

氏 名(本籍)	大 野 修 司 (千 葉 県)
学 位 の 種 類	薬 学 博 士
学 位 記 番 号	甲 第42号
学位授与年月日	平成3年3月15日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当者
学位論文の題名	精巢20 $\beta$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素の精製と諸性質

論文審査委員	主 査 教 授 篠 田 雅 人
	副 査 教 授 入 江 昌 親
	副 査 教 授 河 内 佐 十

## 論文内容の要旨

精巢、卵巣、副腎、胎盤等では、コレステロールを原料として、種々の酵素により多段階にわたり触媒を受けることによりステロイドホルモンが生成されている。それらの酵素の中で、精巣には酸化還元酵素に分類され、C<sub>21</sub>-ステロイドの20位のカルボニル基を $\alpha$ 配位(S配位)に還元する20 $\alpha$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素(20 $\alpha$ -HSD: [EC1.1.1.149])の存在が明らかにされている。本論文では、幼若時のブタ精巢中において、20 $\alpha$ -HSD活性とは異なり、20位のケト基を $\beta$ 配位(R配位)に還元する20 $\beta$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素(20 $\beta$ -HSD: [EC1.1.1.53])が多量に存在することを見出し、その活性を触媒する酵素の精製に動物種においてはじめて成功し、精製標品を用いた諸性質の検討を行った。また、それらの結果から、精巣における本酵素の生理学的意義について考察を加えた。

17 $\alpha$ -hydroxyprogesteroneを幼若ブタ精巣サイトソール画分と $\beta$ -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R<sub>f</sub>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<sup>1</sup>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、ブタの幼若時の精巢中に既知の20 $\alpha$ -HSDの他に、20 $\beta$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素(20 $\beta$ -HSD)活性の存在を明らかにした。

20 $\beta$ -HSD活性は精巢中でサイトソール画分に局在しており、各種動物の精巢中ではブタに比較的高く存在し、モルモットおよびラットにもわずかに存在した。また同じブタ精巢中でも、その活性は幼若時では高く、成熟時では非常に低いことを認めた。

20 $\beta$ -HSDは、幼若ブタ精巣サイトソール画分を原料として硫酸沈殿、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、ダイーリガンドクロマトグラフィー、等電点電気泳動(またはヒドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィー)などにより高純度に精製し、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、等電点電気泳動、およびHPLCのクロマトグラム上いずれも単一バンドあるいは単一ピークであることを認めた。なお、精製標品の収量はサイトソール画分より0.56%、比活性は17 $\alpha$ -hydroxyprogesteroneを基質として4.08nmol/min/mgであり、同じくサイトソール画分より51倍に上昇した。

ブタ精巣20 $\beta$ -HSD精製標品の等電点は5.2、分子量はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、ゲル濾過の両方法においていずれも30500と推定された。また、分子中に糖は検出されず、270nmに吸収極大を

示すタンパク質であった。さらに、本酵素は生理的 pH 付近で、あるいは、熱処理に対して比較的安定であり、45℃、30分の処理に対して活性の低下はみられず、45℃、16時間の処理でもなお50%の活性が残存していたが、酸性領域 (pH 4.5 付近) では非常に不安定であった。

本酵素はその還元触媒活性において、17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone (Km, 9.4  $\mu$ M), progesterone (Km, 1.5  $\mu$ M), pregnenolone (Km, 4.0  $\mu$ M), 11-deoxycorticosterone (Km, 8.6  $\mu$ M) を基質とするが、11位にカルボニル基や水酸基を持つ cortisone, cortisol, corticosterone は基質とならなかった。また、Vmax値は、17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone に対して最も高い値 (9.6 nmol/min/mg) が得られたが、Km値も考慮すると Vmax/Km 値は progesterone に対して最も高い値 (2.93) が得られた。また、補酵素要求性に関して、17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone を基質とした反応では  $\beta$ -NADPH (Km, 17  $\mu$ M) が最適であり、 $\beta$ -NADH (Km, 1003  $\mu$ M),  $\alpha$ -NADPH (Km, 85.2  $\mu$ M),  $\beta$ -3'-NADPH (Km, 179.2  $\mu$ M) など高濃度添加により補酵素となり得るが、 $\alpha$ -NADHは補酵素とならなかった。また、至適 pH は補酵素によりわずかに異なり、 $\beta$ -NADPH の場合には 5.5,  $\beta$ -NADH の場合には 6.0 であった。また、至適温度は 45℃ であった。さらに、重金属イオン Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup> (10<sup>-3</sup> M) の添加により強く酵素活性が阻害されたが、SH 化合物添加による著しい酵素活性変化は認められなかった。ビリジヌクレオチドを補酵素とした還元反応においては、ニコチンアミド基の 4 位に存在する 2 個の水素原子のうちいずれかが基質に取り込まれるが、<sup>3</sup>H 標識 NADPH と <sup>14</sup>C 標識基質を利用したダブルトレーシングによりそのプロキラルティを検討した結果、20 $\beta$ -HSD は、還元型ビリジ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して基質の還元を行うことが明らかになった。また、本酵素は代表的なステロイド代謝酵素阻害物質の中で、特に spironolactone, SU 10603, cyanoketone により比較的強く (10<sup>-5</sup> M オーダー) で阻害された。

ブタ精巣 20 $\beta$ -HSD は還元反応に限らず、 $\beta$ -NADP<sup>+</sup> 存在下 20 $\beta$ -hydroxy-4-pregnen-3-one および 17 $\alpha$ , 20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one 中の 20 $\beta$ -水酸基の酸化反応も触媒することを認めたが、17 $\alpha$ , 20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one を基質とした反応は 20 $\beta$ -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触媒反応が飽和に達することを認めた。また、20 $\beta$ -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、pH 7.4 の条件下では酸化反応の方がより低いエネルギーで進むことを明らかにした。

ブタ精巣 20 $\beta$ -HSD の酸化触媒活性に関し、基質は 20 $\beta$ -hydroxy-4-pregnen-3-one (Km, 31.4  $\mu$ M) が最も適しており、その他に数種の 5-en-3 $\beta$ -ol 構造を持つ 20 $\alpha$ -水酸化ステロイドの酸化も触媒した。補酵素として  $\beta$ -NADP<sup>+</sup> を要求し、その他に高濃度領域で  $\beta$ -NAD<sup>+</sup>,  $\beta$ -3'-NADP<sup>+</sup> も補酵素となり得た。また、至適 pH は 7.5 であった。

ブタ精巣 20 $\beta$ -HSD は補酵素 NADPH 存在下、C<sub>21</sub>-ステロイドばかりでなく C<sub>19</sub>-ステロイドである 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone (5 $\alpha$ -DHT) の代謝を触媒する高い酵素活性を示し、この酵素反応による主代謝物は、TLC および GC の結果より基質である 5 $\alpha$ -DHT の 3 $\alpha$ -および 3 $\beta$ -水酸化ステロイドであることを同定した。この結果から、20 $\beta$ -HSD が同一分子中に 3 $\alpha$ -HSD および 3 $\beta$ -HSD の両活性 (3 $\alpha$ / $\beta$ -HSD 活性) を有し、その比活性の割合はおおよそ 4 : 3 であることを明らかにした。

ブタ精巣 20 $\beta$ -HSD が触媒するこの 3 $\alpha$ / $\beta$ -HSD 活性は、5 $\alpha$ -DHT ばかりではなく、種々の 5 $\alpha$  または 5 $\beta$ -ジヒドロステロイドを基質とすることができ、その酸化・還元を触媒した。また、この触媒活性は、補酵素要求性、至適 pH および金属イオンの影響等において、20 $\beta$ -HSD の触媒活性とよく類似していた。さらに、基質 5 $\alpha$ -DHT の還元には 20 $\beta$ -HSD 活性と全く同様に NADPH 上の 4-*pro*-S 水素原子を選択特異的に利用することなどから、本酵素の 20 $\beta$ -HSD 活性と 3 $\alpha$ / $\beta$ -HSD 活性は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。

精巣 $20\beta$ -HSD活性が幼若期に高く、成熟期にきわめて低いことから本酵素の成育に伴う活性変化を検討した結果、 $20\beta$ -HSD活性は幼若期の精巣（生後7～30日）で特異的に高く、生後30日以後急激に減少し、成熟期になっても変わらなかった。また、 $5\alpha$ -DHTを基質とした $3\alpha/\beta$ -HSD活性は、 $20\beta$ -HSD活性と同様に幼若期に特異的に高く、その後減少し、 $20\beta$ -HSD活性と同様な変動パターンを示した。しかし、 $3\alpha/\beta$ -HSD活性は、成熟期には再び高い活性を示し、この点で両活性間に差が認められた。また、成育に伴う $3\alpha$ -HSD活性と $3\beta$ -HSD活性の比に特に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本酵素タンパク質の量的変化は、生後30日まで増加したが30日以後は減少を続け、成熟期では極めて微量であった。また、成育に伴う両酵素活性の変動パターンは、ブタ精巣に限らずモルモット精巣においても同様に認められたことから、幼若期の $5\alpha$ -DHTの代謝に関与している $3\alpha/\beta$ -HSD活性は、本酵素である $20\beta$ -HSDによって触媒されており、成熟期に出現してくる $3\alpha/\beta$ -HSD活性は $20\beta$ -HSD以外の分子種によって触媒されていると考えられた。

以上の結果から、本酵素は幼若期にのみ特異的に多量に存在し、アンドロゲンの生合成調節や代謝など幼若期に特有な steroidogenesis に関与している可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

ステロイドホルモンはそれぞれの分泌器官において、コレステロール ( $C_{27}$ -ステロイド) から種々の酵素に支配されて生合成され、体内に分泌されている。 $20\beta$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素 ( $20\beta$ -HSD) はこれらステロイドホルモン生合成酵素の一質として、 $C_{21}$ -ステロイドの20位のカルボニル基を $\beta$ 配位 (R配置) に還元する脱水素酵素として知られている。

本論文は幼若ブタ精巣を原料として、高等動物からはじめて $20\beta$ -HSDを精製、単離し、その酵素化学的諸性質を明らかにするとともに、本酵素の精巣における生理的意義について検討し、次の諸知見を得ている。

$20\beta$ -HSDは精巣のサイトソール画分に局在しており、その含量に種特異性があり、ブタに多く存在し、その活性は幼若時に特に高いことを認めた。精製された本酵素は等電点pH 5.2, 分子量 30,500, 糖を含まないタンパク質であり、熱処理に対して比較的安定である。本酵素は選択特異的な補酵素要求性を示し、還元反応のみでなく、酸化反応をも触媒することを認めた。

さらに特筆すべきは、本酵素が $20\beta$ -HSD活性のみでなく、 $3\alpha/\beta$ -HSD活性をも併せ持つ多能性酵素であることを発見し、その酵素化学的性質も明らかにしている。

以上の結果は、ステロイドホルモンの内分泌機構の解明のみでなく、生殖生理学の領域にも寄与するところ大であり、薬学博士の学位論文として十分な内容と認める。