

ラット脳ミクロソームに存在するエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼの特性

誌名	佐賀大学農学部彙報
ISSN	05812801
著者	塚本, 卓治 中橋, 徹 矢田, 幸博
巻/号	63号
掲載ページ	p. 25-30
発行年月	1987年9月

ラット脳ミクロソームに存在するエストラジオール-2- ヒドロキシラーゼの特性：

肝ミクロソームのエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼとの比較*

塚本 卓治・中橋 徹・矢田 幸博・佐藤 正雄・稲葉 喬
(生物化学研究室)

昭和62年4月9日 受理

Characteristics of Microsomal Estradiol 2-hydroxylase in Rat Brain: Comparative Studies with Liver Microsomal Estradiol 2-hydroxylase

Takuji TSUKAMOTO, Toru NAKAHASHI, Yukihiko YADA,

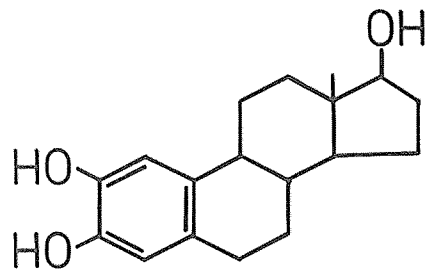
Masao SATO and Takashi INABA

(Laboratory of Biological Chemistry)

Received April 9, 1987

緒 言

哺乳動物におけるエストロゲンの代謝経路は、多様であるが、なかでもエストロゲンからカテコールエストロゲンへの水酸化反応はエストロゲン代謝の一つの主要な経路であると考えられている^{1,5)}。それらカテコールエストロゲンの中で、2-ヒドロキシエストラジオール (Fig. 1) は、エストラジオール-2-ヒドロキシラーゼの作用によって生成することが、まず、肝臓ホモジネートを用いた研究から証明された¹⁴⁾。しかしながら、このエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼの酵素化学的特性は、この酵素が不溶性画分に存在しているためとその活性測定が困難であったために、一時期、その活性が最も高い肝臓を用いての研究を通して、チトクロム P450 様の酵素であると考えられていたのみであった^{2, 12)}。しかし、最近、(2-³H) エストラジオールを基質とする高感度の“ラジオメトリックアッセイ”法⁵⁾の登場により、肝臓以外の多くの器官、なかでも特に、カテコールエストロゲンの標的器官と考えられている脳に存在するエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼに関する研究が盛んになってきた^{6, 9)}。



2-Hydroxyestradiol, 17β

Fig. 1 Chemical structure of 2-hydroxy-estradiol.

* 本論文の要旨は、日本生化学会九州支部会 (昭和61年5月, 福岡市) で発表した。

Fishman⁷⁾および筆者ら¹³⁾は、ラット脳ミクロソーム画分に存在するエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼが一部提唱されていた NADPH+H⁺依存性¹²⁾ではなく、NADH+H⁺依存性であることを示唆した。さらに、筆者ら¹⁴⁾は、カテコールアミンがラット脳ミクロソームのエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼの活性を制御することにより、性腺刺激ホルモンの分泌調節に関与している可能性を示唆した。

本研究では、ラット脳ミクロソームに存在するエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼの特性を肝ミクロソームのエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼと比較検討することにより調べた。

実験方法

1. 生物試料および飼育法 本実験を通じ6週令の雄の Wistar 系ラット (体重140~200 g) を九動株式会社から購入して使用した。なお使用するまで水と飼料 (ラット、マウス、ハムスター用固形飼料, 日本クレア株式会社) を十分に与えて22°C~25°Cで飼育した。

2. ラット脳および肝ミクロソーム画分の調製 ラットの首を骨折させて殺し、大脳および肝臓をすばやく取り出し、氷冷した0.32 M ショ糖溶液中で各組織の血管および血液をできる限り取り除いた。その際、肝臓内部の血液は灌流により除去した。その後、各組織の湿重量に対して4倍量 (W/V) の0.32 M ショ糖を含む10 mM Hepes (N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸) 緩衝液 (pH 7.8) を加え、テフロンガラスホモゲナイザーにより磨砕した。このホモジネートから Whittaker の方法¹⁵⁾に従い、段階的遠心分離により、ミクロソーム画分 (100,000 × g 沈殿物) を得た。得られたミクロソーム画分は0.155 M Tris (トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン) 緩衝液 (pH 7.4) で一度、洗浄した後、実験に供した。

3. (2-³H) エストラジオールの調製

2-ヨードエストラジオールを Hillman らの方法⁸⁾に従って合成した。この2-ヨードエストラジオールからの高比放射能 (2-³H) エストラジオールの調製は、英国の Amersham 社に依頼した。Amersham 社では、トリチウムガス気流中、Pd 触媒で2-ヨードエストラジオールの接触還元が行われ、高比放射能活性の (2-³H) エストラジオールが調製された。このようにして調製された (2-³H) エストラジオールはシリカゲルのカラムを用い、中圧クロマトグラフィーによって精製した。精製した (2-³H) エストラジオールは、Fig. 2 に示すように、シリカゲル薄層クロマトグラフィー的に均一であり、ラジオ化学的にも非常に純度の高いものであった。なお精製した (2-³H) エストラジオールの比放射能活性

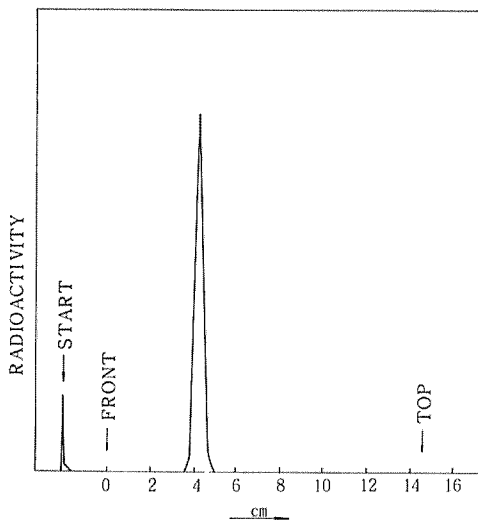


Fig. 2 Thin layer chromatography of purified (2-³H)estradiol. Silica gel chromatogram (Merck) was developed in a solvent system of chloroform-ethanol (95:5, V/V) for 50 minutes at 20°C. The radioactivity of (2-³H)estradiol was recorded by an Aloka JTC-203 radioscanner.

は19.9 C₁/mmolであった。

4. 活性測定法 (2-³H) エストラジオールを基質とする“ラジオメトリックアッセイ”法⁵⁾で測定した。すなわち、エタノールに溶解した(2-³H) エストラジオールを一定量とり、窒素気流で溶媒を除去した。これに Tris 緩衝液(pH 7.4, 終濃度0.1 M), グルコース-6-リン酸(終濃度5 mM)とグルコース-6-リン酸脱水素酵素(1 U/ml)を加えた。さらに、脳ミクロソームを用いた場合、20 μlの100 mM NAD(ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド), 肝ミクロソームの場合、20 μlの100 mM NADP(ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸)を加え、脳ミクロソーム画分(0.4~0.6 mgタンパク質/ml)または肝ミクロソーム画分(0.9~1.2 mgタンパク質/ml)を各々150 μl加えて総量を2.0 mlとした。この反応液を37°Cで15分間インキュベートした後、氷冷したデキストラン-チャコール溶液を等量加えることにより反応を停止した。次に、その混合物を遠心して得られた上清を等量のクロロホルムと混合し、さらにその水層を Amberlite XAD-2 カラムを通すことにより、ほぼ、³H₂Oのみを得ることができた。そのC-2水酸化によって生じた³H₂Oを液体シンチレーションカウンター(Aloka LSC-900)で、測定することにより、2-ヒドロキシエストラジオールの生成量を推定した。

結 果

1. 一酸化炭素による阻害 反応混合液(2.0 ml)に窒素、一酸化炭素をそれぞれ約10分間ずつ吹き込んだ後に、Table 1 に示す条件下でインキュベーションを行った。この場合、用いられた基質、(2-³H) エストラジオール、の濃度は肝ミクロソーム、脳ミクロソームの場合、ともに、1.0 μMであった。Table 1 に示すように肝ミクロソームのエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼの活性は、一酸化炭素により顕著に阻害された。一酸化炭素を導入後、そのまま反応混合液を密封した場合、2-ヒドロキシエストラジオールの生成はほとんど阻害され、コントロールのわずか7%であった。また、一酸化炭素を導入後、反応混合液を大気中にさらし、インキュベートしながら、この間、30秒ごとに一酸化炭素を導入(30秒間)した場合には、2-ヒドロキシエストラジオールの生成はコントロールの56%であった。また、反応混合液を高純度窒素にて密封した場合、2-ヒドロキシエストラジオールの生成はコントロールの約67%となり、反応混合液中には、ある程度の酸素が残留していたことが考えられる。

一方、一酸化炭素の脳ミクロソームのエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼに及ぼす影響は少なく、一酸化炭素にて反応混合液を密封した場合でも、2-ヒドロキシエストラジオールの生成はコントロールの70%を保持した(Table

Table 1 Effects of nitrogen and carbon monoxide on the formation of 2-hydroxyestradiol by liver and brain microsomes

Incubation conditions	2-hydroxyestradiol formation (% of control)	
	Liver	Brain
Atmosphere (Control)	100	100
N ₂ ^a	67	80
CO ^b	7	70
CO ^c	56	84

^a The incubation mixture was bubbled with N₂ gas for 10 minutes prior to incubation and completely sealed during the 15 minute incubation.

^b The incubation mixture was bubbled with CO gas for 10 minutes prior to incubation and completely sealed during the 15 minute incubation.

^c The incubation mixture was bubbled with CO gas for 10 minutes prior to incubation and bubbled with CO gas for 30 seconds at 30 seconds intervals during the 15 minute incubation.

1).

2. SKF-525A(β -ジエチルアミノエチルジフェニルプロピルアセタート)による阻害 肝および脳ミクロソーム画分に存在するエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼの活性は、ともに、SKF-525Aにより濃度依存的に阻害された。Fig. 3に示すように、肝のエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼ活性は、基質濃度が $2.5 \mu\text{M}$ の場合、 1.0 mM のSKF-525Aの存在下では、ほとんど消失した。また、エストラジオール-2-ヒドロキシラーゼの活性を50%阻害するのに必要なSKF-525Aの濃度は約 $33 \mu\text{M}$ であった。一方、SKF-525Aによる脳ミクロソームのエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼの阻害は、肝ミクロソーム酵素阻害

に比べはるかに弱く、低濃度の基質($0.1 \mu\text{M}$)を使用した場合でも、50%阻害を引き起こすのに必要なSKF-525Aの濃度は 5.0 mM であった。

3. ノルエピネフリンによる阻害 すでに報告¹⁴⁾しているカテコールアミンによるエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼ活性の阻害が、脳のエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼ

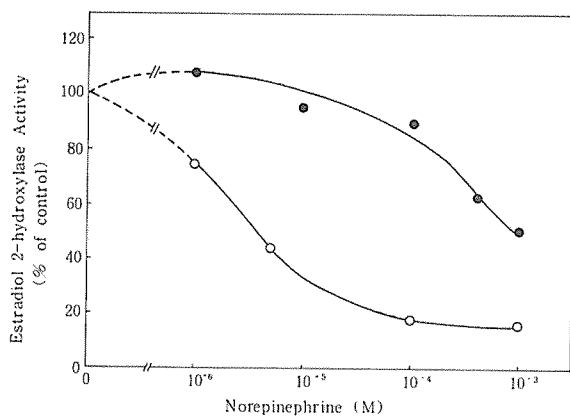


Fig. 4 Effects of norepinephrine on estradiol 2-hydroxylase activity in rat brain and liver microsomes. Rat brain microsomes (\circ) and liver microsomes (\bullet) were incubated with ($2\text{-}^3\text{H}$)estradiol in the presence of the indicated concentrations of norepinephrine for 15 min at 37°C . Values are the means of duplicate determinations from four experiments.

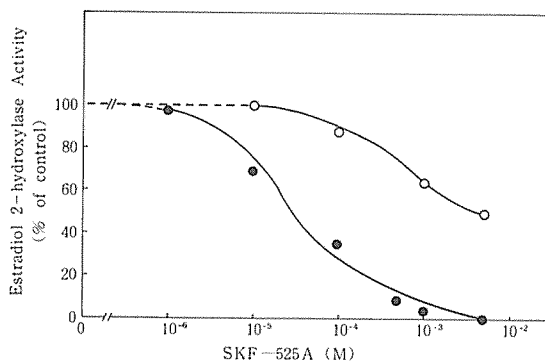


Fig. 3 Effects of SKF-525A concentration on estradiol 2-hydroxylase activity in rat brain and liver microsomes. Rat brain microsomes (\circ) and liver microsomes (\bullet) were incubated with ($2\text{-}^3\text{H}$)estradiol in the presence of the indicated concentrations of SKF-525A for 15 min at 37°C . Values are the means of replicate determinations from three experiments.

に特異的なものか、また、肝のエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼをも阻害するのかを検討するために、脳および肝ミクロソームを用いてカテコールアミン中、最もその阻害効果が高いと思われるノルエピネフリンの脳および肝ミクロソームのエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼに及ぼす影響を調べた。Fig. 4はその結果である。ノルエピネフリンの濃度が $1.0 \mu\text{M}$ から $100 \mu\text{M}$ の範囲では、脳ミクロソームのエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼに比べ、肝ミクロソームのエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼは、ノルエピネフリンによりほとんど阻害されず、有意義な阻害効果は、 $100 \mu\text{M}$ 以上の高濃度のノルエピネフリンによりはじめて観察された。また、Fig. 5に示すように、ラット脳ミクロソーム

のエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼのノルエピネフリンによる阻害は拮抗阻害であり、その阻害定数(K_i)は $10 \mu\text{M}$ と計算された。なお、ラット脳ミクロソーム画分に存在するエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼの K_m と V_{max} の値はそれぞれ、 $5.0 \mu\text{M}$ と $5.0 \text{ pmol}^3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ であった。

考 察

本研究では、ラット脳ミクロソームのエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼの特性に関する知見を、肝ミクロソームのエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼと比較検討することにより得た。その結果、脳ミクロソームのエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼは、肝ミクロソーム酵素とは異なり、一酸化炭素により強い阻害を受けず (Table 1)、さらに、活性中心に対するSKF-525Aの見かけ上の親和性は、肝ミクロソームのエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼの1%以下であった。

脳ミクロソームの薬物代謝酵素でチトクロムP450と考えられているアリルヒドロカーボンヒドロキシラーゼは肝ミクロソームのアリルヒドロカーボンヒドロキシラーゼに比べ、SKF-525Aによる阻害の程度が低いことが報告されている⁴⁾。しかしながら、この脳ミクロソーム酵素は一酸化炭素下で約20%の活性しか保持しなかった⁴⁾。一方、脳ミクロソームエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼは一酸化炭素下で約70%の活性を保持した (Table 1)。さらに、脳ミクロソームのエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼは肝ミクロソームのエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼと異なりコファクターとして $\text{NADH} + \text{H}^+$ を要求する^{7, 13)}。以上のことから、脳ミクロソームのエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼはチトクロムP450でない可能性が高く、少なくとも肝ミクロソームのエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼとは同一の酵素系ではないと考えられる。

ラット脳ミクロソームのエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼはノルエピネフリンにより拮抗的に阻害された (Fig. 5)。一方、ノルエピネフリンは肝ミクロソームのエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼを阻害する能力が低く (Fig. 4)、このことから、ラット脳と肝におけるミクロソームのエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼの特性が異なっていることがわかった。

2-ヒドロキシエストラジオールは哺乳動物脳において、ゴナドトロピンおよびプロラクチンの分泌調節に関係していることが提唱されている^{3, 11)}。したがって、ノルエピネフリンが、ラット脳ミクロソームのエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼの活性を調節することにより、ゴナドトロピンやプロラクチンの分泌調節に関与している可能性も考えられる。

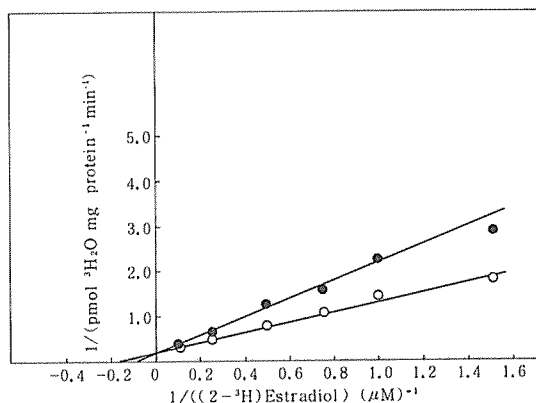


Fig. 5 Double reciprocal plot of velocity against ($2-^3\text{H}$)estradiol concentration in rat brain microsomal estradiol 2-hydroxylase. Rat brain microsomes were incubated with various concentrations of ($2-^3\text{H}$)estradiol for 15 min at 37°C in the presence (●) and absence (○) of $10 \mu\text{M}$ norepinephrine. Values are the means of replicate determinations from three experiments.

摘 要

ラット脳ミクロソームに存在するエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼの特性を肝ミクロソームのエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼと比較検討することにより調べた。チトクロムP450様酵素と考えられているラット肝ミクロソームのエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼは一酸化炭素により顕著に阻害されたが、脳ミクロソームのエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼは強い阻害を受けなかった。また、チトクロムP450の阻害剤として知られているSKF-525Aは、肝ミクロソームのエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼを濃度依存的に阻害し、基質濃度が $2.5\mu\text{M}$ の場合、50%の活性阻害に達するのに必要なSKF-525Aの濃度は $33\mu\text{M}$ であった。これに対し、脳ミクロソームのエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼのSKF-525Aによる阻害は、肝ミクロソーム酵素の場合よりもはるかに弱かった。

さらに、生理活性アミンの一つであるノルエピネフリンは脳ミクロソームのエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼを拮抗的に阻害したが、肝ミクロソームのエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼに対する阻害効果は低いものであった。

これらの結果から、ラット脳ミクロソームのエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼは肝ミクロソームのエストラジオール-2-ヒドロキシラーゼとは異なるものであると考えられる。

謝 辞

本研究にあたり有益なご助言をいただきました大阪大学蛋白質研究所今井嘉郎博士ならびに九州大学理学部三原勝芳博士に深謝します。また、2-ヨードエストラジオールの構造決定に御協力いただきました九州大学農学部桑野栄一博士ならびに佐賀大学理工学部近藤道男博士に深謝します。

引 用 文 献

1. Ball, P., H.O.Hoppen and R.Knuppen (1974). *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **355**, 1451~1462
2. Bolt, H.M., H.Kappus and R.Käsbohrer (1974). *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **39**, 1072~1080
3. Clarke, I.J., K.Wynne, J.W.Funder and J.K.Findlay (1982). *J. Endocrinol.*, **95**, 19~27
4. Das, M., P.K.Seth and H.Mukhtar (1981). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **216**, 156~161
5. Fishman, J. and B.I.Norton (1975). *Endocrinology*, **96**, 1054~1059
6. Fishman, J., B.I.Norton and E.F.Hahn (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**, 2574~2576
7. Fishman, J. and B.I.Norton (1983). *J. Steroid Biochem.*, **19**, 219~228
8. Hillman-Elie, A., G.Hillman and U.Schiedt (1953). *Z. Naturforsch.*, **86**, 436~440
9. Hoffman, A.R., S.M.Paul and J.Axelrod (1980). *Biochem. Pharmac.*, **29**, 83~87
10. King, R.J.B. (1961). *Biochem. J.*, **79**, 361~369
11. Lamberts, S.W.J., T. Verleun and R.Oosterom (1985). *Endocrinology*, **116**, 2631~2636
12. Paul, S.M., J.Axelrod and E.J.Diliberto (1977). *Endocrinology*, **101**, 1604~1610
13. 塚本卓治, 佐藤正雄, 矢田幸博, 稲葉 喬 (1983). *神経化学* **22**, 414~416
14. Tsukamoto, T., M.Sato and T.Inaba (1984). *Bull. Jap. Neurochem. Soc.*, **23**, 84~86
15. Whittaker, V.P. (1965). *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **15**, 39~96