

## 原 著

## テストステロン投与によるマウス顎下腺アンドロゲンレセプター局在の変動と核内リン酸化能の亢進

吉 田 元 彦

岩手医科大学歯学部口腔生化学講座

(主任：太田稔教授)

〔受付：1991年12月5日〕

〔受理：1992年1月18日〕

**Abstract :** The effects of testosterone administration on the localization of the androgen receptor and on the activity of nuclear phosphorylation were investigated in female mouse submandibular gland. Administration of testosterone ( 500  $\mu\text{g}$  / 100 g body weight ) to female mice caused translocation of androgen receptor from the cytosol to the nucleus within 3hrs. Approximately 80% of the nuclear receptor bound to the active chromatin which was prepared from the nucleus by micrococcal nuclease digestion. Incorporation of  $^{32}\text{P}$  from [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP into the nucleus was enhanced 3hrs after testosterone administration and then the enhanced incorporation returned to a control level in 6 ~ 9 hrs. Such a phosphorylation activity was found in the active chromatin and a similar effect of testosterone administration was observed on  $^{32}\text{P}$  incorporation. Nonhistone proteins, which were extracted from the  $^{32}\text{P}$ -labeled nucleus with 0.35 M NaCl, were mainly phosphorylated. These results indicate that mouse submandibular gland contains protein kinases which are activated by the nuclear androgen receptor, and that the kinases seem to be involved in the transcription activation modulated by the androgen receptor.

**key words :** androgen receptor, submandibular gland, active chromatin, phosphorylation.

## 緒 言

ステロイドホルモンレセプターは甲状腺ホルモン、ビタミン D<sub>3</sub> やレチノイン酸にたいするレセプターと同様、リガンド依存性の転写活性調節因子であり、対応するリガンドと複合体を形成した後に標的器官において特異的な遺伝子の発現を促進または抑制する<sup>1,2)</sup>。ステロイドレセプターは可溶性のタンパク質性のレセプター

であるが、その細胞内の局在はエストロゲンレセプターのように活性型および非活性型ともに核に局在しているものと<sup>3,4)</sup>、グルココルチコイドレセプターのように非活性型は細胞質に、活性型は核に存在するものがある<sup>5)</sup>。

活性型ステロイドレセプター複合体が核内で作用するには、特異的遺伝子付近のクロマチン領域へ結合することが重要なステップであると考えられる。最近、レセプターによって発現が

---

Translocation of androgen receptor and enhancement of nuclear phosphorylation activity in mouse submandibular gland by testosterone administration.

Motohiko YOSHIDA

(Department of Biochemistry, Iwate Medical University School of Dentistry, Morioka 020)

岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020)

*Dent. J. Iwate Med. Univ.* 16 : 139 - 149, 1991

調節される特異的遺伝子の5'上流域には各々のレセプターが認識、結合するDNA配列(ホルモンレスポンス配列)が存在することが明らかになった<sup>6,7)</sup>。しかし現在のところアンドロゲンレセプターに特有のホルモンレスポンス配列は見い出されておらず、*in vitro*実験系ではグルココルチコイドレスポンス配列にグルココルチコイドとアンドロゲンレセプターの両方が結合することが報告されている<sup>8,9)</sup>。したがって、両レセプターが細胞内で正確に作用するためには、特異的なDNA配列に加えて、レセプターが各々特異的な遺伝子を選択する何らかの機構が存在するものと考えられる。その機構の一つとしてDNA配列近傍に結合するタンパク質因子によるクロマチンの微細構造の差異が考えられる。

レセプターに特有な核内因子がさらに存在する可能性がある。あるいはDNA配列に結合しているタンパク質がホルモン依存的にリン酸化などの修飾を受けることにより、特異的なレセプターの結合部位が形成される可能性も考えられる。

一方、マウスやラット顎下腺はアンドロゲンや甲状腺ホルモンに反応して上皮成長因子を産生し<sup>10,11)</sup>、雄性生殖器官に匹敵する量のアンドロゲンレセプターが存在することが明らかとなってきた<sup>12-15)</sup>。当教室ではこれまで成長因子を高濃度に産生する顎下腺の機能を明らかにし、さらにアンドロゲンレセプターによる遺伝子発現調節機構を解明する目的で研究を進めてきたが<sup>16-20)</sup>、本研究ではマウス顎下腺アンドロゲンレセプターの核内での局在、おもに遺伝子転写活性の高いクロマチン領域(転写活性クロマチン画分)における局在について検討し、それにたいするテストステロン投与の影響について検討した。また、アンドロゲンレセプターの作用発現のためには前述のように核内でのタンパク質修飾がおこる可能性が考えられるので、本研究ではアンドロゲンによって活性の変動する核内プロテインキナーゼ活性が存在するかどうかも検討した。

## 材料および方法

1. 実験動物: 8~10週齢のddY系雌雄マウスを14時間10時間の明暗サイクル、22°Cの条件下、自由に固形飼料ならびに飲料水を与えて飼育した。Testosterone propionate (TP)をアルコール、ついでプロピレングリコールに溶解した後、100g体重あたりテストステロンとして500 $\mu$ gを頸背部皮下に投与した。

2. 試薬: 標識合成アンドロゲン [<sup>3</sup>H]mibolone (74.0 Ci/mmol)はAmershamより、[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (3,000 Ci/mmol)はDupon-New England Nuclearより購入した。Micrococcal nuclease と dithiothreitol (DTT)はBoehringer Mannheim GmbHより購入した。Phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), ethylene glycol-bis-( $\beta$ -aminoethyl ether) N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA)はSigmaより、ガラス繊維フィルターGC 50はToyo Roshiより、leupeptinはペプチド研究所より購入した。ACSIIシンチレーターはAmershamより購入した。その他の試薬は半井化学製の特級試薬を使用した。

3. 緩衝液: 緩衝液A (50 mM Tris-HCl, 25 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 M ショ糖, 0.5 mM PMSF, 0.4 mM leupeptin, pH 7.4), 緩衝液B (10 mM Tris-HCl, 1 M hexylene glycol, 0.1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 5 mM EGTA, 0.5 mM leupeptin, pH 7.4), 緩衝液C (5 mM pyridoxal phosphate, 20 mM sodium barbital, 1.5 mM EDTA, 0.15 M KCl, 5 mM DTT, 20% (v/v) glycerol, pH 8.0), 緩衝液D (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% (v/v) glycerol, 0.5 mM leupeptin, pH 7.4), 緩衝液E (10 mM Tris-HCl, 10 mM sodium molybdate, 0.5 mM DTT, pH 7.4)。

4. 核と細胞質の調製: マウスは頸椎脱臼により屠殺された。直ちに顎下腺を摘出し、冷生理食塩水中に浸した。付着結合組織を除去した後、5倍容の緩衝液Aを加えてフロンホモゲナイザーでホモゲナイズした。ホモジネートを

1,000 xg で 10 分間遠心し、得られた沈澱を粗核画分とした。さらに粗核画分を緩衝液 B に懸濁し、1,500 xg, 30 分間遠心した。得られた沈澱に 1 ml の緩衝液 C を加え、0°C で 30 分間抽出後、80,000 xg, 60 分間遠心し上清を核抽出物とした。また、上記と同様に摘出した顎下腺に 9 倍容の緩衝液 D を加えてホモゲナイズし、150,000 xg, 30 分間遠心し、得られた上清を細胞質として用いた。

5. アンドロゲンレセプターの測定: 100  $\mu$ l の細胞質ならびに核抽出物に 10 nM の [<sup>3</sup>H]mibolone を添加し、2  $\mu$ M の非標識 mibolone 存在ならびに非存在下、0°C で細胞質は 90 分間、核抽出物は 24 時間インキュベートした。ついで、100  $\mu$ l の 20% (w/v, 緩衝液 E に懸濁) hydroxylapatite を加え、適宜攪拌しながら、20 分間インキュベート後、遠心分離した。ついで、緩衝液 E で十分洗浄した後、1 ml のエタノールで抽出し、ACS II シンチレーターを加え、液体シンチレーションカウンター (アロカ LSC-903) で放射活性を測定した。非標識 mibolone を加えない試料の結果 (総結合量) から加えた試料の結果 (非特異的結合量) を引き、特異的結合量 (レセプター量) を算出した。

6. アンドロゲンレセプターの活性化と核結合能の測定: 方法 5 に従い、雌顎下腺細胞質を 10 nM [<sup>3</sup>H]mibolone で標識し、その一部に KCl を 0.4 M になるように加えて、さらに 0°C, 30 分間インキュベートした。未結合の [<sup>3</sup>H]-mibolone は dextran-coated charcoal 法<sup>21)</sup>により除去した。 [<sup>3</sup>H]mibolone 標識レセプターを含む細胞質 (100  $\mu$ l) に雄マウス粗核画分 (50  $\mu$ l) を加え、0°C で 90 分間インキュベートした。反応液をガラス繊維フィルター GC 50 でろ過した。フィルターを緩衝液 E で充分洗浄後乾燥し、シンチレーションバイアルに移し、ACS II シンチレーターを加え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。

7. 転写活性クロマチン画分の調製: TP 投与マウス顎下腺を 9 倍容の 0.25% (v/v) Triton X-100 と 10 mM monothioglycerol を加えた

緩衝液 A でホモゲナイズ後、800 xg, 10 分間遠心し沈澱を得た。10 mM monothioglycerol を含む緩衝液 A で沈澱を洗浄し、さらに同緩衝液に再懸濁した。1 mM CaCl<sub>2</sub> 存在下で micrococcal nuclease (250 units/20 Abs<sub>254</sub>/1 mg DNA) を添加し、0°C で 30 分間反応した。EDTA と EGTA を最終濃度 5 mM になるように添加し反応を停止した。1,000 xg, 10 分間遠心した後、得られた沈澱に 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM monothioglycerol, 0.1 mM PMSF, pH 7.4) を加えて再懸濁し、0°C で 20 分間可溶化した。1,000 xg, 10 分間遠心し、上清として転写活性クロマチン画分を得た。

8. グリセロール密度勾配遠心法による転写活性クロマチン画分の分析: 緩衝液 D を用いて、4.5 ml の 15 - 30% (v/v) のグリセロール直線密度勾配を密度勾配作製装置 (日立) で作製した。これに micrococcal nuclease 処理によって得られた転写活性クロマチン画分 300  $\mu$ l を重層し、2°C で 230,000 xg (日立 RPS-55 T 2 ローター, 50,000 rpm), 16 時間遠心した。5 滴 (約 200  $\mu$ l) ずつ分取し、同時に自動紫外部吸収計で 254 nm での吸光度を測定した。また、これらフラクションについてアンドロゲンレセプター量を測定した。カタラーゼ (11.4 S) を沈降係数の標準タンパク質として用いた。

9. 核画分におけるリン酸化能の測定: 粗核画分 (2.5 mg タンパク質) を 30 mM Tris-HCl 緩衝液 (5 mM MgCl<sub>2</sub>, 115 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7.5) に懸濁した。 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP, 5  $\mu$ Ci を含む 0.1 mM ATP を添加し、25°C で 90 分間インキュベートした。トリクロロ酢酸を最終濃度 10% (w/v) になるように加え反応を停止した。遠心後、沈澱物を 10% トリクロロ酢酸で 3 回洗浄し、1 M NaOH を加え、37°C で一晩放置した。トリクロロ酢酸を加えて中和した後に放射活性をシンチレーションカウンターで測定した。転写活性クロマチン画分 (核画分 500  $\mu$ g DNA に相当する) についても、同様の方法によりリン酸化能を測定した。

10. ヒストンおよび非ヒストン蛋白質の分離：上述の方法により粗核画分を<sup>32</sup>Pで標識した後、0.35 M NaCl 溶液に懸濁し、30 分間攪拌した。遠心により 0.35 M NaCl 可溶性の非ヒストンタンパク質と不溶性のヒストンタンパク質に分別した。液体シンチレーションカウンターでそれぞれに取り込まれた放射活性を測定した。

11. DNA ならびにタンパク質量：DNA 量は Burton 法<sup>22)</sup>で測定した。タンパク質量は Bradford 法<sup>23)</sup>により測定し、ウシ血清アルブミンを標準タンパク質として用いた。

## 結 果

1. アンドロゲンレセプターの活性化と核結合能の測定：

Table 1 に示すように、未処理試料に比べ 0.4 M KCl 処理した細胞質では約 5 倍多いレセプターが核画分に結合した。この結果は非活性型アンドロゲンレセプターが *in vitro* ではステロイドを結合した後、塩処理により核に結合可能な活性型レセプターに変換することを示している。また、核画分には活性型アンドロゲンレセプターに対する結合部位が存在することを示唆している。

2. マウス顎下腺アンドロゲンレセプターの細胞質ならびに核画分局在におよぼすテストステロンの影響：

Table 2 に示すように、非 TP 投与雌マウスではレセプターは主として細胞質に存在した。TP 投与後に細胞質レセプターは減少し、核レセプターが増加した。この細胞内局在性の違いは血中テストステロン濃度を反映していると考えられる。実際、非 TP 投与雌マウスでは細胞質アンドロゲンレセプター含量は核アンドロゲンレセプター量より高値であるが（レセプター量比、細胞質：核 = 1 : 0.07）、TP 投与後 3 時間では細胞質アンドロゲンレセプターが減少するのに対し、核アンドロゲンレセプターが増加した（Table 2、細胞質：核 = 1 : 1.9）。このことはリガンドと結合したレセプターが核内に移行し、出現したのと考えられる。

Table 1 Binding of [<sup>3</sup>H]mibolerone-receptor complex to crude nuclei.

Treatment	Nuclear bound
—	400 dpm
Activation (0.4 M KCl)	2250 dpm

Cytosol and crude nuclei from mouse submandibular gland were prepared as described under "Materials and Methods." [<sup>3</sup>H]-mibolerone-labeled cytosol was activated in the presence of 0.4 M KCl. Nonactivated or activated [<sup>3</sup>H]mibolerone-receptor was incubated with crude nuclei. Nucleus-bound [<sup>3</sup>H]mibolerone-receptor was measured by glass filter assay.

Table 2 Distribution of cytosolic and nuclear androgen receptors.

Testosterone treatment	Cytosol	Nuclei
Time (h)	(fmol/mg DNA)	(fmol/mg DNA)
0	596.0 ± 127.0	42.5 ± 10.1
3	188.3 ± 40.8	351.4 ± 74.7

Testosterone propionate was injected into female mouse. Cytosol or nuclear extract from submandibular gland was incubated with [<sup>3</sup>H]-mibolerone as described under "Materials and Methods." The incubate was treated with hydroxylapatite and bound radioactivity was measured.

3. 転写活性クロマチンへの核内アンドロゲンレセプターの結合：

つぎにアンドロゲンレセプターの核内での局在性について検討した。雄マウス顎下腺から得られた転写活性クロマチン画分では遺伝子からの転写が盛んに行われており、転写活性調節因子の1つであるアンドロゲンレセプターもここに結合していると期待される。グリセロール密度勾配遠心により得られたフラクション 11, 14, 18 上に高い放射活性を認めた。(Fig. 1)。各フラクションをアガロース電気泳動で分析すると、フラクション 11, 14, 18 は各々モノ、ジ、トリヌクレオソームに相応した。また、モノヌクレオソームの前に検出されたピークはヌクレオソームから解離したアンドロゲンレセプター

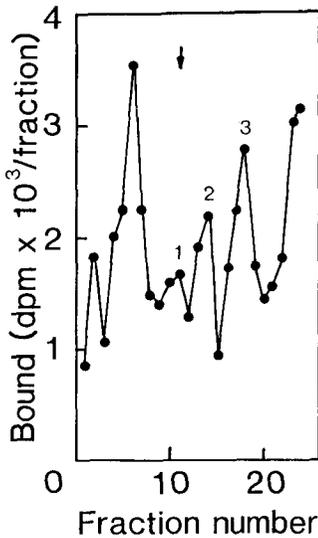


Fig. 1 Distribution of androgen-receptor complex bound to chromosomal fraction.

The purified nuclei (1 mg DNA) from male mouse submandibular gland were digested with micrococcal nuclease (250 units) at 0°C for 30 min. The soluble fraction was analyzed on 15-30% glycerol gradients. After centrifugation, fractions of approximately 200 μl were collected and incubated with 10 nM [<sup>3</sup>H]mibolerone at 0°C. After 48 h-incubation, [<sup>3</sup>H]mibolerone-androgen receptor complex was measured by hydroxylapatite adsorption assay. An arrow shows catalase (11.4 S) as a marker protein. 1, 2 and 3 in figure show mononucleosome, dinucleosome and trinucleosome, respectively.

である。

4. 雌マウス顎下腺転写活性クロマチン上でのアンドロゲンレセプターの分布におよぼすテストステロン投与の影響:

非 TP 投与雌より得られた活性クロマチン画分でも雄ほど顕著ではないが、三つのピークが認められた (Fig. 2 A)。前述のごとく TP 投与により雌マウス顎下腺では核に存在するアンドロゲンレセプター量が増加することが示されたので (Table 2), 雌マウスに TP を投与し、経時的に転写活性クロマチン画分中のレセプター

を測定した。TP 投与 1 時間後では、ジヌクレオソームに相当するピークが増加した (Fig. 2 B)。TP 投与の 3 時間後ではモノ、ジ、トリヌクレオソームに相当するピークの放射活性が著しく上昇し、特にトリヌクレオソームに最も高い結合活性が認められた (Fig. 2 C)。TP 投与 9 時間後にはすべてのピークで最大の放射活性を測定した (Fig. 2 E)。TP 投与 18 時間後では TP 投与 6 時間後のパターン (Fig. 2 D) と同様であり、ジヌクレオソームでの活性は認められなかった (Fig. 2 F)。

[<sup>3</sup>H]mibolerone を雌マウスに皮下投与し、3~9 時間後に転写活性クロマチン画分を調製して同様に分析した。Fig. 2 に示した結果と同様に、投与後 3~9 時間で転写活性クロマチンのヌクレオソーム画分に [<sup>3</sup>H]mibolerone の取り込みが見られた (データは示さない)。

5. テストステロン投与後の顎下腺核画分リン酸化能の経時的変動:

アンドロゲンレセプターの核移行と転写活性クロマチン領域への結合過程にともない、遺伝子転写の調節がおこるものと考えられる。この過程にはヒストンや非ヒストンタンパク質の修飾が起こることが期待される。そこで本研究ではテストステロン投与後のマウス顎下腺核におけるリン酸化能の変動について検討した。Fig. 3 に示すごとく TP 投与後 3 時間で顎下腺核画分中の <sup>32</sup>P 取り込み量が上昇し、TP 投与 6 時間で投与前のレベルに戻った。

つぎに、核画分から調製した転写活性クロマチン画分のリン酸化能にたいするテストステロン投与の影響を測定した。TP 投与 3 時間後においては <sup>32</sup>P の取り込み率は高値を示し、さらに 6 時間後には投与前のレベルに減少し (Fig. 4), 核画分での <sup>32</sup>P の取り込みの経時変化と類似していた。これらの結果は顎下腺核には血中テストステロン濃度の上昇にともなって活性が変動するリン酸化活性が存在し、その活性は転写活性クロマチン画分においても示された。

6. テストステロン投与雌マウス顎下腺のヒストンおよび非ヒストンタンパク質への <sup>32</sup>P の取

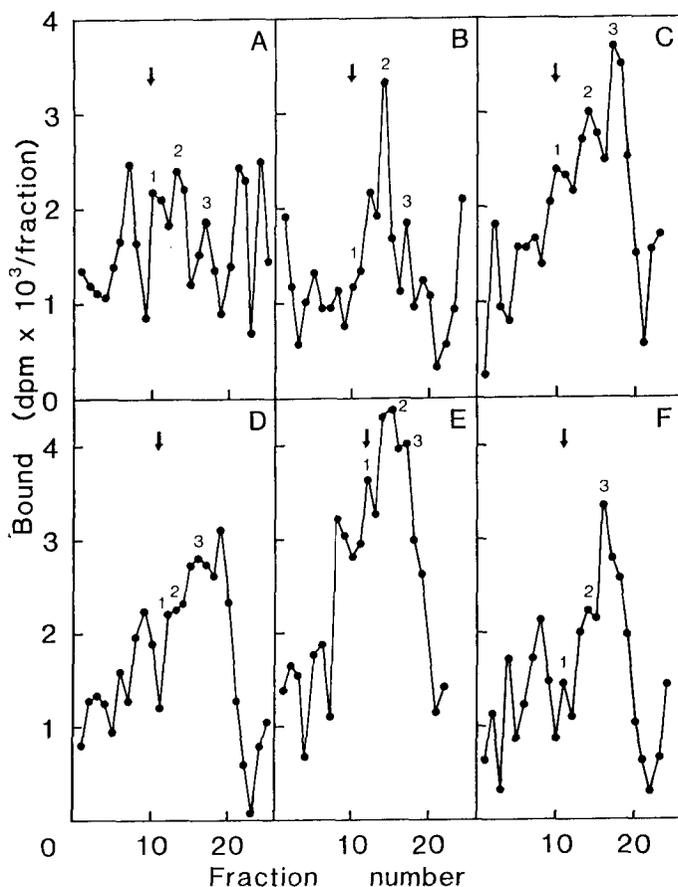


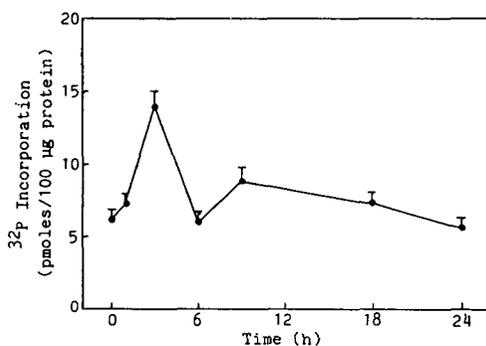
Fig. 2 Distribution of androgen-receptor complex in nuclease-digested chromosomal fractions.

Female mice were injected with testosterone propionate (500  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  body weight) and killed at 0 (A), 1 (B), 3 (C), 6 (D), 9 (E), 18 (F) h after single injection. Purified nuclei prepared from submandibular glands were digested and the resulting soluble fractions were analyzed as described in Fig. 1. An arrow shows catalase as a marker protein. 1, mononucleosome; 2, dinucleosome; 3, trinucleosome.

り込み:

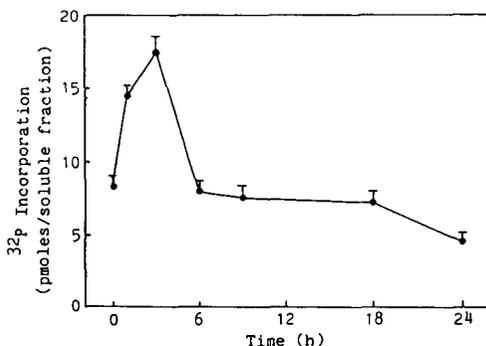
リン酸化活性が核タンパク質の構成成分であるヒストンあるいは非ヒストンタンパク質をリン酸化するかどうかを検討した。非ヒストンタンパク質は核クロマチンにゆるやかに結合しているため、0.35 M NaCl で処理すると抽出される<sup>20)</sup>。非ヒストンタンパク質のリン酸化の割合はTP投与1時間後から上昇し、TP投与3~6時間後で最大になった (Table 3)。その後、

しだいに減少し、TP投与24時間後ではTP投与前値に戻った。非ヒストンタンパク質のリン酸化の総リン酸化タンパク質にたいする比率はTP投与後6時間で最大となった。一方、ヒストンタンパク質への<sup>32</sup>Pの取り込みはTP投与3~6時間後には相対的に減少した。これらの結果はテストステロンによって活性化されるプロテインキナーゼが存在し、このキナーゼは主に非ヒストンタンパク質を基質としてリン酸化



**Fig. 3** Effect of testosterone administration on incorporation of <sup>32</sup>P into nuclear fraction.

Female mice were injected with testosterone propionate and killed at 1, 3, 6, 9, 18 or 24 h after single injection. The purified nuclei (2.5 mg protein) were incubated with 0.1 mM ATP containing [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP at 0°C. After 90 min, <sup>32</sup>P-labeled fractions were precipitated with 10% ice-cold trichloroacetic acid, washed with trichloroacetic acid, and then counted.



**Fig. 4** Effect of testosterone administration on incorporation of <sup>32</sup>P into soluble fraction produced by nuclease digestion.

Female mice were treated with testosterone propionate at indicated times. The purified nuclei (500 µg DNA) were digested with micrococcal nuclease (125 units) at 0°C for 30 min and the resulting soluble fraction was incubated with 0.1 mM ATP containing [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP at 0°C for 90 min. <sup>32</sup>P-labeled fractions were treated as described in Fig. 3.

**Table 3** Effect of testosterone administration on <sup>32</sup>P incorporation into histone and nonhistone proteins.

Testosterone treatment Time (h)	Total incorporation pmoles/ 100 µg protein	Nonhistone proteins		Histones	
		pmoles	%	pmoles	%
0	11.3	2.5	22.3	8.8	77.7
1	14.5	4.0	27.6	10.5	72.4
3	15.1	5.0	33.4	10.1	66.6
6	12.9	4.8	37.3	8.1	62.7
9	13.8	3.9	28.2	9.9	71.8
18	14.3	4.2	29.5	10.1	70.5
24	11.0	2.3	21.0	8.7	79.0

Female mice were injected with testosterone propionate and were killed at indicated times. The purified nuclei (1.5 mg protein) were incubated with 0.1 mM ATP containing [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP at 0°C for 90 min, and then <sup>32</sup>P-labeled nuclear proteins were treated with 0.35 M NaCl. The radioactivities in 0.35 M NaCl-soluble (nonhistone proteins) and insoluble (histones) fractions were counted.

することが明らかになった。

## 考 察

アンドロゲンレセプターは一般に雄性動物の標的細胞に多く含まれているが、レセプターの性状を検索するためには、通常、事前に去勢を行って内因性のアンドロゲンを除去する必要がある。一方、マウスでは雌の顎下腺にも雄性器官に相当する量のアンドロゲンレセプターが存在しており、同時に血中アンドロゲン濃度が低いことから無傷の雌マウスを使用できる利点がある。本研究の目的は、雌顎下腺に存在するアンドロゲンレセプターの核クロマチン上での局在の経時的な検索であるが、はじめに顎下腺内でのアンドロゲンレセプターの動向とTP投与による雌でのレセプターの変動に関する基本的な実験を行う必要があった。この結果、雌マウスへのTP投与により顎下腺における細胞質レセプターの著明な減少と核レセプターの増加が観察された。このことはTP投与により血中アンドロゲン濃度が上昇し、細胞質に存在する非活性型アンドロゲンレセプターがテストステロンと複合体を形成し、活性型となり核へ移行したためと思われる。これらの観察結果は当教室で行った同様の実験成績<sup>25)</sup>を確認するものである。ついでステロイドホルモンレセプターと核およびクロマチン画分との相互作用について検討した。まず、ステロイドレセプターと核を別々に調製した後、両者の結合を分析した。この結果、細胞質に存在するアンドロゲンレセプターはリガンドと結合しても核との結合能を持たない非活性型レセプターであることが示された。非活性型レセプターは0.4 M KCl処理することにより核に結合可能な活性型レセプターに変換した。リガンドを結合したアンドロゲンレセプターは*in vitro*では25°Cの加温処理でも活性型レセプターに転換することが知られている<sup>26)</sup>。したがって、細胞内では非活性型レセプターは適当な温度と生理的塩濃度にさらされており、アンドロゲンとの結合が引き金となって活性型レセプターへ転換するものと考えられ

る。

つぎに、ホルモンを動物に投与して、*in vitro*で形成したアンドロゲンレセプター複合体の核内での局在性を検討した。TP投与後調製した核画分をさらにmicrococcal nuclease消化により分画し、転写活性クロマチン画分を得た。グリセロール直線密度勾配遠心により転写活性画分をさらに分画すると、沈降速度の異なるヌクレオソーム、すなわち大きさの異なるヌクレオソームを分別することが可能であった。また、このようにして分別された活性クロマチン上のアンドロゲンレセプターを測定することができた。ヌクレオソームの大きさにより結合しているレセプター量に若干の差が認められ、雌ではトリヌクレオソームの放射活性が低く、雄ではモノヌクレオソームの放射活性が低かった。さらに、雌マウスにTPを投与し、経時的に核クロマチン上でのアンドロゲンレセプター複合体の分布の変動を検索したところ、ヌクレオソームに結合するレセプター量に変化が観察された。これらのことは投与したTPが顎下腺のアンドロゲンレセプターと複合体を形成後、レセプターは活性型に転換し、転写活性クロマチン領域に結合することを示している。

当教室の佐藤ら<sup>27)</sup>は本実験と同様の方法でラットの肝臓に存在するグルココルチコイドレセプターについて検索したところ、本研究で得られた結果と同じく、核に存在するグルココルチコイドレセプターの一部はモノ、ジ、ならびにトリヌクレオソームに相応する転写活性クロマチン画分に結合していることを明らかにした。したがって、活性型ステロイドレセプターの作用発現部位が、少なくとも転写活性クロマチンに存在するものと推測できる。

Micrococcal nucleaseやDNase Iは制限された条件下では核内クロマチン構造のうち比較的分散した状態のクロマチンを選択的に切断することが報告されている。以前からこのようにnucleaseにより消化を受けやすい部位は転写活性が高い領域であることが見いだされている<sup>28, 29)</sup>。最近、ステロイドホルモン依存的に発現

する個々の遺伝子において、遺伝子の5'上流域にあるレセプター結合部位にホルモン依存的にレセプターが結合し、nuclease感受性が高くなる部位が現れることがわかってきた<sup>30)</sup>。したがって、今回マウス顎下腺で見られた核レセプターが結合する転写活性クロマチンはアンドロゲン依存的に転写が調節されている遺伝子の近傍を含むものと考えられる。

興味あることに雌マウス顎下腺でもTP投与により、転写活性クロマチンに結合するレセプター量が増加した。雌マウスは妊娠時には副腎由来のアンドロゲン濃度が高くなることがわかっている<sup>31)</sup>。したがって、妊娠の維持や胎児の発生にアンドロゲン・アンドロゲンレセプターが機能し、顎下腺から上皮成長因子などの生理活性物質が分泌され、胎児の成長などに関与している可能性が考えられる。

遺伝子転写の活性化にはクロマチンの構造変化が重要であると考えられる。クロマチンの構造変化の要因としては、クロマチンを構成するタンパク質が修飾を受け、これがクロマチンの構造変化をきたし、転写活性を変化させるといふ考え方がある。本研究の<sup>32</sup>Pのタンパク質への取り込み実験で得られた成績は、マウス顎下腺核中にアンドロゲンレセプターの核局在の経時変化と一致して活性が変動するプロテインキナーゼが存在することを示唆した。また、この活性により非ヒストンタンパク質が主にリン酸化されることが明らかとなった。これらの結果はアンドロゲンによる遺伝子発現の調節機構に非ヒストンタンパク質のリン酸化が深く関わっている可能性を示唆するものである。

ステロイドレセプターにたいする核アクセプター部位として、アクセプタータンパク質やアクセプターDNA配列(ホルモンレスポンシブ配列)があげられるが、非ヒストンタンパク質はアクセプタータンパク質の一候補として考えられている<sup>32,33)</sup>。非ヒストンタンパク質のなかでhigh-mobility group(HMG,電気泳動上高移動度グループ)と呼ばれているタンパク質は、転写活性の高いクロマチン領域に多く含ま

れており、遺伝子活性の調節に重要な役割を果たすとの報告がある<sup>34,35)</sup>。今後、どの非ヒストンタンパク質がアンドロゲン依存的にリン酸化を受けるのか、また、そのリン酸化がクロマチン構造の変化を引き起こす要因となるかどうかの検討が必要と考えられる。

## 結 語

1. 雌マウス顎下腺核からmicrococcal nuclease消化により調製した転写活性画分中のモノ、ジ、トリヌクレオソーム上にアンドロゲンレセプター複合体が局在するが、この局在パターンはTP投与により変動した。

2. 雌マウス顎下腺核画分ならびに転写活性画分を[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATPとインキュベートした際に、両画分に<sup>32</sup>Pの取り込みが認められた。このリン酸化はTP投与3時間で最大値を示し、TP投与にたいする経時的応答性は両画分とも同じであった。

3. <sup>32</sup>Pで標識した核を0.35 M NaClで処理して分別した非ヒストンタンパク質とヒストン画分中のリン酸化能を比較するとTP投与3時間での非ヒストンタンパク質の活性が上昇した。

4. 以上の結果より、マウス顎下腺には活性型アンドロゲンレセプターによって活性化されるプロテインキナーゼが存在し、これらキナーゼはアンドロゲンレセプターによる遺伝子転写活性調節に関与しているものと推察される。

## 謝 辞

ご指導とご校閲を頂いた岩手医科大学歯学部口腔生化学講座太田稔教授、実験に際しご助言、ご協力を頂いた佐藤詔子助教授ならびに口腔生化学教室員各位に感謝いたします。また、論文を纏めるにあたりご助言をいただいた根本優子博士に感謝いたします。本論文の要旨の一部は第33回岩手医科大学歯学会例会において発表した。

## 文 献

- 1) Yamamoto, K. R. : Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Ann. Rev. Genet.* 19: 209-252, 1985.
- 2) Evans, R. M. : The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 40: 889-895, 1988.
- 3) King, W. J. and Greene, G. G. L. : Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature* 307: 745-747, 1984.
- 4) Welshons, W. V., Lieberman, M. E. and Gorski, J. : Nuclear localization of unoccupied oestrogen receptors. *Nature* 307: 747-749, 1984.
- 5) Wikstrom, A.-C., Bakke, O., Okret, S., Bronnegard, M., and Gustafsson, J.-A. : Intracellular localization of the glucocorticoid receptor: evidence for cytoplasmic and nuclear localization. *Endocrinology* 120: 1232-1242, 1987.
- 6) Strahle, U., Klock, G., and Schutz, G. : A DNA sequence of 15 base pairs is sufficient to mediate both glucocorticoid and progesterone induction of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7871-7875, 1987.
- 7) Beato, M. : Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56: 335-344, 1989.
- 8) Cato, A. C. B., Henderson, D., and Ponta, H. : The hormone response element of the mouse mammary tumour virus DNA mediates the progestin and androgen induction of transcription in the proviral long terminal repeat region. *EMBO J.* 6: 363-368, 1987.
- 9) Chalepakis, G., Arnemann, J., Slater, E., Bruller, H.-J., Gross, B., and Beato, M. : Differential gene activation by glucocorticoids and progestins through the hormone regulatory element of mouse mammary tumor virus. *Cell* 53: 371-382, 1988.
- 10) Byyny, R. L., Orth, D. N. and Cohen, S. : Radioimmunoassay of epidermal growth factor. *Endocrinology* 90: 1261-1266, 1972.
- 11) Gresik, E. W. and Barka, T. : Precocious development of granular convoluted tubules in the mouse submandibular gland induced by thyroxine and testosterone. *J. Anat.* 159: 177-185, 1980.
- 12) Wilson, J. D. and Goldstein, J. L. : Evidence for increased cytoplasmic androgen binding in the submandibular gland of the mouse with testicular feminization. *J. Biol. Chem.* 247: 7342-7348, 1972.
- 13) Takuma, T., Nakamura, T., Hosoi, K. and Kumegawa, M. : Binding protein for dihydrotestosterone in mouse submandibular gland. *Biochim. Biophys. Acta* 496: 175-181, 1977.
- 14) Verhoeven, G. : Androgen binding protein in mouse submandibular gland. *J. Steroid Biochem.* 10: 121-133, 1979.
- 15) Ohara-Nemoto, Y., Nemoto, T., Sato, N., Kyakumoto, S. and Ota, M. : Comparison of androgen receptor in male and female rat submandibular glands. *Jpn. J. Oral Biol.* 27: 679-784, 1985.
- 16) 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.
- 17) Kyakumoto, S., Kurokawa, R. and Ota, M. : Effect of castration and administration of testosterone on cytosol and nuclear androgen receptor in mouse submandibular gland. *Biochem. Int.* 11: 701-707, 1985.
- 18) 太田 稔: ラットならびにマウス顎下腺のアンドロゲンレセプター, 歯基礎誌, 27: 1007-1024, 1985.
- 19) 太田 稔: 唾液腺のステロイドホルモンレセプター, 唾液腺シンポジウム, 28: 1-21, 1987.
- 20) Ohara-Nemoto, Y., Nemoto, T., and Ota, M. : Ribonucleic acid association with androgen receptor from rat submandibular gland. *J. Steroid Biochem.* 29: 27-31, 1988.
- 21) 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.
- 22) Burton, K. : A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* 62: 315-323, 1956.
- 23) Bradford, M. M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254, 1976.
- 24) Hiremath, S. T., Loor, R. M. and Wang, T. Y. : Isolation of an androgen acceptor from salt extract of rat prostatic chromatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97: 981-986, 1980.
- 25) Kyakumoto, S., Kurokawa, R. and Ota, M. : Mechanism of replenishment of androgen receptors in cytosol of mouse submandibular gland. *J. Endocrinology* 115: 411-418, 1987.
- 26) Nemoto, T., Ohara-Nemoto, Y. and Ota, M. : Heterogeneity of molybdate-stabilized, non-transformed glucocorticoid receptor from rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 131: 1139-1145, 1985.
- 27) Sato, N., Kyakumoto, S., Sawano, K. and Ota, M. : Intranuclear distribution of rat liver glucocorticoid receptors by nuclease digestion in a

- cell-free system. *Endocr. Res.* 14: 243-262, 1988.
- 28) Bloom, K. S. and Anderson, J. N. : Fractionation of hen oviduct chromatin into transcriptionally active and inactive regions after selective micrococcal nuclease digestion. *Cell* 15: 141-150, 1978.
- 29) Mcghee, J. D. , Wood, W. I. , Dolan, M. , Engel, J. D. , and Felsenfeld, G. : A 200 base pair region at the 5' end of the chicken adult beta-globin gene is accessible to nuclease digestion. *Cell* 27 (1 pt 2) : 45-55, 1981.
- 30) Gross, D. S. and Garrard, W. T. : Nuclease hypersensitive sites in chromatin. *Annu. Rev. Biochem.* 57: 159-197, 1988.
- 31) Kurachi, H. and Oka, T. : Changes in epidermal growth factor concentrations of submandibular gland, plasma and urine of normal and sialoadenectomized female mice during various reproductive stages. *J. Endocrinology* 106: 197-202, 1985.
- 32) Spelsberg, T. C. , Goldberger, A. , Horton, M. and Hora, J. : Nuclear acceptor sites for sex steroid hormone receptors in chromatin. *J. Steroid Biochem.* 27 : 133-147, 1987.
- 33) Spelsberg , T. C. , Rories, C. , Rejman, J. J. , Goldberger, A. , Fink, K. , Lau, C. K. , Colvard, D. S. and Wiseman, G. : Steroid action on gene expression: Possible roles of regulatory genes and nuclear acceptor sites. *Biol. Reprod.* 40: 54-69, 1989.
- 34) Levy-Wilson, B. : Enhanced phosphorylation of high-mobility-group proteins in nuclease-sensitive mononucleosomes from butyrate-treated HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 2189-2193, 1981.
- 35) Palvimo, J. and Maenpaa, P. H. : Binding of high-mobility-group proteins HMG 14 and HMG 17 to DNA and histone H1 as influenced by phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* 952: 172-180, 1988.
- 36) Spaulding, S. W. , Fucile, N. W. , Bofinger, D. P. and Sheflin, L. G. : Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent phosphorylation of HMG 14 inhibits its interactions with nucleosomes. *Mol. Endocrinol.* 5 : 42-50, 1991.