



ラット黄体ミトコンドリアのCholesterol側鎖断裂酵素に対するProtein Kinaseの作用機序

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2009-08-25 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 稲葉, 俊夫 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://doi.org/10.24729/00009368">https://doi.org/10.24729/00009368</a>

# ラット黄体ミトコンドリアの Cholesterol 側鎖断裂酵素に対する Protein Kinase の作用機序

稲 葉 俊 夫

## Mechanism of Protein Kinase Stimulation on Cholesterol Side Chain Cleavage Enzyme System in Rat Luteal Cell Mitochondria

Toshio INABA

Laboratory of Veterinary Surgery, College of Agriculture

(Received October 30, 1982)

### Summary

In the mammalian ovary, after ripening and rupture of follicle, there is formed a corpus luteum. The corpus luteum secretes progesterone whose main action is connected with preparation for and maintenance of pregnancy. Although luteinizing hormone (LH) and prolactin are known to stimulate the production of progesterone in the corpus luteum, these mechanism are not well understood. The rate-limiting step of steroidogenesis in steroid-hormone-producing tissues is thought to be cholesterol side-chain cleavage (CSCC, HALL & YOUNG, 1968). The CSCC enzyme complex is considered to be a most probable locus for gonadotropic regulation of steroidogenesis in corpora lutea, although other enzymes and membrane sites have not been excluded. Beyond the initial gonadotropic impact, i.e., cAMP formation, the only recognized pathway for activation of steroidogenesis is via cAMP-dependent protein kinase. In the present investigation, the regulatory role of cAMP-dependent protein kinase on steroidogenesis has been studied in luteal cell mitochondria prepared from heavily luteinized prepubertal rat ovaries.

Studies on the subcellular distribution of protein kinase activity in the corpus luteum obtained from PMS-hCG treated rats revealed that  $72.4 \pm 3.4\%$  of total cellular protein kinase activity was in the cytosol fractions, and  $5.5 \pm 0.1\%$  of that was in the mitochondrial fractions, as cAMP-dependent.

Preliminary to more extensive studies of intracellular compartments as loci for the regulation of steroidogenesis, tightly coupled mitochondria from rat ovaries have been prepared by differential centrifugation. Morphological and functional intactness of these luteal cell components was demonstrated by electron microscopy and by having tightly coupled oxidative phosphorylation systems in their respiration. The major steroid products isolated, following incubation of mitochondria with labeled free cholesterol and L-malate, were pregnenolone and progesterone, which were characterized by chromatography and carrier recrystallization analysis. Progesterone synthesis by luteal mitochondria indicated not only that these organelles contained the CSCC enzyme system but that they also contained  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase complex.

To permit a more direct exploration of mitochondrial steroidogenesis, methods for radioimmunoassay of pregnenolone have been studied. Antiserum was generated in a rabbit against pregnenolone-16 $\alpha$ -carboxyethyl thioether conjugated to bovine serum albumin. The antibody, used for the assay of pregnenolone in extracts of serum and tissue homogenates, proved sufficiently specific to allow direct assay of extracts without chromatography. The accuracy and precision of the assay method for pregnenolone were satisfactory.

Using the radioimmunoassay method, net pregnenolone production in luteal cell mitochondria was determined. In the presence of 17 $\beta$ -hydroxy-4,4,17 $\alpha$ -trimethylandroster-5-eno-(2,3-d)-isoxazole and a suitable electron donor, cholesterol was converted to a single product, i.e., pregnenolone, in luteal cell mitochondria. Mitochondria secreted more pregnenolone when incubated with cAMP or partially purified cytosol protein kinase in the presence of 1 mM CaCl<sub>2</sub>. In the absence of Ca<sup>++</sup>, however, cAMP and protein kinase stimulation was not observed, suggesting the presence of a permeability barrier excluding extramitochondrial protein kinase from the CSCC enzyme system.

To clarify the possibility that Ca<sup>++</sup> is involved in LH induced intramitochondrial activation, the partially purified cytosol protein kinase was added to a solubilized preparation of the CSCC enzyme complex obtained from luteal cell mitochondria. After 30 min incubation, a stimulation of pregnenolone production was observed, suggesting that Ca<sup>++</sup> was not required for the direct stimulation of protein kinase on the solubilized CSCC enzyme complex. In the present study, it seems that Ca<sup>++</sup> facilitates the access of protein kinase to the CSCC enzyme complex in the mitochondrion.

It is observed that an interval of only 15 minutes occurred between the time of LH administration to rats and the demonstrable increase in progesterone production by ovary. If cholesterol is utilized by the CSCC enzyme complex which is located on the matrix side of the inner membrane, cholesterol molecules have to migrate across the mitochondrial membranes. The rate of "flip-flop" of cholesterol molecules in phospholipid bilayers, however, is known to be slow with a half-life of more than 1 hour in most cases. In order to explain the rapid response of LH, mitochondria were preincubated without sterol substrate. The addition of cAMP and cytosol protein kinase to cholesterol-depleted mitochondria caused a significant increase in pregnenolone production in the presence of Ca<sup>++</sup>, suggesting that protein kinase could stimulate cholesterol supply to the CSCC enzyme system.

It is concluded from these results that protein kinase stimulates cholesterol conversion to pregnenolone and progesterone in luteal cell mitochondria in the presence of Ca<sup>++</sup>, probably through the stimulation of cholesterol supply to the CSCC enzyme complex.

## 目 次

緒 言	139
第 1 章 Protein Kinase の細胞内分布	139
第 2 章 ミトコンドリアの Steroids 合成	142
第 3 章 Pregnenolone の Radioimmunoassay	145
第 4 章 cAMP の Cholesterol 側鎖断裂反応におよぼす影響	146
第 5 章 Protein Kinase と $Ca^{++}$ の Cholesterol 側鎖断裂酵素刺激作用	149
第 6 章 Cholesterol 側鎖断裂酵素に対する Protein Kinase の直接的刺激作用	153
第 7 章 Cholesterol 側鎖断裂反応と Cholesterol の関係	154
第 1 節 Aminoglutethimide の Cholesterol 代謝阻止作用	154
第 2 節 Cholesterol の Cholesterol 側鎖断裂酵素への結合におよぼす Protein Kinase の刺激作用	157
第 8 章 総 括	160
謝 辞	161
引用文献	161

## 緒 言

成熟した哺乳類の雌の卵巣では、次の世代を残すために卵の育成が行なわれるが、その他、妊娠の準備と維持、および泌乳などに必要な steroids の合成も行なわれる。

一般に、卵胞の成熟期には、estradiol に代表される estrogen が分泌され、そのフィードバックにより脳下垂体から一時的に大量の黄体形成 hormone (LH) 分泌が起り、その刺激により排卵が起る<sup>1)</sup>。排卵した後に黄体が形成され、黄体からは、progesterone に代表される gestagen が主に分泌される<sup>2, 3)</sup>。Progesterone は子宮粘膜の分泌機能を刺激して、妊娠に好都合な子宮の内部的環境を作る<sup>4)</sup>。その他、子宮内膜に着床した受精卵の発育をはじめ、妊娠期間を通じてその維持に progesterone が大きな役目を果たすことが知られている<sup>4)</sup>。

黄体からの progesterone の分泌は LH あるいは prolactin により促進されることはすでに早くから知られているが、その作用機序については prolactin はもちろん、LH についても未だ不明な点が多い。1968年 HALL & YOUNG<sup>5)</sup>により、黄体細胞では cholesterol から pregnenolone への変換が progesterone 合成における律速段階であり、LH はこの反応を司る cholesterol 側鎖断裂酵素 (CSCC 酵素) を促進することに関与することが示唆された。さらに、最近の研究により<sup>6-10)</sup>、LH が黄体細胞表面にある受容体に結合した後、黄体細胞内で cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate (cAMP) の量が増加することが明らかになっており、増加した cAMP は cAMP 依存性 protein kinase (PK) を介して、ミトコンドリア内の CSCC 酵素に働き、progesterone の生合成を促進するという経路が現在一般に受け入れられている。LH が黄体細胞内の PK を増加させるまでの機序は、上述したように最

近かなり明白になってきたが、しかし、それ以後の、PK の CSCC 反応促進の作用機序について、明確に説明を加えた報告は未だない。

著者は黄体の steroids 合成を促進する LH の作用機序の解明に寄与する目的で、幼若期雌ラットに性腺刺激 hormone を投与して過排卵を誘起し、同一日齢の均質な黄体のみを含む卵巣を形成させ、これら黄体についてミトコンドリアの CSCC 酵素に対する PK の作用機構を研究した。

なお、本論文中に用いた steroids の系統名と慣用名、ならびにその略記号の関係は表 1 に示した。

なお、本論文は、既報<sup>11-15)</sup>のほかに、未発表研究を追加して総合的にとりまとめ、昭和56年12月に大阪府立大学農学部に提出した学位請求論文の概要である。

## 第1章 Protein Kinase の細胞内分布

cAMP 依存性 PK は卵巣<sup>16)</sup>を含む多数の組織<sup>17)</sup>で同定されているが、ラット黄体細胞内における分布状態について検討した報告は未だない。

PK は regulatory subunit と catalytic subunit の2つの成分から構成されており、cAMP が regulatory subunit に結合すると、catalytic subunit は regulatory subunit から解離し、ある種の蛋白をリン酸化させる活性を示すことが明らかになっている<sup>18)</sup>。

最近の研究により、排卵前の卵巣と黄体は PK を含有しており、そのリン酸化能が cAMP によって高進することが示された<sup>19-21)</sup>。そして、この PK 活性の大部分が、少なくともウシ黄体では超遠心後の上清の分画に認められている<sup>19)</sup>。

本章では、ラット黄体細胞をホモジネートした後、遠心分離により細胞を分画し、それぞれの分画に含まれる PK 活性値を、histone 蛋白に対する [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP の<sup>32</sup>P 付加量によって測定した。

Table 1. Systematic, trivial names and abbreviation of steroids.

Systematic name	Trivial name	Abbreviation
5-cholesten-3 $\beta$ -ol	cholesterol	C
3 $\beta$ -hydroxy-5-pregnen-20-one	pregnenolone	Pn
4-pregnene-3, 20-dione	progesterone	P
20 $\alpha$ -hydroxy-4-pregnen-3-one	20 $\alpha$ -dihydroprogesterone	20 $\alpha$ -P

## I 実験材料および方法

### 1. 試薬類

[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP, ammonium salt (7.8 Ci/mmol) は New England Nuclear Corp. (Boston, MA) 社製のものを使用した。絨毛性性腺刺激 hormone (hCG)、cAMP、1-methyl-3-isobutyl-xanthine、histone (Type II A) および 脂肪酸除去 ウシ血清 albumin (BSA) は全て Sigma (St. Louis, MO) 社製品のものを使用した。妊馬血清性腺刺激 hormone (PMS) は Hormone Distribution Office, NIAMDD から入手した。液体シンチレータは Research Products International Corp. (Elk Grove, IL) 社製の Budget-solve<sup>®</sup> を使用した。その他の試薬および溶媒類はすべて市販品 (分析用) を使用した。

### 2. 実験動物

Holtzman 社 (Madison, WI) から入手した生後 26 日の雌ラットに 50 IU の PMS を皮下注射し、その 56 時間後に 25 IU の hCG を皮下注射した。hCG 投与後 8 日にラットを頸椎脱臼により殺して多数の開花期黄体を含んだ卵巣を採取し、ただちに 0.075 M sucrose、0.225 M mannitol、1 mM EDTA、および 1 ml 当り 1 mg の脂肪酸除去 BSA から成る溶液 (SMEB 溶液) に入れて、0 °C に冷却した。

### 3. 細胞分画法

BLOBEL & POTTER<sup>22)</sup>の方法に準じて、ラット黄体細胞を細分画した。すなわち、7 匹分の卵巣を眼科用メスでまとめて細切後、10 ml の SMEB 溶液を加え、モーター連動のテフロン・ガラス・ホモゲナイザーを用いて 8 回上下し、ホモジネートした。なお、ホモジネートと以下に示す遠心操作は 4 °C の状態で行なった。ホモジネートを 1,000 g で 10 分間遠沈した。1,000 g ペレットに 5 ml の 0.05 M Tris-HCl、0.025 M KCl、5 mM MgCl<sub>2</sub>、pH 7.5 溶液 (TKM 溶液) と 0.25 M sucrose を添加して懸濁し、ガーゼを用いてろ過後、1,000 g で 10 分間さらに遠沈した。このペレットに 12 ml の 1.4 M sucrose を添加した TKM 溶液を加えて懸濁し、これを 4 ml の 2 M sucrose を添加した TKM 溶液に重層した。105,000 g で 60 分間遠沈後、ペレットを 4 ml の SMEB 溶液で 1 度洗浄し、最終的に 0.7 ml の SMEB 溶液に懸濁して核分画とした。

最初に分離した 1,000 g 上清分画をさらに 8,000 g で 10 分間遠沈して、ミトコンドリアのペレットを分離した。このペレットを 4 ml の SMEB 溶液に懸濁し、8,000 g で 10 分間遠沈した。同様の操作でミトコンドリアのペレットを 3 回洗浄した。最終的に 1.1 ml の SMEB 溶液にミトコンドリアのペレットを懸濁した。

8,000 g 上清分画を 10,000 g で 15 分間遠沈し、上清をさらに 105,000 g で 1 時間遠沈して、マイクロゾームのペレットを分離した。最終的に 1.5 ml の SMEB 溶液にマイクロゾームのペレットを懸濁した。

105,000 g 上清はサイトゾール分画とした。

### 4. 分析方法

PK 測定については、FAKUNDING & MEANS<sup>23)</sup>の方法を一部変更して行なった。すなわち、反応溶液として、25  $\mu$ l の酵素溶液、5  $\mu$ l の 48 mM NaF、50  $\mu$ l の測定試薬溶液 (80 mM dl- $\alpha$ -glycerophosphate、0.3 mM [ $\gamma$ -<sup>32</sup>p] ATP、6 mM 酢酸マグネシウム、5 mg/ml histone、0.3 mM ethyleneglycol-bis( $\beta$ -aminoethylether) N,N'-tetraacetic acid、および 5  $\mu$ l の 20 mM dl- $\alpha$ -glycero-phosphate に溶解した 34  $\mu$ M cAMP、pH 6.5 を用いた。酵素溶液を試薬溶液に添加することによって incubate を開始し、30 °C で 10 分間行なった。反応終了後、試料溶液の 50  $\mu$ l を Whatman No. 3 MM ロ紙 (2  $\times$  2 cm) にとり、WASTILA<sup>24)</sup>らの方法にしたがいロ紙を洗浄した。核、ミトコンドリア、およびマイクロゾーム分画は PK を測定する前に、0.1% Triton X-100 で処置した<sup>25)</sup>。

蛋白量については、LOWRY らの方法<sup>26)</sup>により測定した。なお、結晶 BSA を標準物質として用いた。

## II 実験成績

DOWNING & DIMINO<sup>25)</sup>の方法に準じ、PMS-hCG 処置雌ラットから得た卵巣のサイトゾール分画に、硫酸アンモニウムの 15–50% 飽和液を加えて塩析した PK を用い、PK 活性を測定するための反応条件について検討した。その結果、2  $\mu$ M の cAMP を加えて、0–20 分間 incubate したとき、酵素反応は 10 分間の incubate 時間内では時間に比例して増加した。そして、PK 活性値は酵素蛋白 1 mg で 1 分間当り、1,008 pmol を示した。次に種々の量の酵素蛋白を

Table 2. Distribution of protein kinase in subcellular fractions of rat luteal cell

	Protein kinase activity (pmol <sup>32</sup> P incorporated/mg protein · min)		Activity ratio (-cAMP/+cAMP)	% of total protein kinase activity
	-cAMP	+cAMP		
Nuclei	105.9 ± 9.2	229.6 ± 14.7	0.461	1.8 ± 0.1
Mitochondria	77.2 ± 3.0	172.4 ± 2.7	0.448	5.5 ± 0.1
Microsome	279.6 ± 8.3	749.3 ± 20.8	0.373	20.3 ± 0.6
Cytosol	71.6 ± 2.9	384.0 ± 18.3	0.186	72.4 ± 3.4

Values represent the mean ± SE of four observations.

Nuclei, mitochondria, and microsome fractions were solubilized with 0.1% Triton X-100.

用いて、10分間 incubate すると、酵素反応は 200 μg の量までは酵素量に比例して増加した。そして、PK 活性値は cAMP 無添加のときには、単位蛋白量および単位時間当り 177 pmol を示し、2 μM の cAMP を添加したときには 1,001 pmol を示した。また、cAMP 無添加の時の値を添加した時の値で割ることにより得た活性比は 0.177 を示し、用いた PK が cAMP に大きく依存していることがわかった。

PK のラット黄体細胞内分布状態を検討した結果、表 2 に示したとおり、全細胞中の cAMP 依存性 PK の 72.4% はサイトゾール分画に集中して存在しており、20.3% がミクロソーム分画に、5.5% がミトコンドリア分画に、1.8% が核分画に存在していることが認められた。また PK 活性比は上記の順で大きくなり、cAMP への依存性が小さくなることを示した。

### III 考 察

細胞機能を変化させる cAMP のいままでに知られているただ一つの作用機構は cAMP 依存性 PK を活性化させることにより、細胞内蛋白のリン酸化と機能的変更を行なうことであると言われていた<sup>27)</sup>。LH と cAMP が仲介して細胞内 PK を活性化させた後、細胞内の可溶性および細胞内小器官に結合した蛋白は機能的に変更を受け得るという観点のもとで、本章ではラット黄体細胞内における PK の細胞内分布状態を検討したところ、成績に示したとおり、全細胞中の cAMP 依存性 PK の 72.4% はサイトゾール分画に集中して存在しており、5.5% がミトコンドリア分画にあるという興味ある知見が得られた。

in vitro 実験より、LH が 30 分以内で黄体細胞からの P 合成を刺激することが既に報告されており<sup>28)</sup>、LH の P 合成刺激は P<sub>n</sub> 合成増加を供ったものであることは一般に認められた事実であるから、本実験結果と考え併せると、ミトコンドリア内に存在する PK はミトコンドリア内の steroids 合成に関与していると考え、LH の速効性を説明する上できわめて好都合な結果である。

最近、DOWNING & DIMINO (1979)<sup>25)</sup> はウシ黄体スライスを用いて、LH がサイトゾール分画の PK のみならず、ミトコンドリア分画の PK をも活性化させることを示唆した報告をしており、これは上述の推論を支持するものである。しかし、LH がミトコンドリアへの C 輸送を促進するのか、生産された steroids の排出を促進するのか、あるいはミトコンドリアの CSCC 酵素を活性化するのかは未だ明白ではない<sup>6)</sup>。

一方、cAMP 不在下でも黄体ミトコンドリア内に単位蛋白量および単位時間当り、77 pmol の PK 活性が本実験結果で認められたが、この内因性 PK が解離した catalytic subunit なのか、cAMP 非依存性のものなのか現時点では決定し難い。

### VI 小 括

ラット黄体細胞内における PK の分布状態について検討した。

ラット黄体細胞をホモジネートした後、遠心分離により細胞を分画し、それぞれの分画に含まれる PK 活性を、histone 蛋白に対する [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP の <sup>32</sup>P 付加量によって測定した。

結果は、全細胞中の cAMP 依存性 PK の 72.4%

はサイトゾール分画に集中して存在しており、5.5%がミトコンドリア分画にあることが認められた。ミトコンドリア内の PK の生理的意義については第 4 および 5 章で述べる。

## 第 2 章 ミトコンドリアの Steroids 合成

卵巣ミトコンドリアは正常の呼吸チトクローム系に加えて、steroids 水酸化反応に関与する電子伝達系、すなわち CSCC 酵素系を有することが知られている<sup>29)</sup>。後者の電子伝達系は副腎皮質ミトコンドリアの steroids 水酸化<sup>30)</sup>と同様に、flavoprotein dehydrogenase、iron-sulphur 蛋白、およびチトクローム P-450 の 3 成分に分けられる<sup>31)</sup>。呼吸の電子伝達系は NADH に特異性を有するが、一方 CSCC 酵素の電子供給者は NADPH であると言われている<sup>32)</sup>。これら 2 つの電子伝達系は機能的に相関していると考えられている<sup>33)</sup>。

CSCC 反応において、C から P<sub>n</sub> へ至るまでに途中二、三の反応段階があることが知られている。すなわち、C<sub>20</sub> 水酸化と C<sub>22</sub> 水酸化を経て、C<sub>20</sub> と C<sub>22</sub> 間の側鎖断裂が起ることが知られており、このうちで 20 $\alpha$  水酸化反応が律速段階であると言われている<sup>35)</sup>。

近年、卵巣ミトコンドリアは CSCC 酵素以外に P 合成に必要な 4<sup>5</sup>-3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (4<sup>5</sup>-3 $\beta$ -SDH) をも含んでいることが示唆された<sup>35-37)</sup>。しかし、これらの報告では一般に実験に用いたミトコンドリア分画が機能性を有しているものか、およびマイクロゾームの混入がないものかを十分満足には検討していない。

本章では前章と同様の方法で調製したミトコンドリアを用いて、他の分画の混入の有無および steroids 生産能を調べた。

### 1 実験材料および方法

#### 1. 試薬類

New England Nuclear Corp. (Boston, MA) 社製 [4-<sup>14</sup>C]-C (54.0 mCi/mmol)、[7-<sup>3</sup>H]-P<sub>n</sub> (17.2 Ci/mmol)、および [1, 2, 6, 7-<sup>3</sup>H]-P (114 Ci/mmol) は使用直前に Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー<sup>38)</sup>により純化して用いた。非放射性 steroids、NADPH、glutamate、succinate、malate、ADP、および ATP は全て Sigma

(St. Louis, MO) 社製品のものを使用した。脂肪酸除去 BSA、hCG、PMS、および液体シンチレータは前章と同じものを使用した。その他の試薬および溶媒類はすべて市販品(分析用)を使用した。

#### 2. 黄体ミトコンドリアの分離法とその性状

前章と同様にして、PMS-hCG 処置ラットの黄体からミトコンドリアを分離した。

分離したミトコンドリア分画の 1 部を採り、3% glutaraldehyde を加えた、0.1 M sodium cacodylate 緩衝液、pH 7.4 で固定し、電子顕微鏡を用いて観察した。

ミトコンドリア分画の形態的評価を補足するために、細胞内局在酵素を測定することにより、他の分画の混入の有無を検討した。すなわち、PHILLIPS & LANGDAN の方法<sup>39)</sup>によりマイクロゾームに局在している NADPH-cytochrome c reductase の活性を測定した。

さらに、分離したミトコンドリアの機能を調べるために、MILLER & HUNTER<sup>40)</sup>の酸素電極法により、呼吸能力を測定した。

#### 3. ミトコンドリアの Incubation 実験

分離したラット黄体ミトコンドリアに [<sup>14</sup>C]-C を基質として加え、これに種々の補酵素を加えて incubate し、ミトコンドリアの steroids 合成に対する補酵素の影響を調べた。すなわち、ミトコンドリア分画に incubation 用の緩衝溶液 (0.225 M mannitol、0.075 M sucrose、10 mM リン酸カリウム緩衝液、pH 7.4、10 mM Tris 緩衝液、pH 7.4、0.2 mM EDTA、および試薬液 1 ml に対して 1 mg の脂肪酸除去 BSA) を、ミトコンドリア蛋白量 0.2~0.3 mg に対して 1 ml の割合で加えた。各 incubation フラスコにはミトコンドリア懸濁液、2% dimethyl sulfoxide に溶解した [<sup>14</sup>C]-C の 1.8 nmol (0.1  $\mu$ Ci)、および 1 mM の NADPH、5 mM の succinate あるいは 5 mM の L-malate のいずれか 1 つを入れた。Incubation は Dubnoff incubator を用いて 37°C で 0~120 分間、空気中で振とうしながら行なった。

反応終了後、[<sup>3</sup>H]-P<sub>n</sub> と [<sup>3</sup>H]-P をおのおの 0.01  $\mu$ Ci ずつトレーサーとして incubation 後の試料に添加し、回収率を計算した。放射性代謝産物の抽出については、ethyl ether-4:chloroform-1 (V/V) を用いて行なった。抽出時回収率は平均 96.7 $\pm$



2.0% (SE, n=31) を示した。抽出物に 5~50  $\mu\text{g}$  の非放射性 steroids を carrier として加えた。代謝物の分離については、hexane-formamide のペーパー・クロマトグラフィー<sup>4)</sup>を用いて行なった。放射活性部位は放射性クロマトグラム・スキャナー (Pakard 7201 型) を使って求めた。1 回目のクロマトグラムで、(1)C、(2) P+Pn、および(3) 20 $\alpha$ -P に相当する 3 分画に分け、各分画を methanol と acetone で溶出した。(2) の分画については、アセチル化した後再度クロマトグラフィーを行なった。単離したすべての放射性代謝産物に、15 mg の非放射性 carrier steroids を加えて、一定の比放射活性になるまで再結晶をくり返した。各放射性代謝産物の量については、再結晶操作で一定の比放射活性になった時に残っている量を基礎にした。

蛋白量については、前章と同様の方法<sup>26)</sup>により測定した。

## II 実験成績

### 1. ミトコンドリア分画の性状

電子顕微鏡検査の結果、作成したラット黄体ミトコンドリアの形態には障害を受けた形跡が認められず、きわめて少数のミクロゾーム以外は他の細胞内小器官の混入は一切認められなかった。

ミトコンドリア分画の形態的評価を補足するために細胞内局在酵素を測定することにより、他の分画の混入の有無を検討した結果、ミクロゾームに局在する NADPH-cytochrome c reductase 活性はミトコンドリア分画で全細胞中の約 4% を示した。こ

れは、ミトコンドリア分画には約 4% のミクロゾームが混入していることを示している。

作成したミトコンドリア分画における酸素電極法による呼吸能の測定結果では、succinate を基質にした時 respiratory control ratio は 3.19、glutamate では 2.11 を示したことにより、作成したミト

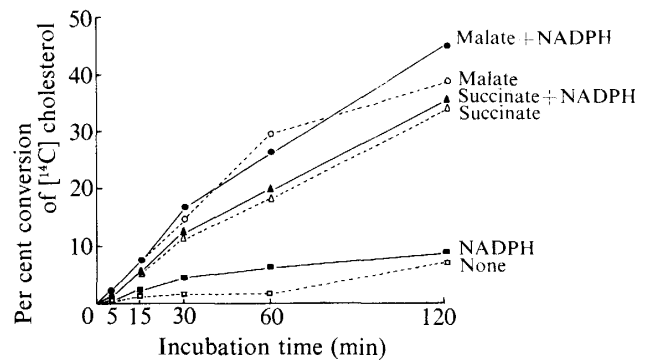


Fig. 1. Comparative efficiency of respiratory substrates in supporting the cholesterol-side-chain-cleavage reaction by rat luteal mitochondria.

Mitochondria fractions from ovaries of rats treated with 50 IU PMS and 25 IU hCG were incubated with [<sup>14</sup>C]-cholesterol (1.85 nmol, 0.1  $\mu\text{Ci}$ ) at 37°C for indicated time. Each of 5 mM energy substrates except for 1 mM NADPH was added to the incubation medium and incubation volume was 1.0 ml. The mitochondrial protein concentration was 0.24 mg/ml. After incubation, radioactive metabolites were extracted, isolated, and identified with the method of recrystallization to constant specific activity. Major metabolites were pregnenolone and progesterone.

Table 3. Recrystallization of pregnenolone and progesterone formed by mitochondria

Solvent	Specific activity (dpm/ $\mu$ mole)	
	Pregnenolone	Progesterone
Original	381	410
Methanol Crystal 1	385	392
Ethanol Crystal 2	400	381
Methanol Crystal 3	374	376
Ethanol Crystal 4	372	368

[<sup>14</sup>C]-Cholesterol was incubated with rat luteal cell mitochondria, extracted and chromatographed. The radioactive peaks corresponding to pregnenolone and progesterone were extracted and to each fraction 15 mg authentic cold steroid were added before recrystallization. Recrystallizations were carried out in the solvent systems mentioned.

コンドリア分画は十分な酸化的リン酸化反応系を保持していることが認められた。

## 2. ミトコンドリアの Steroids 合成

分離したラット黄体ミトコンドリアに  $[^{14}\text{C}]$ -C を基質として加え、これに種々の補酵素を加えて incubate し、ミトコンドリアの steroids 合成に対する補酵素の影響を調べた。

ミトコンドリアの incubation 液に NADPH を補酵素として添加したが、 $[^{14}\text{C}]$ -C の代謝は添加しない対照に比較して変化が見られなかった。これはおそらく、ミトコンドリアの膜を NADPH が通過し難いために起ったものと考えられる。L-malate を補酵素にした時、succinate よりもさらに効果的にミトコンドリアの steroids 合成を促進することがわかった (図1参照)。ミトコンドリアを  $[^{14}\text{C}]$ -C と L-malate といっしょに incubate した時、主代謝産物として Pn と P が検出された (表3参照)。一方、黄体ミトコンドリアにおいては  $20\alpha$ -P は合成されなかった。

## III 考 察

本章では steroids 合成の調節機序を追求していくために、まず準備したラット黄体のミトコンドリアの性状を検討した。

電子顕微鏡検査の結果、作成したミトコンドリアは電子密度の高い matrix で取り囲まれた tubulo-vesicular cristae を持っており、マイクロゾームの混入がきわめてわずかに認められた以外に他の細胞内小器官の混入は認められないことがわかった。DIMINO ら (1979)<sup>42)</sup> はブタ卵巣ミトコンドリアにおける steroids 生産とその形態との関係を詳細に検討し、steroids を生産していない幼若期のミトコンドリアは lamellar cristae になっており、卵巣のミトコンドリアは大きく pleomorphic cristae になり、P 生産の活発な黄体のミトコンドリアは tubulo-vesicular cristae をしていることを示唆した。本実験で得られたラット黄体ミトコンドリアの形態は DIMINO ら<sup>42)</sup> の指摘しているブタ黄体ミトコンドリアのそれによく一致しており、作成したミトコンドリアは steroids 合成を活発に行なっていることが推察された。

細胞内の NADPH-cytochrome c reductase 活性の測定結果より、作成したミトコンドリア分画に

は 4.2% のマイクロゾームが混入していることが示唆された。PHILLIPS & LANGDON<sup>39)</sup> はラット肝細胞内の本酵素の分布状態を検討し、精製したミトコンドリア分画においても 3.5% の活性を認めている。この報告より、本酵素はミトコンドリアにも本来少量存在しているという推論も成り立つ。一方、ラット精巣では小型のミトコンドリアを大型のマイクロゾーム顆粒から完全に分離するのはほとんど不可能だと言われており<sup>43)</sup>、著者の作成した黄体ミトコンドリアはほぼ満足すべき純度を有しているものと考えられる。

また、このようにして作成した黄体ミトコンドリアは succinate を基質とした時、respiratory control ratio は 3.19 を示した。この値は DIMINO ら (1976)<sup>44)</sup> の報告した正常値の範囲であることより、作成したミトコンドリア分画は十分な酸化的リン酸化反応系を維持していることがわかった。

作成した黄体ミトコンドリアの steroids 合成機能は succinate および L-malate を利用して、C から Pn と P への転換をさせる能力を調べることにより、十分維持されていることがわかった。Succinate と L-malate は機能的ミトコンドリアで見られるエネルギー依存性過程を経由してのみ C 転換を維持することが知られている<sup>45)</sup>。本実験成績では L-malate は succinate よりも CSCC 酵素のエネルギー供給者としてすぐれていることがわかった。この理由として、ROBINSON & STEVENSON (1971)<sup>46)</sup> はブタ黄体ミトコンドリアを用いた実験から、図2に示した経路で malate は直接 NADP に電子を伝達し、一方、succinate は flavoprotein を経由して呼吸の電子伝達系を介し、NADP に電子を伝達することを示唆しており、これよりラット黄体ミト

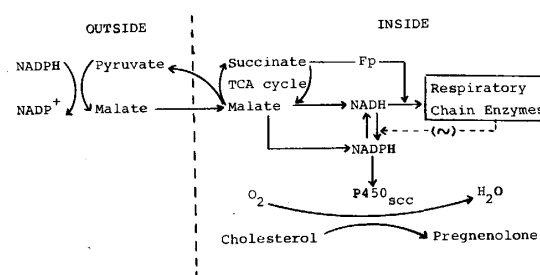


Fig. 2. The proposed pathway in luteal cell mitochondria for supplying reducing equivalents to support cholesterol conversion to pregnenolone.

コンドリアでも同様のことが起っているものと考えられる。

従来、性腺のミトコンドリアではCはPnに代謝され、生成したPnはミクロゾームでPに代謝されると言われてきたが<sup>47)</sup>、本実験成績に示したとおり、ラット黄体ミトコンドリアがNAD<sup>+</sup>を添加しなくてもP合成を行なうことは、黄体ミトコンドリアが4<sup>5</sup>-3β-SDH複合体を含有しているのみならず、十分量のNAD<sup>+</sup>と内因性の電子伝達系を經由して、NADHを再び酸化させる能力があることを意味している。同様の観察が、ブタ卵巣からのミトコンドリアを用いた他の研究者によってもなされている<sup>48)</sup>。

黄体細胞においてミトコンドリアとミクロゾームの両分画からPが生産されることは、黄体細胞は卵胞細胞よりもP合成能が大きいことを意味している。さらに、黄体細胞は異なった方法でミトコンドリアとミクロゾームによって合成されたPを操作している可能性がある。すなわち、ミクロゾームで生産されたPは、Pから以降の代謝産物の基質としてすぐに利用されるが、一方、ミトコンドリアで合成されたPは位置的にミクロゾームに存在する酵素から離れており、すぐには利用されないために細胞からよりたやすく分泌されるのかもしれない。

#### IV 小 括

前章と同様の方法で調製したミトコンドリア分画を用いて、他分画混入の有無、およびsteroids生産能を調べた。

電子顕微鏡検査の結果、ミトコンドリアの形態には障害を受けた形跡が認められず、きわめて少数のミクロゾーム以外は他の細胞内小器官の混入は一切認められなかった。

またこの観察はミクロゾームに局在するNADPH-cytochrome c reductase活性がミトコンドリア分画において4.2%を示したことから裏付けられた。しかも、酸素電極法による呼吸能の測定では、succinateを基質とした時、respiratory control ratioは $3.19 \pm 0.17$  (n=8)を示した。この値はいままで報告されて来た正常値の範囲であり、得られた分画に含まれるミトコンドリアは正常に近い呼吸能を維持していることが確かめられた。

次に、分離したラット黄体ミトコンドリアに[<sup>14</sup>C]-Cを基質として加え、これに種々の補酵素を加え

てincubateし、ミトコンドリアのsteroids合成に対する補酵素の影響を調べた。

その結果、呼吸を維持するsuccinateあるいはL-malateの添加では、ミトコンドリアは[<sup>14</sup>C]-Cを[<sup>14</sup>C]-Pnと[<sup>14</sup>C]-Pに転換した。これより、ミトコンドリアは呼吸によって得たエネルギーをsteroidsの水酸化に利用したものと考えられる。従来、性腺のミトコンドリアではCからPnまでの代謝が行なわれると言われて来たが、本実験により黄体ミトコンドリアがNAD<sup>+</sup>を添加しなくてもPの合成を行ない得る証拠を得た。この事実から、黄体ミトコンドリアは4<sup>5</sup>-3β-SDH複合体を含有しているのみならず、十分な量のNAD<sup>+</sup>と共に内因性の電子伝達系を經由して、NADHを再び酸化させる能力があると考えられる。さらに、CSCC反応に必須の補酵素であるNADPHの添加では[<sup>14</sup>C]-Cはほとんど代謝されず、このことから、ミトコンドリア膜はNADPHの通過に対しては障害となっていると考えられる。

### 第3章 Pregnenolone の Radioimmunoassay

前章の結果から、黄体ミトコンドリアではCからPnのみならずPまでが合成されることがわかった。そこで、ミトコンドリアにおけるsteroids合成を調査するには、PnとPの両方を測定する必要が起る。Pの微量定量法としてはradioimmunoassay (RIA)がすでに確立されているが、Pnの測定法については十分に満足できる微量定量法が目下、見当たらない。本章ではPnのRIA法について検討した。

その結果、Pnの抗原としてPn-16α-carboxyethyl thioether 牛血清 albuminを使用することにより、特異性のきわめて高い抗血清を作成し得た。この抗血清を使用して、ラット血清および卵巣のhexane抽出物を、純化操作を施すことなく、直接RIAの試料としてPn量の測定を試みた。また、純化操作を省略することの可否を確かめるために、hexane抽出物をSephadex LH-20マイクロカラムで精製した試料をもこのRIAにかけて測定し、直接法と比較した。その結果、両者の値には差を認めなかった。

本法の、測定内および測定間変位係数はそれぞれ9.1%と10.6%で、理論値と実測値との差は15%以

内であった。さらに、測定感度は最小 0.02 ng で、生体内の微量 Pn の測定に使用できることが明らかとなった。

なお、本章の項目については、既報<sup>11)</sup>を参照。

## 第4章 cAMP の Cholesterol 側鎖断裂反応におよぼす影響

第2章でラット黄体ミトコンドリアは  $\Delta^5-3\beta$ -SDH を含有しており、Pn から P の転換を行ない得ることを指摘したが、生産された P はラット肝ミトコンドリアでは酸化的リン酸化反応の阻害物質 (uncoupler) として作用することが incubation 実験で知られている。

In vitro の代謝実験においてミトコンドリアを灌流する方法を効率的に使い得るならば、流動的に基質を供給し、生産物を生産部位から速やかに取り除くことができるので、上述の uncoupler が生理的に意義があるものか判定できるはずである。したがって、従来の in vitro 実験よりも、より生体内に近い状態で steroids 生産機能を測定することができる。

SULIMOVICI & BOYD(1968)<sup>49)</sup>はラット黄体ミトコンドリアに cAMP を添加して incubate し、cAMP が Pn 生産を刺激することを示唆した。しかし、この機構は十分な説明がつけられず、cAMP が直接 steroids 水酸化酵素を活性化したか、あるいは生産された Pn をミトコンドリアから排出させるのを促進したのだろうと推測されていた。

本章では灌流方法を有効に用いて、cAMP と P 合成との関連を調べた。

### 1 実験材料および方法

#### 1. 試薬類

$N^6, O^2$ -dibutyryl cAMP ((Bu)<sub>2</sub>cAMP) は Sigma (St. Louis, Mo) 社製のものを使用した。[7-<sup>3</sup>H]-Pn、[1, 2, 6, 7-<sup>3</sup>H]-P、非放射性 steroids、hCG、PMS、脂肪酸除去 BSA、ATP、その他の試薬および溶媒類は第1～3章で述べたものと同じものを使用した。

#### 2. 黄体ミトコンドリアの分離法

第1章と同様にして、PMS-hCG 処置ラットの黄体からミトコンドリアを分離した。

### 3. ミトコンドリアの灌流方法

HASHIMOTO<sup>50)</sup>の方法、および装置をそのまま用い、ミトコンドリア分画を灌流した。すなわち、0.7～1.0 mg の蛋白を含有するミトコンドリア分画を図3に示した直径 2.5 cm のマイクロシリンジフィルターホルダー (Millipore) に入れ、灌流液 (0.225 M mannitol, 0.075 M sucrose, 10 mM リン酸カリウム緩衝液、pH 7.4, 10 mM Tris 緩衝液、pH 7.4, 0.2 mM EDTA 1 mg/ml 脂肪酸除去 BSA、200  $\mu$ M ATP、および 5 mM L-malate) を流した。灌流液の中に 0～100  $\mu$ M の C を 2% dimethyl sulfoxide に溶解して添加した。95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> のガスで飽和した灌流液を、マスターフレックスポンプ (Cole-Parmer Inst. Co.) を用いて10分間当り 3 ml の速度で流した。ポンプ以外の灌流装置は 37°C 温浴槽の中で維持した。灌流後の液は10分毎に採取し、4時間行なった。

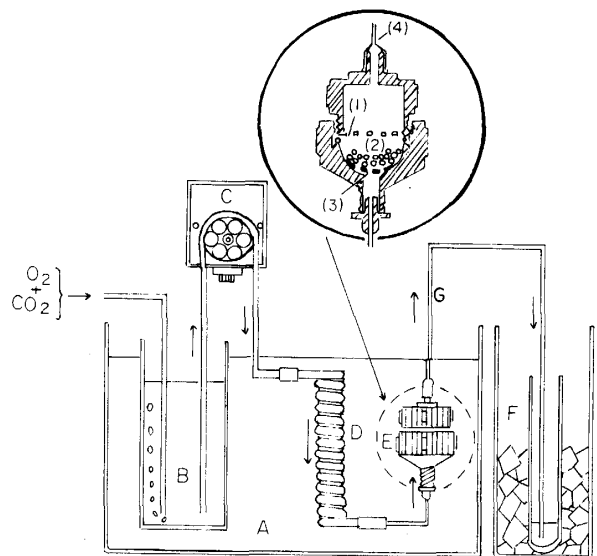


Fig. 3. Perfusion apparatus.

The system consisted of a tissue chamber (E) immersed in an incubator (A) at 37°C. Perfusion medium was aerated (B) with a mixture of 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> and pumped at a constant flow through a mixing coil (D) into the tissue chamber. Flow rate was maintained at 3 ml/10 min through intramedic tubing (PE90) (G) by means of a peristaltic pump (C). Fractions were collected at 4°C (F) during a 30 min collection period. Details of the tissue chamber are illustrated in the circular inset; (1) rubber O-ring, (2) isolated mitochondria, (3) platinum gauze screen, (4) 19 gauge hypodermic needle.

## 4. 分析方法

灌流液中に放出した Pn は第 3 章で述べた RIA 法<sup>1D)</sup>により、また P は DE VILLA らの RIA 法<sup>5D)</sup>により測定した。

蛋白量については、LOWRY らの方法<sup>26)</sup>により測定した。なお、結晶 BSA を標準物質として用いた。

## II 実験成績

## 1. 灌流に用いる C 量について

灌流に steroid 基質として用いる C の最適量を決定するために、ラット黄体ミトコンドリアを 0 ~ 100  $\mu\text{M}$  の C を含んだ緩衝液で灌流した。その結果、図 4 と 5 に示したとおり、ミトコンドリアからの P

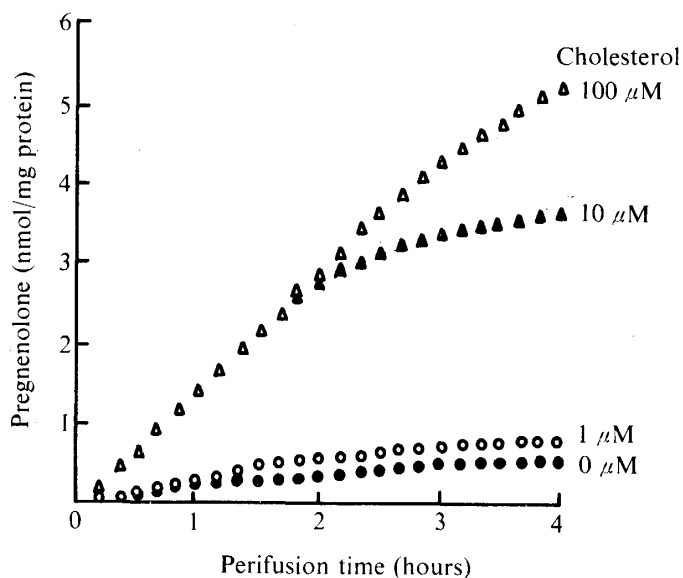


Fig. 4. Pregnenolone output from ovarian mitochondria. Mitochondria were perfused with indicated amount of cholesterol.

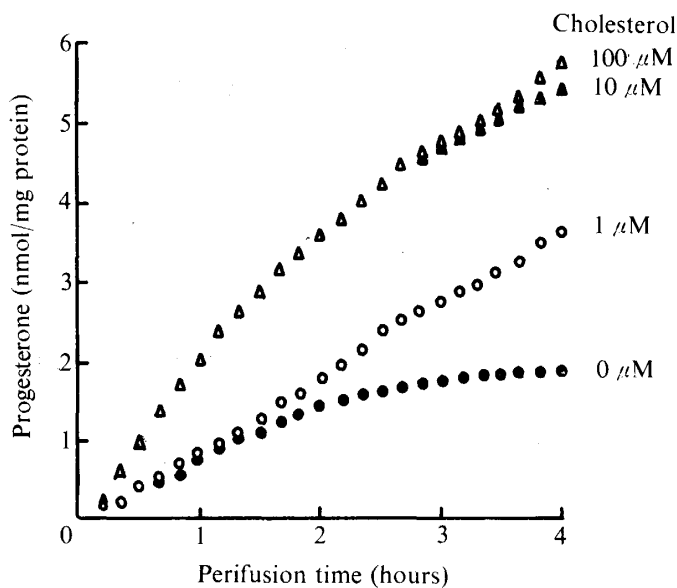


Fig. 5. Progesterone output from ovarian mitochondria. Mitochondria were perfused with indicated amount of cholesterol.

と Pn 生産は、添加した C 量の増加に伴って、上昇を示した。そして、100  $\mu$ M の C の添加でミトコンドリアからの steroids 生産はほぼ最高に達した。

## 2. cAMP のミトコンドリアの Steroids 生産 におよぼす影響

100  $\mu$ M の C を含んだ incubation 液でミトコンドリアを灌流した。灌流液中に PK を活性化するのに十分な量 (1 mM) の cAMP を添加してミトコンドリアからの Pn と P の生産量を測定した。その結果、図 6 と 7 に示したとおり、cAMP を添加したミトコンドリアからの Pn と P の生産は、4 時間の灌流時間内では無処置群のそれにほぼ一致していた。このことから、ミトコンドリア内の PK を十分に活性化させるのに必要な cAMP の添加だけでは P 生産にはほとんど影響を与えないことが示された。

## III 考 察

本実験結果に示したとおり、steroid 基質の無添加状態でもミトコンドリアは少なくとも 4 時間は *in vitro* で P を生産し続けることがわかった。さらに、Pn の生産は P よりも低いことから、生産された Pn はミトコンドリアでただちに P に転換を受けるものと考えられる。C を添加した時の Pn と P の生産をみると、低濃度の C を添加した場合には、steroids 生産は少なく、P が主に生産された。高濃度の C の添加では steroids 生産が有意に上昇し、Pn と P がほぼ等量生産された。この結果から、ミトコンドリアに存在する  $17\beta$ -HSD および NADH はいずれか一方、あるいは両方が量的に限られており、Pn の生産量が増加して来ると、P への代謝が追いつかなくなるものと考えられる。

本実験成績より、100  $\mu$ M の C の添加で、ミトコンドリアの steroids 生産はほぼ最高に達することがわかった。ラット副腎ミトコンドリアの CSCC 酵素の C に対する  $K_m$  は 90  $\mu$ M と報告されており<sup>52)</sup>、この値と比較すると黄体ミトコンドリアのそれは低いことから、卵巣の CSCC 酵素は C に対して副腎のそれよりも親和性が高いものと思われる。

SULIMOVICI & BOYD(1968)<sup>49)</sup> はラット黄体ミトコンドリアに cAMP を添加して incubate し、その結果 cAMP が Pn 生産を刺激したことを報告した。その内容を詳しくみると、彼らは  $[^{14}\text{C}]-\text{C}$  を基質に用いて、ミトコンドリアでの  $[^{14}\text{C}]-\text{Pn}$  と

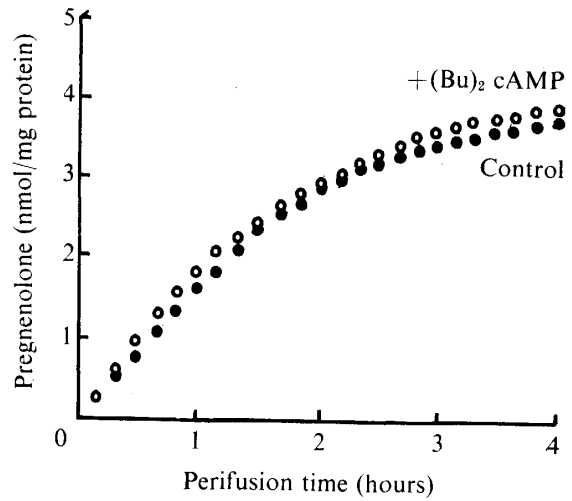


Fig. 6. Effect of  $(\text{Bu})_2$  cAMP on mitochondrial pregnenolone synthesis. Mitochondria were perfused with 1 mM of  $(\text{Bu})_2$  cAMP.

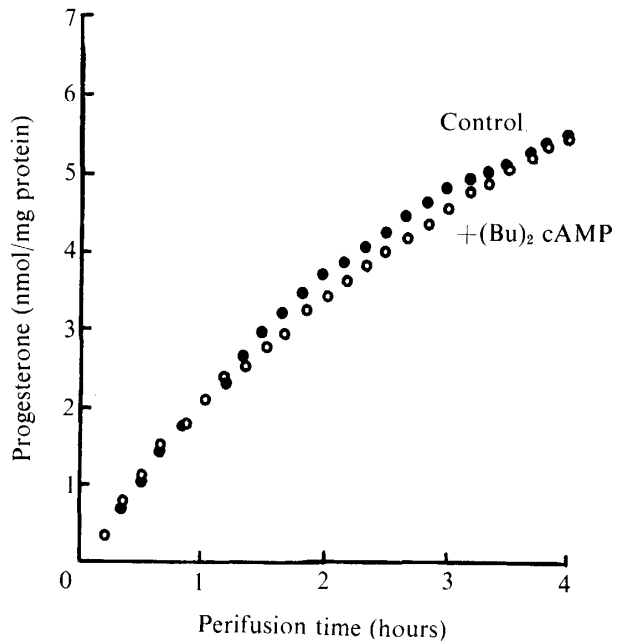


Fig. 7. Effect of  $(\text{Bu})_2$  cAMP on mitochondrial progesterone synthesis. Mitochondria were perfused with 1 mM of  $(\text{Bu})_2$  cAMP.

$[^{14}\text{C}]-\text{P}$  の生成率を調べ、cAMP を添加すると  $[^{14}\text{C}]-\text{Pn}$  の生成率は上昇し、 $[^{14}\text{C}]-\text{P}$  の生成率は減少したが、両者を合わせた生成率は無添加群と同等であったことから、cAMP はミトコンドリア

で生産された Pn の排出を促進したために、ミトコンドリアにおける Pn から P への転換は減少し、結果として Pn の生成が増加したのではないかと推論している。一方、灌流装置を用いてミトコンドリアで生産された Pn がただちに移動可能な状態で行なった著者の実験では、cAMP のミトコンドリアの Pn と P 生産促進作用は観察されなかった。この結果より、SULIMOVICI & BOYD<sup>49)</sup>の推論しているような cAMP に Pn の排出促進作用があるとは考え難い。

第 1 章の結果より、黄体ミトコンドリア内に PK 活性が存在することが明らかになった。さらに、分離したブタ黄体ミトコンドリアを cAMP と incubate すると、ミトコンドリア内のほとんど全ての PK を活性化させることが報告されており<sup>25)</sup>、これは少なくとも cAMP はミトコンドリア膜を通過することができることを意味している。しかし、それにもかかわらず、本実験において、ミトコンドリアに内在する PK を活性化させるのに、十分な量の cAMP を添加した緩衝液で灌流したが、Pn 生産の増加は観察されなかった。この結果から判断すると、ミトコンドリアに存在する PK には(1)CSCC 反応を促進する作用がない、(2)量的に不十分なために作用が発揮できない、あるいは(3)その作用の発現には未知因子の協力が必要である、という三つの可能性が考えられる。

#### IV 小 括

灌流方法を有効に用いて、第 1 章で問題になったミトコンドリアに存在する PK の steroids 合成に関与する可能性について検討した。

ミトコンドリアを種々の濃度の C とともに灌流し、灌流液中の Pn と P を RIA で測定した。その結果、100  $\mu$ M の C を基質とした時、ミトコンドリアからの Pn と P の生産量はほぼ最高に達した。

次に、100  $\mu$ M の C を含んだ灌流液でミトコンドリアを灌流し、灌流液中に PK を活性化するのに十分な量 (1 mM) の cAMP を添加してミトコンドリアからの Pn と P の生産量を測定した。その結果、ミトコンドリアからの Pn と P の生産は cAMP 添加によって変化を示さなかった。このことから、ミトコンドリア内 PK は steroids 合成に関与しないと一応考えられる。

## 第 5 章 Protein Kinase と Ca<sup>++</sup> の Cholesterol 側鎖断裂酵素 刺激作用

前章においては添加した cAMP がミトコンドリア内での P 合成に影響を与えなかった。その理由として、ミトコンドリア内の内因性 PK 量では不十分であるという可能性が考えられる。

一方、ごく最近、DOWNING & DIMINO(1979)<sup>25)</sup> は in vitro でブタ黄体ミトコンドリアを cAMP で処置すると、ミトコンドリアの PK は活性化されるが、CSCC 活性は上昇しないことを示唆した。この報告より、ミトコンドリアの PK は P 合成に直接関与していない可能性も考えられる。

そこで、本章では PK を外から添加した場合にミトコンドリアのステロイド生産がどのような影響を受けるかを検討した。

### I 実験材料および方法

#### 1. 試薬類

[7-<sup>3</sup>H]-Pn、非放射性 steroids、hCG、PMS、脂肪酸除去 BSA、(Bu)<sub>2</sub>cAMP、ATP、その他の試薬および溶媒類は第 1 ~ 3 章で述べたものと同じものを使用した。17  $\beta$ -hydroxy-4,4,17  $\alpha$ -trimethyl androst-5-eno-(2,3-d)-isoxazole (Isoxazole) は Washington 大学 (St. Louis, MO) の ARPADI, CSAPO 博士から寄贈されたものを用いた。

#### 2. Incubation 実験

第 1 章と同様にして、PMS-hCG 処置ラットの黄体からミトコンドリアを分離した。実験には、凍結、融解を 3 回くり返して膜を破壊したミトコンドリア、1 mM の Ca<sup>++</sup> で膜の透過性を増加させたミトコンドリア、および無処置のミトコンドリアを調製し、これら三群のミトコンドリアに第 1 章で用いた PK を添加し、Pn 生産におよぼす影響を調べた。

すなわち、上記の三種ミトコンドリア懸濁液に第 2 章で述べた incubation 用の緩衝液をミトコンドリア蛋白量 0.2~0.3 mg に対して 1 ml の割合で加えた。Incubation フラスコにはミトコンドリア懸濁液、0~5,000  $\mu$ g の PK、50  $\mu$ M (Bu)<sub>2</sub>cAMP、2% dimethyl sulfoxide に溶解した 200  $\mu$ M の C、200  $\mu$ M ATP、および 1 mM NADPH を入れた。無処置ミトコンドリアの incubation には、N

ADPH を用いずに 5 mM の L-malate を用いて行なった。Pn から P への変換を阻止して実験系を簡略化するために、 $1^5-3\beta$ -SDH 抑制剤として 30  $\mu$ M の Isoxazole を incubation 液に加えた。

Incubation は Dubnoff incubator を用いて 37°C で 30 分間、空気中で振とうしながら行なった。

### 3. 分析方法

反応終了後、incubation 液中の Pn は第 3 章で述べた RIA 法により測定した。なお、Pn 抗血清の Isoxazole に対する交叉反応については、0.05% 以下であり、実験に用いた Isoxazole の量では Pn 測定にはほとんど影響しないものと言える。

ミトコンドリアの PK 活性は第 1 章で述べた FUKUNDING & MEANS<sup>23)</sup>の変法により測定した。

蛋白量については、LOWRY らの方法<sup>26)</sup>により測定した。なお、結晶 BSA を標準物質として用いた。

## II 実験成績

### 1. 無処置ミトコンドリアに対する PK の作用

無処置ミトコンドリアの Pn 生産に対する PK 添加の影響を調べた。ミトコンドリア分画をすべての基質および 30  $\mu$ M の Isoxazole といっしょに 37°C

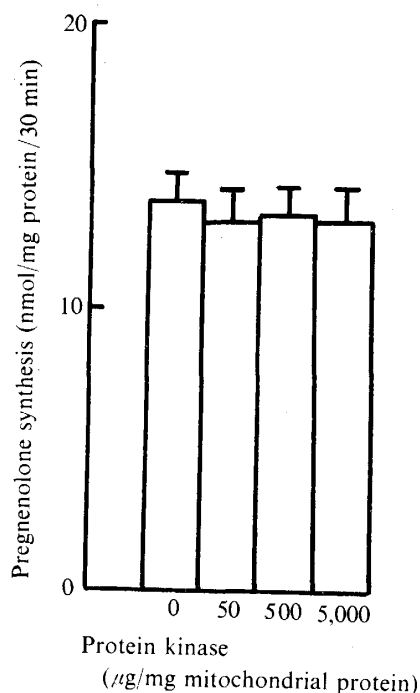


Fig. 8. Effects of protein kinase on pregnenolone synthesis in luteal mitochondria (with 50  $\mu$ M cAMP).

で 30 分間 incubate した。Incubation 液にミトコンドリア蛋白 1 mg 当り 50~5,000  $\mu$ g の PK を添加したが、図 8 に示したとおり、Pn 生産には PK 添加による影響は認められなかった。

### 2. 凍結、融解処置ミトコンドリアに対する PK の作用

第 2 章で外因性の NADPH はミトコンドリア内の steroids 合成を促進しなかったため、ミトコンドリア膜が物質の通過に障害となっている可能性が推察された。そこで、凍結、融解により膜を破壊したミトコンドリアを用いて PK の効果を調べてみた。その結果、50~5,000  $\mu$ g の PK 添加後、Pn 生産の促進は認められなかった (図 9 参照)。凍結、融解処置したミトコンドリアの Pn 生産は無処置ミトコンドリアの約 2/3 に減少したことから、CSCC 酵素活性が凍結、融解により低下したものと思われる。

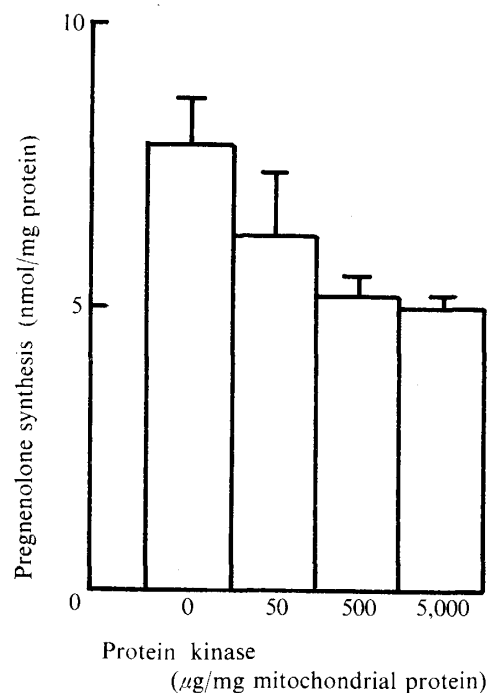


Fig. 9. Effects of protein kinase on pregnenolone synthesis by "Freeze-Thaw" treated luteal cell mitochondria.

Fresh mitochondrial fraction was repeated 3 times the treatment of freezing and thawing, and incubated with indicated amount of protein kinase at 37°C for 30 min. Pregnenolone synthesis in the incubation medium was determined by RIA.



Table 4. Effects of  $\text{Ca}^{++}$  on protein kinase activities in luteal cell mitochondria.

$\text{Ca}^{++}$ (mM)	Protein kinase activity (pmol $^{32}\text{P}$ incorporated/mg protein · min)		Activity ratio (-cAMP/+cAMP)
	-cAMP	+cAMP	
0	46.6 ± 1.9	96.0 ± 1.1	0.485
0.1	41.7 ± 1.8	95.0 ± 2.0	0.439
1	42.8 ± 2.0	86.1 ± 1.5	0.497

### 3. $\text{Ca}^{++}$ 処置ミトコンドリアに対する PK の作用

$\text{Ca}^{++}$  存在下で PK がミトコンドリアにおける steroids 合成におよぼす影響を検討した。その結果、前述と同様の反応系に 1 mM の  $\text{CaCl}_2$  の存在下で 40~4,000  $\mu\text{g}$  の PK を添加すると、Pn 生産は無添加群の約 2 倍に上昇した (図10参照)。また  $\text{Ca}^{++}$  単独ではミトコンドリアの steroids 生産は増加を示さなかった。

電子顕微鏡検査の結果、用いた  $\text{Ca}^{++}$  の濃度ではミトコンドリア膜の形態に大きな変化は認められなかった。

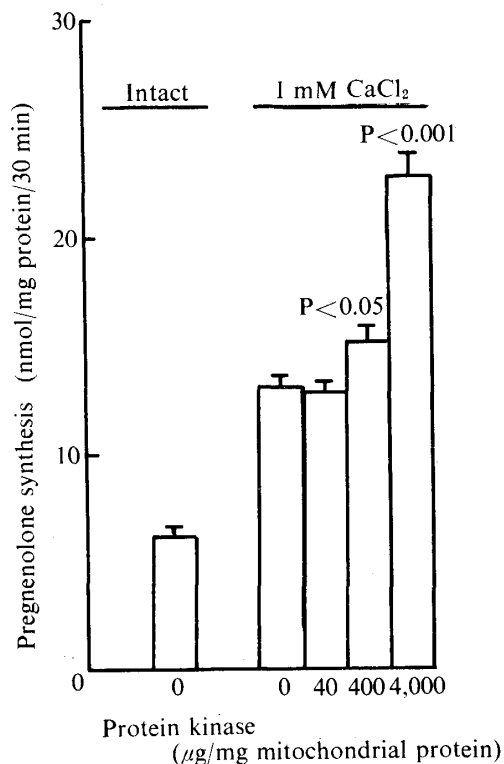


Fig. 10. Effects of protein kinase on pregnenolone synthesis in luteal mitochondria (with 50  $\mu\text{M}$  cAMP).

さらに、0~1 mM の  $\text{Ca}^{++}$  添加後、ミトコンドリアの PK 活性を測定したところ、活性値はほとんど変化を示さなかった (表4参照)。

### 4. $\text{Ca}^{++}$ 処置ミトコンドリアに対する cAMP の作用

cAMP だけではミトコンドリアの P 生産に影響を与えなかったが (第4章)、 $\text{Ca}^{++}$  の存在下では cAMP の作用が現われるか否かを次に検討した。すなわち、ミトコンドリア懸濁液に 0.1~1 mM の cAMP を添加して incubate したところ、 $\text{Ca}^{++}$  不在下では Pn 生産は無添加群と同等であったが、1 mM の  $\text{Ca}^{++}$  の存在下では Pn 生産が無添加群の約 1.5 倍に上昇した (図11参照)。

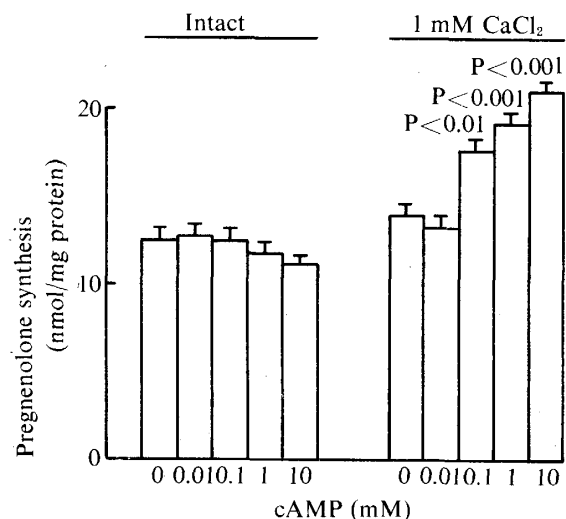


Fig. 11. Effects of cAMP on pregnenolone synthesis in luteal mitochondria.

Mitochondrial preparations were incubated with the addition of cAMP in the absence or presence of 1 mM  $\text{CaCl}_2$  at 37°C for 30 min. Pregnenolone synthesis in the incubation medium was determined by RIA.

### III 考 察

前章の結果より、ミトコンドリアに存在する内因性 PK だけでは steroids 合成を促進するのに十分ではないものと考え、本章ではサイトゾールからの PK を与えてみた。しかし、成績に示したとおり、外部から PK を補ってもミトコンドリアの steroids 合成には変化が見られなかった。

DOWNING & DIMINO(1979)<sup>25)</sup>により、無処置ブタ黄体ミトコンドリアの steroids 合成は PK による影響を受けないことが報告されている。彼らの測定法は単に外因性 [ $^{14}\text{C}$ ]-C の転換を見ているものである。卵巣ミトコンドリアで内因性に貯えられている C は、外因性の [ $^{14}\text{C}$ ]-C よりもさらにたやすく steroids 合成に利用し得ることが想定されているが、彼らは Pn 合成の量的変化は測定していない。彼らの欠点を補うために、本実験では PK を添加し、ミトコンドリアからの正味の Pn 合成を測定した。しかしながら、無処置ラット黄体ミトコンドリアには PK の steroids 生産促進作用は認められなかった。

第 2 章でミトコンドリア膜が物質の通過に障害となっている可能性が推察されたことから、本章で無処置ミトコンドリアに PK 添加後、Pn 生産が増加しなかったのは、添加した PK はミトコンドリアの膜を通過できないと想定される。そこで、一般に細胞膜を破壊するのに用いられている凍結、融解法を試みたが、成績に示したとおり、CSCC 酵素自身が失活し、PK の steroids 生産刺激作用をみることはできなかった。

ミトコンドリア膜を破壊せずに、PK の通過を容易にさせる方法として、 $\text{Ca}^{++}$  を用いてミトコンドリアを swelling させることを次に試みた。本実験に  $\text{Ca}^{++}$  を用いて、PK のミトコンドリアの steroids 合成におよぼす影響を検討したところ、1 mM の  $\text{Ca}^{++}$  存在下では PK がミトコンドリアの Pn 生産を促進したのみならず、cAMP でもミトコンドリアの内因性 PK を活性化させ、Pn 生産を促進させることがわかった。 $\text{Ca}^{++}$  が副腎皮質のミトコンドリアの steroids 水酸化を刺激することが *in vitro* 実験より指摘されているが<sup>53)</sup>、本実験における黄体ミトコンドリアでは  $\text{Ca}^{++}$  単独で steroids 生産を増加させることは認められなかった。

$\text{Ca}^{++}$  が LH により導かれる steroids 合成促進に関与している可能性は未だ報告されていない。最

近、核磁気共鳴の研究により、数 mM 濃度の  $\text{Ca}^{++}$  が副腎皮質のミトコンドリア内で高スピン ferric cytochrome P-450 cscC に対する C の結合を増加させることが報告されている<sup>54)</sup>。本研究で用いた  $\text{Ca}^{++}$  の濃度は生理的量のそれとほぼ同等と思われる。

本研究によって黄体ミトコンドリアの steroids 合成に  $\text{Ca}^{++}$  が何らかの役割を果し得ることが示唆され、これは今まで疑問であった PK の作用機構を明らかにする上で、問題解決の糸口を作るものと考えられる。

### IV 小 括

PK を外から添加した場合に、ミトコンドリアの steroid 生産がどのような影響を受けるか検討した。

cAMP、L-malate、ATP、C、および実験系を簡略下するために Pn から P への代謝を阻止する目的で、 $4^{\beta}$ - $3^{\beta}$ -SDH の抑制剤として 30  $\mu\text{M}$  の Isoxazole を添加した反応液にミトコンドリアを懸濁し、これに、硫酸塩析法によって黄体ミトコンドリアのサイトゾール分画から分離した PK を、蛋白 1 mg 当り 40~4,000  $\mu\text{g}$  添加した。この反応液を 37  $^{\circ}\text{C}$  で 30 分間 incubate した。反応終了後、反応液中の Pn を RIA で測定した。その結果、添加した PK はミトコンドリアにおける Pn 生産に対し何ら刺激効果を示さなかった。

第 2 章ではミトコンドリア膜が物質の通過に障害となっている可能性が推察された。そこで、凍結、融解により膜を破壊したミトコンドリアを用いて PK の効果を調べてみたが、Pn 生産の促進は見られなかった。

次に、 $\text{Ca}^{++}$  存在下で PK がミトコンドリアにおける steroids 合成におよぼす影響を検討した。その結果、前述と同様の反応系に 1 mM の  $\text{CaCl}_2$  の存在下で 40~4,000  $\mu\text{g}$  の PK を添加すると、Pn 生産は無添加群の約 2 倍に上昇した。電子顕微鏡検査の結果、用いた  $\text{Ca}^{++}$  の濃度ではミトコンドリア膜の形態に大きな変化はなかった。さらに、 $\text{Ca}^{++}$  添加後、ミトコンドリアの PK 活性を測定したところ、活性値はほとんど変化していなかった。

cAMP だけではミトコンドリアの P 生産に影響を与えなかったが(第 4 章)、 $\text{Ca}^{++}$  の存在下では cAMP の作用が現われるか否かを次に検討した。すなわち、ミトコンドリア懸濁液に 0.1~10 mM の cA

MPを添加して incubate したところ、1 mM の  $Ca^{++}$  存在下では Pn 生産が無添加群の約 1.5 倍に上昇した。このことから、第 4 章ではミトコンドリア内 PK の steroids 合成の促進作用を否定したが、 $Ca^{++}$  存在下ではその可能性があると考えられる。

## 第 6 章 Cholesterol 側鎖断裂酵素に対する Protein Kinase の直接的刺激作用

前章で、ミトコンドリアの膜内 CSCC 酵素に対し、PK は  $Ca^{++}$  の存在下であれば刺激作用を發揮することがわかったが、 $Ca^{++}$  は単に PK のミトコンドリア内への進入あるいは移動に役立っているのか、それとも PK の作用発現に関与しているのかについて問題が残る。そこで、本章では PK が  $Ca^{++}$  不在下で CSCC 酵素に直接作用して C から Pn への転換を刺激するかどうかを調査した。

### 1 実験材料および方法

#### 1. 試薬類

phospholipase A (*Vipera russelli*) は Sigma (St. Louis, MO) 社製品を使用した。[7- $^3H$ ]-Pn、非放射性 steroids、hCG、PMS、脂肪酸除去 BSA、(Bu) $_2$ cAMP、ATP、その他の試薬および溶媒類は第 1～3 章で述べたものと同じものを使用した。

#### 2. CSCC 酵素の分離法

第 1 章と同様にして、PMS-hCG 処置ラットの黄体からミトコンドリアを分離した。これを、CARON らの方法<sup>55)</sup>に準じて、phospholipase A で 10 分間処置し、ミトコンドリア膜から CSCC 酵素を分離した。

#### 3. Incubation 実験

第 5 章で述べたのと同様の方法で、CSCC 酵素分画を 37°C で 30 分間 incubate した。

#### 4. 分析方法

反応終了後、incubation 液中の Pn は第 3 章で述べた RIA 法<sup>11)</sup>により測定した。

蛋白量については、LOWRY らの方法<sup>26)</sup>により測定した。なお、結晶 BSA を標準物質として用いた。

全測定結果は Student's t 検定を行ない、統計処理した。その判定規準として、両側検定で  $P < 0.05$  ならば有意に差があると判定した。結果は全て平均

値  $\pm$  SE で示されている。

## II 実験成績

ラット黄体細胞のミトコンドリアの膜から phospholipase A の処置により、CSCC 酵素を分離精製し、 $Ca^{++}$  の不在下で PK を直接反応させた。用いた PK は黄体細胞のサイトゾール分画を硫酸で塩析したものである。硫酸処置後、PK 活性値は 1 mg 蛋白で 1 分間当り 380 から 960 pmol の  $^{32}P$  をヒストン蛋白に付加させるまでに上昇した。また、PK 分画中への CSCC 酵素の混入状態を見るために、非放射性 C を基質として PK 分画と反応させた。その結果、添加した C は代謝を受けずに残存しており、精製した PK 分画は CSCC 酵素活性をもたないことがわかった。

CSCC 酵素を分離精製して実験した場合、CSCC 酵素蛋白 1 mg 当り 60～6,000  $\mu$ g の PK の添加により、Pn の生産が 1.4～2.4 倍の上昇を示した (図 12)。

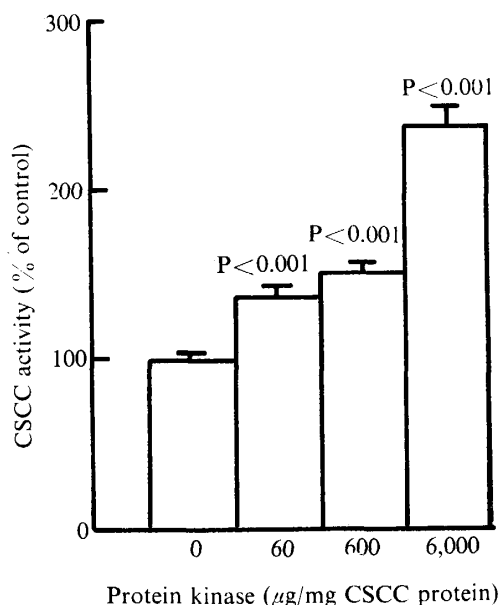


Fig. 12. Effects of protein kinase on activity of isolated cytochrome P-450<sub>CSCC</sub>. A crude CSCC enzyme was prepared by treating luteal mitochondria with phospholipase A and using the supernatant obtained after centrifugation at 105,000  $\times$  g for 60 min. Protein kinase was added to CSCC enzyme in the presence of 50  $\mu$ M cAMP and 200  $\mu$ M ATP.

### III 考 察

本章で用いた可溶性 CSCC 酵素はラット黄体ミトコンドリアを phospholipase で処置して得たものである。この可溶化手法により、これらミトコンドリア CSCC 酵素の一部が膜から分離することが知られている<sup>55)</sup>。分離した CSCC 酵素は PK の直接作用を研究する上で大変都合のいい材料となる。

2、3 の研究者により<sup>25,28)</sup>、in vitro 実験で、LH は黄体からの P 分泌を30分以内に促進させることが報告されている。第1章ではミトコンドリア分画に PK が存在することを証明したが、その生理的意義については不明であった。本章では CSCC 酵素が  $Ca^{++}$  不在下で PK により活性化したことは、LH の速効性を説明する上できわめて好都合な結果である。

$Ca^{++}$  のミトコンドリアにおよぼす働きについて、一般に  $Ca^{++}$  は matrix 間隙に calcium phosphate あるいは hydroxyapatite の形で蓄積されることが知られており、その作用としてミトコンドリア内膜の電気化学的 potential を変化させ、さらに膜の構成を変化させることも知られている<sup>56)</sup>。前章の結果と合わせて考察すると、 $Ca^{++}$  はミトコンドリア膜に作用して、PK のミトコンドリア内への侵入あるいは移動を容易にするのではないかと考える。

本章の結果から CSCC 酵素の3成分のいずれが PK によりリン酸化されたかは明らかではない。このことに関して、CARON ら (1975)<sup>55)</sup> はウシ黄体ミトコンドリアからのこれら3成分のうち、チトクローム P-450 が PK によりリン酸化を受けることを示唆している。このリン酸化を受けた蛋白が果して次にいかなる反応で P 合成促進につながるかはまだ疑問の残る所でもある。

PK による2倍程度の CSCC 反応の促進は、SHIOTA & WIEST (1979)<sup>7)</sup> の報告した、分離したラット黄体細胞から合成される P が LH または cAMP により3~4倍増加したのと比較すると少ないと思われる。しかし、この CSCC 酵素の活性化が黄体細胞における LH および cAMP の steroids 合成促進の作用機構の一つであろうと信じる。

### IV 小 括

PK が分離した CSCC 酵素に直接作用して C か

ら Pn への転換を刺激するかどうかを調査した。

ラット黄体細胞のミトコンドリア膜から CSCC 酵素を遊離させるために phospholipase A を37°Cで10分間処置し、その後105,000 g、60分間遠心した。上清に遊離した CSCC 酵素と C、NADPH および cAMP を加えた incubation 液に、CSCC 酵素蛋白1 mg 当り60~6,000  $\mu$ g の PK を添加したところ、Pn 生産量は無添加群の1.4~2.4倍に上昇した。この結果は PK が  $Ca^{++}$  の不在下でもミトコンドリア膜から分離した CSCC 酵素には直接促進的に作用することを示唆するものである。前章の結果と併せて考察すると、 $Ca^{++}$  は PK のミトコンドリア内への侵入あるいは移動を容易にするのではないかと考える。

## 第7章 Cholesterol 側鎖断裂反応と Cholesterol の関係

Steroids 生産組織は膜合成のためと同時に hormone 生産のために C を必要とする。黄体細胞はこの C を確保するために、3つの供給源を有すると言われている<sup>57)</sup>。すなわち、acetate からの de novo 合成によるもの、細胞内の脂質小滴に貯えられた sterol esters から由来するもの、または血液から細胞内に入ってきたものがある<sup>57)</sup>。

近年、ミトコンドリア内の CSCC 反応速度は、C の CSCC 酵素への結合速度によって調節されており、副腎皮質刺激 hormone (ACTH) の副腎皮質からの Pn 生産への刺激は窮極的にこのレベルで行なわれているという仮説が提起されている<sup>58)</sup>。

前章で PK が CSCC 反応を促進させた作用機構として、PK が CSCC 酵素活性を上昇させたか、あるいは C の CSCC 酵素への結合を促進させたかの二通りが考えられる。本章ではこの問題点の解明を試みた。

### 第1節 Aminoglutethimide の Cholesterol 代謝阻止作用

ミトコンドリア内の C 濃度と Pn 生産との関係を研究するには、異った濃度の C を含有するミトコンドリアの標本が望まれる。本節では CSCC 酵素の抑制剤である aminoglutethimide (AG) を用いて、ミトコンドリア内の C 濃度を変化させようかどうかを調べた。

## I 実験材料および方法

### 1. 試薬類

[7-<sup>3</sup>H]-Pn, [4-<sup>14</sup>C]-C, 非放射性 steroids, hCG, PMS, 脂肪酸除去 BSA, その他の試薬および溶媒類は第1~3章で述べたものと同じものを使用した。

### 2. Incubation 実験

第1章と同様にして、PMS-hCG 処置ラットの黄体からミトコンドリアを分離した。種々の濃度の AG をミトコンドリア incubation 液に添加して AG の有効濃度を調べた。すなわち、ミトコンドリア分画に第2章で述べた incubation 用の緩衝溶液を、ミトコンドリア蛋白量 0.24 mg に対して 1 ml の割合で加えた。各 incubation フラスコにはミトコンドリア懸濁液、0~10 mM の AG、2% dimethyl sulfoxide に溶解した 100 μM の C、および 5 mM の L-malate を入れた。Incubation は Dubnoff incubator を用いて 37°C で 1 時間、空気中で振とうしながら行なった。反応終了後、incubation 液中に放出した Pn は第3章で述べた RIA 法<sup>11)</sup>により、また P は DE VILLA らの RIA 法<sup>51)</sup>により測定した。

次に、1 mM の AG を使い、C のミトコンドリア内蓄積の可能性について検討した。すなわち、0.22 mg のミトコンドリア懸濁液と 2.29 nmol (0.12 μCi) の [<sup>14</sup>C]-C、5 mM の L-malate および AG を加えた上記と同様に調製した incubation 液を 37°C で 0~120 分間、incubate した。反応終了後、ミトコンドリアと incubation 液を遠心により分離し、おのおのに含まれる [<sup>14</sup>C]-C の代謝産物を第2章に記述した方法と同様の方法で調べた。

蛋白量については、LOWRY らの方法<sup>26)</sup>により測定した。なお結晶 BSA を標準物質として用いた。

## II 実験成績

### 1. AG の有効濃度

まず最初に、黄体ミトコンドリアの C 代謝を阻止するのに必要な AG 量を検討した。0~10 mM の AG をミトコンドリア incubation 液に添加して AG の有効濃度を調べた結果を図13に示した。ミトコンドリアからの Pn 生成は 0.1 μM の低濃度の AG 添加から減少の傾向が観察され、1 mM の AG

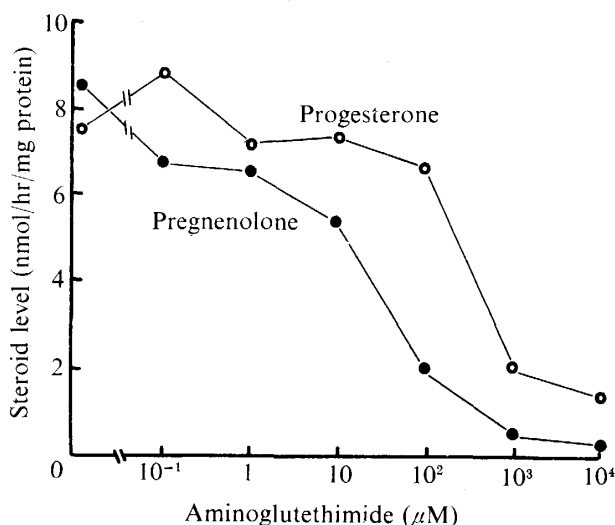


Fig. 13. Effect of aminoglutethimide on mitochondrial steroidogenesis.

Mitochondria fractions from ovaries of rats treated with 50 IU PMS and 25 IU hCG were incubated with 100 μM cholesterol at 37°C for 1 hr. Aminoglutethimide was added to the incubation medium in the indicated concentrations. In all cases 5 mM L-malate was the energy substrate and incubation volume was 1.0 ml. The mitochondrial protein concentration was 0.24 mg/ml.

添加ではほぼ完全に抑制された。一方、P の生成は 0.1 mM の AG 添加ではほとんど抑制されず、1 mM の AG 添加で有意に減少し、AG 量を 10 mM に増加させた場合でも 1 mM の場合と同程度抑制された。

### 2. AG 添加による Cholesterol のミトコンドリア内蓄積

1 mM の AG を使い、C のミトコンドリア内蓄積の可能性について検討した結果を図14と15に示した。1 mM の AG 添加群 (図14) では [<sup>14</sup>C]-C がミトコンドリアに取り込まれる量は増加し、2 時間で用いた基質量の約60%に達した。しかし、ミトコンドリア内および incubation 液中の [<sup>14</sup>C]-Pn と [<sup>14</sup>C]-P の生産量はきわめて少なかった。

一方、AG 無添加群 (図15) では、用いた基質量の約30%が2時間の反応時間後ミトコンドリア内に取り込まれており、incubation 液中には多量の [<sup>14</sup>C]-Pn と [<sup>14</sup>C]-P を認めた。しかし、ミトコンドリア内には [<sup>14</sup>C]-Pn と [<sup>14</sup>C]-P はほとんど検出されなかった。Pn と P の生成率を比較すると、

最初は Pn の生成が高まり、60分ではほぼ最高に達し、その後減少の傾向を示したが、P の生成は Pn の上昇よりも少し遅れて上昇し、incubation 時間とともに連続的な増加を示した。このことから、ミトコンドリアから incubation 液中に放出された Pn は再びミトコンドリア内に入り、P に代謝されるものと考えられる。さらに、P の連続的な増加から、P はこの系での終末産物であると考えられる。

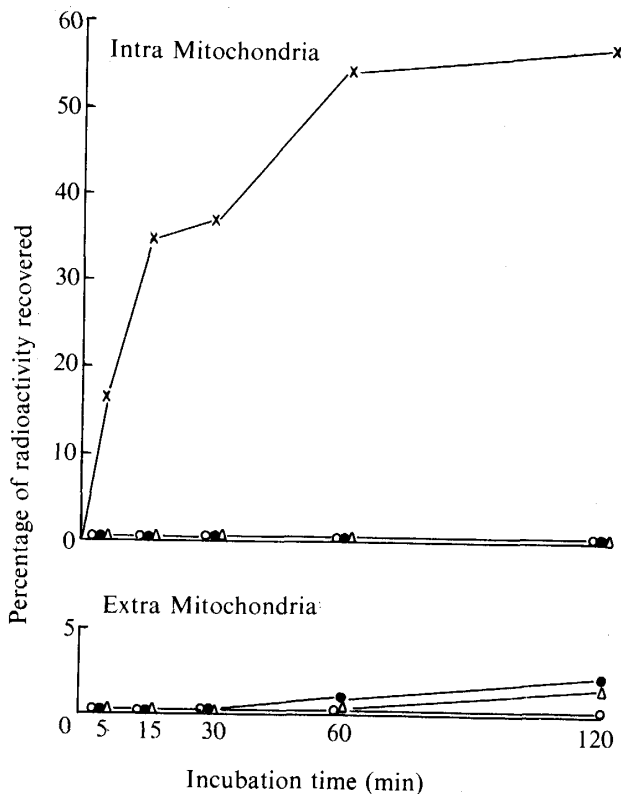


Fig. 14. Effect of aminoglutethimide on  $[^{14}\text{C}]$ -cholesterol conversion by rat luteal mitochondria.

Mitochondria fractions from ovaries of rats treated with 50 IU PMS and 25 IU hCG were incubated with  $[^{14}\text{C}]$ -cholesterol (2.29 nmol, 0.12  $\mu\text{Ci}$ ) at 37°C for indicated time. One mM aminoglutethimide was added to the incubation medium. Five mM L-malate was the energy substrate and reaction volume was 1.0 ml. The mitochondrial protein concentration was 0.22 mg/ml. After incubation, mitochondria were separated from the incubation medium and radioactive metabolites in both intra and extra mitochondria fractions were measured.

X—X, cholesterol; ●—●, pregnenolone; Δ—Δ, progesterone; ○—○, 20 $\alpha$ -dihydroprogesterone.

### III 考 察

AG は CSCC 酵素を抑制することにより Pn 生産を低下させることが報告されている<sup>59)</sup>。さらに、AG 投与により遊離およびエステル型 C の過度の蓄積が起こることが既に報告されている<sup>60)</sup>。本章の実験成績より、AG が CSCC 反応を抑制することを再確認できたのみならず、AG 投与による C の過度の蓄積がミトコンドリア内でも起っていると考えられる。

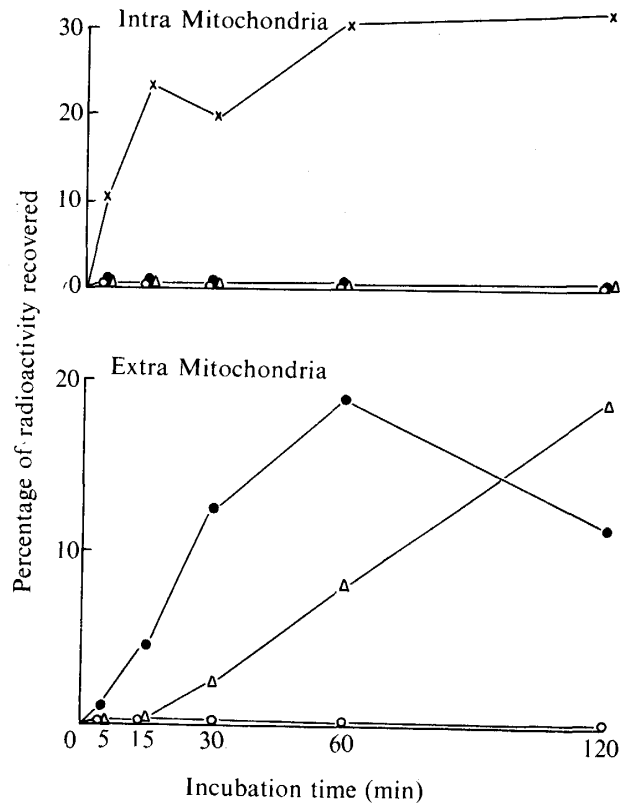


Fig. 15. Metabolism of  $[^{14}\text{C}]$ -cholesterol by rat luteal mitochondria.

Mitochondria fractions from ovaries of rats treated with 50 IU PMS and 25 IU hCG was incubated with  $[^{14}\text{C}]$ -cholesterol (2.29 nmol, 0.12  $\mu\text{Ci}$ ) at 37°C for indicated time. Five mM L-malate was the energy substrate and reaction volume was 1.0 ml. The mitochondrial protein concentration was 0.22 mg/ml. After incubation, mitochondria were separated from the incubation medium and radioactive metabolites in both intra and extra mitochondria fractions were measured. X—X, cholesterol; ●—●, pregnenolone; Δ—Δ, progesterone; ○—○, 20 $\alpha$ -dihydroprogesterone.

KORITZ & KUMUR (1970)<sup>61)</sup>は ACTH の副腎皮質の steroids 合成促進の作用機序の1つとして、ミトコンドリアからの Pn 放出促進が含まれることを示唆した。ラット黄体ミトコンドリア分画では  $4^5-3\beta$ -SDH が存在することが第2章でわかったので、そこでは Pn と P が生成される。P はラット肝では酸化リン酸化の uncoupler として知られており<sup>62)</sup>、そして、黄体ミトコンドリアでは succinate の酸化に対して二面性を有している。すなわち、ある P 濃度では酸素の取り込みを促進し、また他の濃度ではそれを抑制すると言われている<sup>63)</sup>。ミトコンドリア内膜は CSCC 酵素を含んでおり、物質の透過性が非常に乏しく、たとえ比較的 low molecular weight のものでも膜を通過しないことが知られている<sup>64)</sup>。それゆえ、PK の作用の一つとして、ミトコンドリア膜の物質透過性を増し、P の放出を促進させるということが考えられる。しかし、本章の実験成績より、ミトコンドリアで生産された Pn と P は生成後速やかにミトコンドリアから放出されることが明らかになった。Pn と P のミトコンドリア外への速やかな放出は PK の不在で認められたことから、PK はミトコンドリアが生産した Pn と P の放出には関与していないものと考えられる。

#### IV 小 括

CSCC 酵素の抑制剤である AG を用いて、ミトコンドリア内の C 濃度を変化させるかどうかを調べた。

まず、種々の濃度の AG をミトコンドリア incubation 液に添加して AG の有効濃度を調べた。その結果、1 mM の AG を添加すると C 代謝はほとんど阻止され、Pn と P 生産は認められなかった。

次にこの濃度の AG を使って、C のミトコンドリア内蓄積の可能性について検討した。その結果、 $[^{14}\text{C}]-\text{C}$  がミトコンドリアに取り込まれる量は incubation 時間とともに増加し、2 時間で用いた基質量の 60% に達した。しかし、 $[^{14}\text{C}]-\text{Pn}$  と  $[^{14}\text{C}]-\text{P}$  の生産量はきわめて少なかった。

一方、AG 無添加群では、用いた基質量の約 30% が 2 時間の反応時間後ミトコンドリア内に取り込まれており、incubation 液中には多量の  $[^{14}\text{C}]-\text{Pn}$  と  $[^{14}\text{C}]-\text{P}$  を認めた。しかし、ミトコンドリア内には  $[^{14}\text{C}]-\text{Pn}$  と  $[^{14}\text{C}]-\text{P}$  はほとんど検出され

なかった。

以上の結果から、1 mM の AG は CSCC 酵素を十分に抑制し、ミトコンドリアの C 濃度を増加することがわかった。さらに、ミトコンドリアで生産された Pn と P は生成後速やかにミトコンドリアから排出されることが明らかになった。Pn と P のミトコンドリア外への速やかな放出は PK の不在で認められたことから、PK はミトコンドリアが生産した Pn と P の放出には関与していないものと考えられる。

### 第2節 Cholesterol の Cholesterol 側鎖断裂酵素への結合におよぼす Protein Kinase の刺激作用

ACTH 処置後 15~20 分のラットの副腎から分離したミトコンドリアは、無処置群に比較して Pn の生産能が有意に増加することが報告されている<sup>61)</sup>。また、光スペクトル分析により、ACTH 処置後 Pn によって誘導された逆スペクトル I 型は増加することが示唆されている<sup>65)</sup>。さらに、EPR スペクトル分析により、 $g=8.1$  シグナルの高さが上昇することが観察されており<sup>66)</sup>、これは高スピン第二鉄型中のミトコンドリア・チトクローム P-450 部分の増加を示す。この高スピン型は CSCC 酵素として同定されている<sup>67)</sup>。

これらの結果は副腎皮質 steroids 合成の律速段階が C の CSCC 酵素へ結合する所であると解釈される<sup>58, 65-67)</sup>。

一方、黄体ミトコンドリアを用いた研究は光スペクトルを扱った分野では、上記の副腎を用いて行なわれた研究ほど現在のところ進んでいない。Steroids を生産する点で副腎と類似した黄体においても、副腎と同様の機構が働いて steroids 生産調節が行なわれている可能性があると思われる。そこで、本節では C の CSCC 酵素への結合におよぼす PK の影響を調べた。

#### 1 実験材料および方法

##### 1. 試薬類

$[7-^3\text{H}]-\text{Pn}$ 、非放射性 steroids、hCG、PMS、脂肪酸除去 BSA、その他の試薬および溶媒類は第 1~3 章で述べたものと同様のものを使用した。

##### 2. Incubation 実験

ミトコンドリア内の C 含有量を減少あるいは増加

させるために、黄体ミトコンドリアを単独、または 1 mM の AG および 200  $\mu$ M の C といっしょに 37  $^{\circ}$ C で 1 時間、前節で用いたのと同様の incubation 液中で incubate した。次に、ミトコンドリアを 2 度、第 1 章で述べたのと同様のミトコンドリア作成用溶液で洗浄した。その後、さらに 1 mM の  $\text{CaCl}_2$  の存在下で、ミトコンドリアを  $(\text{Bu})_2\text{cAMP}$  または PMS-hCG 処置ラットの黄体から得た PK といっしょに、37  $^{\circ}$ C で 30 分間 incubate した。

### 3. 分析方法

ミトコンドリア中の総および遊離 C 量は SEARCY & BERGQUIST<sup>68)</sup>による比色法を用いて測定した。

Incubation 溶液中の PK は第 3 章で述べた RIA 法<sup>11)</sup>により測定した。実験に用いた AG および Isoxazole の量では C、Pn、および P 測定に何ら影響をおよぼさなかった。

蛋白量については LOWRY<sup>26)</sup>らの方法により測定した。なお結晶 BSA を標準物質として用いた。

## II 実験成績

### 1. ミトコンドリアの C 含有量

黄体ミトコンドリアに 1 mM の AG および 200  $\mu$ M の C を加えて incubate した場合、両者を添加しないミトコンドリアに比べて、遊離 C 含量は蛋白 1 mg 当り 41 から 510 nmol に増加した。なお、両ミトコンドリアの C ester には差が見られなかった (表 5)。

### 2. C を高濃度に含有するミトコンドリアの Pn 生産

図 16 に示したとおり、AG によりミトコンドリア内の C が高濃度にある場合には、Pn 生産は蛋白 1 mg で 30 分間当り約 47 nmol を示した。

また、1 mM の  $(\text{Bu})_2\text{cAMP}$  あるいは 0.05 mM

の  $(\text{Bu})_2\text{cAMP}$  と 4 mg の PK の添加によつては Pn 生産は影響を受けなかった。

### 3. C 含有の乏しいミトコンドリアの Pn 生産

Sterol 基質を加えない状態でミトコンドリアを incubate し、ミトコンドリアに内在する C を消費させた。その後、200  $\mu$ M の C を加えてミトコンドリアを incubate すると、Pn 生産は蛋白 1 mg で 30 分間当り約 8 nmol を示した。また、1 mM の  $(\text{Bu})_2\text{cAMP}$  あるいは 0.05 mM の  $(\text{Bu})_2\text{cAMP}$  と 4 mg の PK の添加によつて、無添加群に比べ、

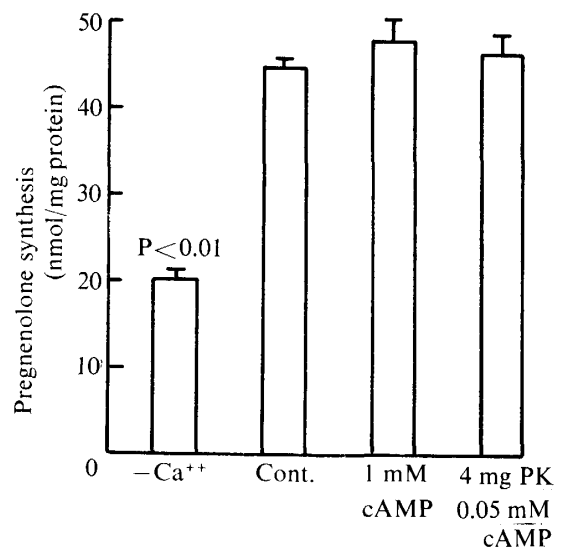


Fig. 16. Effects of cAMP and protein kinase on pregnenolone synthesis in luteal cell mitochondria in the presence of 1 mM  $\text{Ca}^{++}$ .

Mitochondrial preparation was preincubated with 1 mM aminoglutethimide and 200  $\mu$ M cholesterol at 37  $^{\circ}$ C for 1 hr. After wash out aminoglutethimide, mitochondrial preparation was incubated with protein kinase and/or cAMP in the presence of 1 mM  $\text{CaCl}_2$  at 37  $^{\circ}$ C for 30 min.

Table 5. Effects of aminoglutethimide on mitochondrial sterol content.

	Free Cholesterol (nmol/mg protein)	Cholesteryl ester (nmol/mg protein)
With 1mM AG and 200 $\mu$ M Cholesterol	510	85
Without AG and Cholesterol	41	101

Mitochondria were incubated with or without 1mM aminoglutethimide and 200 $\mu$ M cholesterol for 1 hour.



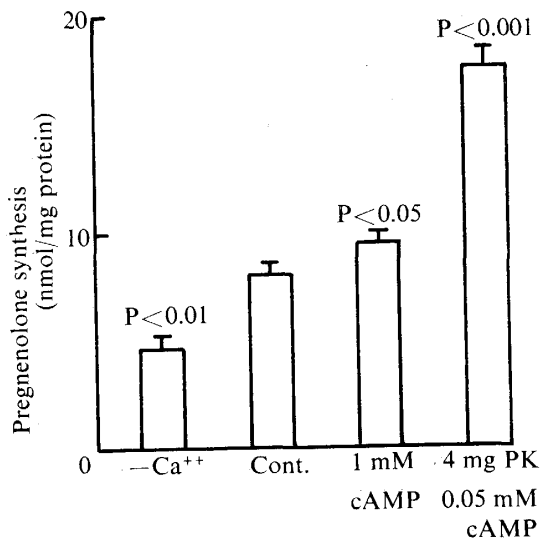


Fig. 17. Effects of cAMP and protein kinase on pregnenolone synthesis in luteal cell mitochondria in the presence of 1 mM Ca<sup>++</sup>.

Mitochondrial preparation was preincubated without cholesterol substrate at 37°C for 1 hr. and then, incubated with 200 μM cholesterol at 37°C for 30 min. Protein kinase and/or cAMP were added to incubation medium.

Pn 生産が有意に上昇した (図17)。

### III 考 察

第5章で得られた図10と11に示した成績より、黄体ミトコンドリアを 200 μM の C を基質といっしょに incubate した場合、蛋白 1 mg で30分間当り約 14 nmol の Pn 生産が観察された。この値を本節で得られた成績と比較すると、C を高濃度に含有するミトコンドリアでは、Pn 生産は蛋白 1 mg で30分間当り約 47 nmol を示し、上記の無処置ミトコンドリアの約 3.5 倍の量である。一方、C 含有量の乏しいミトコンドリアでは、Pn 生産は約 8 nmol で、上記の無処置ミトコンドリアの約 1/2 量である。この結果はミトコンドリアの Pn 生産はミトコンドリア内の C 濃度が高いものほど大きく、30分内の incubation では外液中の C は Pn 合成に与らないことを示唆している。そして、Pn 生産がミトコンドリア内 C 濃度によって大きく変化することから、CSCC 酵素の活性化よりもむしろ、C の CSCC 酵素への結合速度によって調節されているものと考えられる。

副腎皮質と黄体の CSCC 酵素は酵素活性、およ

びスペクトル特性の点で非常に似ているという報告があり<sup>69)</sup>、研究の進んでいる副腎皮質を扱った報告を参考にすると、ラット副腎皮質ミトコンドリアにおいて、CSCC 反応が CSCC 酵素のうち、チトクローム P-450 と C の結合したスピンスペクトル量に比例し、ACTH 投与によってこの高スピンスペクトルは増加することが報告されている<sup>58, 65)</sup>。ACTH によりチトクローム P-450 と C の結合体が増加したことは、①チトクローム P-450 量が増加したことによるもの、②チトクローム P-450 量は変化しないが、遊離のものが減少し、C との結合体が増加したの 2 通りが想定される。これに関して、ARTHUR & BOYD (1975)<sup>70)</sup>は LH 処置により、ラット黄体ミトコンドリアの総チトクローム P-450 量は変化しないことを報告しており、これは②の説、すなわち、前述の著者の説を支持するものである。

C の CSCC 酵素への結合におよぼす PK の影響を考察すると、本節に示した成績より、C を高濃度に含有するミトコンドリアは PK を添加したとき、無添加群とはほぼ同量の Pn を生産するが、一方 C 含有量の乏しいミトコンドリアは PK の添加により、無添加群の約 2.2 倍の Pn を生産することがわかった。この結果は、PK が C 含有量の乏しいミトコンドリア内で C を CSCC 酵素に結合させることに関与している可能性を示唆している。

最近、cycloheximide および puromycin 等の蛋白合成抑制剤を用いた実験から、tropic hormones の steroids 合成促進作用が蛋白合成を介したものであることが示唆されている<sup>71)</sup>。また、ごく最近、cytochalasin B、vinblastine 等の microfilament および microtubule の機能を阻害する物質を用いた実験から、LH および ACTH の steroids 合成促進作用が microfilament あるいは microtubule を介して、細胞内の C をミトコンドリア内へ取り込ませることに関与することが示唆されている<sup>72, 73)</sup>。それゆえ、PK の作用が本論文で示した C の CSCC 酵素への結合速度を促進するのみならず、ミトコンドリアに C を供給することにも関与している可能性が考えられる。この種の研究はごく最近始められたばかりで、今後さらに検討されることを期待したい。

### IV 小 括

C の CSCC 酵素への結合におよぼす PK の影響

を調べた。

まず、ミトコンドリア内のC濃度と Pn 生産の関係进行调查した。実験には、Cを高濃度に含有するミトコンドリア、C含有量の乏しいミトコンドリア、および無処置のミトコンドリアを調製し、これら3群のミトコンドリアを大量のCと30分間 incubate して、incubation 液中に放出された Pn 量を測定した。Cを高濃度に含有するミトコンドリアは、ミトコンドリアをあらかじめ AG で処理することによって作成した。C含有量の乏しいミトコンドリアは、C基質を与えない状態でミトコンドリアを incubate して作成した。

実験結果は、Cを高濃度に含有するミトコンドリアでは無処置ミトコンドリアの約3.5倍のPnを生産し、C含有量の乏しいミトコンドリアは対照の約1/2量のPnを生産した。この結果はミトコンドリアのPn生産はミトコンドリア内のC濃度が高いものほど大きく、30分間の incubation では外液中のCはPn合成に与らないことを示唆している。そして、Pn生産がミトコンドリア内C濃度によって大きく変化することから、CSCC反応はCSCC酵素の活性化よりもむしろ、CのCSCC酵素への結合速度によって調節されているものと考えられる。

次に、CのCSCC酵素への結合におよぼすPKの影響を調査した。前記と同様にしてCを高濃度に含有するミトコンドリアとC含有量の乏しいミトコンドリアを作成し、これらのミトコンドリアをCa<sup>++</sup>の存在下で大量のCとPKを添加して30分間 incubate し、incubation 液中に放出された Pn 量を測定した。

その結果、Cを高濃度に含有するミトコンドリアはPKを添加したとき、無添加群とほぼ同量のPnを生産したのにとどまったが、一方、C含有量の乏しいミトコンドリアはPKの添加により、無添加群の約2.2倍のPnを生産した。

以上の結果は、PKがC含有量の乏しいミトコンドリア内でCをCSCC酵素に結合させることに関与している可能性を示唆している。

## 第8章 総括

黄体のsteroids合成を促進するLHの作用機序の解明に寄与する目的で、過排卵処置したラット黄体ミトコンドリアのCSCC酵素に対するPKの作

用機構を研究した結果、次の点を明らかにすることができた。

1. 全細胞中のcAMP依存性PKは、その72.4%がサイトゾール分画に集中して存在しており、5.5%がミトコンドリア分画に存在することを認めた。
2. 黄体ミトコンドリアがCSCC酵素のみならず、4<sup>β</sup>-3<sup>β</sup>-SDH複合体を含有しており、CからPnとPへ代謝させる能力があることを示した。
3. 血中および組織中のPnの微量測定法につき、実施が比較的簡単で、かつ正確度、精度、特異性の点につき、いずれも十分満足すべきRIAを確立した。
4. ミトコンドリア内のPKはcAMPによって活性化されるが、膜内CSCC酵素に対して、Ca<sup>++</sup>の存在下においてのみ刺激作用を発揮することを見出した。
5. PKはCa<sup>++</sup>の不在下でも膜から分離したCSCC酵素に直接促進的に作用することを明らかにした。このことから、Ca<sup>++</sup>はPKのミトコンドリア内への侵入あるいは移動を容易にするものと考えられる。
6. PKのCSCC反応の促進機構として、PKがCSCC酵素のリン酸化を起し、CのCSCC酵素への結合を高めるものと考えられる。

以上の研究結果から、図18に示した模式図のように、cAMPにより活性化したPKはCa<sup>++</sup>の存在下でミトコンドリア内のCSCC酵素に接近し、その

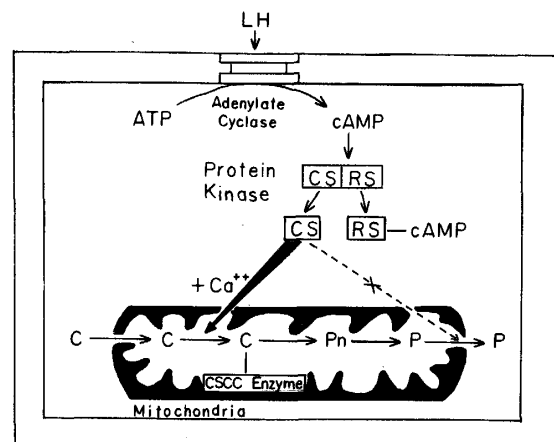


Fig. 18. Possible modes of action of LH on steroidogenesis in a corpus luteum cell.

C: cholesterol, Pn: pregnenolone, P: progesterone  
CS: catalytic subunit, RS: regulatory subunit

リン酸化を起こさせ、Cの CSCC 酵素への結合を増加させる結果、CからPへの合成を促進させるという一連の可能性が考えられ、PKの CSCC 反応促進の作用機構の解明に一つの手がかりを提供し得たものと考ええる。

#### 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、諸事に亘り、温かい御指導と御助言を賜った本学家畜外科学講座・蘭守龍雄教授に心から御礼申し上げます。また、有益な御助言を載いた本学家畜繁殖学講座・市川茂孝教授、同家畜薬理学講座・柳谷岩雄教授、宮崎大学農学部家畜生理学講座・江藤禎一教授、大阪大学医学部第二病理学教室・松本圭史教授、米国 Washington 大学医学部産婦人科教室・W.G. WIEST 教授、米国 Colorado 州立大学獣医学部生理学教室・NISWENDER 教授に深謝します。

また、AG を贈与下さいました米国 Ciba Pharmaceutical Co. の C.A. BROWNLEY, JR. 博士と Isoxazole を贈与下さいました米国 Washington 大学医学部産婦人科教室・故 A.I. CSAPO 教授にも謝意を表します。

#### 引用文献

- 1) BUTCHER, R.L., COLLINS, W.E. and FUGO, N.W. (1974). Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 $\beta$  throughout the 4-day estrus cycle of the rat. *Endocrinology*, **94**, 1704-1708.
- 2) SASHIDA, T. and JOHNSON, D.C. (1976). The response of the immature rat ovary to gonadotrophins: Acute changes in cyclic AMP, progesterone, testosterone, androstenedione and oestradiol after treatment with PMS or FSH + LH. *Acta Endocrinol (Kbh)*, **82**, 413-425.
- 3) SUZUKI, K. and TAMAOKI, B. (1979). Enzymological studies of rat luteinized ovaries in relation to acute reduction of aromatizable androgen formation and stimulated production of progestins. *Endocrinology*, **104**, 1317-1323.
- 4) FIESER, L.F. and FIESER, M. (1959). *Steroids*. Reinhold Pub. Corp., New York, 539-540.
- 5) HALL, P.F. and YOUNG, D.G. (1968). Site of action of tropic hormones upon the biosynthetic pathways to steroid hormones. *Endocrinology*, **82**, 559-568.
- 6) MARSH, J.M. (1976). The role of cyclic AMP in gonadal steroidogenesis. *Biol. Reprod.*, **14**, 30-53.
- 7) SHIOTA, K. and WIEST, W.G. (1979). On the mechanism of prolactin stimulation of steroidogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **112**, 169-178.
- 8) AZHAR, S. and MENON, K.M.J. (1975). Adenosine 3':5'-monophosphate-dependent phosphorylation of ribosomes and ribosomal subunits from bovine corpora luteum. *Biochim. Biophys. Acta*, **392**, 64-74.
- 9) JUNGMANN, R.A. and SCHWEPPE, J.S. (1972). Mechanism of action of gonadotropin. 1. Evidence for gonadotropin-induced modifications of ovarian nuclear basic and acidic protein biosynthesis, phosphorylation, and acetylation. *J. Biol. Chem.*, **247**, 5535-5542.
- 10) JUNGMANN, R.A., HIESTAND, P.C. and SCHWEPPE, J.S. (1974). Mechanism of action of gonadotropin. IV. Cyclic adenosine monophosphate-dependent translocation of ovarian cytoplasmic cyclic adenosine monophosphate-binding protein and protein kinase to nuclear acceptor sites. *Endocrinology*, **94**, 168-183.
- 11) INABA, T., WIEST, W.G. and NISWENDER, G.D. (1980). Radioimmunoassay of serum and ovarian pregnenolone in immature rats. *Steroids*, **34**, 663-675.
- 12) INABA, T. and WIEST, W.G. (1979). Aminoglutethimide inhibition of steroidogenesis in rat luteal cell mitochondria. *26th Annual Meeting of the Society for Gynecologic Investigation*, San Diego, California, Abstract No. 165.
- 13) INABA, T. and WIEST, W.G. (1979). Protein

- kinase stimulation of mitochondrial steroidogenesis. *26th Annual Meeting of the Society for Gynecologic Investigation*, San Diego, California, Abstract No. 124.
- 14) INABA, T. and WIEST, W.G. (1979). The effect of cyclic-AMP and prolactin on mitochondrial steroidogenesis. *61th Annual Meeting of the Endocrine Society*, Anaheim, California, Abstract No. 546.
- 15) WIEST, W.G. and INABA, T. (1980). Protein kinase stimulation of cholesterol side chain cleavage enzyme system in rat luteal cell mitochondria. *27th Annual Meeting of the Society for Gynecologic Investigation*, Denver, Colorado, Abstract No. 140.
- 16) KUO, J.F. and GREENGARD, P. (1969). Cyclic nucleotide-dependent protein kinase. IV. Widespread occurrence of adenosine 3' : 5' monophosphate-dependent protein kinase in various tissues and phyla of the animal kingdom. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **64**, 1349–1355.
- 17) CORBIN, J.D., KEELY, S.L. and PARK, C.R. (1975). The distribution and dissociation of cyclic adenosine 3' : 5'-monophosphate dependent protein kinases in adipose, cardiac and other tissues. *J. Biol. Chem.*, **250**, 218–225.
- 18) KUO, F.J. and GREENGARD, P. (1970). Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *J. Biol. Chem.*, **245**, 2493–2498.
- 19) MENON, K.M.J. (1973). Purification and properties of a protein kinase from bovine corpora lutea that is stimulated by cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate and luteinizing hormone. *J. Biol. Chem.*, **248**, 494–501.
- 20) HUNZICKER-DUNN, M. and JUNGSMANN, R.A. (1978). Rabbit ovarian protein kinases. I. Effect of an ovulatory dose human chorionic gonadotropin or luteinizing hormone on the subcellular distribution of follicular and luteal protein kinases. *Endocrinology*, **103**, 420–430.
- 21) LING, W.Y. and MARSH, J.M. (1977). Reevaluation of the role of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate and protein kinase in the stimulation of steroidogenesis by luteinizing hormone in bovine corpus luteum slices. *Endocrinology*, **100**, 1571–1578.
- 22) BLOBEL, G. and POTTER, V.R. (1966). Nuclei from rat liver: Isolation method that combines purity with high yield. *Science*, **154**, 1662–1665.
- 23) FAKUNDING, J.L. and MEANS, A.R. (1977). Characterization and follicle stimulating hormone activation of sertoli cell cyclic AMP-dependent protein kinases. *Endocrinology*, **101**, 1358–1368.
- 24) WASTILA, W.B., STULL, J.T., MAYER, S.E. and WALSH, D.A. (1971). Measurement of cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate by the activation of skeletal muscle protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **246**, 1996–2003.
- 25) DOWNING, J.R. and DIMINO, M.J. (1979). Studies on mitochondrial protein kinase activity of porcine corpora lutea. *Endocrinology*, **105**, 570–573.
- 26) LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275.
- 27) RUBIN, C.S. and ROSEN, O.M. (1975). Protein phosphorylation. *Annu. Rev. Biochem.*, **44**, 831–887.
- 28) MASON, N.R., MARSH, J.M. and SAVARD, K. (1962). An action of gonadotropin in vitro. *J. Biol. Chem.*, **237**, 1801–1806.
- 29) COOPER, J.M. and THOMAS, P. (1970). Uptake and interconversion of oestrone and oestradiol in rabbit uterus. *Biochem. J.*, **117**, 24P.
- 30) KIMURA, T. and SUZUKI, K. (1967). Components of the electron transport system in adrenal steroid hydroxylase. Isolation and properties of non-heme iron protein (adrenodoxin). *J. Biol. Chem.*, **242**,

- 485–491.
- 31) SULIMOVICI, S. and BOYD, G.S. (1968). The effect of ascorbic acid *in vitro* on the rat ovarian cholesterol side chain cleavage enzyme system. *Steroids*, **12**, 127–149.
- 32) YAGO, N., DORFMAN, R.I. and FORCHIELLI, E. (1967). Extramitochondrial NADPH and cholesterol side chain-cleaving enzyme system in the heavy mitochondria of bovine corpora lutea. *J. Biochem.*, **62**, 345–352.
- 33) ROBINSON, J. and STEVENSON, P.M. (1971). Electron flow and cholesterol-side-chain cleavage in ovarian mitochondria. *Eur. J. Biochem.*, **24**, 18–30.
- 34) KARABOYAS, G.C. and KORITZ, S.B. (1965). Identity of the site of action of 3', 5'-adenosine monophosphate and adrenocorticotrophic hormone in corticosteroidogenesis in rat adrenal and beef adrenal. *Biochemistry*, **4**, 462–468.
- 35) OMURA, T., SANDERS, E., ESTABROOK, R.W., COOPER, D.Y. and ROSENTHAL, O. (1966). Isolation from adrenal cortex of a nonheme iron protein and a flavoprotein as a reduced triphosphopyridine nucleotide-cytochrome P-450 reductase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **117**, 660–673.
- 36) SULIMOVICI, S. and BOYD, G.S. (1969). The  $\Delta^5$ - $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase of rat ovarian tissue. *Eur. J. Biochem.*, **7**, 549–558.
- 37) DIMINO, H.J. and CAMBELL, M.D. (1976). Progesterone synthesis by luteal mitochondria in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **152**, 54–56.
- 38) CARR, B.R., MIKHAIL, G. and FLICKINGER, G.L. (1971). Column chromatography of steroids on Sephadex LH-20. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **33**, 358–360.
- 39) PHILLIPS, A.H. and LANGDAN, R.G. (1962). Hepatic triphosphopyridine nucleotide cytochrome c reductase. Isolation, characterization and kinetic studies. *J. Biol. Chem.*, **237**, 2652–2660.
- 40) MILLER, R.N. and HUNTER, JR., F.E. (1970). The effect of halothane on electron transport, oxidative phosphorylation, and swelling in rat liver mitochondria. *Mol. Pharm.*, **6**, 67–77.
- 41) ZAFFARONI, A. and BURTON, R.B. (1951). Identification of corticosteroids of beef adrenal extract by paper chromatography. *J. Biol. Chem.*, **193**, 749–767.
- 42) DIMINO, M.J., ELFONT, E.A. and BERMAN, S.K. (1979). Changes in ovarian mitochondria: Early indicators of follicular luteinization. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **112**, 505–510.
- 43) YOSHIZAKI, K., MATSUMOTO, K. and SAMUELS, L.T. (1978). Localization of  $\Delta^4$ -5 $\alpha$ -reductase in immature rat testes. *Endocrinology*, **102**, 918–925.
- 44) DIMINO, M.J., LLOYD, D.M., ELFONT, E.A., PETERS, D.W. and SCHUBATIS, R.J. (1976). Studies on oxidative phosphorylation and steroidogenesis by ovarian mitochondria after gonadotropic stimulation. *Endocrinology*, **99**, 1377–1385.
- 45) UZGIRIS, V.I., MCINTOSH, E.N., ALONSO, C. and SALHANICK, H.A. (1971). Role of reversed electron transport in bovine corpus luteum mitochondrial steroid synthesis. *Biochemistry*, **10**, 2916–2923.
- 46) BOBINSON, J. and STEVENSON, P.M. (1971). Electron flow and cholesterol-side-chain cleavage in ovarian mitochondria. *Eur. J. Biochem.*, **24**, 18–30.
- 47) VAN DER VUSSE, G.J., KALKMAN, K.L. and VANDERMOLEN, H.J. (1974).  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in rat testis tissue. Inter- and subcellular localization and inhibition by cyanoketone and nagarse. *Biochem. Biophys. Acta*, **348**, 404–414.
- 48) DIMINO, M.J. (1977). Differences in mitochondrial steroidogenesis between follicular and luteal tissue of porcine ovaries. *Endocrinology*, **101**, 1844–1849.

- 49) SULIMOVICI, S. and BOYD, G.S. (1968). The cholesterol side chain cleavage enzymes in immature rat ovary. *Eur. J. Biochem.*, **3**, 332-345.
- 50) HASHIMOTO, I., ASANO, T. and WIEST, W.G. (1975). Progestational function of perfused rat corpora lutea. *Endocrinology*, **96**, 421-430.
- 51) DE VILLA, JR., G.O., ROBERTS, K., WIEST, W.G., MIKHAIL, G. and FLICKINGER, G.L. (1972). A specific radioimmunoassay of plasma progesterone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **35**, 458-460.
- 52) BELL, J.J. and HARDING, B.W. (1974). The acute action of adrenocorticotrophic hormone on adrenal steroidogenesis. *Biochim. Biophys. Acta*, **348**, 285-298.
- 53) SIMPSON, E.R., JEFCOATE, C.R., MCCARTHY, J.L. and BOYD, G.S. (1974). Effect of calcium ions on steroid-binding spectra and pregnenolone formation in rat adrenal mitochondria. *Eur. J. Biochem.*, **45**, 181-188.
- 54) SIMPSON, E.R. and WATERS, J. (1975). Effect of calcium on pregnenolone formation and cytochrome P-450 in rat adrenal mitochondria. *J. Steroid. Biochem.*, **6**, 395-400.
- 55) CARON, M.G., GOLDSTEIN, S., SAVARD, K. and MARSH, J.M. (1975). Protein kinase stimulation of a reconstituted cholesterol side chain cleavage enzyme system in the bovine corpus luteum. *J. Biol. Chem.*, **250**, 5137-5143.
- 56) CHANCE, B. (1965). The energy-linked reaction of calcium with mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **240**, 2729-2748.
- 57) CHRISTIE, M.H., STRAUSS, III, J.F. and FLICKINGER, G.L. (1979). Effect of reduced blood cholesterol on sterol and steroid metabolism by rat luteal tissue. *Endocrinology*, **105**, 92-98.
- 58) SIMPSON, R.R., MCCARTHY, J.L. and PETERSON, J.A. (1978). Evidence that the cycloheximide-sensitive site of adrenocorticotrophic hormone action is in the mitochondrion. *J. Biol. Chem.*, **253**, 3135-3139.
- 59) UZGIRIS, V.I., WHIPPLE, C.A. and SALHANICK, H.A. (1977). Steroselective inhibition of cholesterol side chain cleavage by enantiomers of aminoglutethimide. *Endocrinology*, **101**, 89-92.
- 60) ARMSTRONG, D.T., DORRINGTON, J.H. and ROBINSON, J. (1976). Effects of indomethacin and aminoglutethimide phosphate in vivo on luteinizing-hormone-induced alterations of cyclic adenosine monophosphate, prostaglandin F, and steroid levels in preovulatory rat ovaries. *Can. J. Biochem.*, **54**, 796-802.
- 61) KORITZ, S.B. and KUMUR, A.M. (1970). On the mechanism of action of the adrenocorticotrophic hormone. The stimulation of the activity of enzymes involved in pregnenolone synthesis. *J. Biol. Chem.*, **245**, 152-159.
- 62) WADE, R. and JONES, JR., H.W. (1956). Effect of progesterone on oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, **220**, 553-562.
- 63) ROBINSON, J. and STEVENSON, P.M. (1971). Electron flow and cholesterol-side-chain cleavage in ovarian mitochondria. *Eur. J. Biochem.*, **24**, 18-30.
- 64) DEPIERRE, J.W. and ERNSTER, L. (1977). Enzyme topology of intracellular membranes. *Ann. Rev. Biochem.*, **46**, 201-262.
- 65) SIMPSON, E.R., JEFCOATE, C.R., BROWNIE, A.C. and BOYD, G.S. (1972). The effect of ether anaesthesia stress on cholesterol-side-chain cleavage and cytochrome P-450 in rat adrenal mitochondria. *Eur. J. Biochem.*, **28**, 442-450.
- 66) WILLIAMS-SMITH, D.L., SIMPSON, E.R., BARLOW, S.M. and MORRISON, P.J. (1976). Electron paramagnetic resonance studies of cytochrome P-450 and adrenal ferredoxin in single whole rat adrenal glands. *Biochem. Biophys. Acta*, **449**,

72-83.

- 67) JEFCOATE, C.R., ORME-JOHNSON, W.H. and BEINERT, H. (1976). Cytochrome P-450 of bovine adrenal mitochondria. Ligand binding to two forms resolved by EPR spectroscopy. *J. Biol. Chem.*, **251**, 3706-3715.
- 68) SEARCY, R.L. and BERGQUIST, L.M. (1960). A new color reaction for the quantitation of serum cholesterol. *Clin. Chim. Acta*, **5**, 192-199.
- 69) GRAVES, P.E., UZGIRIS, V.I. and SALHANICK, H.A. (1980). Modification of enzymatic activity and difference spectra of cytochrome P-450 from various sources by cholesterol side chain cleavage inhibitors. *Steroids*, **35**, 543-559.
- 70) ARTHUR, J.R. and BOYD, G.S. (1975). The effects of luteinizing hormone in vivo on cholesterol side-chain-cleavage activity in mitochondria of the rat corpus luteum. *Biochem. Soc. Trans.*, **3**, 895-897.
- 71) TOAFF, M.E., STRAUSS, III., J.F., FLICKINGER, G.L. and SHATTIL., S.J. (1979). Relationship of cholesterol supply to luteal mitochondrial steroid synthesis. *J. Biol. Chem.*, **254**, 3977-3982.
- 72) SILAVIN, S.L., MOSS, G.E. and NISWENDER, G.D. (1980). Regulation of steroidogenesis in the ovine corpus luteum. *Steroids*, **36**, 229-241.
- 73) CRIVELLO, J.F. and JEFCOATE, C.R. (1980). Intracellular movement of cholesterol in rat adrenal cells; kinetics and effects of inhibitors. *J. Biol. Chem.*, **255**, 8144-8151.