



Title	幼若ラット睾丸における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 学位 論文

幼若ラット睾丸における C₁₉-Steroids の生合成

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—

テーマ2. 幼若ラット睾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

(1)

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)

ラット睾丸ホモジネートを材料とし、Progesterone を基質にして incubation 実験によって、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 Androstanedione, Testosterone を main products とするが、生後 20-40 日位の幼若のそれは、Androstanedione, Testosterone は minor products で: Androstanedione, Androsterone, 5 α -Androstan-3 β , 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 Androstanedione, Testosterone の 5 α - 及び 3-keto の還元反応によって生ずることを報告している。

図1. 胎兒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

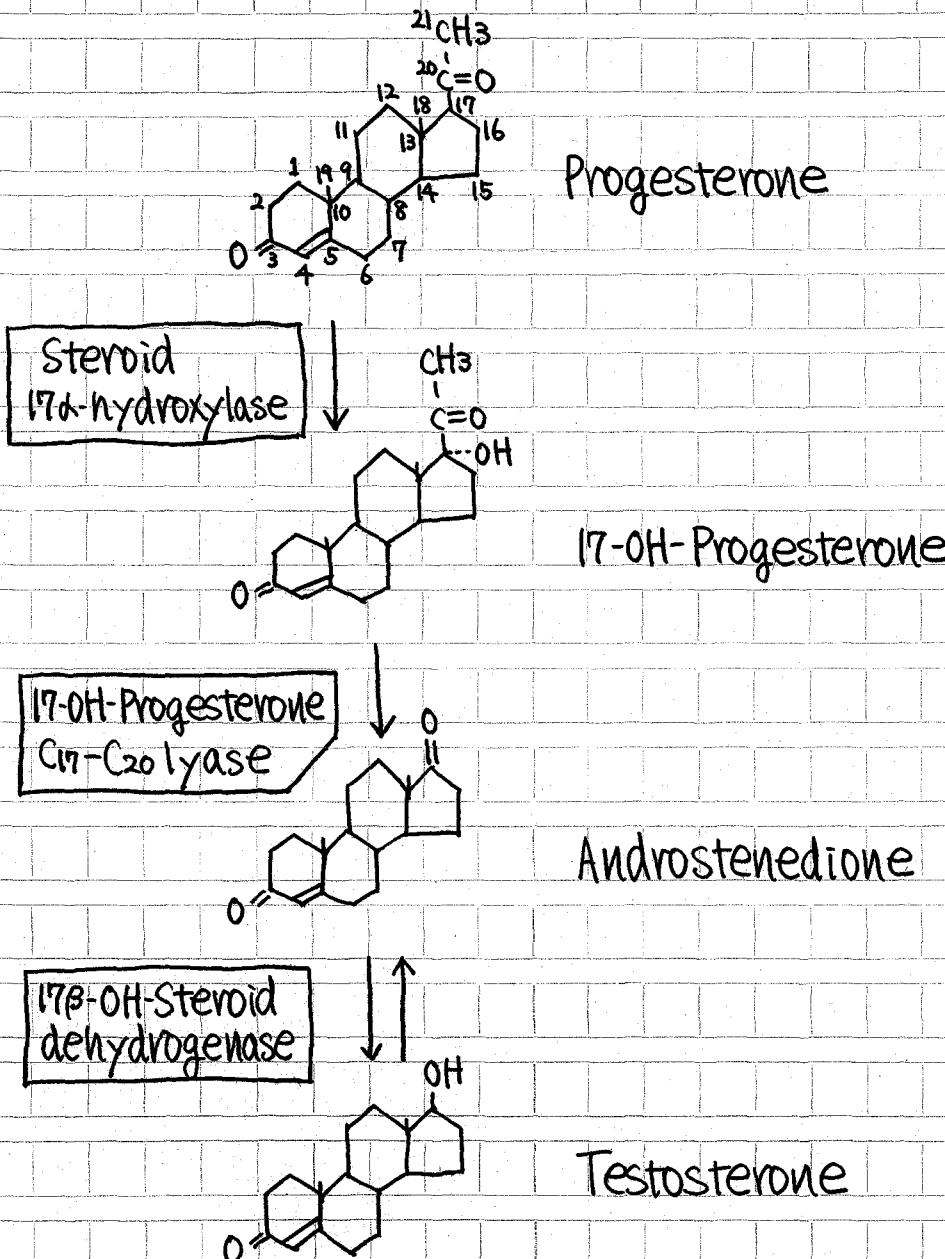


図2. 幼若ラット睾丸における Progesterone からの
C₁₉-Steroids の合成経路(I)

Progesterone



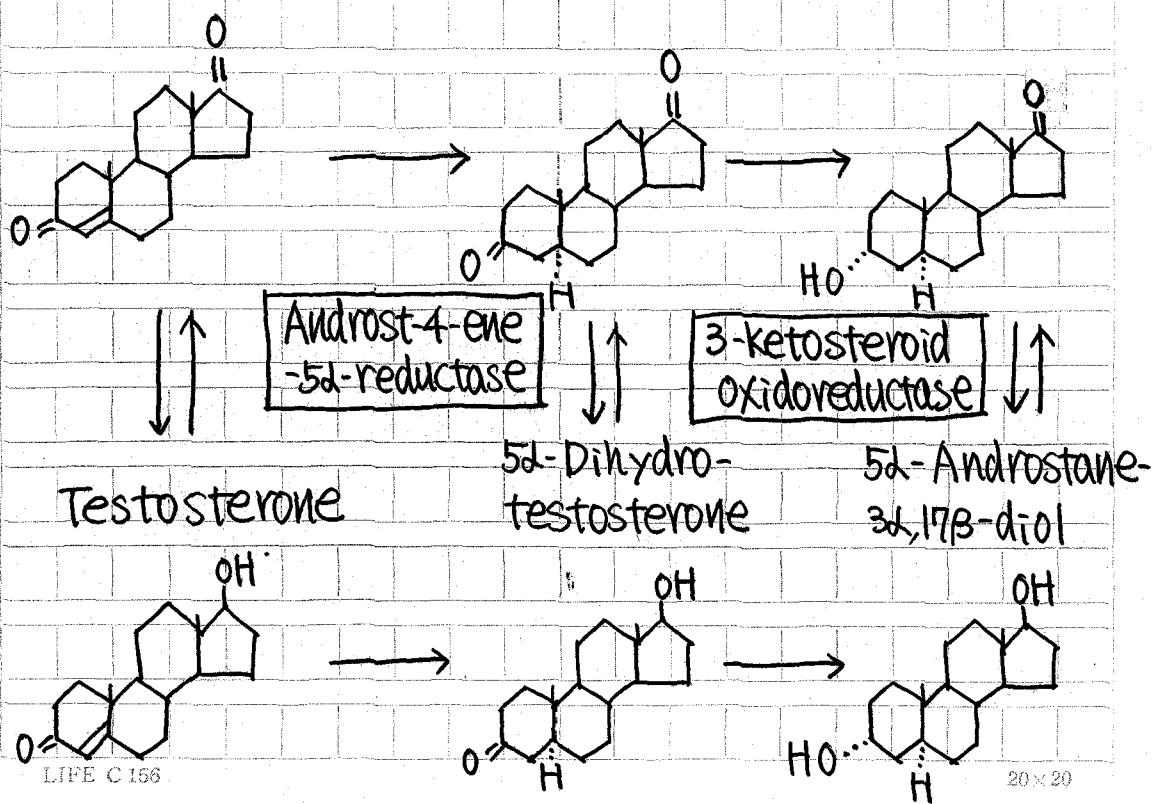
17-OH-Progesterone



Androstene-dione

Androstanedione

Androsterone

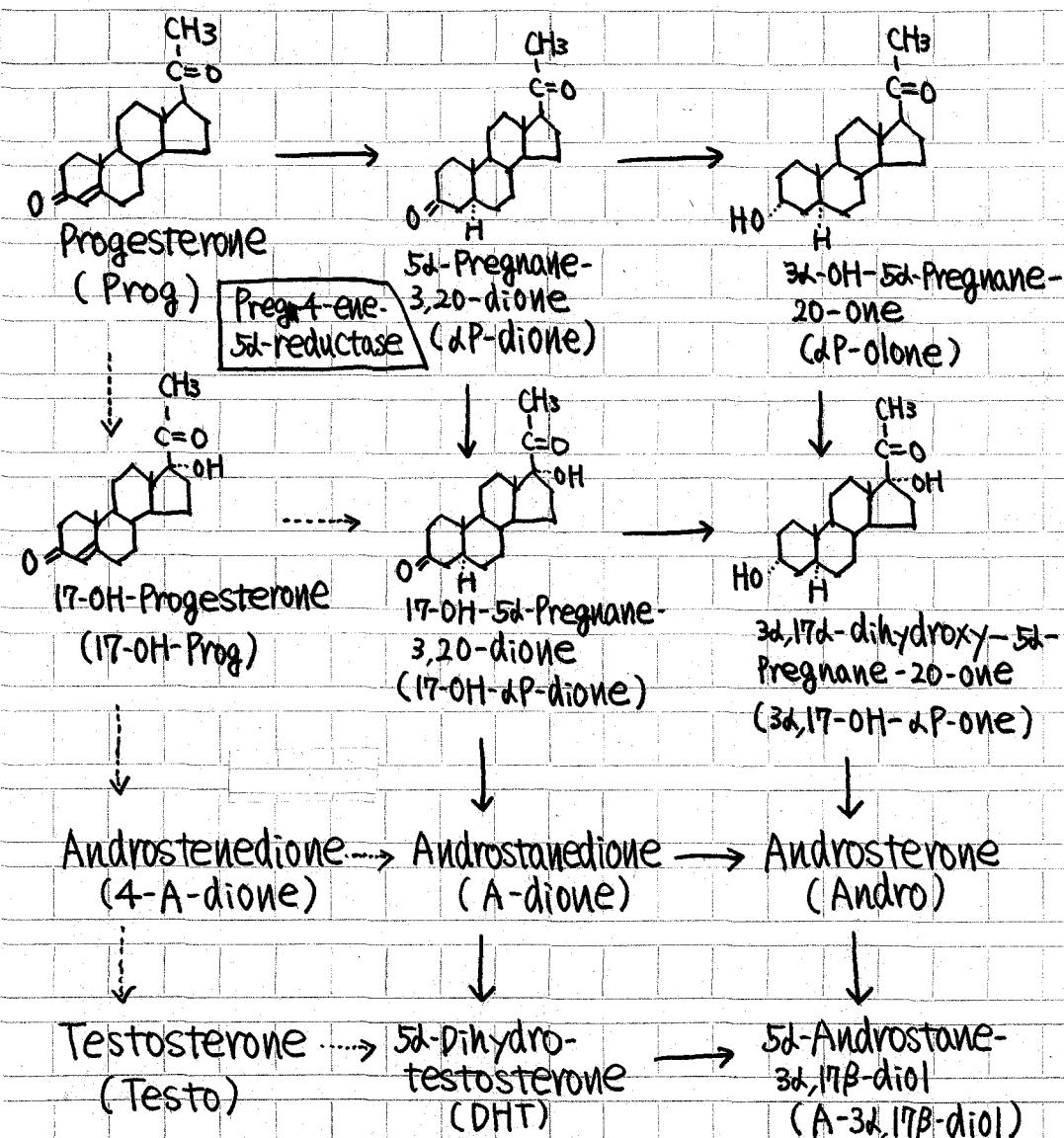


しかし、Inano(10)は、幼若ラット睾丸において、Pregnene核の 5 α -及び 3-keto 還元のあこることを報告しているし、我々(13)も、

^3H -Pregnenolone, ^3H -Progesterone を基質にして、こ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、これが先づ、5 α -還元を起こし、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 及び側鎖切断があり、Androstanedione, Androsterone, 5 α -Dihydrotestosterone, 5 α -Androstan-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. 幼若ラット睾丸における 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、これぞれ 3 β -isomer が存在し得る。

《実験 I》

幼若及び成熟ラット睾丸ホモジネートにおける 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（十分に精子形成が進んでいます）の雄ラットを使用した。

(2) 化学薬品 … 7-[³H]-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 によって 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睾丸の被膜を取り、wet weight を測り、0.001 M の EDTA を含む 0.25 M sucrose で homogenate にした。^{In mole/luci} の ³H-Progesterone を試験管 (2 × 10 cm) に入れ 底に沈めた後、0.02 ml の Ethanol で溶解した。各試験管に 0.06 M nicotinamide, 2 mM MgCl₂, 0.8 mg NADPH を含む 0.3 M Potassium Phosphate buffer

(pH 7.4) 0.5 ml を加えた。これに 0.5 ml の 10, 20 mg 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 1.0 ml として Sample は 3 時間 34°C で

30 分 incubation し、0.1 ml の IN-HCl を加えることによって反応を停止させた。

(4) ステロイドの分離 …… 各 Sample に 100 µg 前後の non-radioactive な Prog., α -P-dione, 17-OH-Prog., 4-A-dione, Andro, Testo, DHT, A-3 α , 17 β -diol, A-3 β , 17 β -diol, 20 α -dihydroprogesterone を Carrier として加えた。これを 10 ml の Ether: Chloroform (4:1, v/v) で 3 回抽出した後、5 ml の純水で 2 回水洗した。

最初の chromatography は T. 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 3 α , 17-OH- α -P-one, ② 17-OH-Prog + A-3 α , 17 β -diol,

③ 3 β , 17-OH- α -P-one, ④ Testo + A-3 β , 17 β -diol の 4 つの

fraction に、(B) は ⑤ α -P-dione, ⑥ α -P-olones (α -P-one

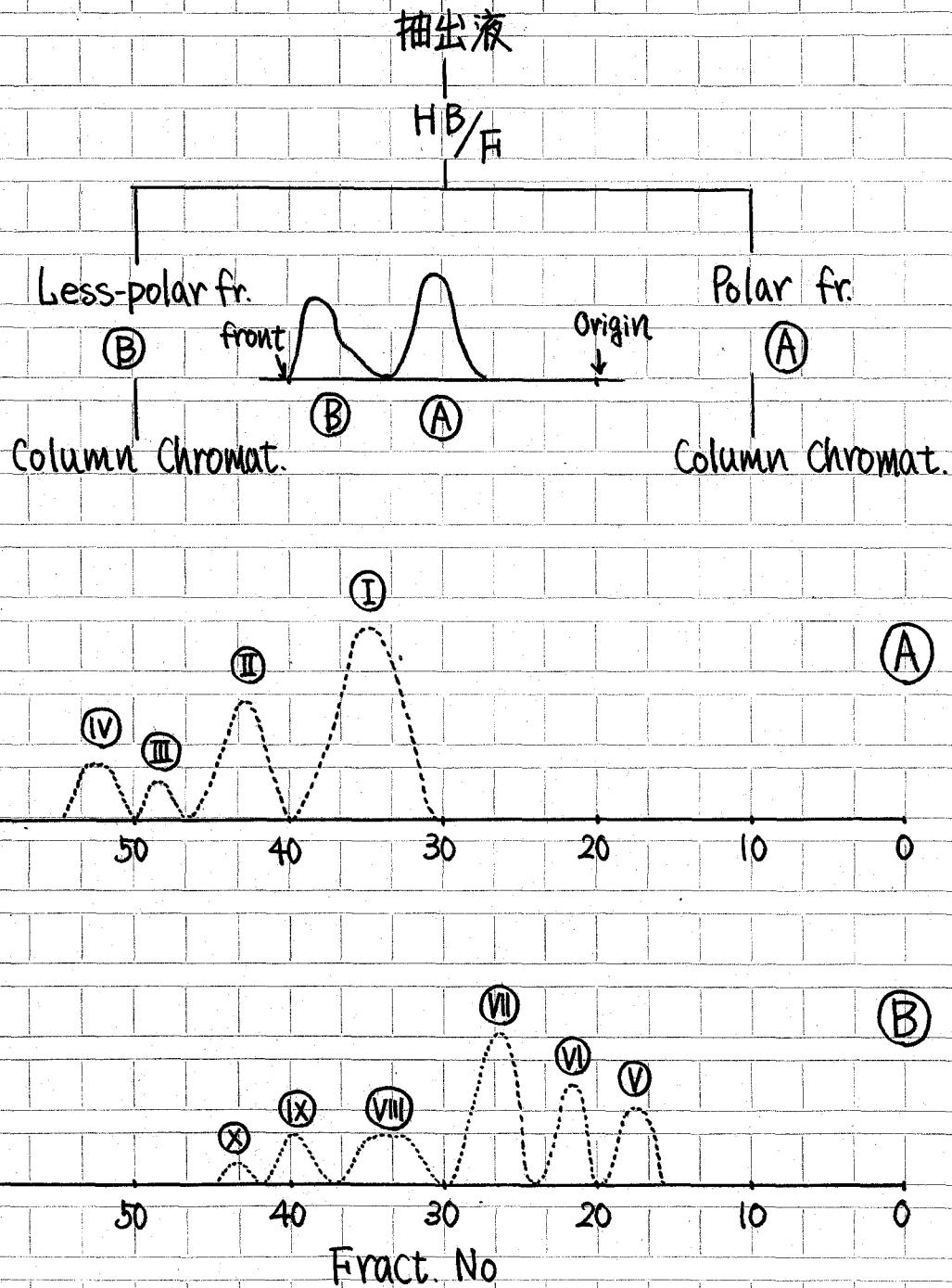
① 3α -, 3β -を足したもの) + A-dione, ⑦ Prog + Andro +
 17-OH- α -P-dione, ⑧ DHT + Epiandro (Andro の 3β -isomer),
 ⑨ 4-A-dione, ⑩ 20 α -dihydroprogesterone の 6つの
 fraction に分離された。

②, ④, ⑥, ⑦ 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
 よってすべて分離された。(以上の step を図 4 に示す。)

⑧ は、2 分して、後で述べる再結晶法により、分離、同定した。

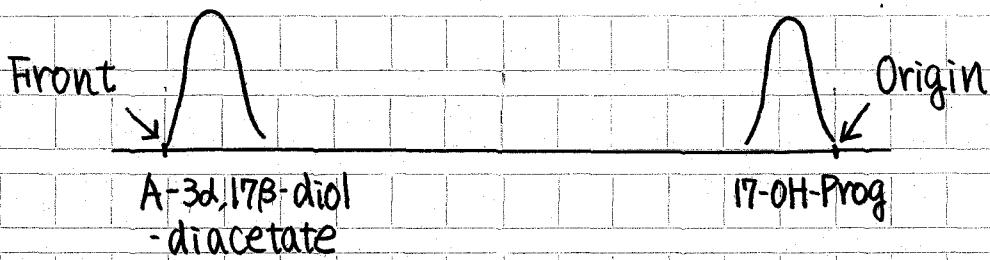
尚、各 products の産生量については、最初の chromatography 上で、各々の fraction に含まれる radioactivity の割合を % で 算出し、この各分画の % を次の chromatography の結果に従って、この中に含まれる Steroids の割合に応じて分配して行き、それを 産出量とした。

図4. ステロイドの分離

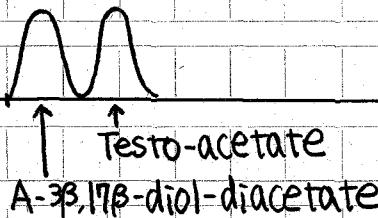


II, IV, VI, VII → Acetylation → H/F

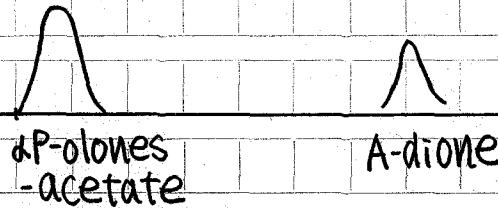
(II)



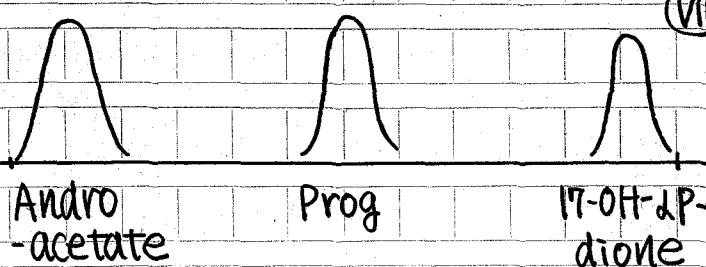
(IV)



(VI)



(VII)



(5) ステロイドの同定

再結晶法 Chromatography によって分離された各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 Scintilator 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、結晶をつくります。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、產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。

α -P-olone, 17-OH- α -P-dione, 3 β ,17-OH- α -P-one 以外のすべての
 3 H-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 3 H-products の同定

Isolated steroid	3 β ,17-OH- α -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、 α -P-olones, 17-OH- α -P-dione, 3 α , 17-OH- α -P-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つて、次の方法によつて tentatively に同定した。

^3H - α -P-olones acetate 及び ^3H - α -P-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、よく混合して暗所に室温で 20 時間放置) した後に酢酸中にあける短時間のクロム酸化 (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 α -P-dione となり、これは再結晶法で同定された。 ^3H -17-OH- α -P-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 α , 17-OH- α -P-one は chromatography 上の位置、アセチル化されること Pyridine 中のクロム酸化 (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- α P-dione と chromatography 上の位置が一致し、酢酸中にあ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 幼若の睾丸は、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 からすべての 5α -reduced metabolites が検出された。(かも、Prog の 5α -reduced metabolites である α P-dione, α 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- α P-one が大量に蓄積されることがわかった。これに反して、成熟の睾丸は、幼若のそれに比べはるかに低い Prog の代謝活性を持ち、 5α -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はいるが、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、これが組織量を増やすが 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、共に検出されなかつた。)

表2. 幼若及び成熟ラット睾丸における³H-Progesteroneの代謝

Tissue	Immature		Adult		No tissue
Amount of tissue	10mg		20mg		
	Percentage formation				
α P-dione	3.6	0.7	0.3	0.4	<0.1
β P-olones	12.0	6.4	0.4	0.6	<0.1
Sum of 5 α -reduced met.	(15.6)	(7.1)	(0.7)	(1.0)	
β ,17-OH-Prog	2.3	<0.2	14.6	25.2	0.0
17-OH- α P-dione	18.0	5.1	0.2	0.1	0.0
3 α ,17-OH- α P-one	30.6	49.4	<0.1	<0.3	0.0
3 β ,17-OH- α P-one	13.7	8.1	<0.1	<0.1	0.0
Sum of 5 β -reduced met.	(62.3)	(62.6)	(0.2)	(0.1)	
β -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 β ,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 5 β -reduced met.	(5.9)	(13.7)	(0.0)	(0.0)	
Prog unchanged	2.1	4.4	77.0	61.5	95.4

[³H]-Progesterone (¹n mole/¹μci) was incubated at 34°C

for 30 min with 10mg or 20mg homogenates.

(考察)

従って、幼若ラット睾丸において、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 -還元が起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 -還元が起こりにくいためと考えられる。

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、△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 α P-dione + α 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 $17\text{-OH-}\alpha\text{P-dione}$ は、5分で $t_0 - \tau$ (15.1%)で、15分では4%以下、更に、その 3α -reduced metaboliteである $3\alpha,17\text{-OH-}\alpha\text{P-one}$ は、15分から30分の間、実に total products の50%とし、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、 $3\alpha,17\text{-OH-}\alpha\text{P-one}$ も又、中間産物であることを示している。又、 $3\alpha,17\text{-OH-}\alpha\text{P-one}$ の漸減に対して、 4-A-dione の 5α -及び 3α -reduced metaboliteである Androが漸増し、120分では47.2%に達した。Testo の 5α -及び 3α -reduced metaboliteである $A-3\alpha,17\beta\text{-diol}$ は、30分で、6.4%，120分で11.9%であった。

(考察)

この実験によって、幼若ラット睾丸は、図6に示す様な経路で、Prog から、 5α -reduced C₁₉-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. 幼若ラット睾丸における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 β ,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 β -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 β ,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. 幼若ラット睾丸における ^3H -Progesteroneの代謝 (Time course 実験)

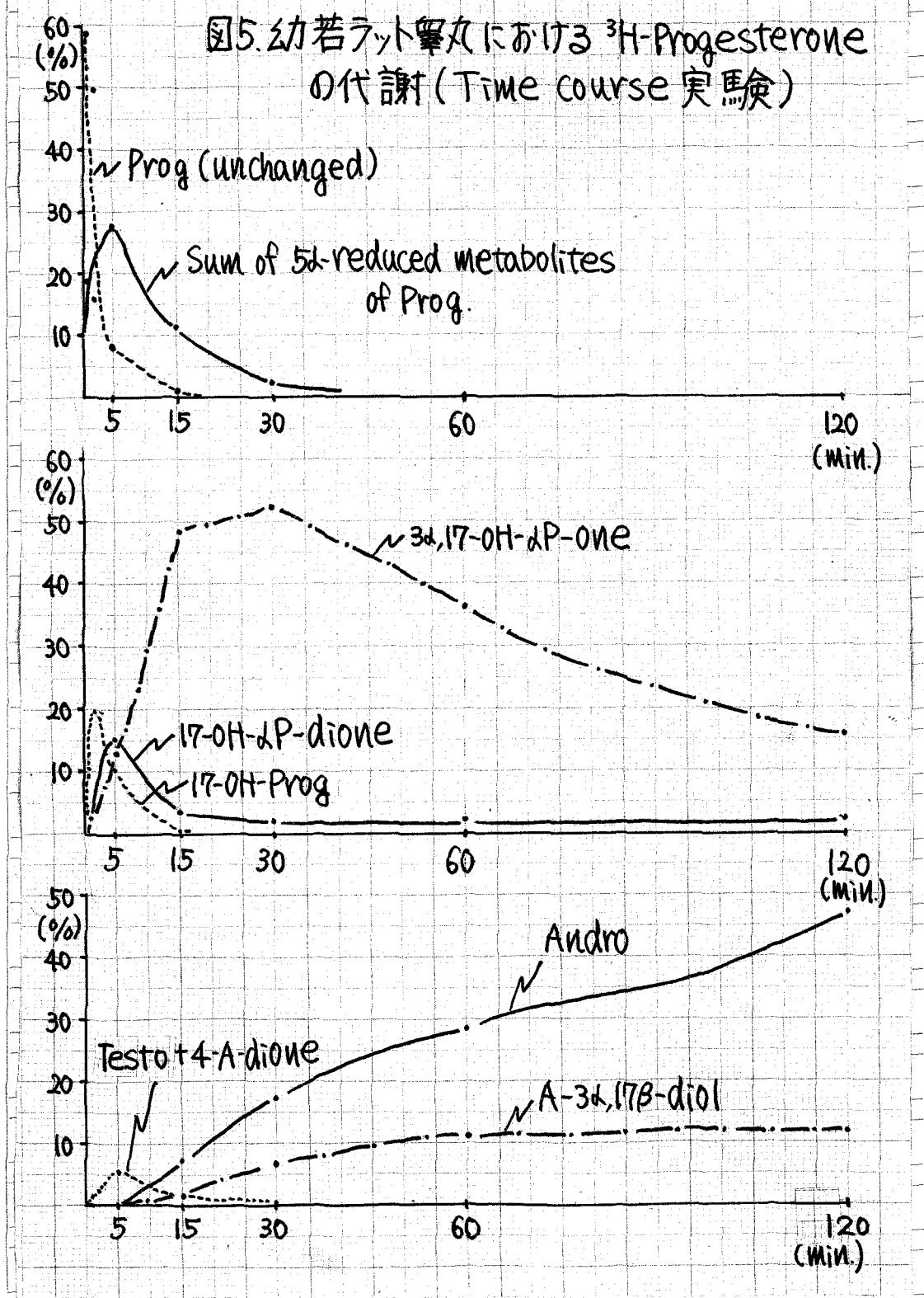
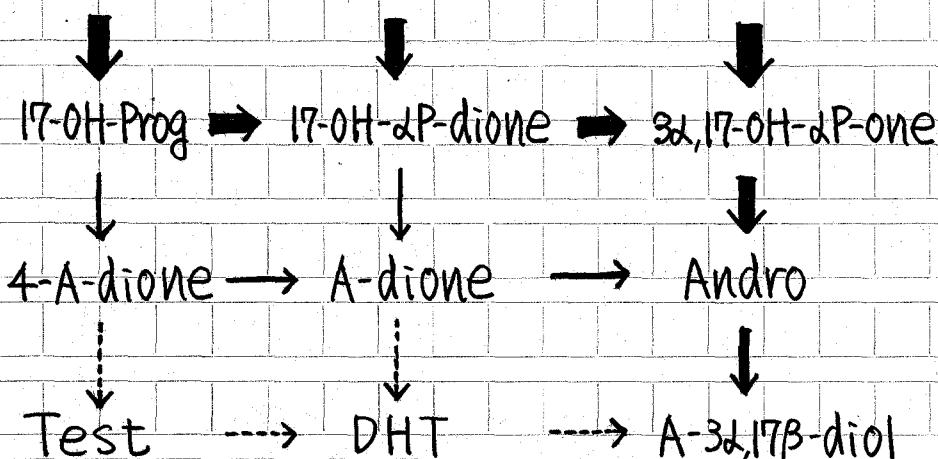


図6. 我々の考へている幼若ラット睾丸における Progesterone の代謝パターン

Prog → α P-dione → α P-olones



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 dP-dione から
実際に 5 α -reduced C₁₉-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-dP-dione) の代謝

(実験方法)

(1) 実験動物 … 実験Ⅰと同じ。

(2) 化学薬品 … 実験Ⅰと同じ。

但し、基質として使用した ³H-dP-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 とクロム酸ク化を用いて、純化、精製したものを使った。

その純度は、再結晶法で 99.5% 以上であった。

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

尚 Substrate は、In mole% incub とした。

(4) ステロイドの分離、同定 … 実験Ⅰと同じ。

(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 C₁₉-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、幼若のそれと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、dP-olones は 63.4%，17-OH-Prog の 5 α -reduced metabolites の和は 18.0%，5 α -reduced C₁₉-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)

幼若ラット睾丸において実際に dP-dione より 5 α -reduced C₁₉-steroids が合成されること及び 5 α -還元を引き起こす酵素 (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の結果を考え合わせれば、3-Keto を

還元する酵素 (3-keto oxidoreductase) は、高い活性を示すが、

これに先立つ 5 α -reductase 活性が非常に弱いために、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睾丸における³H-dP-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
α 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- α P-dione	12.1	8.4	2.1	2.3	1.6	0.4	<0.1
3 β ,17-OH- α P-one	20.0	39.4	50.1	5.9	9.4	17.0	0.0
3 β ,17-OH- α 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 β ,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)	
α 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 (Prog) 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 Prog, 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いくことが証明されているので、図 3 (P-5) に示す様な生成経路パターンは、生後日数と密接に関係して変化していくと思われる。尚、生後日数による生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でていながら、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 -Androstanediols の生物学的機能

1968年以来、男性ホルモンの標的組織である前立腺、精う等は、特異的に高い Androst-4-ene-5 α -reductase 活性を示す。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)、ラット睾丸の精細管 (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 は細胞増殖に關係し、5 α -Androstanediol 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 $\alpha, 17\beta$ -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、睾丸においても、A-3 $\alpha, 17\beta$ -diol が睾丸の持つ機能、特に Spermatogenesis と強い關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 7a, 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

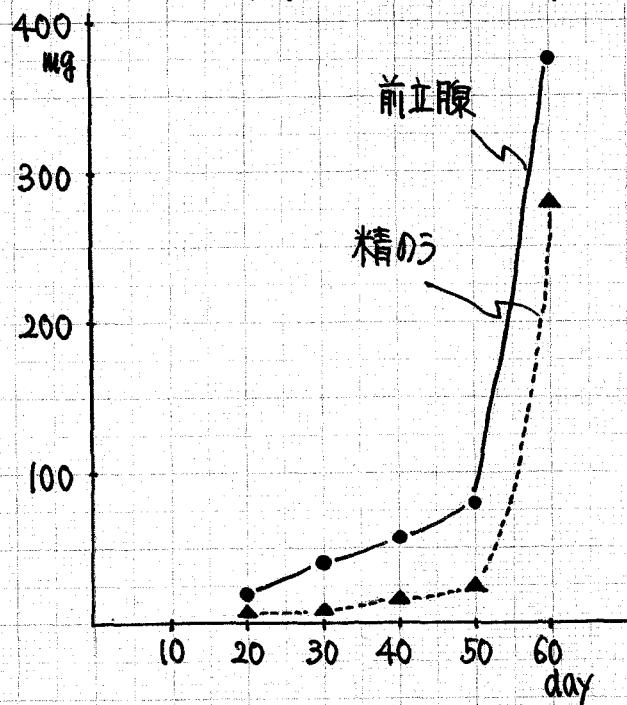
組織である前立腺、精のうは、生後50日頃から急速に、その組織重量を増していく。しかし、それは明らかに血中の Testo 濃度に依存していることが知られている。(しかし、図8a)、b) に示す様に睾丸は、Testo の血中濃度が非常に低い20日すぎから急速に組織重量を増して行き(主に Germ Cell の増加)、Testo の血中濃度が高くなりはじめると50日頃には、もはや、その重量増加は停止してしまう。

しかし、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、幼若ラット睾丸は図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、成熟ラット睾丸は、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、睾丸が生後日数の変化について、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)))

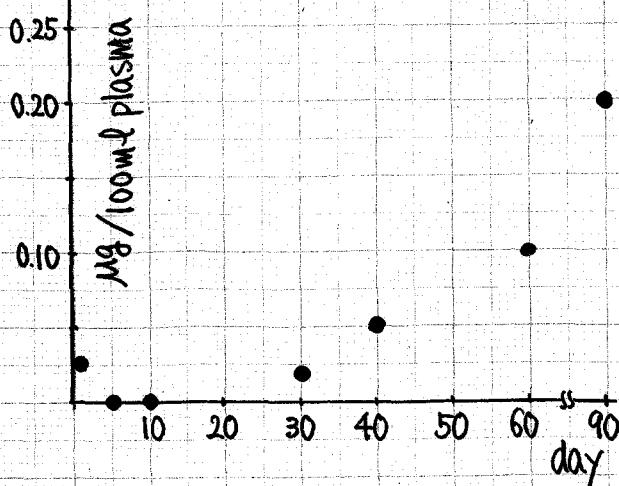
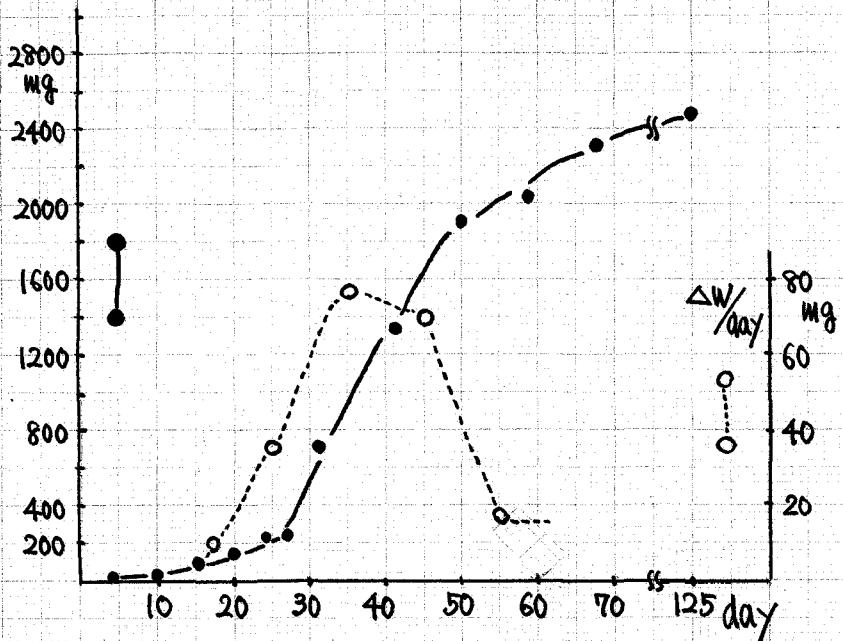
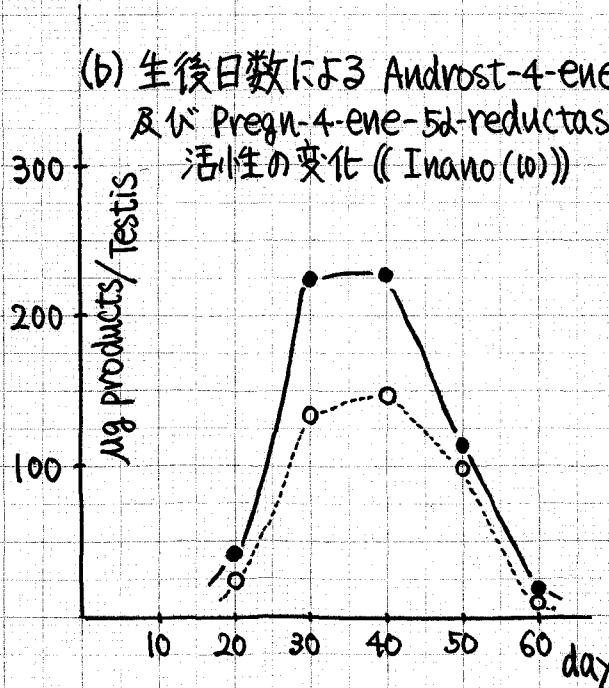


図8(a) 生後日数による睾丸の重量変化

(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 (19)))

テーマ2. 幼若ラット睾丸を構成する各細胞群における

Pregnendiolone および Progesterone の代謝

— Germ Cell による C₂₁-OH-Steroids および C₁₉-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）

睾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、睾丸における C₁₉-Steroids 生合成（図10）の場は、Leydig Cell のみであると信じられて来た。

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

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 C₁₉-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 C₁₉-Steroids の生合成は行わないが、Prog, Prog からは、

Testを生合成することが報告された(30-32)。この生合成の割合はLeydig Cellの $\frac{1}{10}$, specific activityになると $\frac{1}{100}$ (Leydig Cellの占める体積は睾丸全体の5~8%であるといふ)であるといふ。しかし、Germ Cell自身におけるC₁₉-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Prog, Progを基質にした場合のC₁₉-Steroidsの生合成を検索した。

図9. 睾丸を構成する細胞群

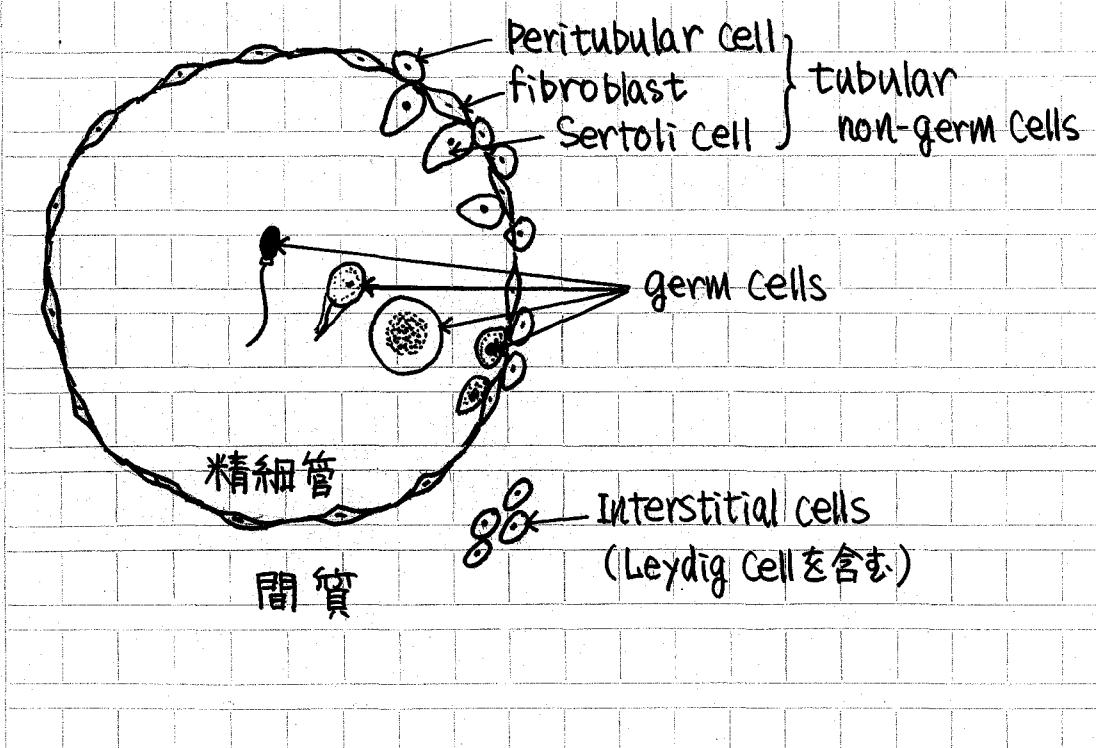
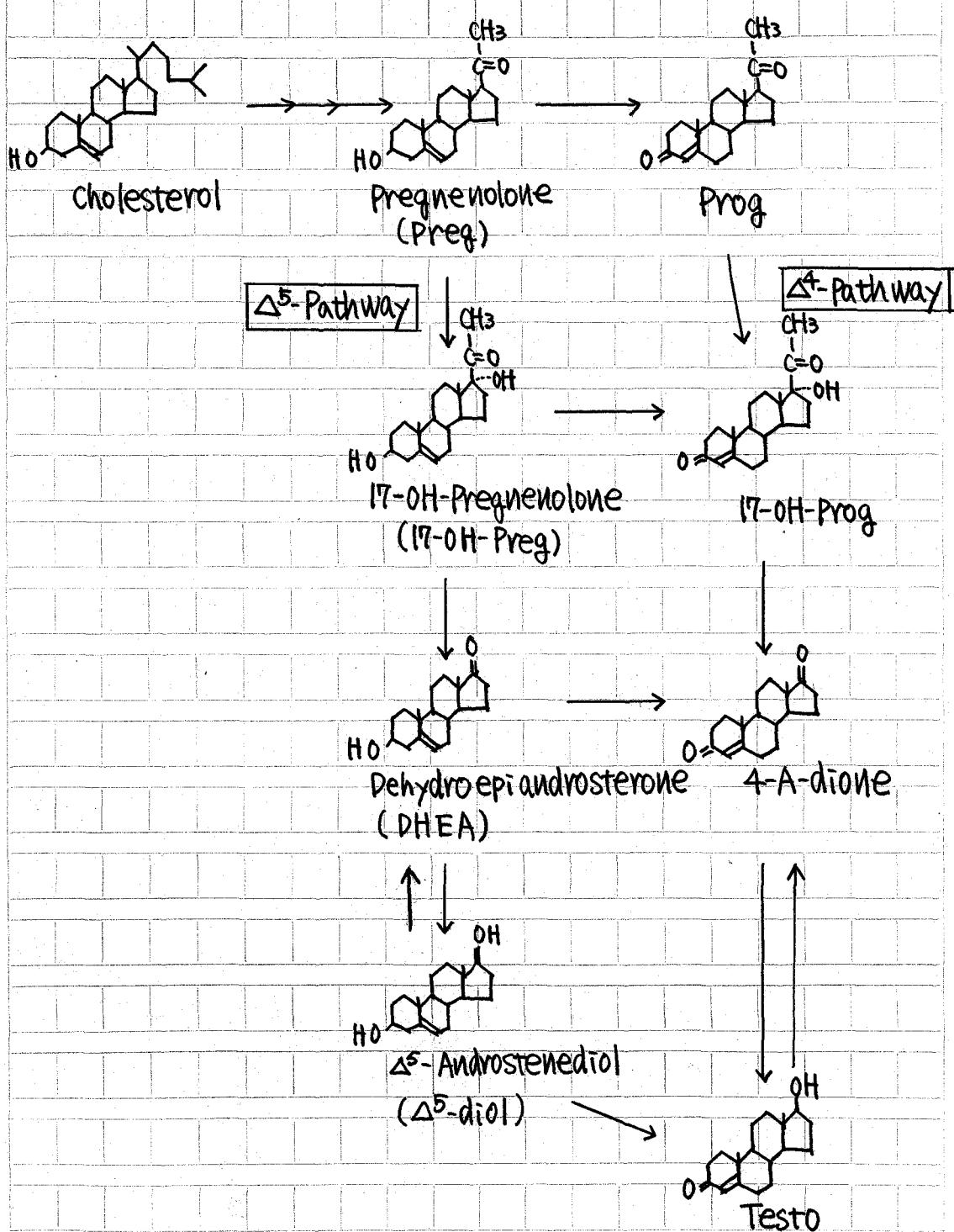


図10. Cholesterolからの C₁₉-Steroids 生合成経路

《実験IV》

幼若ラット睾丸全体、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と同じ、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學位論文(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III》に詳細が述べてあるので、概略を次に述べる。

幼若ラット睾丸の被膜をとり、これを 0.1% Collagenase と

1 mM CaCl₂·2H₂O 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 b. Eagle's minimum essential medium

(4 mM-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 b. Germ cell fraction とした。Viability

は、50%前後であった。容器にく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)。

この方法によって分離された精細管, 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と同じ。

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

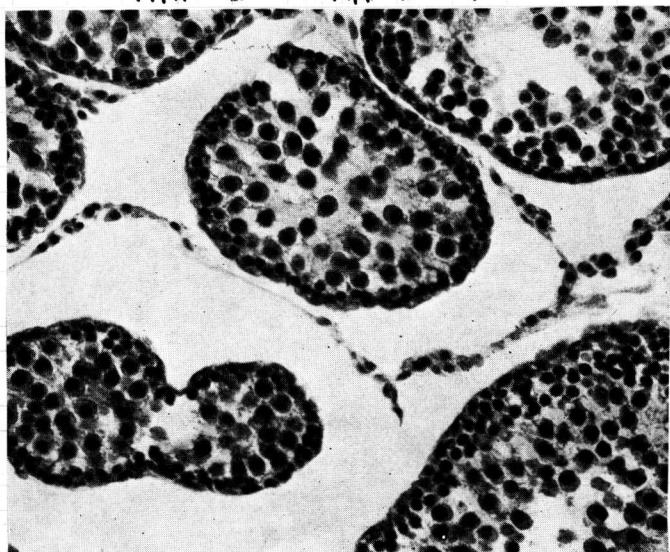
(5) ステロイドの分離、同定… 実験Iと同じ。

(6) 蛋白定量… 各組織の蛋白定量はビューレット法(37)によった。

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

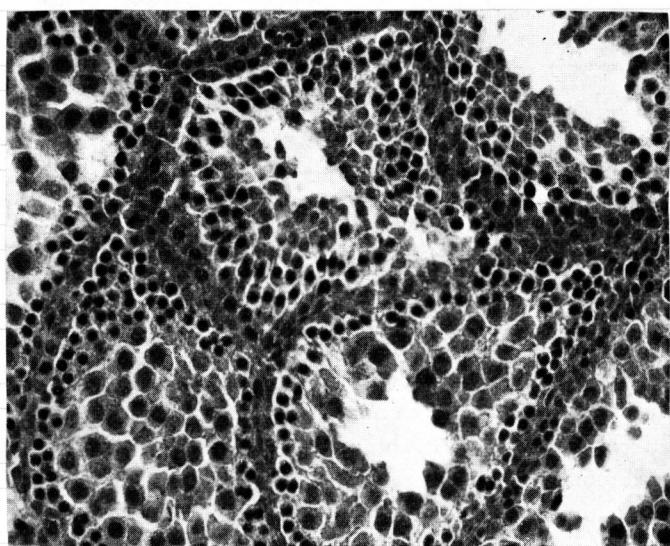
〈生後30日ラット睾丸全体(280X, H.E)〉

精細管と間細胞よりなる



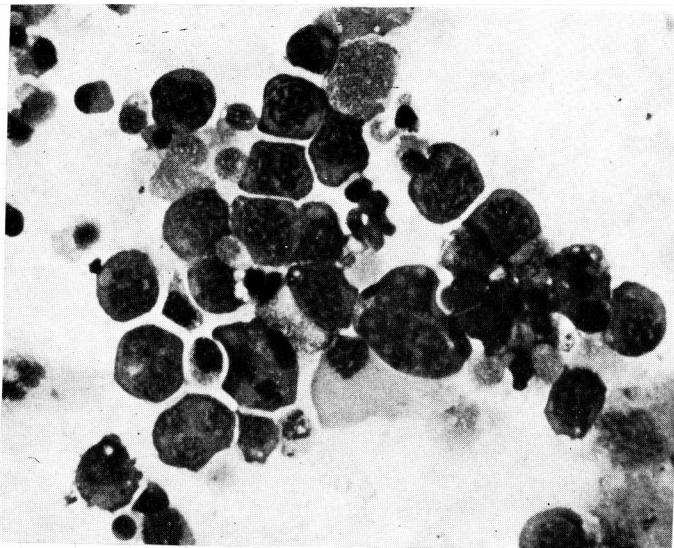
〈生後30日ラット精細管(280X, H.E)〉

連續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よりなる。



(実験結果)

実験結果を表5に示す。(注…生成量は%で表わしてある)

(結論と考察)

C₁₉-Steroidsの產生は、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の產生を示すが、その中では、Germ cellが最も強い。睾丸全体は、精細管の10倍OrderのC₁₉-Steroidsの產生があり、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自身での、

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る。

Germ cellでの生成は、Non-germ cellのそれよりやや多い。

表5. 幼若ラット睾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 (μg/mg protein)	1	2	1	2	1	2	1	2	
Percentage formation									
α -P-dione	5.7	2.6	3.5	5.4	8.4	15.1	4.9	7.6	<0.3
Δ P-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)	
17β -OH-Prog	8.9	1.2	2.6	4.7	3.0	5.6	1.4	2.4	0.0
17β -OH- Δ P-dione	11.7	7.2	0.5	1.0	0.6	2.1	<0.4	<0.5	<0.4
3, 17β -OH- Δ P-one	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-3 β , 17β -diol	0.2	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
A-3 β , 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行った。

《実験5》

幼若ラット睾丸全体、精細管、Germ Cell、Non-germ Cell における
 ^3H -Pregnенolone の代謝

(実験方法)

- (1) 実験動物… 実験Iと同じ。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と同じ。
- (3) 化学薬品… 実験Iと同じ。但し、基質として使用した $\text{7}\alpha-[^3\text{H}]$ -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と同じ。但し、 $[^3\text{H}]$ -Preg は、 $1.5 \text{ nmoles}/0.9\text{ ml}$ の濃度で使用し、0.3M 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 (VI), Δ^5 -pathway の products である 17-OH-Preg は (II), DHEA は (VIII) に含まれるので、次の様にして分離した。

(VI) fraction は、先づ hexane-formamide system (H/F) の paper chromatography で Δ^5 -olones 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 によって、Preg-Acetate と A-dione に分離された。

(II) fraction は、アセチル化後、H/F chromatography ですべて分離出来た（以上のステップを図12に示す）。

(VIII) 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）。

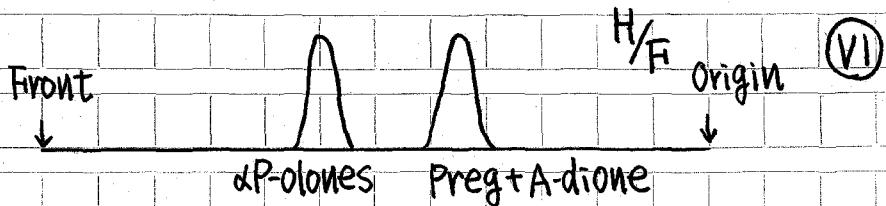
又、 Δ^5 -diol は最初の H/F chromatography で (A) fraction のすぐ Origin 側に分離されるが、この fraction に有機の radioactivity は検出されなかった。

(6) ステロイドの同定—実験Iに同じ。

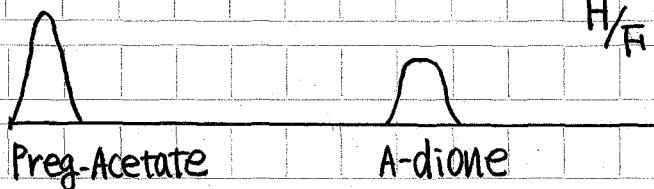
(7) 蛋白定量—実験IVに同じ。

(42)

图 12.



Acetylation

Acetylation $\rightarrow \text{H/F}$

(II)

A-3 α ,17 β -diol-diacetate

17-OH-Preg-Acetate

17-OH-Prog.

图 13.

ethanol:methanol:water (15:9:10, v/v)

(VIII)

DHT+EpiAndro

DHEA

30 20 10 0

Fract. No

(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-Progの生成量も少なかった。

これに比べ、Progは大量に生成され、例えば、蛋白量10mg(wet weightで)あたり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-Progの5 α -reduced metabolitesも生成されている。

このことは、幼若ラット睾丸を構成する各細胞群において、Prog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C₂₁-17-OH-Steroids

及びC₁₉-Steroidsの生成は、共にProgを基質した場合(表5…P-39)

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、Progからも、C₁₉-Steroidsを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 (¹⁴ C/ 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 β ,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 のみであると長い間信じられてきた。近年の研究 (29-32) により、ラット精細管は、Preg, Prog からの Testo の合成を行うことが明らかになってきた。我々は更に Germ cell 自身でも Preg, Prog から C₁₉-Steroids の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 を通って速やかに 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, 5d-reduced metabolites, prog, preg との他の 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, 5d-reduced C₁₉-steroids に代謝され、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言えられる。間細胞から分泌された Steroids の中で、血中にに入った 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る。

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。

(あわりに)

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ます。大阪大学
微生物病研究所助手西宗義武先生にも、御助言を戴き、深く
感謝致します。

尚、テーマ2の実験については、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Ⅲ》
として提出致します。テーマ1の実験につい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. Fischer : Steroids 11 351 ('68)
- (4) Fischer, M & E. Steinberger : Acta Endocr. 68 285 ('71)
- (5) Coffey, J.C., F.S. French & S.N. Nayfah : Endocrinology 89 865 ('71)
- (6) Shauwnwhite, 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) Nayfah, 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) Fischer, M & E. Steinberger : Steroids 12 491 ('68)
- (12) Steinberger, E & M. Fischer : 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. Suppl. 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. Fieder & 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) Lucy, 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. Fischer :

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)