酢酸鉛投与ラット肝における Steroid 5 β -Reductase の活性について

Steroid 5 β -Reductase Activity in the Livers of Rats administered with Lead Acetate

北海道大学医学部衛生学教室

富田 勤・斎藤 和雄・高桑 栄松

Tsutomu Tomita, Kazuo Saito and Eimatsu Takakuwa

Department of Hygiene and Preventive Medicine, Hokkaido University School of Medicine, Sapporo

The increase of urinary δ -aminolevulinic acid in lead poisoning is well observed. In this paper, the effects of lead acetate on the activities of 4 α -reductase and 5 β -reductase to cortisol, cortisone, testosterone and 4 α -androstene-3, 17-dione and of dehydrogenase to 3 α -hydroxysteroid and 3 β -hydroxysteroid were examined. To measure the activities, 12,000 $\times$ g and 105,000 $\times$ g supernatant of rat liver were used.

The 4 α -reductase activity to cortisol and testosterone showed a significant decrease twenty-four hours after the administration of lead acetate, but that to testosterone showed a remarkable increase seventy-two hours after the administration of lead acetate.

The 5 β -reductase activity to testosterone decreased significantly twenty-four hours after the administration of lead acetate, but increased seventy-two hours after administration of lead acetate. No significant difference was found in 4 α -androstene-3, 17-dione.

From these results, it was suggested that steroid 5 β -reductase activity was an important factor in affecting the heme synthesis in lead poisoning.

I. 序

近年ポルフィリンの代謝過程が酵素学的に明らかにされるにつれ、鉛中毒において、ポルフィリン前駆物質である δ -aminolevulinic acid (ALA と略す), porphobilinogen (PBG と略す) の尿中排泄が増加し、特に ALA の増加¹⁾ が鉛中毒における代謝異常を早期に表現するものとして、注目されるようになった。この ALA を生成する酵素が δ -aminolevulinic acid synthetase (ALA-S と略す) であり、ポルフィリン生合成の最初の段階を触媒する律速酵素である。

Granick ら^{2,3)} は ALA-S の誘導を試み、動物でのポルフィリン合成は、主としてこの ALA-S 活性の変動により調節されていると報告している。すなわち、動物に AIA (allylisopropylacetamide) あるいは DDC (3, 5-dicarboxy-1, 4-dehydrocollidine) などの薬物を投与する実験で、薬物ポルフィリン症が生じるが、この理由は

薬物によって肝臓の ALA-S が急速に誘導生成され、酵素量が増加するため起こるものと言われている。また、ニワトリの胚肝の組織培養法⁴⁾ により、従来 non-functional と考えられていたステロイド代謝産物のうちのあるものが強力に ALA-S の誘導作用を示すことが知られている。すなわち、4 α -3-ケトンをも有する testosterone, progesterone, 11 β -hydroxy-progesterone などの化合物は、ほとんど ALA-S の誘導作用を示さないが、4 α -reductase により一部変換された 5 β 位に水素をも有する etiocholanolone, pregnanolone, 11-keto-pregnanolone などの化合物は、強力な誘導作用を示すと言われている。従って、5 β 型ステロイドは生体内のヘム合成系においても、ALA-S の誘導作用を示すことが考えられることから、5 β 型ステロイド生成を調節する 5 β -reductase 活性の変動が ALA-S 活性に影響を与えることが推測される。

鉛投与によるヘム合成系の障害機構に関しては詳細に

検討されつつあるが、尿中 ALA 量の増加の作用機序については未解決の点も多く、また ALA-S 活性と Δ^4 -reductase および 5β -reductase 活性との関連について論じた報告は見られない。

今回は、まず Δ^4 -reductase および 5β -reductase 活性に対する鉛の影響を明らかにするため、基質として体内に存在するステロイドホルモンを選び、正常ラット肝と鉛投与ラット肝とで比較検討したので報告する。

II. 実験方法

1. 実験動物および投与方法

実験動物としては、ウィスター系雄性ラット (体重 200~250 g) 36匹を使用し、対照群、鉛投与24時間群、鉛投与72時間群の3群に分け、鉛投与群には酢酸鉛水溶液 (1 ml/体重 100 g) を動物の腹腔内に1回あるいは24時間毎に3回投与した。酢酸鉛水溶液は、酢酸鉛 ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) を 10 mg/ml の割合で精製水に溶かし、調製した。対照群には、精製水 (1 ml/体重 100 g) を投与した。動物は、それぞれ24時間、72時間後にと殺して肝臓を摘出し、4℃の0.25 M 蔗糖溶液で洗浄した。

2. steroid Δ^4 -reductase 活性の測定方法

肝臓に0.25 M 蔗糖溶液を加え、20% ホモジネート溶液とし、この12,000×g 上清を酵素溶液として使用した。

反応条件は、Tomkins⁵⁾、Matsui ら⁶⁾の方法に準じ、基質 (8.4×10^{-7} moles) のエタノール溶液 0.1 ml に G-6-PDH (7 units), NADP (3.6×10^{-6} moles), G-6-PN₂ (3.3×10^{-5} moles) を含む 0.2 M tris-HCl buffer, pH 7.2, 5.9 ml を加え、さらに酵素溶液 0.5 ml を加え、この溶液を2等分し、一方を対照溶液とし、他方を37℃にて10分間振盪した。反応を終結させるためには反応混合物に dichloromethane (CH_2Cl_2), 4.0 ml を加え、充分に拌攪した。この反応終結溶液に水 4.0 ml を加え、充分に抽出操作を行ない、上層 (水層) と下層 (CH_2Cl_2 層) に分離した。この上層をさらに CH_2Cl_2 で抽出し、 CH_2Cl_2 層と先の下層とを合せ、10 ml の CH_2Cl_2 溶液とした。この溶液を分光光度計 240 m μ の波長で測定し、対照溶液と反応溶液との吸光度の差をその酵素の活性とした。活性値はすべて蛋白量 mg に対して反応したステロイド量で示した。

基質には、生体内に存在する次の化合物を合成あるいは精製して用いた。すなわち、cortisol(I), cortisone(II), testosterone(IIIa), Δ^4 -androstene-3, 17-dione(IVa) である (Fig. 1)。

Fig. 1 Metabolic Pathways of Substrates

3. testosterone 5α -reductase および 5β -reductase 活性の測定方法

Δ^4 -reductase 活性は 5α -reductase と 5β -reductase 活性の和であることから、testosterone の代謝産物である 5α 体 (IIIb)⁷⁾ および 5β 体 (IIIc)⁸⁾ の生成比を求め、それぞれ 5α -reductase および 5β -reductase 活性値に換算した。なお、生成比の測定は、代謝産物をシリカゲルの薄層クロマトグラフィー (展開溶媒: ethylacetate-cyclohexane(1:1)) を用いて分離し、薄層自動検出装置を用いて、Fig. 3 に示す様に、それぞれのピーク面積を測定することにより、生成比を求めた。また、 5β -reductase 活性値のみを測定する場合には、105,000×g 上清を酵素溶液とし、その 1.0 ml を用いて、37℃, 20分間振盪した。活性値は蛋白量 mg に対して反応したステロイド量で示した。

4. Δ^4 -androstene-3, 17-dione 5α -reductase および 5β -reductase 活性の測定方法

testosterone(IIIa) の場合と同様に、この代謝産物である 5α 体 (IVb) および 5β 体 (IVc) の生成比から 5α -reductase と 5β -reductase の活性値を求めた。なお、代謝産物は薄層クロマトグラフィーによる分離が不可能であったため、Jones' reagent⁹⁾ による酸化後、ガスクロマトグラフィー (カラム: 1.5% SE-30, 温度: 230℃) を用いて分離し、生成比を求めた。活性値は蛋白量 mg に対して反応したステロイド量で示した。

5. 3α -および 3β -hydroxysteroid dehydrogenase 活性の測定方法

3α -hydroxysteroid dehydrogenase 活性の測定は、Koide¹⁰⁾ の方法に準じ、NAD(10^{-6} moles) を含む 0.1 M phosphate buffer, pH 8.0, 2.7 ml に酵素溶液 (105,000×g 上清) 0.02 ml を加え、15分間、プレインキュベーションした後、androstene(2.0×10^{-7} moles) のメタノール溶液 0.02 ml を加え、340 m μ の波長で反応速度を

測定した。

3 β -hydroxysteroid dehydrogenase 活性の測定は、Marcus ら¹¹⁾の方法に準じ、NAD(10^{-6} moles)を含む0.1 M pyrophosphate buffer, pH 8.9, 2.9 ml に酵素溶液 (105,000 $\times$ g 上清) 0.02 ml を加え、10分間、プレインキュベーションした後、epiandrosterone(4.0×10^{-7} moles)のジオキサン溶液 0.02 ml を加え、340 m μ の波長で反応速度を測定した。活性値は、蛋白量 mg に対する unit で示した。

Ⅲ. 実験結果

1. 肝中の 4⁴-reductase 活性におよぼす酢酸鉛の影響

鉛投与群における cortisol 4⁴-reductase 活性は、対照群に比べ、鉛投与24時間群において約40%の有意の低下を示し ($p<0.10$), 72時間群においては逆に約10%の上昇が認められた。cortisone 4⁴-reductase 活性は、対照群に比べ、24時間群において僅か約7%の低下を示し、72時間群において約17%の上昇が認められたが、何れも有意の変動ではなかった (Table 1)。

鉛投与群における testosterone 4⁴-reductase 活性は、対照群に比べ、鉛投与24時間群において約40%の低下を示し ($p<0.05$), 72時間群において約27%の上昇が認められたが、有意ではなかった。また、4⁴-androstene-3, 17-dione 4⁴-reductase 活性は、対照群に比べ、24時間群において約17%の低下を示し、72時間群において回復の傾向が見られた (Table 1)。

2. 5 α -reductase および 5 β -reductase による testosterone(IIIa) の代謝並びにその活性

testosterone(IIIa) の代謝産物は、対照群および鉛投与24時間群のいずれも、Fig. 2 の薄層クロマトグラムに示すように、同一の生成物を示した。さらに量的関係は、

A : control
B : 24 hours after administration of lead acetate
C : case of excluding testosterone (IIIa) from incubation mixture
developing solvent: ethyl acetate-cyclohexane (1:1)

Fig. 2 Thin-layer Chromatogram of Metabolites obtained by Incubating Testosterone(IIIa)

Fig. 3 Quantitative Thin-layer Chromatogram of Metabolites obtained by Incubating Testosterone(IIIa)

Fig. 3 に示すように、鉛投与群では 5 α 体(IIIb)と 5 β 体(IIIc)の生成が明らかに減少した。

5 α -reductase および 5 β -reductase の活性は、Table 2 に示す様に、対照群に比べ、鉛投与24時間群の場合、いずれも有意の差が認められた ($p<0.05$) が、72 時間群においては、有意の差は認められなかった。しかし、鉛の 3

Table 1. Effect of Lead Acetate on the Activity of 4⁴-Reductase from Rat Liver

substrate	steroid metabolized (10^{-4} m mole)		
	control	Pb administration	
		24 hr after adm.	72 hr after adm.
cortisol (I)	0.0840 $\pm$ 0.0142 (7)	0.0513 $\pm$ 0.0064 (9)*	0.0918 $\pm$ 0.0216 (6)
cortisone (II)	0.1315 $\pm$ 0.0072 (5)	0.1230 $\pm$ 0.0204 (6)	0.1536 $\pm$ 0.0269 (6)
testosterone (IIIa)	0.1756 $\pm$ 0.0263 (6)	0.1058 $\pm$ 0.0095 (6)**	0.2233 $\pm$ 0.0289 (6)
4 ⁴ -androstene-3, 17-dione (IVa)	0.1920 $\pm$ 0.0266 (6)	0.1585 $\pm$ 0.0274 (6)	0.1920 $\pm$ 0.0180 (6)

Remarks: The numbers written in arabic numerals in parentheses show the number of rats. All data are represented by mean $\pm$ SE. Statistical significance test was indicated with *($p<0.10$) and **($p<0.05$) compared the control value

Table 2. Effect of Lead Acetate on the Activities of 5 α - and 5 β -Reductase to Testosterone (IIIa)

product	steroid metabolized (10 ⁻⁴ m mole)		
	control	Pb administration	
		24 hr after adm.	72 hr after adm.
5 α -steroid ^{a)} (IIIb)	0.1297 $\pm$ 0.0198 (6)	0.0813 $\pm$ 0.0064 (6)**	0.1650 $\pm$ 0.0120 (6)
5 β -steroid ^{a)} (IIIc)	0.0459 $\pm$ 0.0072 (6)	0.0245 $\pm$ 0.0034 (6)**	0.0583 $\pm$ 0.0066 (6)
5 β -steroid ^{b)} (IIIc)	0.1603 $\pm$ 0.0114 (7)		0.1850 $\pm$ 0.0063 (7)*

a) case of administration only once b) case of administration three times

Other remarks are the same as table 1

Table 3. Effect of Lead Acetate on the Activities of 5 α - and 5 β -Reductase to Δ^4 -androstene-3, 17-dione (IVa)

product	steroid metabolized (10 ⁻⁴ m mole)		
	control	Pb administration	
		24 hr after adm.	72 hr after adm.
5 α -steroid (IVb)	0.1540 $\pm$ 0.0223 (6)	0.1270 $\pm$ 0.0258 (6)	0.1551 $\pm$ 0.0250 (6)
5 β -steroid (IVc)	0.0380 $\pm$ 0.0052 (6)	0.0315 $\pm$ 0.0044 (6)	0.0369 $\pm$ 0.0056 (6)

Remarks are the same as table 1

Table 4. Effect of Lead Acetate on the Activities of 3 α - and 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase

enzyme	activity (10 ⁻² unit/mg protein)	
	control	Pb administration
3 α -HSD ^{a)}	0.7140 $\pm$ 0.0496 (7)	0.7831 $\pm$ 0.0326 (7)
3 β -HSD ^{b)}	0.1770 $\pm$ 0.0209 (7)	0.2224 $\pm$ 0.0182 (7)

a) 3 α -hydroxysteroid dehydrogenaseb) 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase

Other remarks are the same as table 1

回投与の場合には、5 β -reductase 活性は、対照群に比べ、72時間群において、有意の上昇を示した ($p < 0.10$)。

3. Δ^4 -androstene-3, 17-dione 5 α -reductase および 5 β -reductase 活性

5 α -reductase および 5 β -reductase の活性は、Table 3 に示す様に、対照群に比べ、鉛投与24時間群、72時間群ともに有意の変動は認められなかった。

4. 3 α -および 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase 活性

3 α -および 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase 活性は、Table 4. に示す様に、対照群に比べ、鉛投与72時間群において上昇を示した。

IV. 考 察

鉛中毒では、骨髄の ALA-S 活性が上昇し、ALA が過剰生成されると言う報告^{1,12)} が数多く見られ、現在この ALA-S の誘導生成機構については、主にステロイドあるいは化学薬剤によっておこされる肝性ポルフィリアの実験から、次のような解釈がなされている。すなわち、ALA-S はポルフィリン生合成の律速酵素であり、Burnharm ら¹³⁾ は ALA-S の生成および制御に最終産物であるヘムの repression と inhibition の機能が関与しているとしている。また、Sassa ら¹⁴⁾ は肝細胞における ALA-S の誘導生成を強調し、これに2つの誘導方法があるとし、一つは DNA から messenger RNA に至る transcription site への repressor がとれて誘導される場合で、DDC, Steroid などの誘導薬物がある。他の一つは messenger RNA から transfer RNA を経てリボソーム上の蛋白合成の translation site への repressor がとれて誘導される場合で、ALA などの誘導薬物がある。

本実験では、 Δ^4 -reductase により代謝されたステロイドのある種のものが上記のごとく ALA-S を誘導生成することから、鉛投与による 5 β -reductase 活性の変動に基づきヘム合成系への影響について考察する。

今回測定した対照群ラットにおける各種ステロイドに

対する 4⁴-reductase 活性の大きさは、4⁴-androstene-3, 17-dione(IVa), testosterone(IIIa), cortisone(II), cortisol(I) の順で、すでに報告されているものと同様の結果が得られている。また、鉛投与の場合、鉛投与24時間群の 4⁴-reductase 活性は、対照群に比較し、いずれも低下を示すが、鉛投与72時間群の 4⁴-reductase 活性は、対照群に比較し、4⁴-androstene-3, 17-dione の場合、完全に元に回復しており、testosterone の場合、約27%の上昇を示している。正ら¹⁾の報告では、鉛投与72時間後に尿中 ALA の顕著な増加が認められており、本実験においても、条件は若干異なるが、4⁴-reductase 活性が同じく72時間後に上昇を示したことは、ステロイド代謝産物が ALA-S の誘導生成を促がすものと推測される。

Granick ら⁴⁾は、この ALA-S 誘導能力の大きさを多くの種類のステロイドおよびその誘導体について詳細に検討した結果から、強力な誘導作用をもつものは、

- ① A-B ring が cis に位置した 5 β -androstane, 5 β -pregnane 型の核をもつこと
- ② C-3, C-7, C-20(C-11) 位にアルコールまたはケトンとして酸素原子をもつこと
- ③ C-21 位の水酸化により活性を失うこと
- ④ グルクロン酸抱合型で活性を失うこと
- ⑤ A, B または D ring に 2 重結合導入で活性を失うこと

の構造上の特徴をもつものであるとしている。

今回測定した 4⁴-reductase には、5 α -reductase と 5 β -reductase の 2 種が含まれており、上記の条件を満足するステロイドは 5 β -reductase により代謝された 5 β -ステロイドである。本実験では、Table 2 に示すごとく、5 β -reductase 活性は、testosterone の場合、対照群と鉛投与24時間群との間に有意の低下が認められた。ここで、5 β -reductase 活性の低下が認められたことは、体内で 5 β -ステロイド、すなわち、etiocholanediol, etiocholanolone-17 β の生成が減少し、従って ALA-S を誘導する物質が少なくなり、ALA の生成は減少するものと考えられる。しかし、72時間群において、5 β -reductase 活性が対照群と比較して上昇し、しかも鉛の3回投与の場合には有意の上昇を示し、さらに 3 α -および 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase 活性が上昇していることは、testosterone の代謝中間体である 5 β -ステロイドの生成が増加するものと思われる。従って、これらのステロイドがヘム合成系の調節機構で、derepressor に働きかけることにより、repressor がとれ、その結果 ALA-S 活性が上昇し、ALA の生成は増加するものと考えられる。このことから、

testosterone 5 β -reductase は、鉛投与の際、ヘム合成系への関与の大きい酵素であることが推測される。また、4⁴-androstene-3, 17-dione 5 β -reductase 活性では、対照群と鉛投与72時間群との間に有意の差が認められなかったが、3 α -および 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase 活性が上昇していることは、この基質の代謝産物である 5 β -ステロイドの生成も増加している可能性を示唆している。

cortisol 4⁴-reductase 活性は、鉛投与24時間群が対照群に比べ、約40%も低下している。しかし、Granick ら⁴⁾の報告している cortisol の代謝産物である 5 β -ステロイドの tetrahydrocortisol は、ALA-S にほとんど影響を与えないことから、ヘム合成系への影響はないものと考えられる。また、5 β -reductase 活性の変動の大きかったことは、cortisol が鉛中毒と関連の深いステロイドであることがうかがえる。

今後、上記の推測をより明確にするため、5 β -reductase 活性と ALA-S 活性との関連性、ならびに血中ステロイド濃度とその 5 β -reductase 活性との関連についても検討する必要があると考えている。

V. 結 論

酢酸鉛をラットの腹腔内に投与し、肝臓の 12,000 $\times$ g あるいは 105,000 $\times$ g 上清に存在する各種酵素活性を測定し、次の結果を得た。

1) cortisol および testosterone に対する 4⁴-reductase 活性は、対照群に比べ、鉛投与24時間群においては有意の低下を示し、鉛投与72時間群においては著しい上昇を示したが、有意の差は認められなかった。

2) cortisone および 4⁴-androstene-3, 17-dione に対する 4⁴-reductase 活性は、対照群に比べ、鉛投与24時間群においては低下の傾向を示し、鉛投与72時間群においては回復または上昇の傾向を示した。しかし、いずれも有意の差は認められなかった。

3) testosterone に対する 5 β -reductase 活性は、対照群に比べ、鉛投与72時間群において著しい上昇を示した。

4) 3 α -hydroxysteroid および 3 β -hydroxysteroid に対する dehydrogenase 活性は、対照群に比べ、鉛投与72時間群において、上昇を示した。

これらのことは、鉛投与の際、5 β -reductase 活性の変動が、生体のヘム合成系における ALA-S 活性に影響を与える因子の一つとしての可能性を有することを示唆しているものと考えられる。

なお、本論文の一部は、第45回日本衛生学会において発表した。

文 献

- 1) 正 和朗: 実験的鉛中毒ラットの骨髄 δ -aminolevulinic acid 合成酵素に関する研究, 日衛誌, **29**, 379-387 (1974).
- 2) Granick, S.: The induction in vitro of the synthesis of δ -aminolevulinic acid synthesis in chemical porphyria: A response to certain drugs, sex hormones, and foreign chemicals, J. Biol. Chem., **241**, 1359-1375 (1966).
- 3) Granick, S. and Urata, G.: Increase in activity of δ -aminolevulinic acid synthetase in liver mitochondria induced by feeding of 3, 5-dicarbethoxy-1, 4-dihydro-collidine, J. Biol. Chem., **238**, 821-827 (1963).
- 4) Granick, S. and Kappas, A.: Steroid induction of porphyrin synthesis in liver cell culture, J. Biol. Chem., **242**, 4587-4593 (1967).
- 5) Tomkins, G. M.: The enzymatic reduction of Δ^4 -3-ketosteroids, J. Biol. Chem., **225**, 13-24 (1957).
- 6) Matsui, M., Abe, F., Kimura, K. and Okada, M.: Comparative studies on the metabolic hydrogenation of the ring A in testosterone and its conjugates by male rat liver in vitro, Chem. Pharm. Bull., **20**, 1913-1920 (1972).
- 7) Norymberski, J. K. and Wood, G. F.: Partial reduction of steroid hormones and related substances, J. Chem. Soc., 3426-3430 (1955).
- 8) Elisberg, E., Vanderheghe, H. and Gallagher, T. F.: Preparation of 3α -hydroxyetiocholan-17-one by a differential reduction with sodium borohydride, J. Am. Chem. Soc., **74**, 2814-2816 (1952).
- 9) Dierassi, C., Engle, R. R. and Bower, A.: The direct conversion of steroidal Δ^5 - 3β -alcohols to Δ^5 - and Δ^4 -3-ketones, J. Org. Chem., **21**, 1547-1549 (1956).
- 10) Koide, S. S.: Further study on the purification of 3α -hydroxysteroid dehydrogenase of rat liver, Biochim. Biophys. Acta, **110**, 189-194 (1965).
- 11) Marcus, P. I. and Talalay, P.: Induction and purification of α - and β -hydroxysteroid dehydrogenases, J. Biol. Chem., **218**, 661-674 (1956).
- 12) 井上 将: 鉛中毒時の porphyrin 代謝に関する研究 (第三報) Glycine, ALA, PBG より porphyrin 生合成に関する研究, 国民衛生, **28**, 612-616 (1959).
- 13) Burnham, B. F. and Lascelles, J.: Control of porphyrin biosynthesis through a negative-feedback mechanism, Biochem. J., **87**, 462-472 (1963).
- 14) Sassa, S. and Granick, S.: Induction of δ -aminolevulinic acid synthetase in chick embryo liver cell in culture, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **67**, 517-522 (1970).

(受付 1976年3月24日)