Parotin 構成々分の Testosterone 生合成系への影響

大阪大学薬学部

青 沼 繁, 小 浜 靖 弘, 野 村 正 和
平 野 淳 史, 福 田 ちさと, 森 千佐子
青 沼 真一郎

The Effects of Parotin Components on Testosterone
Biosynthesis in Rats

Shigeru AONUMA, Yasuhiro KOHAMA, Masato NOMURA,
Atsushi HIRANO, Chisato FUKUDA,
Chisako MORI and Shinichiro AONUMA

Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Osaka University

During our studies on the active moiety of parotin, we succeeded in purifying MP-parotin (MW=130000) and parotin-subunit (MW=45000) from crude parotin. Furthermore, AA-1 (MW = 9100) was isolated after the tryptic cleavage of the parotin-subunit. AA-1 was the smallest unit ever obtained which had serum Ca-decreasing activity and circulating leucocyte-increasing activity together with the nature of specific localization in bone. Therefore, AA-1 was considered to contain the essential residues for parotin activity in its structure. Since crude parotin was also known to show andromimetic action, these parotin components reduced in size were assayed in this regard.

A daily injection of MP-parotin (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$), parotin-subunit (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) or AA-1 (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) was administered subcutaneously for two weeks to male rats weighing 200 ~ 220 g. The dynamics of the testicular biosynthesis of testosterone from ^3H -pregnenolone and ^{14}C -progesterone via Δ^4 , Δ^5 -pathway and the transition of Δ^5 to Δ^4 -steroids were measured. MP-parotin and the parotin-subunit stimulated the pathway of pregnenolone $\rightarrow$ 17-hydroxypregnenolone $\rightarrow$ dehydroepiandrosterone $\rightarrow$ androstenedione $\rightarrow$ testosterone and resulted in the elevation of serum testosterone levels. Cyclic AMP levels in the testicular homogenate and the motility of epididymal sperm were also increased by the treatment. On the other hand, AA-1 showed no effect on these parameters. It was concluded that andromimetic activity, which is involved in MP-parotin or parotin subunit was independent of parotin activity on the bone tissue.

緒 論

著者らは parotin の化学的本態に関する研究を進め、血清 Ca 低下作用、循環白血球数増加作用及び免疫交叉反応性などを指標としてその有効最小成分の分離精製を行ない、順次 MP-parotin (分子量: 132000)¹⁰⁾, parotin-subunit (45000)⁴⁾ さらに AA-1 (9100)⁶⁾ を得、これらの物質がいずれも骨組織への特異的分布など共通の生理活性を有することを確認してきた^{5) 7) 11)}。しかし、同時に parotin が testosterone 生合成を促進し、また精子運動性、精子生存性などに対しても促進的に作用すること²⁾ を認めているので、このように低分子化した成分についても parotin 本来の作用の他に睾丸ホルモンへの作用を備えているか否かを検討し、その作用の独立性を parotin-subunit までは認めたが、さらに分画した AA-1 ではこの独立性作用が消失しているという重大な知見を得たのでここに報告する。

実験方法

体重 200-220g の Wistar 系雄性ラット (徳島実験動物研究所) を 1 群 8 匹の 4 群に分け、各群のラットに対して既報^{4) 6) 10)} に従い調整した MP-parotin (500 µg/kg), parotin-subunit (20 µg/kg), AA-1 (20 µg/kg) 及び対照として生理食塩水をそれぞれ 2 週間連日背部皮下投与した。なお検体は生理食塩水に溶解し、投与量は 1 ml/kg とした。検体投与終了日の翌日にエーテル麻酔下腹部大動脈より採血後脱血死させ、直ちに睾丸及び副睾丸を採取し、以下に述べる如く睾丸 testosterone 生合成及び cyclic AMP レベル、副睾丸精子運動性及び血清中 testosterone レベルの測定に使用した。

Testosterone 生合成

ラット睾丸酵素標本を用い、[1-¹⁴C] progesterone (¹⁴C-progesterone, 56 mCi/mole, Amersham) 及び Δ^5 [7(n)-³H]-pregnenolone (³H-pregnenolone, 10 mCi/mole, Amersham) から Δ^5 経路 (progesterone $\rightarrow$ 17-hydroxyprogesterone $\rightarrow$ androstenedione $\rightarrow$ testosterone) 及び Δ^5 経路 (pregnenolone $\rightarrow$ 17-hydroxypregnenolone $\rightarrow$ dehydroepiandrosterone $\rightarrow$ androstenediol $\rightarrow$ testosterone) ならびに Δ^5 から Δ^5 経路への移行を含めた testosterone 生合成系について検討した。酵素標本として既報¹⁾ に従い、1 匹ずつのラット右側睾丸を同量の 0.02 M トリス-HCl 緩衝液 (pH 7.0) でホモジナイズ後、10000 × g, 15 分間, 4 °C にて遠心分離した上清を用いた。生合成反応は, Shikita ら¹²⁾ の方法に準じ、基質として比放射能 2.5 µCi/mg に調整した ¹⁴C-progesterone 及び 25 µCi/mg に調整した ³H-pregnenolone 各 0.24 µmole に、NADPH 及び NAD 各 1 µmole を含む 0.25 M ショ糖-0.05 M トリス-HCl 緩衝液 (pH 7.4)-5 mM MgCl₂ 1.5 ml 及び酵素標本 0.5 ml を添加し、37 °C にて反応させた。反応終了後キャリアー (pregnenolone, progesterone, 17-hydroxypregnenolone, 17-hydroxyprogesterone, androstenedione, androstenediol, dehydroepiandrosterone, testosterone) 各 100 µg を含むアセトン溶液 2 ml を添加し反応を停止させた。遠心分離 (1500 × g, 15 分間) により上清を得、さらに沈殿をアセトン 2 ml で 3 回洗浄し得られた上清を先の上清と合わせ、液量が約 0.5 ml になるまで減圧濃縮した。濃縮液をエーテル 2 ml で 3 回抽出し、エーテル層を合わせ等量の再蒸留水で 3 回洗浄後エーテル層を減圧乾固した。抽出物をクロロホルム 100 µl に溶解し、Yanaiharu ら¹⁴⁾ の方法に従い、代謝産物の分離及び同定に用いた。すなわち、クロロホルム抽出液 50 µl をワコーゲル B-5 (220 µm), 溶媒クロロホルム: エーテル (9:1) を用いた薄層クロマトグラフィー (TLC) により分画し、画分 I (R_f: 0.80), II (0.71), III (0.50), IV (0.40) 及び V (0.27) (検出: 紫外線ランプまたはヨウ素発色) を得、さらに 2 回各画分を同条件下で再 TLC

を行なった。全画分をそれぞれピリジン-酢酸を用いてアセチル化後、アセチル I 及び II は、東洋口紙 No. 50 口紙、溶媒ヘキサン:メタノール:水 (10:8:2) を用いたペーパークロマトグラフィー (PC) で分画し、アセチル I より progesterone (0.85) 及びアセチル II より androstenedione (0.70) を回収した。アセチル II はベンゼン:酢酸エチル (95:5) を用い 2 回 TLC を行ない、pregnenolone acetate (0.27) 及び dehydroepiandrosterone acetate (0.40) を回収した。アセチル IV 及び V はベンゼン:メタノール (9:1) を用いた TLC で分画し、アセチル IV より 17-hydroxyprogesterone (0.52) 及び画分アセチル IV-1 (0.79)、またアセチル V より 17-hydroxypregnenolone acetate (0.72) 及び androstenediol (0.88) を回収した。画分アセチル IV-1 は PC で分画し、testosterone acetate (0.40) を回収した。放射活性は各画分相当箇所のシリカゲルまたは口紙よりエタノール 2 ml を用い 40℃ で加温抽出し、再結晶法により精製した後シンチレーションカクテル ACS II (Amersham) 5 ml を加え、液体シンチレーションカウンター (東芝ベックマン LS-150) で測定した。結果は添加した前駆体の総放射活性に対する各代謝産物の放謝活性の百分率で示した。また 17-hydroxyprogesterone, androstenedione 及び testosterone については、 ^3H , ^{14}C それぞれの分布百分率より $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ 比を算出した。なお添加した ^3H の総放射活性は 755000 cpm で、その代謝産物への回収率は 71.9%, 添加した ^{14}C の総放射活性は 173000 cpm で、その回収率は 67.1% であった。

血清中 Testosterone レベルの測定

血清 1 ml をエーテル 3 ml で 2 回抽出後エーテルを減圧留去し、Testosterone radioimmunoassay kit (Amersham) を用いて測定した。

Cyclic AMP の測定

既報⁵⁾に従い、左側辜丸を冷 6% TCA 2 ml 中ホモジナイズし、1500×g, 15 分間遠心分離した上清を 2 倍量のエーテルで 6 回抽出し、エーテルを減圧下に除去後、Cyclic AMP assay kit (Amersham) を用いて cyclic AMP レベルを測定した。

精子運動率の測定

既報²⁾に従い、副辜丸精子を Ca-free-krebs-Ringer-phosphate buffer に懸濁し ($7 \sim 9 \times 10^6$ sperm/ml), 以後 37℃ で経時的に運動率を測定した。運動率は顕微鏡下 (×100) に運動精子と非運動精子とを合わせて少なくとも 100 匹以上数え、全精子数に対する運動精子数の百分率で示した。

実 験 結 果

Testosterone 生合成系に及ぼす影響

Parotin 構成々分を連日 2 週間皮下投与したラットの辜丸 testosterone 生合成系について前駆体として ^{14}C -progesterone 及び ^3H -pregnenolone を用いて検討した。

1) ^{14}C -Progesterone を前駆体とした Δ^4 経路

Fig. 1 に Δ^4 経路の各中間代謝物及び testosterone における放謝活性の分布を示した。

前駆体の progesterone の放射活性は 15 分で対照及び AA-1 投与群において 50% にまで減少し、30 分では 30% が残存していたのに対し、parotin-subunit 及び MP-parotin 投与群では消費が促進され、15 分で 40% にまで減少し、30 分に至るまでより少ない残存率を示す傾向を認めた。

17-Hydroxyprogesterone においては他の代謝物に比較して分布は最も低かった。対照及び AA-1 投与群では放射活性の分布が 15 分から 30 分にかけてゆるやかに増加し、その後減少する傾向を示したが、parotin-subunit 及び MP-parotin 投与群では 15 分に分布のピークを示す急激な増加と減少を示した。

Fig. 1. Effects of parotin components on testosterone biosynthesis from ^{14}C -progesterone via Δ^4 -route in rat testicular tissue.

Each point represents mean $\pm$ S.E. (n=8). Sample was given S.C. daily for 2 weeks.

(○) Control (saline, 1 ml/kg), (●) AA-1 (20 $\mu\text{g/kg}$), (▲) Parotin-subunit (20 $\mu\text{g/kg}$), (■) MP-parotin (500 $\mu\text{g/kg}$).

Androstenedione では 17-hydroxyprogesterone と同様に対照及び AA-1 投与群ではゆるやかな放射活性の分布の増加と減少が認められたのに対し, parotin-subunit 及び MP-parotin 投与群では 15 分で対照群よりも高い分布の増加がみられ, 60-120 分では対照群より低い分布を示した。17-Hydroxyprogesterone では 15 分で分布のピークを示したのに対し, androstenedione では分布のピークは遅れ 30 分であった。また 17-hydroxyprogesterone 及び androstenedione のいずれにおいても parotin-subunit 及び MP-parotin 投与群では, 対照群に比べ早い時間帯においてより高い分布を, 60 分以後ではより低い分布を示す傾向を認めた。

Testosterone では対照及び AA-1 投与群は 15 分で 13%, 30 分で 19%, 60 分で 28% と経時的に蓄積が進み, 120 分では 32% であったのに対し, parotin-subunit 及び MP-parotin 投与群では 60-120 分において 37% と蓄積がさらに増加する傾向を認めた。

このように ^{14}C -progesterone の消費が parotin-subunit 及び MP-parotin 投与群において15分で対照群に比べ増加する結果が得られたが, testosterone の蓄積量において parotin 構成成分投与群では増加傾向が認められたものの有意な差異はなく, Δ^4 経路における parotin の促進作用はわずかなものと考えられた。また17-hydroxyprogesterone への分布が極めて少なく, その貯留が androstenedione に比べ時間的に先行する点などはこれまでの報告^{12,14)}とよく一致する結果を得た。

2) ^3H -Pregnenolone を前駆体とした Δ^5 及び Δ^4 経路

Fig. 2 に Δ^4 及び Δ^5 経路の各中間代謝物及び testosterone における放射活性の分布を示した。

前駆体の pregnenolone は経時的に消費され対照及び AA-1 投与群における残存率は15分で約60%, 30分で約40%にまでしか減少しなかったのに対し, parotin-subunit 及び MP-parotin 投与群では15分で45% ($p < 0.01$: Versus control) 及び48%, 30分では20% ($p < 0.01$) 及び25% ($p < 0.01$) と前駆体の消費が有意に亢進することを認めた。

Fig. 2. Effects of parotin components on testosterone biosynthesis from ^3H -pregnenolone via Δ^4 and Δ^5 -roots in rat testicular tissue. Each point represents mean $\pm$ S.E. ($n=8$). Sample was given S.C. daily for 2 weeks.

(○) Control (saline, 1 ml/kg), (●) AA-1 (20 $\mu\text{g/kg}$), (▲) Parotin-subunit (20 $\mu\text{g/kg}$), (■) MP-parotin (500 $\mu\text{g/kg}$).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: Significantly different from control.

17-Hydroxypregnenoloneでは対照及びAA-1投与群が30分に放射活性の分布のゆるやかなピークを示したのに対し、parotin-subunit及びMP-parotin投与群では15分にピークを持つ急激な増加と減少が認められたが、放射活性の分布は低いいずれも5%未満であった。

Dehydroepiandrosteroneでは対照及びAA-1投与群は15分で放射活性の分布が5%にまで増加し、30分では6%のピークを示し、その後ゆるやかに減少し、120分でも4%の分布を示したのに対し、parotin-subunit及びMP-parotin投与群では15分で3-4% ($p < 0.01$) のピークを示した後減少しはじめ、30分ではともに2% ($p < 0.01$)、120分ではいずれも1%台 ($p < 0.01$) の分布しか示さず、対照群に比べ分布の有意な減少が認められた。

Androstenediolはいずれの群においても0.1%未満の値を示し、ほとんど分布しないことを認めた。

Progesteroneでは各群ともに15分で放射活性の分布が8-9%にまで上昇し、対照及びAA-1投与群は、その後ゆるやかに減少し120分ではともに5%であったのに対し、parotin-subunit及びMP-parotin投与群では30分で対照及びAA-1投与群より高い11%の分布を示し、60分以後では逆転し対照群より低い分布を示す傾向を認めた。

17-Hydroxyprogesteroneでは ^{14}C -progesteroneを前駆体とした場合 (Fig. 1) と同様の分布傾向が認められたが、放射活性の分布はさらに少なく3%以下であった。

Androstenedioneでは対照及びAA-1投与群は15分で3%及び4%、30分で7%及び12%であったのに対し、parotin-subunit及びMP-parotin投与群では15分で12% ($p < 0.01$) 及び8% ($p < 0.05$)、30分で23% ($p < 0.01$) 及び19% ($p < 0.01$) と著しく蓄積が進み分布率の有意な増加を認め、その後60分では急激に減少し、対照群よりも低い分布を示す傾向を認めた。

Testosteroneでは対照及びAA-1投与群は15分で4%及び6%、30分で11%及び14%と、 ^{14}C -progesteroneを前駆体とした場合 (Fig. 1) と比べ低い分布を示したが、60分及び120分においては有意な差異は認められず、時間的な遅れが認められるものの蓄積量における変化は認められなかった。Parotin-subunit及びMP-parotin投与群では15分で12% ($p < 0.01$) 及び11% ($p < 0.05$) と対照群に比べ有意な分布率の増加が認められたものの ^{14}C -progesteroneを前駆体とした場合 (Fig. 1) に比べ低い値を示したのに対し、30分では26% ($p < 0.01$) 及び24% ($p < 0.01$)、60分では37% ($p < 0.05$) 及び35% ($p < 0.05$) と蓄積がさらに進み、対照群に比べ有意な分布の増加が認められ、さらに ^{14}C -progesteroneを前駆体とした場合 (Fig. 1) と比較してもより高い分布を示した。

このように ^3H -pregnenoloneの消費がparotin-subunit及びMP-parotin投与群では著しく増加するとともにtestosteroneの蓄積も著しく増加する結果が得られた。これらの物質が Δ^4 経路に著明な促進作用を示さなかったことより、parotin-subunit及びMP-parotinは Δ^5 経路もしくは Δ^5 ステロイドから Δ^4 ステロイドへの移行を促進したものと考えられる。

3) Δ^4 経路の中間代謝物及びTestosteroneにおける $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ 比

Fig. 3に17-hydroxyprogesterone, androstenedione及びtestosterone画分における $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ 比 (放射活性の分布率の比) の経時の変化を示した。

17-Hydroxyprogesteroneでは15分で対照及び検体投与群全てにおいて $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ 比が0.4を示し、以後経時的に上昇し120分では1に近づくことを認めた。

Androstenedioneでは対照及びAA-1投与群において15分で $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ 比が0.4及び0.5であったのに対し、parotin-subunit及びMP-parotin投与群では0.9及び0.7と ^3H の利用率が増加しており、30

分では1.2及び1.1と ^3H の利用率がさらに増大し, ^{14}C の利用率を上回る結果を得た。

Testosteroneにおいても androstenedione と同様の傾向が認められ, 15分では対照及びAA-1投与群が0.6及び0.7であったのに対し, parotin-subunit 及びMP-parotin 投与群では1.2及び1.1と ^3H の利用率を上回る結果を得た。

このように17-hydroxyprogesterone における $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ 比がいずれの時間帯においても1より小さかったのに対し, androstenedione においては parotin-subunit 及びMP-parotin 投与群の $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ 比が30分以降1以上を示したことにより, androstenedione における ^3H の増加は17-hydroxyprogesterone に由来するものではなく, Δ^4 経路の中間代謝物である dehydroepiandrosterone に由来するものと考えられる。Fig. 2において pregnenolone の消費が著しく促進しているにもかかわらず, dehydroepiandrosterone の貯留が少なくなるという結果は, 対照群に比らべ parotin-subunit 及びMP-parotin 投与群では dehydroepiandrosterone から androstenedione への移行が特異的に促進される結果と一致するものであった。さらに androstenedione は ^{14}C -progesterone を前駆体とした場合, parotin-subunit 及びMP-parotin 投与群では対照群に比らべ約1.5倍の分布を示したのに対し, ^3H -pregnenolone の特異的な増加が認められたことも dehydroepiandrosterone から androstenedione への移行が特異的に促進された結果とよく一致した。

以上の結果より parotin-subunit 及びMP-parotin が pregnenolone $\rightarrow$ 17-hydroxypregnenolone $\rightarrow$ dehydroepiandrosterone $\rightarrow$ androstenedione $\rightarrow$ testosterone の経路を促進することにより testosterone 生合成を増加させることを認めた。一方 AA-1 は testosterone 生合成に影響を及ぼさないことを認めた。

Fig. 3. Effects of parotin components on $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ ratio in 17-hydroxyprogesterone, androstenedione and testosterone formed from ^3H -pregnenolone and ^{14}C -progesterone in rat testicular tissue.

a) Ratio of percentage of recovered ^3H radioactivity versus percentage of recovered ^{14}C radioactivity in each steroid.

Each point represents mean of 8 rats.

(○) Control, (●) AA-1, (▲) Parotin-subunit, (■) MP-parotin

血清中 Testosterone レベル, 睾丸中 cyclic AMP レベル及び副睾丸精子運動性に及ぼす影響

Parotin 構成成分を2週間投与後のラット血清中 testosterone レベルを測定した結果, Table 1 に示す如く parotin-subunit 及びMP-parotin 投与群において testosterone レベルが対照群に比らべ44%及び49% ($p < 0.05$) 上昇していることを認めたが, AA-1 投与群ではほとんど変化がみられなかった。

睾丸中 cyclic AMP レベルについては Table 2 に示す如く, parotin-subunit 及びMP-parotin 投与群において上昇の傾向を認めたが, AA-1 投与群では変化を認めなかった。

Table 1. Effects of parotin components on testosterone level in rat serum.

Sample	Dose ($\mu\text{g/kg/day}$, s.c. for 2 weeks)	Serum testosterone level ^{a)} (pg/ml of serum)		
Control	—	232.1	$\pm$ 30.2	
AA-1	20	245.4	$\pm$ 36.7	(6)
Parotin-subunit	20	334.4	$\pm$ 69.1	(44)
MP-Parotin	500	344.8	$\pm$ 24.7 *	(49)

a) Mean $\pm$ s.e. (n = 8). Change % of testosterone level from control was given in parenthesis.

* $p < 0.05$: Significantly different from control.

Table 2. Effects of parotin components on cyclic AMP level in rat testis.

Sample	Dose ($\mu\text{g/kg/day}$, s.c. for 2 weeks)	Cyclic AMP level ^{a)} (f mole/mg of tissue)		
Control	—	10.2	$\pm$ 2.2	
AA-1	20	10.9	$\pm$ 2.0	(7)
Parotin-subunit	20	12.6	$\pm$ 3.2	(24)
MP-Parotin	500	12.1	$\pm$ 2.1	(19)

a) Mean $\pm$ s.e. (n = 8). Change % of cyclic AMP level from control was given in parenthesis.

Table 3. Effects of parotin components on rat epididymal sperm motility.

Sample	Dose ($\mu\text{g/kg/day}$, s.c. for 2 weeks)	Sperm motility (%) ^{a)}			
		Time (min) after release from epididymis			
		0	60	120	
Control	—	62.4 $\pm$ 4.5	48.0 $\pm$ 1.9	38.3 $\pm$ 5.7	
AA-1	20	66.9 $\pm$ 2.1 (7)	54.2 $\pm$ 4.7 (13)	39.0 $\pm$ 5.5 (2)	
Parotin-subunit	20	74.2 $\pm$ 5.3 (19)	58.9 $\pm$ 7.6 (23)	55.2 $\pm$ 6.9 (44)	
MP-Parotin	500	76.4 $\pm$ 5.2 (22)	61.7 $\pm$ 3.9 ** (29)	52.2 $\pm$ 6.5 (36)	

a) Epididymal sperm ($7-9 \times 10^6$ sperm/ml) was incubated in Ca-free Krebs-Ringer-phosphate buffer (pH 7.4) at 37°C. Mean $\pm$ s.e. (n = 8). Change % of sperm motility from control was given in parenthesis.

** $p < 0.01$: Significantly different from control.

副睪丸精子運動性については Table 3 に示す如く parotin-subunit 及び MP-parotin 投与群で精子採取直後において約20%, 37°C 1時間放置後約25%, 2時間放置後約40%と対照群に比らば運動性の亢進が認められたが, AA-1 投与群では対照群とほとんど差がみられなかった。

考 察

Parotin と性機能に関し, 著者らは既に parotin 産生臓器である唾液腺の摘出により睪丸重量が減少するとともに Leydig 細胞が萎縮し, これらの変化が parotin 投与により補償されること, また

辜丸摘出により唾液腺重量の減少と同時に唾液腺及び血清中 parotin レベルが減少することを認め報告した^{3) 9)}。さらに parotin が辜丸における testosterone 生合成を促進するとともに精液形成能, 精子運動性亢進作用を有することを認め^{1) 2)}, parotin が性機能亢進作用を有することを明らかにしてきた。

Parotin は骨などの硬組織の発育, Ca 代謝作用など間葉系組織に対する分化, 発育促進作用を有するが⁸⁾, これらの作用を有する parotin 構成々分として MP-parotin, parotin-subunit 及び AA-1 を順次精製単離し^{4) 5) 6)}, さらに最小有効成分である分子量 9100 の糖ペプチド AA-1 についてはその全一次構造を明らかにしてきた^{7) 11)}。本報では parotin の性機能亢進作用が, これら低分子化した成分にもまだ存在するの否かについて辜丸 testosterone 生合成系を中心に検討を加えた。

Table 4. Summary of parotin activity and andromimetic activity in parotin components.

Action ^{a)}	Purification order			
	Parotin	→ MP-Parotin	→ Parotin-subunit	→ AA-1
Parotin activity ^{b)}	+	+	+	+
Andromimetic activity				
Promotion of testosterone biosynthesis in testis	+	+	+	—
Elevation of testosterone level in serum	+	+	+	—
Increase of sperm motility	+	+	+	—
Elevation of cyclic AMP level in testis	+	+	+	—

a) + : Active, — : No effect.

b) Serum Ca-decreasing activity, circulating leucocyte-increasing activity, specific localization in bone and so on.

その結果 MP-parotin 及び parotin-subunit が辜丸 testosterone 生合成を著明に増加させるとともに血清中 testosterone レベルを上昇させ, さらに精子運動性をも亢進させ, 明らかに性機能亢進作用を示すことを認めた。しかし最小成分の AA-1 ではもはや testosterone 生合成, 血清中 testosterone レベル及び精子運動性に何ら作用を示さず, 性機能亢進作用が消失していることを認めた。すなわち Table 4 に示す如く parotin の性機能亢進作用は parotin → MP-parotin → parotin-subunit の精製段階までに存在し, AA-1 には存在せず, 従って parotin の硬組織への作用と性機能への作用は互いに独立性作用であることを証明しえたものと考ええる。Parotin の testosterone 生合成系に対する作用として, 前回²⁾ は Δ^4 経路を中心に検討したが, 本報では Δ^4 , Δ^5 経路及び Δ^5 ステロイドから Δ^4 ステロイドへの移行を含めた生合成系について検討を加え, MP-parotin 及び parotin-subunit が pregnenolone → 17-hydroxypregnenolone → dehydroepiandrosterone → androstenedione → testosterone の生合成経路を特異的に亢進させることを明らかにした。この testosterone 生合成系路は 17 α -hydroxylase, desmolase, 17 β -hydroxysteroiddehydrogenase 及び 3 β -hydroxysteroiddehydrogenase の酵素と NADPH 系の補酵素により進行されるが, これらの酵素反応は cyclic AMP により調節されることが知られている¹³⁾。MP-parotin 及び parotin-subunit は testosterone 生合成亢進時に辜丸中の cyclic AMP レベルにおいて増加傾向を示したことにより, これらの作用が cyclic AMP を介した作用であることが強く示唆された。

結 語

Parotin の性機能亢進作用が血清 Ca 低下作用、循環白血球数増加作用及び骨への特異的分布などに対して独立したものであるか否かを明らかにする目的で、parotin から順次精製された MP-parotin, parotin-subunit 及び AA-1 の性機能への影響をみることにより検討した。ラットに検体を2週間連日投与した結果 MP-parotin 及び parotin-subunit が睾丸中 pregnenolone → 17-hydroxypregnenolone → dehydroepiandrosterone → androstenedione → testosterone の経路を促進することにより、testosterone 生合成を増加させ、さらに血清中 testosterone レベルの上昇及び精子運動性と亢進をもたらすことを認め、これらの作用が睾丸中 cyclic AMP を介する作用であることを明らかにした。しかし最小成分の AA-1 では性機能への作用はみられず、従って parotin の硬組織への作用と性機能への作用は互いに独立性作用であることを証明した。

実験材料の一部を提供された帝国臓器製薬株式会社に感謝する。実験の一部を担当した津村晶子氏に感謝する。

文 献

- 1) 青沼 繁, 真弓忠範, 田中慶一: 唾液腺ホルモンと性機能 (第3報) Parotin, S-Parotin 及び Serum-Parotin の Progesterone 代謝に及ぼす影響。薬学研究, 38: 37—46, 1967.
- 2) 青沼 繁, 真弓忠範, 中島敏彦, 鈴木宏治: 唾液腺ホルモンと性機能 (第4報) モルモット精液に対するパロチンの作用。日内分泌会誌, 46: 127—138, 1970.
- 3) 青沼 繁, 真弓忠範, 中島敏彦, 鈴木宏治: 唾液腺ホルモンと性機能 (第5報) 唾液腺ホルモンの下垂体前葉 FSH, LH 活性に対する作用および下垂体剔出, 去勢などによる唾液腺ホルモンの挙動。日内分泌会誌, 46: 139—147, 1970.
- 4) 青沼 繁, 小浜靖弘, 中陳静男, 屋敷伸治, 江川 宏: 唾液腺ホルモンの Subunit に関する生理化学的研究。日内分泌会誌, 50: 1468—1476, 1974.
- 5) 青沼 繁, 小浜靖弘, 中陳静男, 屋敷伸治, 和田昌師, 小宮山豊: 唾液腺ホルモンの Subunit に関する生理化学的研究 (その2)。日内分泌会誌, 52: 93—104, 1976.
- 6) 青沼 繁, 小浜靖弘, 小宮山豊, 中陳静男, 山田康子: 唾液腺活性フラグメントに関する生理化学的研究。日内分泌会誌, 53: 821—832, 1977.
- 7) S. Aonuma, Y. Kohama, Y. Komiyama, S. Fujimoto and M. Nomura: Amino acid sequence of an active fragment, Fr. AA-1 of salivary gland hormone. Chem. Pharm. Bull., 28: 417—423, 1980.
- 8) 青沼 繁, 小宮山豊: 唾液腺ホルモン。ホルモンと臨床, 28: 増刊号, 311—316, 1980.
- 9) 伊藤四十二, 青沼 繁, 條田雅人: 顎下腺の研究: 顎下腺と睾丸の關係に就いて。内分泌, 1: 79—88, 1954.
- 10) Y. Ito: A salivary gland hormone. Ann. N.Y. Acad. Sci., 85: 228—310, 1960.
- 11) Y. Kohama, Y. Komiyama and S. Aonuma: Chemistry of salivary gland hormone. Adv. Physiol. Sci., 28: 271—276, 1981.
- 12) M. Shikita, H. Kakizaki and B. Tamaoki: The pathway of formation of testosterone from 3β -hydroxypregn-5-en-20-one by rat testicular microsomes. Steroids, 4: 521—531, 1964.
- 13) 志田圭三: アンドロゲン。ホルモンと臨床, 28: 増刊号, 222—237, 1980.
- 14) T. Yanaihara and P. Troen: Studies of the human testis. I. Biosynthetic pathways for androgen formation in human testicular tissue in vitro. J. Clin. Endocrinol. Metab., 34: 783—792, 1972.

(受付日: 58, 6, 10)