

脳におけるホルモン代謝

第 2 編

ラット脳における 3α -hydroxysteroid dehydrogenase の存在とそれに及ぼす中枢作用薬の影響

岡山大学医学部脳代謝研究施設病態生化学部門 (主任: 高坂睦年教授)

金 行 孝 雄

(昭和51年4月26日受稿)

はじめに

哺乳動物に性ホルモンを投与すれば性行動に影響を与えるが、これらの結果は中枢に依存していると考えられる¹⁾。一方、性ホルモンはしばしば精神の興奮に関係し^{2,3,4)}、胎内において過剰の性ホルモンにさらされると性の分化に関係するだけでなく、出生後の情動表出にも影響を与える⁵⁾。

私達は testosterone 及びその代謝産物が情動表出に関係すると考え、その基礎的知見を得るために中枢神経系における testosterone 代謝を追求している。著者は前報⁶⁾でラット間脳ホモジネートと 4 - 14 C-testosterone を NADPH の存在下でインクベートした。代謝産物とし、dihydrotestosterone (DHT) と 5α -androstan- $3\alpha, 17\beta$ -diol (5α -A-diol) を認め、ラット間脳に Δ^4 - 3 -ketosteroid 5α -oxidoreductase が存在することを確認した。更に中枢作用薬として臨床的に最も多く使用されているジフェニルヒダントイン、イミプラミン及びクロルプロマジンラット腹腔内に投与した後、間脳内の本酵素活性を測定した。その結果、使用した薬物により本酵素活性が抑制されると共に反応生成物 5α -A-diol の生成量が有意に減少していた。

本論文ではこの 5α -A-diol 生成減少について更に追求するために基質に 4 - 14 C-DHT を使用し、実験を行い、本反応に関与する酵素の存在を認めると共に本反応に対する中枢作用薬の影響を調べた。

実験方法

1. ステロイド

4- 14 C-dihydrotestosterone (specific activity

50.6 mCi/mM, New England Nuclear) 及び [$1, 2$ - 3 H (N)] 5α -androstan $3\alpha, 17\beta$ -diol (specific activity 44 Ci/mM, New England Nuclear) は使用前に薄層クロマトグラフィー (TLC) で精製した。

2. ラット間脳ホモジネート及びインクベーション。前報⁶⁾の方法で行った。ラット間脳は pH7.0 リン酸塩系緩衝液 (イオン強度0.1) でホモジネートし、pH7.0 のインクベーションメジウムでインクベートした。

3. 代謝産物の分離同定と転換率の測定。

前報⁶⁾の方法で代謝産物を分離し、TLC 及びガスクロマトグラフィー (GLC) で同定した。酵素活性は 5α -A-diol の pM/mg 蛋白質/120分で現わした。

4. 酵素特性の検索

I) 至適 pH: ラット間脳ホモジネート, 4 - 14 C-DHT と NADPH が存在するインクベーションメジウムをリン酸塩系緩衝液 (イオン強度0.1) で一定の pH に保ち、pH6.8~7.8 の範囲で酵素活性を測定し、至適 pH を求めた。

II) K_m 値の測定: ラット間脳ホモジネート, 4 - 14 C-DHT と NADPH が存在するインクベーションメジウムに DHT を加え基質濃度を 1×10^{-3} M から 1×10^{-7} M まで変化させ、酵素活性を測定した。Lineweaver-Burk plot を用い K_m 値を求めた。

5. 中枢作用薬投与がラット間脳における 5α -A-diol 生成に与える影響。

体重約100gの雄ウィスター系ラットを1群7頭とし、4群に分けた。

中枢作用薬はコントミン®(塩酸クロルプロマジン

慣用名

13

3α -Hydroxysteroid dehydrogenase, 3α -hydroxysteroid: NADP oxidoreductase (E.C. 1. 1. 1. 50); Δ^4 - 3 -ketosteroid 5α -oxidoreductase, 3 -oxo- 5α -steroid: (acceptor) oxidoreductase (E.C. 1. 1. 3. 99. 5); testosterone 17β -dehydrogenase, 17β -hydroxysteroid: NADP 17β -oxidoreductase (E.C. 1. 1. 1. 64); NADPH, reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate.

注射液10mg/2 ml), 注射用アレビアチンナトリウム® (ジフェニルヒダントインナトリウム250 mg) 及びトフラニール® (塩酸イミプラミン注射液25mg/2 ml) を使用した。塩酸クロルプロマジン0.4mg/0.1 ml, ジフェニルヒダントインナトリウム0.5mg/0.1 ml 及び塩酸イミプラミン0.1mg/0.1ml になるように生理食塩水で希釈したものと, 対照とし, 生理食塩水をそれぞれの群に体重100g当り0.1ml ずつ14日間腹腔内に連続投与した。15日目に断頭し, 冷却生理食塩水中に取り出した。軟膜及び血管を取り除き, 間脳相当部分を分離秤量後, 9倍量のpH7.0リン酸塩緩衝液でホモジナイズした。実験方法2及び3に従ってインクベートし, 反応生成物を測定し, 酵素活性を比較した。

実験結果

1. 代謝産物の同定.

I) TLCによる同定: 抽出分離した試料及びそのアセチル化物は展開剤(表1)でTLCを行った。ラジオオートスキャンer及び硫酸発色により5 α -A-diolと一致したスポットを認めると共に単一スポットを示し, 分離したスポットは認めなかった。5 α -A-diolと5 α -androstan-3 β , 17 β -diolは展開剤: エーテル: 酢酸エチル(95:5)で分離した。

II) GLCによる同定: 基質にDHTを用い, 分離した試料は, N, O-ビス(トリメチルシリル)アセトアミドでトリメチルシリルエーテル化した。

表1 薄層クロマトグラフィーに使用した展開溶剤系

1. Ether	: Ethylacetate	95 : 5
2. Benzene	: Ethanol	9 : 1
3. Methanol	: Benzene	1 : 1
4. Cyclohexane	: Ethylacetate	1 : 1
5. Chloroform	: Ether	3 : 1
6. Chloroform	: Ethanol	19 : 1
7. Benzene	: Ethanol	19 : 1
8. Benzene	: Ethylacetate	3 : 1

充填剤は2% XE-60 (chromosorb. w (A. W) DMCS, 60~80 mesh) 及び2% OV-17 (chromosorb. w (A. W) DMCS, 60~80 mesh) を用いた。5 α -cholestanを内部標準とし用い, 表2の条件でGLCを行った。表3は分離した試料のGLCによる同定を示したもので代謝産物として5 α -A-diolを認めた。5 α -A-diolと5 β -androstan-3 α , 17 β -diolは2% OV-17カラムでは分離しなかったが, 2% XE-60カラムで分離した。

2. ラット間脳中のDHTから5 α -A-diol生成に關する酵素の特性.

至適pHは約7.0(図1)で, Km値は 5.9×10^{-6} M(図2)であった。

3. 中枢作用薬のin vivo投与がラット間脳5 α -A-diol生成に与える影響.

図3は中枢作用薬が5 α -A-diol生成に与える影響を調べたもので, 反応生成物5 α -A-diol量は, 生理食塩水群 110.5 ± 25 pM, ジフェニルヒダントイン群 120.9 ± 25.5 pM, イミプラミン群 108.9 ± 17.5 pM及びクロルプロマジン群 144.3 ± 33 pM/mg蛋白質/120分であった。反応生成物量は生理食塩水群を対照とし, 使用したすべての中枢作用薬群との間にStudent's t-testを用いて検定した結果, 有意差が認め

表2 ガスクロマトグラフィーによる測定条件

	5 α -Androstan-3 α , 17 β -diol	
	2% XE-60	2% OV-17
Column temp	180 $^{\circ}$ C	240 $^{\circ}$ C
Injector	275 $^{\circ}$ C	300 $^{\circ}$ C
N ₂ gas	25 ml/min	—
He gas	—	20 ml
H ₂ gas	0.5 kg	30 ml
Air	1 L/min	0.95 L/min
Sensitivity	10 ⁻¹	10 ⁰
Attenuator	1/32	1/8
Glass column	1.5 m	1.5 m
Type	Yanaco. G-80	Yanagimoto GCG-550 F

表3 ステロイド誘導体の相対保持時間

	2% OV-17		2% XE-60	
	Standard	Sample	Standard	Sample
5 α -Cholestan	1.00	—	1.00	—
5 α -Androstan-3 α , 17 β -diol	0.37	0.37	0.40	0.39
5 β -Androstan-3 α , 17 β -diol	0.37	0.37	0.47	—
5 α -Androstan-3 β , 17 β -diol	0.51	—	0.60	—

図1 ラット間脳3 α -hydroxysteroid dehydrogenase の至適 pH

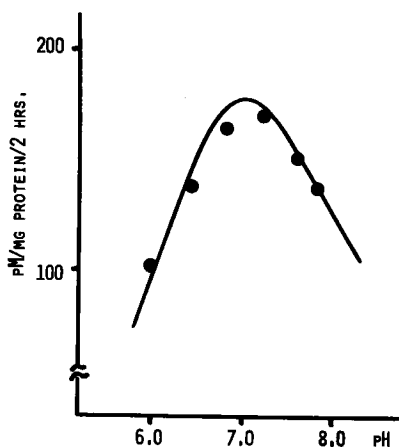


図2 ラット間脳3 α -hydroxysteroid dehydrogenase のみかけのKm値

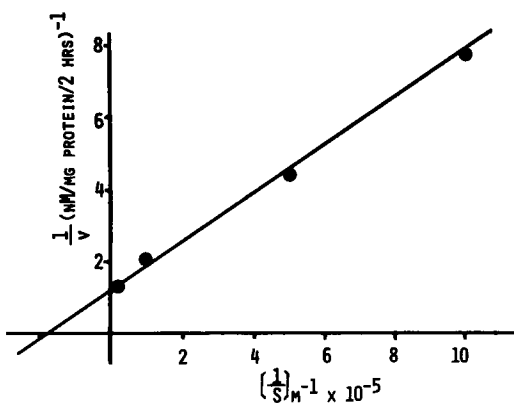
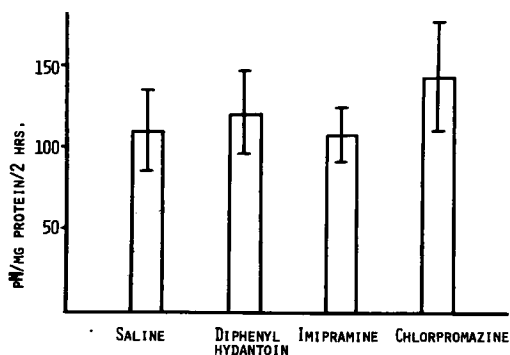


図3 ラット間脳3 α -hydroxysteroid dehydrogenase 活性に及ぼす中枢作用薬の影響



実験例数 $n = 7$. 実験値はmean \pm S. D. である。

られなかった。

考 察

先の著者の報告において、ラット終脳の25,000×g上清分画における testosterone 17 β -dehydrogenase 活性に与える中枢作用薬の影響を検し、ジフェニルヒダントインとクロルプロマジンにより本酵素活性が増加した⁷⁾ またラット間脳ホモジネート中の Δ^4 -3-ketosteroid 5 α -oxidoreductase 活性はジフェニルヒダントイン、イミプラミン及びクロルプロマジンにより低下した。そして、それと共に反応生成物 5 α -A-diol の生成量が有意に減少していることを確認した⁶⁾

本論文で、5 α -A-diol 生成は 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase の作用によるものと考え、至適 pH と Km 値を測定した。そして、中枢作用薬による本酵素活性への影響を検討した。

ラット間脳ホモジネートと 4¹⁴C-DHT を NADPH 存在下でインキュベートした。反応生成物は TLC と GLC から主要代謝産物は 5 α -A-diol であることを確認した。Sholiton ら⁸⁾ Massa ら⁹⁾ Rommerts ら¹⁰⁾ や Denef ら^{11,12)} は in vitro の条件下でラット脳とラベルした testosterone をインキュベートし、5 α -A-diol の存在を認めている。一方、Sholiton ら^{13,14)} はラット及びサルを用い、ラベルした testosterone の infusion を行い脳内に 5 α -A-diol を認めている。

ラット間脳ホモジネートにおける DHT から 5 α -A-diol への転換酵素 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase の至適 pH は 7.0 であったが、pH 6.0~7.8 の広範囲において強い活性を示した。

Shimazaki ら¹⁵⁾ はラット前立腺の soluble fraction において本酵素の至適 pH はほぼ 6.4 であると報告している。

本酵素の Km 値は 5.9×10^{-6} M であり、testosterone 代謝に関連する他の酵素よりも活性が高く、著者の実験結果から、ラット終脳の 25,000×g 上清分画における testosterone から Δ^4 -androstenedione への転換は 0.12%/mg 蛋白質/120分⁷⁾ ラット間脳ホモジネート中の Δ^4 -3-ketosteroid 5 α -oxidoreductase による DHT への転換は 1.21%/mg 蛋白質/120分であり⁶⁾ DHT を基質とした本実験で 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase による 5 α -A-diol への転換は 3.48%/mg 蛋白質/120分であった (表 4)。このことは志田ら¹⁶⁾ の前立腺における testosterone 代謝に関連する酵素活性の傾向と一致している。

表4 ラット脳における testosterone 代謝に係る酵素活性の比較

Enzyme	Animal No.	Conversion of substrate (%/mg protein/120 min)
Testosterone 17 β - dehydrogenase (NADP)	10	0.12 \pm 0.02
Δ^4 -3-ketosteroid 5 α -oxidoreductase	8	1.21 \pm 0.18
3 α -Hydroxysteroid dehydrogenase	7	3.48 \pm 0.79

実験値は mean \pm S. D. である。

性ホルモンは中枢神経系において性行動に関係するだけでなく、しばしば、精神の興奮に関係し、思春期、月経周期及び妊娠などの性周期に一致して精神状態に変化を起す。そこで私達は精神作用に及ぼす性ホルモンの役割について目を向けながら、中枢神経系における testosterone 代謝を手掛けると同時に脳組織内における testosterone と testosterone 代謝産物が精神興奮の過程にどのようにかわり合いを持っているかについて知見を得たいと考え、中枢作用薬が 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase 活性に与える影響を検討した。

本実験で使用した薬物は本酵素活性に影響を与えなかった。

この結果、testosterone は間脳内において、生理的条件下で代謝されている可能性があり、使用した中枢作用薬により間脳の testosterone 17 β -dehydrogenase と Δ^4 -3-ketosteroid 5 α -oxidoreductase 活性が増強または抑制される点から、testosterone あるいはその代謝産物は脳内興奮に関係している可能性がある。一方、3 α -hydroxysteroid dehydrogenase 活性は他の testosterone 代謝に関連する酵素よりも強く、また、中枢作用薬は本酵素活性に影響を与えないことから、精神興奮に関係するよりも排泄型 5 α -A -diol へ代謝さ

されていくものと考え。また、脳において testosterone や Δ^4 -androstenedione は estrogen に変換されることから、^{17,18,19,20,21,22,23,24} この代謝系も精神作用に意味を持つ可能性も考えなければならない。

結 語

4-¹⁴C-DHT とラット間脳ホモジネートを NADPH の存在下でインクベートした。主な代謝産物は TLC 及び GLC で 5 α -A-diol であることを確認した。この代謝産物は酵素反応に依存していると考え、酵素特性を検し、至適 pH 7.0, Km 値 5.9 \times 10⁻⁶M を得た。これらの性質から、ラット脳に 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase が存在することを確認した。

また、使用目的の異なる中枢作用薬であるジフェニルヒダントイン、イミプラミン及びクロロプロマジンラット腹腔内に14日間投与後、間脳内 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase 活性を測定した。本酵素活性は生理食塩水群を対照とし、いずれの薬物群においても有意差を示さなかった。

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜った高坂睦年教授に深甚なる謝意を表します。また、この研究に深い御理解と御援助を頂いた岡山県立短期大学、赤木五郎学長および黒田正清教授に感謝します。

文 献

- 1) Michael, R. P., Zumpe, D., Keverne, E. B. and Bonsall, R. W.: Neuroendocrine factors in the control of primate behavior. Recent Progr. Hormo. Res., **28**, 665-706, 1972.
- 2) Mandsley, H.: Psychophysiological autonomic and visceral disorders. In Noyes' Modern Clinical Psychiatry, ed. L. C. Kolb, W. B. Saunders Company, Philadelphia, London, Tronto, pp. 444, 1968.
- 3) Rose, R. M.: The psychological effects of androgens and estrogens—a review. In Psychiatric complications of medical drugs, ed. R. I. Shader, Raven Press, Publishers, New York,

- North-Holland Publishing Co., Amsterdam, pp. 251-293, 1972.
- 4) 市川潤：妊娠中，出産後および人工流産後に発病した精神障害の臨床。精神神経学雑誌，**76**，457-483，1974.
 - 5) Yalom, I. D., Green, R. and Fisk, N.: Prenatal Exposure to Female Hormones. Effect on psychosexual development in boys. Arch. Gen. Psychiatry, **28**, 554-561, 1973.
 - 6) 金行孝雄：脳におけるホルモン代謝：第1編。ラット脳における Δ^4 -3-ketosteroid 5 α -oxidoreductaseの存在とそれにおよぼす中枢作用薬の影響。岡山医誌，**89**，1-12，1977.
 - 7) 金行孝雄：脳におけるホルモン代謝：ラット脳における Testosterone 17- β -dehydrogenase (NADP) とそれにおよぼす神経薬物の影響。日内分泌誌，**50**，1281-1291，1974.
 - 8) Sholiton, L. J., Hall, I. L. and Werk, E. E.: The iso-polar metabolites produced by incubation of [4^{14} C] testosterone with rat and bovine brain. Acta endocr. Copenh., **63**, 512-518, 1970.
 - 9) Massa, R., Stupnicka, E., Kniewald, Z. and Martini, L.: The transformation of testosterone into dihydrotestosterone by the brain and the anterior pituitary. J. Steroid Biochem., **3**, 385-399, 1972.
 - 10) Rommerts, F. F. G. and Van Der Molen, H. J.: Occurrence and localization of 5 α -steroid reductase, 3 α - and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases in hypothalamus and other brain tissues of the male rat. Biochim. Biophys. Acta, **248**, 489-502, 1971.
 - 11) Deneff, C., Magnus, C. and McEwen, B. S.: Sex differences and hormonal control of testosterone metabolism in rat pituitary and brain. J. Endocr., **59**, 605-621, 1973.
 - 12) Deneff, C., Magnus, C. and McEwen, B. S.: Sex-dependent changes in pituitary 5 α -dihydrotestosterone and 3 α -androstenediol formation during postnatal development and puberty in the rat. Endocrinology, **94**, 1265-1274, 1974.
 - 13) Sholiton, L. J., Jones, C. E. and Werk, E. E.: The uptake and metabolism of (1, 2- 3 H) -testosterone by the brain of functionally hepatectomized and totally eviscerated male rats. Steroids, **20**, 399-415, 1972.
 - 14) Sholiton, L. J., Taylor, B. B. and Lewis, H. P.: The uptake and metabolism of labeled testosterone by the brain and pituitary of the male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). Steroids, **24**, 537-547, 1974.
 - 15) Shimazaki, J., Kato, N., Nagai, H., Yamanaka, H. and Shida, K.: 3 α -reduction of 5 α -dihydrotestosterone by rat ventral prostate. Endocr. jap, **19**, 97-106, 1972.
 - 16) 志田圭三，伊藤善一，山中英寿：アンドロゲン。ホと臨床，**23**，1203-1219，1975.
 - 17) Ryan, K. J., Naftolin, F., Reddy, V., Flores, F., and Petro, Z.: Estrogen formation in the brain. Am. J. Obstet. Gynec., **114**, 454-460, 1972.
 - 18) Naftolin, F., Ryan, K. J. and Petro, Z.: Aromatization of androstenedione by the anterior hypothalamus of adult male and female rats. Endocrinology, **90**, 295-298, 1972.
 - 19) Flores, F., Naftolin, F. and Ryan, K. J.: Armatization of androstenedione and testosterone by rhesus monkey hypothalamus and limbic system. Neuroendocrinology, **11**, 177-182, 1973.
 - 20) Flores, F., Naftolin, F., Ryan, K. J. and White, R. J.: Estrogen formation by the isolated perfused rhesus monkey brain. Science. N. Y., **180**, 1074-1075, 1973.
 - 21) Weisz, J. and Gibbs, C.: Conversion of testosterone and androstenedione to estrogens in vitro by the brain of female rats. Endocrinology, **94**, 616-620, 1974.
 - 22) Lieberburg, I. and McEwen, B. S.: Estradiol-17 β : a metabolite of testosterone recovered in cell nuclei from limbic areas of neonatal rat brain. Brain Research, **85**, 165-170, 1975.
 - 23) Lieberburg, I. and McEwen, B. S.: Estradiol-17 β : a metabolite of testosterone recovered

- in cell nuclei from limbic areas of adult male rat brains. *Brain Research*, **91**, 171-174, 1975.
- 24) Naftolin, F., Ryan, K.J., Davies, I.J., Reddy, V.V., Flores, F., Petro, Z. and Kuhn, M.:
The formation of estrogens by central neuroendocrine tissues. *Recent Progr. Hormo. Res.*,
31, 295-319, 1975.

Steroid hormone metabolism in the brain:
Part 2. Occurrence of 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase
and the effect of central acting drugs on the enzyme activity.

By

Takao KANEYUKI

Institute for Neurobiology, Okayama University Medical School

(Director : Prof. Mutsutoshi Kohsaka)

In previous study, I have reported that Δ^4 -3-ketosteroid 5 α -oxidoreductase activity in the rat diencephalon was decreased by diphenylhydantoin, imipramine and chlorpromazine administered intraperitoneally. At the same time, it was observed that 5 α -androstane-3 α , 17 β -diol formation was decreased. In this paper, I report on the occurrence of 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase and the effect of the central acting drugs on the enzyme activity.

The results were as follows. 1) 0.2 μ Ci of 4- 14 C-dihydrotestosterone (specific activity 50.6mCi/mM), 1 ml of rat diencephalon homogenate (about 8 mg protein) and NADPH (95 μ M/L) were mixed together and the total volume was adjusted to 2.5ml with phosphate buffer (pH 7.0). The reaction mixture was incubated at 38 °C for 120min. with continual shaking, the reaction contents were exposed to air. A sample of enzyme preparation placed in a boiling water bath for 5min. was used as blank. Identification of the metabolite was performed by TLC and GLC. 5 α -androstane-3 α , 17 β -diol was confirmed as principal metabolite. 2) The occurrence of 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase was confirmed in rat diencephalon. Optimal pH of the enzyme was around 7.0 and apparent Km values was estimated as 5.9×10^{-6} M. 3) Male Wistar rats weighing about 100g were divided into four groups. Each group received chlorpromazine HCl (0.4mg/0.1ml/100g body weight), imipramine HCl (0.1mg/0.1ml/100g body weight), sodium diphenylhydantoin (0.5mg/0.1ml/100g body weight) or normal saline (0.1ml/100g body weight) intraperitoneally for 14 consecutive days respectively. 24 hours following the last administration of the drug, the rats were killed by decapitation. Diencephalon was removed and homogenated with 9 volumes of phosphate buffer (pH 7.0). Homogenated were incubation with dihydrotestosterone and NADPH for the estimation of the 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase activity. The enzyme activity was not affected by these drugs.