



## BIPHASIC REGULATION BY DIBUTYRYL CYCLIC AMP OF STEROID 21-HYDROXYLASE ACTIVITY IN RAT HEPATOCYTES

|       |                                                                                                                |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| メタデータ | 言語: Japanese<br>出版者: 浜松医科大学<br>公開日: 2014-10-30<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者: 那須田, 馨<br>メールアドレス:<br>所属: |
| URL   | <a href="http://hdl.handle.net/10271/1028">http://hdl.handle.net/10271/1028</a>                                |

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

|       |                                                                                                                                                                |         |             |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|-------------|
| 学位記番号 | 医博第 175号                                                                                                                                                       | 学位授与年月日 | 平成 6年 3月25日 |
| 氏 名   | 那須田 馨                                                                                                                                                          |         |             |
| 論文題目  | BIPHASIC REGULATION BY DIBUTYRYL CYCLIC AMP OF STEROID 21-HYDROXYLASE ACTIVITY IN RAT HEPATOCYTES<br>(DIBUTYRYL CYCLIC AMP によるラット肝細胞でのステロイド 21-水酸化反応の 2 相性の調節) |         |             |

医学博士 那須田 馨

## 論文題目

BIPHASIC REGULATION BY DIBUTYRYL CYCLIC AMP OF STEROID 21-HYDROXYLASE ACTIVITY IN RAT HEPATOCYTES

(DIBUTYRYL CYCLIC AMP によるラット肝細胞でのステロイド21-水酸化反応の2相性の調節)

## 論文の内容の要旨

### 〔目的〕

ステロイド21-水酸化酵素は副腎外でもその活性の存在が確かめられている。ラット肝におけるステロイド21-水酸化反応は主に P450<sub>11C6</sub> によるとされ、副腎とは異なることが示されている。副腎でのステロイド21-水酸化反応の調節にはプロテインキナーゼ A を介する系のみでなく、プロテインキナーゼ C を介する系も関わっていることが知られているが、肝でのステロイド21-水酸化反応の調節については明らかになっていない。今回、ラット肝細胞におけるステロイド21-水酸化反応の調節機構を明らかにするため、ラット肝初代培養細胞を用い、cyclic AMP のアナログである dibutyryl cyclic AMP (dbcAMP)、アデニル酸シクラーゼの活性化物質である forskolin、プロテインキナーゼ A の抑制物質である N [2 - (methylamino) ethyl] 5 - isoquinolinesulfonamide (H-8)、及びプロテインキナーゼ C の活性化物質である 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA) のステロイド21-水酸化反応に及ぼす影響について検討した。

### 〔方法〕

8週齢の Sprague-Dawley 系雄ラットより、コラゲナーゼ灌流法により得た分離肝細胞を用いて初代培養細胞を作成した。4時間血清培地で培養後、無血清培地に変更、24時間培養の後

- (1) dbcAMP ( $10^{-11}$ ~ $10^{-3}$ M)
- (2) forskolin ( $10^{-7}$ ~ $10^{-3}$ M)
- (3) dbcAMP ( $10^{-11}$ ~ $10^{-3}$ M) + H-8 ( $10^{-5}$ M)
- (4) TPA ( $10^{-9}$ ~ $10^{-5}$ M)

を含んだ培養液に変更した。さらに24時間培養した後に洗浄し、基質としてprogesterone (P) のみを含んだ培養液に変更した。2時間の培養後、培養液を採取しステロイド測定用とした。細胞は水酸化ナトリウム水溶液で溶解し、蛋白測定を行なった。採取した培養液に内部標準物質としてデキサメサゾンを加え、ジエチルエーテルで抽出した。高性能液体クロマトグラフィーにてデオキシコルチコステロン (DOC) 画分を分取し、酵素免疫測定法により DOC を測定した。P から DOC への転換を細胞蛋白あたりに換算しステロイド21-水酸化酵素活性とした。

### 〔結果〕

- (1) dbcAMP は $10^{-11}$ M の低濃度では酵素活性を上昇させたが、 $10^{-5}$ 、 $10^{-3}$ M の高濃度では反対に低下させた。
- (2) forskolin は $10^{-7}$ M で酵素活性を上昇させたが、 $10^{-5}$ 、 $10^{-3}$ M では上昇はみられなかった。
- (3) 低濃度 dbcAMP による酵素活性の上昇は H-8 により変化しなかったが、高濃度 dbcAMP による酵素活性の低下は H-8 により消失した。
- (4) TPA による酵素活性の変化はみられなかった。

### 〔考察〕

ラット肝初代培養細胞におけるステロイド21-水酸化反応は、dbcAMPの濃度により刺激と抑制の2相性の調節がなされた。

forskolinはcyclic AMPを産生してステロイド21-水酸化反応を調節していると考えられる。

cyclic AMPがプロテインキナーゼAの調節サブユニットに結合すると、活性サブユニットは解離し活性化される。H-8は活性サブユニットに直接働き、その活性を抑制することが知られている。dbcAMPによるステロイド21-水酸化反応の抑制はH-8により消失したことから、活性サブユニットによる調節を受けていると考えられ、ステロイド21-水酸化酵素の調節遺伝子にnegative regulatory elementが存在する可能性や、活性サブユニットにより活性化される負の転写調節因子あるいは不活化される正の転写調節因子が関わっている可能性が考えられる。一方、dbcAMPによるステロイド21-水酸化反応の刺激はH-8により影響を受けないことから、活性サブユニットを介さず、調節サブユニットが直接調節に関わっている可能性や、プロテインキナーゼAとは異なるプロテインキナーゼやカルシウムイオンによる調節を介している可能性が考えられる。

TPAによるプロテインキナーゼCの活性化だけではステロイド21-水酸化反応に影響を与えないが、他の因子との相互作用により調節をすることも考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

ステロイド21-水酸化酵素は副腎以外にも存在し、ステロイドの代謝に関与していることが知られている。ラット肝におけるステロイド21-水酸化酵素は、P450<sub>11C6</sub>といわれ副腎のP450<sub>c21</sub>とは異なるものでその調節機構も未だ不明の点が多い。申請者は本酵素の調節機構を明らかにする目的で、ラット肝初代培養細胞に dibutyryl cyclicAMP (dbcAMP)、forskolin、N〔2-(methylamino)ethyl〕5-isoquinolinesulfonamide (H-8)、および12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)を各々加えた培養液中で24時間培養した後、ステロイド21-水酸化酵素活性を測定した。

### その結果

- ① dbcAMPは $10^{-11}$ Mの低濃度ではステロイド21-水酸化酵素活性を上昇させたが、 $10^{-8}$ ～ $10^{-6}$ の高濃度では活性を低下させた。
- ② 高濃度 dbcAMP 添加時にみられたステロイド21-水酸化酵素活性の低下は protein kinase A (PKA)の抑制物質であるH-8の添加により消失したが、低濃度 dbcAMPによる酵素活性の上昇はH-8により変化しなかった。
- ③ forskolinは $10^{-7}$ Mで酵素活性を上昇させたが、 $10^{-5}$ 、 $10^{-3}$ Mでは上昇はみられなかった。
- ④ protein kinase C (PKC)の活性化物質であるTPAは、酵素活性に影響を与えなかった。

以上のように本論文は、肝ステロイド21-水酸化酵素の調節機構に関して非常に興味ある成績を提示しており、今後の研究の方向を指示するものとして評価された。

本論文の審査の過程で次のような質疑がなされた。

- 1) dbcAMP添加後、酵素活性の上昇に要する時間
- 2) dbcAMPの細胞内移行率
- 3) dbcAMPの代わりに8-bromo-cAMPでも同様の結果が得られるか

- 4) forskolin の投与により細胞内の cAMP の濃度は上昇するか
- 5) 21-水酸化酵素活性の上昇は酵素の mRNA の増加と平行するか
- 6) forskolin 高濃度で21-水酸化酵素活性の低下がおこらず dbcAMP の結果との間に差を生じた理由
- 7) 刺激後の酵素活性の上昇に長時間を要する理由
- 8) c-AMP が PKA を介さないで作用する可能性があるとするならばその機序
- 9) CRE の inhibitory element の存在する可能性について
- 10) PKA の構造と機能
- 11) PKA とは異なる cAMP dependent の PK が存在する可能性
- 12) dbcAMP による長時間（24時間）の刺激により、PKA 以外の蛋白合成が関与する可能性について
- 13) 肝細胞の初代培養細胞を用いた理由
- 14) 肝ステロイド21-水酸化酵素を活性化する生理的活性物質

以上の質疑に対する申請者の応答は概ね適切で、本論文が博士（医学）の学位授与に値する内容を備えていると全員一致で判定した。

|         |    |     |         |    |     |         |
|---------|----|-----|---------|----|-----|---------|
| 論文審査担当者 | 主査 | 教授  | 吉 見 輝 也 |    |     |         |
|         | 副査 | 教授  | 市 山 新   | 副査 | 教授  | 藤 田 道 也 |
|         | 副査 | 助教授 | 鈴 木 和 雄 | 副査 | 助教授 | 中 村 達   |