

学位論文題名

酵素サイクリング法による 3α -ヒドロキシおよび 3-ケトステロイドの高感度比色定量法の開発と 酵素活性測定法への応用

学位論文内容の要旨

酵素活性測定法の高感度化は、蛍光法や発光法の利用を中心に追求されているが、酵素サイクリングを利用する方法も古くから検討されている。いろいろな種類がある酵素サイクリング法の中で、申請者は、サイクリング生成物の指示反応も兼ね備え、かつ高感度なサイクリング法として、脱水素酵素/NADH/チオ NAD からなる基質サイクリング法 (チオ NAD サイクリング系) が最も簡易な増幅定量法として利用できると考え、 3α -ヒドロキシステロイド脱水素酵素 (3α -HSD) を用いた 3α -ヒドロキシステロイド (3α -HS) および 3-ケトステロイド (3-KS) のチオ NAD サイクリング法について検討した。その結果、普及型の比色計を用いるだけで、 5α -アンドロステロン、 5β -アンドロステロン、 5α -ジヒドロテストステロン、 5β -ジヒドロプロゲステロンなどがサブピコモルからピコモルのレベルで簡易に、しかも数分間で測定できる定量法を開発することに成功した。

次いで、これらの高感度比色定量法を応用して、ステロイド 5α -還元酵素 (5α -SR) およびステロイド 5β -還元酵素 (5β -SR) の活性測定法について検討した。これら還元酵素の活性測定はステロイドホルモンが関係している生理的・病理的研究で必須の手法であるが、いずれの酵素も、その活性測定には酵素基質と代謝物の分離操作および高感度な検出法が必要なため、ラジオアイソトープを使用するか、複雑な前処理操作をとる LC-MS または GC-MS 法を使用しなければならず、従来から、より簡易な測定法の開発が求められていた。特に、 5α -SR の阻害剤は前立腺過形成や前立腺がんなどの前立腺疾患の治療薬として有用であることから、 5α -SR 阻害剤のスクリーニングに利用できる簡易な 5α -SR 活性測定法の開発が切望されている。申請者が開発した 3α -HS および 3-KS の高感度簡易定量法は、これら還元酵素の簡易測定に極めてよく適合する検出系としての特徴を備えていることから、 5α -SR 活性測定には 5α -ジヒドロテストステロンの高感度簡易定量法を検出系として利用し、 5β -SR 活性測定には 5β -ジヒドロプロゲステロンの高感度簡易定量法を検出系として利用する活性測定法について検討した。

その結果、 5α -SR 活性測定法の場合は、酵素基質であるテストステロンと代謝物 (5α -ジヒドロテストステロンおよび 5α -アンドロスタン- $3\alpha,17\beta$ -ジオール) の分離を必要としない極めて簡易な活性測定法を開発することに成功した。 5α -SR には 2 種類のアイソザイム (5α -SR1 および 5α -SR2) が存在し、前者は主に肝臓で、後者は主に前立腺で発現しているが、いずれも前立腺疾患の発症によって過剰発現することが知られている。そこで、ラット肝臓ミクロソームを試料とし、本法による 5α -SR1 活性測定法を開発した。また、ラット前立腺ミクロソームを試料とし、 5α -SR2 活性測定法も開発することに成功した。さら

に、5 α -SR の代表的な阻害剤であるフィナステリドを用い、本法が 5 α -SR 阻害活性の測定にも応用できることが確認できた。本法は、ラジオアイソトープを用いる従来の 5 α -SR 活性法に匹敵する感度を有する上に、極めて簡易な操作で、しかも短時間で活性測定が可能なることから、今後、5 α -SR が関係する内分泌研究の分野で活用できるのみならず、前立腺疾患の治療薬開発を目的とする、5 α -SR 阻害剤のスクリーニングのための簡易な手法としての活用が期待される。

一方、5 β -SR は、コレステロールから胆汁酸が生合成される過程で働く重要な酵素であり、この酵素活性の低下あるいは先天的欠損と肝障害の発症、特に新生児における重篤な肝障害の発症との関係に注目した研究は数多くなされている。また、5 β -SR は 4-エン-3-オン構造を有するテストステロン、プロゲステロン、コルチゾールなどの代謝的不活性化や活性化にも関与する酵素であり、ステロイドホルモンの代謝研究においても重視されている酵素である。さらに最近になって、プロゲステロンの 5 β -SR による代謝物である 5 β -ジヒドロプロゲステロンがプレグナン X 受容体の内因性リガンドであり、この受容体との結合を介して、5 β -ジヒドロプロゲステロンが薬物代謝酵素の一種である CYP3A1 を誘導することが明らかにされた。このことから、改めて 5 β -SR が注目されはじめ、その活性測定も重視されるようになったが、前述したように、従来の活性測定法は極めて煩雑であり、簡易な測定法が求められていた。そこで申請者は、5 α -SR 活性測定法の場合と同様な研究手法で、プロゲステロンを酵素基質に用い、代謝物である 5 β -ジヒドロプロゲステロンを酵素サイクリングで定量する、簡易で高感度な 5 β -SR 活性測定法を開発した。次いで、精製 5 β -SR を用いて本法の定量性を確認するとともに、ラット肝サイトソールを試料としても 5 β -SR の活性が、従来法に比して、極めて簡易に測定できることを確認した。

以上は 3-KS の高感度簡易定量法の酵素活性測定法への応用であるが、3 α -HS の高感度簡易定量法の活用法としては、アルカリホスファターゼや β -ガラクトシダーゼの高感度測定への応用が考えられた。すなわち、3 α -HS の 3 位をリン酸エステルあるいは β -ガラクトシドとし、これらを酵素基質とすると、アルカリホスファターゼや β -ガラクトシダーゼによる生成物である 3 α -HS が酵素サイクリング法で簡易に、しかも高感度で測定できるので、このような原理に基づいた、これら酵素の高感度比色法について検討した。アルカリホスファターゼや β -ガラクトシダーゼは ELISA における標識酵素あるいはレポータージーンアッセイにおけるマーカー酵素として汎用されており、これらの酵素活性が普及型の比色用マイクロプレートリーダーで高感度に測定できる意味は大きい。そこで、種々の 3 α -HS のリン酸エステルや β -ガラクトシドを合成し、それぞれの酵素反応における基質としての速度パラメータを調べた上で、アルカリホスファターゼの基質として 17 β -メトキシ-5 β -アンドロスタン-3 α -オールのリン酸エステルを、 β -ガラクトシダーゼのとしては 5 β -アンドロステロンの β -ガラクトシドを選択して、両酵素の活性測定法について検討した。これらの酵素活性は従来から p-ニトロフェニルリン酸エステルおよび o-ニトロフェニル- β -ガラクトシドを基質として用いる比色法が汎用されているが、申請者が開発したアルカリホスファターゼ活性測定法では従来法の 40 倍、 β -ガラクトシダーゼ活性測定法では従来法の 250 倍の高感度化が達成できた。これらの方法では普及型の比色用マイクロプレートリーダーで利用可能であり、今後は ELISA 等の検出系としての活用が期待される。

以上のように、本研究では、3 α -HSD を用いるチオ NAD サイクリングを利用して 3 α -HS や 3-KS の高感度簡易比色定量法を開発するとともに、その応用として、従来法に比して遥かに簡易な 5 α -SR および 5 β -SR 活性測定法、並びにアルカリホスファターゼと β -ガラクトシダーゼの高感度比色測定法を開発することに成功した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 三 浦 敏 明

副 査 教 授 菅 原 満

副 査 准教授 武 隈 洋

副 査 准教授 吉 村 昭 毅 (北海道医療大学)

大学院薬学研究科)

学 位 論 文 題 名

酵素サイクリング法による 3α -ヒドロキシおよび 3-ケトステロイドの高感度比色定量法の開発と 酵素活性測定法への応用

酵素活性の高感度測定は生命科学分野における重要な計測法の一つであるが、それらの計測法の中には特殊な設備・装置や複雑な前処理操作を必要とするものも多い。その代表的な例が、ステロイド代謝や活性化に参与する 5α -還元酵素(5α -SR)や 5β -還元酵素(5β -SR)の活性測定法である。これらの測定法はアイソトープを使用する上に、代謝物の複雑な分離操作が不可欠であり、より簡易な測定法の開発が切望されていた。

本論文は、 5α -SR および 5β -SR 活性の簡易測定法の開発を目的と、これらの酵素活性の簡易測定に最も適合する検出系として、 3α -ヒドロキシステロイド脱水素酵素(3α -HSD)を用いる酵素サイクリング法(過剰の NADH およびチオ NAD の共存下で 3-ケトステロイドに 3α -HSD を作用させる基質サイクリング、1分当たり 400-1000 回転のサイクリング率を示す)を選択し、分離操作を必要とせず、普及型の比色計で測定可能な 5α -SR および 5β -SR の簡易測定法開発に成功したものである。また、 3α -HSD を用いる 3α -ヒドロキシステロイドの酵素サイクリング法を利用して、アルカリホスファターゼ (ALP) および β -ガラクトシダーゼ (β -GAL) の活性測定法についても検討し、従来から繁用されている比色法のそれぞれ 40 倍および 250 倍高感度な活性測定法を開発することにも成功した。

すなわち、3-ケトステロイドである 5α -ジヒドロテストステロンおよび 5β -ジヒドロプロゲステロンの酵素サイクリングを利用し、それぞれがサブピコモルまで簡易に測定できる高感度比色定量法を開発した上で、これらを検出系に用いる 5α -SR および 5β -SR の高感度簡易比色測定法を開発した。これらの測定法はラット肝や前立腺マイクロソームの 5α -SR およびラット肝サイトソールの 5β -SR 活性の測定のみならず、前立腺疾患治療薬として期待される 5α -SR 阻害剤のスクリーニング法にも応用できることを示した。

一方、 3α -ヒドロキシステロイドとして 17β -Methoxy- 5β -androstane- 3α -ol および 5β -androstosterone の酵素サイクリングを利用した高感度簡易比色測定法も確立し、そのリン酸エステルあるいは β -ガラクトシドを酵素基質として利用する、ALP と β -GAL 活性の極めて高感度な比色測定法をそれぞれ開発した。これらの酵素は酵素免疫測定法やレポータ

ージーンアッセイ法における標識酵素あるいはマーカー酵素として生命科学領域で汎用されているものであり、今後、生命科学分野での活用が期待されるものである。

以上のように、著者は、普及型の比色計や比色用マイクロプレートリーダーでも容易に測定可能な 5 α -SR および 5 β -SR 活性測定法を開発するとともに、ALP と β -GAL 活性測定法の大幅な高感度化を達成したものであり、薬学領域をはじめとする生命科学領域の基礎研究や開発研究の進展に貢献する大きな成果を挙げた。

よって、著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。