

氏名・（本籍）	ね もと ゆう こ 根 本 優 子
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理第 821 号
学位授与年月日	昭和61年1月29日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
最終学歴	昭和55年3月 東北大学大学院理学研究科 (前期2年の課程)生物学専攻修了
学位論文題目	ラット顎下腺アンドロゲンレセプターの構造と活性化に関する研究
論文審査委員	(主査) 教 授 小 西 和 彦      教 授 竹 内 拓 司 助 教 授 四 釜 慶 治

## 論 文 目 次

緒 言

実験材料及び方法

第一編 ラット顎下腺細胞質アンドロゲンレセプター

第二編 活性型アンドロゲンレセプターの高分子量化とモリブデン酸の作用

第三編 アンドロゲンレセプターの構造と構成因子

総合考察

要 約

謝 辞

引用文献

図 表

参考論文

# 論文内容要旨

## 緒言

ステロイドホルモンは標的細胞に存在する特異的なレセプターと結合し、ステロイドホルモン・レセプター複合体を形成する。この複合体は活性化と呼ばれるレセプターの構造変化を経て、DNAや核に高親和性の活性型となる。活性型レセプターは核内結合部位に結合して、特定遺伝子の発現を促進する。以上の一連の過程によりステロイドホルモンの生理作用が発現する。従って、ステロイドホルモン・レセプター系は真核細胞での遺伝子発現機構を解明する上で重要なモデル系であると考えられる。しかし、現在のところアンドロゲンレセプターを含めて、ステロイドレセプターの分子構造、活性化機構、核内結合部位等の詳細は明らかになっていない。

本研究はステロイドホルモン・レセプター系の作用機構の解明を目的として、ラット顎下腺アンドロゲンレセプターの分子構造と活性化機構について解析した。

顎下腺は唾液分泌の他に神経成長因子、上皮成長因子、レニンおよびエストロペプチダーゼ等の生理活性物質を含有し、近年、内分泌腺としての機能を持つことがわかってきた。上記生理活性物質の存在量は雄の器官で有意に高いことから、アンドロゲンに依存して合成されると考えられている。しかし、顎下腺におけるアンドロゲンレセプターの存在は明らかになっていない。

本研究では第一編でラット顎下腺にアンドロゲンレセプターが存在することを示し、さらに、活性化誘導条件について検討した。第二編では活性化過程の可逆性について検討し、活性型アンドロゲンレセプターの高分子量化とモリブデン酸の作用について解析した。第三編ではアンドロゲンレセプターの分子構造について検討し、レセプターの構造と活性化機構のモデルを提案した。

## 実験材料及び方法

8-14週令 Wistar 系ラットを使用した。雄ラットは内在性アンドロゲン濃度を低くするために実験の16-20時間前に去勢した。顎下腺細胞質を緩衝液A (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 10% (v/v) glycerol, 1 mM leupeptin) あるいは緩衝液B (緩衝液Aに20 mM sodium molybdateを加えた) で調製した。調製後、直ちに [ $^3\text{H}$ ] 標識ステロイドを添加し、一定時間後に Dextran-coated charcoal 法により遊離ステロイドを除去した。 [ $^3\text{H}$ ] ステロイドの特異的結合  $B_{sp}$  は

$$\text{式} \quad B_{sp} = B_t - B_{ns}$$

より求めた。ここで  $B_t$  は標識ステロイドのみ添加した場合に得られる総結合量であり、 $B_{ns}$  は標識ステロイドと100倍量の非標識ステロイドを添加した場合の非特異的結合量である。

## 第一編 ラット顎下腺細胞質アンドロゲンレセプター

ステロイドレセプターの存在量は標的器官においても極めて少ない。また、レセプターは熱に不安定で蛋白質分解酵素によって分解されやすく、さらに現在のところ有効なアフィニティゲル

の作成が困難であるなどの理由により、真のレセプター像は得られていない。顎下腺アンドロゲンレセプターについてはマウスで1970年代から検討されているが、レセプターに比べて多量に存在するアンドロゲン結合蛋白質を誤って測定していた可能性がある。信頼性の高い研究は1979年にVerhoevenが報告した一編にすぎない。本編ではリガンドとして内在性アンドロゲンである dihydrotestosterone (DHT) と合成アンドロゲン methyltrienolone (R 1881) を用いてレセプターの結合測定を行った。

#### (結果)

1. [ $^3\text{H}$ ] DHT は反応中に代謝され、リガンドとしては不適當であることが示された。
2. [ $^3\text{H}$ ] R 1881 の結合は安定しており、以下の実験は R 1881 を用いて行った。細胞質アンドロゲンレセプターは雌では雄の約 2.5 倍存在することが示された。
3. 加温処理、塩処理及びリン酸化合物処理によってレセプターは非活性型 (nontransformed) から活性型 (transformed) へ変換した。モリブデン酸は活性化を阻害した。
4. 活性化に伴いレセプターの DEAE カラム溶出時の KCl の濃度、沈降係数、及び分子量が変化する事を明らかにした (Table 1)。
5. レセプターの物理化学的性質に関しては雌雄差は見られなかった。

#### (考察)

本研究は雌雄ラット顎下腺にアンドロゲンレセプターが存在することを明らかにした。また、加温処理や塩処理に加えてアンドロゲンレセプターがリン酸化合物によっても活性化されることを初めて示した。ATP はレセプターのリン酸化を促進することにより、活性化を誘導する可能性が考えられている。しかし、ADP やピロリン酸も同様の効果を持つことから、リン酸化以外の作用により活性化をおこすと考えられる。非活性型と活性型レセプターの物理化学的性質の検討から、活性化は非活性型レセプターがサブユニットに解離して活性型となる過程であると考えられる。

## 第二編 活性型アンドロゲンレセプターの高分子量化とモリブデン酸の作用

アンドロゲンレセプターを含めたステロイドレセプターの活性化過程の可逆性については意見がわかれている。本編では活性化条件を除去した場合に活性型から非活性型へのレセプターの変換が誘導されるかどうか検討した。また、その際に非活性型レセプターの安定化剤及び活性化の阻害剤として知られているモリブデン酸の効果についても検討した。

#### (結果)

1. ATP 処理で活性化を行った後、ゲルろ過により ATP を除去した。この際、モリブデン酸存在条件でゲルろ過を行うと、レセプターは DNA 結合可能であった。一方、非存在条件では DNA 結合能は消失した。
2. 活性型レセプターから ATP を除いた後、低塩条件グリセリン密度勾配に上層し、遠心すると、活性型 4S レセプターの 7-8S 型への高分子量化が観察された。

3. 活性型レセプター由来の7-8S 高分子量レセプター（以下転換レセプターと呼ぶ）の沈降係数はモリブデン酸の存否によらずほぼ等しかった。
4. 転換レセプターの DNA 結合能のモリブデン酸依存性は密度勾配遠心後にも確認された。
5. 転換レセプターの分子量は 140 KDa であり、また、0.06 - 0.08 M KCl で DEAE - Sephacel カラムより溶出した。

（考察）

加温処理や塩処理で活性化したレセプターも低塩条件下で高分子量化した。転換レセプターの沈降係数は7-8S で非活性型のそれに類似した。しかし、分子量、DEAE カラムからの溶出パターンは明らかに異なり、特にモリブデン酸存在条件では DNA に結合可能であることから、転換レセプターは非活性型レセプターとは異なる分子形態をとるものと考えられる。従って、活性型レセプターは活性化条件を除去しても非活性型に変換せず、活性化過程は不可逆であると結論できる。不可逆である原因として、活性化過程であるサブユニットの解離に伴って、4S 型レセプターにコンフォメーション変化がおり、再び非活性型を形成できない状態になる可能性が考えられる。

転換レセプターの DNA 結合能の有無はモリブデン酸に依存した。この結果はモリブデン酸がレセプターの DNA 結合部位と直接相互作用することを強く示唆した。高分子量化に伴い DNA 結合部位が再び覆われる、あるいはコンフォメーション変化により DNA 結合不能になることをモリブデン酸は妨げるものと考えられる。本研究で明らかになったモリブデン酸の作用は全く新しい知見である。ステロイドレセプターには DNA 結合に必須な lysine, arginine, cysteine 残基が存在すると報告されている。モリブデン酸はこれらのアミノ酸残基と相互作用して、レセプターの DNA 結合能に影響を及ぼすのかもしれない。

### 第三編 アンドロゲンレセプターの構造と構成因子

非活性型アンドロゲンレセプターにはステロイド非結合性の蛋白質因子、あるいは RNA が構成因子として含まれる可能性が指摘されている。しかし、構成成分として確定したものはなく、レセプターの分子構造の詳細は不明である。本研究ではアンドロゲンレセプターの構造を解析する目的で、非活性型および転換レセプターの構造、特に RNA の結合の可能性について検討した。

（結果）

1. DEAE クロマトグラフィーとグリセリン密度勾配遠心の連続した分析により、非活性型レセプターは分子表面の総荷電量と沈降係数がわずかに異なる複数の分子種の集合体（多分子型）であることが明らかになった。
2. 非活性型レセプターを RNase 処理すると沈降係数は 8S から 6-7S に減少し、非活性型レセプターの構成要素として RNA が存在することが示された。
3. RNase 処理非活性型レセプターは DNA に結合しなかった。
4. 活性化処理後のレセプターを RNase 処理すると低塩条件下におけるレセプターの高分子量

化はおこらなかった。

5. RNase 処理活性型 レセプターに顎下腺細胞質 RNA を加えると沈降係数は 4.5 S から 5.7 S に増加し、高分子量化を再現できた。同時にレセプターの DNA 結合が阻害された。DNA 結合の阻害は yeast RNA, 及び E.coli 16 S, 23 S rRNA によっても観察された。

(考察)

非活性型レセプターには RNA が結合していることが示された。また、細胞質の核酸分画を精製したところ、比較的高濃度 (0.4 - 0.7 mg/ml) の低分子量 RNA が含まれることがわかった。非活性型レセプターの多分子型は酸性の低分子量物質によって生ずることが実験結果から示唆され、従って、低分子量 RNA がこの因子であると考えられる。

さらに第二編で示した活性型レセプターの高分子量化は活性型レセプターに RNA が結合しておることが明らかになった。レセプター上の RNA の結合部位は DNA 結合部位とは異なると推測される。ただし、モリブデン酸不在下では DNA 結合部位にも RNA が結合し、転換レセプターの DNA 結合能が消失するものと考えられる。

非活性型レセプターにおける RNA の結合はレセプターの安定化あるいは活性化の制御などの機能を有する可能性が考えられる。

## 総合考察

### 1. アンドロゲンレセプターの構造

本研究の結果よりアンドロゲンレセプターの構造とその分子型の転換および活性化機構についてのモデルを提案した (Fig. 1)。

非活性型 8S アンドロゲンレセプターは、活性型 4S レセプターにステロイド非結合性の蛋白質因子と、さらに低分子量 RNA が結合した構造をとると考えられる。活性化誘導条件下ではサブユニットが解離して活性型 4S レセプターとなり、DNA 結合部位が露出、あるいはコンフォメーション変化により DNA 結合部位が形成されると考えられる。

本研究は非活性型から活性型レセプターへの変換は不可逆で、活性化誘導条件の除去によって、7-8S 転換レセプター (7-8S aggregated receptor) が形成されることを示した。転換レセプターは蛋白質因子を含まず、活性型 4S レセプターに RNA が結合して形成されると考えられる。

### 2. アンドロゲンレセプター量の性差について

第一編で雌顎下腺細胞質は雄の約 2.5 倍のアンドロゲンレセプターを含むことを示した。雄では内在性アンドロゲンの結合のために全レセプター量を測定していない可能性が考えられた。

Exchange assay により検討したところ、雌雄ともに細胞質レセプターはアンドロゲンを結合していないことが確認された。従って、レセプター量の性差は見かけ上のものではないことが明らかになった。一方、核分画のレセプター量を測定したところ、雄には雌より高濃度のレセプタ

一が存在した。従って、細胞質レセプター量の性差は雌雄におけるレセプターの局在性の違いによることがわかった。また、去勢やアンドロゲン投与により細胞質レセプター量が変動することから、レセプターの細胞内局在は内在性のアンドロゲン濃度に依存して変動するものと考えられる。

顎下腺においてアンドロゲンによって誘導される形態的、生化学的差異は個体レベルでどのような意味があるのだろうか。アンドロゲン・レセプター系の分子レベルでの作用機構の解明とともに、今後解明されるべき重要な問題であると考えられる。

Properties	Nontransformed	Transformed
Apparent dissociation constant <sup>a</sup> (nM)	1.1 - 1.2	-
Number of binding sites <sup>a</sup> (fmol/mg protein)	140 (female) 60 (male)	-
DNA binding	no	yes
KCl concentration eluted from DEAE-Sephacel <sup>b</sup> (mM)	250 - 260	60 - 80 (ATP and KCl) 60 - 80 and 130 (heat)
Sedimentation coefficient <sup>b</sup> (S)	7.8 - 8.6	4.1 - 4.3 (ATP or KCl) 3.5 - 3.8 (heat)
Apparent molecular weight <sup>b</sup> ( $\times 10^{-3}$ )	220	80 - 85 (ATP or KCl) 70 - 80 (heat)

<sup>a</sup> Scatchard analysis was performed with cytosol prepared with buffer B. Under these conditions, almost all androgen-receptor complexes exist as the nontransformed receptor.

<sup>b</sup> Values were determined with cytosol from female rats.

Table 1 ラット顎下腺アンドロゲンレセプターの性質

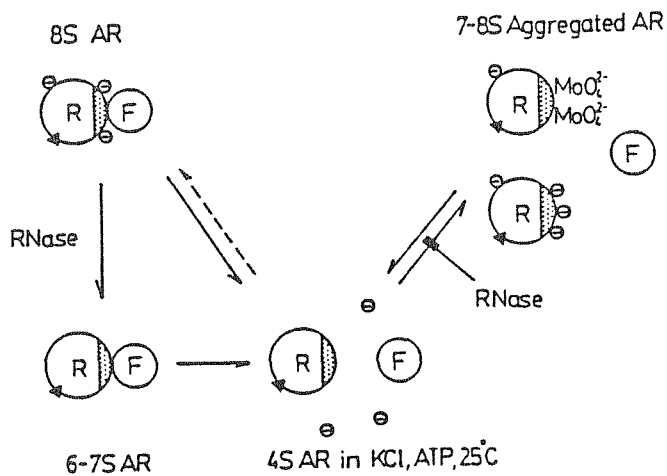


Fig . 1 ラット顎下腺アンドロゲンレセプターの分子構造と活性化機構のモデル

詳細は本文に記した。RNase 処理は4S アンドロゲンレセプター (4S AR) から7-8S 転換アンドロゲンレセプター (7-8S Aggregated AR) への転換を阻害する。使用した記号は以下である。R, 4S アンドロゲン結合サブユニット; F, ホルモン非結合蛋白質因子あるいは4S アンドロゲン結合サブユニット; ⊖, 低分子量RNA; ▼, アンドロゲン; D, DNA 結合部位。

## 論文審査の結果の要旨

根本優子提出の論文は、ラット顎下腺アンドロゲンレセプターの分子構造と活性化機構の解明を目的としたものである。

近年顎下腺は種々の生理活性物質を分泌する内分泌腺としての機能が注目されている。これらの生理活性物質のうち幾つかは、アンドロゲン依存性であると見做されている。アンドロゲンを含むステロイドホルモンは、先ず、標的細胞のレセプターに結合して、活性型レセプターに転換化、活性型レセプターは特定道伝子の発現を促進するという一連の反応により生理作用を発現するとされている。然し乍ら、ステロイドレセプター系の分子構造、活性化機構など、本質的問題は未解決である。

本研究では、実験材料として8-14週令の Wistar 系ラットを使用している。

第一編では、合成アンドロゲン〔<sup>3</sup>H〕methyl trienolone (〔<sup>3</sup>H〕R 1881) の顎下腺細胞への結合を詳細に検討している。その結果、解離定数は雌、雄で等しく、最大結合部位数は両性で大きく異なることを見出している。次に、〔<sup>3</sup>H〕R 1881 を結合させ、25℃での加温や、ATP、ADP、ピロリン酸で、レセプターの活性化に成功している。活性型、非活性型、両者の物理化学的性質を検討し、活性化に伴い変化する物理化学的性質を明らかにしている。

以上の結果から、ラット顎下腺にアンドロゲンレセプターの存在を確認し、活性化は非活性型がサブユニットに解離して起ると推論している。

第二編では、ATP、加温、塩処理などの活性化条件を除去した際に活性型→非活性型の転換があるかどうかを中心に詳細に検討を行っている。その結果、活性型レセプターは非活性型に転換せず、活性化過程は不可逆であると結論している。

第三編では、アンドロゲンレセプターの構造を解明する目的で、非活性型、転換レセプターの構造をRNAの結合の面から比較検討している。結果は非活性型レセプターにはRNAが結合していることを明らかにしている。また活性型レセプターの活性化条件除去による高分子化は、活性型レセプターにRNAが結合することによることを明らかにしている。

以上の結果に基づき、アンドロゲンレセプターの構造とその分子型の転換および活性化機構について、極めて有用なモデルを提案し、また、レセプターの雌雄の差について論じている。

以上、本論文の内容は幾つかの重要な発見を含み、また現在未解決なアンドロゲンレセプターの活性化機構に重要な知見を加えるもので、本人が自立して研究活動を行うために必要な高度の研究能力と学識を有することが示されている。よって根本優子提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。