

—平成 15 年度 岐阜薬科大学特別研究費 (奨励) —

## デヒドロエピアンドロステロンの新しい代謝とその生理的意義に関する研究

宇佐見 則行

### 1. 緒言

近年、性ホルモンや副腎皮質ホルモンなどのステロイドホルモンの生合成中間体や代謝物に新しい生理作用が見出され、これらは内分泌腺以外の組織でも産生され、パラクリン、オートクリン的に作用することが明らかになってきた。最近、臨床においてとりわけ注目されているステロイドは、エストロゲンやアンドロゲンの生合成中間体のデヒドロエピアンドロステロン (DHEA) である。DHEA は副腎の他、脳や皮膚から合成分泌され、血液中に高度濃度に存在するが高齢化に伴い減少し、DHEA 投与は特に女性の老化防止ホルモンとして有効であることから、米国ではサプリメントとして市販されている。また、低 DHEA 濃度と種々の疾患 (循環器疾患、癌、糖尿病、肥満、アレルギー、自己免疫疾患、アルツハイマー病など) との関連が示唆され、これらの疾患に対する臨床治験報告も多い。DHEA あるいはその硫酸抱合体 (DHEAS) に免疫調節及びインスリン分泌調節作用、血栓形成因子 (PAI-1) や肥満と関係する PPAR $\gamma$  の発現抑制などの多様な作用が見出され、DHEAS は GABA $_A$  受容体を負に調節し、また記憶や学習に関係する  $\sigma$ -受容体の内因性アゴニストである。しかし、上記の多彩な作用の生理学・生化学的な機構は十分に解明されていなく、DHEA の代謝についても不明な点が多い。本研究では、マウス組織に、これまでに報告のない DHEA を 17 $\alpha$ -水酸化体 (17 $\alpha$ -OH DHEA) に還元する酵素を見出したので、本酵素の構造・機能的特徴と役割について検討した。

### 2. 実験

DHEA 代謝物の分離・定量: 酵素反応および尿中代

謝物は TLC と HPLC により分析した。TLC では、試料を TLC プレート (Silica gel 60 F-254) に塗布、chloroform : acetone (9 : 1) 中で展開後、ステロイドは濃硫酸:エタノール (1:1) を噴霧、加熱 (120°C 1 時間) により発色検出した。HPLC による代謝物の分離定量は、Daicel Chiralcell OJ-H (5  $\mu$ m, 0.46 x 250 mm) カラムを使用し、流速 0.5 mL/min、移動相 *n*-hexane : IPA (90 : 10)、カラム温度 40°C および紫外 (UV) 検出器の測定波長 210nm に設定して行った。LC/MSD 測定は、HPLC 側を上記測定条件下、MS 側をインターフェイスに APCI を使用し、ポジティブイオンモードで行った。DHEA 還元酵素の精製: マウス腎臓ホモジネートの 105,000xg 上清画分を硫酸分画 (35-70%) 後、Q-Sepharose, Sephadex G-100, RedA Sepharose カラムクロマトグラフィーにより単一に精製した。DHEA 還元酵素 cDNA の単離: 精製酵素の性状と部分配列から予測されるゲノムの本酵素遺伝子を推定し、RT-PCR 法により数種の cDNA を単離、そのリコンビナント酵素の性状解析により本酵素の cDNA を同定した。酵素活性の測定: 上記の LC/MSD 法に加えて、還元反応に伴う補酵素 NADPH の減少速度を 340 nm にて分光学的に測定した。去勢とホルモン投与: 雄性 ICR マウスの精巣を摘出し、また去勢および対照マウスに estradiol benzoate (0.5 mg/kg) を投与した。いずれの処置も 1 週間後に、RT-PCR 法により組織 mRNA 量を分析し、組織ホモジネート 105,000xg 上清画分の酵素活性を測定した。

### 3. 結果・考察

これまでに DHEA の代謝物として 17 $\beta$ -、7 $\alpha$ -、7 $\beta$ -OH 体およびこれらの硫酸抱合体が同定され、このうち 17 $\beta$ -OH DHEA が主代謝物であるとされている。マウス組織のホモジネートによる DHEA の代謝

物を TLC 分析において、17 $\beta$ -OH DHEA と Rf 値が少し異なる代謝物を認め、キラルカラムを用いた LC/MSD 分析により、この代謝物が 17 $\alpha$ -OH DHEA であることを同定した。17 $\alpha$ -OH DHEA は肝を除く組織においては DHEA の主代謝物であり、細胞分画により DHEA を 17 $\alpha$ -OH DHEA に還元する酵素は NADPH を補酵素とし、可溶性画分に局在することが判明した。

本酵素活性が最も高い腎臓から精製した結果、同一分子量 (36 kDa) の単量体で等電点が異なる 2 種の酵素が単離された。両酵素の酵素学的性状はほぼ同一であり、DHEA の他 DHEAS, estrone, androst-4-ene-3,17-dione などの 17-ケト基を 17 $\alpha$ -OH 体に還元し、また種々のステロイドの 3-ケト基も 3 $\alpha$ -OH 体に還元した。このように、本酵素はこれまで報告のない bifunctional な 3(17) $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) であり、特に DHEA sulfate を還元代謝する点では初めての酵素でもある。また、両酵素の cDNA を単離した結果、5 アミノ酸残基が異なる配列であり、ともに aldo-keto reductase superfamily に属することが明らかになった。

本酵素の DHEA と DHEAS に対する Km 値 (0.4  $\mu$ M) は DHEA を他の代謝物に変換する既知の酵素 (CYP 種や 17 $\beta$ -HSD type5) より著しく低く、またその反応性 (kcat 値) も高い。本酵素は、腎臓に高発現していたが、脳、心臓、小腸などにも分布していた。したがって、腎臓は多彩な生理活性のある DHEA の主要な代謝臓器であることが示唆された。また、本酵素は DHEAS (GABA<sub>A</sub> 受容体を負に、 $\sigma$ -受容体を正に調節する) を不活性化し、3 $\alpha$ -HSD 活性によりテトラヒドロプログステロン (GABA<sub>A</sub> 受容体の正の調節因子) を生成するので、脳において本酵素はこれらの神経ステロイドの濃度調節により精神機能維持に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。さらに、エストロゲンは脳内で生成し、脳機能を活性化することが知られているため、脳における本酵素による estrone の 17 $\alpha$ -OH 体への代謝も活性なエストロゲンの濃度に関係するかもしれない。

雌雄マウスの本酵素量を比較した結果、脳における mRNA 発現量と腎臓における活性は雌より雄で高く、性差が認められた。しかし、雄マウスの去勢およびエストラジオール投与は、本酵素の発現量に

はほとんど影響しなかった。単離した 2 種の 3(17) $\alpha$ -HSD のうち、1 種は公開されているマウスゲノム配列に予測されている遺伝子 *Akr1C21* と一致した。*Akr1C21* 遺伝子の 5'-非翻訳領域の転写因子結合部位解析では性ホルモン受容体結合配列が見出せなかった。したがって、本酵素の発現量は、性ホルモン以外の因子により調節されると考えられた。

以上のようにマウスで明らかになった DHEA の新代謝経路が他の動物種においても普遍的であるかどうかを明らかにすることは、DHEA の多彩な生理作用解明に向けて大切である。そこで 17 $\alpha$ -OH DHEA の高感度定量法を検討した。従来ステロイド代謝物分析に繁用されている GC/MS 法では DHEA の 17 $\beta$ -と 17 $\alpha$ -OH 体の分離が不可能であり、キラルカラムを用いた LC/MSD 法によってのみ両者が分離定量でき、実際に、DHEA 投与マウスの臓器および尿中の 17 $\alpha$ -OH DHEA が定量された。また、キラルカラムを用いた LC/MSD 法は、溶媒比を変えることにより、他のヒドロキシステロイドの  $\alpha$ 、 $\beta$ -異性体の分離定量が可能であり、脳内の神経ステロイドの動態分析にも応用が可能であると考えられる。

#### 4. まとめ

以上、本研究では、マウスにおいて DHEA の新代謝経路とこの代謝反応に関与する酵素を明らかにし、ステロイド異性体の分離定量法も確立した。本研究の成果は、第 19 回薬物動態学会および第 77 回日本生化学会で発表し、*Biochem. J.* 誌に公表する予定である。今後、本研究成果を踏まえて、この新代謝の生理的意義を明らかにしてゆきたい。また、本研究により新たに見出された興味ある現象：①2 種の酵素の存在意義とその 1 種のゲノム遺伝子の同定、②性差のメカニズムの解明、③組織特異的発現調節についても研究を展開していく予定である。

#### 5. 謝辞

本研究は、岐阜薬科大学平成 15 年度特別研究費 (奨励研究) により遂行されたものであり、ここにこの助成に対して心より感謝致します。