

ヒト前立腺アンドロゲン・レセプター精製に関する研究

第3編：ヒト前立腺アンドロゲン・レセプターの精製
および精製アンドロゲン・レセプターの定性

広島大学医学部泌尿器科学教室（主任：仁平寛巳教授）

中 原 満

PURIFICATION OF HUMAN PROSTATE ANDROGEN RECEPTOR

III. PURIFICATION OF ANDROGEN RECEPTOR AND
CHARACTERIZATION OF PURIFIED ANDROGEN RECEPTOR

Mitsuru NAKAHARA

*From the Department of Urology, Hiroshima University School of Medicine**(Director: Prof. H. Nihira)*

With 855 g of benign prostatic hypertrophic tissue as starting material, the androgen receptor (AR) was purified by combining the affinity chromatography of heparin Sepharose CL-6B and of R1881-carboxymethyloxime-albumin Sepharose 4B. The final purification fraction had high-affinity, low-capacity binding to ^3H -R1881 in the presence of 1,000-fold molar excess of triamcinolone acetonide (TA) with a dissociation constant of 2.4 nM.

When the relative binding affinity was being assessed, the binding of the final purification fraction to ^3H -R 1881 was not suppressed by estradiol or TA and revealed the binding specificity of the AR. Polyacrylamide gel electrophoresis showed no albumin or TeBG mixed in the final purification fraction.

These results give evidence that the AR had been purified and that, in comparison with the original cytosol, the degree of purification was approximately 2,360 fold. The molecular weight of the purified AR was 32,000 as calculated by high performance liquid chromatography.

The fact the antiserum from rabbit immunized with the purified AR showed a reaction against the purified AR leads us to believe that antibodies for the AR were successfully produced. Further immunological study on AR measurement is considered to be of great importance.

Key words: Prostate, Androgen receptor, Purification

緒 言

内分泌療法に対する前立腺癌の反応性を予測する指標として、前立腺細胞内アンドロゲン・レセプター (AR) の定量が試みられてきた。AR の定量は合成ステロイドの R 1881 を ligand とし、buffer 中に molybdate を加えたレセプター測定法を用いること

で比較的安定した結果が得られるようになったが、臨床的にはまだ広く用いられるに至っていない。この理由としてはレセプター測定法の操作が繁雑で技術を要すること、測定に必要な充分量の組織が採取しにくいことなどが考えられた。そこでレセプターに対する抗体を使用した新しい測定法の確立を目的として、ヒト前立腺 AR の精製を試みてきた^{1,2)}。第1編¹⁾におけ

る affinity chromatography を用いた成績では、AR は部分的に精製可能となったが精製倍率が低かった。そこで第2編²⁾では精製における問題点の改善を目的として、ヒト前立腺 AR の生化学的特性を検討した。その結果は、(1) buffer に molybdate を加えると AR の安定性が増すこと、(2) NaSCN はヒト前立腺 AR の結合能に強く影響するため、ヒト前立腺 AR の精製に使用するには注意を要すること、(3) heparin も高濃度では AR の結合能に影響が出ることなどが判明した。そこで著者が行なってきた AR 精製法の改善にこれらの点を応用して再び AR の精製を試みたところ、精製倍率の著明な改善が得られたのでその成績を報告する。そして精製した AR の物理化学的性状について検討し、さらに精製 AR に対する抗体の作製も試みたのでこれらの成績もあわせて述べる。

材料と実験方法

1. 試 薬

³H-5 α -dihydrotestosterone (³H-DHT) は New England Nuclear より購入した。Sephacryl S-300 は Pharmacia 社製を使用した。hydroxylapatite は Bio-Rad 社 DNA grade を使用した。高速液体クロマトグラフィーの marker protein は Oriental 社製 MW-marker (290,000~12,400) を使用した。その他は既報^{1,2)}と同じである。なお R1881-carboxymethylxime-bovine serum albumin Sepharose 4B は、methyltrienolone-3-carboxymethylxime (分子量 357) 25 mg (24 モル) と bovine serum albumin (BSA, 分子量 68,000) 200 mg (1 モル) とを Erlanger 法³⁾で反応させると 10 モル結合のものが得られ、これに活性 Sepharose 4B を結合させて作製した。

2. 材 料

前立腺肥大症の診断で被膜下前立腺摘除術により得られた前立腺腺腫を液体窒素により瞬間に凍結して、-80°C で保存したものを材料とした。

3. 実験方法

a. Dextran coated charcoal (DCC) 法と hydroxylapatite (HAP) 法の比較

TEMMo buffer (Tris-HCl 10 mM, EDTA-Na₂ 1.5 mM, 2-mercaptoethanol 1 mM, Na₂MoO₄ 10 mM, pH 7.4) を使用し、既報¹⁾と同様の方法で cytosol を作製した後、蛋白濃度が 4 mg/ml, 0.8 mg/ml になるように調整して2種類の検体を得た。これらの検体 500 μ l ずつを ³H-R1881 (0.2 nM~10

nM), その 1,000 倍量 triamcinolone acetonide (TA), さらに100倍量の非標識 R1881 を加えた系と加えない系において 0°C, 24時間反応後、DCC 法、あるいは HAP 法で遊離型 ³H-R1881 (Free) と ³H-R1881・AR 複合体を形成した結合体 (Bound) との分離 (B/F 分離) を行ない、既報と同様に Scatchard plot 法⁴⁾で解析して比較検討した。DCC 法は DCC (0.05% Dextran T-70, 0.5% charcoal, TEMMo buffer) 1 ml と検体とを15分間 incubation 後に 3,000 rpm で15分間遠沈した後、その上清を液体シンチレーション・カウンターで放射活性を測定した。HAP 法は Trachtenberg らの方法⁵⁾に従った。

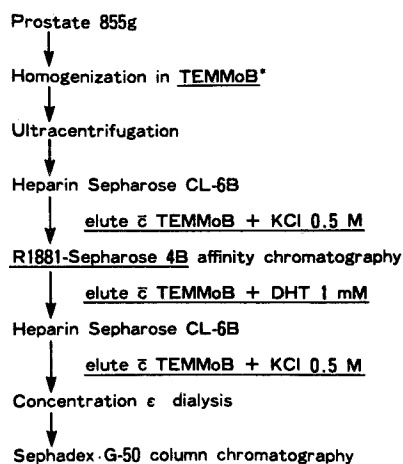
b. AR の精製 (Fig. 1)

1) Cytosol の 作 製

凍結保存した前立腺肥大症の腺腫組織を精製の1週間前より液体窒素の存在下に粉碎し、855 g の粉末状組織を得た。これに4倍量の TEMMo buffer を加えて homogenize し、先と同様にして 2,000 ml の cytosol を作製した。

2) Heparin Sepharose CL-6B affinity chromatography

Heparin Sepharose gel 200 ml と上記 cytosol 2,000 ml と batchwise に 4°C, 1時間反応後、光電比色計(島津製作所, UV-200)でモニターしながら



*TEMMoB: Tris-HCl 10 mM, EDTA 1.5 mM,
2-mercaptoethanol 1 mM,
Molybdate 10 mM, pH 7.4

Fig. 1. Purification procedure of androgen receptor from human benign hyper-trophic prostate. Underlines show revised procedure of purification.

O.D. 280 が 0.03 になるまで TEMM₀ buffer で洗浄した。特異的吸着分画は 0.5 M KCl 加 TEMM₀ buffer 1,000 ml で溶出した。

3) R1881-carboxy-methylxime-BSA-Sepharose 4B affinity chromatography (以下 R1881-Sepharose)

Heparin Sepharose より得られた特異的吸着分画を triamcinolone acetonide (TA) 10 μ M 存在下に R1881-Sepharose 50 ml と 0°C, 24時間 batchwise に反応させた。gel を Buchner funnel に移し TEMM₀ buffer 2,000 ml で洗浄した。ついで 1 mM 5 α -dihydrotestosterone (DHT) を含む TEMM₀ buffer 400 ml 中に移し, 0°C, 24時間 batchwise に反応後, Buchner funnel でろ過, 特異的結合分画を採取した。

4) 2nd-heparin Sepharose chromatography

上記で得られた特異的結合分画を再度 heparin Sepharose gel 50 ml と columnwise に反応させた。TEMM₀ buffer 2,000 ml で非特異的吸着物を洗浄した後, 特異的吸着分画は 0.5 M KCl 加 TEMM₀ buffer 200 ml で溶出した。

5) 濃縮

上記で得られた特異的吸着分画 200 ml は Amicon diaflow PM 10 (Amicon 社) を使用して限外ろ過によって 10 ml まで濃縮した。

6) Sephadex G-50 column chromatography

上記検体を TEMM₀ buffer で平衡化した Sephadex G-50 column chromatography に移し, TEMM₀ buffer で溶出, void volume の分画を最終精製分画とした。

c. 精製 AR の定性

1) Scatchard plot 法による解析

各精製段階で得られた検体の ³H-R1881 (0.1~10 nM) との結合能を検討するために, 1,000 倍量 TA 存在下に 500 倍量の非標識 R1881 を加えた場合と加えない場合との 2 系列でそれぞれ 0°C, 24時間反応させた後に HAP 法で, B/F 分離を行ない, Scatchard plot 法で AR の結合能を解析した。

2) 精製 AR に対する諸種ステロイドの比親和性 (relative binding affinity) についての検討

精製 AR 200 μ l と ³H-R1881 10 nM, それに 10 倍, 100 倍, 1,000 倍の TA をそれぞれ加えたもの, また ³H-R1881 10 nM とその 1,000 倍量 TA を加えたものにさらに 10 倍, 100 倍, 1,000 倍量の非標識 R1881, estradiol (E₂) をそれぞれ添加したものを 0°C, 24時間反応させた。これを HAP 法で B/F 分離

を行なった後, 放射活性を測定した。各ステロイドの R1881 に対する比親和性の算出は既報²⁾と同様に行ない, cytosol で得られた結果と比較検討した。

3) Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

7.5% T, 5% C の polyacrylamide gel (5×60 mm) に cytosol 50 μ l, 1st heparin Sepharose の特異的溶出分画 100 μ l, 精製 AR 150 μ l をそれぞれのせ, 既報¹⁾と同様に PAGE で検討した。同時に ³H-R1881 と 24 時間反応させたものも泳動し, 2 mm ほどのスライスにした後, 各スライスの放射活性も測定した。

4) Sephacryl S-300 column chromatography

精製 AR 500 μ l と 10 nM ³H-R1881, 10 μ M TA, さらに同時に非標識 R1881 を加えた場合と加えない場合において 0°C, 24 時間反応させた後, 各検体を Sephacryl S-300 column chromatography にかかけ, 1 ml ずつの分画で採取して各分画の放射活性を測定した。

5) 蔗糖密度勾配遠心法

精製 AR 500 μ l を 10 nM ³H-R1881, 10 μ M TA, さらに非標識 R1881 を加えた場合と加えない場合において 0°C, 24 時間反応させ, DCC buffer を加えて遊離の ³H-R1881 を遠沈除去後, 上清 250 μ l を既報²⁾と同様に蔗糖密度勾配遠心法で検討した。

6) 高速液体クロマトグラフィー

精製 AR 500 μ l を ³H-DHT, および非標識 DHT の有無下に 24 時間反応させた後に, DCC 法で遊離 ³H-DHT を除去した検体 150 μ l をゲル濾過高速液体クロマトグラフィー (TSK-3,000 SW ゲルカラム) に移し, 0.2 M phosphate buffer (pH 7.4) で 0.7 ml/min で溶出し, 1 分ごとに分画を採取して各分画の放射活性を測定した。

d. 抗ヒト前立腺 AR 抗体の作製

精製 AR 100 μ g を complete Freund's adjuvant とともに家兎背部皮内に免疫し, 4 週間, 8 週間に採血, 8 週目の採血後 50 μ g を booster し, 12 週目に採血した。採取した血液はいずれも血清に分離し, ゲル内拡散法 (Ouchterlony 法) でヒト血清, およびヒト前立腺 cytosol との反応性を検討した。

AR の ¹²⁵I-Na による標識は, 精製 AR 5 μ g を lactoperoxidase 法⁶⁾でヨウ素化した。¹²⁵I-AR の 5,000 cpm ずつと, 各種濃度 (1,000 倍~100,000 倍) に希釈した抗ヒト AR 抗体とを 4°C, 24 時間反応させた後, 2 抗体法で遊離 ¹²⁵I-AR (Free) と抗体と結合した ¹²⁵I-AR (Bound) との分離 (B/F 分離) を行なって結合能を検討した。

e. 蛋白量測定

BSA を標準蛋白として BioRad 社のプロテインアッセイキットで測定した。

結 果

1. DCC 法と HAP 法の比較

Cytosol AR の ^3H -R1881 との結合能を Scatchard plot 法で解析すると、DCC 法および HAP 法の両者ともに高結合親和性 (high affinity)、一定結合部位数 (low capacity) の結合がみられた (Fig. 2)。これを蛋白濃度あたりの結合能でみると、最大結合部位数 ($V_{\max}$) は 0.8 mg/ml の蛋白濃度では DCC 法が HAP 法と比較して小さくなる傾向が認められた (Table 1)。

2. AR の精製

Heparin Sepharose での溶出相は第 1 編と同様であった。

Sephadex G-50 では void volume の 35 ml を最終精製分画とし、 0.1 mg の蛋白が得られた。

3. Scatchard plot による解析

Cytosol, 1st-heparin Sepharose の特異的溶出分画、および精製 AR 分画とも TA 存在下に ^3H -R1881 と高親和性で一定結合部位数の結合能を有していた。蛋白量あたりの最大結合部位数は 9.9 fmol/mg protein, 78 fmol/mg protein および 23 pmol/mg protein と精製とともに増加した。解離定数は 0.9 nM , 2.2 nM および 2.4 nM と精製とともにやや低下傾向が認められた (Fig. 3)。蛋白量あたりの ^3H -R1881 との結合能で計算すると、精製 AR はもとの cytosol に比較して約 2,360 倍の精製倍率となり、第 1 編と比較して精製倍率の著明な改善が得られた (Table 2)。

4. 精製 AR に対する諸種ステロイドの比親和性の検討

精製 AR の ^3H -R1881 との結合は TA や E_2 では抑制されず、R1881 と DHT で強く抑制された。これは TA 存在下の ^3H -R1881 と cytosol の結合特性に類似しており、精製 AR はアンドロゲンと特異性が高い結合を示した (Table 3)。

5. PAGE

第 1 編の成績と同様であった。すなわち cytosol では多数の染色バンドが認められたが、精製 AR 分画では明らかな染色バンドは存在せず、また ^3H -R1881

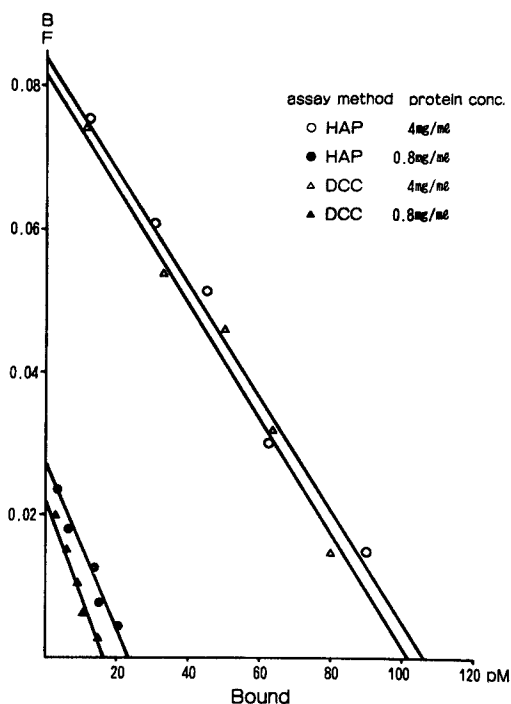


Fig. 2. Comparison of dextran coated charcoal and hydroxylapatite assays for the measurement of human prostatic cytosol androgen receptor by Scatchard plot analysis

Table 1. Comparison of dextran coated charcoal and hydroxylapatite assays for the measurement of human prostatic cytosol androgen receptor at different protein concentrations

Protein concentration (ng/ml)	DCC assay		Hydroxylapatite assay	
	4	0.8	4	0.8
Androgen receptor content (fmole/mg protein)	25.0	19.3 (77%)	26.4	28.1 (106%)
Affinity ($\text{Kd} \times 10^3 \text{ M}$)	1.2	0.7	1.2	0.8

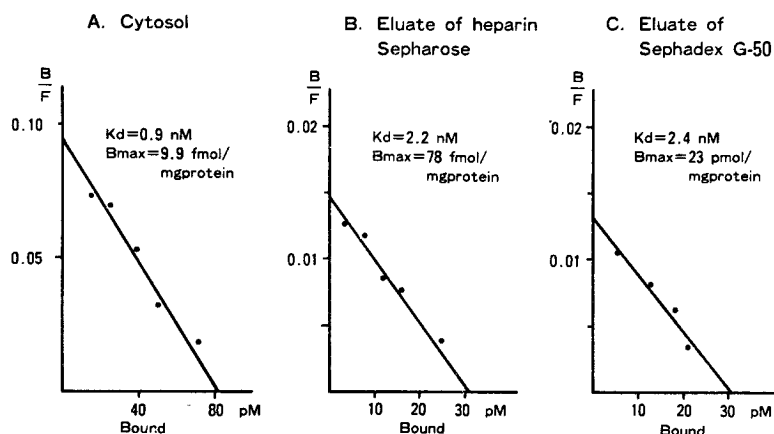


Fig. 3. Scatchard plot analysis of the specific binding of ^3H -R1881 to cytosol, eluate of 1st-heparin Sepharose, eluate of Sephadex G-50 in the presence of 1,000-fold molar excess of triamcinolone acetoneide

Table 2. Purification scheme of androgen receptor from human benign hypertrophic prostate

Purification step	Volume (ml)	Protein (mg)	Specific binding (d. p. m. $\times 10^6$)	Specific activity (d. p. m. / mgprotein)	Recovery (%)	Purification fold
Cytosol	2,000	16,496	30.7	1.9×10^3	100	1
1st heparin Sepharose	1,200	489	7.2	1.5×10^4	23	7.9
R1881-affinity	300	13	n. m. *	n. m.	n. m.	n. m.
2nd heparin Sepharose	200	n. m.	n. m.	n. m.	n. m.	n. m.
Sephadex G-50	35	0.1	0.4	4.4×10^6	1.4	2361

n. m. *: not measurable

Table 3. Relative binding affinity of various steroids for the binding of ^3H -R1881 to cytosol and purified androgen receptor in the presence of 1,000-fold molar excess of triamcinolone acetoneide

	Relative binding affinity(%) cytosol	Purified AR
R1881	100	100
DHT	89	n.m.
E ₂	0.3	1
R5020	0.3	n.m.
TA	n.m.	0.17

* n.m.=not measured

も gel 内に泳動されなかった。これらのことより精製分画中に含まれる可能性がある albumin, TeBG

などの混入は認めないと考えられた。

6. Sephacryl S-300 column chromatography
 ^3H -R1881 のピークは void volume のみ認められ、このピークは非標識 R1881 で抑制された (Fig. 4)。

7. 蔗糖密度勾配遠心法
数個の小さな ピークが散在し、有意な ピークを認めなかった。

8. 高速液体クロマトグラフィー
Adenylate kinase (分子量 32,000) に一致する ^3H -DHT の単一なピークが得られ、このピークは100倍量の非標識 DHT で抑制された。このことよりピークは AR と DHT との特異的な結合によるもので、AR の分子量は約 32,000 と考えられた (Fig. 5)。

9. 抗ヒト AR 抗体の作製

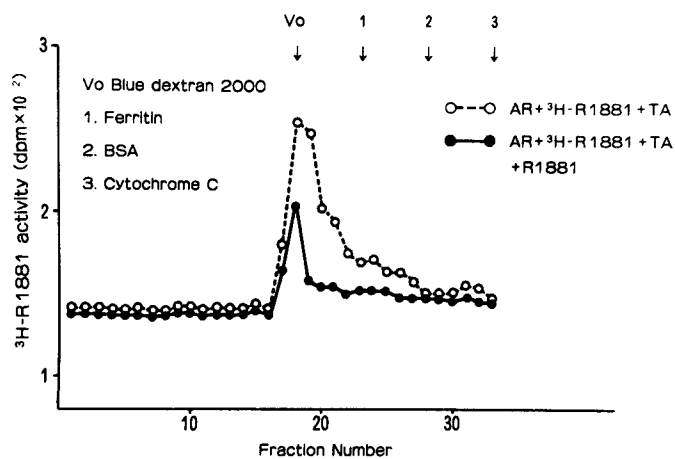


Fig. 4. Elution profile of Sephacryl S-300 column chromatography of purified androgen receptor

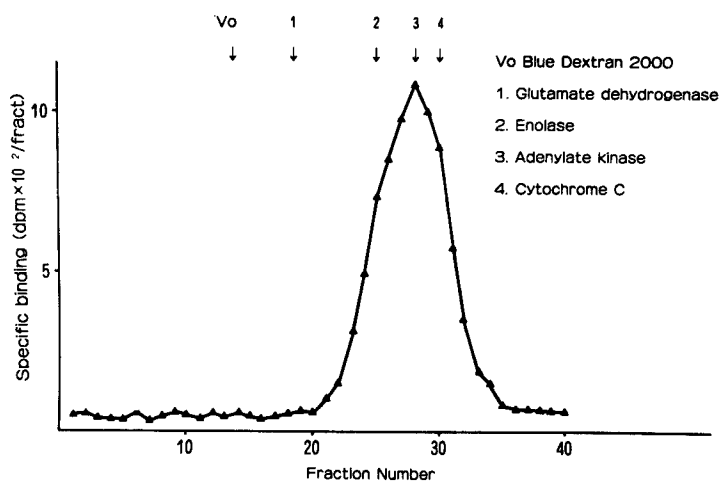


Fig. 5. High-pressure liquid chromatography of purified androgen receptor

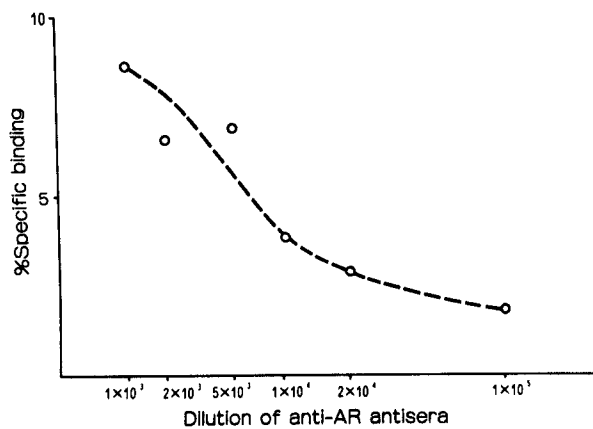


Fig. 6. Dilution curve of anti-androgen receptor antiserum

家兎に免疫して得られた抗ヒト AR 抗血清を Ouchterlony 法で検討すると、ヒト血清とは沈降線を認めず、cytosol と沈降線が認められた。ヨウ素標識精製 AR と抗ヒト AR 抗体とは結合能が低いものの反応が認められた (Fig. 6).

考 察

ヒト前立腺肥大症の腺腫組織から AR を精製した成績を示した。今回の精製法は基本的には第 1 編¹⁾と同様であるが、次の諸点を改善した。sodium molybdate を加えた TEMMo buffer は AR 安定化に有用²⁾であることが判明したので、前立腺組織のhomogenize の段階から使用することとした。TEMMo buffer を使用した際に heparin Sepharose への AR の吸着に影響が出ることが懸念された。そこで結果には示していないが、cytosol AR を ³H-R1881 で標識したものを使用して予備実験で検討したところ heparin Sepharose への吸着が確認され、また吸着された ³H-R1881・AR は 4 mg/ml heparin、あるいは 0.5 M KCl でともに約 60% が溶出された。これはラット前立腺 cytosol AR での heparin Agarose からの溶出が 3 mg/ml heparin で 55%、0.6 M KCl で 78% であったとする報告⁷⁾に一致し、どちらも AR の溶出に有効と考えられた。しかし heparin Sepharose から AR を heparin で溶出すると次の affinity chromatography に悪影響が出るとする報告⁸⁾があって、著者の検討でも 4 mg/ml heparin は AR の結合能に影響する結果²⁾を得ている。またプロゲステロン・レセプター (PgR) は heparin と結合することによりプロゲステロンとの結合能が抑制されるが、これは 0.5 M KCl を加えることにより可逆的に結合能を回復することが報告⁹⁾されている。そこで今回は heparin Sepharose からの AR の溶出は、4 mg/ml heparin の代わりに 0.5 M KCl を使用することとした。

つぎにアンドロゲンを ligand とする affinity chromatography は、今回は特異性がより高い R1881 を ligand とする gel を使用した。予備実験ではこの gel への AR の結合は約 25% で、他の affinity gel の報告^{10,11)}と比較して結合率が低いものであった。affinity gel からの AR の解離条件が精製の重要な点で、前回は AR の解離を低温度下で促進する目的で NaSCN を使用した。しかし NaSCN は AR の結合能に強く影響することが判明²⁾したので、今回の精製実験には使用しないことにした。ラット前立腺において mersalyl acid により AR の解離が

可逆的に促進されることが報告¹²⁾されている。そこで著者はヒト前立腺 cytosol でこの実験を追試したが、この方法は AR 精製には有用でなかった (結果不提出)。今回は AR の解離条件として、AR の測定に用いる低温、長時間での exchange assay の条件を使用することとし、大量非標識 DHT を 0°C、24 時間反応させた。

DCC 法は遊離のステロイドを charcoal に吸着させた後に遠心分離する B/F 分離法で、操作が簡便で安価であることからレセプター測定に広く使われている。しかし低蛋白濃度や高イオン条件では charcoal がレセプターを吸着したり、レセプターと結合したステロイドを吸着したりするために問題があることが知られている^{5,12,13)}。一方 HAP 法は hydroxylapatite にレセプターが吸着することを利用した B/F 分離法で、高 KCl 濃度下でも各種レセプターの測定が可能である¹³⁾。また 1 mg/ml 以下の蛋白濃度以下では DCC 法を使用すると結合部位数が低く出するため、HAP 法が有用とする報告⁵⁾があって、著者の検討もこれを支持する結果を得た。そこで AR の定性は、可能なところは HAP 法で行なった。以上の改正点をまとめると以下のごとくなる。

1. AR 安定化の目的で、今まで使用した TEM buffer に代ってこれに sodium molybdate を加えた TEMMo buffer を精製操作の初めの段階から使用した。

2. Heparin Sepharose から AR を溶出する操作には、従来の 4 mg/ml heparin に代って 0.5 M KCl を使用した。heparin は AR の結合能に影響するので、次の操作の affinity chromatography に対する heparin の影響を除くためである。

3. アンドロゲンを ligand とする affinity chromatography には、今回は T-affinity gel よりも特異性がより高い R1881-affinity gel を使用した。

4. NaSCN は AR の結合能に対する影響が強いので、R1881-affinity gel からの AR の解離操作には NaSCN を使用しないことにした。その代りに大量非標識の DHT を 0°C で、24 時間反応させる方法を採用した。

5. 遊離型 ³H-R1881 (Free) と、³H-R1881・AR 複合体を形成した結合型 (Bound) との分離 (B/F 分離) の操作には、従来の DCC 法に代って hydroxylapatite (HAP) 法を使用した。これは DCC 法に使用する charcoal が低蛋白濃度、あるいは高イオンなどの条件下では AR に影響することが判明したからである。

今回は精製操作短縮のため前回の 1/2 量である855 g の前立腺組織から精製を開始し、最終精製分画は 0.1 mg の蛋白が得られた。この最終精製分画の $^3\text{H-R1881}$ との結合能を TA 存在下に飽和分析法を行ない、Scatchard plot で検討すると、高親和性で一定結合部位数の結合能を有することが判明した。解離定数は cytosol で 0.9 nM、最終 精製分画で 2.4 nM と最終精製分画が cytosol に比較してやや低かった。ラット前立腺 cytosol からの AR の精製においても解離定数は 3.6 nM から 6.5 nM に低下したと報告¹⁴⁾されており、著者の成績と同様の傾向を示した。cytosol AR を硫酸分画法で処理しても同様な解離定数の変化がおこることから、精製 AR の定数の低下は精製過程で何らかの因子が除去された結果と考えている¹⁵⁾。比親和性によるステロイド特異性の検討では estradiol や TA による明らかな抑制はみられず、精製 AR は cytosol AR と同様の結合特異性を有した。以上の成績は最終精製分画は AR としての結合特異性を残していることを示すものである。

精製倍数を蛋白量あたりの結合能で検討すると、最初に作製した cytosol に比較して 1st-heparin Sepharose で7.9倍、最終精製分画で2,360倍となり、精製倍率は第1編の成績に較べて著明な改善である。AR の精製は動物組織を材料とする報告^{7,8,14-20)}が散見され、affinity chromatography を使用した小実験でよりすばらしい成績もある^{14,15,20)}。ヒト前立腺 AR の大部分は DHT と結合した状態で存在²¹⁾するので精製材料としては不利であるため、精製の効率をよくするにはより特異性が高い affinity gel の出現が望まれる。heparin Sepharose における回収率は23%であり、これは先に述べた予備実験に比較して低い値となっている。予備実験では $^3\text{H-R1881}$ の回収率で計算しているのに対して、本実験では heparin Sepharose から溶出された AR を一度凍結して保存し、日を改めて凍結を解除して $^3\text{H-R1881}$ と反応させ、Scatchard plot によって AR 量を測定したために実験の精製段階より低い値となったものと考えられる。

精製 AR の定性実験の一つとして5% PAGE を使用した検討において、AR は gel 内へ移行しなかったと報告¹⁴⁾されている。著者は7.5% PAGE で cytosol AR の検討をしたところ、同様に gel 内に AR は移行を認めなかったが、TeBG や albumin は gel 内へ容易に移行した。そこでこれらの蛋白が精製 AR 内に混入しているか否かを検査する目的で PAGE を使用して検討すると、蛋白バンドも $^3\text{H-R}$

1881 のピークも認めなかった。この結果から精製 AR 内には TeBG や albumin の混入しないことが証認されたと考えられた。

Sephacryl S-300 における検討では、 $^3\text{H-R1881}$ で標識した AR のピークは void volume のところに存在した。また高速液体クロマトグラフィーを使用した検討では、 $^3\text{H-DHT}$ で標識した精製 AR は marker protein である adenylate kinase の部位と一致し、分子量は約 32,000 と推定された。ところが蔗糖密度勾配遠心法における検討では有意のピークが得られなかった。以上の3種の実験成績の間に不一致がみられる理由に考察を加えると、以下に述べるごとくである。子牛子宮から精製された ER は、蔗糖密度勾配遠心法で検討するとイオン濃度条件により沈降係数が 8S と 4S との間の移行性を残しているが、Sephadex G-200 での検討では void volume に溶出された。この成績の差は ER が精製されてもなお凝集傾向を示すため、低濃度 heparin によりこの凝集を抑制することが可能と報告されている²²⁾。ヒト子宮を材料としてこの実験を追試した報告では、精製 ER は SDS 処理により分子量 9万と7万に解離するが、Sephadex G-200, Sephacryl S-300 ではともに void volume に溶出され、分子量は数10万以上と述べられている²³⁾。この実験結果は著者の Sephacryl S-300 における検討結果と一致している。子牛精のう腺から得られた精製 AR が 0.02% heparin 存在下に Sephacryl S-200 の検討で void volume、および Stokes radius 35Å に一致する2つのピークが認められ、35Å の方は cytosol AR の値に一致し、void volume は精製 AR の凝集に起因すると推定されている¹⁵⁾。同一の精製 AR に関する5~20%の蔗糖密度勾配遠心法での検体では多くの放射活性のピークが認められ、この原因も精製 AR に凝集が起った可能性が考えられている¹⁵⁾。これらの実験結果は著者の蔗糖密度勾配遠心法の成績ともよく一致した。以上の報告における精製レセプターの定性の成績および著者の実験結果に共通して認められるのは精製 AR が不安定なことで、このために Sephacryl S-300, 蔗糖密度勾配遠心法、高速液体クロマトグラフィーなどにおける AR の検討成績に不一致がみられたものと考えられる。

Cytosol AR の分子量に関して、ラット前立腺では28万¹⁶⁾、8.5万¹⁴⁾、子牛精のう腺6万¹⁵⁾、ヒト前立腺では高イオン条件で11万~12万²⁴⁾、低イオン条件で27.5~28.3万²⁴⁾などと報告されている。これらに比較すると、高速液体クロマトグラフィーで検討した著者

の成績は約3.2万と小さいものであるが、ヒト前立腺 cytosol AR は 0.4 M KCl 下で3.2万とする報告²⁵⁾とは一致した。ステロイド・レセプターは種々の条件で分子形態が変わることが知られ、cytosol ARの沈降係数に関しては高イオン条件で3~5S、低イオン条件で8~9Sなどの報告がある^{26,27)}。このような分子形態の変化に対する説明として、いくつかのレセプター分子モデルが提唱されている^{28,29)}。すなわちレセプターはいくつかの構成因子から成立しており、これらが種々の条件で解離、会合すると想定されている。

正常結合部位をもつ最小レセプターは meroreceptor といわれ²⁹⁾、その生成は蛋白分解酵素、変性などによることが知られている。meroreceptor の沈降係数は 2.8~3 S, stokes radius は 23~24 Å, 分子量は3万~4万で、ステロイドとの結合部位は存在するが核や DNA との結合部位はないと考えられている²⁹⁾。しかしヒツジ精のう腺から得られた精製 AR は分子量 2 万~2.5 万と小さいが、DNA との結合部位が存在するとの報告もある¹⁹⁾。著者がヒト前立腺肥大症の腺腫組織から作製した精製 AR は、分子量から考えると meroreceptor 可能性がある。ラットの前立腺 cytosol AR を Puca ら²²⁾の方法に準じて精製した際に、精製操作の進行とともに AR の沈降係数が 8 S から 4 S へと小さくなることが報告されている⁹⁾。著者の実験においても精製操作の途中で ³H-R1881 との結合因子以外の AR の部分が解離され、AR の分子量が小さくなった可能性が考えられ、細胞内に存在する蛋白分解酵素が解離の原因となり得るので、AR 精製にあたってこの酵素類を抑制するための工夫が必要と考えられた。

以上の成績をまとめると、最終精製分画は分子量が従来の報告に比較して小さいが、AR としての結合能を有し、albumin や TeBG の混入はなく、目的とする AR が精製されたことを示すものである。

精製 AR に対する抗体作製の試みでは、得られた抗血清は ¹²⁵I で標識した AR との結合率が低いものの反応が認められ、抗 AR 抗体の作製に成功したものと考えられた。現在までのところ AR に対する抗体の作製の報告はみられないが、ER においてはモノクローナル抗体の作製³⁰⁾、これらを利用した免疫組織学的な検討やラジオイムノアッセイ法によるレセプター測定^{31,32)}の簡易化などが報告されている^{31,32)}。そしてこの免疫組織学検討などから、E₂ が cytosol ER と結合した後に核内へ移行するという従来のレセプター説に代わり、レセプターは核内のみ存在するとする新しい考え方も提唱されるなど、精製レセプターを使用

した種々の免疫学的検査手法はレセプターの作用機序解明にも有用と考えられる³³⁾。最近では内分泌療法に対する前立腺癌の反応性を予測する指標として、核 AR 量が治療に対する反応とよい相関を示すとの報告が出てきた^{34,35)}。そこで AR に関して免疫組織学的な検討、ラジオイムノアッセイ法による測定などが開発されれば、複雑な操作を要した AR 測定の簡易化、広範な施設での検討などが可能となる。そして組織内の AR 量が組織構築と関連して検討できるようになれば、前立腺癌のアンドロゲン依存性の指標としての細胞内 AR に関する評価も確立されるであろう。さらに標的臓器におけるアンドロゲンの作用機序のより詳細な解明が期待され、AR の精製は andrology における多様な研究の展開に資するところが大きいと考えられる。

結 語

ヒト前立腺肥大症の腺腫組織から affinity chromatography を用いてアンドロゲン・レセプター (AR) を精製した。この精製 AR について物理化学的性質を検討し、さらに AR に対する抗体作製を試みて以下の成績を得た。

1. ヒト前立腺 AR の精製について

前立腺組織 855 g から heperin Sepharose, R 1881 affinity chromatography³⁾ などを使用して最終精製分画 100 µg を得た。

2. 精製 AR の性質

a. 最終精製分画は 1,00 倍量 triamcinolone acetate (TA) 存在下に ³H-R1881 と高結合親和性 (high affinity)、一定結合部位数 (low capacity) の結合を認め、その解離定数は 2.4 nM であり、AR の結合能を残していた。

b. 精製 AR の諸種ステロイドに対する比親和性 (relative binding affinity) を検討すると、³H-R1881 と精製 AR の結合は R1881 で強く抑制され、TA や estradiol では抑制されず、AR としての高い結合特異性を示した。

c. 精製倍率を蛋白量あたりの結合部位数で計算すると、cytosol の約2,360倍となった。

d. 7.5% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) による検討では、精製 AR 中に albumin, testosterone-estradiol binding globulin (TeBG) などの混入を認めなかった。

e. Sephacryl S-300 column chromatography では void volume に一致した ³H-R1881 のピークが得られた。これに対して高速液体クロマトグラフィ

ーによる検討では、分子量は約 32,000 と考えられた。両実験における成績の不一致の原因として前者では AR の凝集のため、後者の結果は AR の一部が解離したためなどの可能性が考えられた。

3. 精製 AR に対する抗体の作製

精製 AR を使用して家兎に免疫し、抗血清を作製した。この血清は精製 AR のみと反応が認められ、抗 AR 抗体作製に成功したと考えられた。

本論文の要旨は、第57回日本内分泌学会総会（東京）および第4回日本アンドロロジー学会総会シンポジウム（千葉）において発表した。

稿を終るにあたり御指導、御校閲を賜った恩師仁平寛已教授に深甚なる謝意を捧げます。また直接御指導を頂いた宮地幸隆博士、碓井亜博士、貴重な症例を提供して頂いた関連病院諸先生方に心より感謝致します。

なお、本研究の一部は昭和59年度文部省科学研究費の補助をうけたことを記して感謝します。

文 献

- 1) 中原 満：ヒト前立腺アンドロゲン・レセプター精製に関する研究。第1編 affinity chromatography を使用した精製法。泌尿紀要 32 : 1677~1688, 1986
- 2) 中原 満：ヒト前立腺アンドロゲン・レセプター精製に関する研究。第2編 ヒト前立腺アンドロゲン・レセプターの定性。泌尿紀要 32 : 1689~1699, 1986
- 3) Erlanger BF, Borek F, Beiser SM and Lieberman S : Steroid-protein conjugates II. Preparation and characterization of conjugates of bovine serum albumin with progesterone, deoxy-corticosterone, and estrone. J Biol Chem 234: 1090~1094, 1959
- 4) Scatchard G: The attraction of proteins for small molecules and ions. Ann NY Acad Sci 51: 660~672, 1949
- 5) Trachtenberg J, Hicks LL and Walsh PC : Methods for the determination of androgen receptor content in human prostatic tissue. Invest Urol 18: 349~354, 1981
- 6) Miyachi Y, Vaitukaitis E, Nieschlag E and Lipsett MB : Enzymatic radioiodination of gonadotropins. J Clin Endocr 34: 23~28, 1972
- 7) Mulder E, Foekens JA, Peters MJ and Van der Molen HJ : A comparison of heparin agarose and DNA cellulose for the characterization and partial purification of androgen receptors from rat prostate. Febs Letters 97: 260~264, 1979
- 8) Mainwaring WIP and Johnson AD : Use of the affinity label 17 β -bromoacetoxy-testosterone in the purification of androgen receptor proteins. Perspectives in steroid receptor research, Bresciani F., P.89~97, Raven Press, New York, 1980
- 9) Thorsen T : Interaction of heparin with the cytosol progesterone receptor from human mammary tumors : separate estimation of the 4 and 7S binding components with a simple dextran-charcoal assay. J Steroid Biochem 14: 221~227, 1981
- 10) De Larminat MA, Bruchowsky N, Rennie PS, Lee SP and Tertzakian G : Synthesis and evaluation of immobilized androgens for affinity chromatography in the purification of nuclear androgen receptor. The Prostate 5: 123~140, 1984
- 11) Sica V and Bresciani F : Estrogen-binding proteins of calf uterus. Purification to homogeneity of receptor from cytosol by affinity chromatography. Biochemistry 18 : 2369~2378, 1979
- 12) Traish AM, Muller RE and Wotiz HH : A new procedure for the quantitation of nuclear and cytoplasmic androgen receptors. J Biol Chem 256: 12028~12033, 1981
- 13) Peck Jr EJ and Clark JH : Effect of ionic strength on charcoal adsorption assays of receptor-estradiol complexes. Endocrinology 101: 1034~1043, 1977
- 14) Chang CH, Rowley DR and Tindall DJ : Purification and characterization of the androgen receptor from rat ventral prostate. Biochemistry 22: 6170~6175, 1983
- 15) Chang CH, Rowley DR, Lobl TJ and Tindall DJ : Purification and characterization of the androgen receptor from steer seminal vesicle. Biochemistry 21: 4102~4109, 1982
- 16) Mainwaring WIP and Irving R : The use of deoxyribonucleic acid-cellulose chromatography and isoelectric focusing for the char-

- acterization and partial purification of steroid-receptor complexes. *Biochem J* 134: 113~127, 1973
- 17) Irving R and Mainwaring WIP : Partial purification of steroid-receptor complexes by DNA-cellulose chromatography and isoelectric focusing. *J. Steroid Biochem* 5 : 711~716, 1974
- 18) Hu AL, Loor RM and Wang TY: Purification of a 3S cytosol androgen receptor from rat prostate that stimulates DNA-dependent RNA synthesis in vitro. *Biochem Biophys Res Comm* 65: 1327~1333, 1975
- 19) Foekens JA, Mulder E, Vrij L and Van der Molen HJ : Purification of the androgen receptor of sheep seminal vesicles. *Biochem Biophys Res Comm* 104: 1279~1286, 1982
- 20) Mainwaring WIP and Derry NS: Enhanced transcription of RNA genes by purified androgen receptor complexes in vitro. *J Steroid Biochem* 19: 101~108, 1983
- 21) Habib FK, Lee IR, Stitch SR and Smith PH: Androgen levels in the plasma and prostatic tissues of patients with benign hypertrophy and carcinoma of the prostate. *J Endocrinol* 71: 99~107, 1976
- 22) Puca GA, Sica V, Nola E and Bresciani F: Purification and properties of native oestrogen receptor. *J Steroid Biochem* 11 : 301~306, 1979
- 23) 小林俊三・飛岡紀彦・佐本常男・小林 学・岩瀬弘敬・正岡 昭・加藤泰治：固相化 estradiol を用いた affinity chromatography によるヒト子宮 estrogen receptor 精製の限界. *日内分泌会誌* 60 : 110~119, 1984
- 24) Murthy LR, Chang CH, Rowley DR, Scardino PI and Tindall DJ : Physico-chemical characterization of the androgen receptor from hyperplastic human prostate. *The Prostate* 5: 567~579, 1984
- 25) Kodama T, Fuse H and Shimazaki J: Low molecular weight component of androgen receptor in cytosols from benign hypertrophic human prostate treated with high KCl solution. *Endocrinol Japan* 29: 325~333, 1982
- 26) Wilson EM and French FS : Effects of proteases and protease inhibitors on the 4.5 S and 8 S androgen receptor. *J Biol Chem* 254: 6310~6319, 1979
- 27) Lea OA, Wilson EM and French FS: Characterization of different forms of the androgen receptor. *Endocrinology* 105:1350~1360, 1979
- 28) 村上 昭：ステロイドホルモンレセプター. *生化学* 53 : 1224~1229, 1981
- 29) Sherman MR, Rickering LA, Rollwagen FM and Miller LK: Mero-receptors: proteolytic fragments of receptors containing the steroid-binding site. *Fed Proc* 37: 167~173, 1978
- 30) Green GL, Nolan C, Engler JP and Jensen EV : Monoclonal antibodies to human estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 77: 5115~5119, 1980
- 31) King WJ and Greene GL: Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nucleus of target cells. *Nature* 307: 745~747, 1984
- 32) 小林俊三・佐本常男・小林 学・岩瀬弘敬・柄松章司・伊藤由加利・正岡 昭・ヒト乳癌エストロゲンレセプター. 測定用モノクローナル EIA キットの基礎的, 臨床的検討. *ホと臨* 33 : 1175~1179, 1985
- 33) Schrader WT New model for steroid hormone receptor? *Nature* 308: 17~18, 1984
- 34) Trachtenberg J and Walsh PC: Correlation of prostatic nucleic androgen receptor content with duration of response and survival following hormonal treatment in advanced prostatic cancer. *J Urol* 127 : 466~471, 1982
- 35) Concolino G, Marocchi A, Margiotta G, Conti C, Di Silverio F, Tenaglia R, Ferraro F and Bresciani V : Steroid receptors and hormone responsiveness of human prostatic carcinoma. *The prostate* 3: 475~482, 1982

(1986年7月31日迅速掲載受付)