

## マウス顎下腺アンドロゲンレセプターの精製とその性質の検討

八木一弘 根本孝幸\* 根本優子\*.\*\* 太田稔\* 坂巻公男

岩手医大歯学部歯科放射線学講座

(主任：坂巻公男教授)

岩手医科大学口腔生化学講座\*

(主任：太田稔教授)

現岩手医科大学口腔微生物学講座\*\*

(主任：金子克教授)

(受付：1994年12月14日)

(受理：1995年2月10日)

**Abstract :** The sexual dimorphism of mouse submandibular gland is mediated by androgens. In this study, the androgen receptor of mouse submandibular gland was purified and characterized. The androgen receptor from mouse submandibular gland was 6,450-fold purified by one-step affinity chromatography with testosterone-agarose and the purity was estimated to be 1.6% on the basis of the ligand-binding assay. However, silver staining and photoaffinity-labeling experiments with a synthetic androgen, [<sup>3</sup>H]R1881, revealed common 30, 46, 70, and 100 kDa species in the purified sample, indicating that the preparation consisted of a highly purified androgen receptor. Among these species, the largest one of 100 kDa seemed to be an intact receptor molecule, because the apparent molecular weight was in accord with that calculated from the cDNA sequence. The others seemed to be processed ones. Taking into account the domain structure of the androgen receptor, all species which were photoaffinity-labeled with [<sup>3</sup>H]R1881 appeared to retain a C-terminal steroid-binding domain. Thus, it is likely that the 30 kDa species was produced by cleavage at the site between the DNA-binding and steroid-binding domains, and the 46 kDa one between the N-terminal and the DNA-binding domains of the receptor. The occurrence of the 70 kDa product suggested the presence of an additional site, susceptible to proteolysis, in the N-terminal transactivation domain. An immunohistochemical study with polyclonal antibodies against the androgen receptor demonstrated that the receptor was localized in the ductal cells of the submandibular glands of both sexes. Moreover, the receptor existed in those of the sublingual gland.

**Key words :** androgen receptor, submandibular gland, photoaffinity labeling, immunohistochemistry

### 緒 言

マウスやラットの顎下腺はアンドロゲン依存性臓器であり、形態学的<sup>1)</sup>にも、生化学的<sup>2,3,4)</sup>に

も顕著な性差が認められる。一般にアンドロゲンなどのステロイドホルモンはそれぞれ特有のレセプターを介してその作用を発現するが、マウス<sup>5,6)</sup>やラット<sup>7)</sup>の顎下腺にもアンドロゲンレ

Purification and characterization of the androgen receptor from mouse submandibular gland.  
Kazuhiro YAGI, Takayuki NEMOTO\*, Yuko Ohara-Nemoto\*.\*\*, Minoru OTA\* and Kimio SAKAMAKI  
(Department of Radiology, Iwate Medical University School of Dentistry Morioka, 020 Japan)

セプターが存在する。アンドロゲンレセプターは雄顎下腺のみならず雌にも存在する<sup>5,7)</sup>。雌マウスへのアンドロゲン投与は上皮成長因子(EGF), 神経成長因子(NGF)<sup>8)</sup>, カリクレインファミリープロテアーゼ<sup>3,9)</sup>などの雄顎下腺に特有のタンパク質の発現を促す。しかしながらアンドロゲンレセプターの物理化学的性質, すなわちアンドロゲン結合特異性および親和性, ストークス半径, 沈降係数, *in vitro*でのDNA非結合型からDNA結合型への変換において雌雄差は認められていない<sup>7)</sup>。

一方, 雌雄アンドロゲンレセプターの細胞内存在状態は対照的である。すなわち雄では, アンドロゲンレセプターの75%は内在性のアンドロゲンと結合した状態で核内に存在し, 雌ではそのほとんどがリガンドとは結合しない状態で細胞質に存在している。このようにアンドロゲンレセプターはタンパク質分子としては性差は認められないが, 体内のアンドロゲン濃度の違いによって異なる細胞内局在性を示している<sup>6)</sup>。

ステロイドレセプタータンパク質はステロイドホルモンの標的組織においてさえ非常に微量にしか存在せず(通常全タンパク質の0.01%以下), しかもレセプターはステロイド結合能を失いやすく, プロテアーゼによる分解を受けやすい分子であるために, これまでその精製や正確な分子量の決定が困難であった。しかしながら, ここ10年の間に, エストロゲン<sup>10)</sup>, およびグルココルチコイドレセプター<sup>11)</sup>のcDNAがクローニングされ, またラットおよびヒトのアンドロゲンレセプターのcDNAも1988年にクローニングされた<sup>12)</sup>。

一連のレセプターcDNAクローニングの結果, ステロイドレセプターがサイロイドレセプターやレチノイン酸レセプターとともに, 共通のドメイン構造を有し, いわゆるステロイド/サイロイドレセプタースーパーファミリーを形成することが明らかとなった<sup>13,14)</sup>。これらレセプターのドメイン構造は, N-末端側より, レセプター特異的な転写調節に関与するN-末端ドメイン(A/Bドメイン), 2モルの亜鉛イオン

を配位し, ホルモン応答塩基配列に結合するDNA結合ドメイン(Cドメイン), 核移行シグナルをもつヒンジドメイン(Dドメイン), そしてC-末端側のステロイド結合ドメイン(E/Fドメイン)よりなる(Fig.4a参照)。レセプター間では, DNA結合ドメインの相同性をもっとも高く, ついでステロイド結合ドメインの相同性が高い。N-末端ドメインはレセプター間での相同性は見られず, アミノ酸残基数も多様である。この領域に転写活性調節能がある。

本研究ではマウス顎下腺よりアンドロゲンレセプターを精製し, 合成アンドロゲン, [<sup>3</sup>H]R1881による紫外線照射標識法を用いてその構造について検討した。また顎下腺におけるアンドロゲンレセプターの分布を免疫組織化学的手法により検討した。

## 材料および方法

### 1. 実験材料

#### 1) 動物

8~10週齢の雌ddYマウスを静岡実験動物より購入し, 14時間, 10時間の明暗サイクル, 22±1°Cの条件にて, 固形飼料(オリエンタル酵母, MF)を与え, 自由水にて飼育した。その後10~12週齢にて実験に供した。

#### 2) 試薬

トリチウム標識合成アンドロゲン, [<sup>3</sup>H]R1881(87 Ci/mmol), および非標識R1881はNew England Nuclear(Boston, MA, USA)より購入した。ロイペプチン, アンチパインはペプチド研究所(大阪)より, testosterone 17β-hemisuccinate-agarose(テストステロン-アガロース)とウシ胸腺タイプII-ASヒストン-アガロースはSigma(St. Louis, MO, USA)より購入した。二重らせんDNAセルロースは和光純薬より, ビオチン化ヒツジ抗ウサギIgG抗体およびビオチン化ペルオキシダーゼ複合体はVector(Burlingame, CA, USA)より購入した。その他の試薬は特級を用いた。

### 2. 方法

#### 1) 細胞質の調製

雌マウスをエーテル麻酔下にて頸椎脱臼にて屠殺後、顎下腺を摘出し附着する結合組織を除去した。以下の全ての操作は0-4°Cにて行った。組織はプロテアーゼインヒビター (leupeptin, antipain, soybean trypsin inhibitor, pepstatinそれぞれ10 µg/mlと0.5 mM phenylmethanesulfonyl fluoride) を含む8倍容のbuffer A [10mM Tris-HCl (pH 7.5), 3mM MgCl<sub>2</sub>, 10% (v/v) glycerol] にてガラステフロンホモジナイザーによってホモジナイズした。ホモジネートは150,000 x g 30分間遠心して上清を得、これを細胞質画分とした。

#### 2) アフィニティークロマトグラフィー

細胞質画分 (50 ml) をあらかじめbuffer A に平衡化したテストステロン-アガロース (2 ml) とインキュベーションした。ときどき攪拌し1時間反応させた。その後、遠心して上清を除去後、5 mlのbuffer B [20mM Tris-HCl (pH 7.5), 1mM EDTA, 1mM dithiothreitol, 10% (v/v) glycerol, 0.3M NaCl] による洗浄を4回繰り返した。最終的に得られたゲルを2 µM の非標識 R1881 を含むbuffer B (2 ml) で1時間インキュベーション後、遠心により上清を回収した。その後過剰量の非標識 R1881 を除去するために、デキストランチャコールを加え、その後遠心により上清を得た。このチャコール処理をさらに2回行い、最終的に得た標品を精製アンドロゲンレセプター画分とした。

#### 4) [<sup>3</sup>H]R1881 結合分析

細胞質画分および精製アンドロゲンレセプター画分 (0.1 ml) に10nM [<sup>3</sup>H]R1881 を添加した。レセプターによる特異的結合を算出するために、一部の試料には200倍濃度 (2 µM) の非標識 R1881 を加えた。4~16時間後にタンパク質と結合した [<sup>3</sup>H]R1881 をヒドロキシアパタイトに吸着させた。遊離の [<sup>3</sup>H]R1881 を洗浄除去後0.25 mlのエタノールで抽出して液体シンチレーションカウンターで結合放射活性を計測した<sup>7)</sup>。非標識 R1881 を加えない試料で得られた放射活性から非標識 R1881 を加え

た場合の放射活性を差し引き、レセプターによる [<sup>3</sup>H]R1881 の特異的結合とした。

#### 5) ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)

PAGEは0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) 存在下でLaemmliの系<sup>15)</sup>にて行った。ポリアクリルアミド濃度は10% (w/v) とした。マーカーにはPharmacia Biotechnology (Uppsala, Sweden) の低分子量マーカーを用いた。泳動後、銀染色 (銀染色第一, 第一化学薬品, 東京) によりタンパク質を染色した。

#### 6) [<sup>3</sup>H]R1881-アンドロゲンレセプター複合体の紫外線照射標識

テストステロン-アガロース精製アンドロゲンレセプター標品を用いて [<sup>3</sup>H]R1881 によるアフィニティー標識を行った。あらかじめ精製アンドロゲンレセプター標品 (2 ml) を20nM [<sup>3</sup>H]R1881 と0°Cにて16時間インキュベーションした。クロマトチャンバー内に、水平に置いた紫外線照射器 (コスモバイオ社) 上にサラップを敷き、その上に、できるだけ薄くアンドロゲンレセプター標品を展開した。312 nmの波長で、クロマトチャンバー (4°C) 内で、10分間の照射を行った。照射後、最終濃度0.1 mg/mlのナトリウムデオキシコール酸, 10 µg/mlのインシュリンを加え、さらに10% (w/v) トリクロ酢酸を加えて0°C, 40分間放置しタンパク質を沈澱させた。沈澱したタンパク質を100 µlの氷冷エタノールで洗浄後乾燥した。これに20 µlのLaemmliのサンプルbufferを加え溶解し、100°C, 3分間処後、可溶化タンパク質上清をSDSポリアクリルアミドゲルで泳動分離した。泳動後のゲル (約5 cm) を2 mm幅でスライスした後、3 mlの8% (v/v) 4-アゾヘプタメチレンジアミン/8% (v/v) トリトン X 100により可溶化し、その放射活性をアロカ液体シンチレーションカウンターにて測定した。

#### 7) 抗アンドロゲンレセプター抗体を用いた免疫組織化学的検討

ウサギ抗アンドロゲンレセプター抗体はDr. C. Chang (University of Wisconsin,

Madison, WI, USA) より供与された。本抗体はヒトアンドロゲンレセプターのN-末端ドメイン内のアミノ酸残基331-571までを、大腸菌で発現精製した標品をを抗原としてウサギに免疫したものである<sup>16)</sup>。この抗体はヒトだけでなく、ラット、マウスのアンドロゲンレセプターとも反応する<sup>17)</sup>。

免疫組織化学染色のために顎下腺を舌下腺とともに摘出し、10% 中性ホルマリンで直ちに固定した。アルコール系列で脱水後、パラフィン包埋した。パラフィン包埋組織より3µmの切片を薄切し、抗ヒトアンドロゲンレセプター抗体と4°Cで一晩反応させた。Phosphate-buffered saline (pH 7.3) で洗浄後、ビオチン化ヒツジ抗ウサギIgG抗体と30分間、室温で反応させた。その後、切片をビオチン化ペルオキシダーゼ複合体と反応させ、さらに0.02% 過酸化水素と0.1% ジアミノベンチジンを含んだ0.1M Tris-HCl (pH 7.2) で反応させて染色した。コントロールとして抗ヒトアンドロゲンレセプター抗体に代えて非免疫ウサギ血清と反応させた切片に同様の処理を行い非特異的反応のないことを確認した。

#### 8) タンパク質濃度の決定

タンパク質濃度の決定は、血清アルブミンを標準としてタンパク質アッセイキット (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) の方法によった。

### 結 果

#### 1. マウスアンドロゲンレセプターのアフィニティークロマトグラフィーによる精製

雌マウス顎下腺細胞質には比較的高濃度 (70 fmol/mgタンパク質) のアンドロゲンレセプターが存在する<sup>6)</sup>。そこで筆者はテストステロン-アガローズアフィニティークロマトグラフィーにより、本組織からのアンドロゲンレセプターの精製を試みた。一般に細胞質ステロイドレセプターには90 kDa熱ショックタンパク質 (HSP90) をはじめとする種々のタンパク質が結合することが知られている<sup>18)</sup>。実際にラッ

ト顎下腺細胞質アンドロゲンレセプターにもHSP90が結合しているので<sup>19)</sup>、マウス顎下腺アンドロゲンレセプターにもHSP90や70 kDa熱ショックタンパク質などのタンパク質も結合していると思われる。そこで今回の実験ではアンドロゲンレセプター分子以外の結合因子をできるだけ除くために、レセプターをテストステロン-アガロースと結合した後、高塩濃度の緩衝液でよく洗浄してレセプター結合タンパク質の除去を試みた。最終的にテストステロン-アガロースに結合したタンパク質は、合成アンドロゲンであるR1881を含む緩衝液で溶出した。溶出画分中のアンドロゲンレセプターを定量するために、試料中の過剰量のR1881をチャコールで吸着除去し、さらにレセプターに結合している非標識R1881と<sup>3</sup>H]R1881との結合交換実験を行った。Fig.1に示すように<sup>3</sup>H]R1881の交換反応は16時間で最大に達した。

アフィニティークロマトグラフィーによるアンドロゲンレセプター精製の典型的な結果を示

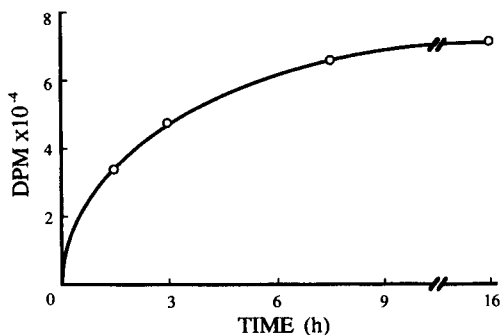


Fig.1 Time course of <sup>3</sup>H]R1881 binding to purified androgen receptor. A sample eluted from affinity resin was treated three times with dextran coated charcoal to strip the excess amount of cold R1881. After the treatment, the receptor fraction was incubated with 10nM <sup>3</sup>H]R1881. After time intervals indicated, <sup>3</sup>H]R1881-receptor complexes were adsorbed by hydroxyapatite and radioactivity was counted as described in "Materials and Methods."

**Table 1** Purification of the androgen receptor (AR) from mouse submandibular gland.

	protein (mg)	amount of AR (pmol)	AR content (pmol/mg protein)	purity (%)	fold-purification
purified AR	0.03	4.83	161.2	1.6	6,450

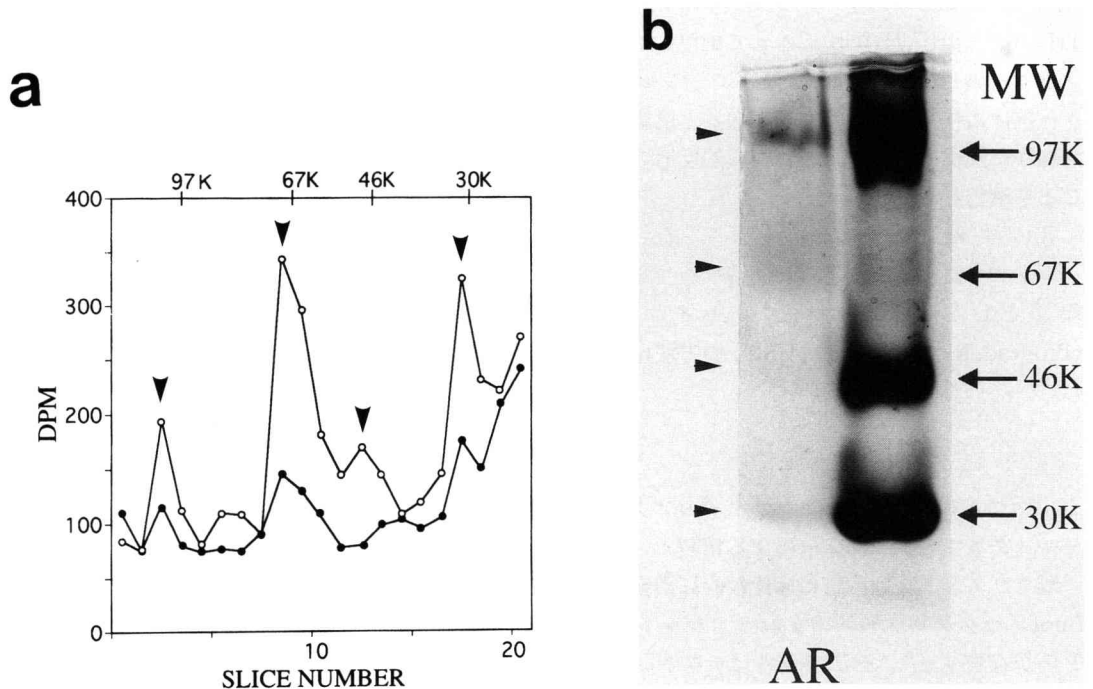
した (Table 1)。このように一段階のクロマトグラフィーにより細胞質レセプターの6,450倍の精製が可能であった。マウスアンドロゲンレセプター cDNA より推測される分子量 98,192 Da<sup>20)</sup> を用いてその純度を推測すると1.6%であった。

## 2. 精製 アンドロゲンレセプターの SDS-PAGE による分析

[<sup>3</sup>H]R1881 結合アンドロゲンレセプター標品を紫外線照射標識した後、SDS-PAGE でタンパク質を分離して標識されるバンドを検出した。Fig. 2a に示したごとく 30, 70, 100 kDa に [<sup>3</sup>H]R1881 により標識されたピークが得られ、

さらに 46 kDa にも小さな肩が得られた。一方、200 倍量の非標識 R1881 を共存させた試料を同様に紫外線照射し電気泳動を行った際には、前述の放射活性のピークはいずれも減少した。したがって紫外線照射標識によって得られたこれらのピークは特異的な結合であると考えられた。

精製標品を SDS-PAGE により分離し、銀染色によりタンパク質のバンドを検出した (Fig. 2b)。もっとも強く染色されるバンドは約 100 kDa の分子量をもち、薄いブロードなバンドが 66-70 kDa 付近に、さらに 46 kDa 付近に、微かなバンドが、また 30 kDa にもバンドがみ

**Fig. 2** SDS-PAGE of purified androgen receptor.

(a) Purified androgen receptor was photoaffinitylabeled and then separated on SDS-PAGE. After electrophoresis, the gel was cut into 2mm pieces as described in "Materials and Methods." Slices were solubilized and radioactivity was counted. Total binding (○) and nonspecific binding (●). (b) Purified androgen receptor was subjected to electrophoresis and then silver-stained. Arrowheads indicate positions of 30, 46, 70 and 100kDa bands.

られた。もっとも代表的なステロイドレセプター結合タンパク質であるHSP90の位置(90 kDa)にはバンドは見られなかった。

### 3. 精製アンドロゲンレセプターのDNAおよびヒストンとの結合能

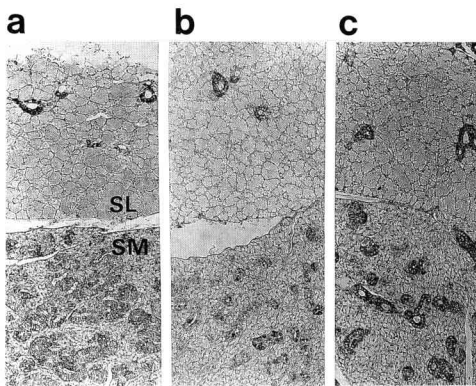
精製アンドロゲンレセプター標品のDNAへの結合について検討した。細胞質アンドロゲンレセプターはその1.8%のみがDNAセルロースに結合した(Table 2)。すなわち、ほとんどがDNAに結合しない状態で存在していた。一方、精製標品では59.3%がDNAセルロースへ結合し、DNA結合活性をもつレセプターが多数を占めていた。この結果は精製アンドロゲンレセプターが結合因子であるHSP90等を解離しているという電気泳動で得られた結果と一致する。しかしながら、そのDNA結合は100%よりもかなり低い値であり、したがって精製標品中の一部のレセプター分子はDNA結合能を失っているものと推測された。たとえば、銀染色および紫外線標識で認められる30 kDaの分子は後述のようにステロイド結合ドメインは有するがDNA結合ドメインを失っているものと思われた。

グルココルチコイドレセプターにはヒストンタンパク質結合能があり、この機能が、グルココルチコイドレセプターの特異的遺伝子の転写調節能に深く関わっているという可能性が提示されている<sup>21)</sup>。そこで、マウス顎下腺アンドロゲンレセプターのヒストンへの結合について検討した。細胞質アンドロゲンレセプター、精製アンドロゲンレセプター標品ではそれぞれ、50.4%、65.6%のヒストン結合能を示した(Table 2)。このことはアンドロゲンレセプ

ターもグルココルチコイドレセプターと同様に、ヒストンと相互作用することを示している。また、これら結果は、ヒストンとの結合がアンドロゲンレセプターの存在状態、すなわち、DNAに結合可能な状態にあるか否かとは関連がないことも示唆している。

### 4. 雌雄マウス顎下腺及び舌下腺でのアンドロゲンレセプターの分布の検討

抗ヒトアンドロゲンレセプターに対するウサギポリクローナル抗体を用いてアンドロゲンレセプターのマウス顎下腺内の分布領域を検討した。その結果、雄の顆粒性膨大部、雌の線条部がアンドロゲンレセプター陽性であり、一方、腺房細胞は陰性であった(Fig.3a,b)。すなわち雌雄顎下腺の導管部がアンドロゲンレセプター陽性であった。このパターンは舌下腺組織も同様であった。すなわち、舌下腺では顎下腺に較べ導管部組織の占める割合は非常に少ないものの、その部位はアンドロゲンレセプター陽性であった。これらの染色像はあらかじめ雌にテストステロンを腹腔投与した場合でも特に変化はなかった(Fig.3c)。



**Fig.3** Immunohistochemical detection of androgen receptors from mouse submandibular and sublingual glands. Androgen receptors from mouse submandibular (lower half, SM) and sublingual (upper half, SL) glands were detected by immunohistochemical techniques. a, male; b, female; c, Testosterone propionate (500 $\mu$ g/100 g body weight) was injected subcutaneously to the female mouse 1hr before sacrifice.

**Table 2** Comparison of cytosolic and purified AR on the binding characteristics to various resins.

resin	cytosolic AR dpm (%)	purified AR dpm (%)
hydroxylapatite	935.4 (100)	19,776.8 (100)
DNA-cellulose	17.1 (1.8)	11,735.5 (59.3)
histone-agarose	471.2 (50.4)	12,972.5 (65.6)

## 考 察

本研究ではマウス顎下腺よりアンドロゲンレセプターを精製してその性質を検討した。アンドロゲンレセプターの検出にはリガンドとして放射性化合物である  $[^3\text{H}]$ R1881 を用いた。R1881 は内在性のアンドロゲンであるテストステロンや  $5\alpha$ -デヒドロテストステロン ( $5\alpha$ -DHT) に較べて代謝されにくく、また R1881 のアンドロゲンレセプターとの結合親和性はテストステロンより高く、 $5\alpha$ -DHT とほぼ同程度 (解離定数,  $10^{-10}\sim 10^{-9}$ nM) である。さらに、このリガンドは、紫外線照射により SDS-PAGE 条件下でも解離しない安定なリガンド-レセプター複合体を形成する<sup>22)</sup>。また、R1881 は  $5\alpha$ -DHT と異なり、マウス顎下腺細胞内アンドロゲン結合タンパク質や血中の性ホルモン結合グロブリンにはほとんど結合しない、など数々の利点がある。したがってリガンドとして  $[^3\text{H}]$ R1881 を用いることにより、マウス顎下腺のアンドロゲンレセプターの特異的検出が可能であると考えられた。

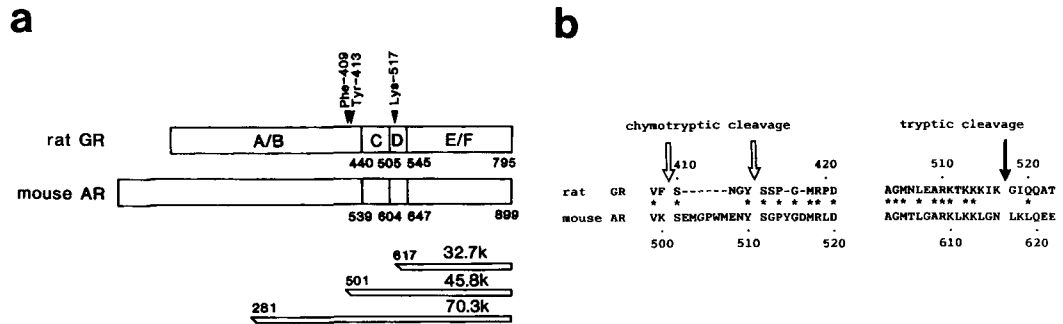
アフィニティークロマトグラフィーによるマウス顎下腺アンドロゲンレセプターの精製度はリガンド結合法でみると 6,450 倍であり、一段階のクロマトグラフィーとしては非常に効率的であった (Table 1)。しかしながら、最近クローニングされたマウスアンドロゲンレセプター cDNA より推測される分子量 98,192 Da を基に計算するとその純度は 1.6% であり、まだ多くの夾雑タンパク質を含むものと考えられた。しかし、Fig. 2a と b の結果を比較すると、銀染色により検出された全ての染色バンドは紫外線標識のピークの位置とほぼ一致していた。これらの結果は精製標品の主要なバンドが、すべてリガンド結合能のある分子、おそらくアンドロゲンレセプターであることを示唆している。このうちタンパク染色法によりもっとも強く染色された 100 kDa のバンド (Fig. 2b) は cDNA クローニングより推測されたマウスアンドロゲンレセプターの分子量とほぼ一致し

た。さらにヒトやラットのアンドロゲンレセプタータンパク質のイムノブロットでもほぼ同様の 100 - 110 kDa のバンドが得られている<sup>17)</sup>。今回の結果は、マウス顎下腺のアンドロゲンレセプターも、すくなくとももっとも高分子量の分子種は他の組織、さらに他種のアンドロゲンレセプターとほぼ同様の 100 - 110 kDa の分子量をもつことを示している。

リガンド結合定量法より見積もられた精製度と紫外線標識と銀染色で得られた結果が大きく異なる理由として次の二つが考えられる。(i)  $[^3\text{H}]$ R1881 による結合交換反応では、完全に遊離の非標識 R1881 を除くことができないため、非標識 R1881 をすでに結合している精製アンドロゲンレセプターのリガンドの置換が不十分であり、標品中のアンドロゲンレセプターのすべてを定量できないためである。(ii) 本標品中のアンドロゲンレセプターは HSP90 等の結合因子を解離しているが、結合因子を解離した状態のレセプターのリガンド結合親和性は約 1/10 に低下している<sup>23)</sup>。これらの原因により、結合交換実験から得られた精製標品のレセプター量は実際よりも過小に見積もられているものと考えられる。

紫外線標識と銀染色は、それぞれアンドロゲンレセプター特異的、非特異的な検出法であるが、ともに 30, 46, 70, 100 kDa の分子種が認められた。このことは 100 kDa の分子がインタクトなアンドロゲンレセプター分子であり、30 ~ 70 kDa の分子はリガンド結合能を保持したペプチドであると考えられる。すなわち、*in vitro* での精製過程、あるいは *in vivo* ですでにアンドロゲンレセプターが限定分解を受けているのではないかと考えられる。

ステロイドレセプターのドメイン構造と、紫外線標識によって決定されたタンパク質の分子量とを考え合わせて推測すると、その切断点は Fig. 4a のようになる。30 kDa の分子はいわゆるステロイド結合ドメインだけをもつ分子と考えられる。ラットグルココルチコイドレセプターではトリプシンに感受性の部位の存在が知



**Fig. 4** Domain structures of glucocorticoid and androgen receptors. (a) Domain structures of rat glucocorticoid (rat GR) and mouse androgen (mouse AR) receptors are schematically illustrated. A/B, C, D, E/F, represent N-terminal transactivation, DNA-binding, hinge, and steroid binding domains, respectively. Amino acid residues 440-505 and 545-795 represent C and E/F domains of rat glucocorticoid receptor, respectively. Amino acid residues 539-604 and 647-899 represent C and E/F domains of mouse androgen receptor, respectively. Rat glucocorticoid receptor is cleaved by chymotrypsin at Phe-403, and by trypsin at Lys-517<sup>20</sup>. Potential cleavage sites and calculated molecular weights of mouse androgen receptor, based on the findings in this study, are indicated below the primary structure of androgen receptor: 32.7, 45.8 and 70.3 kDa species are produced by cleavage of amino acid residues 617, 501 and 281, respectively. (b) Amino acid sequences of mouse androgen and rat glucocorticoid receptors around proteolytic sites of rat glucocorticoid receptor are compared. Amino acid residues identical between two receptors are indicated by stars. Amino acid deletions, represented by hyphens, are introduced in rat glucocorticoid receptor for the maximum matching.

られており、Lys-517とGly-518の間が切断され、27～30 kDaのステロイド結合能のある分子が生じる (Fig. 4b)<sup>24</sup>。Lys残基に富む同様の配列がアンドロゲンレセプターにも存在する (Fig. 4b)。もし、この領域で切断されるなら、そのC-末端側の分子量は32.7 kDaとなり、今回得られた30 kDaの分子に近い値となる (Fig. 4)。

46 kDa付近の小さな肩 (Fig. 2a) は分子量から推測すると、DNA結合ドメイン以降のアミノ酸配列を含むと考えられる。ラットグルココルチコイドレセプターの場合はキモトリプシンの限定分解により39 kDaの分子が生じると報告されている<sup>20</sup>。その切断部位はPhe-409およびTyr-413のC-末端側である。これはマウスアンドロゲンレセプターではLys-510とTyr-518に相当する (Fig. 4b)。アンドロゲンレセプターでも46 kDaの分子が生ずるのはラットグルココルチコイドレセプターと同様な位置が切断されるためではないかと推測され

る。さらに、今回70 kDaにもピークが得られた。この結果は、アンドロゲンレセプターのN-末端領域中に、プロテアーゼの限定分解を受けやすい箇所が存在すること、すなわちN-末端ドメインがさらに二つのサブドメインからなる可能性を示唆している。この切断箇所はN-末端側から約28.2 kDaの付近にあるものと考えられる。N-末端ドメインの機能をさらに理解する上でこれらの領域についての詳細な検討が必要であろう。

本研究では抗アンドロゲンレセプターポリクローナル抗体によりマウス顎下腺アンドロゲンレセプターの局在部位を検索し、雌雄の導管部位にアンドロゲンレセプターが局在することが明らかとなった。EGF、カリクレインなどのアンドロゲン依存的にその発現が制御されている遺伝子は雄顎下腺顆粒性膨大部において特異的に発現しており、今回明らかにされたように顆粒性膨大部および線条部で発現しているアンド



ロゲンレセプターとはやや分布域に差が見られた。さらに雌雄の顎下腺に同様にアンドロゲンレセプターが存在することと合わせて、アンドロゲンレセプターの発現はアンドロゲンによって誘導される EGF などの遺伝子とは異なる発現制御を受けていることを示唆している。実際、私たちは最近マウスアンドロゲンレセプター mRNA の発現がアンドロゲンによりむしろ抑制的に制御されていることを示した<sup>25)</sup>。

本研究により、マウス舌下腺にもアンドロゲンレセプターが発現していることが初めて示された。雄マウス舌下腺にも顎下腺と共通の抗原性をもつカリクレインファミリープロテアーゼが存在するが、その活性は顎下腺の 14% である<sup>26)</sup>。この活性の違いは Fig.3 に示したように顎下腺と舌下腺での導管部の占める面積の差にほぼ等しかった。顎下腺と同様に舌下腺でもアンドロゲン-アンドロゲンレセプター系が EGF やカリクレインの発現を調節しているのかどうか興味のある問題である。マウスでは顎下腺を摘出すると血中の EGF 濃度が低下し、そのために雄では精子形成不全<sup>27)</sup>、雌では母乳の分泌不足による仔マウスの死亡<sup>28)</sup>、流産<sup>29)</sup>を引き起こすなど、生殖機能にきわめて重大な影響がある。このような現象が人にも当てはまるのかどうか、またヒト唾液腺でもアンドロゲンレセプター系が、唾液腺機能の調節に関与するのかどうかなど、今後検討すべき問題である。

## 結 論

マウス顎下腺アンドロゲンレセプターを一段階のテストステロンアガロースアフィニティークロマトグラフィーにより、6,450 倍精製した。アンドロゲンレセプターの純度はリガンド結合アッセイ法により 1.6% と評価された。しかしながら、精製標品の銀染色および合成アンドロゲンである [<sup>3</sup>H]R1881 の紫外線照射標識実験により、両者に共通の 30, 46, 70, 100 kDa の分子が認められ、この標品が高度に純化されたアンドロゲンレセプターを含むことが示された。これらのうち、もっとも高分子量の分子種

として 100 kDa 分子が検出されたが、これは cDNA クローニングから推測される分子量と一致した。アンドロゲンレセプターのドメイン構造を考慮するとすべての分子種が C-末端側のステロイド結合ドメインを含むものと考えられた。30 kDa 分子は DNA 結合ドメインとステロイド結合ドメイン間、46 kDa 分子は DNA 結合ドメインと N-末端ドメイン間で限定分解されたものと考えられた。一方、70 kDa の分子の出現は N-末端ドメインが、さらに二つのサブドメインからなる可能性を示唆していた。また、抗アンドロゲンレセプター抗体を用いた組織化学的手法により、顎下腺導管部にアンドロゲンレセプタータンパク質が局在していることが示された。さらにマウス顎下腺だけでなく、舌下腺導管部にもアンドロゲンレセプターが存在していた。

## 謝 辞

アンドロゲンレセプターの組織化学染色法について御協力御指導をいただいた岩手医大医学部第二病理学講座 増田友之博士に謝意を表します。

## 文 献

- 1) Lacassagne, A. : Dimorphisme sexual de la gland sous-maxillaire chez la souris. *Comptes Rendus Societe de Biologie* 133 : 180-181, 1940.
- 2) Carami, F., Angeretti, P. U., and Levi-Montalcini, R. : Experimental analysis of the mouse submandibular gland in relationship to its nerve growth factor content. *Endocrinology* 70 : 951-922, 1962.
- 3) Angeletti, R. A., Angelleti, P. U., and Calissano, P. : Testosterone induction of estero-proteolytic active in the mouse submaxillary gland. *Biochim. Biophys. Act* 139 : 372-381, 1967.
- 4) Byyny, R. L., Orth, D. N., and Cohen, S. : Radioimmunoassay of epidermal growth factor. *Endocrinology* 90 : 1261-1266, 1972.
- 5) Verhoeven, G. : Androgen binding proteins in mouse submandibular gland. *J. Steroid Biochem.* 10 : 129-138, 1979.
- 6) Kyakumoto, S., Kurokawa, R., Ohara-Nemoto, Y., and Ota, M. : Sex difference in the cytosolic and nuclear distribution of androgen receptor in mouse submandibular gland. *J. Endocrinol.*

- 108 : 267 - 273, 1986.
- 7) Nemoto, T., Ohara-Nemoto, Y., Sato, N., Kyakumoto, S., and Ota, M. : Characterization of nontransformed and transformed androgen receptor from rat submandibular gland. *Biochim. Biophys. Acta* 839 : 249 - 257, 1985.
  - 8) Goldstein, M. N., and Burdman J. A. : Studies of the nerve growth factor in submandibular glands of female mice treated with testosterone. *Anat. Rec.* 151 : 199 - 208, 1965.
  - 9) Sato, N., Nemoto, T., Ohara-Nemoto, Y., Baba, R. and Ota, M. : Effects of castration and sex hormones on the androgen receptor of the mouse submandibular gland. *Jpn. J. Oral Biol.* 27 : 640 - 648, 1985.
  - 10) Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J. M., Argos, P., and Chambon, P. : Human estrogen receptor cDNA : sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320 : 134 - 139, 1986.
  - 11) Hollenberg, S. M., Weinberger, C., Ong, E. S., Cerelli, G., Oro, A., Lebo, R., Thompson, E. B., Rosenfeld, M. G., and Evans, R. M. : Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318 : 635 - 641, 1985.
  - 12) Chang, C., Kokontis, J., and Liao, S. : Structural analysis of complementary DNA and amino acid sequences of human and rat androgen receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 : 7211 - 7215, 1988.
  - 13) Evans, R. M. : The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240 : 889 - 895, 1988.
  - 14) Krust, A., Green, S., Argos, P., Kumar, V., Walter, P., Bornert, J. -M., and Chambon, P. : The chicken oestrogen receptor sequence : homology with *ovrA* and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *EMBO J.* 5 : 891 - 897, 1986.
  - 15) Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680 - 685, 1970.
  - 16) Chang, C., Whelan, C. T., Popovich, T. C., Kokontis, J., and Liao, S. : Fusion proteins containing androgen receptor sequences and their use in the production of poly- and monoclonal anti-androgen receptor antibodies. *Endocrinology* 123 : 1097 - 1099, 1989.
  - 17) Takeda, H., Nakamoto, T., Kokontis, J., Chodak, G. W., and Chang, C. : Autoregulation of androgen receptor expression in rodent prostate : immunohistochemical and *in situ* hybridization analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177 : 488 - 496, 1991.
  - 18) Smith, D. F., Faber, L. E., and Toft, D. O. : Purification of unactivated progesterone receptor and identification of novel receptor-associated proteins. *J. Biol. Chem.* 265 : 3996 - 4003, 1990.
  - 19) Nemoto, T., Ohara-Nemoto, Y., and Ota, M. : Purification and characterization of a non-hormone-binding component of the non-transformed glucocorticoid receptor from rat liver. *J. Biochem.* 102 : 513 - 523, 1987.
  - 20) Gasper, M. L., Meo, T., Bourgarel, P., Guenet, J., and Tosi, M. : A single base deletion in the Tfm androgen receptor gene creates a short-lived messenger RNA that directs internal translation initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 : 8606 - 8610, 1991.
  - 21) Ueda, K., Isohashi, F., Okamoto, K., Kokuhi, I., Kimura, K., Yoshikawa, K., and Sakamoto, Y. : Tight binding of glucocorticoid-receptor complexes to histone-agarose. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151 : 763 - 737, 1988.
  - 22) Brinkmann, A. O., Kuiper, G. G. J. M., Bolt-de-Vries, J., and Mulder, E. : *In situ* photolabelling of the human androgen receptor. *J. Steroid Biochem.* 30 : 257 - 261, 1988.
  - 23) Nemoto, T., Ohara-Nemoto, Y., and Ota, M. : Association of the 90-kDa heat shock protein does not affect the ligand-binding ability of androgen receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 42 : 803 - 812, 1992.
  - 24) Carlstedt-Duke, J., Stromstedt, P.-E., Wrangé, O., Bergman, T., Gustafsson, J. -A., and Jornvall, H. : Domain structure of the glucocorticoid receptor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84 : 4437 - 4440, 1987.
  - 25) Nagai, M., Nemoto, T., Masuda, T., and Ota, M. : Reduction of androgen receptor mRNA concentration by testosterone in mouse submandibular gland. *Endocrine J.* 42 : 31 - 38, 1995.
  - 26) 馬場利恵 : マウス顎下腺に於ける esteropeptase に関する研究, 歯科基礎医学会雑誌, 28 : 573 - 589, 1986.
  - 27) Tsutsumi, O., Kurachi, H., and Oka, T. : A possible physiological role of epidermal growth factor in male reproductive function. *Science* 233 : 975 - 977, 1986.
  - 28) Okamoto, S., and Oka, T. : Evidence for physiological function of epidermal growth factor : pregestational ovariectomy of mice decreases milk production and increases offspring mortality during lactation period. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* 81 : 6059 - 6063, 1984.
  - 29) Tsutsumi, O., and Oka, T. : Epidermal growth factor deficiency during pregnancy causes abortion in mice. *Amer. J. Obst. Gynecol.* 156 : 241 - 244, 1987.