

助成番号：113

肝組織における hydroxysteroid dehydrogenaseの組織化学的研究

松 沢 時 弘

一般教養課程，生物学研究室

1. 目 的

細胞内での代謝調節は，その代謝に関与する酵素の多型現象，あるいは isozyme の存在と密接な関係がある。今回の実験は steroid hormone，特に C_{19} -， C_{21} - steroid の代謝上，その分解，および尿中への排泄の過程で重要な役割を果たしている肝 3α - hydroxysteroid dehydrogenase (EC I. I. I. 50 ; 3α - HSD) の多型現象を，この酵素の組織化学的研究と合わせて調査し， C_{19} -， C_{21} - steroid 代謝の調節機構に，手がかりをうることを目的とした。

2. 方 法

実験材料として成熟ラット (Wistar系) の雄の肝臓を用いた。

3α - HSD zymogram の分析には，肝組織の 50% homogenate (phosphate buffer solution, pH 7.2, 0.1 M) を作り，これを $10,000 \times g$ で 30 分間遠心分離して得られた上清， $30 \mu l$ を Disc - 電気泳動後，Balogh の染色液 (Balogh, 1966) を用いて行った。

3α - HSD 活性の組織化学的観察は，Takikawa および Matsuzawa (1967) の方法で，肝組織の凍結切片 (厚さ 10μ) を作り，Balogh の染色液で酵素活性を検出して行った。また， 3α - HSD の基質には 9 種の 3α - hydroxysteroid を使った (表 - 1)。

表-1 Substrate specificities of NADP-dependent 3 α -HSD isozymes

Substrate	Isozyme-A	Isozyme-B	Isozyme-C
5 α -androstane-3 α -o1, 17-one (androsterone)	1 or 2+	3+	-
5 β -androstane-3 α -o1, 17-one (etiocholanolone)	1 or 2+	4+	2 or 3+
5 α -androstane-3 α , 17 β -diol	1+	2 or 3+	-
5 β -androstane-3 α , 17 β -diol	1+	2+	-
5 β -pregnane-3 α -o1, 20-one	1+	2+	-
5 β -pregnane-3 α , 20 α -diol (pregnanediol)	-	-	-
5 β -pregnane-3 α , 17 α , 21-triol, 11, 20-dione	1+	2 or 3+	-
5 α -pregnane-3 α , 11 β , 17 α , 21-tetrol, 20-one	- or 1+	1+	-
5 β -pregnane-3 α , 11 β , 17 α , 21-tetrol, 20-one	1+	1 or 2+	-

Symbol indicates the intensity of enzyme activity. -; no activity, 1+; slight activity 2+; weak activity, 3+; moderate activity, and 4+; high activity.

3. 結 果

易導度の順に従って、陽極側からA, B, CおよびDと名付けられる4個の3 α -HSDが, disc-電気泳動のゲル上で観察された。AとBは, NADおよびNADPのいずれをもcofactorとして利用でき, CとDはそれぞれNADP-依存, NAD-依存の3 α -HSDであった。NADP-依存の3 α -HSD, A, B, Cの基質に対する親和度は表-1に示してある。NAD-依存の3 α -HSDおよびNADP-依存の3 α -HSDのいずれの場合でも, 最も高い活性が認められたのは, etiocholanoloneを基質にした時であった。調査した9種類のsteroidのいずれを基質とした場合でも, NADP-依存の3 α -HSD活性は, NAD-依存の3 α -HSD活性よりも高かった。

一方, 顕微鏡による組織化学的観察結果はandrosteroneを基質にした時に, 3 α -HSD活性が最も高く, etiocholanoloneの場合は, trace程度の活性しか示さなかった。また, 残り7種のsteroidが基質の時には3 α -HSD活性は認められなかった。さらに, 電気泳動によるzymogramの分析結果とは逆にNAD-依存の3 α -HSD活性は, NADP-依存の3 α -HSD活性よりも高かった。

4. 考 察

これまでの研究では生化学的な方法によって得られた結果と, 顕微鏡による組織化学的観察結果とは必ずしも一致しておらず, これを簡単に方法による差と片付けてきた。今回の実験においても, 電気泳動によるzymogramの分析結果と, 顕微鏡による組織化学的観察結果とは一致しなかった。しかし, 酵素活性を検出するのに用いた方法は, いずれもBaloghの方法によった, 共通の方法であるので, 検出法の差であるとは考えられない。従来の生化学的研究によれば, 3 α -HSD活性は細胞分画中, 可溶性分画およびmicrosome分画の両方に存在することが指摘されている。一方, こ

の実験で使用した標準的な disc-電気泳動法では、microsome 分画中に存在する酵素蛋白質の全てが、running gel 中を通過するのではないことが知られている。また、組織切片による 3α -HSD の組織化学的検出法では、酵素活性を検出しているうちに、可溶性分画中の 3α -HSD の一部が、染色反応液中に流出、拡散し、組織切片上で検出されない可能性がある。したがって zymogram の分析結果、つまり全ての 3α -HSD が etiocholanolone を基質にした場合に、最も高い活性を示し、かつ NADP-依存型が NAD-依存型の方がより高い活性を示すのに対し、組織化学的観察結果すなわち NAD-依存 3α -HSD 活性の方が、NADP-依存 3α -HSD 活性より高く、androsterone が etiocholanolone よりもこの酵素に対してより親和性を示すという、両結果の不一致は、むしろ 3α -HSD の細胞内分布が一樣ではなく、それぞれの細胞分画に存在するこの酵素の基質特異性が異なっていることを暗示している。今後は、この点について検討を進めたい。

5. 関連論文

- 1) Balogh, K. (1966) : J. Histochem. Cytochem., 14 ; 77.
- 2) Takikawa, H. and T. Matsuzawa (1967) : Endocrinol. Japon., 14 ; 276.
(この内容は、T. Matsuzawa (1978). Endocrinol. Japon 25 ; ページ未定 からの抜粋である)