中枢における estrogen 生成の証明とその酵素の性状

群馬大学医学部泌尿器科学教室

主任: 山 中 英 寿 教授

竹 沢 豊, 深 堀 能 立

帝国臓器製薬薬理研究部

本 間 誠次郎

Estrogen Formation in the Central Nervous System and Characteristics of Aromatase of Rat Hypothalamus

Yutaka TAKEZAWA and Yoshitatsu FUKABORI

Department of Urology, Gunma University School of Medicine, Maebashi, Japan

Seijirou HONMA

Pharmacological Research Department, Teikoku Hormone Mfg. Co. Ltd., Kawasaki, Japan

Estrogen formation from androst-4-ene-3,17-dione and its kinetics were studied using microsomes from rat hypothalamus. [4- ^{14}C] androst-4-ene-3,17-dione and a homogenate of rat hypothalamus were incubated in the presence of NADPH at 37°C for 3 hrs. The estrogen fraction was extracted from the incubation mixture with ethyl acetate, purified by column chromatography on Sephadex LH-20 and Bond Elut C18, and separated into estrone and estradiol fractions by HPLC. In analysis of the trimethylsilyl (TMS) derivatives of each fraction by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), the molecular ion peak of the estrone fraction appeared at m/z 344, within 2 amu of that for the TMS derivative of natural estrone. The retention time of the estrone fraction derivative was 11.6 min, the same as that of natural estrone. ^{14}C -estrone was thus concluded to be biosynthesized from [4- ^{14}C]-androst-4-ene-3,17-dione in rat hypothalamus.

The kinetics of the aromatase of rat hypothalamic tissue was studied by measuring $^3\text{H}_2\text{O}$ released from [1 β - ^3H]-androst-4-ene-3,17-dione and estrone as the estrogen product by measured gas chromatography selected ion monitoring (GC-SIM). High correlation was found between $^3\text{H}_2\text{O}$ release and estrone measured by GC-SIM ($r=0.97$). Aromatase activity was linear with respect to incubation time and quantity of tissue. K_m and V_{max} were 30.3nM and 7.98fmol estrogen/h/mg of wet tissue, respectively.

4-hydroxyandrostenedione (4-OH-A) suppressed the activity of aromatase in both rat hypothalamic and human placental tissue in a concentration-dependent manner. Polyclonal IgG to human placental aromatase also suppressed aromatase activity of human placental tissue, but only slightly suppressed that of rat hypothalamus. The molecular structure of aromatase in rat hypothalamus was thus concluded to differ from that in human placenta.

緒 言

Naftolin ら²⁰⁾による中枢の aromatase 発見以来, 中枢の性分化, あるいは性行動に中枢の aromatase により androgen から生成された estrogen が重要な役割を演じていると考えられている³⁾¹⁵⁾²⁹⁾。中枢の aromatase については, 組織内分布, 性差, 年齢的推移等の研究がなされ, その生理的意義, および制御機構についても多くの解明がなされてきている⁷⁾²³⁾²⁴⁾²⁵⁾³⁰⁾³¹⁾。一方, 視床下部, 下垂体においては 5α -reductase 活性の存在も知られており¹⁹⁾²⁹⁾³⁴⁾, その 5α 還元型 androgen の代謝経路については Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) による詳細な解析が行われている⁹⁾¹⁰⁾。しかし, 中枢における aromatization については放射性化合物を用いた検討はなされているが, GC-MS による解析はなされていない。筆者らは中枢で生成された estrogen について GC-MS で検討すると同時に, 更に中枢 aromatase の性状について酵素学的な検討とヒト胎盤 aromatase 抗体, aromatase 阻害剤を用いた検討も行ったので報告する。

実験材料と方法

(1) 実験動物

室内にて一定の明暗条件 (明:12時間 暗:12時間), 恒温 ($22\pm1^{\circ}\text{C}$) 下で飼育した雄性 Wistar 系ラットを使用した。

(2) 標識ステロイドおよび試薬

[4- ^{14}C] -androst-4-ene-3, 17-dione (A- ^{14}C , 比放射能56mCi/mmol) 及び [1 β - ^3H] -androst-4-ene-3, 17-dione (A- ^3H , 比放射能25.4Ci/mmol) は New England Nuclear Research Product (Boston, M.A, U.S.A) から購入した。重水素標識化合物 [2, 4, 6, 7, 16, 16- $^2\text{H}_6$] estrone (E₁-d₆, d₀0%, d₁0%, d₂0%, d₃0%, d₄2.3%, d₅4.1%, d₆82%, d₇8%, d₈3.5%) 及び, [2, 4, 6, 7, 16, 16- $^2\text{H}_6$] estradiol (E₂-d₆, d₀0%, d₁0%, d₂0%, d₃0%, d₄2.3%, d₅4.0%, d₆87%, d₇4.3%, d₈3%) は帝京大学, 神戸川明助教授より提供を受けた。N, 0-Bis (trimethylsilyl) acetamide (TMS-BA), *tert*-buthyldimethyl silylimidazol (*t*-BDMSi) および *tert*-buthyldimethylchloro silane (*t*-BDMCS) は東京化成より購入した。4-hydroxyandrostenedione (4-OH-A) は帝国臓器で合成した。Bond Elut C18 (3ml 用, 6ml 用) 及び CN (3ml 用) ディスパーザブルカラムは Analytichem International (USA) から購入した。Sephadex LH-20 及び還元型 Nicotin Adenine Dinucleocid Phosphate (NADPH) は, それぞれ Pharmacia 社及び Sigma 社より購入した。aromatase 抗体は Buffalo 医学財団, 大沢由男博士より供与された抗ヒト胎盤 aromatase ポリクロナールIgG を用いた。

HPLC 用の溶媒は市販の HPLC 用, その他の溶媒はすべて市販の特級を用いた。

(3) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

装置は日立655A-11でカラムは YMC-Pack-A-302 (5 μm , 250 $\times$ 6mm I.D.) を用いた。移動相はアセトニトリル/ H_2O (50:50) で, 流量及び注入量はそれぞれ1.0ml/mm, 50 μl で行った。検出波長は280nmで行った。

(4) Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

装置はデータ処理付き日立 M2000を用いた。カラムはコーティングしたキャピラリーカラム (25m $\times$ 0.2mm I.D.) でスリットインターフェースからイオン源にセットした。カラム温度は

180℃にセットし240℃まで5℃/min で昇温を行った。エレクトロンインパクトマススペクトルは70eV でその時のイオン源の温度は200℃である。

(5) 誘導体形成

(a) trimethylsilyl (TMS) 化

標準物質及び精製した検体に25% TMS-BA-アセトニトリル溶液50 μ l を加え、室温に1夜放置した。

(b) *tert*-buthyldimethylsilyl (*t*-BDMS) 化

標準物質及び精製した検体に *t*-BDMSi 50 μ l 及び、1.5% *t*-BDMCS-アセトニトリル溶液50 μ l を加え、37℃で24時間放置した。反応液を窒素ガス気流下で濃縮してから50%ヘキサン-ベンゼン250 μ l で希釈した。次いで予め、50%ヘキサン-ベンゼン10ml で洗浄しておいた Bond Elut CN カラムに、上述のサンプルをチャージした。更にサンプルを同溶媒250 μ l にて洗い、カラムにチャージした。次いで同溶媒250 μ l でカラムを洗った後、同溶媒0.5ml で目的物を溶出し、溶媒を留去した。これをアセトンに溶解後、GC-MS サンプルとした。

(6) Gas Chromatography-Mass Spectrometry による測定

(a) Mass Chromatography による測定

キャピラリーカラムはヒューレットパッカードウルトラ-1 (0.25mm $\times$ 25m), カラム温度は180℃から240℃まで毎分10℃, 240℃から290℃まで毎分5℃の昇温で行った。試料を前述の方法でTMS 誘導体化した後、直接 GC-MS に注入した。

(b) Gas Chromatography-Selected Ion Monitoring (GC-SIM) による estrogen の定量

キャピラリーカラムは HP-1 (0.2mm $\times$ 5M) でカラム温度は120℃から280℃まで毎分30℃の昇温とした。モニタリングイオンは estrone の *t*-BDMS 誘導体の分子イオンである m/z 384 と内部標準物質 (E_1 - d_6) の m/z 390 を用いた。それぞれのイオンのピーク面積を求め後述の検量線に合わせ試料中の estrone 量を産出した。検量線の作成は estrone 50, 100, 500, 1000pg をそれぞれ試験管にとりその中に内部標準物質の E_1 - d_6 1ng を加えた後、前述のごとく誘導体化及び精製を行った。得られた精製物をアセトン20 μ l に溶解し、その1-2 μ l を GC-MS に注入した。得られたイオン強度について m/z 384 と m/z 390 のピーク面積比を縦軸に estrone 濃度を横軸にとりコンピューターを用いて検量線を作成した (Fig.6)。

実験 1 視床下部における [4- 14 C] -androst-4-ene-3, 17-dione (A- 14 C) から生成された estrogen の構造解析 (Fig. 1)

(1) インキュベーション法

エーテル麻酔下、ラットを遮血、断頭後、視床下部組織 (全量68g, 700匹相当) を摘出した。得られた視床組織16g に0.1M Tris buffer (pH 7.5) 28ml を加えてテフロンホモゲナイザーでホモゲネートした。これに A- 14 C (7.5 μ g/1.4 μ Ci), NADPH 280mg を加えて37℃で3時間インキュベートした。同様なスケジュールで更に4回インキュベートして得られた視床下部組織全量68g を用いた。

(2) 抽出, 分離, 精製

上記ホモゲネートに1N 塩酸を加えて pH 1 に調節後、4倍量の酢酸エチルで反応物を3回抽出した。5%重曹水、精製水で連続洗浄後、無水 Na_2SO_4 で脱水した後、溶媒を減圧下で留去した。予め、20%メタノール-ベンゼンで膨潤した Sephadex LH-20 を減圧脱気後、カラムクロマトに充填し、20%メタノール:ベンゼン 50ml でカラムを洗浄した。次いで、上記抽出物を同溶媒1ml に溶解し、

5回チャージ（計5ml）後，同溶媒で溶出し5-14mlを estrogen 画分として採取し，溶媒を減圧留去した。得られた油状抽出物をアセトニトリル0.6mlに溶解後，精製水1.4mlを加えて希釈した後，Bond Elut C18カラムで精製した。すなわち，Bond Elut C18（6ml）を予めメタノール15ml，水15mlで順次洗浄後，抽出液をチャージした。更に30%アセトニトリル-H₂O 15mlで洗浄した後，60%アセトニトリル-H₂O 5mlで estrogen 画分を溶出後，溶媒を留去した。10%メタノール-ベンゼンで膨潤した Sephadex LH-20を先に述べた手法でマイクロカラム（2ml）に充填した。Bond Elut カラムで精製した検体を10%メタノール-ベンゼン0.25mlに溶解した後，Sephadex LH-20 カラムにチャージした。同操作を更に2回繰り返し完全にカラムに吸着した後，同溶媒で溶出し1.5～6.5ml 範囲を estrogen 画分として分取，濃縮後，HPLCに付した。相対保持時間12～14分の estrone 溶出画分と相対保持時間9～10分の estradiol 溶出画分をそれぞれ分取した。estrone 画分，estradiol 画分の溶媒を留去後，真空ポンプで乾燥してから前述の方法で TMS 誘導体とした。次にこの TMS 誘導体の一部を GC-MS に注入した。なお，標準用サンプルとして estrone 50ng を TMS 誘導体として GC-MS に注入した。

Assay Procedure

Fig. 1 Identification of estrogen formation in rat hypothalamus: Assay procedure.

実験 2 視床下部 aromatase の性状

(1) 酵素液の作成

雄性 Wistar 系ラット視床下部30g に3倍量の50mM phosphate buffer (pH 7.5) を加えて, テフロンホモゲナイザーでホモゲネートした。これを9000×g で15分間遠心し, 得られた上清を105000×g で1時間再遠心しマイクロゾームを得た。この画分を50mM phosphate buffer (pH 7.5) 17.6ml で懸濁し, 酵素源とした。

(2) 視床下部 aromatase の kinetics

① 基質濃度-反応速度関係

視床下部組織340mg 相当のマイクロゾーム液200 μ l に, 基質として A- 3 H を100 μ l (12.5-1000 pmol), 補酵素として NADPH (1mg) 250 μ l, および1mM EDTA-100mM KCl 混液100 μ l を添加し, 全量650 μ l として37℃で90分間インキュベートした。

② 反応時間-反応量関係

視床下部組織340mg 相当のマイクロゾーム溶液200 μ l に基質として A- 3 H を100 μ l (50pmol), 補酵素として NADPH (1mg) 250 μ l, および1mM EDTA-100mM KCl 混液100 μ l を添加して全量650 μ l として, 37℃で5-120分間インキュベートした。

③ 酵素量-反応量関係

視床下部組織85-1700mg 相当のマイクロゾーム溶液200 μ l に, 基質として A- 3 H を100 μ l (50pmol), 補酵素として NADPH (1mg) 250 μ l, および1mM EDTA-100mM KCl 混液100 μ l を添加し, 全量650 μ l として37℃で90分間インキュベートした。

Fig. 2 HPLC profiles, UV absorption and ^{14}C radio activity of each fraction. 1=estradiol, 2=estrone.

(3) aromatase 活性の測定

① 1β -脱離トリチウム水による aromatase 活性の定量法 ($^3\text{H}_2\text{O}$ 法)

A- ^3H を基質としてインキュベート後、直ちに氷水中で冷却し、クロロホルム4ml及び、蒸留水1mlを加えて振後、2000×rpm 10分間遠心した。水層を取り、冷却下で粉末活性炭約50mgを加え振盪した後、2000×rpm, 10分間で冷却遠心した。水層より0.5mlをとりシンチレーターを加えて ^3H の放射活性を測定した。NADPH 無添加のものをブランクとして生成した $^3\text{H}_2\text{O}$ 量から estrogen のモル数を求めた。

Fig. 3 Mass spectrum of TMS derivatives of estrone fraction.

Fig. 4 Mass chromatogram of TMS derivatives of estrone fraction.

② GC-MS による estrone の定量

① のクロロホルム層を分取し内部標準物質として E_1 - d_6 500pg, E_2 - d_6 500pg を加え, 5%重曹水及び精製水で洗浄し, 無水 Na_2SO_4 で脱水後, 溶媒を減圧留去した。Sephadex LH-20 を予め10%メタノール-ベンゼンで1日放置して膨潤した後, 減圧脱気してツベルクリン筒に充填してマイクロカラム (2ml) を作成した。抽出物を10%ベンゼン-メタノール 0.25ml に溶解しカラムにチャージした。同様な操作を更に2回繰り返して, 抽出物を完全にカラムにチャージ後, 同溶液で溶出し, 1.5~6.5ml を estrogen 分画として採取し, その溶媒を窒素で留去した。これに t -BDMSi, t -BDMCS を加えて誘導体化後, GC-MS に注入した。

(4) aromatase 抗体および aromatase 阻害剤 (4-OH-A) による aromatase の抑制

視床下部組織1.5g 相当のマイクロゾームを20mM phosphate buffer 1ml に懸濁し, 酵素液とした。この酵素液 250 μ l に20mM EDTA 200 μ l, 1mM KCl 100 μ l, NADPH 1mg, A - 3H (1 μ Ci) および 4-OH-A を加え全量750 μ l (4-OH-A : 0.007-0.7 μ M) とし37℃で, 60分間インキュベートした。上記と同じ条件で4-OH-A のかわりにヒト胎盤 aromatase 抗体 (10-200 μ g) を加え, 全量750 μ l とし37℃で, 60分間インキュベートした。4-OH-A, および aromatase 抗体を加えないコントロールの aromatase 活性を100%として各濃度における aromatase 活性を求めた。なお, aromatase 活性の測定は 3H_2O 法で行った。また対照としてヒト胎盤 aromatase の抑制についても検討した。ヒト胎盤組織50mg 相当のマイクロゾームを20mM Tris buffer 200 μ l に懸濁し, 酵素液とした。この酵素液200 μ l に20mM EDTA 200 μ l, 1mM KCl 200 μ l, NADPH 1mg, A - 3H (1 μ Ci) および4-OH-A を加え全量900 μ l (4-OH-A : 0.27-11.1 μ M) とし37℃で15分間インキュベートした。上記とおなじ条件で4-OH-A のかわりにヒト胎盤 aromatase 抗体 (10-200 μ g) を加え全量900 μ l とし37℃で15分間インキュベートした。aromatase 活性は視床下部 aromatase と同様に計算した。

結 果

実験 1 視床下部で [4- ^{14}C] -androst-4-ene-3, 17-dione (A - ^{14}C) から生成された estrogen の構造解析

視床下部組織において, A - ^{14}C より生成された代謝物の TMS 誘導体の Mass Spectrum (MS) パターンを Fig.3に, Mass Chromatogram (MC) を Fig.4にそれぞれ示す。また標準品の estrone の TMS 誘導体の MS パターン Fig.5に示した。estrone の分子イオンピークは m/z 342。芳香核を有した特徴的な解裂イオンが m/z 244および257に認められた。代謝物の分子イオンピーク及び特徴的な解裂イオンは estrone よりも2質量数多い m/z 344, 259及び246に観察された。それぞれの分子イオンの MC では, いずれも相対保持時間 (RT) は, 11.6分で一致した。これらの結果より, 視床下部で A - ^{14}C より生成された estrogen の主化合物は [4- ^{14}C] -estrone であると結論した。また, 視床下部より単離した代謝物の TMS 誘導体の分子イオンピーク m/z 344と estrone の TMS 誘導体の分子イオンピーク m/z 342の MC の結果より (Fig.4), 視床下部組織には内因性 estrone が約10%が含まれていた。estradiol は不純物の干渉を受け GC-MS で同定できなかった。

実験 2 視床下部 estrone の性状

(1) K_m と生成物の確認

3H_2O の生成量 (総 estrogen 生成量) から求めたラット視床下部中の aromatase 活性と, 基質濃度の関係を Fig.7に示す。Lineweaver-Burk のプロットより求めた K_m および V_{max} は, それぞれは30.3nM, 7.98fmol estrogen/h/mg wet tissue であった。

また, aromatase 活性について, $^3\text{H}_2\text{O}$ の生成量から求めた estrogen 値と GC-MS で定量した estrone 値との間には良好な相関が認められた (Fig.8)。

Fig. 5 Mass spectrum of TMS derivatives of estrone.

E 1 384/390 IS= 1 NG

SLOPE : 6.788X10E-1 INTERCEPT : 3.692X10E-2

STD.DEV.X : 3.586X10E-2 STD.DEV.Y : 2.435X10E-2

COR.COEF. : 9.983X10E-1

HEIGH(RAT 10)

Fig. 6 Standard curve of estrone.

Fig. 7 Aromatase activity in rat hypothalamic tissues as a function of substrate concentration. Inset, Lineweaver-Burk plot of initial velocity of $^3\text{H}_2\text{O}$ release vs concentration of androstenedione.

Fig. 8 Correlation of $^3\text{H}_2\text{O}$ release and quantity of estrone measured by GC-SIM. $Y = 0.87X - 0.57$, $r = 0.98$, $p < 0.005$.

(2) 酵素量とインキュベーション時間

ラット視床下部の aromatase 活性は90分まではほぼ直線的に増加した。また酵素量（視床下部組織量）を増加させると750mg/湿重量まではほぼ直線的に増加した (Fig.9)。

(3) aromatase 抗体, aromatase 阻害剤による aromatase 活性阻害効果

4-OH-A はラット視床下部及びヒト胎盤の aromatase をともに抑制した。しかし、ヒト胎盤 aromatase 抗体は、ヒト胎盤 aromatase 活性を抑制したが、ラット視床下部 aromatase をほとんど抑制しなかった (Fig.10)。

Fig. 9 Aromatase activity as a function of quantity of hypothalamic tissue and time.

Fig. 10 Inhibition rate of aromatase activity in rat hypothalamic and human placental tissue by 4-OH-A (a) and anti-aromatase IgG of human placenta (b).

○: Aromatase activity in rat hypothalamus, ▲: Aromatase activity in human placenta.

考 察

筆者らは中枢の aromatase が androstenedione を基質とした時どのような estrogen を生成するかについて GC-MS を用いて検討した。aromatase 活性は視床下部、視索前野において高いことが知られている²³⁾のでそれらの組織を酵素源とした。目的物の生成が極微であることが予想されたため、大量の組織（ラット700匹相当）と多量の基質を用いた。また、内因性の estrogen と外因性の androgen から生成された estrogen を区別するため重水素あるいはキャリアフリーの¹⁴C体を

基質に選ぶ必要があった。生体内の夾雑物が多い割に目的物が極微であることより、各種のクロマトを組み合せ念入りに精製した。各クロマト操作毎に目的物の量比を確認すると同時に GC-MS でも解析するために鎚木ら⁹⁾¹⁰⁾の手法と同様に基質として A-¹⁴C を選んだ。インキュベートから得られた estrogen の GC の保持時間は天然の estrogen の TMS 誘導体に一致し、その分子イオンピークが M/z 344 に、他の特徴的な開裂イオンが M/Z 246 および 259 にそれぞれ認められた。いずれのイオンも天然の estrone のそれよりも 2 質量数多かった。この結果より単離した化合物が A-¹⁴C 由来の estrone であると結論した。

視床下部のインキュベート液から単離した estrone 画分の Mass Chromatography のパターンから内因性 estrone と A-¹⁴C 由来の estrone の量比を M/Z 344 と M/Z 342 のピーク面積から比較すると、視床下部組織中に天然の estrone が 10% 存在していた。estradiol が生成したかどうかについては微量でありかつ不純物の干渉を受け GC-MS による構造確認はできなかった。しかし、HPLC で estradiol 画分の ¹⁴C 量の存在量を推定すると estrone 画分の約 10% であった (Fig.3)。

Clark⁴⁾らはサル視床下部を用いて androstene-3, 17-dione とインキュベートした時に生成した主な estrogen は estrone であることを再結晶法で証明した。同様な知見がハムスター²¹⁾およびラット⁷⁾²³⁾²⁴⁾²⁵⁾の視床下部でも確認されているが、機器分析を用いて中枢の estrogen の生成物を解析したのは著者らがはじめてである。

一方、去勢した雄雌サルに ³H-testosterone を投与し、脳の各部位の抽出物を HPLC で分離、精製すると estradiol が主に生成され、それらは視床下部、辺縁部位に最も多く分布していることが組織オートラジオグラムで確認されている¹⁶⁾¹⁷⁾。

aromatase 活性の定量は RIA 法⁸⁾、比色法²⁷⁾等でなされてきたが、操作が繁雑で微量組織中の酵素活性の定量には応用できない。そこで現在では androgen から estrogen の生合成過程中、1 β 位の水素が脱離することを応用して、[1 β -³H]-androstenedione を基質にし遊離した ³H₂O を定量するいわゆる ³H₂O 法が開発された¹⁾。この方法は極めて簡便でかつ高感度のため中枢⁷⁾²³⁾²⁴⁾²⁵⁾³⁰⁾³¹⁾、前立腺¹¹⁾、精巣⁸⁾及び脂肪中³³⁾の微量な aromatase 活性の定量に用いられている。中枢 aromatase 活性の定量には、³H₂O 法が専ら用いられ酵素の組織内分布、加齢に伴う活性の変化等について検討されている⁷⁾²³⁾²⁴⁾²⁵⁾³⁰⁾³¹⁾。酵素活性の定量値の検討に [7 α -³H]-androst-4-ene-3, 17-dione を用いて生成した ³H-estrone 量と ³H₂O 法で得た値とが一致していたことより ³H₂O 法の妥当性を得ている²³⁾。しかし、最近、Michnovics ら¹⁸⁾は 19 メチル基にトリチウムでラベルした androstenedione を用いて aromatase によって生成する ³H₂O と ³H- 蟻酸の生成比が胎盤と中枢で異なることを報告している。これは胎盤の aromatase で estrogen が生成される機序と中枢での機序が異なることを示唆している。また最近 Brodie ら²⁾の一派は A-³H を基質として前立腺でインキュベートするとトリチウムの脱離体の一部は estrogen の生成以外の代謝経路で生じ、³H₂O 法が必ずしも estrogen の生成を反映しないと報告している。そこで筆者らは estrone の生成量と ³H₂O の脱離の相関をキャピラリー GC-SIM 法を用いて検討した。その結果、Fig.8 に示すように両者は良好な相関と直線性を示した。³H₂O 生成量に比し GC-SIM 法による estrone 定量値が若干、低値を示したのは androstenedione を基質としたときに estrone 以外に catechol estrogen, estradiol も生成したためではないかと考えた。GC-SIM 法は GC の保持時間による物質の分離と、質量数による選別を同時に行い、しかも化学的に性質の等しい安定同位体化合物を内部標準物質として用いるため抽出、精製、誘導などの操作による損失を考慮する必要がないなどの同位体希釈法の長所が生か

される、現在最も信頼の高い分析法である³³⁾。このように $^3\text{H}_2\text{O}$ 法による aromatase 活性の定量法が真の estrogen 量を反映することを確認した後、実験2で視床下部 aromatase の K_m を求めると 30.3nM で、サル⁴⁾²⁶⁾、ラット⁷⁾及びハムスター²¹⁾等で報告されている値と一致した。また、組織量、反応時間に対しても線型の増加を示したことから $A-^3\text{H}$ を用いた時に遊離した $^3\text{H}_2\text{O}$ は aromatase の酵素反応により生成したことを示している。

ヒト胎盤中の aromatase は酸化型で 394nm に吸収を有し一酸化炭素存在下で 450nm にシフトすると同時に活性が抑制されることから P-450 の一種であることが知られており、アフィニティカラムを用いた純化¹²⁾²²⁾、あるいは cDNA 配列の決定もなされている⁵⁾。中枢の aromatase の性状については、酵素活性も少なく、かつ不安定のためその物理化学的性状については不明のまま残されている。筆者らは、ヒト胎盤 aromatase 抗体および aromatase 阻害剤を用いてラット中枢(視床下部)とヒト胎盤の aromatase の相違について検討を加えた。aromatase の最も強い阻害剤である 4-OH-A は中枢及び胎盤の aromatase 活性を強く抑制した。4-OH-A の阻害効果はヒト胎盤 aromatase とラット中枢 aromatase で著しく異なるが、これは元来、中枢の aromatase 活性が胎盤に比しはるかに微弱であるためと考えた。ヒト胎盤 aromatase 抗体はラット中枢 aromatase 活性をほとんど抑制しなかった。このことは両者が異なる分子種であることを示唆している。Michnovics ら¹⁸⁾も胎盤由来の aromatase は KCN, SKF-525 等で抑制されるが中枢 aromatase はほとんど抑制されないことを報告し中枢 aromatase と胎盤 aromatase の違いを示唆している。Osawa ら²²⁾はマウスモノクローナル aromatase 抗体はヒト胎盤 aromatase を抑制するが、金魚中枢およびラット卵巢 aromatase は抑制しないこと、家兎ポリクローナル aromatase 抗体はヒト胎盤、およびラット卵巢 aromatase を抑制するが、金魚中枢 aromatase は抑制しないことより aromatase のアイソザイムの存在を示している。筆者らの実験では中枢と胎盤の aromatase の違いが種特異性によるか臓器特異性によるかは明らかにできなかった。しかし、免疫学、生化学及び遺伝子学的手法により副腎¹³⁾、及び肝臓中⁶⁾の P-450 の構造が明らかにされ、その作用の違いも報告されてきた。近い将来 aromatase についても種族間、臓器間の違いが分子レベルで明らかにされるであろう。

中枢の性分化、及び性行動には中枢において生成された estrogen が重要な役割を演じていると考えられている³⁾¹⁵⁾²⁹⁾。特に Naftolin ら²⁰⁾により脳内に aromatase 活性の存在することが見いだされて以来その役割について注目されてきた。

脳内で生成された estrogen は estrogen receptor と結合して核内に転移してその作用をあらわすとされている¹⁵⁾。Schlinger ら²⁸⁾は、うずらを用いた実験で攻撃行動と核内(結合型) estrogen receptor に相関があり aromatase は receptor に結合可能な estradiol 量を調節することで個体の testosterone に対する反応行動を制御していると述べている。

また高橋ら³⁰⁾³¹⁾はラット視床下部 aromatase の生理的意義、制御機構について検討を行い視床下部 aromatase は中枢性分化臨界時期に雄性性分化の促進に深く関与し、通常は性腺由来の androgen に制御されているが、外因性の androgen や progesterone 及びその誘導体によってもその活性は上昇すると報告している。

aromatase 活性、estrogen receptor は中枢において視床下部、視索前野に最も多いが、皮質にも低濃度であるが存在しており⁴⁾⁷⁾¹⁴⁾、脳内で局所的に生成された estrogen が大脳皮質の成熟にも関与していることが示唆されている¹⁴⁾。以上のように中枢において aromatase により生成された

estrogen の生理的意義については種々の解明がなされつつある。

今後は中枢での aromatase の調節機序, 作用機序について細胞内レベル, 分子レベル明らかにされることが期待される。

結 語

- 1) 中枢における estrogen の生成を GC-MS を用いて証明した。
- 2) 中枢における estrogen の生成は酵素反応によってなされる。また, その K_m , V_{max} はそれぞれ 30.3 nM , $7.98 \text{ fmol estrogen/h/mg wet tissue}$ であった。
- 3) ラット中枢 aromatase 活性の定量において $^3\text{H}_2\text{O}$ 法による $^3\text{H}_2\text{O}$ 生成量と GC-SIM 法により定量した estrone 値との間には良好な相関を認めた。
- 4) aromatase 阻害剤および抗ヒト胎盤 aromatase 抗体による検討より, ラット中枢 aromatase とヒト胎盤 aromatase とは異なる分子種であることが示唆された。

本論文の要旨は第62回日本内分泌学会学術総会及び第8回日本アンドロロジー学術大会に発表した。

稿を終えるに臨み, 終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました群馬大学医学部泌尿器科学教室山中英寿教授に深謝致します。

文 献

- 1) Bellio F.L. and Osawa Y.: Localization of estrogen synthesis in the chorionic villus function after homogenization of human term placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 44: 699–707, 1977.
- 2) Brodie A.M.H., Son C., King D.A., Meyer K.M. and Inkster S.E.: Lack of evidence for aromatase in human prostatic tissues: Effects of 4-hydroxyandrostenedione and other inhibitors on androgen metabolism. *Cancer Research*, 49: 6551–6555, 1989.
- 3) Callard G.W.: Androgen and Estrogen action in vertebrate brain. *Am. Zool.*, 23: 607–620, 1983.
- 4) Clark A.S., MacLusky N.J. and Goldman-Raric P.S.: Androgen binding and metabolism in the cerebral cortex of the developing rhesus monkey. *Endocrinology*, 123: 932–940, 1988.
- 5) Corbin C.J., Graham-Lorence S., McPaul M., Mason J.I., Mendelson C.R. and Simpson E.R.: Isolation of a full-length cDNA insert encoding human aromatase system cytochrome P-450 and its expression in nonsteroidogenic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85: 8949–8952, 1988.
- 6) Fujii-Kuriyama Y., Kimura H., Higashi Y., Sogawa K., Shimizu T., Hatano M. and Gotoh O.: Molecular similarity and diversity of cytochrome P-450 molecules. *Xenobiotic Metabolism and Disposition*: p.11–19, Taylor & Francis, London, New York, Philadelphia, 1989.
- 7) George F.W. and Ojeda S.R.: Change in aromatase activity in the rat brain during embryonic, neonatal, and infantile development. *Endocrinology*, 111: 522–529, 1982.
- 8) Gore-Langton R., McKercher H. and Dorrington J.: An alternative method for the study of follicle stimulating hormone effect on aromatase activity in Sertoli cell cultures. *Endocrinology*, 107: 464–471, 1980.
- 9) 鎗木 豊, 深堀能立,

- 高橋悦子, 山中英寿, 本間誠次郎, 山口 隆, 森 弘, 神戸川明: 中枢における testosterone の代謝物の GC-MS による構造解析と testosterone 代謝酵素の細胞内局在. 日内分泌会誌, 60: 1314-1327, 1984.
- 10) 鎗木 豊: 視床下部, 下垂体におけるアンドロゲンの代謝機構: 北関東医学, 35: 143-152, 1985.
- 11) Kaburagi Y., Marino M.B., Kirdani R.Y., Greco J.P., Karr J.P. and Sandberg A.A.: The possibility of aromatization in human prostate. *J. Steroid Biochem.*, 26: 739-742, 1987.
- 12) Kellis J.T.Jr. and Vickery L.E.: Purification and characterization of human placental aromatase cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.*, 262: 4413-4420, 1987.
- 13) Lindberg R.L.P. and Negishi M.: Alteration of mouse cytochrome P-450c₁₇ substrate specificity by mutation of a single amino-acid residue. *Nature*, 339: 632-634, 1989.
- 14) MacLusky N.J., Naftolin F. and Goldman-Rakic P.S.: Estrogen formation and binding in the cerebral cortex of the developing rhesus monkey. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83: 513-516, 1986.
- 15) McEwen B.S., Bugeon A., Davis P.G., Krey L.C., Levine V.N., McGrinis M.Y., Paden C.M. and Rainbow T.C.: Steroid hormones: Humoral signal which alter brain cells properties and functions. *Recent Prog. Horm. Res.*, 30: 41-92, 1983.
- 16) Michael R.P., Bonsall R.W. and Rees H.D.: The nuclear accumulation of [³H]Testosterone and [³H]Estradiol in the brain of the female primate: Evidence for the aromatization hypothesis. *Endocrinology*, 118: 1935-1944, 1986.
- 17) Michael R.P., Bonsall R.W. and Rees H.D.: Site at which testosterone may act as an estrogen in the brain of the male primate. *Neuroendocrinology*, 46: 511-521, 1987.
- 18) Michnovics J.J., Hahn E.F. and Fishman J.: 19-Hydroxylation and aromatization of androgens in the developing rat brain. *Endocrinology*, 121: 1209-1214, 1987.
- 19) Massa R., Stupnika 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.
- 20) Naftolin F., Ryan K.J., Davies I., J. Reddy V.V., Flores F., Petro Z., Kuhn M., White R.J., Takaoka Y. and Wolin L.: The formation of estrogens by central neuroendocrine tissues. *Recent Prog. Horm. Res.*, 31: 295-316, 1975.
- 21) Negri-Cesi P., Celotti F. and Martini L.: Androgen metabolism in the male hamster-2. Aromatization of androstenedione in the hypothalamus and in the cerebral cortex; Kinetic parameters and effect of exposure to different photoperiod. *J. Steroid Biochem.*, 32: 65-70, 1989.
- 22) Osawa Y., Yoshida N., Fronckowiak M. and Kitawaki J.: Immunoaffinity purification of aromatase cytochrome P-450 from human placenta microsomes, metabolic switching from aromatization to 1 β and 2 β -monohydroxylation, and recognition of aromatase isozymes. *Steroid*, 50: 11-28, 1987.
- 23) Roselli E.R., Ellinwood W.E. and Resco J.A.: Regulation of brain aromatase activity in rats. *Endocrinology*, 114: 192-200, 1984.
- 24) Roselli C.E., Horton L.E. and Resco J.A.: Distribution and regulation of aromatase activity in the rat hypothalamus and limbic system. *Endocrinology*, 117: 2471-2477, 1985.
- 25) Roselli C.E., Kaler L.W. and Resco J.A.: Hypothalamic aromatase activity in young and old male rats.

- Neurobiology of aging, 7: 121-125, 1986. 26) Roselli C.E. and Resmo J.A.: Effect of gonadectomy and androgen treatment on aromatase activity in the fetal monkey brain. *Biology of Reproduction*, 35: 106-112, 1986. 27) Ryan K.J.: Biological aromatization of steroid. *J. Biol. Chem.*, 234: 268-272, 1959. 28) Schlinger B.A. and Callard V.G.: Estrogen receptors in Quail brain: Relationship to aromatase and aggressiveness. *Biology of Reproduction*, 40: 268-275, 1989. 29) Tobet S.A., Shim J.H., Osiechi S.T., Barm M.T. and Canick J.A.: Androgen aromatization and 5α reduction in ferret brain during perinatal development: Effect of sex and testosterone manipulation. *Endocrinol.*, 116: 1869-1877, 1985. 30) 高橋康男, 深堀能立, 鎗木豊, 山中英寿, 神戸川明, 本間誠次郎: 中枢内 aromatase 活性の制御機構 (第1報) 視床下部 aromatase 活性の androgen 投与による影響, *日内分泌会誌*, 62: 1212-1221, 1986. 31) 高橋康男, 山中英寿, 本間誠次郎: 中枢内 aromatase の制御機構 (第2報); 中枢内 aromatase 活性の加齢による変動及び aromatase の脳内分布について. *日内分泌会誌*, 63: 862-869, 1987. 32) 高橋康男, 清水嘉門, 今井強一, 三木正也, 猿木和久, 山中英寿: 肥満と前立腺肥大症, 血中 estrogen 濃度, および脂肪組織の estrogen 合成能との関係, *日泌尿会誌*, 79: 302-308, 1988. 33) 土屋正彦, 大橋 守, 上野民夫編: 医学, 薬学への応用 質量分析法の新しい展開. 現代化学増刊, 15: 160-194, 東京化学同人. 34) Verhovev G., Lamberig G. and Moor P.P.: Nucleus associated steroid 5α -reductase activity and androgen responsiveness. A study in various organs and brain regions of rat. *J. Steroid Biochem.*, 5: 93-100, 1974.

(受付日: '90. 4. 23)

(採択日: '90. 9. 20)