対する反応系のpHの影響を $K_2HPO_4-H_3PO_4$ 緩衝液 (pH 4.0 - 9.0) で検討した結果を Fig.5-3.に示した. 20β -HSD ($35.6\mu g$) を 5α -DHT ($50\text{ nmol}/10\mu l$ ethanol) を基質とし, β -NADPH (250 nmol) 存在下, 各pHの 100 mM 緩衝液 (1.0 ml) 中で酵素反応をさせた結果, 最大 $3\alpha/\beta$ -HSD活性はpH 5.0で得られた. また, $3\alpha/\beta$ -HSD活性はpH 5.0以下では急激に低下する一方, 5.0以上の範囲では比較的緩やかに低下する傾向がみられた. 至適pHであるpH 5.0における $3\alpha/\beta$ -HSDの比活性は通常の酵素反応に用いるpH 7.4での比活性のおよそ11倍の値を示した.

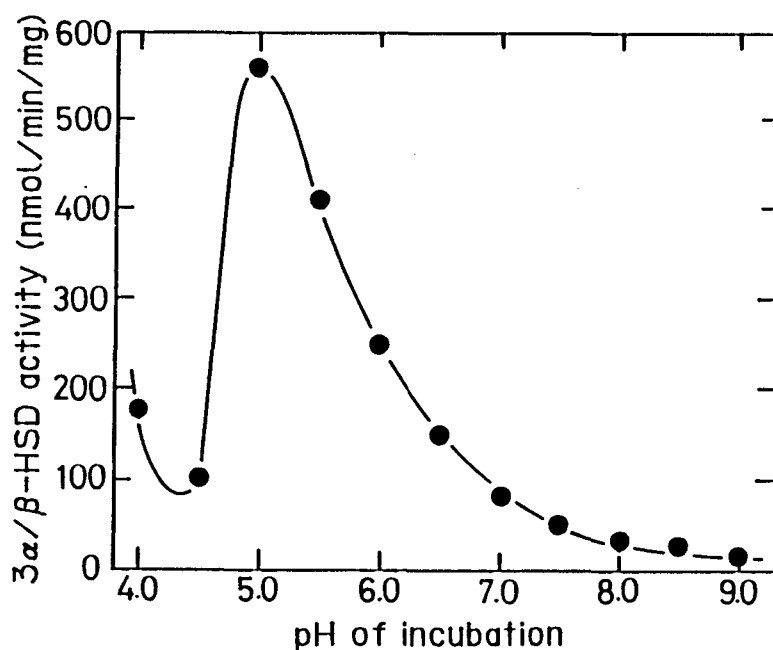


Fig.5-3. Optimum pH for $3\alpha/\beta$ -HSD Activity of Testicular 20β -HSD

5α -DHT ($50\text{ nmol}/10\mu l$ ethanol) was incubated with 20β -HSD ($35.6\mu g$) in a quartz cuvette (1 cm path, 1 ml) in the presence of β -NADPH (250 nmol) in 1.0 ml of various pH's 100 mM $H_3PO_4-K_2HPO_4$ buffer system (pH 4.0-9.0) at $37^\circ C$. The change in absorbance at 340nm versus time was continuously monitored.

2価の重金属イオンの影響

3 α / β -HSD活性に対する種々の重金属イオンの影響を検討した結果を Table 5-V. に示した. 各種2価重金属イオン存在下, 20 β -HSD (35.6 μ g) と基質 5 α -DHT (50 nmol/10 μ l ethanol) および β -NADPH (250 nmol) を1.0 mlの50 mM KPB (pH 7.4) 中で酵素反応させた. 重金属イオンはすべて1 mM塩化物として酵素反応系に加えたが, この条件の下で試料添加に基づく反応系のpHの変化は認められなかった. 3 α / β -HSD活性は, Hg²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺およびCd²⁺により強く阻害されたが, 実験に用いたその他の重金属の中では, 特に酵素活性に影響を及ぼすものは認められなかった.

Table 5-V. Effect of Divalent Cations on the 3 α / β -HSD Activity of Testicular 20 β -HSD

Addition 3 α / β -HSD activity (%) ^{a)}		Addition 3 α / β -HSD activity (%)	
None	100	Ca ²⁺	96.4
Co ²⁺	133.4	Mn ²⁺	96.2
Sr ²⁺	116.1	Ba ²⁺	87.3
Sn ²⁺	115.7	Cd ²⁺	N.D. ^{b)}
Mg ²⁺	109.0	Cu ²⁺	N.D.
Zn ²⁺	100.8	Hg ²⁺	N.D.
Ni ²⁺	100.0	Fe ²⁺	N.D.

a) Expressed as the percentage of remaining activity.

b) not detected; 3 α / β -HSD activity was not detected under the spectrophotometrical assay condition.

5 α -DHT (50 nmol/10 μ l ethanol), purified 20 β -HSD preparation (35.6 μ g) and the chloride form of various divalent cations (1 mM) were incubated in a quartz cuvette (1 cm path, 1 ml) in the presence of β -NADPH (250 nmol) in 1.0 ml of 50 mM KPB (pH 7.4) at 37°C. The change in absorbance at 340 nm versus time was continuously monitored.

3 α / β -HSD活性と20 β -HSD活性との比較

ブタ精巢20 β -HSDが触媒する3 α / β -HSD活性に関する諸性質と第四章で検討した20 β -HSD活性に対する諸性質の比較をTable 5-VI. に示した. 20 β -HSD活性と3 α / β -HSD活性は補酵素要求性, 補酵素 NADPH からの水素原子授受に関する立体特異性, および至適pHの項目に関し, 等しいかまたは非常に類似した結果を示した. しかし, 2価の重金属イオンの影響では, その Fe²⁺, Cd²⁺ が及ぼす影響の点で両活性間に全く異なった結果が認められた.

Table 5-VI. Comparison of 3 α / β -HSD and 20 β -HSD Activities

	For 3 α / β -HSD activity	For 20 β -HSD activity
Optimum pH	5.0	5.5
Divalent cations effect on the activity	Cu ²⁺ , Hg ²⁺ , Cd ²⁺ , Fe ²⁺	Hg ²⁺ > Cu ²⁺
Cofactor requirement	NADPH >> NADH	NADPH >> NADH
Stereospecificity of hydrogen transfer from nicotinamide moiety of NADPH	4- <u>pro</u> S	4- <u>pro</u> S

Substrate used were 5 α -DHT (50 nmol) and 17 α -hydroxyprogesterone (20 nmol) for the 3 α / β -HSD and 20 β -HSD activity respectively.

第四節 考察

ブタ精巣 20β -HSDは基質ステロイドの還元のみならず、補酵素 NADP^+ 存在下 20β -hydroxy-4-pregnen-3-oneおよび $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-oneの酸化も触媒するが、 20α -hydroxy-4-pregnen-3-one, $17\alpha, 20\alpha$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one に対する触媒作用 (20α -HSD活性) は全く存在しない。しかし、 5α -pregnen-3-one 系ステロイドを基質とした場合に、 20β -ヒドロキシステロイド以外に数種の 20α -ヒドロキシステロイドも基質とする結果が得られたことから、 20β -HSDが C_{21} -ステロイドの 20 位以外の酸化還元反応も触媒している可能性が示唆された。また、 20β -HSD活性が精巣中に多量に存在することから、本酵素がアンドロゲンの生合成に関与していることが予想され、 C_{19} -ステロイドに対する触媒作用を発見するに至った。 20β -HSD精製標品は補酵素 NADPH 存在下、testosterone の活性型である 5α -DHT (A/B, trans) を基質とする 3α -および 3β -HSD活性を同時に持ち、さらに、 5α -DHTばかりでなく 5β -DHT (A/B, cis) も基質とすることができた。また、活性は低かったが 4α -pregnen-3-one 系ステロイドの 3 位や 17β -水酸基に対する触媒作用も存在することが示唆された。しかしながら、 β - NADP^+ を補酵素として用いた逆(酸化)反応では、酵素活性とステロイドの構造との間に比較的高い相関関係が得られ、主に 5α -または 5β -ジヒドロステロイドの 3α -および 3β -水酸基に対して特異性が認められた。これらの結果より、ブタ精巣 20β -HSDは polyfunctional な活性を同一酵素分子中に持つ $3\alpha/\beta$, 20β -HSDであると考えられ、既知の *S. hydrogenans* 由来の 20β -HSDに関する報告²⁸⁾と共通した。さらにこのような polyfunctional な酵素はウサギ肝臓中にも存在し、 3α -, 3β -, 17β -, 20α -HSDとして報告されている。^{7,31)}

一方、*S. hydrogenans* 由来の 20β -HSDでは、その 3α -および 20β -HSD活性が同一タンパク質の一つの触媒部位により触媒されていることが次々と報告された。²⁹⁻³¹⁾ ブタ精巣 $3\alpha/\beta$, 20β -HSD酵素タンパク質上の触媒部位が一つであるか複数であるかは、今のところ結論がでていないが、解明の一つの手段として $3\alpha/\beta$ -および 20β -HSD活性に基づく酵素化学的諸性質の比較検討を行った結

果、2価の重金属イオンの影響において、 $3\alpha/\beta$ -HSD活性が1 mMの Fe^{2+} 、 Cd^{2+} イオンの存在により強く阻害を受けたのに対し、 20β -HSD活性はこの2種のイオンではほとんど影響を受けず、両活性間に差が認められたが、その他の重金属イオンでは両活性間で際だった差は認められなかった。さらに、補酵素要求性、至適pHおよび補酵素NADPHからの水素原子授受に関する立体特異性の点において、両者間で全く、または、ほとんど等しい結果が得られた。特に、NADPH から基質 5α -DHTへの水素原子の受渡しは 4-pro-S 水素に選択特異的で、 5α -DHTの 3α -および 3β -水酸化に、いずれも NADPH のニコチンアミド基上の同一部位の水素原子を利用する点で非常に興味深い結果であった。これらの結果から、ブタ精巣 20β -HSDが持つ $3\alpha/\beta$ -および 20β -HSD両活性は *S. hydrogenans* の 20β -HSDと同様に、いずれも同一酵素分子上の一つの触媒部位により触媒されている可能性が考えられる。また、これらの活性が一つの触媒部位において触媒されているとすれば、その触媒部位は大きいか、または非常にフレキシブルな構造を持っていることが考えられる。さらに、精巣 20β -HSDは β -NADP(H) のみならず、比較的高濃度の β -3'-NADP(H) や α -NADPH も補酵素とすることが可能であることから、その補酵素結合部位についても同様にフレキシブルな構造を持っていることが考えられる。

一方、 20β -HSDにより触媒され 17α -hydroxyprogesterone から生成すると考えられる $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one の生理作用として、いくつかの種の魚類中で卵母細胞の成熟を最も効果的に誘導する物質の一つであることが報告されている。¹⁴⁻¹⁶⁾ また、サケ科の魚類中では放精作用に関与していることも報告されている。¹⁸⁾ しかし、哺乳類におけるこのステロイドに関する生理的存在意義はまだ明らかにされていない。それゆえに、本酵素がアンドロゲンの生合成を行うと同時にアンドロゲンの標的臓器でもある精巣中に存在し、幼若期に特異的に活性を示す 20β -HSDが $3\alpha/\beta$ -HSD活性を同一酵素タンパク質上に持つことは、哺乳類の精巣におけるステロイド代謝と内分泌機能を検討する上で非常に興味ある事実であると考えられる。

小括

- 1) 20β -HSD精製標品は NADPH 存在下 5α -DHT を基質とする $3\alpha/\beta$ -HSD活性を持ち、その比活性の割合は $3\alpha/3\beta$ がおよそ 4/3 であった。
- 2) 20β -HSDは 5α -DHT のみならず NADPH または NADP^+ 存在下、種々の 5α または 5β -ジヒドロステロイドに対する $3\alpha/\beta$ -HSD活性を持つことを認めた。
- 3) 20β -HSDが触媒する $3\alpha/\beta$ -HSD活性は、補酵素として還元反応では β -NADPH, また、酸化反応では β - NADP^+ を要求し、その他の β -NAD(H) をはじめとする種々のピリジヌクレオチドも比較的高濃度添加により補酵素となり得ることを認めた。
- 4) 20β -HSDが触媒する $3\alpha/\beta$ -HSD活性の至適 pH は 5.5 であった。
- 5) 20β -HSDが触媒する $3\alpha/\beta$ -HSD活性は、1 mM Fe^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} により強く阻害されたが、その他の重金属イオンでは阻害されなかった。
- 6) ブタ精巢 $3\alpha/\beta$, 20β -HSDは基質 5α -DHT の還元で NADPH 上の 4-pro-S 水素原子を選択特異的に利用した。
- 7) ブタ精巢 $3\alpha/\beta$, 20β -HSDが触媒する 17α -hydroxyprogesterone を基質とする 20β -HSD活性と、 5α -DHT を基質とする $3\alpha/\beta$ -HSD 活性とでは重金属イオンによる一部の結果を除き、補酵素要求性、至適 pH, 補酵素 NADPH からの水素原子授受に関する立体特異性の点でほぼ一致した結果が得られ、両活性が同一触媒部位により触媒されている可能性が示唆された。

第六章 精巣サイトソール画分中に存在する $3\alpha/\beta$ -、 20α -および 20β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素活性の成育に伴う変動⁷⁴⁾

第五章では精製したブタ精巣 20β -HSDが 5α -DHTを基質とする強い $3\alpha/\beta$ -HSD活性を持つことを明らかにした。

一方、 $3\alpha/\beta$ -HSD活性の存在は幼若ラット精巣のホモジネートを実験材料とした一連の progesterone からのアンドロゲン生合成に関する研究⁷⁵⁻⁷⁸⁾により明らかにされている。さらにマウス精巣ホモジネートを用いて、progesterone からのアンドロゲン生合成の加齢に伴う変化が検討されている。⁷⁹⁾ これらの報告はいずれも幼若期の精巣により progesterone から 3α -または 3β -ヒドロキシ- 5α -ジヒドロステロイド類が生合成され、この点に関して $3\alpha/\beta$ -HSD活性が関与していることを示している。

第二章において、 20β -HSD活性が幼若期のブタ精巣中に特異的に多量に存在することを明らかにしたが、この章では、この 20β -HSDの生理的存在意義を明らかにする一端として、哺乳類であるブタの精巣サイトソール画分を実験材料として、加齢に伴う 20β -HSD活性および $3\alpha/\beta$ -HSD活性の変動、さらに 20β -HSD酵素タンパク質量の変動について検討した。また、第二章で、ブタ以外の種の中で 20β -HSD活性が比較的高く存在することを認めているモルモット精巣サイトソールについても、加齢に伴う酵素活性の変動を検討した。

第一節 実験の部

実験材料および試薬 ブタ精巣およびモルモット精巣 養豚場で生後 3, 4, 7, 10, 30, 40, 60, 80, 90日齢の幼若ブタより、去勢に伴う精巣を得た。得られた精巣は直ちに液体窒素中で凍結し、実験室へ移送して実験材料とした。また、屠殺場より生後およそ1年のブタより精巣を得て、氷冷下実験室へ移送し、これを成熟ブタ精巣とした。さらに、生後 3日, 1, 2, 4, 8, 16週齢のモルモ

ット (Hartley種) より精巢を摘出しモルモット精巢を得た。幼若ブタ精巢を除いて、得られた精巢はすべて使用まで SET-Buffer (0.25 M sucrose-10 mM Tris-0.1 mM EDTA, pH 7.4) 中, -20°C で凍結し保存した。

放射能標識化合物 $[4-^{14}\text{C}]5\alpha$ -dihydrotestosterone (1.9 GBq/mmol) は第五章で述べたものを, また $[4-^{14}\text{C}]17\alpha$ -hydroxyprogesterone (2.0 GBq/mmol) はNEN社製 (Lot: 1767-039) をそれぞれ使用した。

標準ステロイド 17α -hydroxyprogesterone は第二章で述べたものを, また 5α -dihydrotestosterone は第五章で述べたものをそれぞれ使用した。

ピリジンヌクレオチド β -NADP⁺ は第四章で述べたものを使用した。

酵素 glucose-6-phosphate dehydrogenaseおよびisocitric dehydrogenase は第四章で述べたものを使用した。

その他の試薬 ATP, glucose-6-phosphate, isocitric acid は第四章で述べたものを使用した。N,O-bis(trimethylsilyl)acetamide は東京化成工業社製を, DEAE-cellulose (DE-52) は Whatman社製を, また, プロッテイン検出キットは Super ScreenTM, immunoscreening system (Amersham社製) を使用した。

サイトソールの調製法 各種生後日数のブタ精巢およびモルモット精巢はハサミで細かく切り刻んだ後, 4.5倍量の0.15 M KCl-0.1 mM EDTA 中で Physcotron を用いてホモジナイズし, 第二章に述べた方法でサイトソール画分を調製した。

酵素活性測定法 各種精巢サイトソール画分中の 20α -および 20β -HSD活性は, 第二章に述べた方法でNADPH-再生系を補酵素として測定した。また, $3\alpha/ \beta$ -HSD活性は, 第二章に述べた方法に以下に示すような変更を加えて測定した。 $[4-^{14}\text{C}]5\alpha$ -DHT (370 Bq/50 nmol/10 μ l ethanol) を基質とし, NADPH-再生系存在下50 mM KPB (pH 7.4) 中, 37°C で30 minインキュベーションした。また, 基質と代謝物の分離にはTLC-プレート (Merck, Kieselgel 60F254, 2×10 cm) を用い, 展開は benzene/ethyl acetate (2/1) により行った。

3 α -および3 β -HSD活性の分別定量には、新たに非放射性5 α -DHT (50 nmol/10 μ l ethanol) を基質として酵素反応を行った。代謝物である 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol および 5 α -androstane-3 β ,17 β -diol の混合物をCH₂Cl₂を用いて薄層板より抽出し、有機溶媒をN₂気流中で揮発させた後、N,O-bis-(trimethylsilyl)acetamide/pyridine (1/1) 溶液を加え室温で30 min反応させることによりTMS化し、⁷²⁾ 第五章に述べた方法でガスクロマトグラフィーを行った。それぞれの酵素活性は3 α / β -HSD活性に、3 α -および3 β -水酸化ステロイドに基づくピーク面積比を乗じて算出した。

タンパク定量法 ウシ血清アルブミン (BSA, 1 mg/ml) を標準として第二章に述べた方法で測定した。

20 β -HSD IgGの作成 日本白色系雄ウサギ (体重2.4 Kg) を用いて、精製20 β -HSD (1.78 mg/ml) 1.1 mlと等量の Freund's complete adjuvant を乳化した後、一ヶ月の間隔で三回皮下注射した。最終免疫の一ヶ月後に頸動脈より全血採血し、抗血清 (41 ml) を得た。抗血清を10 mM PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4) で2倍希釈した後、硫酸アンモニウム1/3飽和溶液とし、室温で 30 min攪拌、30 min静置の後、遠心分離 (10000 \times g, 30 min) により沈澱を集めた。この沈澱を10 mM KPB (pH 7.4) に対して透析し、予め同緩衝液で平衡化したDE-52カラム (1 \times 15 cm) によるクロマトグラフィーを行い、非吸着のIgG画分を得た。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) 法 第三章に述べた方法に従い12%アクリルアミドゲル (10 \times 14 cm, 0.1 cm thick, pH 8.8) を用いて行った。

Western blotting法 ホライズプロット装置 (Atto社製) を用いて Burnetteの方法⁸⁰⁾ に従い SDS-PAGE 後のゲルからニトロセルロース膜 (Hibond C,

Amersham社製) 上へ転写した。

酵素-抗体染色法 ブタ精巣サイトソールタンパクの転写を行った膜を2% BSAを含むTBS (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl) 中, 室温で1 hrインキュベーションし, 続いて適当な希釈を施した20 β -HSD IgGを含むTBS中, 室温で1 hrのインキュベーションを行った。TBST (TBS+0.05% Tween 20) 中で5 minずつ4回洗浄した後, 1000倍希釈した抗ウサギIgG (horse radish peroxidase conjugate, Amersham社製) およびBSA (0.2%) を含むTBS中, 室温で1 hrインキュベーションをした。TBST中で5 minずつ4回洗浄した後, 転写膜の発色は peroxidase の基質として 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, 0.4 mg/ml), H₂O₂ (0.009%)を用い, これらを含むTBS中で20 sec から 5 minまで発色の度合に応じてインキュベーションすることにより行った。発色を終えた転写膜は精製水で洗浄した後, 乾燥した。

第二節 ブタ精巣サイトソール画分中の $3\alpha/\beta$ -, 20α -および 20β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素活性の成育に伴う変動

成育に伴う比活性の変動

各種日齢のブタより得た精巣の重量とサイトソール画分中のタンパク質濃度および総タンパク質量をTable 6-I.に示した。精巣重量の増加はおおむね生後の日数に比例していることが認められた。

成育に伴う $3\alpha/\beta$ -, 20α -および 20β -HSDそれぞれの比活性の変動を調べた結果をFig.6-1.に示した。 20β -HSD活性は生後7日目で高い比活性を示し、この活性はおおよそ30日まで続いた。30日以降では急激に 20β -HSD活性は低下し、成熟期（生後約1年）まで連続的に低い活性を示した。また、同じくブタ精巣サイトソール画分に存在するが 20β -HSDとは別種の酵素タンパク質により触媒されている 20α -HSD活性は、幼若期では 20β -HSD活性より低く成熟期には特異的に

Table 6-I. Total Activities in the Cytosol Fraction of Pig Testis from Various Maturing Stage

Stage (day)	Testis Weight (g)	Cytosol Protein (mg)	Total Enzyme Activity (nmol/min/testis)		
			20α -HSD	20β -HSD	$3\alpha/\beta$ -HSD
4	0.98	35.91	0.77	1.90	46.3
7	0.54	17.01	0.59	1.60	35.2
10	0.79	28.90	0.91	2.21	52.6
30	5.65	280.5	3.82	25.6	319.8
40	8.92	354.2	3.37	16.4	183.5
60	12.1	436.6	1.57	4.52	88.2
80	8.39	332.8	1.93	6.22	86.9
Mature	347.1	11408.9	894.5	106.1	16815.0

[4- 14 C]17 α -Hydroxyprogesterone (370 Bq/20 nmol/10 μ l ethanol, for 20α - and 20β -HSD activities) or [4- 14 C]5 α -DHT (370 Bq/50 nmol/10 μ l ethanol, for $3\alpha/\beta$ -HSD activity) was incubated with the pig testicular cytosol (0.81–1.33 mg protein) in the presence of NADPH-generating systems in 1.0 ml of 50 mM KPB (pH 7.4) at 37°C.

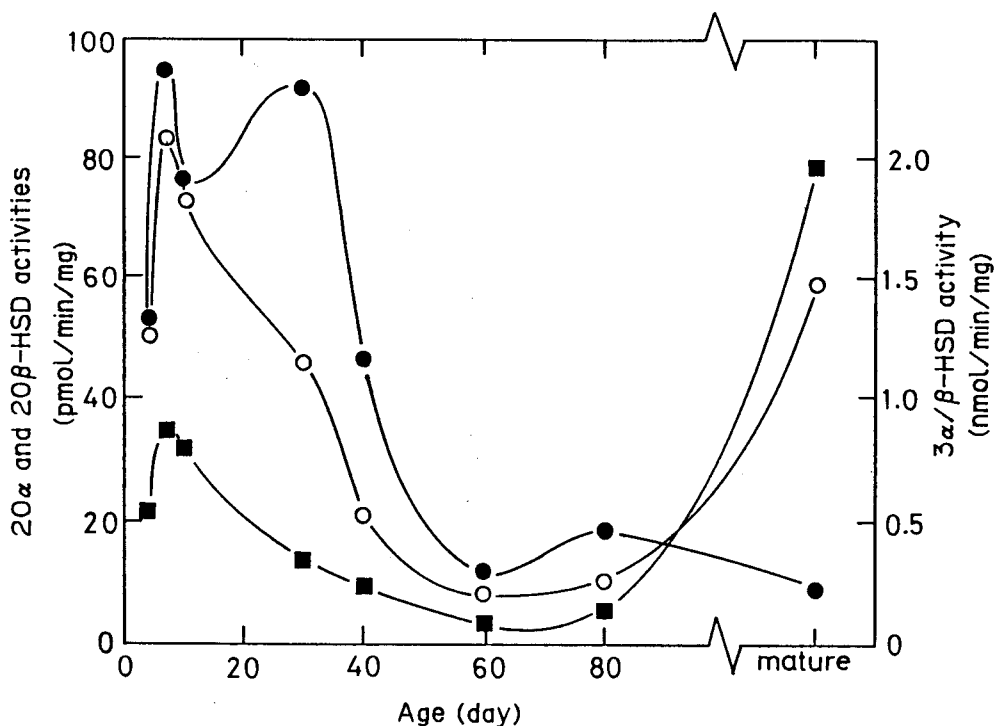


Fig.6-1. Changes in the Enzyme Activities of $3\alpha/\beta$ -HSD, 20α -HSD and 20β -HSD Following the Maturation of Pig

The specific activities indicated are: $3\alpha/\beta$ -HSD (○), 20α -HSD (■) and 20β -HSD (●). $[4-^{14}\text{C}]17\alpha$ -hydroxyprogesterone (20 nmol, for 20α - and 20β -HSD activities) or $[4-^{14}\text{C}]5\alpha$ -DHT (50 nmol, for $3\alpha/\beta$ -HSD activity) was incubated with cytosol fractions (0.81-1.33 mg) in the presence of NADPH-generating system in 1.0 ml of 50 mM KPB (pH 7.4) for 30 min at 37°C .

高く存在し、成育過程全体において 20β -HSD活性の変動とは異なった。 $3\alpha/\beta$ -HSD活性については、その比活性が 20β -HSD活性よりおよそ10倍ほど高く得られたが、生後7-10日で特異的に高い比活性を示し、 20β -HSD活性と同様に生後60日にかけて低下した。しかし、成熟期における比活性は 20β -HSD活性とは異なり、一転して高い値が得られ、この変化はむしろ 20α -HSD活性の変化と共通する結果であった。

一方、ガスクロマトグラフィー法により得られた 3α -HSDと 3β -HSDとの活性比は、幼若期から成熟期にいたる成育過程全体において、きわだつた変化は認められなかった(Fig.6-2.).

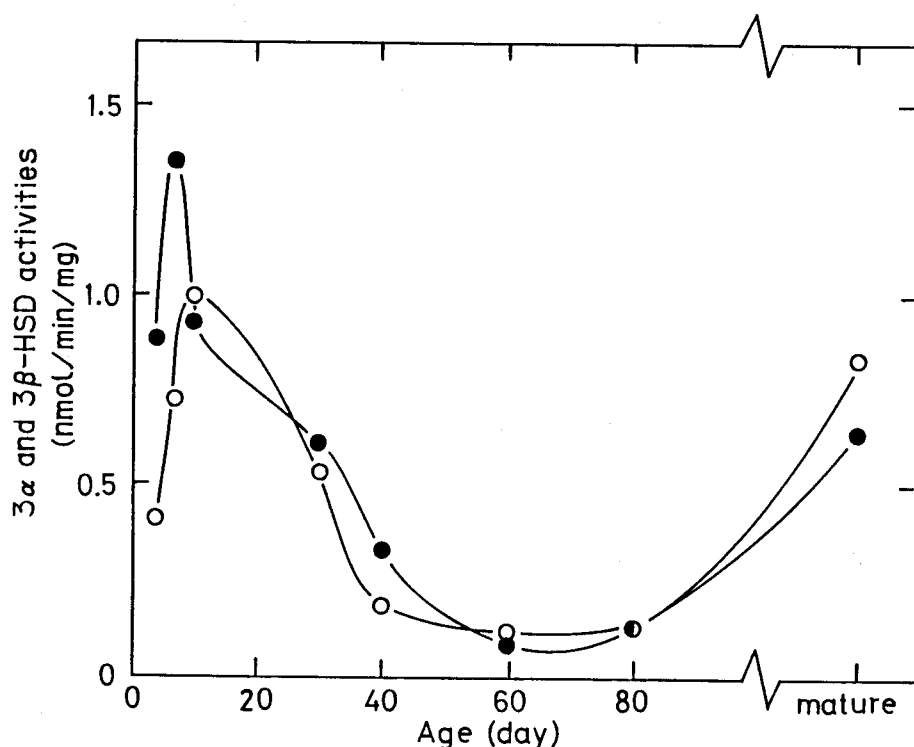


Fig.6-2. Changes in 3α -HSD and 3β -HSD Activities Following the Maturation of Pig

The specific activities indicated are: 3α -HSD (●), 3β -HSD (○). 3α -HSD and 3β -HSD activities were determined by division of specific $3\alpha/\beta$ -HSD activity at the ratio of 5α -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol and 5α -androstane- $3\beta,17\beta$ -diol amounts as the products from 5α -DHT, which were estimated by gas-chromatography after being silylated with N,O-bis(trimethylsilyl)acetamide.

成育に伴うサイトソール画分中の総活性の変動

生後4-80日の間で、精巣一個当りから得られる全サイトソール画分中の $3\alpha/\beta$ -、 20α -および 20β -HSD総活性の変動をFig.6-3.に示した。生後4-80日で、 $3\alpha/\beta$ -HSD活性と 20β -HSD活性との間に非常によく似た結果が得られた。両酵素活性はいずれも生後1ヶ月でピークに達し、その後は精巣重量の明らかな増加にもかかわらず精巣サイトソール画分中の総活性は減少した。なお成熟期における各酵素の総活性は図中に示していないが、 $3\alpha/\beta$ -HSDの総活性が16815 (nmol/min/testis)であるのに対し、 20α -HSDの総活性が895 (nmol/min/testis)、また 20β -HSDの総活性が106 (nmol/min/testis)であり、いずれの活性も成熟時の精巣重量の増大に伴い増加したが、 $3\alpha/\beta$ -HSD活性および 20β -HSD活性間の差は非常に大きかった。

成育に伴う精巣サイトソール画分中の 20β -HSDタンパク質存在比の変化

生後3日、30日、60日、90日および成熟ブタ精巣より得られた一定量のサイトソールタンパク質中にしめる 20β -HSD酵素タンパク質存在量の変化を検討した結果をFig.6-4.に示した。各サイトソールタンパク質(960 ng)およびコントロールとしてブタ精巣 20β -HSD精製品(21 ng)をSDS-PAGE (12% acrylamide gel, 10×14 cm, 0.1 cm thick, pH 8.8)で25 mA定電流、150 min泳動した。20%メタノールを含む0.1 M Tris-0.192 M glycine-0.02% SDS中で、ゲル中のタンパク質をニトロセルロース膜(Hibond-C, Amersham社製)上へ200 mA, 1 hrの条件でWestern blottingし、 20β -HSD特異抗体を用いて酵素-抗体法で 20β -HSD酵素タンパク質の染色を行った。その結果、サイトソール画分中の 20β -HSD酵素タンパク質存在比は明らかに幼若期(特に生後30日目)に多く、その後は加齢に伴い減少し成熟期ではその量は非常に少ないことを認めた。

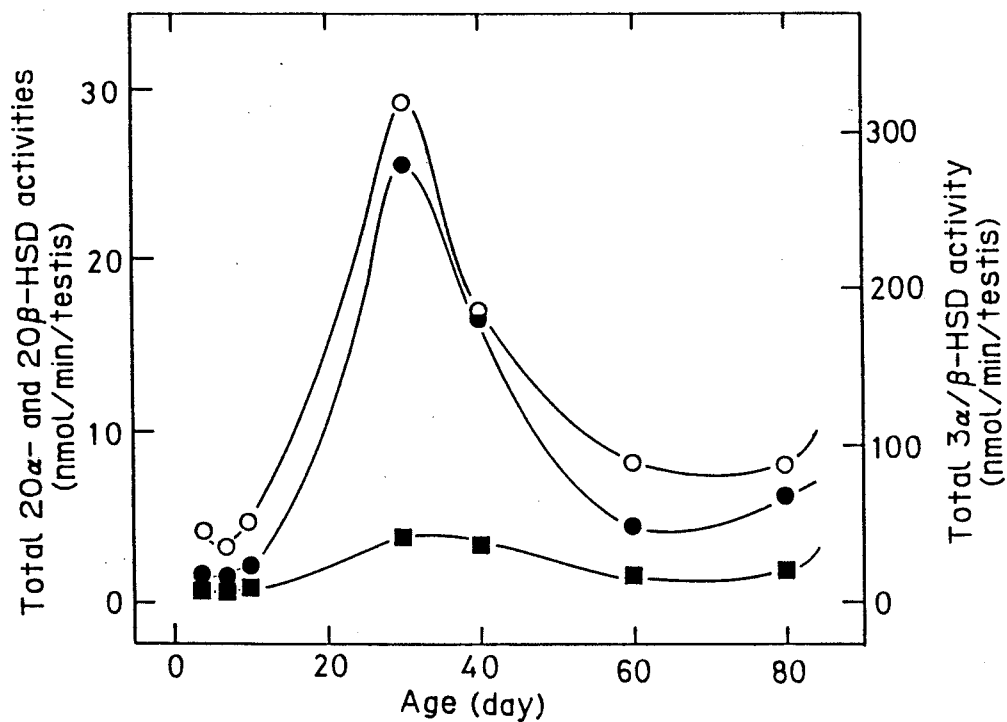


Fig.6-3. Changes in Total Enzyme Activities of $3\alpha/\beta$ -HSD, 20α -HSD and 20β -HSD in the Whole Testis Following the Maturation of Pig

The total enzyme activities indicated are: $3\alpha/\beta$ -HSD (○), 20α -HSD (■) and 20β -HSD (●).

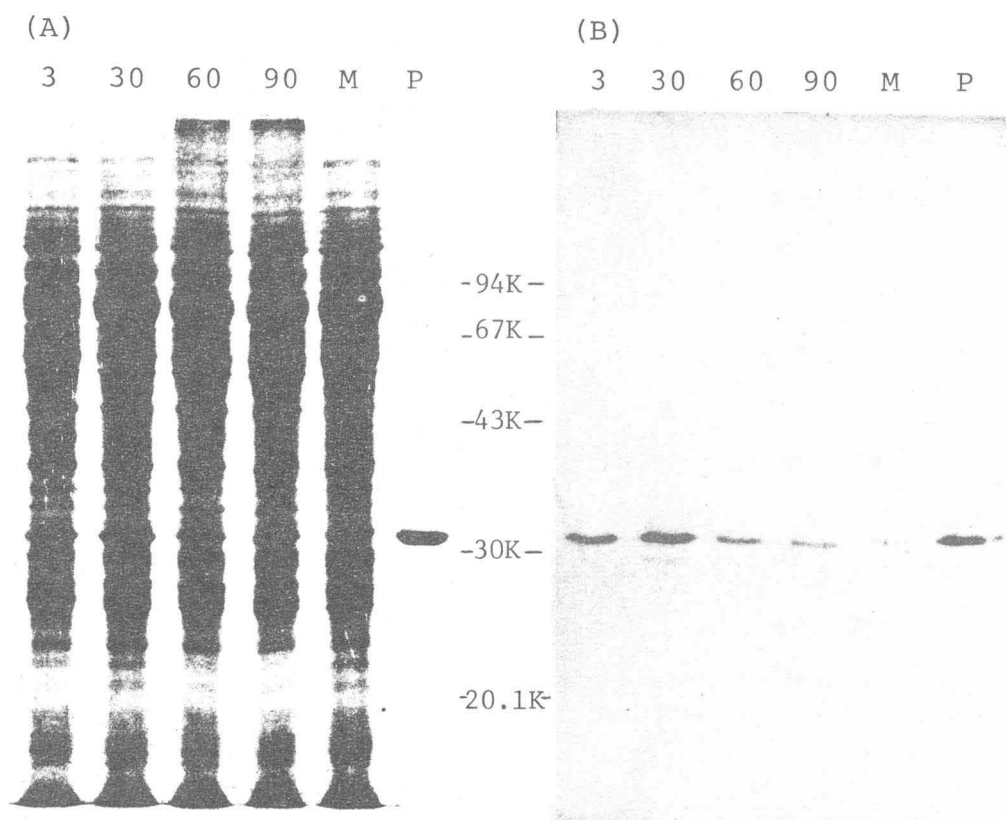


Fig.6-4. Changes in the 20β -HSD Content in the Cytosol Fraction Following the Maturation of Pig

(A): SDS-PAGE was carried out with 12% acrylamide gel ($10 \times 14 \times 0.1$ cm; pH 8.8), 25 mA, 150 min. Applied samples were 3, 3 days old; 30, 30 days old; 60, 60 days old; 90, 90 days old; M, matured (>1 year). All samples described were pig testicular cytosol preparations of $40\mu\text{g}$ each. P was purified pig testicular 20β -HSD $2.6\mu\text{g}$. The gel was stained with Coomassie Blue R-250.

(B): SDS-PAGE was carried out with the same condition as (A). Applied samples were: for 3, 30, 60, 90, M; 960 ng each, and for P; 21 ng. Western-blotting was carried out in 0.1 M Tris-0.192 M glycine-0.02% SDS containing 20% methanol from SDS-PAGE gel to nitro-cellulose membrane (Hibond C; Amersham), 200 mA for 1 hr. For the immunostain, 20β -HSD IgG (rabbit) and anti rabbit IgG (donkey)-horseradish peroxidase conjugate (Amersham) were used as the primary and secondary antibodies respectively. The color-reaction was carried out with 0.4 mg/ml DAB-0.009% H_2O_2 as the substrate of peroxidase.

第三節 モルモット精巣サイトソール画分中の $3\alpha/\beta$ -, 20α -および 20β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素活性の成育に伴う変動

モルモット精巣中ではブタ精巣と比較して、 20α -HSD活性に対して 20β -HSD活性値は低かったが、 $3\alpha/\beta$ -, 20α -および 20β -HSDの全ての活性を検出することができた。加齢に伴う各酵素活性の変動をFig.6-5.に示したが、 $3\alpha/\beta$ -HSD活性および 20β -HSD活性はいずれも生後1週間目にピークを示し、その後第4週間目までに急激に低下した。この生後3日から4週間目までの期間における $3\alpha/\beta$ -HSD活性および 20β -HSD活性の変動は互いに非常によく似ていた。しかし、第4週目以降において両者は全く異なった挙動を示し、 $3\alpha/\beta$ -HSD活性のみが高く得られるが、 20β -HSD活性は連続的に低下し第16週目ではその比活性はほぼ0となった。一方、ブタ精巣に比べてモルモット精巣中では特に 20α -HSD活性の変動が、 20β -HSDおよび $3\alpha/\beta$ -HSDに基づく活性の変動とは明確に異なり、第4週目まで連続的に上昇しそれ以後は比較的緩やかに低下することを認めた。

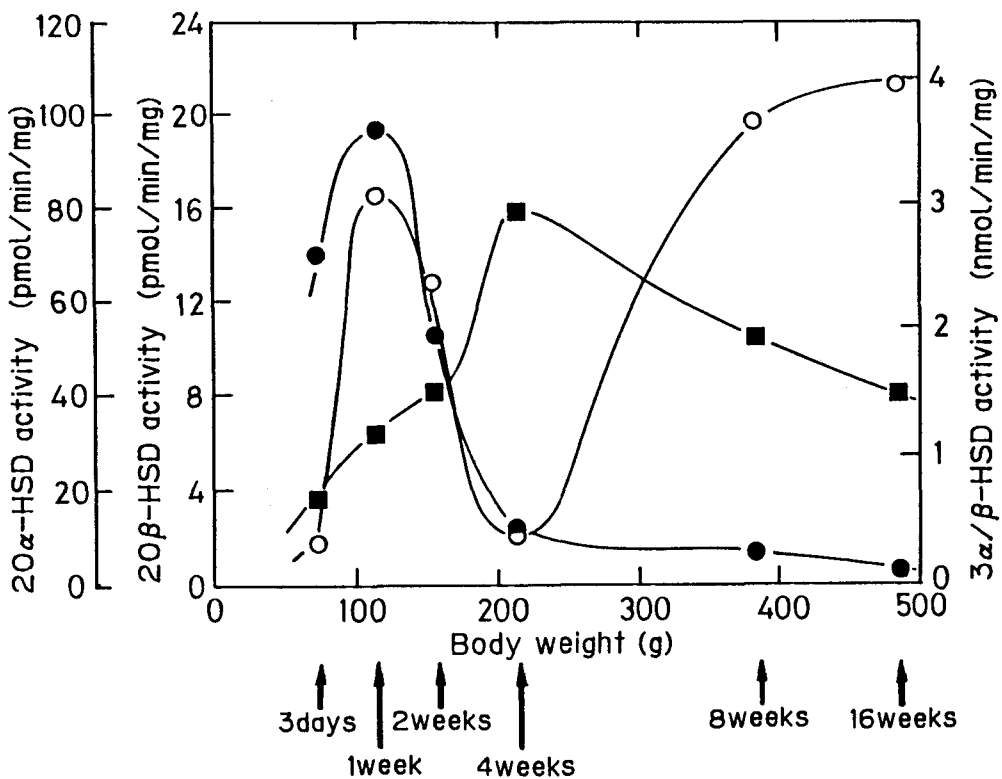


Fig.6-5. Changes in the Enzyme Activities of $3\alpha/\beta$ -HSD, 20α -HSD and 20β -HSD Following the Maturation of Guinea Pig

The specific activities plotted versus the body weight of guinea pigs (Hartley strain). Activities indicated are: $3\alpha/\beta$ -HSD (○), 20α -HSD (■) and 20β -HSD (●). The body weights were: 3 days, 76.2 ± 4.4 g, $n=5$; 1 week, 107.7 ± 4.1 g, $n=5$; 2 weeks, 153.1 ± 6.4 g, $n=5$; 4 weeks, 218.9 ± 6.2 g, $n=3$; 8 weeks, 391.1 ± 8.8 g, $n=3$; 16 weeks, 485.7 ± 4.0 g, $n=3$.

[4- ^{14}C]17 α -hydroxyprogesterone (370 Bq/20 nmol, for 20α - and 20β -HSD activities) or [4- ^{14}C]5 α -DHT (370 Bq/50 nmol, for $3\alpha/\beta$ -HSD activity) was incubated with cytosol fractions (0.81-1.45 mg, for 20α - and 20β -HSD or 1.62-2.90 mg for $3\alpha/\beta$ -HSD) in the presence of the NADPH-generating system in 1.0 ml of 50 mM KPB (pH 7.4) for 30 min at 37°C.

第四節 考察

20 β -HSD活性は幼若期の精巢中に多量に存在する一方、成熟期の精巢中にはほとんど存在しない。³³⁾ 通常は、成熟ブタ精巢および生後2週齢程度の去勢時に得られる幼若ブタ精巢を除くブタ精巢の入手は非常に困難であり、そのためブタの全成育過程を通して任意の時期に検体を得ることができなかった。また、それぞれのデータは精巢一個または数個で行ったため多少のばらつきが存在する可能性はあるが、生後10日および成熟（生後およそ1年）の精巢サイトソール画分中で得られた20 β -HSDおよび20 α -HSDの比活性はそれぞれ第二章で得られた値に対して再現性が認められた。

ブタ精巢中では20 β -HSD活性は幼若期に高く認められたが、その酵素活性は30日以後急激に低下した。また、20 β -HSD酵素タンパク質が全サイトソールタンパク質中に占める割合も30日以後は明らかに減少した。さらに、精巢の重さは確実に増加しているにもかかわらず、精巢一個当りのサイトソール画分中の総20 β -HSD活性も生後30日以後低下した。これらの結果より、精巢中での20 β -HSD活性の変化は酵素活性の変化あるいは酵素触媒のターンオーバー数の変化でなく、サイトソール画分中に存在する20 β -HSD分子数の変化に基づいていることを初めて明らかにしたが、おそらくこの変動は精巢中で20 β -HSDをコードするm-RNAの発現量の変化に基づいていると考えられる。

第五章中では、ブタ精巢20 β -HSD酵素分子がアンドロスタン類（C₁₉-ステロイド）に対する3 α / β -HSD活性を持つことを明らかにした。精巢のサイトソール画分中に含まれる全ての3 α / β -HSD活性が20 β -HSD酵素分子により触媒されているとは限らないが、幼若期の精巢中では20 β -HSDと3 α / β -HSD活性との間に成育に伴う比活性の変動および総活性の変動において類似性が認められ、成熟時では両活性間に明らかな差が認められた。それ故に、生後およそ80日以前の精巢中に存在する3 α / β -HSD活性（幼若期型）は20 β -HSDと同じ酵素分子により触媒されているが、成熟時の精巢サイトソール画分中に認められる3 α / β -HSD活性（成熟期型）は20 β -HSD以外の酵素分子により触媒されていることが

考えられる。さらに同様の結果がモルモット精巣サイトソール画分を実験材料とした場合にも得られた。モルモットの精巣はブタに比べ容易に入手できるので、生後3日より16週まで一群3-5匹を用いて実験を行った。モルモット精巣サイトソール画分中の 20β -HSD活性はブタ精巣に比べ低かったが、 $3\alpha/\beta$ -HSDはブタと同様に幼若期型と成熟期型の少なくとも2種の酵素分子種が存在し、幼若期型は 20β -HSD活性を持ち、成熟期型は持たないことが示唆された。

哺乳類における 20β -HSDおよび 20α -HSDの生理的存在意義は、現在のところ明らかにされているとはいえないが、 20α -または 20β -ヒドロキシステロイドである $17\alpha, 20\alpha$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one, 20α -hydroxy-4-pregnen-3-one および $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one がアンドロゲン生合成に直接的に関与しているチトクローム P-450 (17α -ヒドロキシラーゼ/ C_{17-20} -リアーゼ)活性を阻害すること、¹²⁾ さらに、これらの種のステロイドの中では、 20β -HSDにより触媒され生成すると考えられる 20β -hydroxy-5-pregnen- 3β -ol および $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-5-pregnen- 3β -ol が最も強く、同じチトクローム P-450活性を阻害することが報告され、¹³⁾ これらの現象から 20β -HSDがチトクローム P-450活性を阻害するステロイドを産生することによりアンドロゲン生合成の阻害に関与している可能性が考えられる。

一般にアンドロゲンは、androstenedione として貯蔵され小胞体内で 17β -HSD により testosterone に変換されて分泌され、 5α -reductase により活性化されて 5α -DHTとなり、さらにサイトソールに局在する 3α -HSDにより水酸化され排泄される。一方、testosterone の量は絨毛性性腺刺激ホルモンの分泌量とよく一致し、⁸¹⁾ 出生後一過性に上昇するが、この理由として胎児期から出生後続く高水準のLHにより testosterone の産生が行われ、まだ排泄系が確立していない状態で新生児が胎盤と切り離されるためと推定されている。⁸²⁾ このような背景のもとで、本来ステロイドの排泄に関与している $3\alpha/\beta$ -HSD活性が、ブタおよびモルモット精巣中でいずれも成育に伴い2相性の曲線を示し、その幼若期型のみが 20β -HSD活性を持つことから $3\alpha/\beta$ -および 20β -HSD活性は協同して幼若期の精巣中で特異的にアンドロゲンの生合成調節や代謝などに関

与している可能性が考えられる。

小括

- 1) ブタの成育に伴い、 20β -HSD活性は幼若期の精巢中で特異的に高く、生後30日以後急激に減少し成熟期まで変化はなかった。また、 $3\alpha/\beta$ -HSD活性は 20β -HSD活性と同様に幼若期に特異的に高く認められたが、成熟期には再び高い比活性を示し両活性間に差が認められた。
- 2) ブタ精巢サイトソール画分中の 3α -HSD活性と 3β -HSD活性比の成育に伴う変化は認められなかった。
- 3) ブタ精巢サイトソール画分中の $3\alpha/\beta$, 20β -HSD酵素タンパク質の存在量は、生後30日まで増加したが30日以後は減少を続け、成熟時では極めて微量であった。
- 4) ブタの成育に伴い精巢一個当りのサイトソール画分中に存在する総 20β -HSD活性は、生後30日でピークになり以後精巢重量は増大しているにもかかわらず低下した。また、総 $3\alpha/\beta$ -HSD活性の変化は幼若期において総 20β -HSD活性変化と非常に類似した曲線として得られたが、成熟期では両活性間に大きな差が認められた。
- 5) モルモット精巢サイトソール画分中には $3\alpha/\beta$ -, 20α -, 20β -HSDのいずれの活性も存在した。
- 6) モルモット精巢サイトソール画分中では成育にともない 20β -HSDと $3\alpha/\beta$ -HSD活性変動との間に、幼若期に高い比活性が存在する点で類似性が認められたが、ブタの場合と同様に成熟するにつれ両活性間に差が認められた。
- 7) ブタとモルモット精巢中の酵素活性変動の結果より、 $3\alpha/\beta$ -HSDは少なくとも2種以上の分子種が存在し、幼若期に発現する分子種のみが 20β -HSD活性を持つことが認められた。

第七章 総括

ブタ精巢 20β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素について以下の結果を得た。

- 1) 17α -hydroxyprogesterone を幼若ブタ精巢サイトソール画分と β -NADPH 存在下インキュベーションすることにより得られた主代謝物は、TLCの Rf値、HPLCおよびGCの retention time がいずれも標準ステロイドと一致すること、さらに $^1\text{H-NMR}$ 、MSによる分析結果から $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one であることを同定した。このことから、ブタの幼若時の精巢中に既知の 20α -HSDの他に、 20β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素 (20β -HSD) 活性の存在を明らかにした。
- 2) 20β -HSD活性はブタ精巢中でサイトソール画分に局在し、各種動物の精巢中では幼若期のブタに高く認められたが、その他にもモルモット、ラット精巢中に存在した。また同じブタ精巢中でも、幼若時には高いが成熟時には非常に低いことを認めた。
- 3) 20β -HSDを幼若ブタ精巢サイトソール画分を原料として硫安沈殿、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、ダイ-リガンドクロマトグラフィー、等電点電気泳動などにより精製し、その精製標品はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、ディスク電気泳動、ポリアクリルアミドゲル中での等電点電気泳動の結果、および HPLC のクロマトグラム上いずれも単一成分であることを認めた。また 20β -HSD活性は最終段階で用いた等電点電気泳動により多少失活したが、代わりにヒドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーにより同程度の精製が可能であった。
- 4) ブタ精巢 20β -HSDの等電点は5.2、分子量はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、ゲル濾過のいずれの方法においても30500と推定された。また、分子

中に糖は含まず、270 nmに吸収極大を示すタンパク質でpH 6.0, 30 minあるいは45℃, 30 minの処理に対して耐性を示し、45℃, 16 hrの処理でなお50%の酵素活性を示した。

- 5) ブタ精巢20 β -HSDの還元触媒活性は、[4-¹⁴C]17 α -hydroxyprogesteroneを基質として β -NADPH存在下、インキュベーションし、生成する[4-¹⁴C]17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-oneの放射能を測定することにより定量的な活性測定が可能であった。また、20 β -HSDが触媒する還元活性に関し、以下の酵素化学的諸性質を明らかにした。
- a) 至適pHは反応に使用する補酵素により異なり、 β -NADPHの場合には5.5、 β -NADHの場合には6.0である。
 - b) 至適温度は45℃である。
 - c) 重金属イオンCu²⁺、Hg²⁺ (1 mM)により強く酵素活性が阻害される。またSH化合物添加による著しい酵素活性変化は認められず、この点でブタ精巢20 α -HSD活性と異なる。
 - d) 17 α -hydroxyprogesterone, progesterone, pregnenolone, 11-deoxycorticosteroneを基質とするが、cortisone, cortisol, corticosteroneは基質としない。また、V_{max}値は17 α -hydroxyprogesteroneに対して最も高い結果が得られたが同時にK_m値も大きく、V_{max}/K_m値はprogesteroneが最も大きい。また Streptomyces hydrogenans 由来の20 β -HSDとは基質特異性に関して大きく異なる。
 - e) 補酵素には β -NADPHが最適であり、 β -NADH, α -NADPH, β -3'-NADPHなども補酵素となり得るが、 α -NADHは補酵素とならない。また、S. hydrogenans 由来の20 β -HSDとは補酵素要求性に関して異なる。
 - f) 20 β -HSDは、その還元反応において、還元型ピリジンヌクレオチド中のニコチンアミド基の4-Pro-S水素を選択特異的に利用する。
 - g) 代表的なステロイド代謝酵素阻害物質の中では、spironolactone, SU 10603, cyanoketoneにより10⁻⁵Mオーダーで阻害される。

- 6) ブタ精巣20 β -HSDは還元反応に限らず、 β -NADP⁺存在下 20 β -hydroxy-4-pregnen-3-one および 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one の20 β -水酸基の酸化反応も触媒することを認めたが、17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one を基質とした反応は 20 β -hydroxy-4-pregnen-3-one を基質とした反応に比べて非常に少ない酵素量で飽和に達することを明らかにした。また、20 β -HSDが触媒する酸化反応と還元反応とで活性化エネルギーを比較し、酸化反応の方がより小さいエネルギーで反応が進むことを認めた。
- 7) ブタ精巣20 β -HSDの酸化触媒活性は、[4-¹⁴C]20 β -hydroxy-4-pregnen-3-one を基質として β -NADP⁺存在下インキュベーションし、生成する [4-¹⁴C] progesterone の放射能を測定することにより、または 20 β -hydroxy-4-pregnen-3-one を基質とし、 β -NADP⁺ を補酵素として β -NADPH生成に伴う 340 nmの吸収変化を測定することにより20 β -HSD活性の定量的な測定が可能であった。また、20 β -HSDが触媒する酸化活性に関し、以下の酵素化学的諸性質を明らかにした。
- a) 至適pHは7.5である。
 - b) 補酵素として β -NADP⁺ を要求し、その他 β -NAD⁺、 β -3'-NADP⁺ も補酵素となり得る。
 - c) 基質は 20 β -hydroxy-4-pregnen-3-one が適しており、17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one も基質となり得るがタンパク質量変化に対する直線性領域が小さく、実験系の基質として適さない。
- 8) ブタ精巣20 β -HSDは補酵素 NADPH 存在下、C₁₉-ステロイドである 5 α -dihydrotestosterone (5 α -DHT) の代謝を触媒する高い酵素活性を示し、主代謝物は二次元TLCおよびTMS化したサンプルに基づくGCの結果より基質5 α -DHTの3 α -および3 β -水酸化ステロイドであることを同定した。このことから、20 β -HSDが同一分子中に3 α /3 β -HSD活性を持ち、その比活性の割合は3 α /3 β がおおよそ4/3であることを明らかにした。

- 9) ブタ精巣 20β -HSDが触媒する $3\alpha/\beta$ -HSD活性は 5α -DHTを基質とし、 β -NADPHを補酵素として β -NADPHの消費に伴う340 nmの吸光度変化を測定することにより定量的な測定が可能であった。また、 20β -HSDが触媒する $3\alpha/\beta$ -HSD活性に関し、以下の酵素化学的諸性質を明らかにした。
- a) 5α -DHTのみならずNADPHまたは NADP^+ 存在下、種々の 5α または 5β -ジヒドロステロイドに対する $3\alpha/\beta$ -HSDの酸化・還元両活性を持つ。
 - b) 補酵素として還元反応では β -NADPH、酸化反応では β - NADP^+ を要求し、その他の β -NAD(H)をはじめとする種々のピリジンヌクレオチドも比較的高濃度添加により補酵素となり得る。
 - c) 至適pHは5.5である。
 - d) 重金属イオン Fe^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} (1 mM)により強く阻害されるが、その他の重金属イオンでは阻害されない。
 - e) 基質 5α -DHTの還元はNADPH上の4-pro-S水素原子を選択特異的に利用する。

ブタ精巣 $3\alpha/\beta$ 、 20β -HSDが触媒する 17α -hydroxyprogesteroneを基質とする 20β -HSD活性と、 5α -DHTを基質とする $3\alpha/\beta$ -HSD活性とでは重金属イオンによる一部の結果を除き、補酵素要求性、至適pH、補酵素NADPHからの水素原子授受に関する立体特異性の点ではほぼ一致した結果が得られ、両活性が同一触媒部位により触媒されている可能性が示唆された。

- 10) ブタの成育に伴い、 20β -HSD活性は幼若期の精巣中で特異的に高く、生後30日以後急激に低下し成熟期まで変化はなかった。また、 $3\alpha/\beta$ -HSD活性は 20β -HSD活性と同様に幼若期に特異的に高く認められその後低下したが、成熟期には再び高い比活性を示し両活性間に差が認められた。また、成育に伴う 3α -HSD活性と 3β -HSD活性比の変化は認められなかった。さらにWestern blotting法により検討した、ブタ精巣サイトソール画分中の $3\alpha/\beta$ 、 20β -HSD酵素タンパク質の存在量は、生後30日まで増加したが30日以後は減少を続

け、成熟時では極めて微量であった。一方、精巣一個当りに存在する総 20β -HSD活性は、生後30日でピークに達し以後精巣重量は増大しているにもかかわらず低下した。また、総 $3\alpha/\beta$ -HSD活性の変化は幼若期において総 20β -HSD活性変化と非常に類似した曲線として得られたが、成熟期では両活性間に大きな差が認められた。

- 11) モルモット精巣サイトソール画分中には $3\alpha/\beta$ -、 20α -、 20β -HSDのいずれの活性も存在し、成育にともない 20β -HSDと $3\alpha/\beta$ -HSD活性変動との間に、幼若期に高い比活性が存在する点で類似性が認められたが、ブタの場合と同様に成熟するにつれ両活性間に差が認められた。ブタ精巣中に限らずモルモット精巣中でも同様の酵素活性変動が認められたことから、 $3\alpha/\beta$ -HSDには少なくとも幼若期型と成熟期型との2種以上の分子種が存在し、幼若期型の分子種が 20β -HSD活性を持つ $3\alpha/\beta$ 、 20β -HSDであることを明らかにした。このことから本酵素の生理的作用として、 $3\alpha/\beta$ -HSD活性および 20β -HSD活性が協同して幼若期の精巣中でアンドロゲンの生合成調節や代謝など幼若期に特有のステロイド代謝に関与している可能性が示唆された。

以上より、ブタ精巣 20β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素を精製し、その諸性質を明らかにすると共に、本酵素が polyfunctional な活性を持ち、幼若期の精巣中に特異的に発現される $3\alpha/\beta$ 、 20β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素であることを明らかにし、高等動物の精巣における本酵素の生理的存在意義について考察をした。

謝 辞

本研究に際し，終始御指導御鞭撻を賜り，さらに本論文の御校閲を頂きました星薬科大学生化学教室篠田雅人教授に謹んで感謝の意を表します。

また，終始本研究を御指導をいただき，的確なる御助言をいただいた生化学教室中陳静男助教授に心より感謝致します。

さらに，種々の御協力をいただいた星薬科大学微生物学教室入江昌親教授ならびに日本大学薬学部臨床薬剤学教室青木正忠教授，岡崎国立協同研究機構基礎生物学研究所生殖研究部門長濱嘉孝教授，田中実博士，足立伸次博士および部門員の皆様，また，星薬科大学生化学教室員および卒論生の皆様に心より感謝致します。

平成3年2月

引用文献

- 1) M. Shikita and B. Tamaoki, Biochemistry, 4, 1189 (1965).
- 2) M. Shikita, H. Inano, and B. Tamaoki, Biochemistry, 6, 1760 (1967).
- 3) F. Sato, Y. Takagi, and M. Shikita, J. Biol. Chem., 247, 815 (1972).
- 4) J.A. Pineda, M.E. Salinas, and J.C. Warren, J. Steroid Biochem., 23, 1001 (1985).
- 5) S. Nakajin, Y. Kawai, S. Ohno, and M. Shinoda, J. Steroid Biochem., 33, 1181 (1989).
- 6) W.G. Wiest, J. Biol. Chem., 234, 3115 (1959).
- 7) D.B. Gower, "Biochemistry of Steroid Hormons, Chapter 7," ed. by H.L.J. Markin, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1984, pp. 230-292.
- 8) R. Neher and A. Wettstein, Helv. Chim. Acta, 43, 1628 (1960).
- 9) B. Tamaoki, and M. Shikita, "Steroid Dynamics," eds. by G. Pincus T. Nakao, and J. F. Tait, Academic Press, New York, 1966, pp. 493-530.
- 10) H. Oshima, D.-F. Fan, and P. Troen, J. Clin. Endocrinol. Metab., 40, 426 (1975).
- 11) L.L. Engel, and L.J. Langer, Ann. Rev. Biochem., 30, 499 (1961).
- 12) H. Inano, H. Nakano, M. Shikita, and B. Tamaoki, Biochim. Biophys. Acta, 137, 540 (1967).
- 13) 中陳静男, 高橋一彰, 篠田雅人, 薬誌, 108, 1188 (1988).
- 14) B. Jalabert, J. Fish. Res. Board Canada, 33, 974 (1976).
- 15) F.W. Goets and G. Theofan, Gen. Comp. Endocrinol., 37, 273 (1979)

- 16) Y. Nagahama, K. Hirose, G. Young, S. Adachi, K. Suzuki, and B. Tamaoki, Gen. Comp. Endocrinol., 51, 15 (1983).
- 17) Y. Nagahama and S. Adachi, Dev. Biol., 109, 428 (1985).
- 18) H. Ueda, G. Young, L.W. Crim, A. Kambe-gawa, and Y. Nagahama, Gen. Comp. Endocrinol., 51, 106 (1983).
- 19) N.E. Stacey and P.W. Sorensen, Canadian J. Zoology, 64, 2412 (1986).
- 20) H.J. Hübener and C.O. Lehmann, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 313, 124 (1958).
- 21) H.J. Hübener, F.G. Sahrholz, J. Schmidt-Thomé, G. Neesemann, and R. Junk, Biochem. Biophys. Acta, 35, 270 (1959).
- 22) H.J. Hübener and J. Schmidt-Thomé, Ger. 1,075,521, Feb. 18 (1960).
- 23) G. Neesemann, H.J. Hübener, R. Junk, and J. Schmidt-Thomé, Biochem. Z., 333, 88 (1960).
- 24) H.J. Hübener and F.G. Sahrholz, Biochem. Z., 333, 95 (1960).
- 25) J. Schmidt-Thomé, G. Neesemann, H.J. Hübener, and I. Alester, Biochem. Z., 336, 322 (1962).
- 26) G. Neesemann, H.J. Hübener and J. Schmidt-Thomé, Biochem. Z., 336, 329 (1962).
- 27) T. Pocklington, and J. Jeffery, Eur. J. Biochem., 7, 63 (1968).
- 28) W. Gibb, and J. Jeffery, Biochem. J., 135, 881 (1973).
- 29) C.A.F. Edwards, and J.C. Orr, Biochemistry, 17, 4370 (1978).
- 30) F. Sweet, and B.R. Samant, Biochemistry, 19, 978 (1980).
- 31) R.C. Strickler, D.F. Covey, and B. Tobias, Biochemistry, 19, 4950 (1980).
- 32) L. Marekov, M. Krook, and H. Jörnvall, FEBS-Lett., 266, 51 (1990).
- 33) S. Nakajin, S. Ohno, M. Takahashi, K. Nishimura, and M. Shinoda, Chem. Pharm. Bull., 35, 2490 (1987).

- 34) M.J. O'Hara, E.C. Nice, R. Magee-Brown, and H. Bullman, J. Chromatogr., 125, 357 (1976).
- 35) A. Bensadown and D. Weinstein, Anal. Biochem., 70, 241 (1976).
- 36) W.F.J. Lauwers, L.L. Jeune, H.V. Bossche, and G. Willensens, Biomed. Mass Spectrom., 12, 296 (1985).
- 37) S. Nakajin, S. Ohno, and M. Shinoda, J. Biochem., 104, 565 (1988).
- 38) O. Vesterberg, "Methods in Enzymology," Vol. 22, ed. by W.B. Jakoby, Acad. Press, New York, 1971, pp. 389-412.
- 39) U.K. Laemmli, Nature, 227, 680 (1970).
- 40) L. Ornstein, Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 321 (1964).
- 41) B.J. Davis, Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 404 (1964).
- 42) C.W. Wrigley, J. Chromatogr., 36, 362 (1968).
- 43) J.E. Hodge, and B.T. Hofreiter, "Methods in Carbohydrate Chemistry," eds. by R.L. Whistler, and M.L. Wolfrom, Vol. 1, Acad. Press, New York, 1962, pp. 380-394.
- 44) V.J. Hearing, W.G. Klingler, T.M. Ekel, and P.M. Montague, Anal. Biochem., 72, 113 (1976).
- 45) S. Nakajin, S. Ohno, M. Aoki, and M. Shinoda, Chem. Pharm. Bull., 37, 148 (1989).
- 46) 中陳静男, 大野修司, 青木正忠, 篠田雅人, 薬誌, 108, 1219 (1988).
- 47) S. Ohno, S. Nakajin, and M. Shinoda, Chem. Pharm. Bull., "accepted"
- 48) D.L. Cinti, P. Moldeus, and J.B. Schenkman, Biochem. Pharmacol., 21, 3249 (1972).
- 49) S. Nakajin and P.F. Hall, J. Biol. Chem., 256, 3871 (1981).
- 50) M.J. O'Hara, J. Endocrinol., 59, 141 (1973).
- 51) P.-M. Yuan, S. Nakajin, M. Haniu, M. Shinoda, P.F. Hall, and J.E. Shivery, Biochemistry, 22, 143 (1983).

- 52) S. Nakajin, and P.F. Hall, J. Steroid Biochem., 14, 1249 (1981).
- 53) H. Sato, N. Ashida, K. Suhara, E. Itagaki, S. Takemori,
and M. Katagiri, Arch. Biochem. Biophys., 190, 307 (1978).
- 54) B.K. Stern and B. Vennesland, J. Biol. Chem., 235, 205 (1960).
- 55) T. Nakamoto and B. Vennesland, J. Biol. Chem., 235, 202 (1960).
- 56) G. Betz, and J.C. Warren, Arch. Biochem. Biophys., 128,
745 (1968).
- 57) J. Jarabak, and P. Talalay, J. Biol. Chem., 235, 2147 (1960).
- 58) H. Inano, and B. Tamaoki, Eur. J. Biochem., 53, 319 (1975).
- 59) M. Mori, K. Suzuki, and B. Tamaoki, Biochim. Biophys. Acta,
337, 118 (1974).
- 60) K. Suzuki, and B. Tamaoki, J. Steroid Biochem., 5, 249 (1974).
- 61) P. Talalay, F.A. Loewus, and B. Vennesland, J. Biol. Chem.,
212, 801 (1955).
- 62) W.H. Kersey and R.B. Wilcox, Biochemistry, 9, 1284 (1970).
- 63) F. Hatano-Sato, Y. Takagi, and M. Shikita, J. Biochem., 74, 1065
(1973).
- 64) I. Bjorkhem, and H. Danielson, Eur. J. Biochem., 12, 80 (1970).
- 65) M. Akhtar, D.C. Wilton, I.A. Walkinson, and A.D. Rahintula,
Proc. R. Soc. London, Ser. B, 180, 167 (1972).
- 66) 第十一改正日本薬局方解説書, 日本公定書協会, 廣川書店, 東京, 1986.
pp. C987-C992.
- 67) S. Nakajin, P.f. Hall, and M. Onoda, J. Biol. Chem.,
256, 6134 (1981).
- 68) A.M. Bongiovanni, W.R. Eberlein, A.S. Goldman, M. New,
Recent. Progr. Horm. Res., 23, 375 (1967).
- 69) Y. Higashi, M. Omura, K. Suzuki, H. Inano, H. Oshima,
Endocrinol. Jap., 34, 105 (1987).

- 70) 中陳静男, 高橋雅行, 篠田雅人, 薬誌, 105, 676 (1985).
- 71) S. Ohno, S. Nakajin, and M. Shinoda,
J. Steroid Biochem. Molec. Biol., "submitted".
- 72) E.M. Chambaz, and E.C. Horning, Anal. Letters, 1, 201 (1967).
- 73) A.N. Smirnov, J. Steroid Biochem., 36, 609 (1990).
- 74) S. Ohno, S. Nakajin, and M. Shinoda,
J. Steroid Biochem. Molec. Biol., "submitted".
- 75) M. Ficher, and E. Steinberger, Acta Endocrinol., 68, 285 (1971)
- 76) J.C. Coffey, F.S. French, and S.N. Nayfeh, Endocrinology,
89, 865 (1971).
- 77) H. Inano, Y. Hori, and B. Tamaoki,
Ciba Found. Collo. Endocrinol., 16, 105 (1967).
- 78) H. Inano, and B. Tamaoki, Endocrinology, 79, 579 (1966).
- 79) T. Tsujimura, and K. Matsumoto, Endocrinology, 94, 288 (1974).
- 80) W.N. Burnette, Anal. Biochem., 112, 195 (1981).
- 81) F.I. Reyes, R.S. Boroditsky, J.S.D. Winter, and C. Faïman,
J. Clin. Endocrinol. Metab., 38, 612 (1974).
- 82) 大島博幸, "ホルモンの生物化学3, ステロイドホルモンの生物化学,
第4章," 日本比較内分泌学会編, 学会出版センター,
東京, 1978, pp.94-129.