

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580142

研究課題名(和文)

アスコルビン酸の副腎皮質層特異的ステロイドホルモン産生系への関与とその分子機構

研究課題名(英文)

Function and the molecular mechanism of ascorbic acid in zone-specific steroidogenesis of the adrenal cortex

研究代表者

三谷 芙美子 (MITANI FUMIKO)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：60041852

研究成果の概要(和文):

本研究は、体内で最も濃度が高い(20mM) 副腎でのアスコルビン酸(Asc)の役割を副腎皮質の層別機能との関連から解明することを目的とした。遺伝的にAsc合成不能なラットを用い、Ascは球状層(zG)におけるアルドステロン生成に必須である通常の還元系に加えて補助的に電子を供与する因子となることを示唆する結果を得た。酸化されたAscを還元型に戻す系に関与するOmbがzGに多いこともAscがzGにおいてより重要であることを裏付けると考えられた。

研究成果の概要(英文):

The level of near to 20mM ascorbic acid (Asc) in the adrenal gland is the highest in a body. The purpose of this study was to investigate the possible participation of Asc in the zone-specific steroidogenesis. By employing rat mutants unable to synthesize Asc, Asc was shown to be a reducing factor supporting the classical reducing system specifically in aldosterone synthesis in the zona glomerulosa (zG). One of the components in the regeneration system of Asc, Omb, was abundant in zG, which seems to support above results.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品化学

キーワード：ステロイドホルモン、生理活性物質、副腎皮質、ビタミンC、P 450、アルドステロン、アスコルビン酸

1. 研究開始当初の背景

(1) ラットへのACTH投与に伴う、副腎からのアスコルビン酸(Asc)の急激な減少とそれに続くステロイドホルモン前駆体で

あるコレステロールの減少は、ステロイドホルモン産生とAscとの関わりを示唆した(1946年、Venning EHら)

(2) 1980年～1990年代、Harding BWら、

及び Yanagibashi K らにより、Asc のステロイド産生系における電子供与体としての役割が示唆された。

(3) 他方、Hornsby P らは、1980 年代、Asc は抗酸化剤として特にアルドステロン合成に關する酵素を保護すると主張した。

2. 研究の目的

副腎皮質は球状層、束状層、網状層の三層からなり、各々鉱質コルチコイド(アルドステロン: Aldo)、糖質コルチコイド(コルチゾール、ラットの場合はコルチコステロン: Cor)及び副腎性アンドロゲンを産生する(これを副腎の層別機能という)。これら皮質三層のうち、Asc が特異的に關する酵素系を検討し、その作用の分子機構を解明する。分子矯正医学(Orthomolecular Medicine)の一翼を担う Asc に新しい知見を加える。

3. 研究の方法

(1) 生体内の Asc 量とステロイドホルモン動態との関係の検討: ラットは Asc を体内で合成する。よって、遺伝的に Asc を合成できない骨形成不能ラット(ODS ラット)を用いた。ODS ラットは、飲料水に添加する Asc 量により体内の Asc 量を調整することが可能である。In vivo での Asc 量とステロイドホルモン量を HPLC 又は RIA assay にて測定した。

(2) 生体内の Asc 量と副腎皮質の層特異的ステロイドホルモン合成酵素の発現量及び活性との関係の検討: 申請者らが開発したラット副腎皮質層特異的ステロイドホルモン合成酵素(アルドステロン合成酵素: P450aldo 及び糖質コルチコイド合成酵素: P45011β)の特異抗体を用いて、体内の Asc 量に伴うこれら酵素の発現量を免疫組織化学的およびタンパク化学的に検討した。

(3) ステロイドホルモン合成の再構成系における Asc の作用機序の解明: ステロイドホルモン産生系は各反応を触媒する特異酵素のみならず、その酵素を還元する還元系も必要な複雑な系である。還元系を構成する因子も各々精製して in vitro の再構成系にて反応を詳細に検討した。特に P450aldo により3段階を経て進行するアルドステロン合成に關しては、そのどの段階に Asc が關与するかについても検討した。

(4) ステロイドホルモン合成酵素の大腸菌における大量発現と精製: 酵素の反応機構を検討するには精製した酵素が大量に必要となる。よって、P450aldo および P45011β の大腸菌での大量発現及び精製を試みた。酵

素発現にはタンパク質の folding が重要であることからシャペロニンを同時に発現する系を用いた。

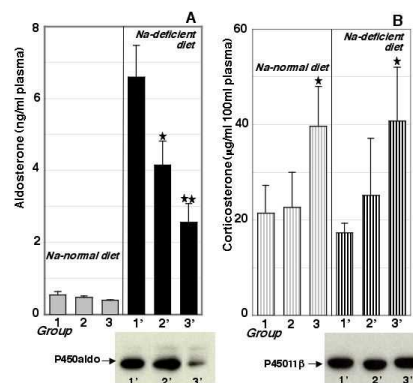
(5) ヒト副腎における Asc の關与の検討: ヒト副腎における層別機能局在については明確な報告が無い。申請者らはヒト副腎の P450aldo 及び P45011β の抗体の開発を試み、これを用いて免疫組織化学的手法により詳細にヒト副腎における層別機能局在を検討した。ヒト P450aldo の大腸菌における大量発現及び精製にも着手した。

4. 研究成果

(1) 副腎皮質のステロイドホルモン合成と体内 Asc 量との関係:

ODS ラットは前述のごとく飲料水に添加する Asc 量により体内の Asc 量を調整することが可能であった。飲料水を通常の 0.1% Asc 液から 0.009% Asc 液にすることにより、plasma、副腎、及び肝臓内の Asc 量は約 1/10 となった。

Na-欠乏食で飼育すると、0.1% Asc 群では plasma Aldo は正常 Na 食群に比べ 1.3 倍も上昇するが、0.009% Asc 群は 8 倍程度の上昇に留まった。一方、Cor 濃度には変化は見られなかった (Fig.1 参照)。Immunoblot により P450aldo および P45011β の発現量を検討した。どちらの群においても両 P450 の発現量に差は見られなかった (Fig.1 & 2 参照)。このこ



とは、Asc 量を通常の約 1/10 程度に抑えても、P450aldo 自体には影響はないが、生合成される Aldo 量に影響があることを示している。

Fig.1

体内 Asc 量のステロイド及びステロイド合成酵素への影響

- 1/1' : 0.01% Asc 飲料水、
- 2/2' : 0.009% Asc 飲料水、
- 3/3' : 0%Asc 飲料水

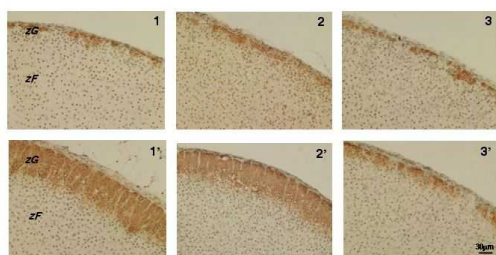


Fig.2

体内 Asc 量と P450aldo の副腎皮質における発現 (免疫組織化学的検討)

1, 2, 3: 正常 Na 食群、

1', 2', 3': Na 欠乏食群

(1/1', 2/2', 3/3': 各々 Asc 飲料水に違いあり。Fig.1 を参照)、P450aldo: 茶色に染色、zG: 球状層、zF: 束状層

(2) ステロイドホルモン再構成系における Asc の効果:

Na 欠乏食のもと 0.009% Asc 飲料水で飼育した ODS ラットの副腎球状層のミトコンドリア画分を P450aldo 源とし、精製した P450 還元系成分 (アドレノドキシニン及びアドレノドキシニン還元酵素) を添加して *in vitro* で Aldo 合成反応及び Cor 合成反応に対する Asc の効果を検討した。還元系のアドレノドキシニン還元酵素量を減少させたとき、Aldo 合成反応における 3 段階のうち特に最後の 18-水酸化に Asc の添加効果が現れることを見いだした (Fig.3 参照)。Cor の生成には影響しなかった。

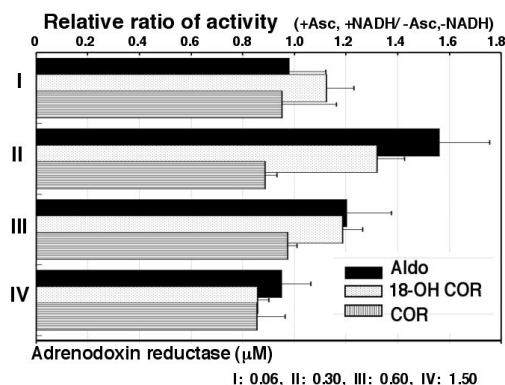


Fig.3

部分再構成系における Aldo 合成反応に対する Asc の効果

尚、Asc の酸化型を還元型にする特異的還元酵素系の一成分と考えられている Omb が副腎では球状層に多く発現していることを見いだしたが、この事実は Asc が皮質では 3 層のうちより球状層において作用していることを裏付けている (Fig.4 参照)

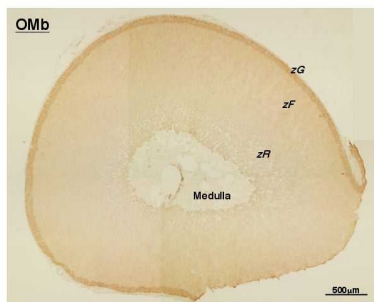


Fig.4

副腎における Omb の局在:

zG: 球状層、zF: 束状層、zR: 網状層

Omb: 茶色に染色

(3) P450aldo の大腸菌における大量発現と精製:

Asc の Aldo 合成への関与を分子レベルでより詳細に検討する為に、P450aldo を大腸菌に大量に発現することを試みた。種々の発現ベクターを模索したが、結局、pET-22b(+) に CYP11B2 遺伝子を *NdeI* と *EcoRI* サイトで挿入し、分子シャペロンである GroES-GroEL 複合体の共発現のもとに、BL21(DE3)pLysS に P450aldo を発現させることに成功した。現在、活性の高い P450aldo を効率よく精製することに着手している。

(4) ヒト副腎における P450aldo の検討:

ヒト P450aldo 及びヒト P450_{11β} 特異的抗体の作製に初めて成功した。これらの抗体を用いてヒト副腎におけるステロイドホルモン合成酵素の局在を検討した。ヒト副腎では、ラットと異なり、誘導的 CYP11B2 を発現する球状層細胞の他に、CYP11B2 を恒常的に発現している CYP11B2 cell cluster が存在することを免疫組織化学的に見いだした (J Clin Endocrinol Metab, 2010) (Fig.5 参照)。ヒト CYP11B2 への Asc の関与も分子レベルで検討すべく、大腸菌での大量発現を試みた。BL21(DE3)を、pET-22b(+)/human CYP11B2 と pGro12 (GroES-GroEL 発現プラスミド) の共存のもとに形質転換し、ヒト CYP11B2 の大量発現に成功した。現在、高度な精製を試みている。

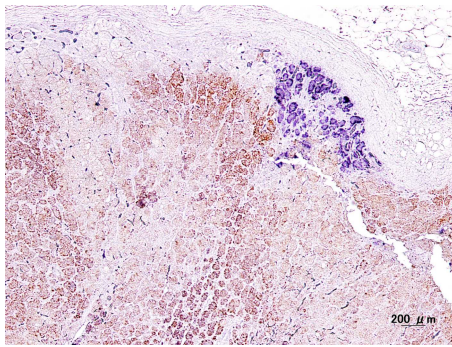


Fig.5.
ヒト正常副腎における P450aldo と P45011β の局在

P450aldo : 紫青色、P45011β : 茶色に染色

(5) 副腎皮質のステロイドホルモン合成における Asc の作用機序 (仮説):
Asc は副腎皮質においても抗酸化剤としての重要な役割を担う。しかし、副腎はステロイドホルモン産生という特殊機能を持つ。これまで得られた結果をもとに、Asc の副腎皮質固有の作用についてその仮説を Fig.6 に記す。Aldo 合成反応における 3 段階のうち特に最後の 18-水酸化に、従来の P450 還元系に加え Asc が補助的電子供与因子として作用していると考えられる。高度に精製した P450aldo を用いて更なる検討が必要である。

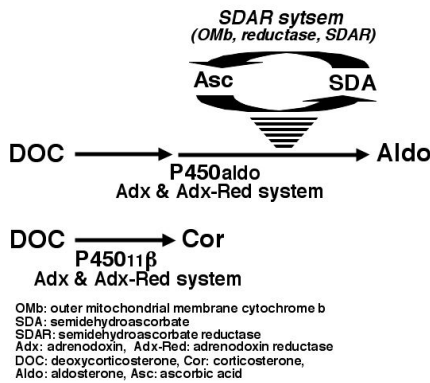


Fig.6
副腎皮質のステロイドホルモン合成における Asc の作用 (仮説)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計2件)

- (1) Nishimoto K, Nakagawa K, Dan L, Kosaka T, Oya M, Mikami S, Shibata H, Itoh H, Mitani F, Yamazaki T, Ogishima T,

Suematsu M and Mukai K.
Adrenocortical zonation in humans under normal and pathological conditions, J Clin Endocrinol Metab, 査読有, 95, 2010, 2296-2305

- (2) Ogishima T, Mitani F, and Suematsu M. Cytochrome P450 (17α) in beta-cells of rat pancreas and its local steroidogenesis, J Steroid Biochem Mol Biol 査読有, 111, 2008, 80-86

〔学会発表〕(計9件)

- (1) 三谷英美子, 荻島正, 上村修平, 向井邦晃 他, 2型糖尿病モデルラット副腎球状層における CYP17A の発現, 第83回日本生化学会大会, 2010年12月10日, 神戸

- (2) 荻島正, 上村修平, 三谷英美子, 向井邦晃 他, 2型糖尿病モデルラットのランゲルハンス島におけるステロイド合成酵素の発現, 第83回日本生化学会大会, 2010年12月10日, 神戸

- (3) 西本紘嗣郎, 三谷英美子, 向井邦晃 他, ヒト副腎皮質における自律的アルドステロン産生細胞クラスター, 第83回日本生化学会大会, 2010年12月10日, 神戸

- (4) Nishimoto K, Mukai K, Ogishima T. *et al.* Variegated zonation in human adrenal cortex, XIV Adrenal Cortex Conference, Adrenal 2010, June 16-18, San Diego, USA

- (5) Nishimoto K, Mukai K, Mitani F, *et al.* Adrenocortical zonation in humans under normal and pathological conditions, 第82回日本生化学会大会, 2009年10月21日, 神戸

- (6) Yoshino K, Ogishima T, Mitani F, *et al.* Localization of cytochrome P450 and production of local steroids in pancreatic β-cells, 第82回日本生化学会大会, 2009年10月21日, 神戸

- (7) Morizane S, Sano M, Moriyama H, Mitani F, *et al.*, 日本循環器病学会 2009, 2009年3月20日, 大阪

- (8) 吉野和寿, 山崎 岳, 三谷英美子, 向井邦晃 他, 膵臓 β 細胞が産生する局所ステロイドの合成と機能, 第81回日本生化学会大会, 2008年12月10日, 神戸

- (9) Dan L, Mukai K, Suzuki R, Mitani F and Suematsu M, A matricellular protein AZ-1

potentially functions as an endogenous angiostatic factor by antagonizing the angiogenic effects of VEGF、第 81 回日本生化学会大会、2008 年 12 月 10 日、神戸

〔図書〕(計 1 件)

(1) 上代、清水監訳、訳者：清水、市山、三谷 他、丸善株式会社、イラストレイテッドハーバー・生化学(原書 28 版) 2011、109-134

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

三谷 芙美子 (MITANI FUMIKO)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：60041852

(2) 研究分担者

向井 邦晃 (MUKAI KUNIAKI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：80229913