

機関番号：3 2 6 7 6

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：2 0 5 9 0 1 2 5

研究課題名 (和文)

ストレス誘導テストステロン産生抑制と防御機構に関する 11 β -HSD の分子多様性

研究課題名 (英文)

Molecular diversity of 11 β -HSDs involved in a protection mechanism from the stress-mediated suppression of testosterone production

研究代表者

中陳 静男 (NAKAJIN SHIZUO)

星薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：9 0 1 0 1 5 7 6

研究成果の概要 (和文)：11 β -HSD (type 1 and type 2) は活性型グルココルチコイド(GC)と不活性型 GC の相互変換を触媒する酵素である。幼若ブタ精巣を実験材料として、これらのアイソザイムの存在を RT-PCR、ウエスタンブロッティング、免疫組織化学染色により検出した結果、精巣には type 1 と比較して type 2 が多量に発現していた。精巣ライディッヒ細胞における GC の代謝は反応速度論的解析から、コルチゾール (活性型 GC) からコルチゾン (不活性型 GC) への酸化反応のみで、反対方向への代謝 (還元反応) は全く認められず、type 2 の触媒する酸化反応が type 1 よりも優位であった。さらに、広範なヒト組織中の 11 β -HSD アイソザイムを定量するリアルタイム RT-PCR を構築し、ヒト精巣におけるこれらのアイソザイムの発現を検出した。これらの研究成果は、精巣ライディッヒ細胞に発現する type 1 および type 2 がコルチゾールの不活性化に関与し、さらに精巣ライディッヒ細胞における GC 誘導テストステロン産生抑制を阻止する機構に関与していることを強く示唆した。

研究成果の概要 (英文)：11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase (11 β -HSD) isozyme (type 1 and type 2) catalyze the interconversion of physiologically active GC and inactive forms. The presence of these isozymes was determined in neonatal pig testis and Leydig cells purified from testes by RT-PCR, Western blotting, and immunohistochemical staining. In the entire testis, a higher level of type 2 was expressed compared to type 1. Next, the direction of GC metabolism in intact Leydig cells was examined, and only oxidation from cortisol to cortisone was detected. Using a microsomal enzyme preparation from Leydig cells, type 2 exhibited potent oxidation activity, and the activity was higher than the oxidation activity catalyzed by the type 1 isozyme. Furthermore, we performed comprehensive determination of the expression of 11 β -HSD isozymes mRNA by real-time RT-PCR in wide range of human tissues. The results of the present study using testis strongly suggest that not only 11 β -HSD type 1 but also type 2 plays important roles in cortisol inactivation in Leydig cells of the testis, and is involved in the protection of glucocorticoid-mediated suppression of testosterone production in Leydig cells of the testis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：生化学、内分泌学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：ストレス、テストステロン、精巣、ライディッヒ細胞、精子形成、11 β -HSD、分子多様性、アイソザイム、

1. 研究開始当初の背景

近年、先進諸国を中心に少子化が進んでおり、日本も例外ではなく合計特殊出生率が1.26(2005年)まで減少した。今後1億2774万人をピークに、日本の人口は減りつづけると予測されており、2055年における総人口は、約8,993万人と推定されている。この少子化による人口減少に関する種々の要因の一つとして、不妊の増加が挙げられている。不妊の原因の半数は男性に原因があり、精子形成不全や精子数の減少による男性不妊といわれている。生物学的に視床下部-脳下垂体-副腎皮質系亢進によるグルココルチコイド(GC)分泌を促すような内外の刺激は“ストレス”と呼ばれ、これによって引き起こされる一連の生体防御反応が“ストレス”である。精巣における正常な精子形成にはテストステロンが必須であるが、“ストレス”によるGCの上昇がGC受容体を介して精巣のテストステロン産生を抑制し、正常な精子形成を妨げていることがげっ歯類の実験から示唆されている。しかし、精巣には正常なテストステロン産生を維持するためにGCの不活性化に関与する機構の存在が考えられている。ラットの精巣には11 β -HSDタイプ1が発現しており、酸化還元酵素でありながら、精巣では活性化型GC(コルチコステロン)から不活性化型GCへの酸化反応が優位である。この酵素が精巣におけるGC誘導テストステロン産生抑制を阻止するために重要な役割を果たしていると考えられていた。しかし、ヒトとげっ歯類におけるステロイドホルモン合成には違いが認められ、ヒトのグルココルチコイドは主にコルチゾールであり、ラットとは異なる。ヒトを含めた高等動物において、GC誘導テストステロン産生抑制阻止に関する詳細は明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

本研究では前述の“ストレス”により引き起こされる男性機能障害に関連し、血中高GCによる精巣テストステロン産生抑制に対する防御機構に関与するGC不活性化にフォーカスをあて、ヒトに近縁な高等動物の精巣あるいはヒト由来の実験材料を用いて、テストステロン産生抑制阻止機構に深く関与する11 β -HSDアイソザイムについて、その分子多様性を究明することとした。

3. 研究の方法

(1) 実験材料：タ精巣は生後2週齢の雄性幼

若の個体から去勢時に得られたものを用いた。ヒト精巣をはじめとした24種の組織由来の総RNAは市販のものを用いた。タンパク質の発現はコードするcDNAをpcDNA 3.1(+)発現ベクターに組み込み、ホストとしてHEK293細胞を用いた。

(2) 精巣よりライディッヒ細胞の分離とライディッヒ細胞よりミクロソームの分離：精巣をコラゲナーゼ/ディスパーゼ処理を行い、パーコール密度勾配遠心分離によりライディッヒ細胞フラクションを得た。純度は80-90%であった。ライディッヒ細胞のミクロソーム分画は超遠心法により得た。

(3) 酵素活性の測定：ライディッヒ細胞における11 β -HSD活性の測定は、放射能標識コルチゾールあるいは放射能標識コルチゾンを経質として添加し、それぞれコルチゾンへの変換(酸化)あるいはコルチゾールへの変換(還元)を測定した。ライディッヒ細胞ミクロソームにおける酵素活性測定には、還元型補酵素としてNADPHあるいは酸化型補酵素としてNAD⁺を使用した。基質とプロダクトの分離にはマイクロプレートを用いたTLCを利用し、プロダクトの放射活性を測定することにより算出した。

(5) RT-PCR：精巣を始めとする各組織から得られた総RNAからオリゴdTをプライマーとして逆転写酵素によりcDNAを作成した。得られたcDNAを鋳型として11 β -HSDアイソザイムを始めとし、目的とした各種標的タンパク質をコードする塩基配列から特異的なPCRプライマーを作成し、PCRを行った。PCRプロダクトはアガロースゲルを用いた電気泳動を行い検出し、デンシトメータにより定量した。

(6) DNA塩基配列分析：cDNAの塩基配列はABI PRISM 3100 genetic analyzerを用い、定法に従い分析した。

(7) ウェスタンブロッティング：ブタ精巣から得られたタンパク試料をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した後、ヒト11 β -HSDアイソザイムに対するそれぞれの抗体を用いて、ブタ11 β -HSDアイソザイムの存在を定法に従った化学発光法により検出した。

(8) 免疫組織化学染色：ホルマリン固定したブタ精巣切片利用し、ヒト11 β -HSDアイソザイムに対するそれぞれの抗体を用いて、ブタ11 β -HSDアイソザイムをパーオキシダーゼ/ジアミノベンチジン法により発色させ、光学顕微鏡で観察した。

(9) 生物学的有意差検定：分散分析(ANOVA)

を用いた多重比較を行った。

(10) リアルタイム RT-PCR による mRNA の定量：ヒトおよびブタ 11 β -HSD アイソザイムを始めとする各種標的タンパク質に対する mRNA は LightCycler 480 を使い、SYBR Green 法により測定した。定量にはそれぞれのタンパク質をコードする cDNA の標準品をクローニングにより調製し、絶対検量線法を用いた。

4. 研究成果

(1) ブタ精巣およびライディッチ細胞における 11 β -HSD アイソザイムの発現

RT-PCR の結果、ブタ精巣および精巣から分離したライディッチ細胞には 11 β -HSD type 1 のみならず、多量の Type 2 が発現していることが判明した (図 1A)。また、精巣に発現が認められたこれらのアイソザイムは、特異的に発現していることが知られている肝臓 (type 1 の発現) および腎臓 (type 2 が発現) と比較した結果、type 1 が肝臓の約 1/14、type 2 は腎臓の約倍量発現していることが判明した (図 1B)。さらに、タンパク質レベルにおける発現をウエスタンブロッティングで確認することができ、ブタ精巣には 11 β -HSD type 1 および type 2 がメッセージレベルのみならずタンパクレベルでも発現していることが判明した。

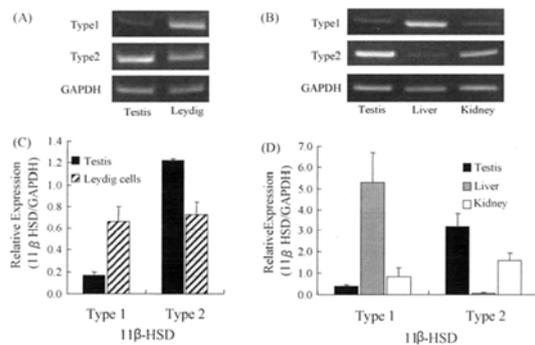


図 1. ブタ精巣における 11 β -HSD type 1 および type 2 mRNA の発現：(A) は PCR プロダクトの電気泳動像、(B) は定量結果を示している。

(2) 免疫組織化学染色による 11 β -HSD アイソザイムの局在

ブタ精巣の組織切片を 11 β -HSD アイソザイムの抗体を使用し、免疫組織化学染色を行った結果、11 β -HSD type 1 はライディッチ細胞に、type 2 はライディッチ細胞のみならず精細管にもわずかに存在していた (図 2)。なお、GR はライディッチ細胞と精細管の両者に認められた。

(3) ブタ精巣ライディッチ細胞における 11 β -HSD の酸化・還元反応の優位性

ブタ精巣から分離したライディッチ細胞の

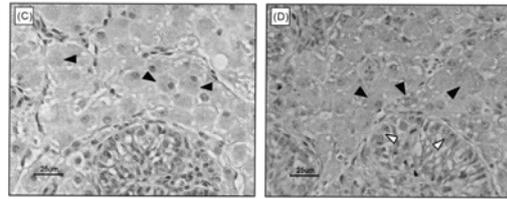


図 2. ブタ精巣組織切片における 11 β -HSD type 1 および type 2 の免疫組織化学染色：(C) は type 1 の抗体により染色したものであり、ライディッチ細胞が陽性となっている (黒の矢尻)；(D) は type 1 の抗体により染色したものであり、ライディッチ細胞 (黒の矢尻) と精細管内の細胞 (白の矢尻) が陽性となっている。

プライマリーカルチャーを行い、コルチゾールからコルチゾンへの変換 (酸化反応) およびコルチゾンからコルチゾールへの変換 (還元反応) の優位性を検討した。その結果、いずれの基質濃度においても酸化反応が優位であり還元反応はほとんど認められなかった (図 3)。従って、インタクトな精巣ライディッチ細胞ではコルチゾールからコルチゾンへの変換が断然優位であることが判明した。

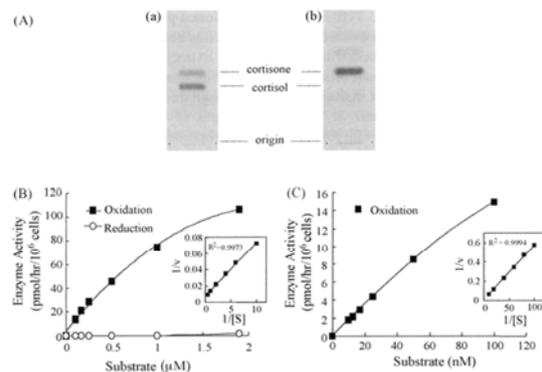


図 3. 精巣より分離したライディッチ細胞におけるコルチゾールおよびコルチゾンの代謝：(A) コルチゾールからコルチゾンへの変換が認められるが、コルチゾンからコルチゾールへの変換は認められない。(B) 基質濃度を変化させたときの酵素活性を示している

(4) 精巣 11 β -HSD アイソザイムの反応速度論的解析

11 β -HSD type 1 および 2 は共に小胞体膜結合酵素であることがよく知られていることから、ブタ精巣ミクロソームを酵素として使用し、反応速度論的解析を行った。その結果、基質であるコルチゾールに対する K_m 値は 1.36 μ M (type 1：補酵素として NAD^+ を使用) および 0.38 μ M (type 2：補酵素として NAD^+ を使用) であることが判明した。同時に測定した肝および腎より調整したミクロソームを酵素とした時のコルチゾールに対する K_m 値は 12.2 μ M (type 1) および 0.41 μ M (type 2) となり、type 2 に関しては同程度の K_m 値が得

られるが、type 1 は肝と比較して精巣は 1/10 ほどの値となった。現在、この相違を明らかにすることはできないが、精巣にはコルチゾールの酸化（コルチゾンへの変換）に関与する NADP⁺ を補酵素とし、コルチゾールに対する親和性が高い第 3 の 11 β -HSD アイソザイムの存在も考えられる。

(5) ブタ精巣由来 11 β -HSD アイソザイムのクローニングと発現

精巣にはコルチゾールのコルチゾンへの変換を触媒する既存の酵素である 11 β -HSD type 1 および type 2 の他に第 3 の 11 β -HSD アイソザイムの存在が考えられたので、それらの新たなクローニングを試みた。その結果、type 1 と類似するが、塩基配列およびタンパク質レベルで、それぞれ 15 および 8 カ所の相違があるクローンが得られた。その cDNA クローンの発現および発現タンパク質の酵素化学的性質の検討から、新たにクローニングした本クローンは、既存の 11 β -HSD type 1 であり、既に他の研究者から報告されている type 1 の塩基配列に誤りのある可能性を明らかにした。

(6) ヒト精巣における 11 β -HSD アイソザイムの発現

ヒト精巣において、11 β -HSD アイソザイムである type 1 と type 2 が存在しているか否かを検討する目的でリアルタイム RT-PCR 法を構築して、これらサブタイプおよび GC 受容体の定量を行い、他の 23 種の組織におけるそれらの発現とも比較した。その結果、図 4 に示すように、ヒトの精巣においても、11 β -HSD type 1 のみならず type 2 も発現しており、これら 2 種のサブタイプがコルチゾールを不活性化（酸化）することにより、GC 誘導テストステロン産生抑制を阻止している可能性を示唆した。

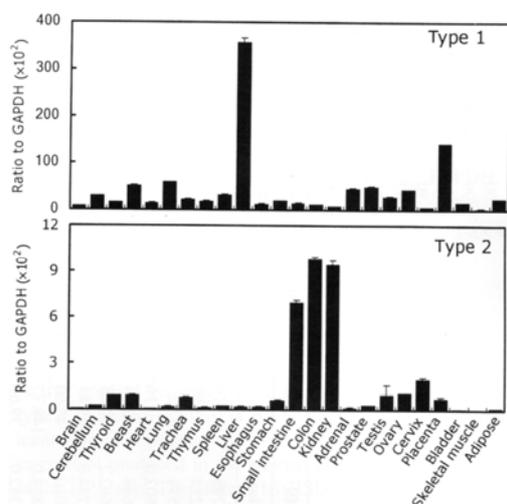


図 4. リアルタイム RT-PCR によるヒト各種組織中の 11 β -HSD type 1 および type 2 mRNA の定量：mRNA のコピー数を GAPDH に対する比で示している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Y. Honda, S. Ohno and S. Nakajin, Leydig cells from neonatal pig testis abundantly express 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β -HSD) type 2 and effectively inactivate cortisol to cortisone, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 査読有, **108** (1-2), 91-101 (2008).
- ② S. Ohno, M. Ohta, Y. Honda, and S. Nakajin, Sequence and expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 cDNA cloned from pig testis, *Mol. Cell. Biochem.*, 査読有, **338** (1-2), 149-156 (2010)
- ③ S. Ohno, M. Ohta and S. Nakajin, Quantitative determination and tissue distribution of human 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase, hexose-6-phosphate dehydrogenase, glucose-6-phosphate transporter, glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor mRNAs, *Horm. Mol. Biol. Clin. Invest.*, 査読有, **2** (1), 219-226 (2010)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 日本薬学会第 130 年会
平成 22 年 3 月 28-30 日 岡山
ブタ 11 β -HSD type 1 cDNA の新規配列とその発現
○大田正規、本田容子、大野修司、中陳静男

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中陳 静男 (NAKAJIN SHIZUO)
星薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：9 0 1 0 1 5 7 6

(2) 研究協力者

大野 修司 (OHNO SHUJI)
星薬科大学・薬学部・講師
研究者番号：2 0 2 3 3 2 2 3