

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

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

II. CHARACTERIZATION OF HUMAN PROSTATE ANDROGEN RECEPTOR

Mitsuru NAKAHARA

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

For improved purification of human prostate androgen receptors (AR), the effect of molybdate, NaSCN and heparin on the binding capacity of human prostate cytosol AR was investigated.

When 10 mM of molybdate in final concentration was added to cytosol, the increase in the maximum binding sites of AR to ^3H -R1881 was approximately 60%, while the dissociation constant was rather increased. With sucrose density gradient centrifugation, the cytosol with molybdate added showed a constant peak of 8~9 S. However, cytosol not enriched with molybdate did not show any significant peak. These results constitute evidence that molybdate has a stabilizing effect of the AR.

When 0.1~0.5 M of NaSCN was added to the cytosol, the dissociation as well as the association of the ^3H -R1881-AR complex showed a tendency to accelerate. However, at a concentration of 0.3 M and over NaSCN, the binding capacity of the AR rapidly disappeared. When the NaSCN was removed with gel filtration, the binding capacity of the AR recovered partially. The effect of NaSCN on the AR was therefore different from that on the estrogen receptors.

Four mg/ml of heparin accelerated the dissociation of the ^3H -R1881-AR complex. Furthermore, with the addition of 4 mg/ml of heparin, the maximum binding sites of AR decreased to 56%.

The above results make it clear that molybdate, NaSCN and heparin have various effects on human prostate cytosol AR, which might be applied to the purification of AR.

Key words: Prostate, Androgen receptor, Characterization

緒 言

前立腺細胞内アンドロゲン・レセプター (AR) の新しい測定法の確立を目的として, affinity chromatography などを用いてヒト前立腺肥大症の腺腫組織から AR の精製を試みた成績を第1編¹⁾で報告した。

その結果は精製 AR は ^3H -R1881 との結合能を残していたが, 精製倍率を蛋白量あたりの結合能で計算すると元の cytosol の約 38 倍と低く, この原因として AR 精製過程に種々の問題点が考えられた。そこで今回は精製の効率向上を目的とし, (1) molybdate のヒト前立腺 AR の安定化作用, (2) 前回の精製法の

重要な過程である affinity gel からの AR の特異的溶出に使用した heparin および NaSCN の, AR の結合能に及ぼす影響などについて検討した。これらの実験において興味ある結果が得られたので, その成績を報告する。

材料ならびに実験方法

1. 試 薬

Promegestone (R5020) は New England Nuclear より購入した。testosterone, estradiol, γ -globulin は Sigma 社製を用いた。molybdate は Na_2MoO_4 (片山化学特級試薬) を使用した。PC-10 は Pharmacia 社製である。他は第1編¹⁾と同様である。

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時に凍結し、使用まで -80°C で保存した。

3. 実験方法

a. 細胞質分画 (cytosol) の作製

凍結保存した前立腺肥大症の腺腫組織を液体窒素の存在下に粉碎し、これに3倍量の TEM buffer (Tris-HCl 10 mM, EDTA- Na_2 1 mM, 2-mercaptoethanol 1 mM, pH 7.4) を加え、第1編と同様にして cytosol を得た。

b. Molybdate の AR 安定化作用の検討

1) 飽和分析法

上記の cytosol とその 1/10 量 DCC buffer (0.5% charcoal, 0.05% Dextran T-70 を含む TEM buffer) とを 0°C , 15分間 incubation 後, 3,000 rpm, 15分間遠沈して内因性の遊離ステロイドを除去した。この DCC 処理された cytosol を2分し、一方は最終濃度が 10 mM になるように molybdate を加え (TEM_{Mo} cytosol), 他方はそれと同量の TEM buffer のみを加えた (TEM cytosol)。 ^3H -R1881 (0.2~10 nM), 1,000倍量 triamcinolone acetonide (TA), これにさらに500倍量非標識 R1881 を加えた場合と加えない場合の2条件下でそれぞれの検体 500 μl を加え, 0°C , 24時間反応させた。DCC 法で遊離 ^3H -R1881 を除去 (B/F 分離) の後に放射活性を測定し、非標識 R1881 を加えない場合の結合数から非標識 R1881 を加えた場合の結合数を差し引いたものを特異的結合とし、Scatchard plot による解析²⁾で解離定数 (K_d) および最大結合部位数 (B_{max}) を求め、TEM_{Mo} cytosol と TEM cytosol との成績を比較した。

2) 蔗糖密度勾配遠心法

TEM cytosol と TEM_{Mo} cytosol を使用した。各検体 500 μl に ^3H -R1881 (最終濃度 10 nM), TA (最終濃度 10 μM) を加えたもの、さらにそれに非標識 R1881 (5 μM) を加えたものの2種類の場合において 0°C , 24時間反応後, DCC 法で遊離ステロイドを除去した上清 250 μl を蔗糖密度勾配遠心法に移した。5~20%蔗糖密度勾配溶液は polystyaltic pump および auto densi-flow IIc (Buchler Instruments Co. USA) を用いてセルロース・ナイトレート・チューブ (5 ml) に重層し、それに先の上清 250 μl を auto densi-flow IIc を用いて静かに重層して、これらを L₈-55 超遠心機 (SW-55, Ti swing rotor, Beckman) で 2°C , 45,000 rpm, 12時間超遠沈した。沈降係数の指標として bovine serum albumin (BSA, 4.6 S) およびヒト γ -globulin (7 S) を用いた。超遠沈後に密度勾配溶液の上面より auto densi-flow IIc を用いて4滴 (約 150 μl) ずつ採取し、各分画の放射活性を測定した。TEM_{Mo} cytosol に 0.5 M KCl を加えた高イオン濃度においても同様に蔗糖密度勾配遠心法を行ない、沈降係数の変化を観察した。

3) 比親和性 (relative binding affinity)

TEM_{Mo} cytosol と 10 nM ^3H -R1881 とを 0°C , 24時間、反応させたものに、 ^3H -R1881 の10倍, 100倍, 1,000倍, 5,000倍の TA をそれぞれ加えて, 0°C , 24時間反応させた後に B/F 分離を行ない、放射活性を測定した。これにより ^3H -R1881 へのプロゲステロン結合蛋白の結合を抑制するのに必要な TA の量を測定した。

つぎに TEM_{Mo} cytosol と 10 nM ^3H -R1881 および 10 μM TA とを 0°C , 24時間反応させたものに、それぞれ2倍, 10倍, 50倍, 100倍, 500倍および1,000倍量の非標識 R1881, DHT, testosterone, R5020, estradiol を添加して24時間反応させた。DCC 法で B/F 分離後に放射活性を測定した。非標識ステロイドを加えないものを100%結合率とし、諸種ステロイドを加えたものに対する割合で表わした。各ステロイドの R1881 に対する比親和性の算定は以下のごとくである。cytosol と ^3H -R1881 との結合が非標識ステロイドにより50%阻害される濃度が x であるとすると、その逆数 ($1/x$) をもって比親和性とした。

c. AR に対する NaSCN の影響

1) Cytosol の作製

凍結保存した粉状状の前立腺腺腫組織に4倍量の TEM_{Mo} buffer (Tris-HCl 10 mM, EDTA- Na_2

1.5 mM, 2-mercaptoethanol 1 mM, molybdate 10 mM) を加えて、先と同様に cytosol を作製した。この cytosol に 1/10 量 DCC を加えて遊離内因性ステロイドを除去した cytosol (DCC 処理 cytosol) で以下の検討を行なった。

2) ^3H -R1881・AR 複合体の解離に及ぼす NaSCN の影響

DCC 処理 cytosol と 10 nM ^3H -R1881 および 10 μM TA と 0°C, 24時間反応させ、 ^3H -R1881・AR 複合体を形成させた。これに (1) TEMMo buffer のみを加えたものを control とし、最終濃度が、(2) 5 μM R1881, (3) 5 μM R1881+0.1 M NaSCN, (4) 5 μM R1881+0.3 M NaSCN, (5) 5 μM R1881+0.5 M NaSCN になるように R1881 および NaSCN を加えた後、0分, 30分, 1, 3, 6, 12, 24時間と経時的に DCC 法で B/F 分離を行ない、 ^3H -R1881・AR 複合体の解離に及ぼす NaSCN の影響を検討した。なお TEMMo buffer のみを加えたものは 48 時間まで観察した。

これと同じ測定系で R1881 を加えず、(1) buffer のみ, (2) 0.1 M NaSCN, (3) 0.3 M NaSCN, (4) 0.5 M NaSCN を加えた場合について、同様に ^3H -R1881・AR 複合体の推移について検討した。

3) ^3H -R1881・AR 複合体の形成に及ぼす NaSCN の影響

DCC 処理 cytosol を (1) buffer のみ, (2) 最終濃度 0.1 M の NaSCN, (3) 最終濃度 0.3 M の NaSCN, (4) 最終濃度 0.5 M の NaSCN を加えた 4 群に分けて、それぞれを 10 nM ^3H -R1881, 10 μM TA と反応させた後、30分, 1, 3, 9, 16, 24時間と経時的に DCC 法で B/F 分離を行ない、 ^3H -R1881・AR 複合体の形成に及ぼす NaSCN の影響を検討した。なお buffer のみ加えたものは 36 時間まで観察した。

また DCC 処理 cytosol を (1) buffer のみ, (2) 最終濃度 0.3 M の NaSCN を加えた 2 群に分け、3 時間経過後にそれぞれ PC-10 gel chromatography で脱塩した。この 2 群をそれぞれ 0.2~10 nM ^3H -R1881, その 1,000 倍量 TA, さらに 500 倍量の非標識 R1881 の有無下に 24 時間反応させた後、DCC 法で B/F 分離を行ない、Scatchard plot で分析した。

d. AR 結合能に及ぼす heparin の影響

1) AR 複合体の解離に及ぼす heparin の影響の検討

DCC 処理 cytosol と 10 nM ^3H -R1881 および 10 μM TA とを 24 時間反応させて ^3H -R1881・AR 複

合体を形成させた後、(1) buffer のみ, (2) 最終濃度 5 μM の R1881, (3) 最終濃度 4 mg/ml の heparin, (4) 最終濃度 4 mg/ml heparin+5 μM R1881 となるように R1881 および heparin を加えた 4 群に分け、経時的に B/F 分離を行ない、 ^3H -R1881・AR 複合体の解離に及ぼす heparin の影響を検討した。

2) AR 複合体の形成に及ぼす heparin の影響の検討

DCC 処理 cytosol に、(1) buffer のみ, (2) 最終濃度 0.4 mg/ml heparin, (3) 最終濃度 4 mg/ml heparin を加えた 3 群に分け、それぞれを 10 nM ^3H -R1881 および 10 μM TA と反応させて経時的に B/F 分離を行ない、 ^3H -R1881・AR 複合体の形成に及ぼす heparin の影響を検討した。

3) Heparin の AR 結合能の検討

DCC 処理 cytosol を、(1) buffer のみ加えた control, (2) 最終濃度 0.4 mg/ml heparin を加えたもの、(3) 最終濃度 4 mg/ml heparin を加えたものの 3 群に分け、0.2~10 nM ^3H -R1881, 1,000 倍量 TA, 500 倍量の非標識 R1881 を加えた場合と加えない場合の 2 条件下に 0°C, 24 時間反応させた後、DCC 法で B/F 分離を行ない Scatchard plot で AR の結合能を解析した。

e. 蛋白量の測定

BSA を標準蛋白として Lowry 法³⁾で測定した。

結 果

1. Molybdate の AR の安定化作用

a. Scatchard plot による解析

TEM cytosol と TEMMo cytosol の Scatchard plot による解析では、いずれも高結合親和性と一定結合部位数の結合を示しており、その解離定数はそれぞれ 1.6, 0.9 nM と両者に大きな差を認めなかった。一方で蛋白量あたりの最大結合部位数はそれぞれ 13.6, 21.6 fmol/mg protein となり、TEMMo cytosol の方が約 60% 大きい値を示した (Fig. 1)。

b. 蔗糖密度勾配遠心法による検討

蔗糖密度勾配遠心法での検討では、TEM cytosol には明らかな放射活性のピークが得られなかったが、TEMMo cytosol には沈降係数 8~9 S の位置に再現性よくピークが得られた。0.5 M KCl 加 TEMMo buffer ではこのピークは消失し、3 S の位置に小さなピークが出現した (Fig. 2)。

c. 比親和性

^3H -R1881 と TEMMo cytosol との結合は、100 倍量 TA の添加により非添加の 40%, 1,000 倍量 TA

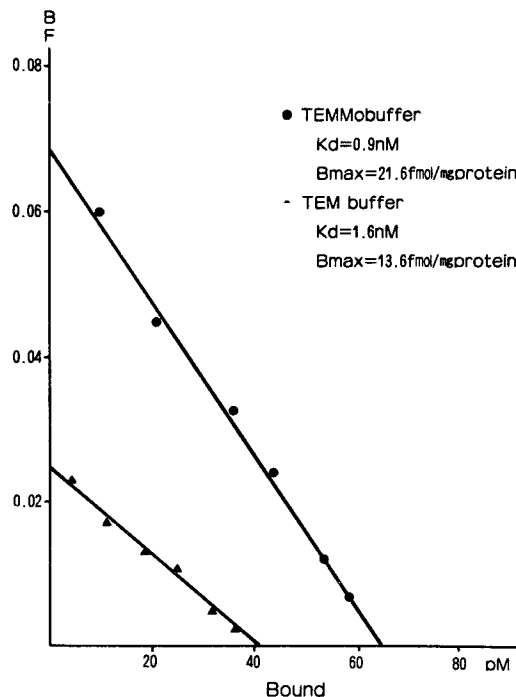


Fig. 1. Scatchard plot analysis of the specific binding of ^3H -R1881 to prostatic cytosol in the presence or absence of 10 mM molybdate

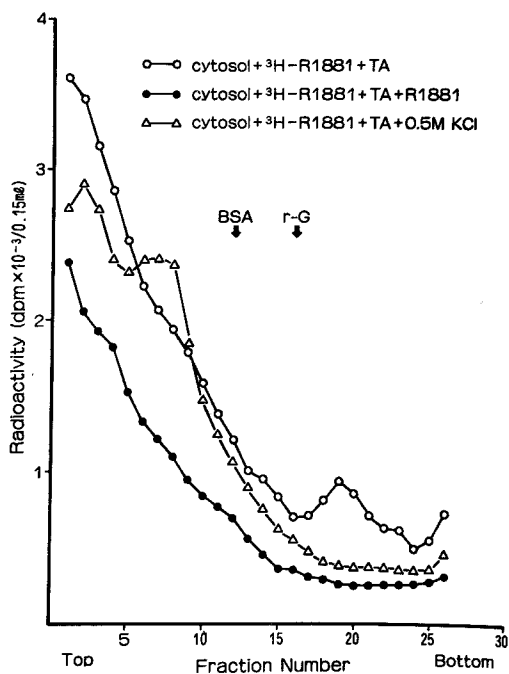


Fig. 2. Sucrose density gradient centrifugation of the prostatic cytosol androgen receptor in the presence of 10 mM molybdate with or without 0.5 M KCl

添加で 58% の抑制がみられ、それ以上の添加量では変化がなかった。そこで、1,000 倍量 TA 存在下に、TEM buffer を使って比親和性を検討した。 ^3H -R1881 と AR の結合は 1.5 倍の R1881 により 50% の阻害が認められ、10 倍で 83%、100 倍で 98%、500 倍で

平衡となった。この R1881 の結合親和性を 1 とすると、それぞれの比親和性は DHT が 0.89, estradiol が 0.005, R5020 が 0.002 であった。すなわち、1,000 倍量の TA 存在下では R1881 と DHT はほぼ同程度の結合阻害を示したが、estradiol と R5020 の結合

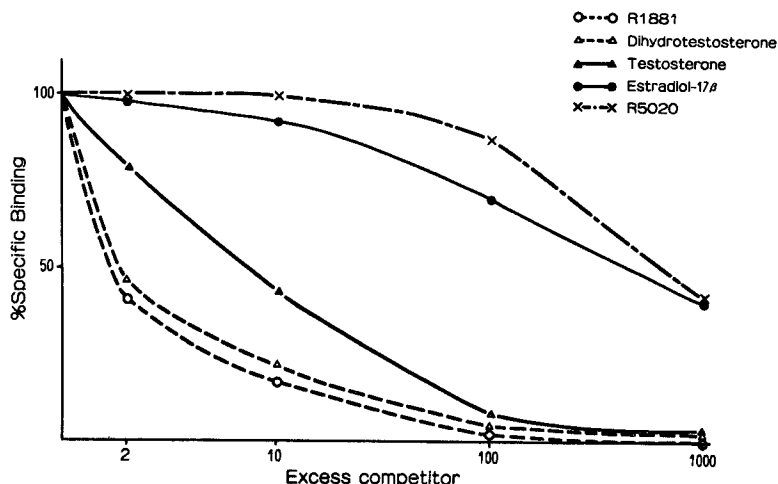


Fig. 3. Inhibition of binding of prostatic cytosol to ^3H -R1881 by various steroids in the presence of 1000-fold molar excess of triamcinolone acetonide

阻害はきわめて弱かった (Fig. 3).

2. AR の結合能に対する NaSCN の影響

a. ^3H -R1881・AR 複合体の解離に及ぼす NaSCN の影響

^3H -R1881・AR 複合体に buffer のみ加えた control 群は12時間で72%, 24時間で70%, 48時間で68%の

結合が残った. R1881 を加えた群は 12時間で72%, 24時間で82%の解離が進んだ. NaSCN を加えると, 濃度の増加に伴ない特異的結合は急激に消失した (Fig. 4).

非標識 R1881 を加えずに NaSCN のみを加えて ^3H -R1881・AR 複合体の推移をみると, NaSCN の濃

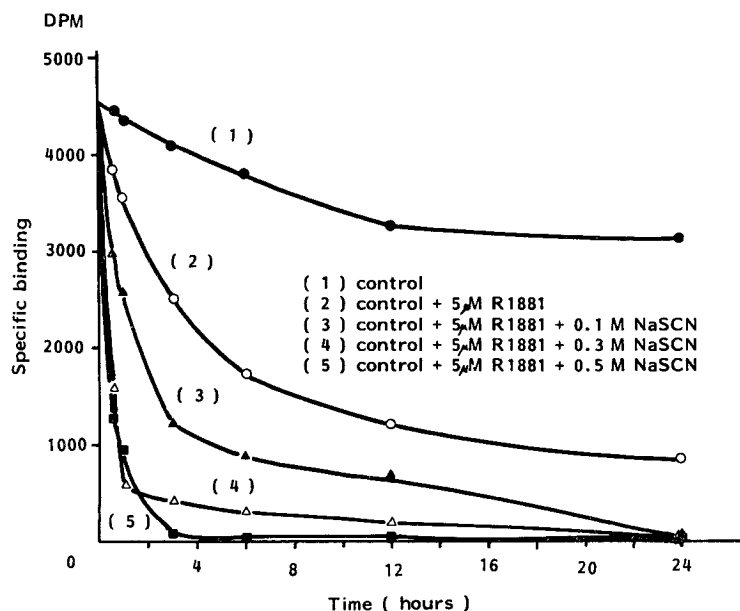


Fig. 4. Effects of NaSCN on stability and dissociation of ^3H -R1881-androgen receptor complex

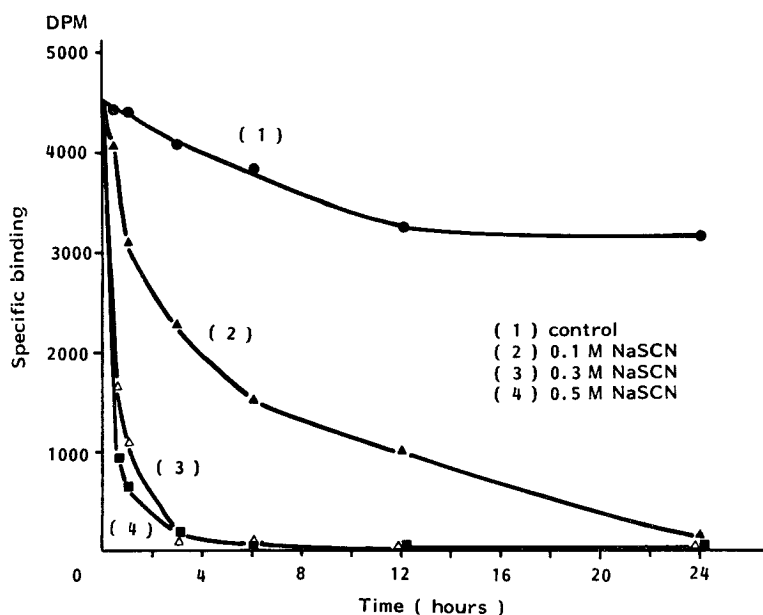


Fig. 5. Effect of NaSCN on stability of ^3H -R1881-androgen receptor complex

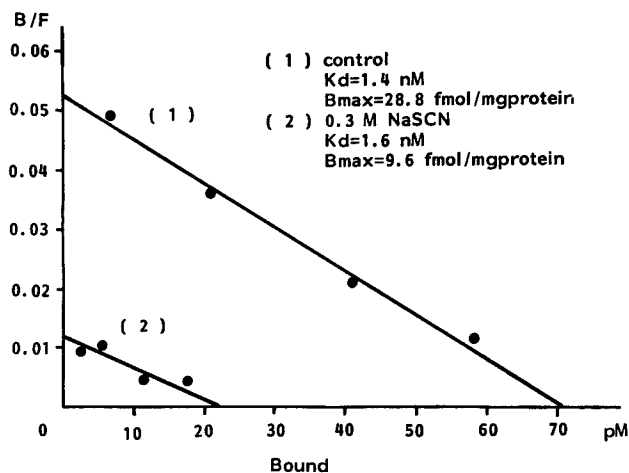


Fig. 6. Scatchard plot analysis of the specific binding of ^3H -R1881 to cytosol treated with NaSCN after desalting with gel filtration

度の増加とともに ^3H -R1881-AR 複合体の解離がきわめてすみやかに起こることが判明した。すなわち 0.3 M NaSCN 以上の濃度では、約 3 時間で ^3H -R1881-AR 複合体のほとんどが解離した (Fig. 5)。

そこで 0.3 M NaSCN と cytosol とを 3 時間反応させ、gel chromatography で NaSCN を脱塩除去後に、 ^3H -R1881 と AR との結合能を Scatchard plot で解析した。control に比較すると解離定数は変化しないが、最大結合部位数は約 1/3 に減少した (Fig. 6)。

b. ^3H -R1881-AR 複合体の形成に及ぼす NaSCN の影響

^3H -R1881 と AR 複合体の形成は、control 群で

は時間とともに増加して 24 時間で最大となり、その後は 48 時間まで平衡状態であった。一方、NaSCN を加えると、最初の 30 分は control に比較して複合体の形成が促進されるが、その後は NaSCN の濃度の増加とともに ^3H -R1881-AR 複合体の形成は抑制された (Fig. 7)。

3. AR 結合能に及ぼす heparin の影響

a. ^3H -R1881-AR 複合体の解離に及ぼす heparin の影響

^3H -R1881-AR 複合体は 4 mg/ml heparin の存在により、放射活性で見ると 3 時間で control の 68% まで減少しており、AR の解離が促進される結果が得られた (Fig. 8)。

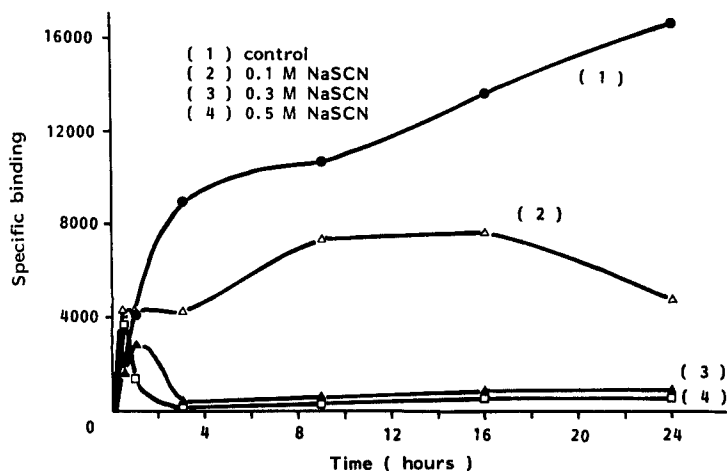


Fig. 7. Effect of NaSCN on association of ^3H -R1881 to androgen receptor

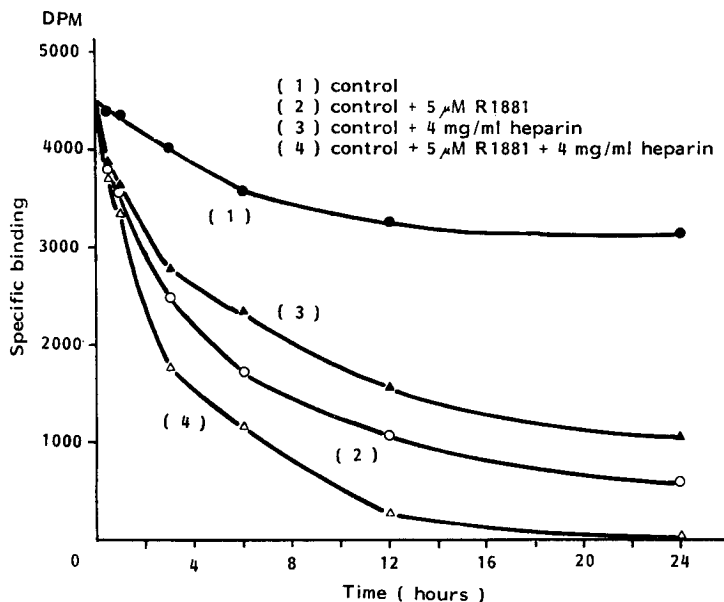


Fig. 8. Effects of heparin on stability and dissociation of ^3H -R1881 androgen receptor complex

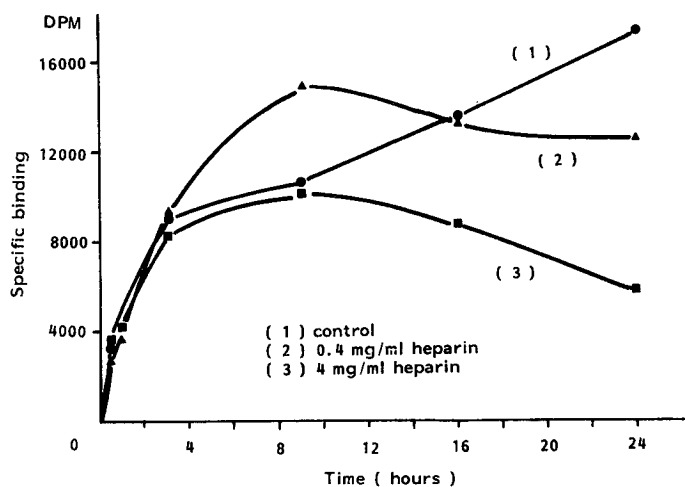


Fig. 9. Effect of heparin on association of ^3H -R1881 to androgen receptor

b. ^3H -R1881・AR 複合体の形成に及ぼす heparin の影響

0.4 mg/ml heparin の存在は、9時間までは control に比較して ^3H -R1881・AR 複合体の形成を促進するが、24時間まで反応させるとむしろ ^3H -R1881・AR 複合体の形成は control より低くなった。4 mg/ml heparin の存在は、9時間までは control とほぼ同様に複合体形成が起きるが、それ以後は ^3H -R1881・AR 複合体の形成は次第に抑制された (Fig. 9)。

Heparin 存在下の飽和分析法では、heparin 濃度

の増加とともに最大結合部位数は低くなることが判明した。すなわち 4 mg/ml heparin 存在により、control と比較して最大結合部位数は非存在下の 44 % となった (Fig. 10)。

考 察

ステロイド・レセプターは核内移行のために activation (活性化) と呼ばれる性状の変化を起こすことが知られている⁴⁾。この活性化は *in vitro* においては高温、高イオン濃度、透析などが必要で、molybdate

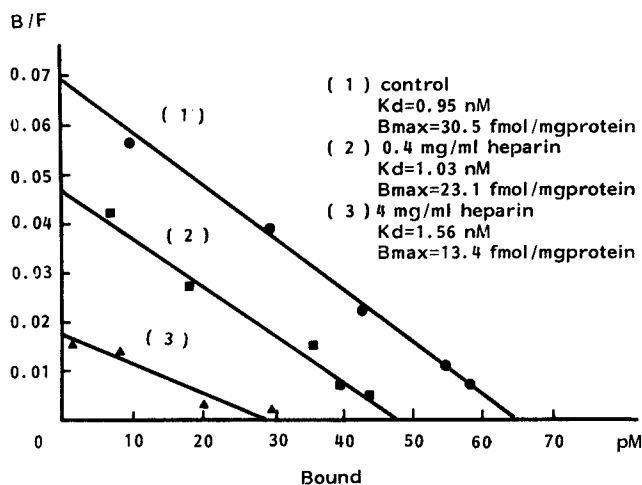


Fig. 10. Scatchard plot analysis of the specific binding of ^3H -R1881 to prostatic cytosol in the presence of heparin

は逆に活性化の阻害剤とされている^{5,6)}。また molybdate はステロイド・レセプターの結合能の安定化作用を有することも報告されている^{5,7-12)}。これらの molybdate の作用機序として、(1) レセプターの脱リン酸化 dephosphorylation が失活に重要な役割を果たしていることから、リン酸酵素阻害剤として作用する、(2) レセプター自身に直接作用する、(3) レセプターとその低分子阻害剤との作用に影響を与えるなどが推察されている^{5,7)}。

ラット前立腺の AR においてレセプター測定系に molybdate を加えると、AR の解離定数、沈降係数、ステロイド特異性などに変化は起きないが、結合部位数の10~80%の増加が認められ、さらに 15、25°C の高温下で AR の安定性を増加させることが報告されている⁷⁾。今回の検討において TEMMo cytosol では TEM cytosol に比較して解離定数はやや小さかったが、最大結合部位数は約 60% 増加した。さらに TEMMo cytosol における比親和性の検討では従来の報告^{7,12)}と同様に AR の結合特異性を示し、先のラット前立腺での成績を支持するものであった。前立腺組織の homogenize の段階から molybdate を添加することにより、さらに cytosol AR の結合部位数が増加すると報告されている⁷⁾。これは homogenize 中の AR の失活が molybdate により抑制されることとともに、最近では nuclear AR が molybdate により cytosol 分画に抽出される可能性も示唆されている^{8,14)}。しかし今回の検討は cytosol を作製後に molybdate を加えて対照と比較しているので、以上の成績は molybdate の AR 安定化を証明するものである。

蔗糖密度勾配遠心法による AR の解析は、AR が不安定であるから分離に長時間を要する水平 swing rotor では困難とする報告がみられる⁹⁾。TEM cytosol では有意の ^3H -R1881 のピークが得られず、TEMMo cytosol で再現性があるピークが得られることも、molybdate の AR 安定化作用の結果と考えられた。AR の沈降係数は低イオン条件では 8~9 S に、高イオン条件では 3~4 S になることが知られている¹⁵⁾。molybdate は高イオン条件下でも 8~9 S を維持することにより安定化されるとの報告¹³⁾もあるが、一方では 3~4 S へ移行するとの報告もみられる⁶⁾。今回の成績は 10 mM molybdate の存在下に、AR の沈降係数は 3 S へ移行するという成績であった。

Molybdate 非添加 cytosol では R1881 と AR の結合は 6 時間以降は減少するが、これに対して 10 mM molybdate 添加では 20 時間まで結合数の増加がみられるという報告¹²⁾がある。著者の成績も飽和量の ^3H -R1881 と cytosol とを反応させて ^3H -R1881・AR 複合体形成の状態を経時的に観察すると、24 時間で複合体形成は平衡となり、その後はさらに 24 時間まで安定であった。つまり molybdate の存在により、0°C では ^3H -R1881・AR 複合体はきわめて安定状態で先の報告を支持する結果であった。

以上の成績は molybdate を加えた TEMMo buffer はヒト前立腺 cytosol AR の定性、定量に有用であるから、AR の精製に応用することが考えられた。

Chaotropic 塩は蛋白構造に大きな変化を起こさない濃度で、蛋白の解離をきたすことが知られている¹⁶⁾。エストロゲン・レセプター (ER) に対して chaotropic 塩の一つである NaSCN は 4°C で ^3H -

estradiol・ER 複合体の解離および形成の両者を促進させ、ER の失活は free の ER に対して緩徐に起こすだけと報告された¹⁶⁾。この性質は低温度下の ER の exchange assay¹⁷⁻¹⁹⁾ や、estradiol を ligand とする affinity chromatography に結合した ER の解離の促進の目的などに利用された²⁰⁾。今回の著者の成績では 0.5 M NaSCN により ³H-R1881・AR 複合体の解離が促進されることは同様であるが、同時にその安定性も急速に失われた。³H-R1881・AR 複合体の形成も最初の30分までは促進されるが、その後は逆に抑制された。これらの成績は NaSCN が AR の結合能に強く影響するもので、この結合能の抑制は NaSCN を除去することにより部分的に回復するものと思われた。Shionogi carcinoma 115 の AR に対する NaSCN の影響を molybdate 非存在下に検討した成績では、0.5 M NaSCN により AR の解離の促進とともに急激に AR の結合能も消失すること、脱塩により部分的に結合能が回復することが報告²¹⁾され、著者の成績と同様の傾向であった。その報告では ER に及ぼす KSCN の影響も検討され、estradiol・ER 複合体に対しては 0.5 M まで結合能の抑制を認めていない。これらの成績より、AR と ER とでは NaSCN の作用の強さが異なるものと思われた。今回の成績では、10 mM molybdate を加えても NaSCN の作用を抑制できない結果であった。chaotropic 塩の中でもその種類により作用強度が異なることが知られ^{21,22)}、AR 精製に應用するには条件を細かく検討する必要が感じられた。また上記の成績はいずれも DCC 法で検討されているが、DCC 法は ER において高イオン濃度では結合能に影響することが報告²³⁾されており、イオン濃度に影響されないレセプター測定法である hydroxylapatite 法での成績と比較検討が必要と考えられた。

Heparin はステロイド・レセプターと特異的に結合することが知られ、Agarose や Sepharose に結合させることにより ER の精製に應用され^{20,24-29)}、AR の精製にも利用されている³⁰⁻³²⁾。また heparin は ER の凝集阻止効果を有することより、レセプターの定性時に少量添加されている²⁶⁾。

Heparin は 0.01~1 mg/ml の濃度で、ER と estradiol の結合に影響を与えないことが報告された²⁸⁾。しかし 1~10 mg/ml の濃度の heparin では、ER の結合能が減少するという²⁷⁾。プロゲステロン・レセプター (PgR) においても、heparin の濃度の上昇とともに結合が抑制されることが報告された³³⁾。AR の結合能に対する heparin の影響に関してはあまり報告

されていないので、著者はこの影響の詳細を検討することにした。4 mg/ml heparin ではヒト前立腺 AR の結合能を明らかに抑制する結果が得られ、heparin は ER や PgR に対すると同様に AR に対しても高濃度では結合能に影響すること判が明した。PgR における結合抑制は沈降係数が早い 7 S の PgR に対しておこり、4 S の PgR にはおこらない。この現象は 0.4 M KCl の添加により可逆的であることからイオンに関係した PgR の形態変化によると想定され、20 mM molybdate を加えることにより阻止されると報告³³⁾された。著者の検討は 10 mM molybdate の存在下に行なっているが、4 mg/ml heparin の作用を完全に阻止できない結果であった。これはレセプターの種類の違いとともに、実験条件の相違も関与しているものと考えられた。すなわち著者の実験では molybdate の濃度が 1/2 で heparin の力価が約 2 倍を使用しているので、molybdate の作用が相対的に弱かったためと考えられた。

以上のごとく molybdate, NaSCN および heparin は AR に対して種々の影響を与えることが判明した。このことは今回の目的とした AR の精製方法の改善に有益であるとともに AR の測定条件、細胞内動態の検討などに有用と考えられた。

結 語

ヒト前立腺 cytosol のアンドロゲン・レセプター (AR) の結合能に及ぼす molybdate, NaSCN, heparin などの影響を検討し、以下の結果を得た。

1. AR に及ぼす molybdate の影響

最終濃度 10 mM の molybdate を cytosol に加えると、³H-R1881 と AR の蛋白量あたりの最大結合部位数は control に比較して約60%増加し、解離定数はやや高くなった。蔗糖密度勾配遠心法による検討で molybdate の添加により cytosol では 8~9 S の部位に再現性のピークが得られたが、molybdate 非添加 cytosol では有意のピークが得られなかった。これらの結果は molybdate の AR 安定化作用を証明するものである。さらに比親和性 relative binding affinity による検討では、molybdate はステロイド特異性には影響しないことが判明した。

2. AR に及ぼす NaSCN の影響

0.1~0.5 M NaSCN を cytosol に添加すると ³H-R1881・AR 複合体の解離および形成はともに促進傾向が認められた。しかし 0.3 M 以上の NaSCN により AR の結合能は急速に失われ、ゲルろ過で NaSCN を除去すると AR の結合能は部分的に回復した。

3. AR に及ぼす heparin の影響

4 mg/ml heparin は ^3H -R1881-AR 複合体の解離を促進させ、また 4 mg/ml heparin の添加で AR の最大結合部位数は56%減少した。

以上の成績のごとく molybdate, NaSCN, heparin などがヒト前立腺 cytosol AR に対して種々の影響を与えることが判明した。

本論文の要旨は、第56回日本内分泌学会総会（大阪）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。

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) Scatchard G: The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann N Y Acad Sci* 51: 660～672, 1949
- 3) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265～275, 1951
- 4) Jensen EV, Suzuki T, Kawashima T, Stumpf WE, Jungblut PW and DeSombre ER: A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Proc Natl Acad Sci USA* 59: 632～638, 1968
- 5) Noma K, Nakao K, Sato B, Nishizawa Y, Matsumoto K and Yamamura Y: Effect of molybdate on activation and stabilization of steroid receptors. *Endocrinology* 107: 1205～1211, 1980
- 6) Kovacs WJ, Griffin JE and Wilson JD: Transformation of human androgen receptors to the Deoxyribonucleic Acid-binding state. *Endocrinology* 113: 1574～1581, 1983
- 7) Gaubert CM, Tremblay RR and Dubé JY: Effect of sodium molybdate on cytosolic androgen receptors in rat prostate. *J Steroid Biochem* 13: 931～937, 1980
- 8) Naritoku WY, Howard EB, Britt JO and Markland Jr FS: Effect of molybdate on androgen receptor levels in canine prostate. *The Prostate* 3: 611～614, 1982
- 9) Trachtenberg J, Hicks LL and Walsh PC: Method for the determination of androgen receptor content in human prostatic tissue. *Invest Urol* 18: 349～354, 1981
- 10) Hawkins EF, Lieskovsky G and Markland Jr FS: Molybdate and the measurement of androgen receptors in prostate cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 53: 456～458, 1981
- 11) Traish AM, Muller RE and Wotig HH: A new procedure for the quantitation of nuclear and cytoplasmic androgen receptors. *J Biol Chem* 256: 12028～12033, 1981
- 12) Shimazaki J, Hikage T, Sato R, Kodama T and Ito H: Measurement of androgen receptor in cytosols from normal, benign hyperplastic and cancerous human prostates. *Endocrinol Japan* 28: 725～734, 1981
- 13) Rowley DS, Chang CH and Tindall DJ: Effects of sodium molybdate on the androgen receptor from the R3327 prostatic tumor. *Endocrinology* 114: 1776～1783, 1984
- 14) Thompson TC and Chng LWK: Extraction of nucleic androgen receptors by sodium molybdate from normal rat prostates and prostatic tumors. *Cancer Res* 44: 1019～1026, 1984
- 15) Lea OA, Wilson EM and French FS: Characterization of different forms of the androgen receptor. *Endocrinology* 105: 1350～1360, 1979
- 16) Sica V, Puca GA, Molinari AM, Buonaguro FM and Bresciani F: Effect of chemical perturbation with NaSCN on receptor-estradiol interaction. A new exchange assay at low temperature. *Biochemistry* 19: 83～88, 1980
- 17) Sica V, Weisz A, Petrillo A, Armetta I and Puca GA: Assay of total estradiol receptor in tissue homogenate and tissue fraction by exchange with sodium thiocyanate at low temperature. *Biochemistry* 20: 686～693, 1981
- 18) Belisle S, Lehoux J-G and Bellabarba D: Exchange assays using sodium thiocyanate

- to measure total nuclear content of estrogen receptors in the hypothalamic pituitary axis of mice. *Steroids* **39**: 643~655, 1982
- 19) Concolino G, Marocchi A, Margiotta G, Conti C, Di Silverio F, Tenaglia R, Ferraro, F and Bracci U: Steroid receptors and hormone responsiveness of human prostatic carcinoma. *The Prostate* **3**: 475~482, 1982
 - 20) 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
 - 21) Omukai Y, Nohno T, Ikeda M, Watanabe S, Senoo T, Saito T and Hosokawa K: Effects of thiocyanate on cytosol androgen receptor from shionogi carcinoma 115. *J Steroid Biochem* **19**: 1055~1059, 1983
 - 22) Kumar SA, Beach T and Dickerman HW: Effect of chaotropic anions on the rate of dissociation of estradiol-receptor protein complexes of mouse uterine cytosol. *Biochem Biophys Res Commun* **76**: 631~638, 1978
 - 23) Peck ER Jr and Clark JH: Effect of ionic strength on charcoal adsorption assays of receptor-estradiol complexes. *Endocrinology* **101**: 1034~1043, 1977
 - 24) Molinari AM, Medici N, Moncharmont B and Puca GA: Estradiol receptor of calf uterus: Interaction with heparin-agarose and purification. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 4886~4890, 1977
 - 25) Auricchio F, Rotondi A, Sampao P and Schiavone E: Effect of heparin on the aggregation of the receptor and interaction of the receptor with heparin-sepharose. *Biochem J* **171**: 137~141, 1978
 - 26) Puca GA, Sica V, Nola E and Bresciani F: Purification and properties of native oestrogen receptor. *J Steroid Biochem* **11**: 301~306, 1979
 - 27) Ratajczak T and Hahnel R: Investigation of method of estradiol receptor purification prior to affinity chromatography. *J Steroid Biochem* **13**: 439~444, 1980
 - 28) Puca GA, Medici N, Molinari AM, Moncharmont B, Nola E and Sica V: Estrogen receptor of calf uterus: An easy and fast purification procedure. *J Steroid Biochem* **12**: 105~113, 1980
 - 29) Madhok TC and Leung BS: Purification of rabbit uterus cytosolic estrogen receptors by affinity chromatography. *J Steroid Biochem* **15**: 299~305, 1981
 - 30) 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
 - 31) 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
 - 32) Mainwaring WIP and Derry NS: Enhanced transcription of rRNA genes by purified androgen receptor complexes in vitro. *J Steroid Biochem*, **19**: 101~108, 1983
 - 33) Thorsen T: Interaction of heparin with the cytosol progesterone receptor from human mammary tumors: separate estimation of the 4 and 7 S binding components with a simple dextran-charcoal assay. *J Steroid Biochem* **14**: 221~227, 1981

(1986年7月31日迅速掲載受付)