

実験動物の肝ミクロソームにおけるアセトヘキサミド還元酵素と 20 β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素活性の系統差, 性差及び種差

今村順茂,^{*,a} 内田麻実子,^a 高田英宜,^a 小田切優樹,^a 土屋公幸^b
熊本大学薬学部,^a 宮崎医科大学附属動物実験施設^b

Strain-, Sex- and Species-Related Differences of Acetohexamide Reductase and 20 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Activities in Liver Microsomes of Experimental Animals

Yorishige IMAMURA,^{*,a} Amiko UCHIDA,^a Hidenori TAKADA,^a
Masaki OTAGIRI,^a and Kimiyuki TSUCHIYA^b

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University,^a 5-1, Oe-honmachi, Kumamoto
862-0973, Japan and Experimental Animal Center, Miyazaki Medical College,^b
5200, Kiwara, Kiyotake-cho, Miyazaki 889-1692, Japan

(Received August 8, 2000; Accepted October 18, 2000)

We examined physiological and genetic factors affecting acetohexamide reductase (AHR) and 20 β -hydroxysteroid dehydrogenase (20 β -HSD) activities in liver microsomes of experimental animals. Pronounced strain-related differences were found in both activities of AHR and 20 β -HSD present in liver microsomes of male rats. Among rat strains tested in this study, even though a Wistar-Imamichi (WIM) rat strain was taken to lack AHR activity, it exhibited a significant 20 β -HSD activity. These findings appeared to be in conflict with our conclusion reported so far, which AHR and 20 β -HSD present in liver microsomes of male rats are identical enzymes. Thus the reason for this discrepancy was discussed. Furthermore, AHR and 20 β -HSD activities were little or not observed in liver microsomes of female rats or male experimental animals other than the rat, indicating the existence of sex- and species-related differences in these two enzyme activities.

Key words—acetohexamide reductase; 20 β -hydroxysteroid dehydrogenase; strain-related difference; male-specific microsomal enzyme; species-related difference

緒 言

実験動物における薬物代謝酵素の活性発現は、系統差、性差、年齢差及び種差などの多くの要因によって影響を受ける。¹⁾例えば、シトクローム P450 (CYP) の分子種の1つである CYP2C11 は、ラットにおいて雄特異的な活性発現を示す薬物代謝酵素である。²⁾この CYP2C11 の活性発現は幼若ラットでは観察されず、成熟ラットのみにおいて観察されること、精巣を切除すると活性発現が顕著に低下することから、アンドロゲン依存性の薬物代謝酵素であることが指摘されている。また薬物代謝の第二相反応 (抱合反応) を触媒するスルホトランスフェラーゼに関しても、その活性発現に性差や年齢差が認められることが報告されている。³⁾しかしながら、薬物の還元的代謝を触媒する酵素の活性発現がどのような生理的及び遺伝的因子によって制御されるか、まだほとんど明らかにされていない。

これまでに我々は、経口抗糖尿病薬アセトヘキサ

ミドの還元的代謝 (Fig. 1) に及ぼす性差や年齢差などの生理的因子、さらに系統差や多型などの遺伝的因子の影響について種々の検討を試みてきた。⁴⁻⁷⁾その結果、ラットの肝ミクロソームに存在するアセトヘキサミド還元酵素 (AHR) は、アンドロゲン依存性の酵素であり雄特異的に発現することが明らかにされた。^{4,5)}また雄性ラットの肝ミクロソームにおける本酵素活性は系統差が認められ、特に Wistar-Imamichi (WIM) 系ラットは本酵素を欠損しているものと見なされた。^{6,7)}

従来からある種のヒドロキシステロイド脱水素酵素類は、ケトン基を有する薬物 (異物) の還元的代謝を触媒することが報告されている。⁸⁻¹⁰⁾最近我々は雄性ラットの肝ミクロソームに存在する AHR が、ステロイド類の 20 位のケトン基を還元する 20 β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素 (20 β -HSD) と同一の酵素であることを明らかにしてきた。^{11,12)}この事実は、雄性ラットの肝ミクロソームに存在する AHR が生理的には 20 β -HSD として機能するこ

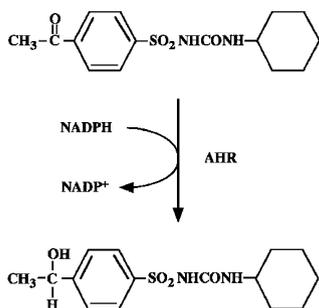


Fig. 1. Metabolic Reduction of Acetohexamide to Hydroxyhexamide

とを示唆している。そこで本研究では、ラットの肝ミクロソームにおける 20β -HSD 活性の系統差と性差を AHR 活性と関連づけて検討するとともに、ラット以外の実験動物に関してもこれらの酵素活性を調べたところ、いくつかの興味深い知見が得られたので報告する。

実験方法

実験材料 アセトヘキサミドは塩野義製薬から恵与されたものをそのまま使用した。ヒドロキシヘキサミドは Girgis-Takla と Chroneos の方法¹³⁾にしたがってアセトヘキサミドを NaBH_4 で還元することにより合成したものを再結晶して用いた。プロゲステロンとその還元生成物である 4-pregnene- 20β -ol-3-one は Sigma 社から購入した。NADP⁺, glucose-6-phosphate 及び glucose-6-phosphate dehydrogenase はオリエンタル酵母社製を用いた。その他の試薬及び溶媒は市販の特級品を使用した。

実験動物 Fischer (F344/N Slc), SD (Slc: SD), Wistar (Slc: Wistar/ST) 及び WKY (WKY/Izm) 系の雄性及び雌性ラット (9 週齢) は日本 SLC から、WIM 系の雄性及び雌性ラット (9 週齢) は動物繁殖研究所 (茨城県) から購入した。また雄性マウス (8 週齢, ddY) と雄性ウサギ (6 月齢, 日本白色種) はいずれも九動 (熊本県) から購入した。雄性クマネズミ (9 週齢, *Rattus tanezumii*) は、宮崎県宮崎郡清武町で捕獲したものを親として、宮崎医科大学附属動物実験施設で繁殖させたものを使用した。

肝ミクロソーム画分の調製 瀉血致死させた実験動物を直ちに開腹し、氷冷した 1.15% KCl 溶液で肝臓を灌流した。ついで肝臓を摘出し、それを細切して 3 倍量の 1.15% KCl を含む 0.01 M Na, K-リン酸緩衝液 (pH 7.4) を加えホモジナイズした。得られたホモジネートを 10,000 g で 20 分間遠心分離し、さらにその上清を 105,000 g で 60 分間遠心分離し沈殿物を得た。この沈殿物を再び上記緩衝液に懸濁後、105,000 g で 60 分間遠心分離することによりミクロソーム画分 (沈殿物) を得た。これらの操作は 3–5°C で行った。

AHR 活性の測定 酵素反応は NADPH 生成系 (0.25 mM NADP⁺, 6.25 mM glucose-6-phosphate, 6.25 mM MgCl_2 , 0.25 units glucose-6-phosphate dehydrogenase), 1.0 mM アセトヘキサミド (当モルの 1N NaOH を含む 0.1 M Na, K-リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解), 酵素溶液 (肝ミクロソーム画分) 及び 0.1 M Na, K-リン酸緩衝液 (pH 7.4) からなる全量 2.0 ml の反応溶液を、37°C で 10 分間インキュベートすることにより行った。この酵素反応は 0.5 ml の 1N HCl を添加することにより停止させた。アセトヘキサミドの還元生成物 (ヒドロキシヘキサミド) の定量は、高岸らの方法¹⁴⁾に準じて高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて行った。装置としては、ポンプ (Hitachi L-6000 型), カラム [LiChrosorb RP-18 (7 mm)], 可変 UV-VIS 分光検出器 (Hitachi L-4000 型, 測定波長 230 nm) 及びデータ処理装置 (Hitachi L-6000 型) を装備した HPLC システムを用いた。移動相としては、0.2% 酢酸-アセトニトリル (53 : 47, v/v) を用い、流速は 1.0 ml/min で行った。AHR 活性は反応液中のタンパク質 1 mg 当たり 1 分間に生成するヒドロキシヘキサミドの nmol 数で表した。タンパク質の定量は、ウシ血清アルブミンを標準タンパク質として Bradford 法¹⁵⁾を一部改良した方法で行った。¹⁶⁾

20β -HSD 活性の測定 酵素反応は AHR 活性の測定の場合と同様に行った。ただし基質としては、0.1 mM プロゲステロン (メタノールに溶解後、これに 0.1 M Na, K-リン酸緩衝液 (pH 7.4) を加えメタノールの最終濃度が 2.0% 以下になるように調製) を用いた。この酵素反応は 0.5 ml の 1N HCl を添加することにより停止させた。プロゲステロンの還元生成物 (4-pregnene- 20β -ol-3-one) の定量は、Swinney らの方法¹⁷⁾に準じて HPLC を用いて行った。装置としては、ポンプ (Hitachi L-6000 型), カラム [LiChrosorb RP-18 (7 mm)], 可変 UV-VIS 分光検出器 (Hitachi L-4000 型, 測定波長 244 nm) 及びデータ処理装置 (Hitachi L-6000 型) を装備した HPLC システムを用いた。移動相としては、水-アセトニトリル-メタノール-テトラヒドロフラン (42 : 28 : 17 : 11, v/v/v/v) を用い、流速は 0.6 ml/min で行った。なお本法は、4-pregnene- 20β -ol-3-one とその異性体である 4-pregnene- 20α -ol-3-one (Sigma 社) が分離定量できることを確認した。 20β -HSD 活性は反応液中のタンパク質 1 mg 当たり 1 分間に生成する 4-pregnene- 20β -ol-3-one の pmol 数で表した。

実験結果

雄性ラットの AHR 活性 先ず、これまで検討した系統のラットに WKY 系ラットを新たに加え AHR 活性の系統差について再検討を試みた。その結果、Fig. 2A に示すように、AHR 活性に顕著な

系統差が存在することを確認することができた。Wistar系ラットとそれに由来する系統(WKY系とWIM系)のラットのAHR活性は、Fischer系やSD系ラットと比較して低い値を示した。特にWIM系ラットにおいては、ほとんどAHR活性を示さないことが確かめられた。一方、今回新たに検討したWKY系ラットは、明らかなAHR活性を示した。

雄性ラットの20 β -HSD活性 雄性ラットの肝ミクロソームにおける20 β -HSD活性を系統間で比較検討した。基質としてプロゲステロンを用いたときの20 β -HSD活性においても、AHR活性と同様に系統差が観察された(Fig. 2B)。しかし、ほとんどAHR活性を示さないWIM系ラットが、20 β -HSD活性に関してはFischer系ラットの約50%の

値を示した。またWKY系ラットは、Fischer系ラットと同程度の20 β -HSD活性を示すことが分かった。

雌性ラットのAHR活性と20 β -HSD活性 雌性ラットの肝ミクロソームにおけるAHR活性と20 β -HSD活性についても同様な比較検討を試みた。Fig. 3から明らかなように、いずれのラットの系統においてもほとんどあるいは全くAHR活性を示さなかった。また20 β -HSD活性に関してもほぼ同じ結果が得られた。したがって、ラットの肝ミクロソームにおけるAHR活性と20 β -HSD活性は、WIM系ラットのAHR活性を除いて(WIM系ラットでは雌雄ともに本酵素活性をほとんど示さず、そのため性差も認められない)、いずれも性差が存在することが実証された。

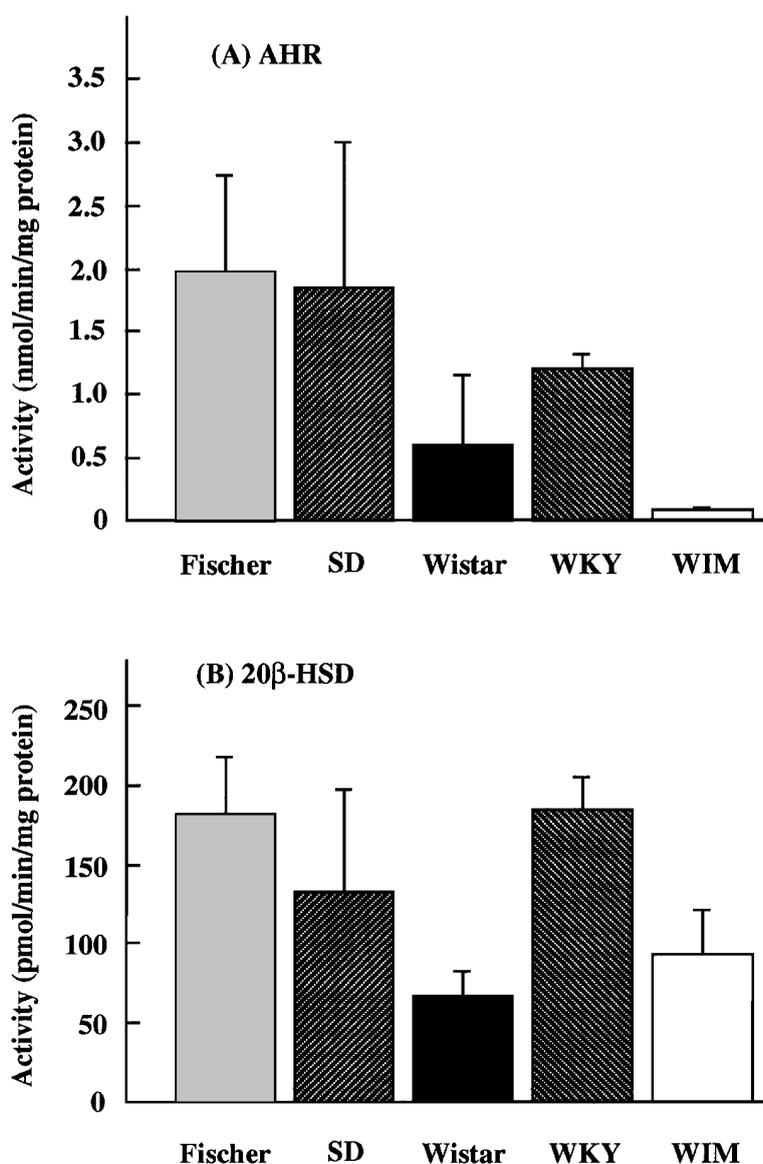


Fig. 2. Strain-Related Differences of AHR and 20 β -HSD Activities in Liver Microsomes of Male Rats
Each bar represents the mean \pm SD of 5 or 6 animals.

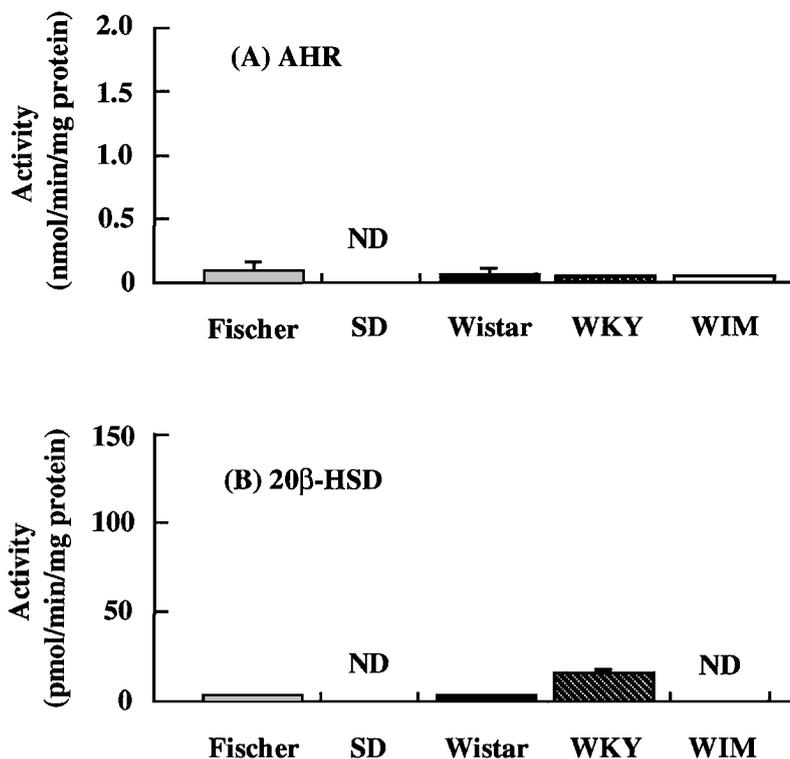


Fig. 3. AHR and 20 β -HSD Activities in Liver Microsomes of Female Rats of Various Strains
Each bar represents the mean \pm SD of 4 to 6 animals. ND: not detectable.

ラット以外の実験動物の **AHR** 活性と **20 β -HSD** 活性 さらに雄性ウサギ、マウス及びクマネズミ (*Rattus tanezumi*) の肝ミクロソームにおいても AHR 活性と 20 β -HSD 活性が観察されるかどうかを検討した。しかしこれらの実験動物においては、ラットの場合と異なっており、いずれの酵素活性もほとんど認められず、種差が存在することが判明した (Fig. 4).

考 察

本研究において雄性ラットの肝ミクロソームにおける AHR 活性に顕著な系統差が認められ、特に雄性 WIM 系ラットは本酵素活性をほとんど示さないことが確かめられた。ラットの肝ミクロソームにおける AHR 活性は雄特異的であり、精巣を切除するとその活性が著しく低下しテストステロンを投与すると回復することから、本酵素活性がアンドロゲンに依存することが既に明らかにされている。⁹⁾ この事実から、肝ミクロソームに存在する AHR は雄性ラットにとって重要な生理的役割を果たしている可能性が示唆される。しかしながら、AHR 活性をほとんど示さない雄性 WIM 系ラットにおいても生殖能力などの性的機能に何ら異常が認められないことから、AHR のその役割に関して疑問点が残されていた。

最近我々は、ラットの肝ミクロソームに存在する

AHR がステロイド代謝酵素の 1 つである 20 β -HSD と同一の酵素であることを明らかにしてきた。^{11,12)} ところが本研究において、AHR 活性をほとんど示さない雄性 WIM 系ラットの 20 β -HSD 活性を調べたところ、意外なことに雄性 Fischer 系ラットの約 50% の 20 β -HSD 活性を示すことが分かった。したがって雄性 WIM 系ラットの肝ミクロソームに存在する AHR は、生体外異物であるアセトヘキサミドを還元する能力をほとんどもたないが、プロゲステロンのような 20 位にケトン基を有する内因性ステロイド類を還元する 20 β -HSD としての本来の機能を果たしうるものと考えられた。

Penning¹⁸⁾ は、ラット肝臓の 3 α -ヒドロキシステロイド脱水素酵素 (3 α -HSD) の基質特異性に関して、次のような注目すべき実験結果を報告している。すなわち本酵素の基質結合ポケットに位置づけられる 86 番目のトリプトファンをチロシンで置換する (W86Y) と 4-nitrobenzaldehyde に対する触媒効率 (k_{cat}/K_m) はほとんどゼロに近い値を示すが、5 α -androstane-3,17-dione や androsterone などのステロイド類に対する触媒効率は野生型 (wild type) と比較してその 15—25% が保持される。一方、本酵素の基質結合ポケットに位置づけられる 227 番目のトリプトファンをチロシンで置換する (W227Y) と 4-nitrobenzaldehyde に対する触媒効率は野生型と比較してその 50% 以上が保持されるが、ステロ

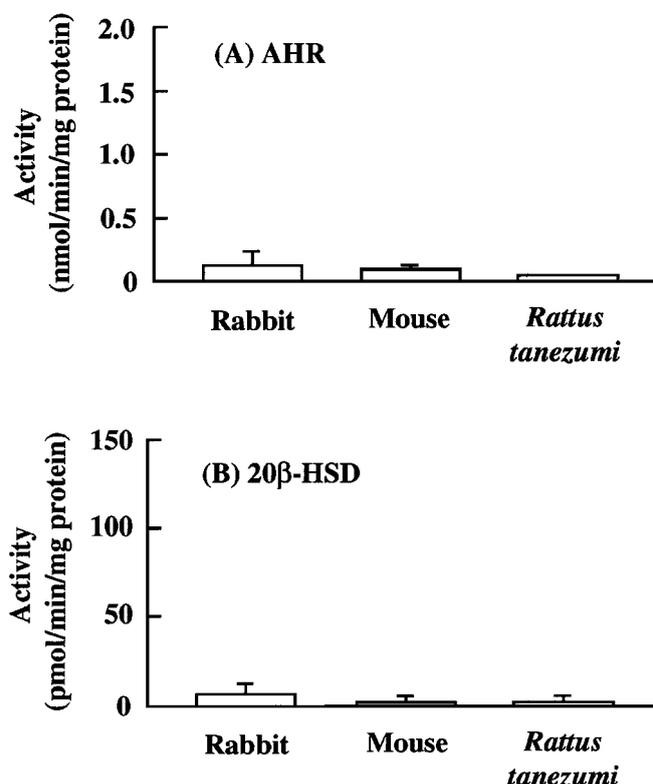


Fig. 4. AHR and 20β-HSD Activities in Liver Microsomes of Male Experimental Animals Other than the Rat
Each bar represents the mean ±SD of 4 animals.

イド類に対する触媒効率は5%以下の低い値を示す。これらの結果をもとに、4-nitrobenzaldehydeとステロイド類は3α-HSDの同一の基質結合部位に結合するが、結合様式は互いに異なっていると結論づけられている。したがって、雄性ラットの肝ミクロソームに存在するAHR (20β-HSD) においても、生体外異物であるアセトヘキサミドと内因性ステロイド類であるプロゲステロンの基質結合部位への結合様式が異なっている可能性がある。雄性WIM系ラットの肝ミクロソームに存在するAHR (20β-HSD) は、恐らく生体外異物の結合に顕著な影響を及ぼすアミノ酸残基が点突然変異を起こしており、アセトヘキサミドを還元する能力をほとんど消失しているが、一方プロゲステロンを還元する能力を保持しており、その本来の機能を果たしうるものと推察される。しかしながら最近いくつかのヒドロキシステロイド脱水素酵素類において、2種以上の分子種の存在が指摘されていることから、雄性ラットの肝ミクロソームには別の20β-HSD分子種が存在する可能性も否定できず、今後更に検討を要する。

ラットには多くの系統が知られており、特にWistar系ラットとそれに由来する系統のラットは各種の実験に繁用されている。ところで同じWistar系ラットでも、薬物代謝能力に大きな差異が認められる例が報告されている。¹⁹⁻²²⁾ 本研究にお

いても、肝ミクロソームのAHR活性が雄性WIM系ラット (近交系) と雄性WKY系ラット (近交系) の間で著しく異なっていることが判明した。そこで遺伝的に近交系ではなくクローズドコロニーとして分類される雄性Wistar系ラットを取り上げ、それぞれの個体の肝ミクロソームにおけるAHR活性と20β-HSD活性を比較した (Fig. 5)。その結果、ラットAやEではAHR活性をほとんど示さないが、20β-HSD活性に関しては雄性Fischer系ラットの約40%の値を示し、これらの酵素活性のパターンが雄性WIM系ラットと類似していることが分かった。したがってWIM系ラットは、Wistar系ラットの中でラットAやEのような酵素遺伝子をもった個体を交配することにより近交系ラットとして導かれたものであり、一方WKY系ラットは、Wistar系ラットの中でラットBのように両活性ともに高い値を示す酵素遺伝子をもった個体から近交系ラットとして導かれたものと考えられる。

雌性ラットの肝ミクロソームにおいては、いずれの系統においてもAHR活性や20β-HSD活性を示さないことが実証された。これは雌性ラットでは、当然のことながら成熟期にアンドロゲンが分泌されないだけでなく、臨界期に一時的に分泌されるアンドロゲンによる刷り込み (imprinting) が行われず、酵素遺伝子が発現しないためと考えられる。⁹⁾ ラットの肝ミクロソームにおけるAHR活性と20β-

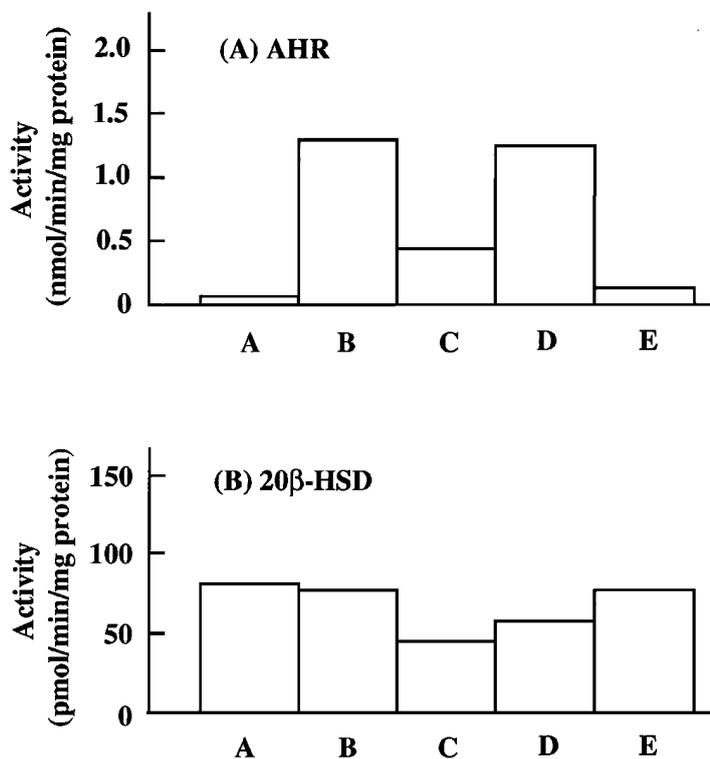


Fig. 5. AHR and 20β-HSD Activities in Liver Microsomes of Individual Male Wistar Rats

HSD 活性のアンドロゲンによる制御機構に関しては、現在更に詳細な検討を実施中である。

さらに本研究では、雄性ウサギとマウスの肝ミクロソームにおいても、雄性ラットと同様に AHR 活性と 20β-HSD 活性を示すかどうか検討した。しかしながらこれらの実験動物の肝ミクロソームにおいては、AHR 活性に加えて 20β-HSD 活性もほとんど認められず、種差が存在することが分かった。ところで実験動物として用いられている各種系統の市販のラットは、いずれも *Rattus norvegicus* に属するものであり、一般にはドブネズミと呼ばれる仲間である。ラットの仲間である *Rattus* 属には、クマネズミと呼ばれる仲間も知られているが、ドブネズミとクマネズミは異なる種に属しており、交配不能である。そこでウサギやマウスと比較して市販のラットと系統的に近いクマネズミ (*Rattus tanezumii*)²³ を用いてさらに検討を試みたが、雄性クマネズミの肝ミクロソームにおいても、AHR 活性と 20β-HSD 活性を示さないことが明らかになった。クマネズミが市販のラットと同様に *Rattus* 属であるのにもかかわらずこれらの酵素活性を示さないことは興味深いことと思われる。

REFERENCES

- 1) Kato R., *Xenobiotica*, **7**, 25–92 (1977).
- 2) Kato R., Yamazoe Y., “Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 105, Cytochrome P450,” eds. by Schenkman J. B., Greim H., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1993, pp. 447–476.
- 3) Matsui M., *Yakugaku Zasshi*, **117**, 729–738 (1997).
- 4) Imamura Y., Torigoe M., Yanachi Y., Higuchi T., Otagiri M., *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **72**, 223–230 (1991).
- 5) Imamura Y., Iwamoto K., Yanachi Y., Higuchi T., Otagiri M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **264**, 166–171 (1993).
- 6) Imamura Y., Kimura R., Kozono Y., Otagiri M., *Life Sci.*, **57**, 1811–1817 (1995).
- 7) Imamura Y., Takada H., Kimura R., Mori Y., Otagiri M., *Life Sci.*, **59**, 2201–2208 (1996).
- 8) Tanaka M., Ohno S., Adachi S., Nakajin S., Shinoda M., Nagahama Y., *J. Biol. Chem.*, **267**, 13451–13455 (1992).
- 9) Maser E., *Biochem. Pharmacol.*, **49**, 421–440 (1995).
- 10) Muramatsu S., Komokata Y., Tanaka Y., Takahagi H., *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 1199–1203 (1997).
- 11) Takada H., Otagiri M., Imamura Y., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **287**, 504–507 (1998).
- 12) Takada H., Uchida A., Kamizono R., Otagiri M., Imamura Y., *Life Sci.*, **67**, 2075–2082

- (2000).
- 13) Girgis-Takla P., Chronos I., *Analyst*, **104**, 117-123 (1979).
 - 14) Takagishi Y., Sato K., Tomita K., Sakamoto T., *Yakugaku Zasshi*, **99**, 961-963 (1979).
 - 15) Bradford M. M., *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976).
 - 16) Zor T., Selinger Z., *Anal. Biochem.*, **236**, 302-308 (1996).
 - 17) Swinney D. C., Ryan D. E., Thomas P. E., Levin W., *Biochemistry*, **26**, 7073-7083 (1987).
 - 18) Penning T. M., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **69**, 211-225 (1999).
 - 19) Matsui M., Hakozaki M., *Biochem. Pharmacol.*, **28**, 411-415 (1979).
 - 20) Yamada J., *Oncologia*, **13**, 127-129 (1985).
 - 21) Corser R. B., Coughtrie M. W. H., Jackson M. R., Burchell B., *FEBS Lett.*, **213**, 448-452 (1987).
 - 22) Sugihara K., Kitamura S., Tatsumi K., *Drug Metab. Dispos.*, **24**, 199-202 (1996).
 - 23) Verneau O., Catzeflis F., Furano A. V., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 11284-11289 (1998).