薬 学 雑 誌
YAKUGAKU ZASSHI
107 (1) 82-85 (1987)

ブタ精巣ミクロソームに存在する Δ^{16} - C_{19} -ステロイド合成活性及び
17 α -ヒドロキシラーゼ/リアーゼ活性に及ぼす Ketoconazole
及び各種ステロイドの阻害効果¹⁾

高橋雅行, 中陳静男, 篠田雅人*
星薬科大学

Inhibitory Effect of Ketoconazole and Various Steroids on Δ^{16} - C_{19} -Steroid
Synthesizing Activity and 17 α -Hydroxylase/Lyase Activity
in Pig Testicular Microsomes¹⁾

MASAYUKI TAKAHASHI, SHIZUO NAKAJIN and MASATO SHINODA*

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hoshi University,
2-4-41, Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo, 142, Japan

(Received September 10, 1986)

The inhibitory effects of ketoconazole and various steroids against Δ^{16} - C_{19} -steroid synthesizing activity and 17 α -hydroxylase activity in testicular microsomes of neonatal pig were investigated. Against these two enzyme activities in microsomes ketoconazole showed a concentration-dependent inhibitory effect and 50% inhibition concentration against the above two enzyme activities was about 0.6 μ M. Moreover, various steroids had a similar inhibitory effect against both of these activities, and 20 α -hydroxypregn-4-en-3-one and 20 β -hydroxypregn-4-en-3-one showed strong inhibitory effects. In the reconstituted system consisting cytochrome P-450 (17 α -hydroxylase/lyase), P-450 reductase, cytochrome b_5 , ketoconazole or 17 α -hydroxyprogesterone showed similar inhibitory effects against these two enzyme activities. The inhibition constants (K_i) of ketoconazole to Δ^{16} - C_{19} -steroid synthesizing activity and 17 α -hydroxylase/lyase were 0.22 μ M and 0.11 μ M, respectively. On the other hand, the K_i values of 17 α -hydroxyprogesterone against the both activities were 15.7 μ M and 11.6 μ M, respectively.

Keywords—cytochrome P-450; 17 α -hydroxylase/lyase; Δ^{16} - C_{19} -steroid synthesizing enzyme; cytochrome b_5 ; testicular microsomes; neonatal pig; ketoconazole; inhibition

著者らは精巣, 副腎皮質等の, アンドロゲンの生合成過程における C_{21} -ステロイドの C_{17} - C_{20} 間の切断反応 (リアーゼ反応) がミクロソームに局在する単一な分子種であるチトクローム P-450 (17 α -ヒドロキシラーゼ/リアーゼ) により触媒されることを初めて明らかにした.²⁾ 一方, ブタ精巣ミクロソームは C_{21} -ステロイドから多量の Δ^{16} - C_{19} -ステロイドを生合成することから,³⁾ ブタ精巣ミクロソームには二種の $C_{17,20}$ -リアーゼ活性: 1つは 17 α -ヒドロキシラーゼ/リアーゼ活性, もう1つは Δ^{16} - C_{19} -ステロイド合成活性が局在すると考えられる.⁴⁾ 著者らは, 後者の活性もチトクローム P-450 (17 α -ヒドロキシラーゼ/リアーゼ) が触媒するが, チトクローム b_5 の関与が必須であることも明らかにしている.³⁾ そこで, Δ^{16} - C_{19} -ステロイド合成活性を 17 α -ヒドロキシラーゼ/リアーゼ活性と比較検討する目的で各種ステロイド合成酵素の阻害物質として知られている数種について, すでにその阻害効果を比較した.⁴⁾

本論文では, 更に抗真菌剤として知られている ketoconazole (*cis*-1-acetyl-4-[4-[[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-imidazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]methoxy]phenyl]piperazine), 及び数種のステロイドを取り上げ, それらの両リアーゼ活性に及ぼす影響を, ブタ精巣ミクロソーム及び再構成系を用いて比較検討した.

実験の部

実験材料及び試薬 幼若ブタ精巣、放射性ステロイド、ピリジンスクレオチド等の購入は既報⁴⁾に従った。Ketoconazole は協和発酵より供与を受けた。標準ステロイドは Sigma 社製、その他の試薬はすべて市販の特級を用いた。

ミクロソームの調製及び各種酵素の精製 ブタ精巣ミクロソームの調製は既報⁴⁾に従った。チトクローム P-450 (17 α -ヒドロキシラーゼ/リアーゼ) 及び P-450 還元酵素の精製、純化は既報^{2a)}に従った。またチトクローム b₅ の精製は Onoda らの方法⁵⁾に従った。

Δ^{16} -C₁₉-ステロイド合成活性及び 17 α -ヒドロキシラーゼ活性の測定 両酵素活性の測定は既報⁴⁾に従った。基質として [4-¹⁴C] progesterone を用いた。

実験結果

ミクロソームレベルでの阻害効果

精巣ミクロソームの触媒する Δ^{16} -C₁₉-ステロイド合成活性及び 17 α -ヒドロキシラーゼ活性に及ぼす ketoconazole の阻害効果を Fig. 1 に示した。

Δ^{16} -C₁₉-ステロイド合成活性は 17 α -ヒドロキシラーゼ活性と同様に ketoconazole の用量に依存して阻害されることが認められ、両酵素活性に対する 50% 阻害濃度は 0.6 μ M であった。

次に数種のステロイドを取り上げ Δ^{16} -C₁₉-ステロイド合成活性及び 17 α -ヒドロキシラーゼ活性に及ぼす阻害効果を比較し、Fig. 2 に示した。

Δ^{16} -C₁₉-ステロイド合成活性は Fig. 2 A に示したように 20 α -hydroxypregn-4-en-3-one 及び 20 β -hydroxypregn-4-en-3-one により強く阻害され、その 50% 阻害濃度はそれぞれ 15 μ M 及び 12 μ M であった。また、高濃度において estradiol 及び 17 α -hydroxyprogesterone により阻害され、その 50% 阻害濃度はそれぞれ 40 μ M 及び 56 μ M であった。しかし、androstenedione 及び androstadienone ではその阻害効果は弱かった。これらの Δ^{16} -C₁₉-ステロイド合成活性に及ぼす阻害効果は Fig. 2 B に示すように 17 α -ヒドロキシラーゼ活性に及ぼす阻害効果と非常によく類似していた。

再構成系レベルでの阻害効果

ステロイド代謝酵素の阻害物質として ketoconazole、阻害効果を示すステロイドとして 17 α -hydroxyprogesterone を取り上げ、それらのチトクローム P-450 (17 α -ヒドロキシラーゼ/リアーゼ)、P-450 還元酵素及びチトクローム b₅ からなる再構成系の触媒する Δ^{16} -C₁₉-ステロイド合成活性及び 17 α -ヒドロキシラーゼ活性に及ぼす阻害効果を検討した。Fig. 3 に ketoconazole の阻害効果を示した。

両リアーゼ活性は ketoconazole の濃度に依存して阻害されることが認められ、Fig. 3 から阻害定数 (K_i) を算出すると、 Δ^{16} -C₁₉-ステロイド合成活性に対して 0.22 μ M、17 α -ヒドロキシラーゼ活性に対して 0.11 μ M であった。また両リアーゼ活性は、17 α -hydroxyprogesterone により競合的阻害を受け (結果は示していない)、 K_i を算出すると Δ^{16} -C₁₉-ステロイド合成活性に対して 15.7 μ M、17 α -ヒドロキシラーゼ活性に対して 11.6 μ M であった。

Fig. 1. The Inhibitory Effect of Ketoconazole on the Δ^{16} -C₁₉-Steroid Synthesizing Activity and 17 α -Hydroxylase Activity of Pig Testicular Microsomes

[4-¹⁴C]Progesterone (0.01 μ Ci/5 nmol) was incubated with immature pig testicular microsomes (388 μ g) and NADPH (250 nmol) in the presence of various concentrations of ketoconazole. The mixtures (1.0 ml) in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4), were incubated for 15 min at 37°C. ○, Δ^{16} -C₁₉-steroid synthesizing activity; ●, 17 α -hydroxylase activity.

Fig. 2. The Inhibitory Effect of Various Steroids on the Δ^{16} - C_{19} -Steroid Synthesizing Activity (A) and 17α -Hydroxylase Activity (B) of Pig Testicular Microsomes

The detail of a enzyme assay system was described in the legend of Fig. 1. Various steroids used for enzyme inhibition were ●, androstenedione; ○, androstadienone; ■, 17α -hydroxyprogesterone; □, estradiol; ▲, 20α -hydroxypregn-4-en-3-one; △, 20β -hydroxypregn-4-en-3-one.

考 察

ブタ精巣で特異的に合成される Δ^{16} - C_{19} -ステロイドはミクロソームに局在する酵素により、 C_{21} -ステロイドから合成されることが明らかにされている。⁶⁾ すなわち dehydroepiandrosterone あるいは androstenedione 等の C_{19} -ステロイドは pregnenolone あるいは progesterone から 17α -ヒドロキシ体を経由して合成されるのに対して、 Δ^{16} - C_{19} -ステロイドの生合成は 17α -ヒドロキシ体を経由することはない。⁷⁾

Ketoconazole はイミダゾール環を有し、広スペクトルを持つ抗真菌薬であり、その作用機序として、真菌内で lanosterol の 14-脱メチル反応を阻害して ergosterol 産生を減少させることにより真菌の成長を阻止すると考えられている。⁸⁾ 更に、精巣における 17α -ヒドロキシラーゼ/リアーゼ反応、⁹⁾ 副腎における $C_{20,22}$ リアーゼ反応及び $11\beta/18$ -ヒドロキシラーゼ反応¹⁰⁾等のチトクローム P-450 が関与する反応を阻害することも知られている。

今回、ブタ精巣ミクロソーム及びチトクローム P-450 (17α -ヒドロキシラーゼ/リアーゼ)の再構成系における Δ^{16} - C_{19} -ステロイド合成活性が ketoconazole により阻害されることを新たに発見し、この ketoconazole による Δ^{16} - C_{19} -ステロイド合成活性の

阻害程度が 17α -ヒドロキシラーゼ/リアーゼ活性の阻害程度と非常によく類似していることを認めた。なお、 17α -ヒドロキシラーゼ/リアーゼ活性については、ヒドロキシラーゼ及びリアーゼの活性は絶えず平行していることから、^{2b)} 17α -ヒドロキシラーゼ活性のみを測定し、 17α -ヒドロキシラーゼ/リアーゼの指標とした。

次に数種のステロイドの両リアーゼ活性に及ぼす阻害効果を検討した。実験に使用したステロイドとして、 17α -ヒドロキシラーゼ/リアーゼの反応中間体である 17α -hydroxyprogesterone、¹¹⁾ 反応生成物である androste-

Fig. 3. The Inhibitory Effect of Ketoconazole on Δ^{16} - C_{19} -Steroid Synthesizing Activity (A) and 17α -Hydroxylase Activity (B) Catalyzed by Re-constituted Cytochrome P-450 (17α -Hydroxylase/lyase) Enzyme System

The substrate, $[4-^{14}\text{C}]$ progesterone ($0.01 \mu\text{Ci}/5 \text{ nmol}$) was added to a cytochrome P-450 enzyme system, which was reconstituted with purified testicular P-450 (58.8 pmol), P-450 reductase (362 mU), cytochrome b_5 (1.18 nmol), NADPH (250 nmol) in 1 ml of 50 mM potassium phosphate buffer ($\text{pH } 7.4$), without or with various concentrations of ketoconazole. The mixtures for enzyme assay were incubated for 25 min at 37°C . The concentrations of ketoconazole as a inhibitor in A and B: a) $0.56 \mu\text{M}$, b) $0.28 \mu\text{M}$, c) not added, respectively.

nedione, そして Δ^{16} - C_{19} -ステロイドである androstadienone, その他に 17α -ヒドロキシラーゼ/リアーゼ反応を阻害することが知られている estradiol,¹²⁾ 20α -hydroxypregn-4-en-3-one 及び 20β -hydroxypregn-4-en-3-one¹⁸⁾ を取り上げた. これらのステロイドのミクロソームにおける Δ^{16} - C_{19} -ステロイド合成活性に及ぼす阻害効果は 17α -ヒドロキシラーゼ活性に及ぼす阻害効果と非常によく類似していることを明らかにした. 更に再構成系において, 17α -hydroxyprogesterone が Δ^{16} - C_{19} -ステロイド合成活性を阻害することを見出した. 17α -Hydroxyprogesterone はチトクローム P-450 (17α -ヒドロキシラーゼ/リアーゼ) のリアーゼ反応の基質となることから, 17α -ヒドロキシラーゼ活性は見かけ上阻害されるが, Δ^{16} - C_{19} -ステロイド合成活性が 17α -ヒドロキシラーゼ活性と同様阻害されることを認めた. また, 両リアーゼ活性に対する K_i 値も類似していた.

以上の結果は, 著者らが明らかにしているブタ精巢ミクロソームの触媒する Δ^{16} - C_{19} -ステロイド合成活性がチトクローム P-450 (17α -ヒドロキシラーゼ/リアーゼ) の触媒する反応であり, その反応にはチトクローム b_5 の存在が必須であるということを更に裏付けたと考える.

謝辞 Ketoconazole を供与していただいた協和発酵工業株式会社に感謝します.

引用文献及び注

- 1) Abbreviations: pregnenolone, 3β -hydroxypregn-5-en-20-one; progesterone, pregn-4-ene-3,20-dione; 17α -hydroxyprogesterone, 17α -hydroxypregn-4-ene-3,20-dione; dehydroepiandrosterone, 3β -hydroxyandrost-5-en-17-one; androstenedione, androst-4-ene-3,17-dione; androstadienol, androsta-5,16-dien-3 β -ol; androstadienone, androsta-4,16-dien-3-one; estradiol, estra-1,3,5(10)-triene-3,17 β -diol.
- 2) a) S. Nakajin, P. F. Hall, *J. Biol. Chem.*, **256**, 3871 (1981); S. Nakajin, J. E. Shivery, P.-M. Yuan, P. F. Hall, *Biochemistry*, **20**, 4037 (1981); b) S. Nakajin, M. Shinoda, M. Haniu, J. E. Shivery, P. F. Hall, *J. Biol. Chem.*, **259**, 3971 (1984).
- 3) S. Nakajin, M. Takahashi, K. Higashiyama, M. Shinoda, *J. Biochem. (Tokyo)*, **98**, 615 (1985); S. Nakajin, M. Takahashi, M. Shinoda, P. F. Hall, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **132**, 708 (1985).
- 4) 中陳静男, 高橋雅行, 篠田雅人, 薬誌, **105**, 677 (1985).
- 5) M. Onoda, P. F. Hall, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **108**, 454 (1982).
- 6) D. B. Gower, *J. Steroid Biochem.*, **3**, 45 (1972).
- 7) K. Shimizu, F. Nakada, *Biochim. Biophys. Acta*, **450**, 441 (1976).
- 8) H. Van den Bossche, H. G. Willemsens, W. Cools, F. Cornelissen, W. F. Lauwers, J. M. Van Cutsen, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **17**, 922 (1980).
- 9) S. C. Sikka, R. S. Swerdloff, J. Rajfer, *Endocrinology*, **116**, 1920 (1985).
- 10) K. Nakai, I. Miyamori, M. Ikeda, H. Koshida, R. Takeda, K. Suhara, M. Katagiri, *J. Steroid Biochem.*, **24**, 321 (1986).
- 11) S. Nakajin, P. F. Hall, *J. Steroid Biochem.*, **14**, 1249 (1981).
- 12) M. Onoda, P. F. Hall, *Endocrinology*, **109**, 763 (1981).
- 13) S. Nakajin, P. F. Hall, M. Onoda, *J. Biol. Chem.*, **256**, 6134 (1981).