

ハーダー腺の分泌するアルキルジアシルグリセロールの 物性解明とその素材としての応用開発

東京大学 医学部

脊 山 洋 右

Fatty acid and alkyl compositions of 1-alkyl-2,3-diacylglycerols (ADG) in the Harderian gland of golden hamster were determined. Fatty acids of male ADG consisted of straight chain saturated acids. Both even- and odd-numbered acids were observed, indicating that acetyl- and propionyl-CoAs were equally used as primers in the fatty acid synthesis. In female ADG a large amount of iso- and anteiso-branched fatty acids were detected. Odd-numbered acids contained iso- together with anteiso-branchings, and even-numbered acids contained iso-branchings. These findings suggested that isobutyryl-, isovaleryl-, and 2-methylbutyryl-CoAs were used as primers in addition to acetyl- and propionyl-CoAs in fatty acid synthesis in the female gland. Such unusual primers are catabolic intermediates of valine, leucine, and isoleucine, respectively. Treatment with testosterone in female led to the disappearance of such branched chain fatty acids. Castration led to the appearance of iso- and anteiso-branched chain fatty acids. We conclude from these observations that the production of branched chain fatty acids in the Harderian gland of golden hamster is inhibited by testosterone at the step of isovaleryl-CoA dehydrogenase and 2-methyl branched chain acyl-CoA dehydrogenase. Thus androgens are essential to the control of the composition of ADGs in the golden hamster Harderian gland. This organ is a suitable model in the study of androgen receptor, and the application of such a unique ADG, bioactive lipid, will be the subject of a further communication.

1 緒 言

ハーダー腺は齧歯類の眼窩内に発達した外分泌腺で、脂質を分泌することで知られている¹⁾。湿重量の20%以上を脂質が占めている。この脂質はアルキルジアシルグリセロール (ADG) であることが多いが、動物種によりその脂肪酸及びアルキル残基の組成は異なっている。

本研究の対象となったゴールデンハムスターではこの外分泌脂質に雌雄差があることが知られていた。その違いについて、これまでは雄では直鎖の飽和脂肪酸から成るのに対し、雌では不飽和脂

肪酸が含まれているという報告があつて²⁾、不飽和結合の有無が雌雄差となって現れたものと考えられてきた。

ところが、本研究で改めてこの脂質を分析したところ、雌のADGには不飽和脂肪酸は存在せず、むしろイソ型およびアンテイソ型の分枝鎖脂肪酸が多量に含まれていることが明らかになった³⁾。

このことは、雌雄差の本態が脂肪酸生成におけるプライマーの違いにあることを意味している。acetyl-CoAがプライマーとして使われると偶数鎖の脂肪酸が合成されるのに対して、isovaleryl-CoA, isobutyryl-CoA, 2-methylbutyryl-CoAがプライマーとして使われるとイソ型、アンテイソ型分枝鎖が合成されることがわかっているので、これらのCoA誘導体を生成する分枝鎖アミノ酸の代謝調節が雌雄によって異なっていることが浮かび上がってきた。

分泌脂質の性差をもたらすべく性ホルモンによって調節されているのは、従来考えられていた

Characterization of alkyldiacyl-glycerols from the Harderian gland

Yousuke Seyama

Faculty of Medicine,
University of Tokyo



ような脂肪酸不飽和化酵素 (desaturase) ではなく、分枝鎖アミノ酸の分解過程の酵素であることが明らかになったといえよう⁴⁾。

血小板活性化因子 (PAF) がアルキルリン脂質であるように、ADGのようなアルキル脂質は生理活性脂質でもある。本研究はこの脂質に見られる雌雄差の本態を明らかにすることによって、その特性を生かした脂質の応用開発の基礎を与えようというものである⁵⁾。

2 実験

2.1 試料調製および分析方法

ゴールデンハムスターのハーダー腺から脂質をクロロホルム/メタノール溶液で抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーでADGを単離精製した。ADGをメタノリシスして得られた脂肪酸メチルエステル、およびイソプロピリデン誘導体化したアルキル残基はそれぞれガスクロマトグラフィー質量分析機 (GC/MS) にて同定し、ガスクロマトグラフィー (GLC) にて定量した。ADGおよび脂肪酸メチルエステル、アルキルグリセロールは C^{13} および H^1 -NMRによっても分析した³⁾。

2.2 雄に対する去勢と雌に対するテストステロン投与

雄のゴールデンハムスターを去勢し、8週間飼育した後ハーダー腺を摘出してそのADGの分析を行った。雌にはテストステロン錠剤を頸部皮下に埋め込み、8週間飼育後にハーダー腺のADG分析を行った⁴⁾。

3 結果

3.1 薄層クロマトグラフィーにみるADGの雌雄差

シリカゲルプレートにより中性脂質を分離した薄層クロマトグラフィーでは、雌のADGが2つのスポット (F1、F2) に分かれるのに対して、雄のADGは3つのスポット (M1、M2、M3) に分離される

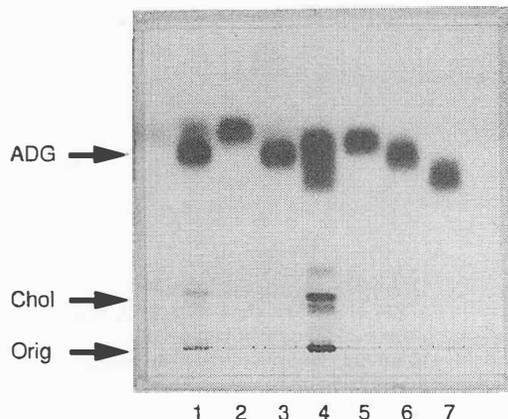


図1 ゴールデンハムスターハーダー腺脂質の薄層クロマトグラム

1: 雌の粗脂質; 2: 雌ADG (F1);
3: 雌ADG (F2); 4: 雌の粗脂質
5: 雄ADG (M1); 6: 雄ADG (M2);
7: 雄ADG (M3)

ADG: 1-alkyl-2, 3-diacylglycerol;

Chol: cholesterol; Orig: origin

プレート: silica gel 60 (Merck, Darmstadt)

展開溶媒: hexane-diethylether-acetic acid
(80:20:1, v/v)

検出: 20%硫酸噴霧後に120℃に加熱

3.2 NMRによる分枝鎖の証明

雌のADGをNMRで分析したところグリセロールの3位にイソバレリアン酸が存在すること、および2位にはイソ型、アンテイソ型分枝鎖脂肪酸が多量に含まれていることが示された。さらに、単離したアルキルグリセロールの分析から雌のアルキル残基にもこの型の分枝鎖が存在することが明らかになった。

一方、雄のADGには脂肪酸、アルキル残基ともに、このような分枝鎖は認められず、直鎖の成分から構成されていることが示された。

3.3 ADGの脂肪酸組成

雄のADGの脂肪酸組成は単純で、直鎖の脂肪酸から成り、最も多いのは15:0という奇数酸であった。偶数酸だけではなく奇数酸も存在することが特徴である。

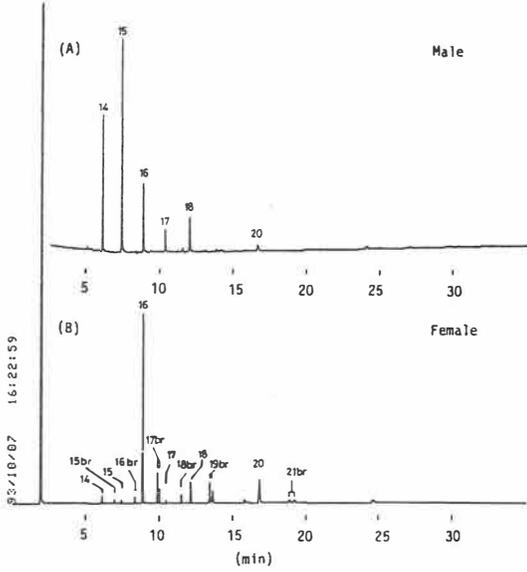


図 2 ハーダー腺ADGの脂肪酸メチルエステルのガスクロマトグラム

(A) 雄; (B) 雌

図中の数字 (14-21)は炭素鎖長を示す。
"br"は分枝鎖脂肪酸を意味する。

カラム: OV-1キャピラリーカラム (0.28mmx25m)
流速: 1 ml/min
温度: 180℃に1分保った後, 5℃/minで250℃まで昇温

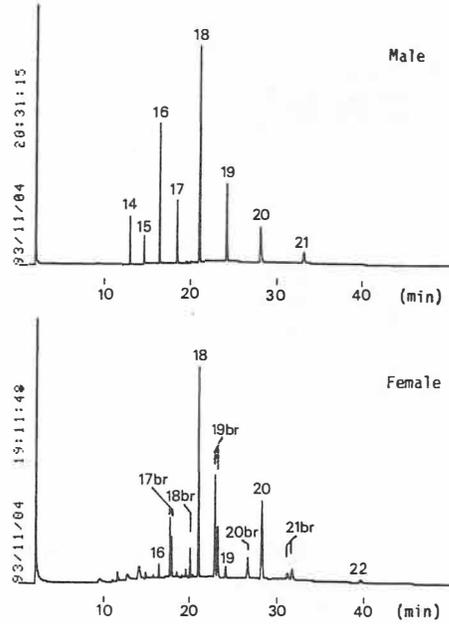


図 3 ADGに由来するalkylglycerolのisopropylidene誘導体のガスクロマトグラム

Male 雄; Female 雌

図中の数字 (14-22)は炭素鎖長を示す。
"br"は分枝鎖脂肪酸を意味する。

カラム: OV-1キャピラリーカラム (0.28mmx 25m)
流速: 1 ml/min
温度: 180℃に1分保った後, 5℃/minで250℃まで昇温

これに対して雌のADGでは多量の分枝鎖脂肪酸が含まれており、しかもその分枝の形がイソ型及びアンテイソ型であった。炭素数が奇数のものではイソ及びアンテイソ型、炭素数が偶数のものではイソ型の分枝鎖脂肪酸であった。脂肪酸鎖の中央部分には分枝は存在しない点がいづれが以前に報告したモルモットのハーダー腺脂質とは異なっている⁶⁾。

3.4 ADGのアルキル残基の組成

ADGのアルキル残基の組成にも脂肪酸と対応した雌雄差が見られた。

すなわち、雄のADGでは18:0を主成分として直鎖のものから構成され、偶数成分と共に奇数の成分も存在していた (図3)。

一方、雌のADGでは多量のイソ型およびアンテイソ型分枝鎖の成分が検出された。偶数鎖ではイソ型、奇数鎖ではイソ型およびアンテイソ型の分枝であった。

3.5 テストステロンの効果

雄のゴールデンハムスターを去勢すると、ハーダー腺のADGは薄層クロマトグラフィー上で3つのスポットからなる雄型から2つのスポットの雌型に変わった (図4)。

一方、テストステロンを投与した雌では逆に2つのスポットから成る雌型から3つのスポットの雄型に変わったことが示された。

そこで、去勢した雄のハーダー腺のADGの脂肪酸組成をGLCおよびGC/MSで分析したところ、イ

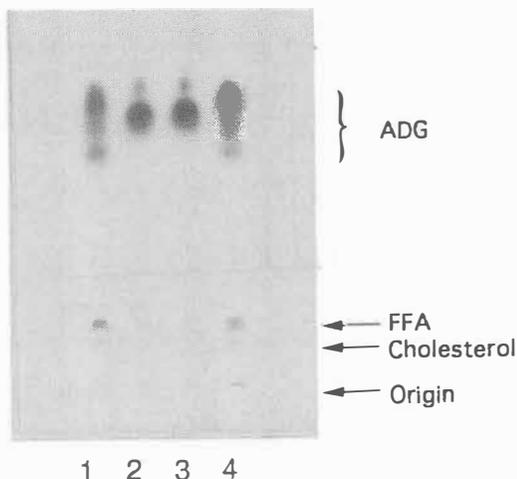


図4 ゴールデンハムスターハダダ腺脂質に対するテストステロンの効果

1: 雄; 2: 去勢した雄; 3: 雌;
4: テストステロンを投与した雌

ADG: 1-alkyl-2,3-diacylglycerol; FFA: free fatty acid

プレート: silica gel 60 (Merck, Darmstadt)

展開溶媒: hexane-diethylether-acetic acid (80:20:1, v/v)

検出: 20%硫酸噴霧後に120℃に加熱

ソ型およびアンテソ型分枝鎖脂肪酸が多量に検出され、雌に見られる特徴を有していた。アルキル残基組成も47%がイソ型およびアンテソ型分枝鎖を有するものになっていた。

一方、テストステロンを投与した雌のADGは直鎖脂肪酸のみから構成され、アルキル残基も直鎖であるという雄のADGのパターンに変わっていた。

4 考察

4.1 ゴールデンハムスターのADGにおける性差

ゴールデンハムスターのハダダ腺が分泌する脂質であるADGに雌雄差があることは15年以前から知られていたが、雌に不飽和脂肪酸が存在することが違の本質であるかのように考えられていた。今回の研究により雌のADGに存在したのは不飽和結合ではなくイソ型およびアンテソ型の分枝鎖であることが明らかになった。以前の報告は

ガスクロマトグラフィーの同定を誤った結果である。

アルキル残基は脂肪酸から合成されるので、雌のADGのアルキル残基にもイソ型およびアンテソ型分枝鎖が多量に存在していた。

4.2 ゴールデンハムスターのハダダ腺における脂肪酸合成のプライマー

雄のゴールデンハムスターのハダダ腺では偶数鎖及び奇数鎖の脂肪酸が合成されるので、acetyl-CoAとpropionyl-CoAがプライマーとして使われていることになる。

これに対して雌の場合にはイソ型及びアンテソ型分枝鎖脂肪酸が合成されるのでisobutyryl-CoA, isovaleryl-CoA, 2-methylbutyryl-CoAがプライマーとして使われていることを意味している。これらはそれぞれvaline, leucine, isoleucineという分枝鎖アミノ酸の代謝中間体であることから、雌では分枝鎖アミノ酸がacetyl-CoAとpropionyl-CoAにまで代謝されることなく、これらの中間体の段階で蓄積し、脂肪酸合成のプライマーとして使われたことを意味している。

4.4 ADG組成に雌雄差をもたらす酵素

ゴールデンハムスターのハダダ腺では雄ではacetyl-CoAとpropionyl-CoAが脂肪酸合成におけるプライマーとして使われ、雌ではisobutyryl-CoA, isovaleryl-CoA, 2-methylbutyryl-CoAがプライマーになる。このことは、valine, leucine, isoleucineという分枝鎖アミノ酸の代謝過程における2種類の酵素である2-methyl-branched-chain acyl-CoA dehydrogenaseとisovaleryl-CoA dehydrogenaseが雄では活性発現しているのに対し、雌では活性がないことを示唆している(図5)。

即ち、ゴールデンハムスターの分泌脂質に見られた雌雄差は分枝鎖アミノ酸の代謝過程が性ホルモンの調節を受けた結果であることが判明したといえよう。

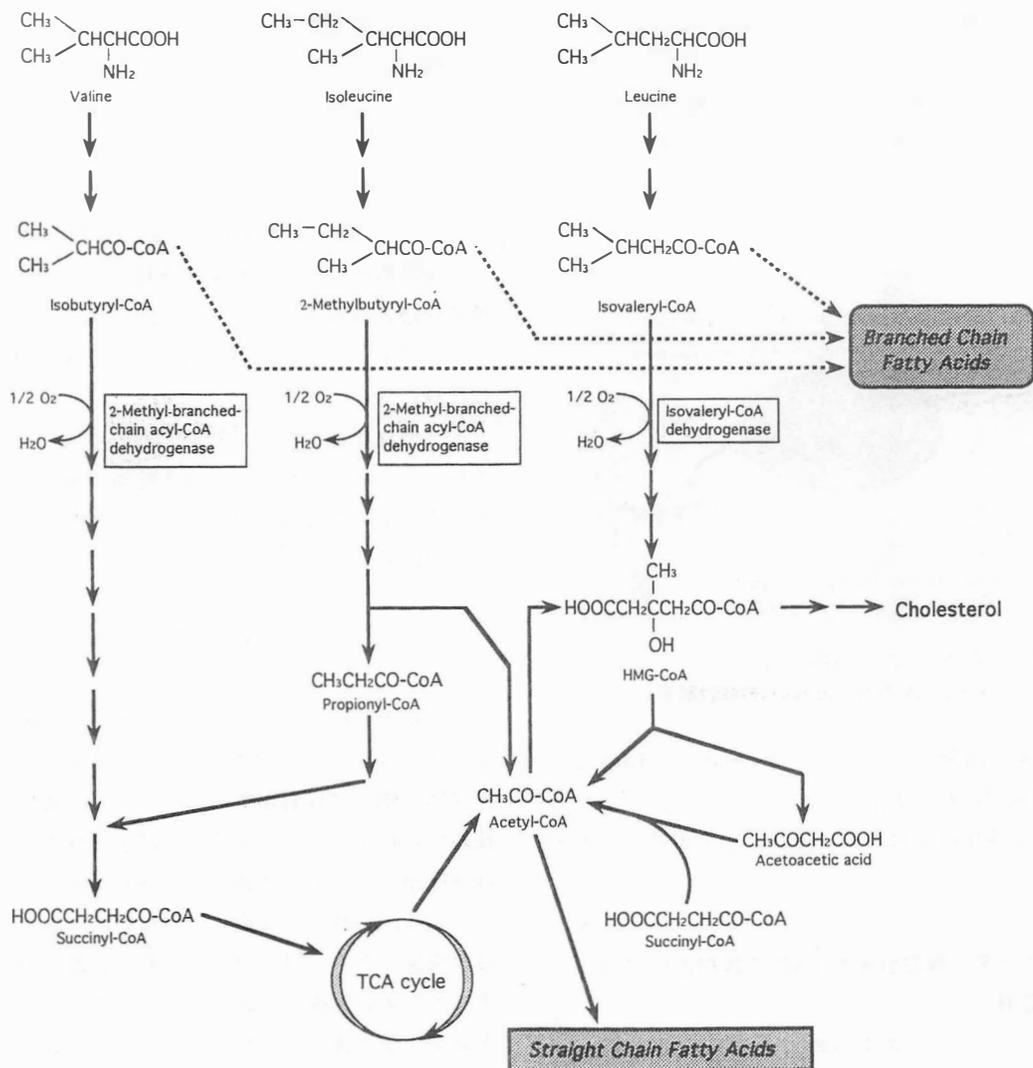


図 5 分枝鎖アミノ酸 (valine, leucine, isoleucine) の代謝

4.5 テストステロンによる酵素の発現調節

ゴールデンハムスターの雄を去勢し、雌に対してはテストステロン投与を行うという実験を行った結果、ハーダー腺のADGが雄は雌型に、雌は雄型に変わることが示されて、前述の2種類の酵素の発現を介して脂肪酸組成が変化することが実証された。即ち、テストステロンが存在する状態ではこれらの酵素が働いてvaline、leucine、isoleucineという分枝鎖アミノ酸はacetyl-CoAとpropionyl-CoAにまで代謝されるが、テストステ

ロンが存在しないと中間体のisobutyryl-CoA、isovaleryl-CoA、2-methylbutyryl-CoAが蓄積してイソ型およびアンティソ型の分枝鎖脂肪酸が合成される。

4.6 アンドロゲン受容体の役割

テストステロンは核内に存在するアンドロゲン受容体を介して染色体上の特定の遺伝子部位を活性化し、mRNAの発現、タンパク質の合成をもたらすものと考えられている。ゴールデンハムスター

のハーダー腺はまさにこの系を解析する上で格好のモデルであり、テストステロンがアンドロゲン受容体を介して働いた結果を分泌脂質であるADGの組成変化としてモニターすることが可能である(図6)。

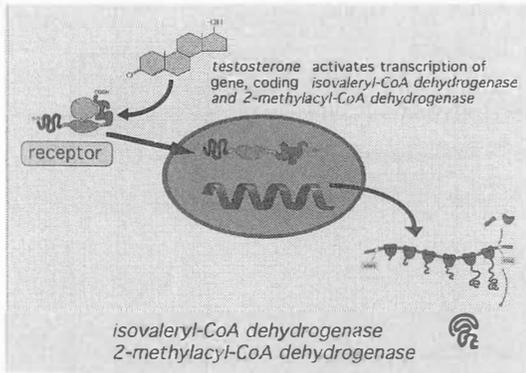


図6 アンドロゲン受容体を介した acyl-CoA dehydrogenaseの発現調節

しかも、薄層クロマトグラフィーという簡便な方法で鋭敏に検出することができるので、アンドロゲン受容体研究において優れたモデル系といえよう。

4.7 ハーダー腺の分泌するADGの素材としての応用

ゴールデンハムスターのハーダー腺の脂質はADGであるが、不飽和結合を全く含んでいないという特徴がある。その代謝の本質は今回の研究で明らかになったが、イソ型及びアンテイソ型分枝鎖の存在はこの脂質の素材としての応用を考える上で示唆に富んでいる。

即ち、ADGが直鎖の飽和脂肪酸及びアルキル残基から成っていると、そのままでは融点が高くヒトの体温では流動性が乏しいが、イソ型及びアンテイソ型の分枝鎖が導入されることによって融点が下がり、適度な流動性を確保することが可能になる。因みに、これらの分枝鎖成分を含まない雄では奇数鎖の導入およびC2やC3という極端に短い脂肪酸をグリセロールの3位に導入することに

よって融点を調節していることが判明した。

不飽和結合は空気中で不安定で、異臭の原因にもなるが、イソ型及びアンテイソ型分枝鎖脂肪酸は安定で扱いやすいという利点を有している。ゴールデンハムスターのハーダー腺が分泌するADGの果たす生理的役割は未だに推定の域を出ないが、創傷治癒に關与する細胞成長因子や^{7, 8)}、多量に分泌されるポルフィリン、或いはフェロモンのような生理活性物質の溶剤としての機能が考えられる。

イソ型及びアンテイソ型分枝鎖を導入したアルキルジアシルグリセロールは化粧品の素材として適しているのではないかとわれ、今後この方面の応用開発が期待される。

5 総括

ゴールデンハムスターのハーダー腺の脂質であるアルキルジアシルグリセロール(ADG)の雌雄差は雄の場合には直鎖であるのに対し、雌では分枝鎖が存在することによることが示された。これは分枝鎖アミノ酸の代謝過程の酵素が雄では発現しているが、雌では発現していない為にもたらされた現象である。雄に対する去勢と、雌に対するテストステロン投与実験により、このことはアンドロゲン受容体を介したテストステロンの効果であることが判明した。

本研究の意義は、ADGの性差の本態をあきらかにして、アンドロゲン受容体研究のモデル系を樹立したことと、イソ型及びアンテイソ型分枝鎖を有するADGの素材としての有効性を提唱した点にある。

引用文献

- 1) Seyama Y, Kasama T, Yasugi E, et al., : Lipids in Harderian glands and their significance, In : Webb SM, Hoffman RA, Puig Domingo ML, Reiter RJ (eds) : Harderian glands, Springer-Verlag,

- Berlin, 195-217 1992
- 2) Lin WL, Nadakavukaren MJ, : Harderian glandlipids of male and female golden hamsters, *Comp. Biochem. Physiol.*, 70B, 627-630 1981
 - 3) Seyama Y, Otsuka H, Ohashi K, et al., : Sexual dimorphism of lipids in Harderian glands of golden hamsters, *J. Biochem.*, 117 661-670 1995
 - 4) Seyama Y, Hida A, Hayashi S, et al., : Androgenic control of 1-alkyl-2, 3-diacylglycerol in the Harderian gland of the golden hamster, *Mesocricetus auratus*, *J. Biochem.*, 119 in press, 1996
 - 5) Seyama Y, Otsuka H, Ohashi K, et al., : Sexual diversity of the lipid metabolism in the Harderian gland of golden hamster, *Microscopy Res. Technol.*, in press, 1996
 - 6) Yamazaki T, Seyama Y, Otsuka H, et al., : Identification of alkyldiacylglycerols containing saturated methyl branched chains in the Harderian gland of guinea pig, *J. Biochem.*, 683-691 1981
 - 7) Yokoyama Y, Kano K, Kaji K, et al., : Purification and characterization of a growth factor from the guinea pig Harderian gland, *J. Biol. Chem.*, 17058-17063 1989
 - 8) Yokoyama Y, Kano K, Matsuda Y, et al., : Effect of Harderian gland derived growth factor on the growth of corneal stromal cells, *Cornea*, 11 380-385 1992