

コロイド金標識 Nontransformed type androgen receptor の 組織細胞化学的研究

奈良県立医科大学第2解剖学教室

中山正成, 橋本研二, 奥田喜一, 山本浩司

HISTOCYTOCHEMICAL STUDY ON NONTRANSFORMED TYPE ANDROGEN RECEPTOR LABELED WITH COLLOIDAL GOLD IN RAT TESTIS

MASANARI NAKAYAMA, KENJI HASHIMOTO, YOSHIKAZU OKUDA
and HIROSHI YAMAMOTO

The 2nd Department of Anatomy, Nara Medical University

Received August 29, 1989

Summary: As described in a previous paper, with a dihydrotestosterone affinity Sepharose 4B column the authors isolated and purified the transformed type androgen receptor in high ionic strength from the rat testis.

Now, with the same affinity column we isolated the nontransformed type androgen receptor in the presence of sodium molybdate from the rat testis. The molecular weight of the receptor estimated by gel chromatography was about 300,000 daltons or more. In a histochemical electron microscopic study, the colloidal gold-labeled nontransformed androgen receptor had an affinity to nuclear proteins which might be constituents of the active chromatin in a Sertoli cell nuclei. The DNase treatment indicated that actin is not the target of the binding of this type of the receptor.

The nontransformed androgen receptor may localize in an active chromatin region as well as the transformed androgen receptor and regulate their hormone responsive gene in higher order chromatin structures.

Index Terms

nontransformed androgen receptor, colloidal gold post-embedding method, rat testis, electron microscopic study

緒 言

先の奈良医学雑誌(第40巻3号)¹⁾でジヒドロテストステロン アフィニティー カラムで単離精製した活性型の transformed type androgen receptor の組織化学的性状は DNA と androgen hormone に結合する両ドメインを持つことを示し, これまでに報告されているアンドロゲンレセプターの性状と一致していることを示した。このアンドロゲンレセプターの細胞内での存在形態

には2種類あると考えられている。即ち, 一つはステロイドホルモンにより活性化されたレセプター-ホルモン複合体で, DNA 能結合を持ち, これがホルモン応答遺伝子のアクセプター部位に作用して遺伝子発現に働いている活性型のアンドロゲンレセプターで, DNA 結合ドメインはメタル結合フィンガー構造をとっていると考えられる²⁾。もう一つはホルモンにより活性化されていない非活性型の nontransformed type のレセプターであり, 現在その複合体はモリブデン酸存在下で安定化された状態

で単離されており³⁾, ホルモンが結合しても活性化されないタイプである。この非活性型のアンドロゲンホルモンレセプターの研究はステロイドホルモンの作用とレセプターの活性化機構, さらにはその遺伝子発現の調節機構の研究にとって重要である。このステロイドホルモンレセプターの作用発現モデルは Greene (1984) らにより報告されている⁴⁾, 今回モリブデン酸存在下で dihydrotestosterone affinity column によりラット精巣の非活性型のアンドロゲンレセプターを単離し, その性状を組織細胞化学的に検討した結果を報告する。

材料と方法

材料

ウイスター雄ラット (4-6 週令) の精巣 (Lot No.2449) は Pel-Freez より購入した。5 α -dihydrotestosterone: BSA は Makor Chemical Co. より, DNase I (Type II, from bovine pancreas) および Testosterone は Sigma Chemical Co. より, Trypsin (203 unit/mg) は Millipore Co. より購入した。その他の試薬類は試薬特級, 電子顕微鏡用試薬を用いた。

方法

(1) Nontransformed type androgen receptor の単離精製

(a) cytosol

ラット精巣 27gr を 100ml の 10mM Tris-HCl (pH7.6), 1.5mM β -mercaptoethanol, 1.5mM EDTA, 20mM sodium molybdate (TMEM) で 0-2°C 下で Warring blender によりホモゲナイズした。これを cheese cloth で組織片を除去し, 日立 RPS65T ローターで 105,000 \times g, 2°C で 90 分間超遠心した。脂肪を除去後, ラット精巣の上清を得た。これを cytosol 分画とした。

(b) Affinity chromatography

5 α -dihydrotestosterone affinity column の作成, およびレセプターの溶出は先の論文に記載された方法で作成した¹⁾, cytosol 分画を dihydrotestosterone affinity column に吸着させ, TMEM 緩衝液で十分に洗浄後, カラムよりゲルを取り出し, 100 μ g/ml の testosterone を含む TMEM 緩衝液中にゲルを 4°C で 6 時間以上置いた。ゲル溶液を再度カラムにつめ, 過剰のテストステロンホルモンを加えることにより遊離してきたタンパク質を回収し, 蒸留水により透析後凍結乾燥により乾燥させた。

(c) Gel chromatography

TMEM 緩衝液 0.2ml に溶かした蛋白分画を同溶液で平衡化した SuperoseTM12 (分画範囲 300,000 以下) ゲル

カラムで FPLC system (Pharmacia Co) にて分画した。分画流速は 0.5ml/min で行った。ゲル濾過の分子量測定は Catalase (M.W.=240,000), Ovalbumin (M.W.=45,000), Cytochrome C (M.W.=12,500) の保持時間を指標として測定した。

(2) 電子顕微鏡学的研究

(a) 固定と包埋

ラットをエーテル麻酔し, 精巣を摘出後すぐに氷冷した 2.5% glutaraldehyde-0.1M phosphate buffer (pH7.4) 溶液中で 1-2mm³ に細切した。この組織片を 4°C で 2 時間固定した。0.25M Sucrose 溶液で一昼夜十分に洗浄し, 上昇アルコールシリーズで脱水後, LR white resin (London Chemical Co.) で 60°C, 24 時間重合包埋した。超薄切片を作成し, 200-300mesh の Nickel grid (Veco Co.) に載せ, 使用時まで 4°C で保存した。

(b) Nontransformed androgen receptor のコロイド金標識

17nm コロイド金は Roth ら (1987) の⁵⁾ 方法により作成した。即ち, pH 未調整のコロイド金溶液 2ml に 10 μ g の nontransformed androgen receptor を加え, 数分後 5% polyethylene glycol (#20,000) を 40 μ l 加えて安定化させた。

この溶液を日立 RP65T ローターで, 24,000rpm 2°C, 40 分間遠心し, ベレットを得た。このベレットを 2ml の 0.05% polyethylene glycol, 5% glycerol, 0.01% Na₂S₂O₄ 溶液に再懸濁し, 10-30% の glycerin linear density gradient に重層し, 日立 RPS40T ローターで 14,000rpm, 4°C, 30 分間遠心して金粒子径を揃えた。

(c) DNase I のコロイド金標識

DNase I のコロイド金標識は Bendayan (1981) ら⁶⁾ の方法に準じて 5nm コロイド金で作成した。

(d) 染色法

(1) Postembedding 法による一重染色

超薄切片の載った grid を 0.05% Triton X-100 を含む phosphate buffered saline (TBS) (pH7.4) で 10 分間前処理し, 最適染色像が得られるように同溶液で希釈したコロイド金標識 nontransformed androgen receptor を室温下で 30-90 分間反応させ, 0.05% Tween20 を含む PBS (pH7.4) で 15 分間 3 回洗浄した。蒸留水で洗浄後, 酢酸ウラニール, レイノルド溶液で染色し, 透過型電子顕微鏡 (TEM) (日本電子 1200EX, JEOL) で観察した。

(2) Trypsin 処置

超薄切片の載った grid を PBS にトリプシンを 10 μ g/ml になるように溶かした液で 37°C で 15 分間前処置し,

TBS で洗浄後(d)の(1)で述べた一重染色を行った。

(3) Postembedding 法による同一面での二重染色

Gridの前処理は一重染色の場合と同じである。前処理後 TBS(pH7.4)で希釈した 5nm コロイド金標識 DNase I で 37°C で、30 分間、湿箱中で反応させた。反応後、TBS で 5 分間、3 回、洗浄後、TBS で一重染色と同倍率に希釈した 17nm コロイド金標識 nontransformed androgen receptor を 37°C、30 分間、湿箱中で反応させた。反応後、0.05% Tween 20 を含む PBS (pH7.4) で 15 分間、3 回洗浄し、一重染色と同じ方法でカウンター染色し、TEM にて観察した。

(e) 金粒子数のカウントと面積の測定

コロイド金粒子の数はコロニーカウンターにて数えた。核と細胞質の面積の測定はライツ半自動画像解析装置 (Leitz-A.S.M.) にて測定した。

結果と考察

ラット精巣をモリブデン酸存在下でホルモゲナイズすることにより、非活性型の、安定化した Nontransformed type androgen receptor を、one step method により得た。即ち、約 27gr のラット精巣を 3 倍量の TMEM 緩衝液でホルモゲナイズし、超遠心後の上清 (蛋白量として 2.5gr) からアンドロゲンホルモンレセプターを 5 α -dihydrotestosterone affinity column で精製した。収量は約 200 μ g であり、非活性型のアンドロゲンレセプターのゲル濾過 (分画範囲 300,000 以下) での分子量の測定では void volume 付近で溶出したので、約 300,000 か、それ以上の分子量を持ったものであろう。これまでに報告されたなかで、Nemoto (1985)⁷⁾ らは顎下線から得た非活性型のアンドロゲンレセプターは沈降係数約 8S でゲル濾過の分子量は 220,000 であると報告している。また最近、Rowley (1986) ら⁸⁾ は沈降係数が 9S type (M.W.=270,000-300,000) と 7.7S type の 2 種類の非活性型を報告し、前者は 4.4S アンドロゲンレセプターの oligomer が DNA への結合能はないが、後者は 4.4S monomer が RNA と複合体を作り、DNA への結合能を持った中間体であると報告している。今回得たモリブデン酸安定化ホルモンレセプターはゲル濾過で得た分子量測定からは Rowley らの報告している 2 種類の型のうち、後者の 7.7S type よりももっと高分子の 9S type のものを得たと考えられる。今回この分子量約 300,000 の安定化した非活性型のアンドロゲンホルモンを proteolysis なしに得ることができた最大の理由は one step method により、短時間にアンドロゲンレセプターを他のタンパク質から分離した結果であると考えられる。

次にこの非活性型アンドロゲンレセプターをコロイド金標識し、その組織への結合により生物学的性状を検索した。コロイド金標識 nontransformed androgen receptor (NTRG) でラット精巣を染色すると精細管内にあるセルトリ細胞、精子形成細胞群のほとんどの細胞に染色が認められたが、染色体の凝縮がみられる精子では金粒子はほとんど認められなかった。精細管内細胞全体での各細胞をみるとコロイド金の分布は染色される細胞の核と細胞質を比較すると核に特異的で核に 80% 以上 ($P < 0.01$) の金粒子が認められ、核に特異的に親和性を示した。核内での分布を見ると Fig.1 に示すように、セルトリ細胞の核ではクロマチンが分散した状態がほとんどで、凝縮したクロマチンはほとんど認められない。この分散したクロマチンの境界部に主として金粒子が認められた。この分散したクロマチンは Felsenfeld (1986) ら⁹⁾ のモデルでは 30nm fiber である solenoid から 10nm fiber である beads on a string の状態であり、この高次構造の変化が遂伝子の転写活性に重要な働きをしていると考えている。金粒子の分布しているこのクロマチンの境界部の径は平均 20nm 以下であるので恐らく solenoid type が beads on a string の状態、即ち転写活性の盛んな状態にあると思われる所にこの金粒子が存在していると考えられる。又 Fig.2 で示すようにクロマチンが凝縮している所、すなわち solenoid type がさらに凝縮した高次構造である condensed chromatin の転写不活性な部位と考えられる領域にはこの金粒子が存在していないので、非活性型のアンドロゲンレセプターの核内での存在場所も活性型のアンドロゲンレセプターの存在場所とはほぼ一致したところにあるのかもしれない。このことはアンドロゲンレセプターが常にホルモン応答遺伝子かあるいは近くに存在して、ホルモンによりレセプターが活性化されるとこの活性型レセプターが応答遺伝子の転写を制御している領域 (アクセプターからプロモーター領域) の構造に変化を与え、転写系酵素の働きを促進するのかもしれない。

次にこの非活性型のアンドロゲンホルモンレセプターの結合相手が DNA かタンパク質か何かを探るために、精巣の切片を trypsin 処理後に NTRG 染色すると Fig.3 に示すように金粒子はほとんど核内に存在せず、非特異的な染色のみであったことから、非活性型のアンドロゲンレセプターは核タンパク質に親和性を持つことを示した。さらに Fig.4 に示すように精巣の切片を 5nm コロイド金標識 DNase I で前染色し、次に同一表面上で 17nm NTRG で後染色した結果、Fig.1 で示した場合の 70% 以上の NTRG の金粒子が核内に認められた。同希

積率でアッセイしたにもかかわらず約7割が残ったことは DNase I 感受性領域 DNA や nuclear matrix の主要タンパク質であるアクチンが NTRG の受容体ではないことを示していると同時に約3割のこの受容体が DNase I により結合阻害されることを示している。このことは精製したレセプタータンパク質の純度を示していると考えられる。一方このモリブデン酸安定化レセプターの欠点は、モリブデンがレセプターの DNA 結合ドメインを構成するシステイン残基に強い親和性を示し¹⁰⁾、DNA 結合活性を消失させる性質を持つことである。従って、この複合体が solenoid や beads on a string を構成する核タンパク質と DNA の両方に同時に結合能を持っているかどうか不明であるが、低イオン強度下で非活性化型の複合体は現在のところ単離されていないため、今回の実験では確認できなかったが Rowley (1986) ら⁸⁾ は 9S type のアンドロゲンレセプターには DNA 結合活性は無いと報告しており、我々が得たレセプターも DNA 結合活性はないかもしれない。

以上のことから非常性型のアンドロゲンレセプターは分子量約 300,000 で、アンドロゲンと核タンパク質に親和性のあるものを one step method により得たと考えられる。

この論文の一部は第 94 回日本解剖学会総会 (1989 年 宮崎) にて発表した。

文 献

- 1) 中山正成, 奥田喜一, 別府謙一, 橋本研二, 山本浩司: 奈医誌. **40**: 315, 1989.
- 2) **Danielsen, M., Hinck, L. and Rinsgold, G.M.:** Cell **57**: 1131, 1989.
- 3) **De Boer, W., Blot, J., Brinkman, A.O. and Mulder, E.:** Biochimica et Biophysica Acta **889**: 240, 1986.
- 4) **King, W.J. and Greene, G.L.:** Nature **307**: 745, 1984.
- 5) **Roth, J., Bendayan, M. and Orci, L.:** J. Histochem. Cytochem. **26**: 1074, 1978.
- 6) **Bendayan, M.:** J. Histochem. Cytochem. **29**: 531, 1981.
- 7) **Nemoto, T., Ohara-Nemoto, Y., Sato, N., Kyakumoto, S. and Ota, M.:** Biochimica et Biophysica Acta **839**: 249, 1985.
- 8) **Rowley, D.R., Premont, R.T., Johnson, M.P., Young, C.Y.F. and Tindall, D.J.:** Biochemistry **25**: 6988, 1986.
- 9) **Felsenfeld, G. and McGhee, J.D.:** Cell **44**: 375, 1986.
- 10) **Whethers, B.J., Grate, J.H. and Schrauzer, G. N.:** J. Am. Chem. Soc. **101**: 917, 1979.

Figure legends

Fig. 1-2. Postembedding method with a colloidal gold(17nm) labeled nontransformed androgen receptor(NTRG) in a Sertoli cell. Nucleolus(NO), fibrillar shell(Fs), fibrillar center(Fc), granular region(G), basement membrane(BM), heterochromatin(HC), nucleus(N) and cytoplasm(Cyt). Bar, 1 μ m

Fig. 3. After trypsin treatment, a NTRG(arrow) stain in a Sertoli cell was carried out in the same concentration as shown in Fig. 1-2. Bar, 1 μ m

Fig. 4. Doubly stained postembedding method in a Sertoli cell. The method was described on materials and methods. The arrowhead was 5 nm DNase I gold and the arrow was 17 nm NTRG. Basement membrane(BM), nucleolus(NO), interchromatin granules(IG). Bar, 1 μ m



