



Title	幼若ラット辜丸におけるC19-Steroidsの生合成
Author(s)	山田, 盛男
Citation	大阪大学, 1973, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/2587
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士學位論文

幼若ラット睪丸における C₁₉-Steroids の生合成

テーマ1. 幼若ラット睪丸における Progesterone からの
5 α -reduced C₁₉-Steroids の生合成
—新しい生合成経路の発見—

テーマ2. 幼若ラット睪丸を構成する各細胞群における
Pregnenolone および Progesterone の代謝
—Germ Cell による C₂₁-17-OH-Steroids
および C₁₉-Steroids の生合成の発見—

大阪大学大学院 理学研究科
生化コース

山田 盛男

テーマ 1. 幼若ラット睾丸における Progesterone からの

5 α -reduced C₁₉-Steroids の生合成

—新しい生合成経路の発見—

共同研究者: 松本圭史 (大阪大学医学部第二病理学教室)

(序論)

ラット睾丸ホモジェネートを材料とし、Progesterone を基質にした incubation 実験により、胎児 (1, 2), 生後数日目 (1, 3-5) および成熟 (3-10) のそれは、図 1 に示す様な経路で、C₁₉-Steroids として、 Δ^4 -steroids である Androstenedione, Testosterone を main products とあるが、生後 20-40 日位の幼若のそれは、Androstenedione, Testosterone は、minor products で、Androstenedione, Androsterone, 5 α -Androstane-3 α , 17 β -diol 等の 5 α -reduced C₁₉-Steroids が main products であることが知られている (5, 8-12)。

更に、Steinberger (12), Coffey (5) は、上記の 5 α -reduced C₁₉-Steroids は、図 2 に示す様に、Progesterone から生成された Androstenedione, Testosterone の 5 α -及び 3-keto の速やかな還元反応によって生ずることを報告している。

図1. 胎児及び成熟ラット睾丸における Progesterone からの C₁₉-Steroids の生合成経路

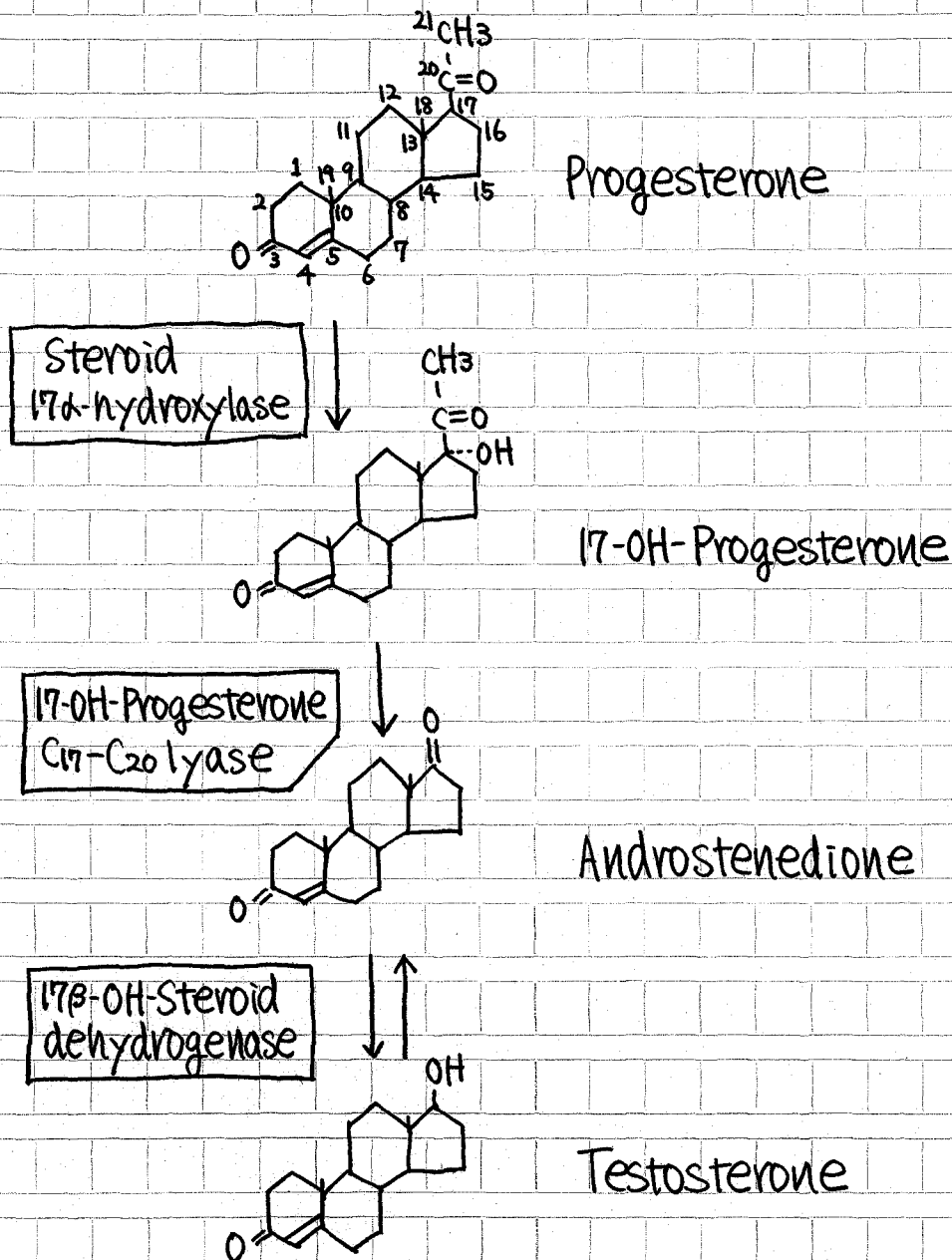
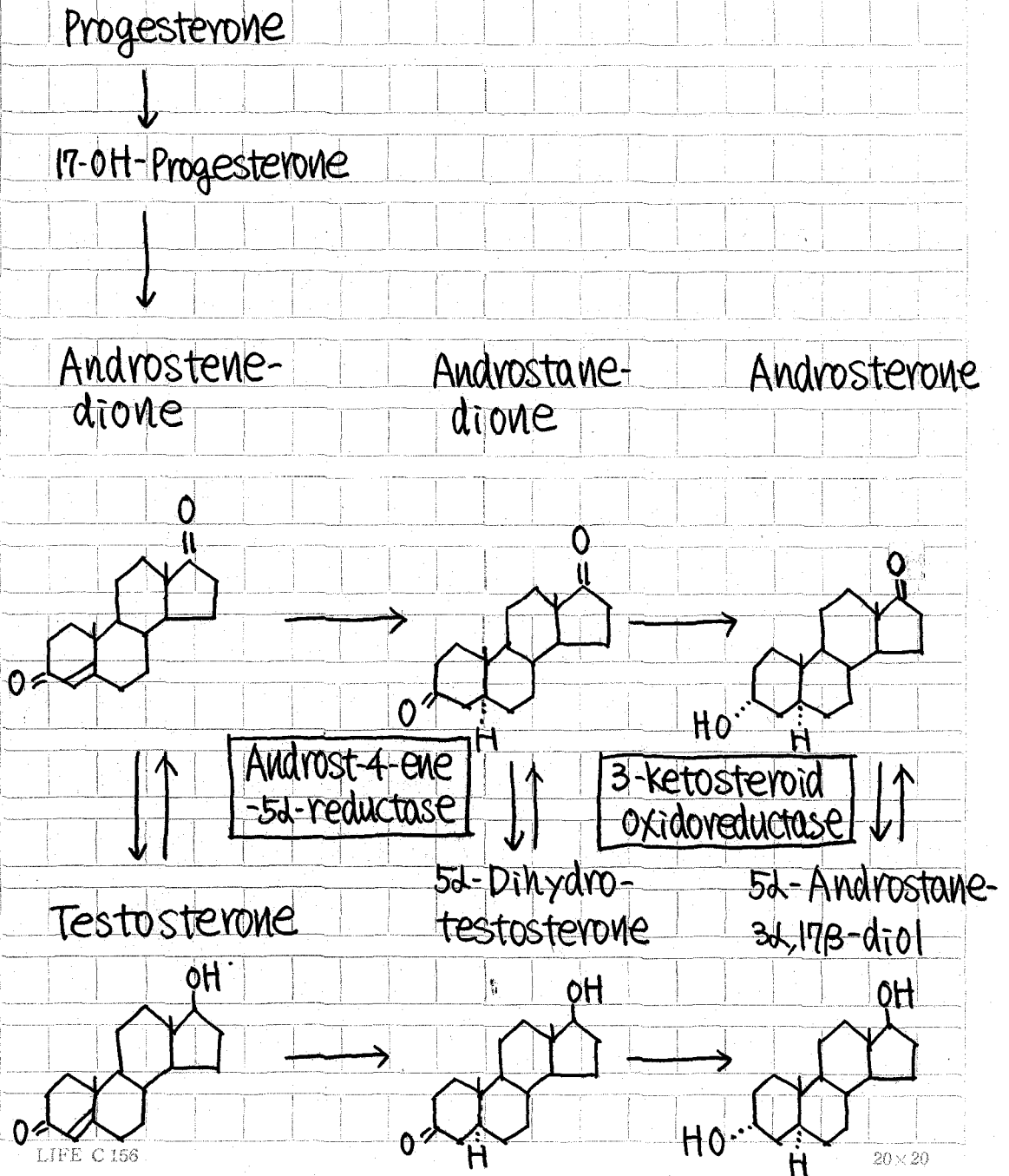


図2. 幼若ラット睪丸における Progesterone からの
C₁₉-Steroids の生合成経路 (I)

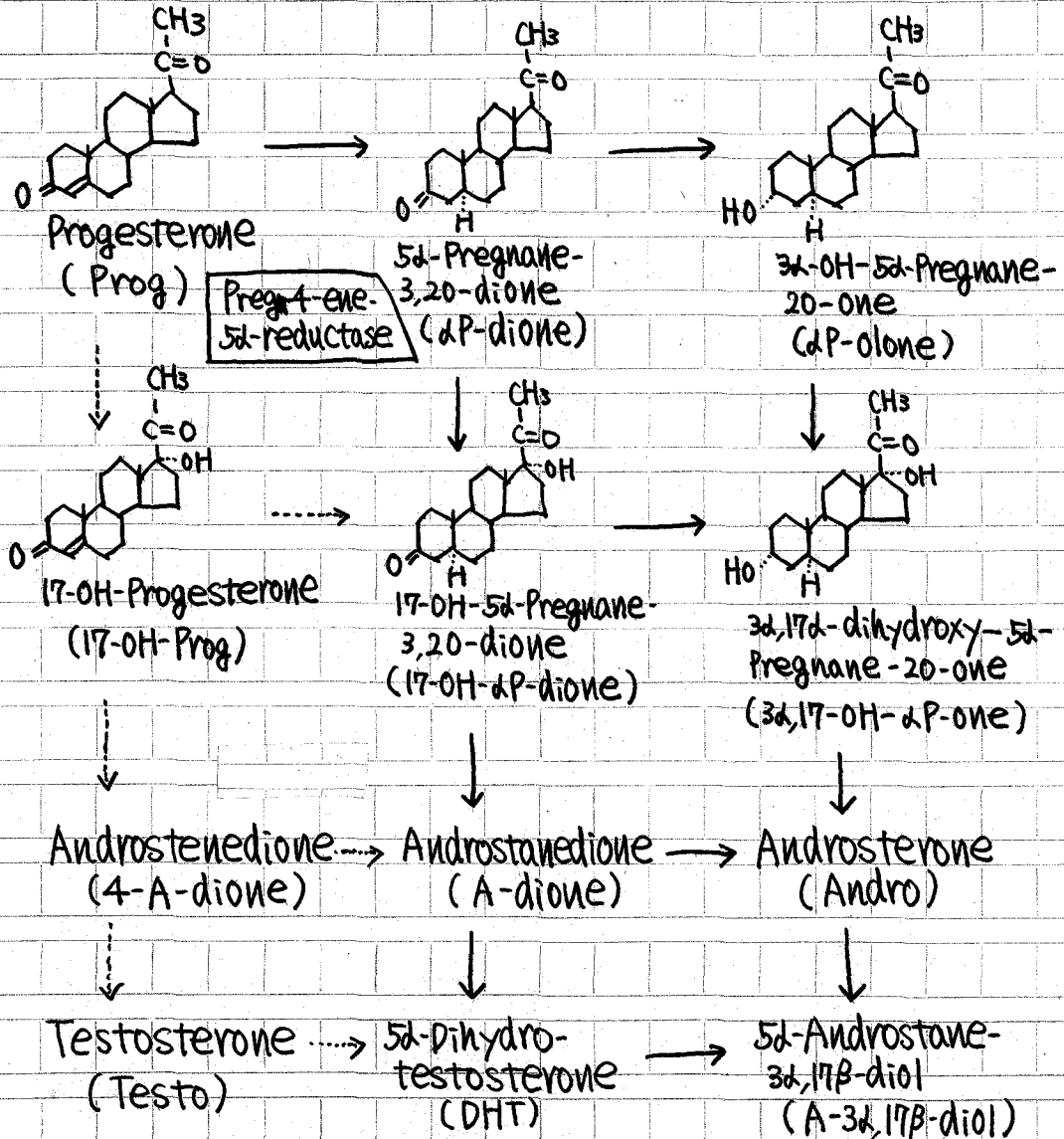


しかし、Inano (10) は、幼若ラット睪丸において、Pregnene核の5 α -及び3-keto還元のおこることを報告している。我々(13)も、³H-Pregnenolone, ³H-Progesteroneを基質にして、それを確かめると共に、同じ incubation timeにおいて、使用した組織量の多い方が、Progesteroneの5 α -reduced metabolitesの生成量が少ないことを見つけているので、次の様な生合成経路も存在するのではないかと考えた。

つまり、図3に示す様に、Progesteroneを基質にした場合、それが先づ、5 α -還元をおこし、5 α -Pregnane-3,20-dioneあるいは更に、3-keto還元を行い、3 α -OH-5 α -Pregnane-20-oneになってから、次に、17 α -Hydroxylation及び側鎖切断がおこり、Androstenedione, Androsterone, 5 α -Dihydrotestosterone, 5 α -Androstane-3 α ,17 β -diol等の5 α -reduced C₁₉-Steroidsが生成されるという経路が存在するのではないかと考え、本実験を行なった。

図3. 幼若ラット睪丸における Progesterone からの

C19-Steroids の生合成経路 (II)



注) 以後文中の Steroids の名称は () 内の略称で記す。

尚. 3-keto 還元 Steroids にはそれぞれ 3β-isomer が存在し得る。

《実験I》

幼若及び成熟ラット睪丸ホモジェネートにおける Progesterone の代謝

(実験方法)

- (1) 実験動物 --- 我々の研究室で飼育・繁殖させて来た Wistar 系の生後33日目の幼若ラット(精子形成の途中段階で成熟した精子はまだ造られない)と110日目の成熟ラット(十分に精子形成がおこなわれている)の雄ラットを使用した。
- (2) 化学薬品 --- 7- ^{3}H -Progesterone は the New England Nuclear Corporation から購入し、使用直前に Hexane-saturated Formamide system (14) の paper chromatography により purify した。Non-radioactive standard steroids は Steraloids, Inc. 及び Ikapharm より購入した。NADPH は Sigma Chemical Company より購入した。
- (3) Incubation --- 幼若及び成熟ラット睪丸の被膜をとり、wet weight を測り、0.001 M の EDTA を含む 0.25 M Sucrose で homogenate にした。1 n mole/ μCi の ^{3}H -Progesterone を試験管(2x10 cm)に入れ、底によく洗めた後、0.02 ml の Ethanol で溶解した。各試験管に、0.06 M nicotinamide, 2 mM MgCl_2 , 0.8 μg NADPH を含む 0.3 M Potassium Phosphate buffer

(pH 7.4) 0.5ml を加えた。それに、0.5ml の 10, 20mg の tissue を含む homogenate を加えることにより反応を開始した。

Total Volume を 1.0ml とした Sample は、それぞれ 34°C で 30 分 incubation し、0.1ml の 1N-HCl を加えることにより反応を停止させた。

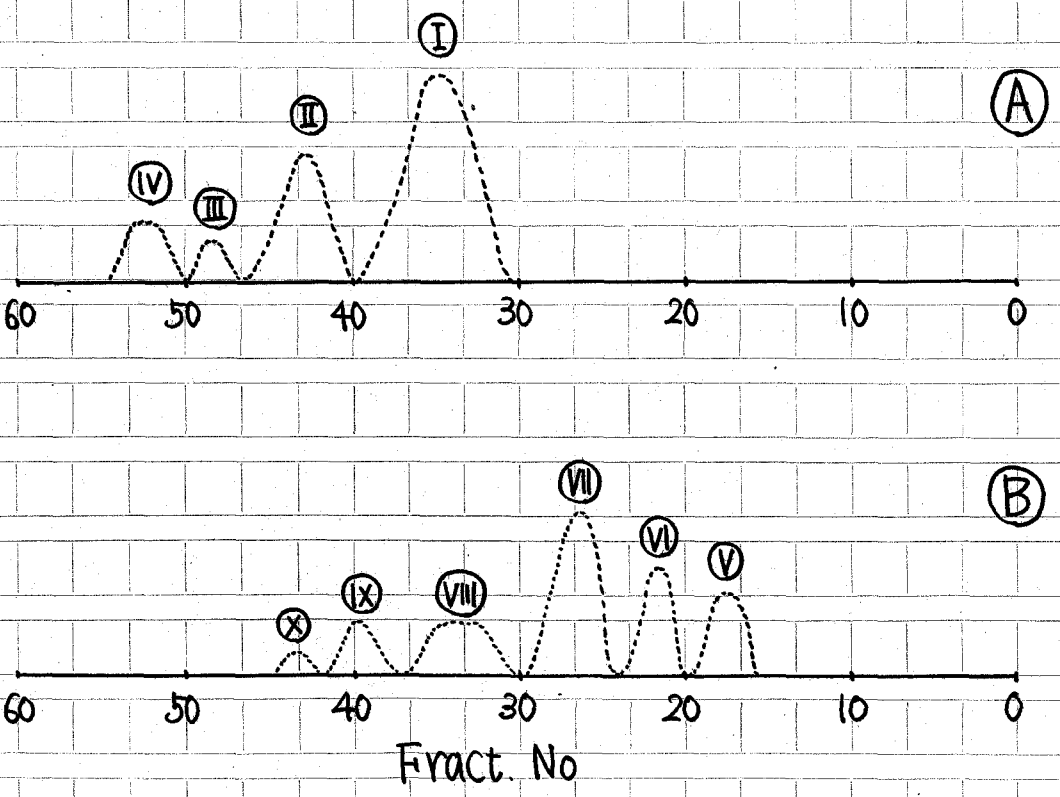
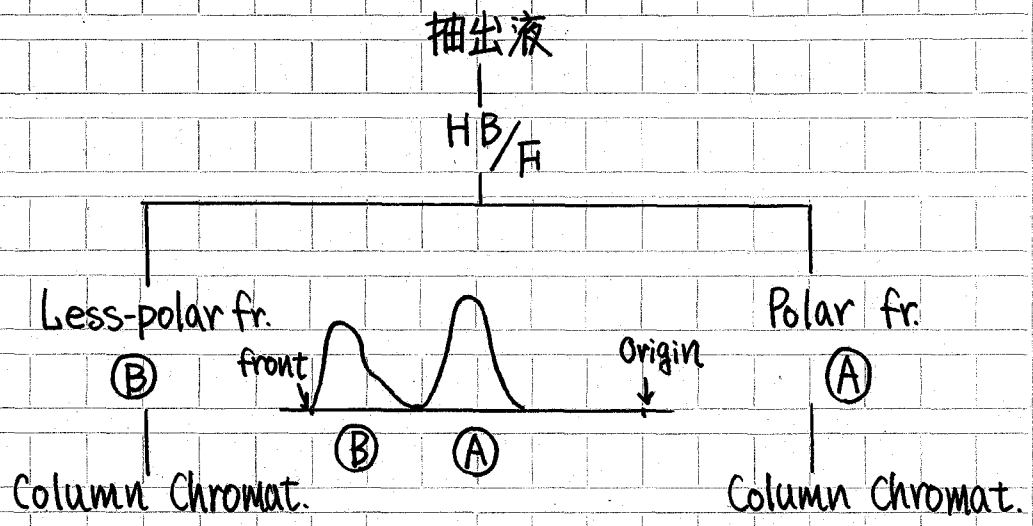
- (4) ステロイドの分離---各 Sample に 100 μ g 前後の non-radioactive な Prog, Δ P-dione, 17-OH-Prog, 4-A-dione, Andro, Testo, DHT, A- Δ , 17 β -diol, A- Δ , 17 β -diol, 20 α -dihydroprogesterone を Carrier として加えた。これを 10ml の Ether: Chloroform (4:1, v/v) で 3 回抽出した後、5ml の純水で 2 回水洗した。最初の chromatography として、Zaffaroni 型 (14) の paper chromatography, Hexane: Benzene (1:1, v/v)-saturated Formamide system (HB/F) を用いた。これにより、Polar fraction (A) と Less-polar fraction (B) に 2 分された。次に、両方とも Amberlite IRC-50 を用いる elution column chromatography (15), Ethanol: Benzene: cyclohexane: Water (25: 50: 225: 1, v/v) により、(A) は ① Δ , 17-OH- Δ P-one, ② 17-OH-Prog + A- Δ , 17 β -diol, ③ Δ , 17-OH- Δ P-one, ④ Testo + A- Δ , 17 β -diol の 4 つの fraction に、(B) は ⑤ Δ P-dione, ⑥ Δ P-olones (Δ P-one

の 3α -, 3β - を足したもの) + A-dione, (VII) Prog + Andro + 17-OH- Δ P-dione, (VIII) DHT + Epiandro (Andro の 3β -isomer), (IX) 4-A-dione, (X) 20α -dihydroprogesterone の 6つの fraction に分離された。

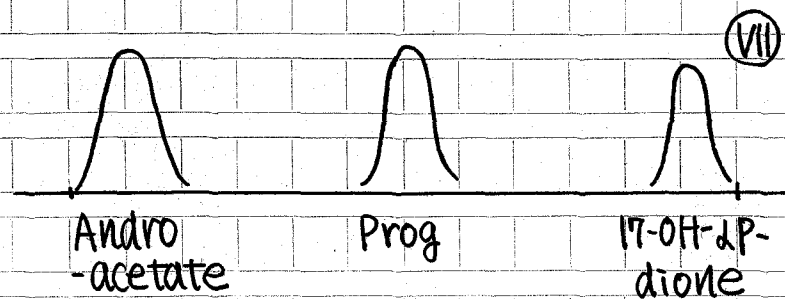
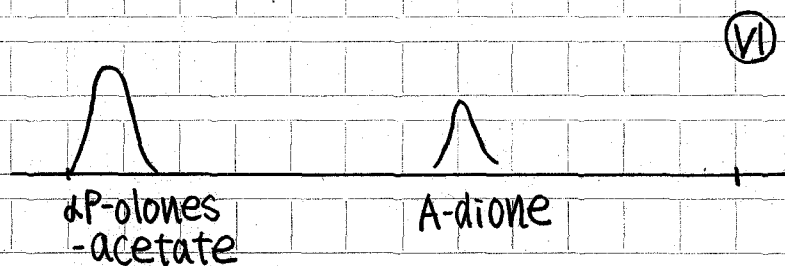
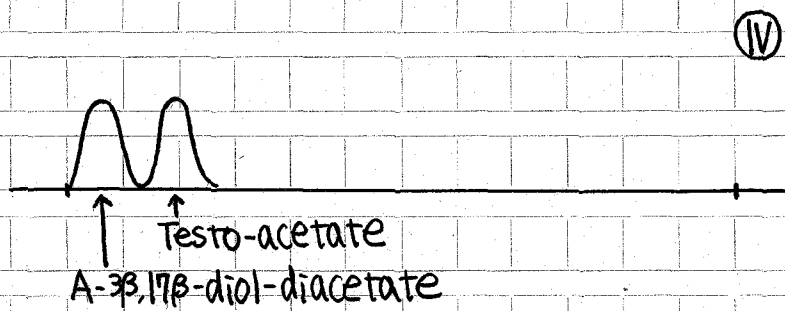
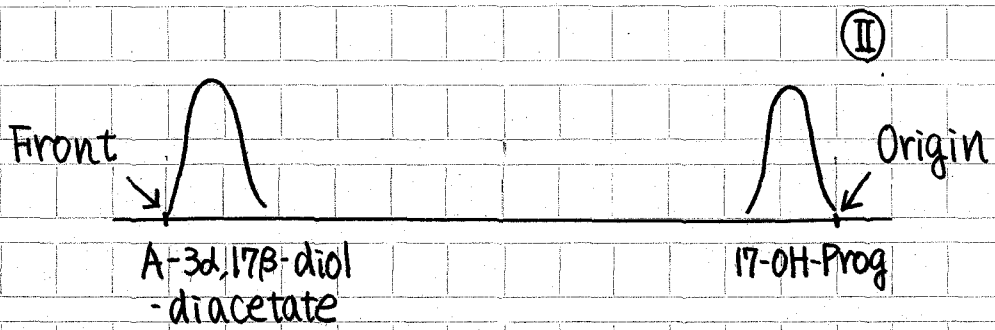
(II), (IV), (VI), (VII) 各 fraction は、アセチル化 (0.15 ml の Acetic anhydride : Pyridine (1:5, v/v) を加え、常温で 24 時間放置 --- 3-OH のみがアセチル化される条件)) し、Hexane-saturated Formamide system (H/F) の paper chromatography においてすべて分離された。(以上の step を図 4 に示す。)

(VIII) は、2 分して、後で述べる再結晶法により分離、同定した。尚、各 products の産生量については、最初の chromatography 上で、各々の fraction に含まれる radioactivity の割合を % で算出し、この各分画の % を次の chromatography の結果に従って、この中に含まれる Steroids の割合に応じて分配して行き、それを産出量とした。

図4. ステロイドの分離



②, ④, ⑥, ⑦ → Acetylation → H/F



(5) ステロイドの同定

再結晶法 Chromatography により分離された各 ^3H -Product に、それに相当すると思われる non-radioactive standard steroid 15mg を加え、Methanol:Chloroform (1:1, v/v) 10 数滴でよく加熱溶解してから、数滴をバイアルにとり、乾燥させた後、Methanol 2.0ml でよく溶かし、その 0.2ml を試験管にとり、U.V 吸収あるいは発色反応を利用し、分光光度計で Optical density を測り、質量 (mg) を算定する。残りの 1.8ml は乾燥させた後、Toluene-base の Scintillator 5ml を加え、液体シンチレーションカウンターで radioactivity (dpm) を測定する。又、加熱溶解した残りの Sample は、乾燥させた後、適当な有機溶媒 (Methanol, Ethanol, n-Hexane, Chloroform etc) 少量で溶かした後、freezer の中に、一夜放置し、結晶をつくらす。結晶が出来たら、上澄液と結晶の一部をそれぞれバイアルにとり、上記の操作を繰返す。この様にして、溶媒を変えて、数回 (普通は 3 回) 再結晶を行い、specific radioactivity (dpm/mg) を Constant にすることにより、その purity を計算し、各 product の同定を行うと同時に、産生量を正確に算出する。最後の 2 度の結晶の specific radioactivity が $\pm 5\%$ of the mean であることを最低条件とした。

Δ^5 P-olone, 17-OH- Δ^5 P-dione, 3 β ,17-OH- Δ^5 P-one 以外のすべての ^3H -Products は、以上の方法で同定した。その一例を表1に示す。

表1. 再結晶法による ^3H -products の同定

Isolated steroid	3 β ,17-OH- Δ^5 P-one	Andro-acetate
re-crystallization	Specific Radioactivity (dpm/mg)	
Origin	13,800	1,530
1st. (EtOH+chl.)		(MeOH)
Mother liquor	18,500	4,220
Crystal	12,300	1,210
2nd. (MeOH+chl.)		(EtOH)
Mother liquor	13,500	1,680
Crystal	12,900	1,230
3rd. (EtOH+chl.)		(MeOH)
Mother liquor	12,700	1,290
Crystal	12,600	1,230
Purity	91.3%	79.9%

尚、 Δ^5 - Δ^4 -olones, 17-OH- Δ^5 -dione, $3\alpha, 17$ -OH- Δ^5 -one の standard steroids は、非常に高価なために、再結晶法では、同定出来なかった。そこで、次の方法によって、tentatively に同定した。

^3H - Δ^5 -olones acetate 及び ^3H - Δ^5 -olones は non-radioactive standard steroids と chromatography 上の位置が一致し、脱アセチル化 (0.8 ml の MeOH でよく溶かした後、0.2 ml の 0.33 N NaOH を加え、よく混合し、暗所に室温で 20 時間放置) した後に、酢酸中における短時間のクロム酸酸化 (0.5% Chromium trioxide in 90% aqueous acetic acid 0.5 ml で暗所に室温で 30 分間放置……3-OH のみが酸化される条件) で Δ^5 -dione となり、これは再結晶法で同定された。 ^3H -17-OH- Δ^5 -dione は、chromatography 上の位置、アセチル化されないこと (前述のアセチル化法では、17-OH はアセチル化されない)、酢酸中の長時間のクロム酸酸化 (0.5% chromium trioxide in 90% aqueous acetic acid 0.5 ml で暗所に室温で一夜放置……3-OH の酸化及びステロイド骨格以外の C-側鎖が切断される条件) で A-dione となり、再結晶法で同定された。 ^3H - $3\alpha, 17$ -OH- Δ^5 -one は、chromatography 上の位置、アセチル化されること、Pyridine 中のクロム酸酸化 (0.5% Chromium trioxide in Pyridine 0.5 ml で暗所に室温で一夜放置……3-OH のみが酸化される条件) で、

17-OH- Δ P-dione と chromatography 上の位置が一致し、酢酸中における長時間のクロム酸マ化で A-dione となり、これは再結晶法で同定された。

(実験結果)

実験結果を表2に示す。(注-生成量は%で表わしてある。)

先づ、幼若の睪丸は、高い Prog の代謝活性を持つことがわかると同時に、Steinberger (12), Coffey (5) の実験結果とは異なり、 Δ^4 -steroids である Prog, 17-OH-Prog, 4-A-dione, Testo からのすべての 5 α -reduced metabolites が検出された。しかも、Prog の 5 α -reduced metabolites である Δ P-dione, Δ P-olones の和は、使用した組織量の多い方が有意に少ないことから、これらは中間産物であることが示唆される。又、3 α , 17-OH- Δ P-one が大量に蓄積されることがわかった。これに反して、成熟の睪丸は、幼若のそれに比べ、はるかに低い Prog の代謝活性を持ち、5 α -reduced products はほとんど検出されなかった。尚、DHT の生成が認められているがこれは、基質中に contamination していたものである。又、成熟において、この条件下では、17-OH-Prog のみが main product として検出されているが組織量を増やすか incubation time を長くすれば、4-A-dione, Testo が main products として蓄積されてくるのは明らかである。20 α -dihydroprogesterone は、共に検出されなかった。

表2. 幼若及び成熟ラット脳丸における ^3H -Progesteroneの代謝

Tissue	Immature		Adult		No tissue
	10mg	20mg	10mg	20mg	
Amount of tissue	Percentage formation				
Δ^5 -P-dione	3.6	0.7	0.3	0.4	<0.1
Δ^5 -P-olones	12.0	6.4	0.4	0.6	<0.1
Sum of Δ^5 -reduced met.	(15.6)	(7.1)	(0.7)	(1.0)	
17-OH-Prog	2.3	<0.2	14.6	25.2	0.0
17-OH- Δ^5 -P-dione	18.0	5.1	0.2	0.1	0.0
3 α ,17-OH- Δ^5 -P-one	30.6	49.4	<0.1	<0.3	0.0
3 β ,17-OH- Δ^5 -P-one	13.7	8.1	<0.1	<0.1	0.0
Sum of Δ^5 -reduced met.	(62.3)	(62.6)	(0.2)	(0.1)	
4-A-dione	3.2	1.4	1.2	2.7	<0.1
Testo	1.3	1.1	0.3	1.0	0.0
DHT	0.7	1.1	0.4	0.6	0.8
Andro	1.8	7.4	0.0	0.0	0.0
EpiAndro	2.1	2.9	0.0	0.0	0.0
A-3 α ,17 β -diol	0.2	1.3	0.0	0.0	0.0
A-3 β ,17 β -diol	0.2	0.4	0.0	0.0	0.0
A-dione	1.6	1.4	0.0	<0.1	<0.1
Sum of Δ^5 -reduced met.	(5.9)	(13.7)	(0.0)	(0.0)	
Prog unchanged	2.1	4.4	77.0	61.5	95.4

[^3H]-Progesterone ($1\text{ nmole}/\mu\text{Ci}$) was incubated at 34°C for 30 min with 10mg or 20mg homogenates.

(考察)

従って、幼若ラット睪丸において、4-A-dione, Testo が蓄積されないのは、Prog, 17-OH-Prog, 4-A-dione, Testo のすべてから速やかに5 α -及び3-keto 還元がおこるからと考えられる。

又、逆に、成熟において、4-A-dione, Testo が蓄積されるのはすべての5 α -還元がおこりにくいからと考えられる。

尚、我々の実験結果と Steinberger (12), Coffey (5) の実験結果との違いについては《全体としての考察》(P-26) でディスカッションする。

《実験Ⅱ》

幼若睾丸ホモジネートにおける Progesterone の代謝
(Time Course 実験)

(実験方法)

(1) 実験動物…実験Ⅰに同じ。ただ、生後33日目の雄ラットのみを用いた。

(2) 化学薬品…実験Ⅰに同じ。

(3) Incubation…実験Ⅰに同じ。ただ、すべて 50mg の tissue を用い、incubation time を 1, 2, 5, 15, 30, 60, 120 分とした。

(4) ステロイドの分離・同定…実験Ⅰに同じ。

(実験結果)

実験結果を表3及び図5に示す。(注…生成量は%で表わしてある。)

先づ、 Δ^4 -group に関しては、基質である Prog は、incubation time 2分で既に 50% 以上代謝され、15分では 1% 前後しか残っていない。

17-OH-Prog は、2分でピーク (19.8%) で、やはり、15分では 0.1% 以下しか検出されない。Testo + 4-A-dione は、5分でピーク (5.3%) で、30分では 1% 以下である。

次に、5 α -reduced group に関しては、先づ、Prog の 5 α -reduced metabolites である Δ^5 -P-dione + Δ^5 -P-olones は、5分でピーク (27.9%) で、60分では 1% 以下、17-OH-Prog の 5 α -reduced

metaboliteである17-OH- Δ P-dioneは、5分で7 μ g (15.1%)で、15分では4%以下、更に、その3 α -reduced metaboliteである3 α ,17-OH- Δ P-oneは、15分から30分の間、実に total products の50%として、蓄積されるが、それ以降、漸減し、120分では15.5%であった。このことは、3 α ,17-OH- Δ P-oneも、又、中間産物であることを示している。又、3 α ,17-OH- Δ P-oneの漸減に対して、4-A-dioneの5 α -及び3 α -reduced metaboliteであるAndroが、漸増し、120分では47.2%に達した。Testoの5 α -及び3 α -reduced metaboliteであるA-3 α ,17 β -diolは、30分で6.4%、120分で11.9%であった。

(考察)

この実験において、幼若ラット睾丸は、図6に示す様な経路で、Progから、5 α -reduced Ca-Steroidsを生成する主要な生合成経路を持っていることが強く示唆される。

表3. 幼若ラット睪丸における ^3H -Progesteroneの代謝 (Time Course)

Tissue	Immature							No tissue
Incubation time	1 min	2'	5'	15'	30'	60'	120'	120' 注)
Percentage formation								
Prog	58.8	49.6	8.4	1.2	1.1	1.2	1.6	95.6
20 α -OH-Prog	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Δ P-dione	4.6	7.5	13.6	1.3	0.4	0.2	0.3	0.3
Δ P-olones	14.3	8.6	14.6	10.7	2.7	0.5	<0.3	<0.1
Sum of 5 α -reduced met.	(18.6)	(15.8)	(27.9)	(11.7)	(2.8)	(0.4)	(0.0)	
17-OH-Prog	10.5	19.8	10.0	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
17-OH- Δ P-dione	0.7	2.4	15.1	3.8	2.2	2.3	2.6	<0.2
3 α ,17-OH- Δ P-one	2.2	2.1	13.3	48.7	52.9	36.2	15.5	<0.1
3 β ,17-OH- Δ P-one	0.8	0.8	3.1	3.7	1.3	0.4	0.4	0.0
Sum of 5 α -reduced met.	(3.7)	(5.3)	(31.5)	(56.2)	(56.4)	(38.9)	(18.5)	
4-A-dione	1.4	2.1	3.6	0.8	0.1	0.0	0.0	0.0
Testo	0.5	0.8	1.7	1.1	0.3	<0.1	<0.1	0.0
DHT	<0.8	<0.8	<0.8	1.0	<0.8	1.1	2.7	0.9
Andro	<0.1	<0.1	0.5	7.4	17.4	28.7	47.2	<0.1
Epi Andro	<0.2	0.2	1.1	2.1	1.1	1.1	1.8	0.0
A-3 α ,17 β -diol	<0.1	<0.1	0.2	2.2	6.4	11.3	11.9	<0.1
A-3 β ,17 β -diol	<0.2	<0.1	<0.1	0.5	0.4	0.4	0.4	0.0
A-dione	<0.1	<0.1	1.0	1.0	0.9	1.6	5.7	0.0
Sum of 5 α -reduced met.	(0.0)	(0.2)	(2.8)	(13.3)	(26.2)	(43.3)	(68.8)	

注) 0 min における control もこれと同様の結果だったので記さなかった。

図5. 幼若ラット睪丸における ^3H -Progesterone
の代謝 (Time course 実験)

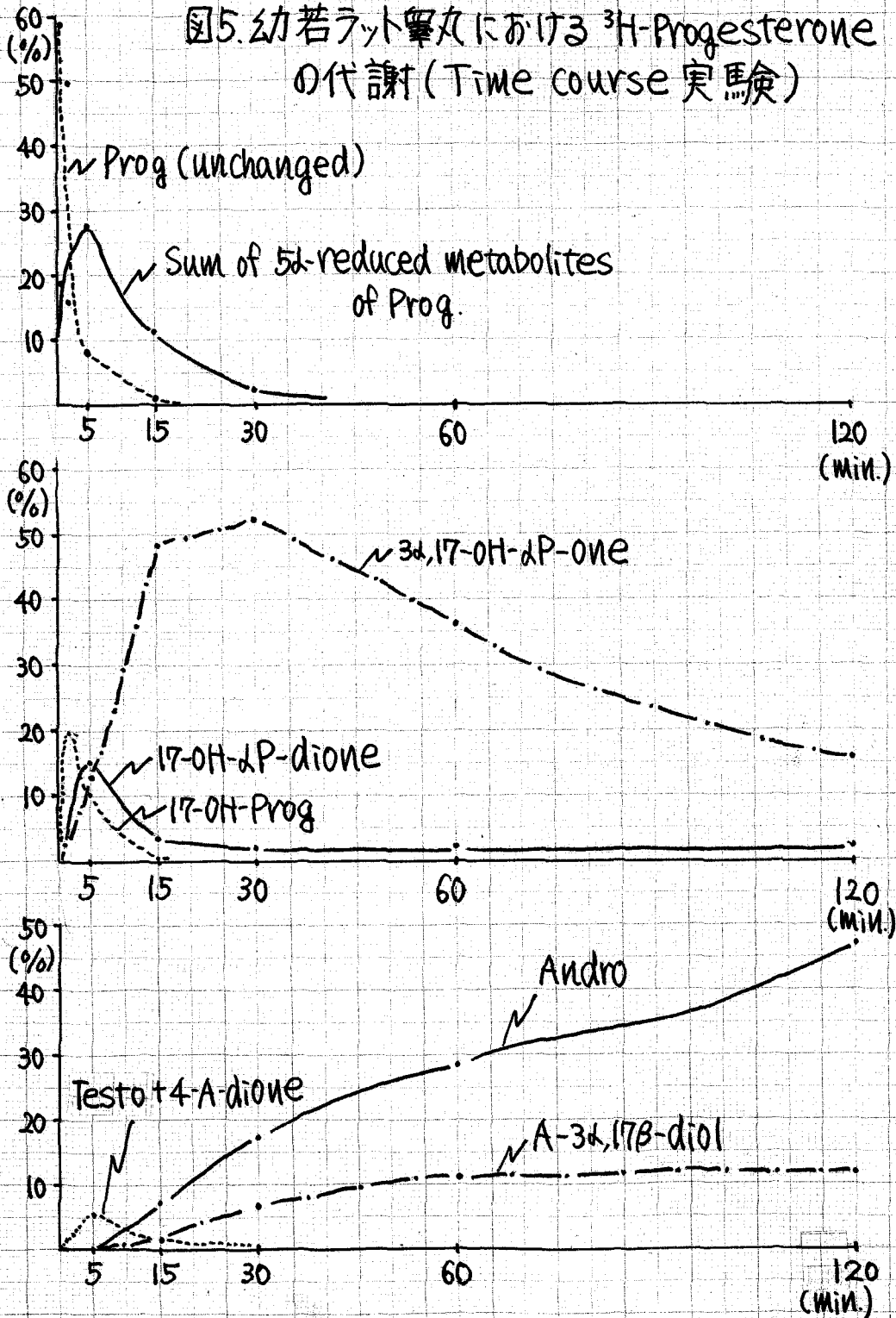
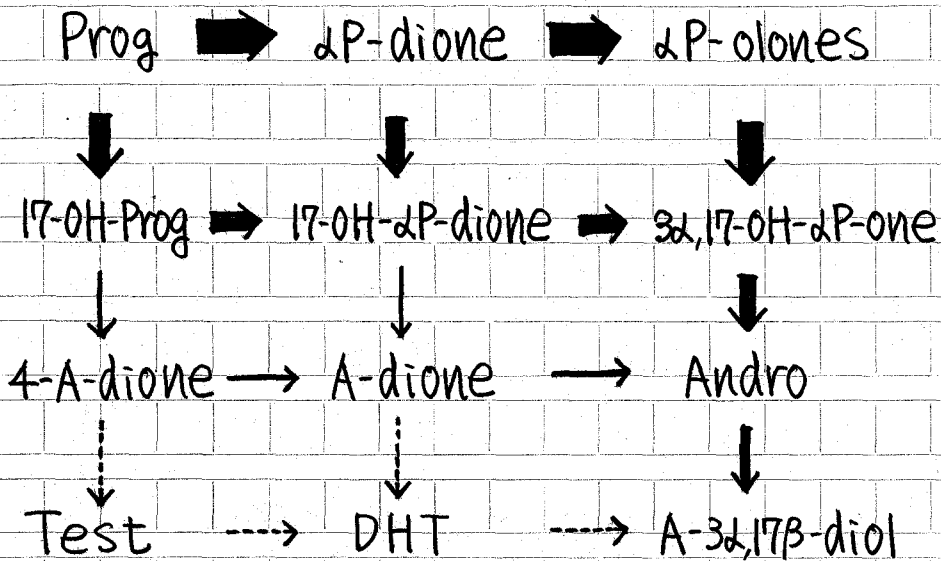


図6. 我々の考えている幼若ラット睪丸における Progesterone の代謝パターン



次に、図6の生合成経路の存在をより確実化するために、

Progesteroneの5 α -reduced metaboliteである Δ P-dioneが実際に5 α -reduced C α -Steroidsが生合成されるかどうか調べた。

《実験Ⅲ》

幼若及び成熟ラット睾丸ホモジネートにおける ^3H -5 α -Pregnane-3,20-dione (^3H - Δ P-dione)の代謝

(実験方法)

(1) 実験動物 --- 実験Ⅰに同じ。

(2) 化学薬品 --- 実験Ⅰに同じ。

但し、基質として使用した ^3H - Δ P-dioneは、 ^3H -Progを幼若ラット睾丸ホモジネートとincubationし、前述の種々のChromatographyとクロム酸タ化を用いて、純化、精製したものをを用いた。その純度は、再結晶法で99.5%以上であった。

(3) Incubation --- 実験Ⅰに同じ。ただ10mg, 20mg, 100mgのtissueを用い、Incubation timeをすべて30分とした。

尚、Substrateは、1nmole/ μmCi とした。

(4) ステロイドの分離、同定 --- 実験Ⅰに同じ。

(実験結果)

実験結果を表4に示す。(注…生成量は%で表わしてある。)

幼若において、17-OH-Prog, 4-A-dione, Testo の5 α -及び3-keto reduced productsが有意に検出されている。例えば、100mgの組織量を用いた場合、17-OH-Progの5 α -reduced metabolitesの和は、53.4%, 5 α -reduced C $_{19}$ -Steroidsの和は、24.7%であった。

又、 Δ^4 -groupは全然検出されなかった。

成熟においても、幼若のそれに比べて生成量は少ないが明らかに5 α -及び3-keto reduced productsが生成されている。例えば、100mgの組織量で、 Δ^4 -P-olonesは63.4%, 17-OH-Progの5 α -reduced metabolitesの和は、18.0%, 5 α -reduced C $_{19}$ -steroidsの和は、2.5%であった。又、幼若のそれと同様に Δ^4 -groupは全然検出されなかった。

(考察)

幼若ラット睪丸において、実際に、 Δ^4 -P-dioneより5 α -reduced C $_{19}$ -Steroidsが生合成されること及び5 α -還元をひき起こす酵素(5 α -reductase)は、全く非可逆的に働くことが示された。従って、図6(P-21)に示す様な主要な生合成経路が存在することが明らかになった。

又、成熟においては、実験Iの結果と考え合わせれば、3-ketoを

還元する酵素 (3-keto oxidoreductase) は、高い活性を示すが、
それに先立つ 5 α -reductase 活性が非常に弱いため、Progesterone
を基質に使用すると、5 α -reduced products が生成されないことが
明らかになった。

表4. 幼若及び成熟ラット睪丸における ^3H - Δ^4 -P-dioneの代謝

Tissue	Immature			Adult			No tissue
Amount of tissue	10mg	20mg	100mg	10mg	20mg	100mg	
Percentage formation							
Prog.	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Δ^4 -P-olones	29.7	17.5	7.2	54.9	62.5	63.4	<0.3
17-OH-Prog	<0.2	<0.2	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
17-OH- Δ^4 -P-dione	12.1	8.4	2.1	2.3	1.6	0.4	<0.1
3 β ,17-OH- Δ^4 -P-one	20.0	39.4	50.1	5.9	9.4	17.0	0.0
3 β ,17-OH- Δ^4 -P-one	7.8	7.7	1.2	0.4	0.6	0.6	0.0
Sum of 5 α -reduced met.	(39.9)	(55.5)	(53.4)	(8.6)	(11.6)	(18.0)	
4-A-dione	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Testo	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
DHT	0.9	0.7	0.6	0.2	0.2	0.2	0.3
Andro	1.4	5.1	17.6	0.4	0.7	1.7	<0.1
Epi Andro	1.9	2.3	1.6	0.2	0.4	0.2	0.0
A-3 α ,17 β -diol	0.2	0.6	4.3	0.1	0.1	0.6	0.0
A-3 β ,17 β -diol	<0.2	<0.1	<0.3	0.0	0.0	0.0	0.0
A-dione	1.4	1.9	0.9	0.3	0.2	<0.1	0.0
Sum of 5 α -reduced met.	(5.5)	(10.3)	(24.7)	(1.0)	(1.4)	(2.5)	
Δ^4 -P-dione unchanged	10.6	5.2	3.3	30.2	17.7	6.6	96.1

《全体としての考察》

我々は Pregnenolone (Preg) を基質とした場合にも、Prog, 17-OH-Prog の 5 α -reduced metabolites 及び 5 α -reduced C₁₉-Steroids を検出している (13) ので、幼若ラット睪丸は Preg, Prog を基質にした場合、4-A-dione, Testo を中間体とせずに、Andro, A-3 α , 17 β -diol 等の 5 α -reduced C₁₉-Steroids を生合成する主要な経路を持っていることを本実験によって明らかにした。この結果は Steinberger (12), Coffey (5) の結果と、最終生成物に関しては同じであるが生合成経路に関しては異なる。これは、現在のところ、Incubation time, 組織量の違い、あるいはもっと本質的な Rat の strain, 生後日数の違い等によるものと考えている。

実際、Androst-4-ene-5 α -reductase 活性 (10, 16, 17) 及び Pregn-4-ene-5 α -reductase 活性 (10) は、生後日数に従って著明に変化して行くことが証明されているので、図3 (P-5) に示す様な生合成経路パターンは生後日数と密接に関係して変化して行くと思われる。尚、生後日数による生合成経路パターンの変化の生物学的意義及び 5 α -reduced C₁₉-steroids の生物学的機能については、ディスカッションの域を出ていないが、現在わかっていること及び考え得ることを次に述べる。

(1) 5 α -Androstane diols の生物学的機能

1968年以來、男性ホルモンの標的組織である前立腺、精のう等は、特異的に高い Androst-4-ene-5 α -reductase 活性を示し、Testo は DHT となってはじめて男性ホルモン作用を現わすことが明らかになった(18-20)。更に、最近、男性ホルモンの標的組織と考えられる視床下部、脳下垂体(21,22)、ラット睪丸の精細管(16,17,23)、germ cell(24)でも、高い Androst-4-ene-5 α -reductase 活性を示すことが明らかにされた。

又、Robel(25,26)は、ラット前立腺において、DHTは細胞増殖に関係し、5 α -Androstane diol は分泌を促進すると報告し、

Ohno(27)は、マウス腎において、A-3 α ,17 β -diol が特異的に alcohol dehydrogenase, β -glucuronidase を induce することを報告している。

以上のことから、睪丸においても、A-3 α ,17 β -diol が睪丸の持つ機能、特に Spermatogenesis と強い関係を持っている可能性があり、今後注目される。

(2) 生後日数による C₁₉-steroids 生合成経路 パターンの変化とその生物学的意義

図7(a), (b) に示す様に、ラットにおいて、男性ホルモンの代表的な標的

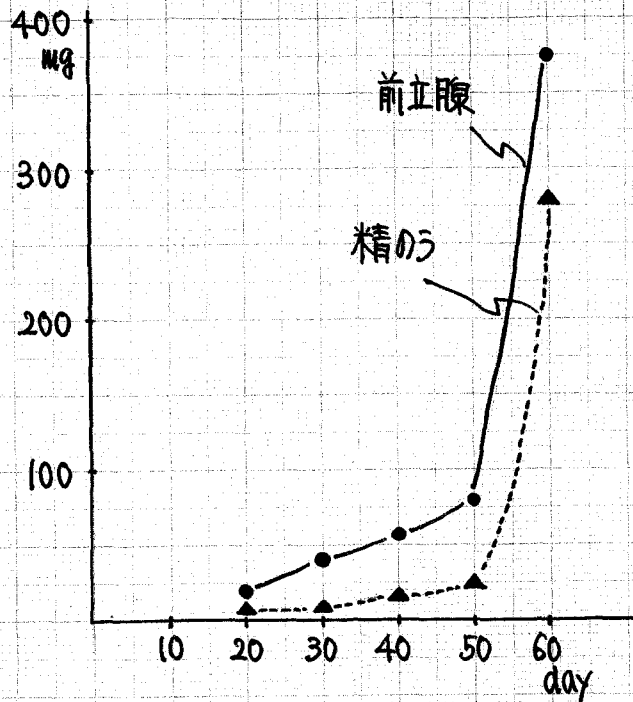
組織である前立腺、精のうは、生後50日頃から急速に、その組織重量を増て行き、しかも、それは明らかに血中のTesto濃度に依存していることが知られている。しかも、図8(a), (b)に示す様に睪丸は、Testoの血中濃度が非常に低い20日すぎから急速に組織重量を増して行き(主に germ cellの増加)、Testoの血中濃度が高くなりはいめる50日頃には、もはや、その重量増加は、stopしてしまう。

しかも、一日あたりの重量増加の変化は、Androst-4-ene-5 α -reductase 及び Pregn-4-ene-5 α -reductase 活性の変化と全く一致している。

以上のことから、幼若ラット睪丸は、図2(P-3)あるいは図6(P-20)に示す様な 5 α -reduced C₁₉-steroids 生合成経路を持ち、Testoを血中に分泌することなく、A-3 α , 17 β -diolを生成し、男性二次性徴を亢進させずに、Spermatogenesisに促進効果を及ぼし、成熟ラット睪丸は、図1(P-2)に示す様な経路で大量にTestoを生成し、これを血中に分泌し、男性二次性徴を促進するということが考えられる。

即ち、睪丸が生後日数の変化につれて、男性ホルモンの生合成経路を変化させることによって、種々の男性ホルモンの標的組織の成長、分化を調節している可能性があり、生体レベルでのホルモンの調節機構の研究として、今後興味ある問題である。

図7(a) 生後日数による前立腺, 精のう
の重量変化 ((Inano (10)))



(b) 血中のテストステロン濃度
((Resko (28)))

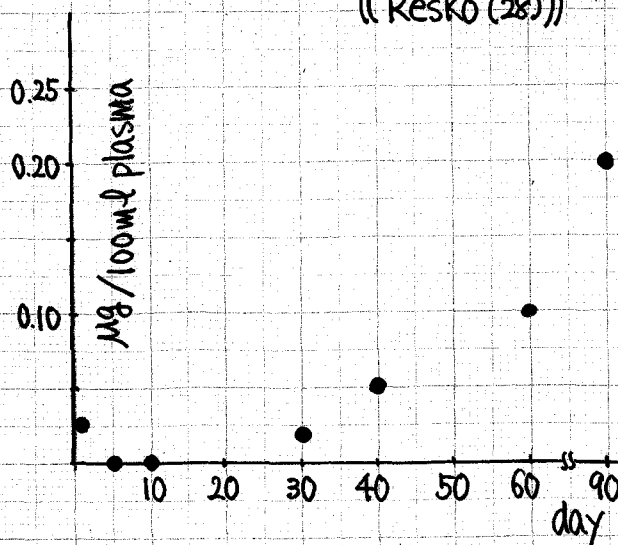
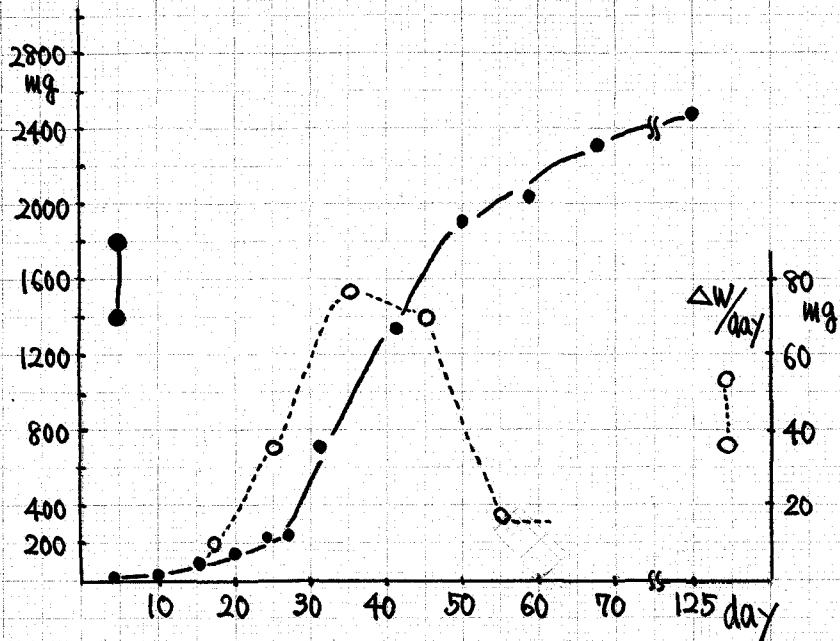
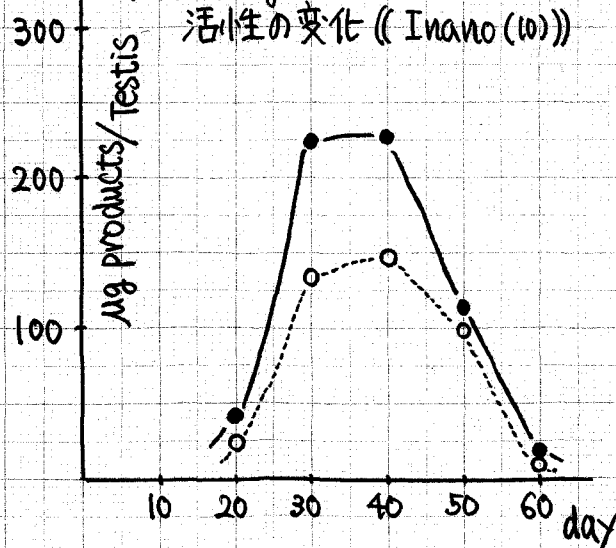


図8 (a) 生後日数による睪丸の重量変化



(b) 生後日数による Androst-4-ene- (●—●)
及び Pregn-4-ene-5 α -reductase (○—○)
活性の変化 ((Inano (10)))



テーマ2. 幼若ラット睪丸を構成する各細胞群における

Pregnenolone および Progesterone の代謝

— Germ Cell による C_{21} - 17-OH -Steroids および C_{19} -Steroids の生合成の発見 —

共同研究者: 安江俊二 (大阪大学微生物病研究所細菌ウイルス部門)

松本圭史 (大阪大学医学部第二病理学教室)

(序論)

睪丸を構成する細胞群は 図9 の模式図に示す様に、大きく、

次の3つ, (i) Interstitial Cells (Leydig Cellを含む)

(ii) tubular non-germ cells (精細管を構成する fibroblasts, peritubular cells, 精細管内に存在する Sertoli Cell)

(iii) Germ Cells (Spermatogenesis の種々の段階の細胞集団) に分けられるが、長い間、睪丸における C_{19} -Steroids 生合成 (図10) の場合は、Leydig Cell のみであると信じて来た。

ところが、1965年、Christensen (29) は、成熟ラット睪丸を用いて、

Leydig Cell を含む間質と精細管を光学顕微鏡下で分離し、

精細管にも、Prog から C_{19} -Steroids を生合成する能力があること

を in vitro の実験で示した。同様の方法で、精細管は、Cholesterol

からの C_{19} -Steroids の生合成は行わないが、Preg, Prog からは、

Test を生合成することが報告された(30-32)。その生合成の割合は, Leydig Cell の $\frac{1}{10}$, specific activity にすると $\frac{1}{100}$ (Leydig Cell の占める体積は, 睪丸全体の 5~8% であるという) であるという。しかし, Germ Cell 自身における C_{19} -Steroids の生合成能力についての成績は見られない。

我々は, Collagenase 処理と精細管の細胞培養法を使用する Germ Cell の分離法を開発し(17, 24, (33)), Germ Cell における Preg, Prog を基質にした場合の C_{19} -Steroids の生合成を検索した。

図9. 睪丸を構成する細胞群

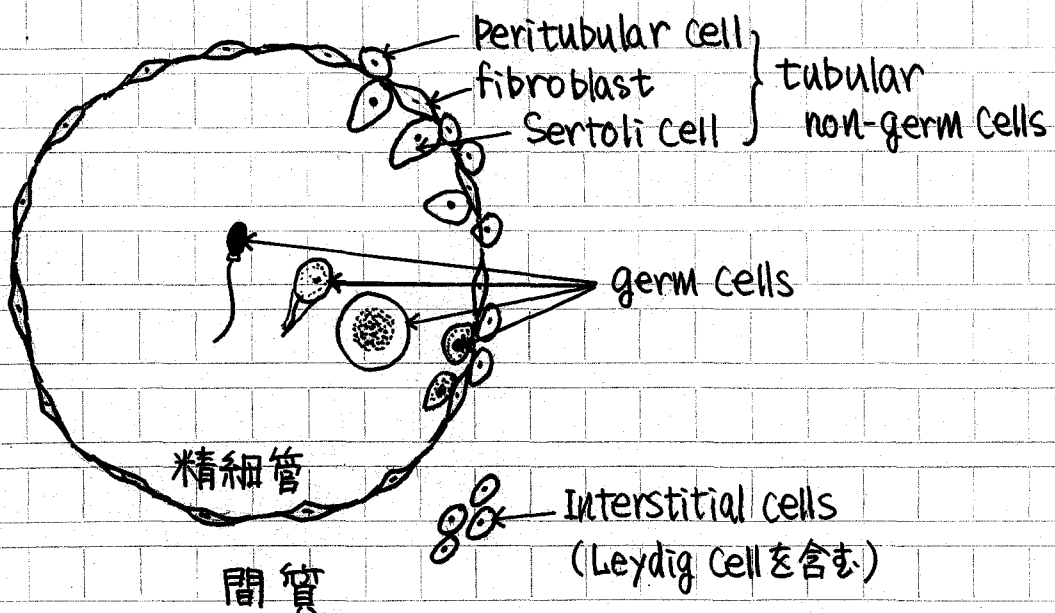
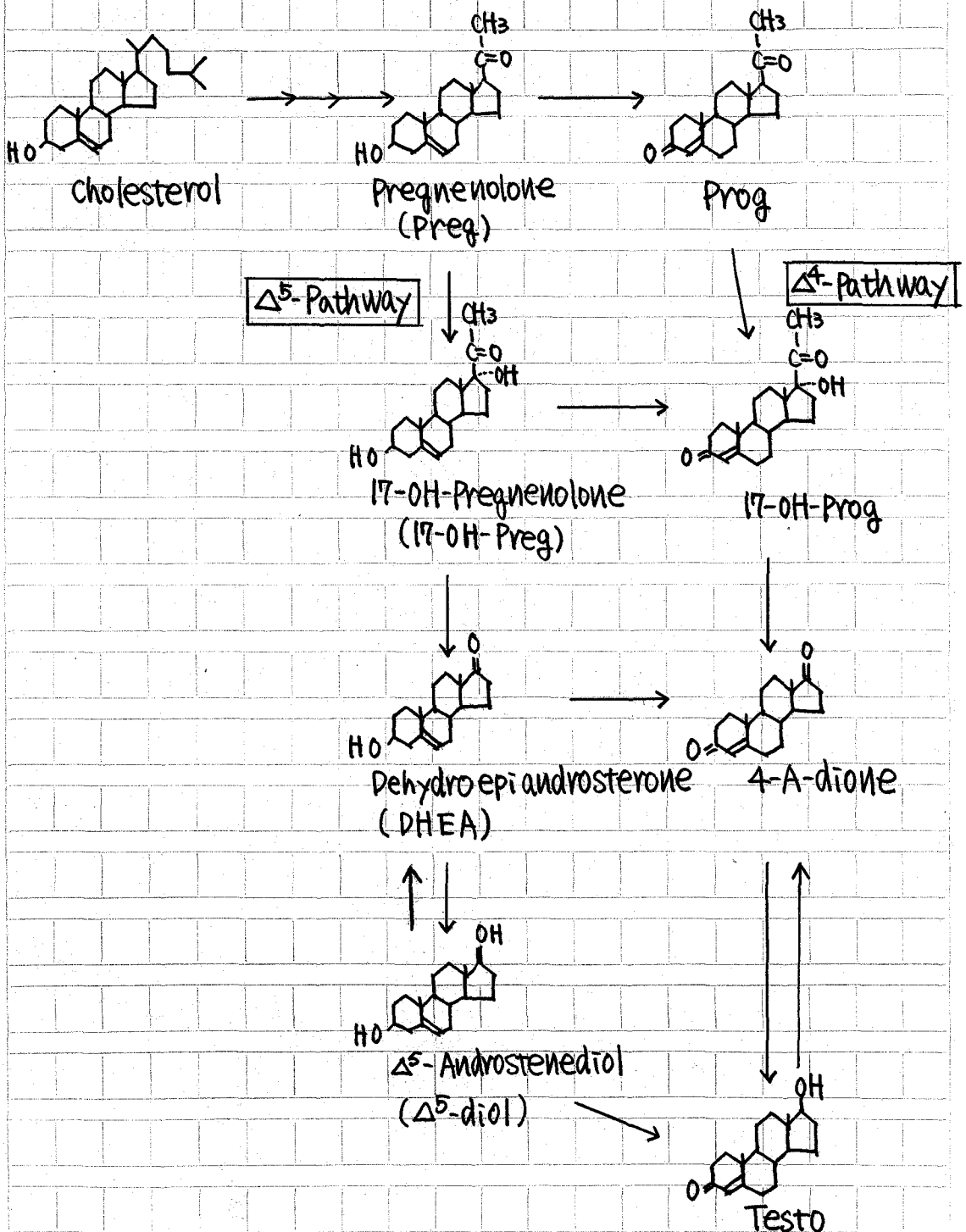


図10. CholesterolからのC₁₉-Steroids 生合成経路



《実験IV》

幼若ラット睪丸全体、精細管、Germ Cell, Non-germ Cell における
 ^3H -Progesterone の代謝

(実験方法)

(1) 実験動物—実験Iに同じ、ただ生後30日目の雄ラットを使用した。

(2) 精細管, Non-germ cell, Germ Cell の分離及びその純度—

共同研究者である安江俊二君の博士学位論文(1973年3月)

あるいは、文献(24)《参考論文I》, 本実験の投稿用論文(13)

《参考論文II》に詳細が述べてあるので、概略を次に述べる。

幼若ラット睪丸の被膜をとり、これを0.1% Collagenase と

1mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を含む phosphate buffer saline (-) (pH7.4)

で、37°C で30分 incubation する。精細管は、間質とよく分離

するので、これをよく洗浄して tubular fraction とした。

この精細管を更に0.1% Collagenase で37°C, 30分間

incubation すると、小さな断片となるが、これをよく洗浄した後、

注意深く pipetting し、Eagle's minimum essential medium

(4mM-glutamine と10% Calf serum を含む) で34°C で

2日間培養する。Germ Cell は floating Cell となるので(34),

これを集めてよく洗浄し、germ cell fraction とした。Viability

は、50%前後であった。容器にくっついて増殖するのは non-germ cell であるので、これを集めて使用した。精細管にも、Leydig Cell の contamination があった場合は、これは attaching cell となる(32, 35, 36)。

この方法により分離された精細管, Germ Cell fraction, Non-germ Cell fraction の顕微鏡写真を図11に示す。

(3) 化学薬品--- 実験Iに同じ。

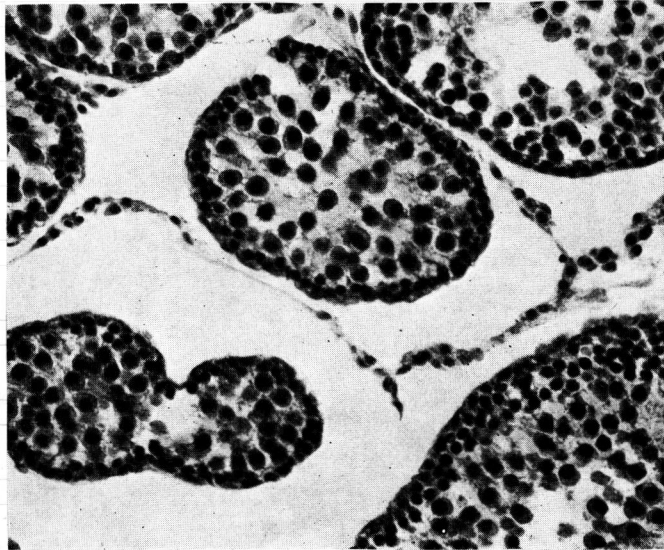
(4) Incubation--- 実験Iに同じ。ただし、各組織 10mg, 20mg を用い、incubation time を20分とした。

(5) ステロイドの分離・同定--- 実験Iに同じ。

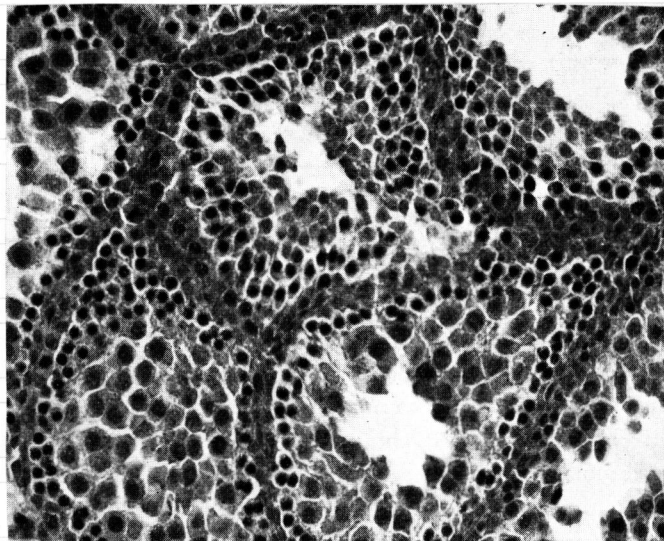
(6) 蛋白定量--- 各組織の蛋白定量はビュレット法(37)によった。

図11. 幼若ラット睪丸全体, 精細管, Germ Cell, Non-germ Cell
の顕微鏡写真

〈生後30日ラット睪丸全体(280X, H.E)〉
精細管と間細胞になる

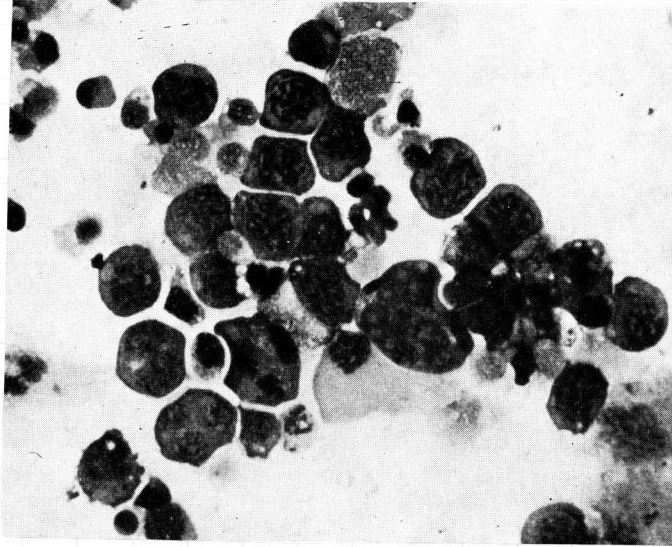


〈生後30日ラット精細管(280X, H.E)〉
連続切片で間細胞は認められなかった



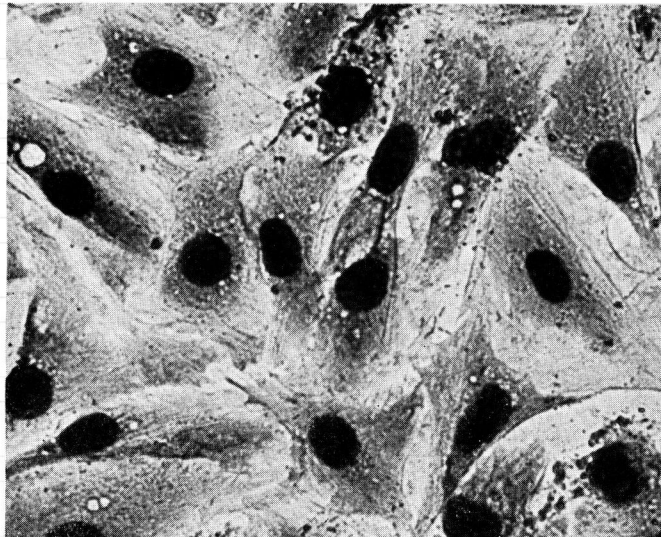
〈生後30日ラットの精細管の細胞培養で得た
floating Cell (420x, Giemsa染色)〉

Germ Cellよりなる。あるものは多核細胞。



〈同じく attaching Cell (420x, Giemsa染色)〉

Fibroblastに似た non-germ Cell となる。



(実験結果)

実験結果を表5に示す。(注…生成量は%で表われている)

(結論と考察)

C₁₉-Steroidsの産生は、使用した組織量にほぼ比例して増加している。精細管, germ cell, Non-germ cellは、ほぼ同程度のC₁₉-Steroidsの産生を示すが、その中では、germ cellが最も強い。睪丸全体は精細管の10倍OrderのC₁₉-Steroidsの産生があり、Christensen (29), Hall (30) の成績とよく一致している。もし、Leydig cellが精細管分画にcontaminationした場合は、その細胞培養によってNon-germ cell fractionに入る(32, 35, 36)ので、表5の成績は、germ cell自身で、ProgからC₁₉-Steroidsが生成され得ることを示している。

又、精細管, germ cell, Non-germ cellでも、Prog, 17-OH-Progの5 α -及び3-keto reduced metabolitesが生成されるのがわかり、germ cellでの生成は、Non-germ cellのそれよりやや多い。

表5. 幼若ラット睪丸の各細胞集団における ^3H -Progesterone
の代謝

Tissue	Testis (Whole)		Tubules		Germ Cells		Non-germ Cells		No Cells
Amount (ng Protein)	1	2	1	2	1	2	1	2	
Percentage formation									
Δ^5 -dione	5.7	2.6	3.5	5.4	8.4	15.1	4.9	7.6	<0.3
Δ^5 -olones	23.6	20.2	3.2	4.6	4.6	5.8	1.9	3.0	<0.5
Total	(29.3)	(22.8)	(6.7)	(10.0)	(13.0)	(20.9)	(6.8)	(10.6)	
17-OH-Prog	8.9	1.2	2.6	4.7	3.0	5.6	1.4	2.4	0.0
17-OH- Δ^5 -dione	11.7	7.2	0.5	1.0	0.6	2.1	<0.4	<0.5	<0.4
3,17-OH- Δ^5 -dione	23.4	43.2	0.4	1.3	0.2	0.5	0.3	0.4	<0.1
Total	(44.0)	(51.6)	(3.5)	(7.0)	(3.8)	(8.2)	(1.7)	(2.8)	
4-A-dione	2.3	1.8	0.2	0.4	0.7	1.2	0.6	0.8	0.0
Testo	0.9	1.7	<0.1	0.2	<0.1	0.2	<0.1	0.2	<0.1
DHT	0.4	0.8	0.0	0.0	<0.1	0.2	<0.1	<0.1	<0.1
Andro	0.3	2.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Epi Andro	1.3	2.4	<0.1	<0.3	<0.1	<0.2	<0.1	<0.1	<0.1
A- ^3H - 17β -diol	0.2	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
A- ^3H - 17β -diol	<0.1	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Total	(5.4)	(10.0)	(0.2)	(0.6)	(0.7)	(1.6)	(0.6)	(1.0)	
Prog un-changed	11.6	5.0	86.7	78.6	81.6	68.8	88.7	84.0	96.3

注) Germ Cells と Non-germ Cells に関しては、2回実験を行ない
同様の結果を得たので、その平均値で表わした。

ついで、ステロイドとしての出発物質である Preg を基質にした場合は、図10に示す様に Δ^5 -pathway の products も生成される可能性があったので、次に ^3H -preg を基質にして同様の実験をした。

《実験5》

幼若ラット睪丸全体、精細管、Germ Cell, Non-germ Cell における ^3H -Pregnenolone の代謝

(実験方法)

- (1) 実験動物---実験Iに同じ。ただ生後30日目の雄ラットを使用した。
- (2) 精細管、Germ Cell, Non-germ Cell の分離---実験IVに同じ。
- (3) 化学薬品---実験Iに同じ。但し、基質として使用した γ - ^3H -pregnenolone は、the Radiochemical Centre, Amersham より購入し、使用直前に、Hexane-Formamide system の paper chromatography で purify した。NAD は、Sigma chemical company より購入した。
- (4) Incubation---実験Iに同じ。但し、 ^3H -preg は、 $1.5 \text{ nmoles}/0.9 \mu\text{Ci}$ の濃度で使用し、0.3 M Potassium Phosphate buffer に更に、5mg の NAD を加えた。組織量は、10mg, 100mg を使用し、30分 incubate した。

(5) ステロイドの分離…ほとんど実験Iと同じであるが、Second Chromatographyにより、基質である Preg は ⑥, Δ^5 -pathway の products である 17-OH-Preg は ⑦, DHEA は ⑧ に含まれるので、次の様にして分離した。

⑥ fraction は、先づ hexane-formamide system (H/F) の paper chromatography で Δ^5 -pregnenes と preg + A-dione の 2 つに分離し、Preg と A-dione は、アセチル化後、

H/F Chromatography において、Preg-Acetate と A-dione に分離された。

⑦ fraction は、アセチル化後、H/F Chromatography で、あべて分離出来た (以上のステップを図12に示す)。

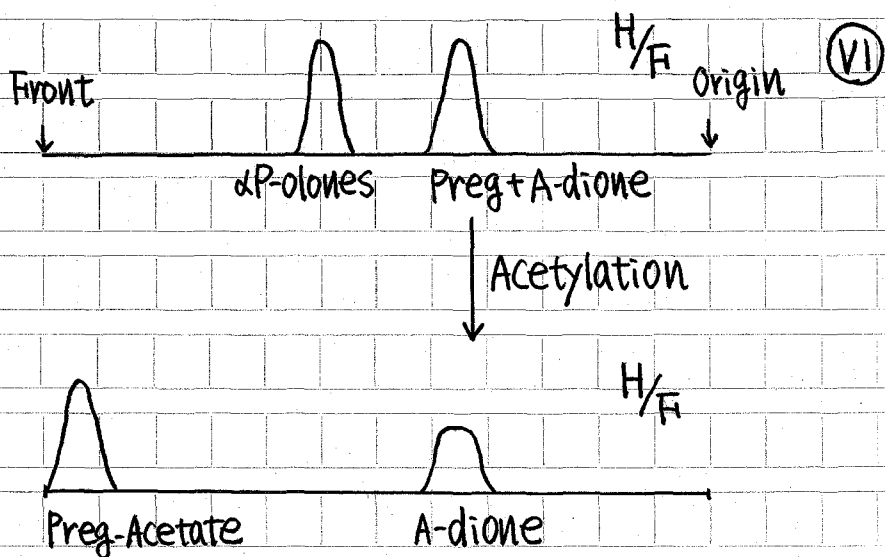
⑧ fraction は、Amberlite IRC-50を用いる elution column chromatography (15); ethanol: methanol: water (15:9:10, v/v) で DHEA と DHT + Epi Andro に分離された (図13)。

又、 Δ^5 -diol は、最初の HB/F Chromatography で ⑨ fraction のすぐ Origin 側に分離されるが、この fraction に有意の radioactivity は検出されなかった。

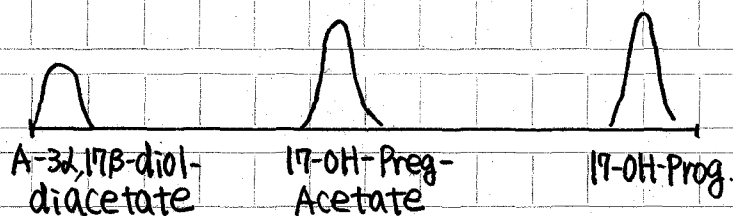
(6) ステロイドの同定…実験Iに同じ。

(7) 蛋白定量…実験IVに同じ。

12.

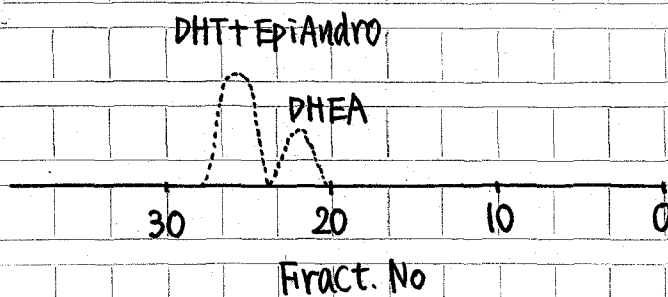


Acetylation $\rightarrow$ H/F



13.

ethanol: methanol: water (15:9:10, $\frac{1}{v}$)



(実験結果)

実験結果を表6に示す。(注…生成量は%で表わしてある)

(結論と考察)

すべての細胞集団において、 Δ^5 -pathwayのproductsである DHEA, Δ^5 -diolは検出されず、17-OH-Pregの生成量も少なかった。それに比べ、Progは大量に生成され、例えば、蛋白量10mg (wet weight) でおよそ100mg tissueにあたる) の場合、精細管 (23.8%), Germ Cell (45.5%), Non-Germ Cell (32.9%) であった。又、Prog 及び 17-OH-Preg の 5α -reduced metabolites も生成されている。このことは、幼若ラット睪丸を構成する各細胞群において、Pregを基質にした場合、ほとんどが Progに代謝されて、結局、Progを基質にした時と同様の代謝が行われることを示している。更に、Germ Cell と Non-germ Cell における C_{21} -17-OH-steroids 及び C_{19} -Steroids の生成は、共に Progを基質した場合 (表5…p39) より少ないが、二者間の比較においては、同じ位であったので、Germ Cell の Viability (50%前後) を考慮すると、やはり、Germ Cell は、Preg からも、 C_{19} -Steroids を生合成し得る能力を持っていることが示唆される。

表6. 幼若ラット睾丸の各細胞集団における ^3H -Pregnenoloneの代謝

Tissue	Testis (whole)		Tubules		Germ Cells		Non-germ Cells		No Cells
Amount (ng Protein)	2	10	2	10	2	10	2	10	
Percentage formation									
Prog	2.5	1.9	30.5	23.8	22.9	45.5	20.0	32.9	<0.1
dP-dione	3.7	0.4	2.7	5.8	1.6	4.8	1.7	3.6	<0.1
dP-olones	8.9	2.8	4.5	10.0	2.5	8.4	3.0	10.8	0.0
20 α -dihydro- Prog.	<0.2	<0.4	<0.1	<0.2	<0.1	<0.2	<0.2	<0.1	0.0
Total	(15.1)	(5.1)	(37.7)	(39.6)	(27.0)	(58.7)	(24.7)	(47.3)	
17-OH-Prog	6.4	2.2	1.7	1.3	0.7	0.4	0.5	0.4	<0.1
17-OH-Prog	11.2	0.5	7.0	16.9	0.8	4.5	0.8	3.0	<0.1
17-OH-dP-dione	13.2	4.1	<0.9	3.3	<0.3	0.6	<0.2	0.4	<0.1
3,17-OH-dP-one	19.0	2.7	1.3	6.5	<0.1	1.4	<0.2	0.6	<0.1
Total	(49.8)	(9.5)	(10.0)	(28.0)	(1.5)	(6.9)	(1.3)	(4.4)	
DHEA	<0.2	<0.3	<0.1	<0.2	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.0
4-A-dione	5.4	3.4	1.4	7.8	0.3	1.9	0.3	1.8	<0.1
Testo	2.6	2.2	<0.1	0.6	<0.1	0.3	0.0	0.4	0.0
A-dione	1.4	3.6	<0.1	<0.4	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
DHT	1.0	2.0	<0.1	<0.3	<0.1	<0.1	<0.1	<0.2	<0.1
Andro	1.0	17.5	<0.1	0.8	0.0	<0.1	0.0	<0.1	0.0
EpiAndro	2.5	7.8	<0.1	1.0	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
A-3 α ,17 β -diol	<0.2	3.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Total	(13.9)	(39.7)	(1.4)	(10.2)	(0.3)	(2.2)	(0.3)	(2.2)	
Preg unchanged	3.4	1.7	39.4	8.0	60.7	22.7	60.7	35.9	90.0

《全体としての考察》

前述したごとく、Androgenの産生細胞はLeydig Cellのみであるといわれて来た。近年の研究(29-32)により、ラット精細管は、Preg, ProgからのTestoの生合成を行うことが明らかになって来た。我々は更に、Germ Cell自身でも、Preg, ProgからC₁₉-Steroidsの生合成を行なうことを見出した。Galjaard(38), Parvinen(39)の研究により、Preg, Prog, Testoはblood-testis barrierを通して速やかに精細管に入るが、Cholesterolは入らないことが明示された。従って、その活性が弱いとは言え、精細管、germ cell自身がPreg, Progからandrogenを生合成する能力を有することは、germ cell周囲のandrogen濃度を保つために必要であると考えられる。脳下垂体から分泌されるLHにより、testo, 5 α -reduced metabolites, prog, pregその他のPre-androgenがLeydig Cellから分泌されてすぐ横に存在する精細管内に入り、testo, 5 α -reduced C₁₉-steroidsに代謝されて、androgenの標的細胞である(?) germ cellにより有効に使用される。この場合、germ cell自身にもこれらの反応を起こす能力があるので、精細管内に入ったsteroidsは更に有効に使われると考えられる。間細胞から分泌されたsteroidsの中で、血中に入ったtestoのみが標的組織での男性化作用とgonadotrophinの分泌

を抑制する。従って、精細管が間細胞のすぐ横に存在することは、間細胞から分泌された steroids が germ cell により有効に使用されて Spermatogenesis を維持するために必要であろう。

外部から生理的量の androgen が投与されると Spermatogenesis は強く抑制されるが、さらに大量の androgen が投与されると、Spermatogenesis は回復に向うと報告されている。この事実は、Leydig Cell の steroids 生成が中止している場合には非常に大量の androgen が血中に存在しないと germ cell に到達して Spermatogenesis を維持することが出来ないことを意味し、Leydig Cell の steroidogenesis と germ cell の関係が密接であることを示唆している。

(おわりに)

この研究は、大阪大学医学部第二病理学教室助教授
松本圭史先生の直接指導の下に行なったものであり、又、大阪大学
微生物病研究所助手西宗義武先生にも御助言を載き、深く
感謝致します。

尚、テーマ2の実験に関しては、1973年1月に Endocrinology に
accept され、同年中に Publish されますので、その原稿を《参考論文Ⅳ》
とし、提出致します。テーマ1の実験に関しては、もう少し追加実験
を行い、近い将来に投稿の予定です。

参考文献

- (1) Noumura, T., J. Weisz & C.W. Lloyd : Endocrinology 78 245 ('66)
- (2) Bloch, E : Steroids 9 415 ('67)
- (3) Steinberger, E & M. Ficher : Steroids 11 351 ('68)
- (4) Ficher, M & E. Steinberger : Acta Endocr 68 285 ('71)
- (5) Coffey, J.C., F.S. French & S.N. Nayfeh : Endocrinology 89 865 ('71)
- (6) Slaunwhite, W.R. Jr & L.T. Samuels : J. Biol. Chem 220 341 ('56)
- (7) Savard, K., R.I. Dorfman, B. Baggett & L.L. Engel :
J. Clin. Endocr 16 1629 ('56)
- (8) Inano, H & B.-I. Tamaoki : Endocrinology 79 579 ('66)
- (9) Nayfeh, S.N., S.W. Barefoot, Jr & B. Baggett : Endocrinology 78 1041 ('66)
- (10) Inano, H., Y. Hori & B.-I. Tamaoki : In Wolstenholme G. E. W.
and M. O'Connor (eds.), Ciba Foundation Colloquia
on Endocrinology, vol 16, J. & A. Churchill, London, P-105 ('67)
- (11) Ficher, M & E. Steinberger : Steroids 12 491 ('68)
- (12) Steinberger, E & M. Ficher : Endocrinology 89 679 ('71)
- (13) Yamada, M., S. Yasue & K. Matsumoto : Endocrinology
《参考論文Ⅲ》 (in press) ('73)
- (14) Zaffaroni, A & R.B. Burton : J. Biol. Chem 193 749 ('51)

- (15) Seki, T & K. Matsumoto : J. Chromatography 27 423 ('67)
- (16) Rivarola, M.A., E.J. Podesta & H.E. Chemes : Endocrinology 91 537 ('72)
- (17) Matsumoto, K & M. Yamada : Endocrinology (in press) ('73)
《参考論文(Ⅱ)》
- (18) Lostroh, A.J : Endocrinology 85 438 ('69)
- (19) Anderson, K.M & S. Liano : Nature 219 277 ('68)
- (20) Baulieu, E.E., Lasnitzki, I & P. Robel : Nature 219 1155 ('68)
- (21) Rommerts, F.F.G & H.J. Van Der Molen : B.B.A 248 489 ('71)
- (22) Jaff, R.B : Steroids 14 483 ('69)
- (23) Rivarola, M.A & E.J. Podesta : Endocrinology 90 618 ('72)
- (24) Yamada, M., S. Yasue & K. Matsumoto : Acta Endocr 71 393 ('72)
《参考論文(I)》
- (25) Robel, P; Acta Endocr Supple 153 279 ('71)
- (26) Robel, P, I. Lasnitzki & E.E. Baulieu : Biochemie 53 81 ('71)
- (27) Ohno, S., R. Dofuku & U. Tettenborn : Clinical Genetics 2 128 ('71)
- (28) Resko, J.A., H.H. Feder & R.W. Goy : J. Endocr. 40 485 ('68)
- (29) Christensen, A.K & N.R. Mason : Endocrinology 76 646 ('65)
- (30) Hall, P.F., D.C. Irby & De Kretser, D.M : Endocrinology 84 488 ('69)
- (31) Lacy, D & A.J. Pettit : Brit. Med. Bull 26 87 ('70)
- (32) Dufau, M.L., De Kretser, D.M & B. Hudson : Endocrinology 88 825 ('71)

- (33) Nishimune, Y & T. Komatsu : Exptl. Cell. Res. 75 514 ('72)
- (34) Steinberger, A & E. Steinberger : Exptl. Cell. Res. 44 443 ('66)
- (35) Steinberger, E., A. Steinberger & M. Ficher :
Rec. Prog. Horm. Res 26 547 ('70)
- (36) de Kretser, D.M., K.J. Catt, M.L. Dufau & B. Hudson : J. Reprod. Fertil
24 311 ('71)
- (37) Gornall, A.G., C.S. Bardawill & M.M. Davidi : J. Biol. Chem 177 751 ('49)
- (38) Galjaard, J.H., Van Gaasbeek, J.H., De Bruyn, H.W & Van der Molen, H.J.:
J. Endocr. 48 1 ('70)
- (39) Parvinen, M., Hurme, P & M. Niemi : Endocrinology 87 1082 ('70)