

[別紙 1]

論文内容の要旨

論文題目

ゴールデンハムスターのハーダー腺をモデルとした脂質代謝の制御機構

指導教官 脊山 洋右 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

氏名 日田 安寿美

ハーダー腺は眼窩に位置する外分泌腺で、齧歯類では主に脂質を分泌する。この組織には脂質の合成酵素が存在し、脂質代謝を研究するうえでよいモデル系となる。ゴールデンハムスターではハーダー腺の脂質組成に雌雄差が見られ、薄層クロマトグラフィー(TLC)分析すると主成分である1-アルキル-2,3-ジアシルグリセロール(ADG)が雄では3スポット、雌では2スポットとしてあらわれる。この雌雄差はガスクロマトグラフィー(GLC)分析でも確認することができ、雄では直鎖脂肪酸、雌では直鎖以外に分枝鎖の脂肪酸からも構成される。

本研究では、この違いを制御する機構を明らかにするために以下の実験を行った。まず、雌の腺に見られる分枝鎖脂肪酸の炭素骨格は偶数と奇数のイソ型および奇数のアンテイソ型であることから、分枝鎖アミノ酸すなわちバリン、ロイシン、イソロイシンの分解産物が脂肪酸合成のプライマーになることを予測した。そこで[¹⁴C]

ラベルした分枝鎖アミノ酸のトレーサー実験を行い、各臓器の脂質への取り込みを調べた。肝臓、心臓、脳の脂質には RI の取り込みがほとんど見られないことに比べ、ハーダー腺の脂質には RI 投与後の取り込みが経時的に増加し、6 時間から 9 時間後に取り込みのピークに達した。このことから、ハーダー腺は分枝鎖アミノ酸を脂肪酸合成に効率よく利用していることが明らかとなった。ゴールデンハムスターのハーダー腺脂質を TLC 分析したところ、雌雄ともに ADG への RI の取り込みがみられた。しかしゴールデンハムスターの雄ではコレステロールへの RI の取り込みが見られたが、雌では見られなかった。以上より、雄の腺では分枝鎖脂肪酸がアセチル-CoA にまで分解されて脂肪酸やコレステロールの合成に利用されることが示された。

ADG のどの部分に RI が取り込まれたのかを知るために、ラジオガスクロマトグラフィ分析を行った。ゴールデンハムスターではアルキル基、アシル基ともに雄では偶数と奇数の直鎖脂肪酸に、雌では分枝鎖脂肪酸に RI の取り込みが見られた。このことから、雄では分枝鎖アミノ酸がアセチル-CoA やプロピオニル-CoA にまで分解されて脂肪酸合成に用いられたことが示され、雌ではバリン、イソロイシン、ロイシンがそれぞれイソブチリル-CoA、2-メチルブチリル-CoA、イソバレリル-CoA に代謝された後、脱分枝されずにそのまま脂肪酸合成に利用されることが明らかとなった。以上より、ゴールデンハムスターのハーダー腺における脂質組成の雌雄差は、イソブチリル-CoA と 2-メチルブチリル-CoA に作用する短鎖/分枝鎖アシル-CoA 脱水素酵素 (SBCAD) と、イソバレリル-CoA に作用するイソバレリル-CoA 脱水素酵素 (IVD) の活性が雌雄で異なることに起因することが考えられた (図 1)。

対照実験として、ハーダー腺脂質の主成分が ADG であり、その構成脂肪酸組成が雌雄ともに同じであるチャイニーズハムスターを用いて、分枝鎖アミノ酸のトレーサー実験を行った。TLC 分析により雌雄共に ADG にラベルの取り込みが見られ、ADG のアルキル基、アシル基ともに直鎖脂肪酸と分枝鎖脂肪酸の両方にラベルの取り込みが見られた。またチャイニーズハムスターの雌雄は共にコレステロールへのラベルの取り込みが見られたことから、IVD と SBCAD の活性には雌雄差が存在しないことが示唆された。

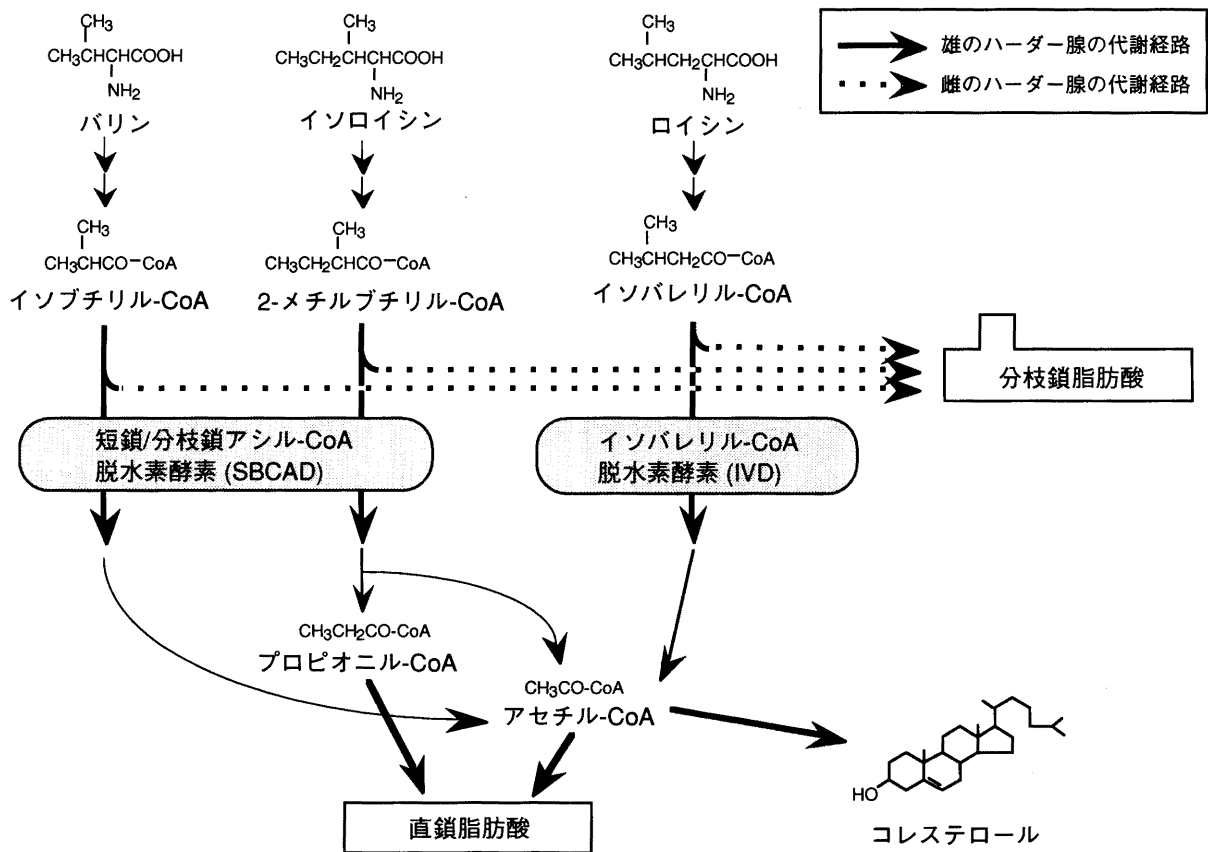


図1 ゴールデンハムスターのハーダー腺における分枝鎖アミノ酸の代謝経路。

雄の腺ではIVDとSBCADの活性が高く、雌の腺では活性が低いことが示された。

次に、ゴールデンハムスターについてIVDとSBCADの活性を測定したところ、雄では活性が高く、雌では低いことが明らかとなった。また、雄を去勢すると脂質組成は雄型から雌型に、雌にテストステロンを投与すると、雌型から雄型に変化し、IVDとSBCADの活性も前者では雌のレベルまで低下し、後者では雄のレベルまで上昇が認められた。

テストステロンを投与すると、IVDとSBCADの活性が増加し、免疫組織化学染色ではアンドロジェンレセプター(AR)の発現が起きること、抗アンドロジェン剤であるフルタミドによりIVDおよびSBCAD活性の誘導が阻害されることから、テストステロンによりARの発現が誘導され、IVDとSBCADの発現が誘導されることが示された。

以上より，ゴールデンハムスターのハーダー腺に見られる脂質組成の雌雄差は，IVDおよびSBCAD活性の誘導がARにより制御されているために生じる結果であることが明らかとなった。

二つの酵素の性質を応用し，分泌液の脂質組成を調べることでアンドロジェン様薬剤の効果をモニターする系を考案した．ゴールデンハムスターの嗅覚をエーテルで刺激すると半麻酔状態になると共にハーダー腺が絞られて脂質が分泌される．この分泌液を約 $1\mu\text{l}$ 採取し，TLCプレートに直接塗布して脂質を分析した．

雄を去勢してから2週間と，テストステロンの投与を開始してから2週間，分泌液を経時的に採取して脂質分析を行ったところ，図2aとbに示す通り脂質組成の変化をモニターすることができた．また，去勢した雄にフルタミドとテストステロンの同時投与を行ったところ，フルタミドの濃度依存的にアンドロジェン阻害効果が見られ， 50mg/kg で顕著な阻害効果を示した(図2c)．すなわちこのモニター系はアンドロジェンだけでなく抗アンドロジェン様薬剤の効果を調べる上でも利用可能であることが明らかとなった．この方法は14日間という比較的短い期間で，非侵襲的かつ経時的に一個体への影響を追跡できることから，創薬時にアンドロジェンおよび抗アンドロジェン様薬剤の効果をスクリーニングする *in vivo* の系として有用であると考えられる．

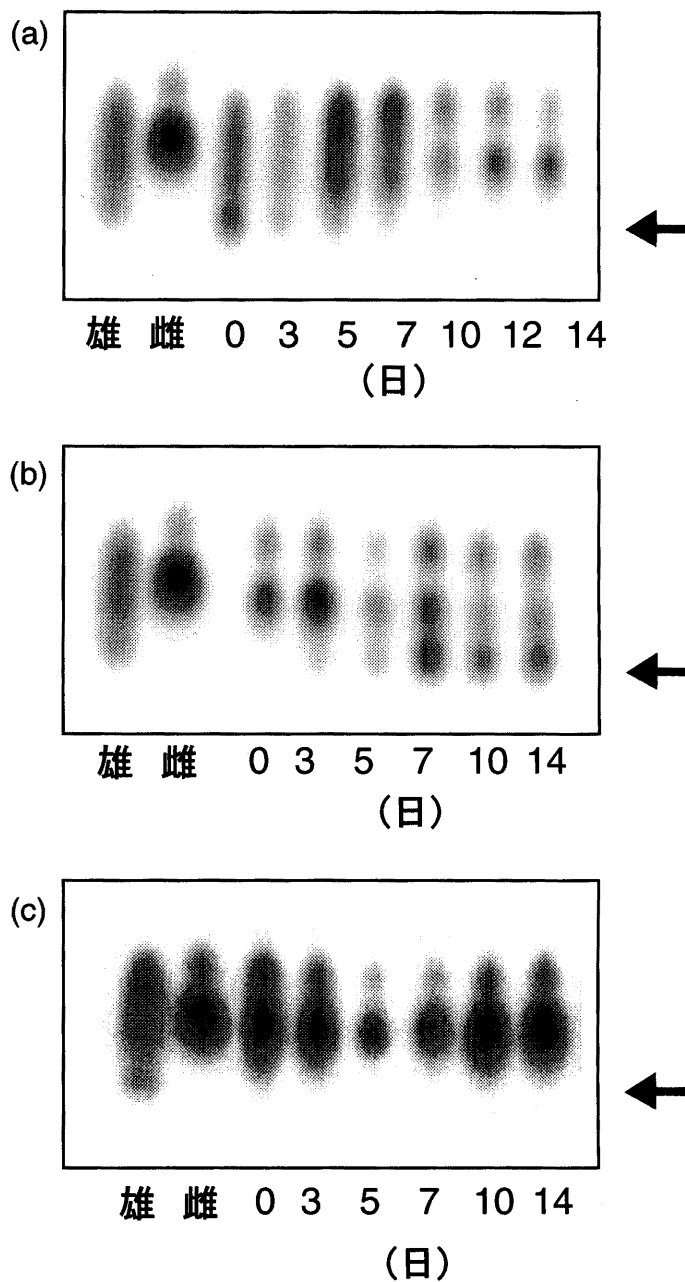


図2 各術後2週間のADGプロファイルの変化．

(a) 去勢後; (b) 去勢2週間後の雄にテストステロンの投与を開始後; (c) 去勢2週間後の雄にテストステロン(1 mg/kg)とフルタミド(50 mg/kg)を同時投与開始後の変化．それぞれ経時的にハーダー腺の分泌液を採取し，ADGプロファイルの14日間の変化をモニターした．矢印は雄に特有なスポットの位置を示す．