

アンドロゲン依存組織（ラット前立腺及び
マウス乳癌SC115とそのサブライン）
のrRNA合成に対するアンドロゲンの
制御機構

鈴木 徳 昭

アンドロゲン依存組織（ラット前立腺及び
マウス乳癌SC115とそのサブライン）
のrRNA合成に対するアンドロゲンの
制御機構

鈴木 徳 昭

目次

	頁
第1章 緒言	---4
第2章 ラット前立腺単離核における RNA polymerase I の "engaged" form 及び "free" form 活性に及ぼすアンドロゲンの初期作用	---7
第1節 序論	---7
第2節 ラット前立腺単離核における RNA polymerase I の活性測定条件の検討	---9
第3節 ラット前立腺核内の RNA polymerase I の "engaged" form と "free" form の活性に対するアンドロゲンの効果	---21
第4節 前立腺単離核の RNA polymerase I の活性に対する cycloheximide の影響	---27
第5節 RNA polymerase I を制御する蛋白性因子に関する2つの実験	---31
第6節 総括	---39
第3章 ラット前立腺核小体蛋白質燐酸化に及ぼすアンドロゲン (in vivo), ポリアミン, cyclic nucleotides (in vitro) の影響	---43
第1節 序論	---43

第2節	ラット前立腺核小体蛋白の燐酸化に及ぼす去勢 の影響	--- 45
第3節	前立腺核小体蛋白の燐酸化に及ぼすテストステ ロン投与の影響	--- 48
第4節	ポリアミン及び cyclic Nucleotidesの影響	--- 57
第5節	総括	--- 63
第4章	アンドロゲン依存性マウス乳癌(シオノギ癌 SC115)とそのサブライン(CS-1とCS-2)に おける rRNA 合成に対するアンドロゲン依存性	--- 67
第1節	序論	--- 67
第2節	SC115とそのサブライン(CS-1とCS-2) の細胞増殖と細胞質のアンドロゲンレセプター の比較	--- 68
第3節	核内におけるアンドロゲンレセプター複合体の 挙動	--- 74
第4節	単離核の RNA polymerase I, II の活性に及 ぼすアンドロゲンの効果	--- 79
第5節	総括	--- 84
第5章	まとめ	--- 88

謝辭	--- 90
略号 (ABBREVIATIONS)	--- 91
参考文献 (REFERENCES)	--- 92
掲載雑誌目録	--- 102

第1章

緒言

多細胞生物，とくに高等動物の場合，各細胞がそれぞれの役割を荷い，お互いに密接に情報伝達を行うことによって調和ある生命維持が可能になる。この細胞間の情報伝達を担う物質としてホルモン，神経伝達物質，オートコイドなどがあるが，これらの物質のその標的細胞への最初の作用という点にもとづいて，2つの群に分けられる。

第1の群（ペプチド性ホルモンやカテコールアミンなど）は各標的細胞の細胞膜に存在する特定の受容体に結合して，細胞内に新たなシグナル（second messenger）を発生させるものである。このシグナルとしては1959年に Sutherland によって見出された CAMP が最初であり，この合成酵素である *adenyl cyclase* とその制御系が脚光をあびた（Robinson et al, 1971）が，現在はこれ他に *phospholipase C* の活性化により *phosphatidyl inositol* (PI) より生ずる *diacylglycerol* (DG) が Ca^{2+} と共同して *protein kinase C* を活性化する系（Nishizuka, 1983）や，その他インシュリンなどが働く未知の系もあることが知られるようになってきた。いずれにしろ，細胞内に生じた second messenger が *protein kinase* などを活性化することによってその細胞を制御するものである。

第2の群は，細胞膜を通りぬけて主として核に作用するものである。これはステロイドホルモン，甲状腺ホルモン，ビタミンD₃などを含み，核内で直接的に遺伝子発現を制御していることが明らかになってきているもので，これらのホルモンの研究は分子生物学の中心課題とも合流し，多くの研究者の注目をあつめている。

ステロイドホルモンの作用機構の分子レベルでの研究は Jensen ら（1960）のレセプター蛋白質の発見に始まるというてよからう。彼らは高い比活性をもつ3H-エストラジオールを未熟ラットに注射

し、子宮の細胞質中に 3H-エストラジオールレセプター複合体を見出し、これがいわゆる "two step" で核内に入ることを示した。このあと、他の多くのステロイドホルモンにおいてもその標的器官の細胞内に特定のレセプター蛋白質の存在が見出され、レセプターの精製、性質について多くの知見が蓄積されてきた (King and Mainwaring, 1974; Yamamoto and Alberts, 1976)。しかしステロイドホルモンについての中心的課題は、これらのレセプター蛋白質が核内へ入った後の行動についてである。この点については O'Malley ら (1978) のニワトリの輸卵管におけるオバルブミンやアビジンの mRNA 合成に対するプロゲステロンやエストラジオールの作用についての先駆的な研究以来、最近の遺伝子工学を利用したいくつかの研究業績 (Mayo and Palmiter, 1982; Hynes et al, 1983; Chandler et al, 1983) など総覧すると、特定の mRNA の gene の発現の制御に関係することは疑いないことであるが、具体的に遺伝子及びその近傍でどのように働いているかについてはまだほとんど解明されていない。

その上、これらは anabolic action をもち、細胞増殖に関係の深いステロイドホルモンの場合には、むしろ rRNA 合成に対する効果の方が顕著であることに注目しなければならない。例えばアンドロゲンの場合は、早くから rRNA 合成が非常に速かに促進されることを見出されており (Liao et al, 1966; Liao and Linn, 1967)、このことは RNA polymerase I の活性測定からも確認されている (Mainwaring et al, 1971; Hosoya et al, 1978)。しかし、この rRNA 合成は、肝で見られる (Muramatsu et al, 1970) ように、その前にある種の蛋白が合成されるようであるので複雑な様相をもつ。しかし、この系では生成物は pre-rRNA であること、その遺伝子配列は上流部分を含めてほとんど解明されていること、核小体として単離して調べることも可能なことなど、有利な点も多く、また上に述べたように増殖、癌との関係からも重要なので、この rRNA 合成に研究の焦点をあわせることにした。

これを研究する組織としては、まずラット前立腺を取り上げることにした。それはアンドロゲン依存性組織の中でもよく研究されており、アンドロゲンによく反応すること、又他のホルモンの影響を受けにくいからである（前立腺に関する研究を第2章と第3章に記す）。

次には、シオノギ乳癌SC115とそのサブライン（CS-1とCS-2）を用いることにした。これは後で詳しく述べるが、これらの腫瘍は増殖に対するアンドロゲン依存性が異なるものであり、アンドロゲン作用と増殖、 TRV A 合成との関係を調べるのにより実験材料であると考えられるからである（SC115とそのサブラインに関する研究を第4章に記す）。

第2章

ラット前立腺単離核における RNA polymerase I の "engaged" form 及び, "free" form 活性に及ぼすアンドロゲンの初期作用

第1節 序論

既に述べたような理由により, ラット前立腺の rRNA 合成について, そのアンドロゲンによる促進作用の機構を研究するにしてもいろいろなアプローチがある。既に二,三の研究グループが mRNA 合成制御の研究に用いているような, 核内の関係する各構成成分を単離した上で再構成系を作って調べるという方法は勿論最終的には必要であるが, 現段階ではまだ確かめておかなければならない点が多く, 再構成系で得られた結果が必ずしも in vivo の現象を反映しているとは考えにくい。たとえば, 単離の過程で, 重要な調節蛋白質, 低分子物質が流出していないか, 各成分が無傷に単離されたか各構成成分をどのようにしてもとの状態に再構成するかなどの問題がある。そこで筆者はまず単離核を用いる RNA 合成反応を調べることにした。単離核であるから, 核内の構成成分は in vivo に近い状態に保たれていると考えられる。これについてできる限り, RNA 合成の諸相を研究してから, 次に単離核の糸を解体する方向に進むことにする。

単離核における RNA 合成の特徴は, in vivo で既に転写を開始している RNA 鎖の伸長反応のみであって in vitro での新たな転写開始はみられないということである (Udvardy and Seifart, 1976; Nagai et al, 1975)。in vitro の単離核を使った RNA polymerase I の活性を測定したとき, 去勢により減少し, テストステロン投与によって増加するが, これは核を単離した時点ですでに転写を開始している rRNA precursor の chain 数が減少, 増加していることを意味する。従って, アンドロゲンは RNA polymerase

I の転写開始反応の調節に何らかの関与をしていると考えられるわけである。このアンドロゲンの関与がどのようなものかについて焦点を合わせてみる必要がある。

cycloheximide や puromycin などの蛋白合成阻害剤をラットに投与後、肝臓の単離核の RNA polymerase I の "engaged" form の活性を測定すると、これが速かに ($t_{1/2} = 1.3$ h) 減少していることが見出されている (Muramatsu et al, 1970; Mishima et al, 1979)。RNA polymerase I の酵素自体の半減期はかなり長いので (Schmid and Sekeris 1973, Benecke et al, 1973), この減衰は turn over の早い蛋白質が RNA polymerase I の initiation を制御しているためと考えられる。即ちこの turn over の早い蛋白質が核内に存在しないと, RNA polymerase I が DNA に結合し転写開始を行なめないという仮説である。ラット前立腺の場合, アンドロゲンを取り去ったり, 投与した時の RNA polymerase I の活性変化は, cycloheximide を投与して RNA polymerase I の活性を阻害させる場合よりもずっと遅いけれども (Liao et al, 1966; Liao and Linn, 1967), これは標的臓器におけるこのホルモンの濃度変化に関係しているためで, 本質的には上で述べた cycloheximide の場合と似ていると思われる。この両者の RNA polymerase I の活性の変動が, どのように結びつけられるか, 非常に興味のあるところである。

単離核を使って RNA polymerase I の活性を測定する際に有利な点がもう一つある。それは, 細胞を高張な溶液でホモジナイズ後に, 高張な溶液のままで核を単離した場合, 核内の RNA polymerase I はほとんど核内にとどまり (Yu, 1975a), in vivo のままの全 RNA polymerase I の量を測定することが可能だということである。

又核内では上で述べてきた "engaged" form の他に "free" form と呼ばれるものが存在する。これは外から DNA を加えた時, これを読むことのできる RNA polymerase I のことである (Yu, 1974;

1975 (b), Kellas et al, 1977)。先に述べた turn over の早い蛋白質が、この "free" form を "engaged" form に変換させるということが考えられるが、まだ確かなことはわかっていない。

前立腺の場合にも、両者の酵素が単離核を用いた系で存在することが見出され (Hosoya et al, 1978), アンドロゲンとの関係について多少調べられているが、その実験では "free" form の活性測定につきまとう誤差のこともあり、まだ立ちいった研究はなされていない。

以上のような状況で筆者は、ラット前立腺単離核における RNA polymerase I の "engaged" form, "free" form の活性が、アンドロゲンや cycloheximide, 更には mRNA 合成を阻害する α -amanitin を用いてどのように変化するかを調べてみることにした。

第2節 ラット前立腺単離核における RNA polymerase I の活性測定条件の検討

単離核における RNA 合成を測定する時は、2 価のカチオン、イオン強度、核量、その他多くの条件について詳しく検討を行った上でなされなければならない。これらの点について検討されている組織はラット肝 (Widnell and Tata, 1966; Chambon et al, 1968; Novello and Stirpe, 1969; Hulbert et al, 1969) や子宮 (Bouton et al, 1977), マウスの腎 (Jänne et al, 1976) など比較的少数であり、特に本章でこれから問題となるラット前立腺の場合は、まだ十分検討されてはいない。とくに "free" form の活性測定は、その活性が肝の場合に比べて少ない上 (Hosoya et al, 1978), 核の単離操作中に, "free" form が核外へ流出する可能性があるため (Yu, 1975 (a)(b)), まず基礎的な条件の検討を行ってから本研究に入る必要があった。そのため本節では、ラット前立腺の核の単離法の検討, RNA polymerase I, II の活性に対する Mg^{2+} , Mn^{2+} の効果, 及び RNA polymerase I の "free"

form の測定条件の検討を行った。

[材料と方法]

実験動物は松本実験動物研究所，又は高杉実験動物より購入したウイスター系ラット（150～250g）で，恒温室（25℃）で，固型飼料（オリエンタル・MF）と水とを十分に与えて飼育し，250～350g になったものを使用した。

ラット前立腺単離核の精製 断首して摘出された腹部前立腺は，直ちに湿重量を測定後，ハサミで細かく切りきざむ。核の単離，精製は次の Method I（"engaged" form のみの活性を測定する時）又は Method II（"engaged" form と "free" form を同時に測定する時）で行った。すべての操作は 0～4℃で行う。

Method I

細かく切りきざんだ前立腺に 5ml の 0.32M sucrose-1mM $MgCl_2$ （以下 Medium A と略す）を加え，ガラス-テフロンホモジナイザーでホモジナイズ後，100メッシュのステンレスネットで結締組織を取り除いた後，10%（w/v）となるように Medium A を加えて，700×g 10分遠心後，沈澱を 30ml の 2.2M sucrose-1mM $MgCl_2$ （以下 Medium B）に suspend してホモジナイズ後，5ml の Medium B のベッドを敷いた遠心チューブの中に入れ，62800×g で 60分間遠心を行い（HITACHI 65P，RPS-27-2）核を沈澱させる。これに組織と同量の 0.32M sucrose を加えホモジナイズ後，核 suspension とする。

Method II

細かく切りきざんだ前立腺に 5ml の Medium B を加えホモジナイズ後，100メッシュのステンレスネットを通して結締組織を除いた後，25ml の Medium B を加えて均一にし，超遠心にかける。以下の操作は Method I の場合と同じである。

このように調製した核 suspension は氷中で放置し，その日のうちに RNA polymerase 活性を測定する。

RNA polymerase 活性の測定 RNA polymerase の活性は

[^3H] UTP (略号は 9/ ページ参照) の酸不溶性画分への取り込みを液体シンチレーションカウンターで測定することにより調べた。以下にその標準測定条件を示す。

核の RNA polymerase の "engaged" form の活性測定は, 0.25 ml の反応溶液で行い, 0.1 ml の核 suspension (100 μg の DNA を含む) と以下の成分を含む。

33.3 mM Tris-HCl (pH 7.9), 0.6 mM の ATP と GTP と CTP, 0.03 mM UTP, 3 μCi [^3H] UTP, 4.0 mM MgCl_2 , 50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.33 mM DTT.

以上の成分は通常 0.15 ml のアッセイ medium としてアッセイ系に加えらる。ただし Mg^{2+} の効果を調べる場合は Mg^{2+} を最終濃度で 0 ~ 10 mM まで変えて測定した。また Mn^{2+} の効果を調べる場合には Mg^{2+} の代りに Mn^{2+} を 0 ~ 6 mM, 硫酸の効果を調べる場合には, Mg^{2+} 4 mM, あるいは Mn^{2+} 2 mM の存在下で, 硫酸濃度をいろいろに変えた medium で測定した。

反応は上記のアッセイ medium を 25°C で 5 分間, プレインキューベーションし, Dische 法 (Dische, 1937) により, DNA 量を 100 μg / 0.1 ml に調製された核 suspension を 0.1 ml 加えて反応を開始させ, 25°C 10 分インキュベートする。反応は 10% PCA 2 ml を加え, 氷中で 20 分放置後, 3000 rpm 10 分の遠心を行うことにより沈殿を回収し, 5% PCA - 1% ピロリン酸ナトリウム溶液で 3 回洗う。そしてこの酸不溶性の沈殿に 0.3 N NaOH を 0.5 ml 加えて 30°C, 16 時間, インキュベート後, 1.5 N HCl を加えて中和し, 更に 10% PCA 0.6 ml を加えて 20 分, 氷中で放置後, 3000 rpm 10 分の遠心を行い, 上清 (RNA 画分) に含まれている ^3H のカウントを, トルエン系シンチレーターに溶解後に液体シンチレーションカウンターで測定する。一方, 上清を取り除いた残りの沈殿は更に 5% PCA を 3 ml 加え, 70°C, 20 分のインキュベートにより, DNA を加水分解し, DNA 定量を Burton 法 (Burton, 1956) により行った。

RNA polymerase 活性は, DNA 100 μ gに相当する核あたりの酸不溶性画分に取り込まれたUMP量 Pmolを用いて表わした。

RNA Polymerase I の活性を測定する場合は, アッセイ medium に α -Amanitin (1 μ g/ml) を加え, RNA polymerase II を測定する時は, α -Amanitin を加えない時の活性から, 加えた時の活性を差し引いて求めた。

"free" form の活性測定は, 標準アッセイ medium に polyd(A-T) と Actinomycin D をそれぞれ 30 μ g/0.15 ml, 80 μ g/ml を加える。反応は, これらが入った medium (0.1 ml) を 25°C, 5 分, フレインキュベート後, Method II で調製した核 suspension 0.05 ml (約 60 μ g の DNA を含む) を加えて 25°C, 30 分, インキュベートする。その後の操作は "engaged" form の場合と同じである。

[結果]

単離核を用いた in vitro での RNA 合成は, その合成のタイムコースをみてみると, Fig. 1. のように次第に弯曲し, 5~15 分後には反応がストップしてしまう。この主な原因は単離核の RNA 合成は in vivo で既に転写開始をしている RNA 鎖の伸長反応をみている, つまり, reinitiation がないことによるものと考えられている (Udvardy and Seifart, 1976; Nagai et al, 1975)。そこで正確な活性測定をするためには, 最初の直線部分を出来るだけ長くするようにし, その領域の時間内で測定しなければならない。このため筆者は通常の 37°C での反応から, 温度を少し下げ, 25°C で反応させることにした。

又前立腺の場合は, 単離核での RNA 合成には RNase 活性は見られないという報告がある (Hosoya et al, 1978) けれども, このように温度を下げることは RNase の活性を更に確実になくすためにも有利であると考えられる。

又, 核の量により, 反応のプラトーに達する活性が異なる。即ち, 核の量が少いほど反応が進む結果が得られた (Fig. 1.)。

このタイムコースの実験で得られた結果より, 以後の実験はすべ

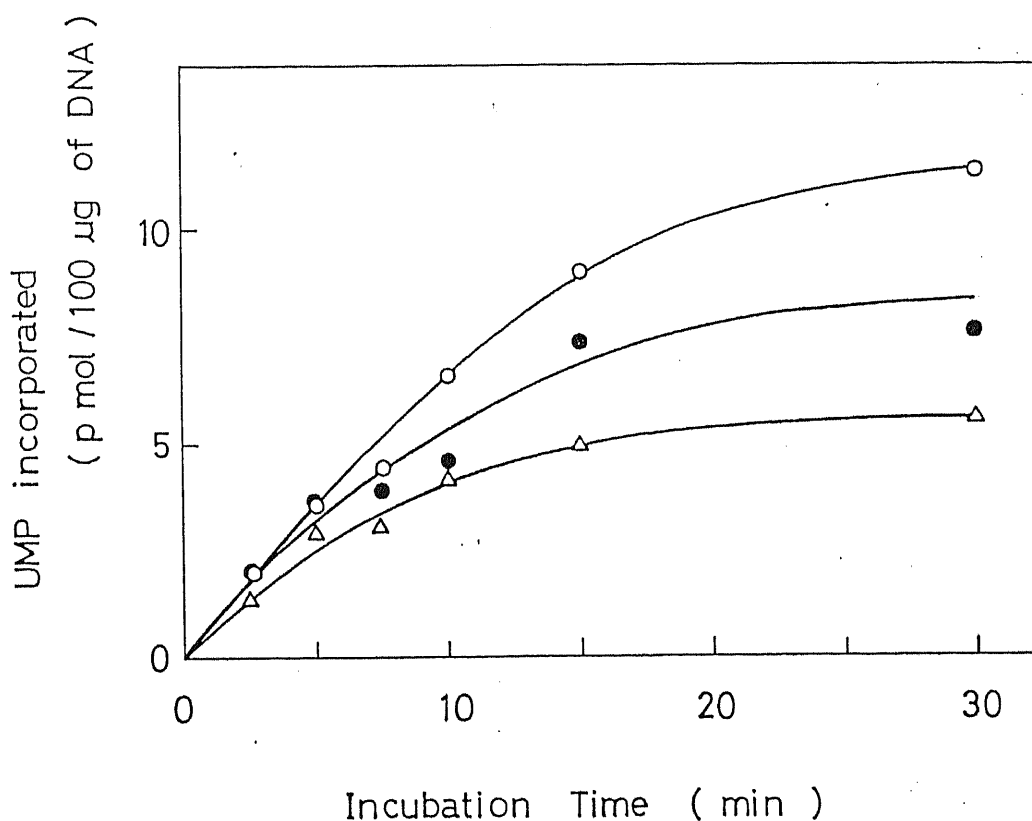


Fig. 1 Time course of RNA synthesis by RNA polymerase I in nuclei of rat ventral prostates. the reaction mixture contained, in a final volume of 0.25 ml: 1 $\mu\text{g/ml}$ α -amanitin, 4 mM MgCl_2 , 50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 μCi ^3H -UTP, 0.6 mM ATP, CTP and GTP each, 33.3mM Tris-HCl, pH 7.9.

The reaction was started by 0.1 ml of nuclear suspension which contained the amount of DNA as indicated below, followed by incubation for the time indicated in the figure at 25°C . The amount of DNA in the reaction mixture was determined later and found to be in the range of 100-110 μg (-o-), 55-65 μg (-●-), or 30-40 μg (-A-).

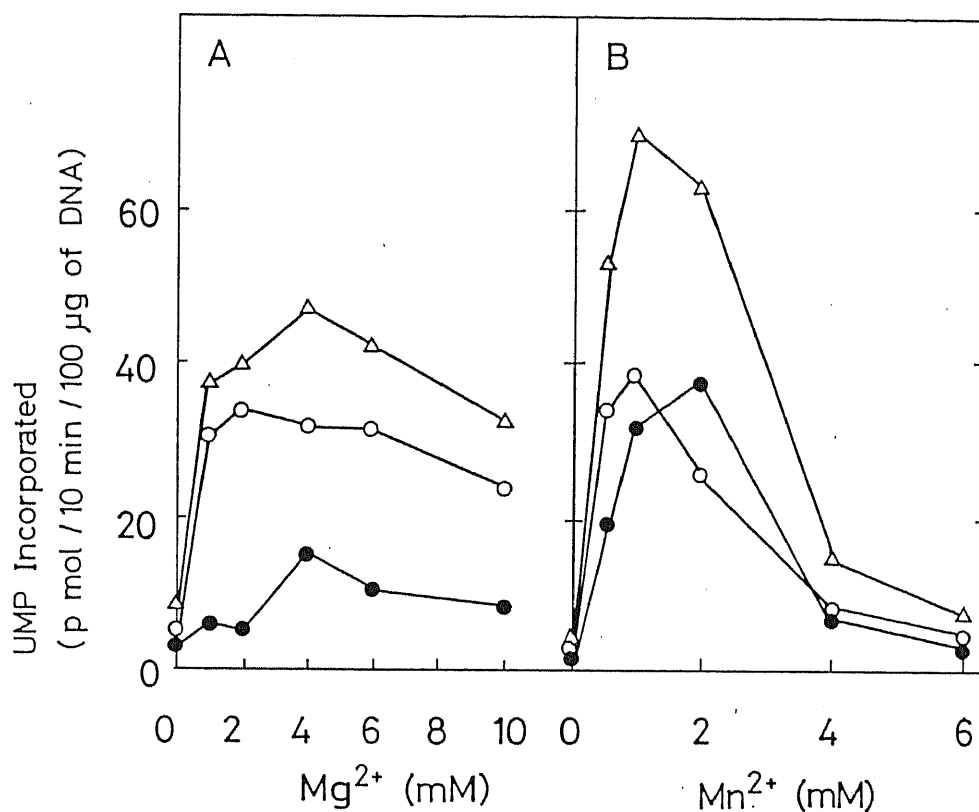
て極量 ($100 \mu\text{g DNA/tube}$) を一定にし、 25°C , 10分インキュベートすることにより RNA polymerase I の活性を測定することにした。

次にこのようなインキュベーション条件で2価のカチオン, 及びイオン強度の影響について調べてみた。

一般に RNA polymerase の活性はイオン強度や2価のカチオン (Mg^{2+} , Mn^{2+}) に非常に強く影響される。RNA polymerase I は、低いイオン強度下で Mg^{2+} , あるいは Mn^{2+} によりその活性が促進され、RNA polymerase II は高いイオン強度下で Mn^{2+} により活性が促進されること肝 (Reeder, 1972; Chambon et al, 1968; Widnell and Tata, 1966; Novello and Stirpe, 1969; Hulbert et al 1969) や、子宮 (Bouton et al, 1977) について示されている。しかし前立腺の単離核の RNA 合成反応の場合、そのイオン強度, 及び Mg^{2+} , Mn^{2+} の効果について詳しく調べた例がないため、まずこの点の検討を行った。

Fig. 2 は、硫酸濃度 50 mM のときの RNA polymerase (engaged form) の活性に対する Mg^{2+} と Mn^{2+} の濃度の影響を調べたものである。 Mg^{2+} は 1 mM ですでに RNA polymerase I を活性化するか、 2 mM で最大となり、それ以後次第にその効果が減少する。 Mn^{2+} も RNA polymerase I を活性化するか、その至適濃度は 1 mM で、高濃度の Mn^{2+} は活性を急激に減少させた。RNA polymerase II に対する Mn^{2+} の効果は 2 mM で最大を示し、 Mg^{2+} の効果はあまり見られなかった。

次に Mg^{2+} 4 mM と Mn^{2+} 2 mM 存在下で硫酸濃度の影響を調べた (Fig. 3)。RNA polymerase I は、 Mg^{2+} でも Mn^{2+} でも 50 mM の硫酸でその活性が最大になるのに対して、RNA polymerase II は Mg^{2+} 存在下において、硫酸 50 mM で小さいピークと、硫酸濃度の増加に伴う活性上昇が見られたが、 Mn^{2+} 2 mM 存在下での反応の場合よりも硫酸の効果は少なかった。又 Mn^{2+} 2 mM 存在下では硫酸濃度の増加に伴い活性が直線的に増加した。これらの結果より以後、RNA polymerase I を測定する場合は、 50 mM 硫酸存



LEAGENTS TO FIGURES

Fig.2 Effect of concentrations of divalent cations on ^3H -UMP incorporation into RNA in prostatic nuclei under low ionic strength conditions. The activity of nuclei which were isolated by Method I from normal rat prostates was measured under standard conditions (see Materials and Methods) except that divalent cation (A) Mg^{2+} (B) Mn^{2+} was present at the indicated concentration. Δ , without α -amanitin; o , with $1 \mu\text{g/ml}$ of α -amanitin (RNA polymerase I); $\bullet$, incorporation inhibited by α -amanitin (RNA polymerase II).

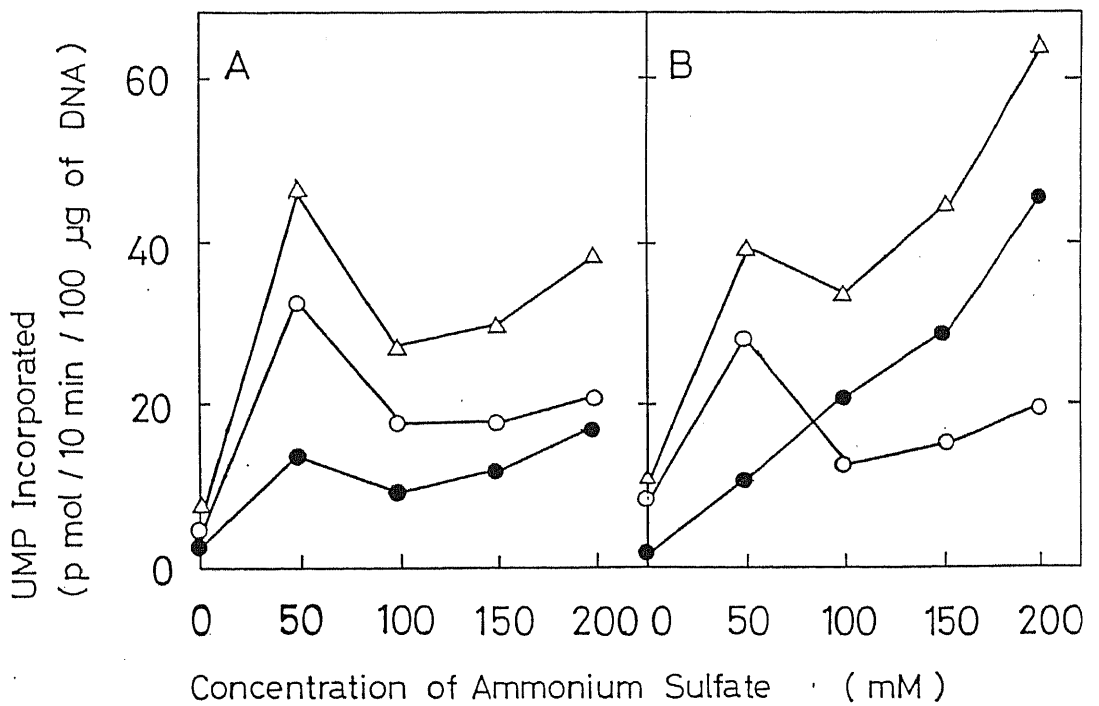


Fig.3 Effect of ionic strength on ³H-UMP incorporation into RNA in prostatic nuclei in the presence of 4 mM Mg²⁺ or 2 mM Mn²⁺. The activity of nuclei from normal rat prostates was measured under standard conditions (Materials and Methods) except that ammonium sulfate and divalent cations (A, Mg²⁺; B, Mn²⁺) were present at the indicated concentrations. Δ, without α-amanitin; ○, with α-amanitin; ●, incorporation inhibited by α-amanitin.

在下で Mg^{2+} 4 mM を加えることにし, RNA polymerase II と I を同時に測定する場合は硫酸 50 mM 存在下で Mn^{2+} を 1 mM 加えてインキュベートすることにした。

次に polymerase I の "free" form の活性測定の条件を検討した。Yu (1974, 1975(a), 1975(b)) は単離核に exogenous な DNA を加えるとこの DNA を template とする RNA 合成が起り, この反応に関与することの出来る RNA polymerase I を "free" form と呼んでいるが, その活性測定に対しては二三の問題がある。

"engaged" form の RNA polymerase I の測定の場合は, 核の単離法による差はほとんどないが, 肝組織の場合, "free" form の RNA polymerase I の活性に差がでてくることが Kellas ら (1977) によって報告されている。彼らは, 等張 sucrose 溶液の場合, "free" の核外への流出があるためと考えている。そこで前立腺の場合も, 核の単離を2つの medium (即ち, 高張と等張) を用いて行い比較してみることにした。又 "free" の測定には Actinomycin D を加えて "engaged" 活性を押えておいて, RNA 合成をみるわけであるがこの Actinomycin D の量が少ないと測定に誤差が生じるのでその量についても検討することにした。

その結果は Fig. 4 に示してある。高張 (Fig. 4 B) の方が低張 (Fig. 4 A) の場合より "free" 活性が約 40 % 多く測定された。しかし, この両者の差は肝臓の場合ほど大きくはない。又 Actinomycin D の量は 20 μ g/ml で十分であることがわかった。

又 template となる poly d(A-T) 量も核内の酵素量に十分対応するだけ加える必要がある。そこで poly d(A-T) の量についても検討したが, Fig. 5 に示すように, 20 μ g/tube でほぼ飽和に達することがわかった。

以上の実験結果にもとづいた標準アッセイ medium ([材料と方法] に示してある) によりそのタイムコースを取ってみると, Fig. 6 で示すように "engaged" では少なくとも 10 分, "free" では少なくとも 60 分の間は直線的に反応が進行するようになった。

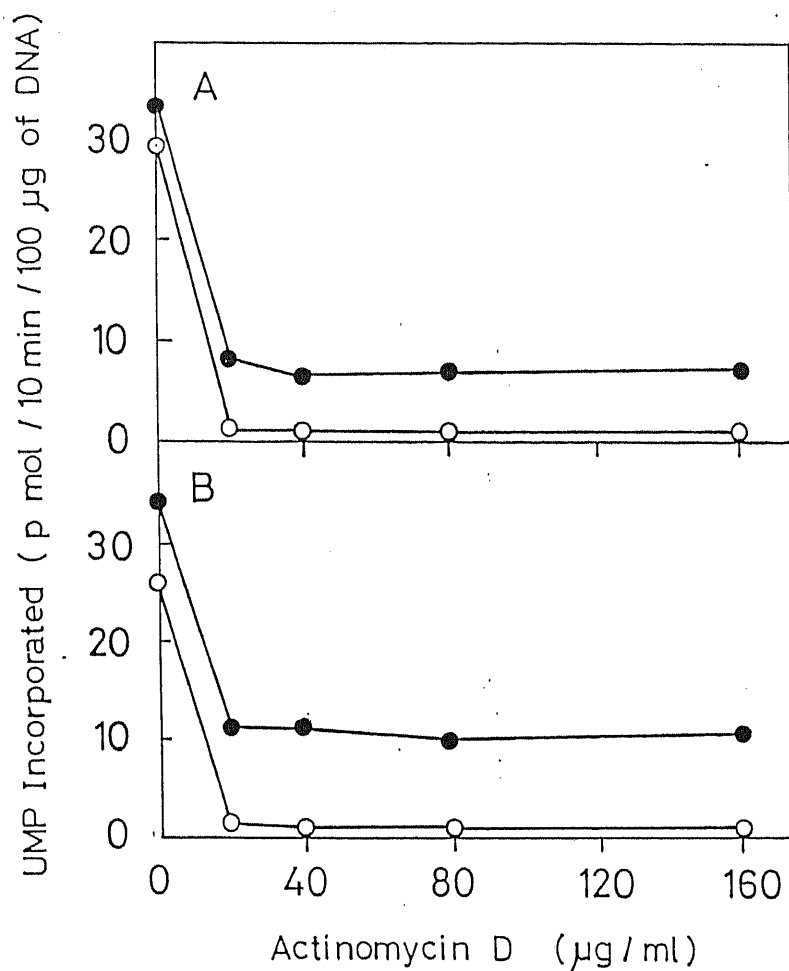


Fig.4 Analysis of two different preparations of rat prostatic nuclei for "free" RNA polymerase I activity. Rat prostatic nuclei were isolated by (A) Method I (isotonic sucrose) or (B) Method II (hypertonic sucrose). The nuclei were incubated for 30 min at 25°C in the standard reaction mixture in the presence of poly d(A-T) (●) or in the absence of poly d(A-T) (○) and in the presence of actinomycin D as indicated. The amount of DNA of nuclei used in the reaction mixture was in the range of 85-115 µg in (A) or 55-75 µg in (B).

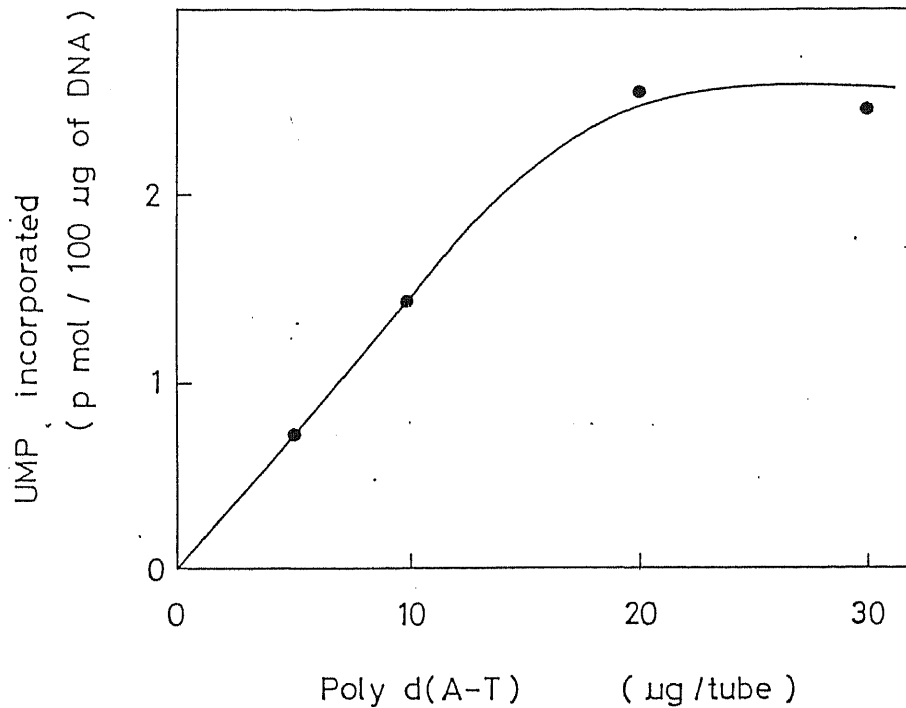


Fig.5 Poly d(A-T) stimulation of exogenous template dependent RNA synthesis in rat prostate nuclei. Nuclei were prepared by Method II from 7 rats. The reaction mixture contained 12 μg actinomycin D and the indicated amount of poly d(A-T). Reaction proceeded for 10 min at 25°C. The amount of endogenous DNA in the reaction mixture was in the range of 53-74 μg .

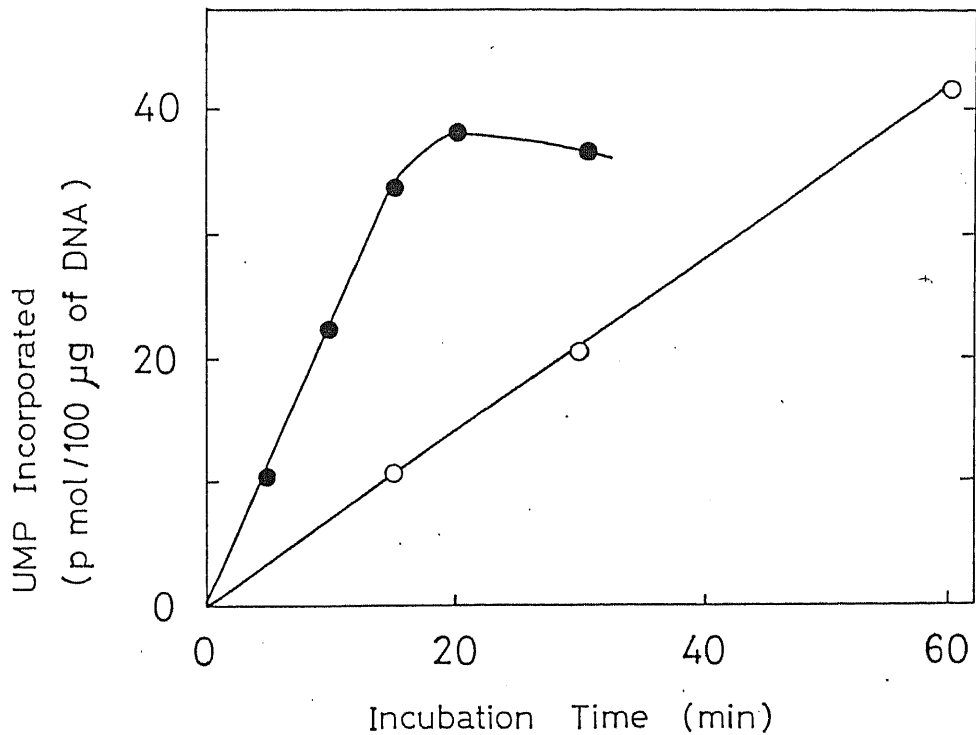


Fig.6 Time course of RNA synthesis by "engaged" and "free" RNA polymerase I in isolated nuclei. Nuclear fractions from normal rat prostates were incubated at 25°C for various time periods in the standard assay systems described in Materials and Methods. The nuclei for "engaged" RNA polymerase I activity was isolated by Methods I and the nuclei for "free" RNA polymerase I, by Method II. ●, "engaged" RNA polymerase I; ○, "free" RNA polymerase I.

第3節 ラット前立腺核内の RNA polymerase I の "engaged" form と "free" form の活性に対する アンドロゲンの効果

第2節で示した実験結果により、前立腺単離核における in vitro での RNA polymerase I の "engaged" form と "free" form の活性測定の設定できたので、ラットを去勢、又はアンドロゲン処理した時の前立腺単離核の両酵素活性を測定した。

〔材料と方法〕

去勢はラットにチオペンタールナトリウム溶液（注射用蒸留水で、 $0.3\text{g}/4.8\text{ml}$ ） $0.2 \sim 0.25\text{ ml}$ を腹腔内に注射して麻酔し、両睾丸を摘出し、切り口を金属バンドでふさぐ。テストステロン投与は去勢後48時間～60時間後のラットに対して行うが、テストステロンプロピオネートを綿奥油に用時溶解させ（ $25\text{mg}/\text{ml}$ ） 250g のラットに対し、その 0.1 ml を皮下に注射する。

RNA polymerase I の可溶化 RNA polymerase I の可溶化は Roeder, Rutter の方法（1970）に準ずる。

去勢後48時間のラット（1群、 $10 \sim 12$ 匹のラット）にテストステロンを投与後、12時間、あるいは24時間のラットの前立腺を摘出し（対照群は綿奥油だけを投与後12時間、あるいは24時間のラット）Method II で核を単離後、 5ml の 10mM Tris-HCl (pH 7.9) - 5mM MgCl_2 - 5mM DTT - 1M sucrose に suspend 後、 4M の硫酸 (pH 7.9) を加えて、硫酸の最後濃度を 0.3M にした後、60分間、ゆっくりと攪拌後、KUBOTA INSONATOR 200M を使用して溶液の粘性がなくなるまで Sonication を行う（Sonication は10秒ごとに、20秒の冷却のための interval を置く）。この溶液は $105000 \times g$ で60分遠心した後、その上清に 4M の硫酸 (pH 7.9) 溶液 70ml を加え、攪拌しながら30分後に、 $25000 \times g$ 30分の遠心を行い、得られた沈殿を、 1.5ml の 50mM Tris-HCl (pH 7.9) - 1mM MgCl_2 - 0.5mM DTT - 0.1mM EDTA - 25% グリセロールに溶かし、同じ buffer で一晩透析する。 $105000 \times g$, 60分遠心後

その上清を RNA polymerase I 画分とする。

可溶性 RNA polymerase I の活性測定 上のように可溶性された酵素活性は, Goldberg らの方法 (1977) に従って測定した。反応溶液 (60 μ l) は以下に示す: 0.5 mM の ATP, GTP, CTP, 8 μ M UTP, 5 mM NaF, 2.5 mM β -メルカプトエタノール, 30 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 120 μ g BSA, 3 μ Ci $[^3\text{H}]$ UTP, 18 μ g calf thymus DNA, 1 μ g/ml α -amanitin, 4 mM MgCl_2 , 5~15 μ l の酵素溶液。

又, 反応は 30°C, 15 分のインキュベーションにより行い, 10% TCA に不溶性の画分に取り込まれた ^3H のカウントを可溶性された RNA polymerase I 活性とした。10% TCA を加えて得られた沈殿は, GF/C グラスフィルター上で 5% TCA - 1% ピロリン酸ナトリウムで洗った後, エタノールで一回洗浄後, 60°C で乾燥させた後, トルエンシンチレーターに入れ液体シンチレーションカウンターで ^3H のカウントを測定した。

酵素蛋白量の測定 RNA polymerase I の酵素蛋白量の測定はラット肝より精製した RNA polymerase I の抗体 (Igarashi et al, 1983) を使った補体結合反応 (Gravey et al, 1977) により測定した。反応は酵素可溶性溶液を RNA polymerase I の抗体と 37°C 30 分, インキュベーションすることにより酵素に抗体を結合させ, 補体 (モルモットより調製) と SRBC (Sheep Red Blood Cell) 存在下で 37°C 30 分 インキュベーションにより溶血した SRBC の量を, OD at 530 値を測定することにより調べた。

[結果と考察]

まず RNA polymerase I の "engaged" form 及び "free" form の活性に対する去勢の影響を調べてみた。正常なラットを去勢して, 6, 12, 24, 48 時間後の前立腺単離核を調製し, それぞれの RNA polymerase I の活性を測定した (Fig. 7)。"engaged" form は去勢後 6 時間目から早くも減少の傾向を示し, 24 時間以内に正常レベルの 60% まで減少し, 48 時間後には正常レベルの 50% 以下にな

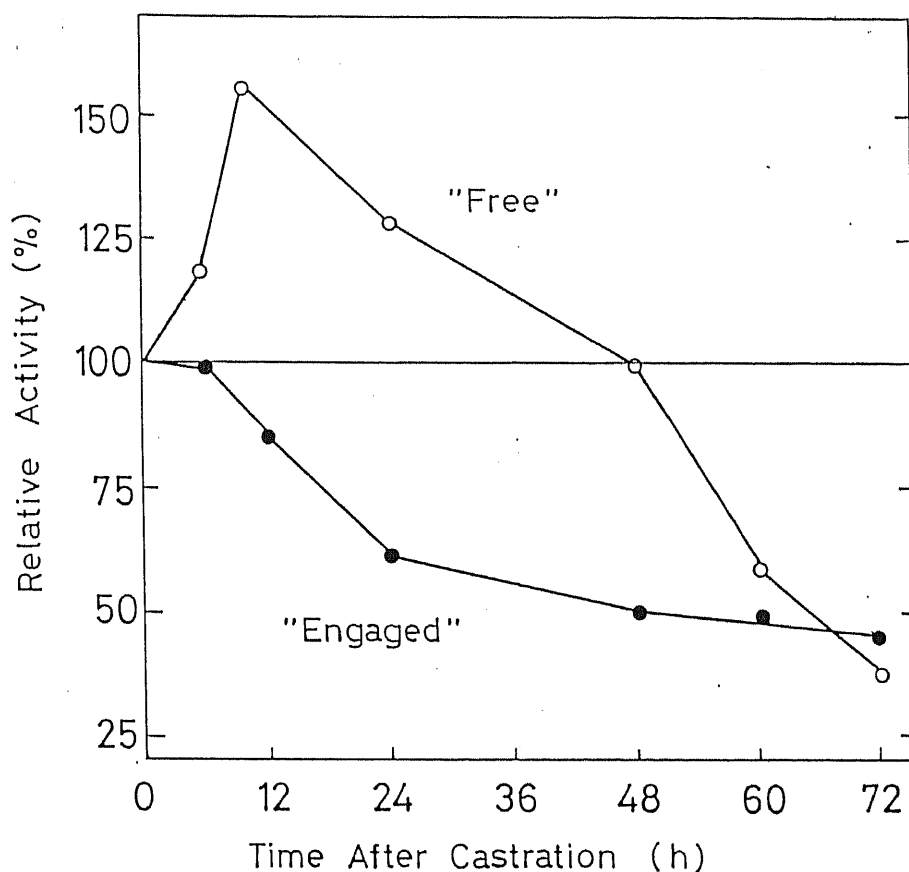


Fig.7 Variation in the activities of "engaged" and "free" RNA polymerase I of isolated prostatic nuclei after castration. Nuclei were isolated by Method II from the prostates of androgen-primed castrated rats, and assayed for "engaged" (-●-) and "free" (-○-) RNA polymerase I as described in Materials and Methods. Values shown are expressed as percentage of control and the means of three experiments are present with standard errors. 100 % values are 12.34 ± 1.23 pmol UMP/10 min/100 μ g DNA, and 6.05 ± 0.85 pmol UMP/10 min/100 μ g DNA for "engaged" and "free" enzymes, respectively. One group consisted of 6-9 rats.

た。それに対し, "free" formの方は去勢後6時間で上昇傾向を示し12時間で正常レベルの170%まで増加した。そしてそれ以後は減少に転じ, 48時間後には正常レベルに, 更に去勢72時間後には正常レベルの40%まで減少した。次に去勢ラットにテストステロンを皮下投与して両活性を調べてみたのがFig. 8である。去勢したラットの"engaged"及び"free"の活性を100%として表わしてある。"engaged" formはテストステロン投与後, すくなくとも24時間までその活性は上昇し続け250%になるのに対して, "free" formの活性はテストステロン投与後24時間まではほとんど変化は見られなかった。ただテストステロン投与後, 8時間で"free" formの活性は有意に15%ほど減少したが, 去勢して12時間目のところで見られた"free" formの50%の増加(Fig. 7)のように目だった活性変化は見られなかった。Fig. 7で示した去勢による"free" formの活性の上昇は"engaged" formが terminationによりDNAからはずれ, "free" formの活性として測定されたためだと考えられる。その後の"free" formの減少は, 酵素合成それ自体が減少しているか, 酵素のdegradationが促進されているか, あるいはその両方だと考えられる。けれどもこれとは逆に, 去勢ラットにテストステロンを投与した時(Fig. 8)は"free"から"engaged"への変換がおきているようには見えないので, この間において, 酵素量の全体が変化しているかどうかを調べる必要があると考えられたので, 去勢ラットにテストステロンを投与し, 12時間後, および24時間後の核内のRNA polymerase Iを可溶化し, その活性とRNA polymerase Iの抗体を使った補体結合反応により, 直接, RNA polymerase Iの酵素蛋白量を定量してみた。

Fig. 9の上段のA, Cにテストステロン投与12時間後の, 下段のB, Dに24時間後のRNA polymerase Iの酵素活性(A, B)と酵素蛋白量(C, D)をそれぞれ示した。黒のカラムは, 綿奥油のみを投与した時の対照群の値である。

この結果によると, RNA polymerase Iはテストステロン投与

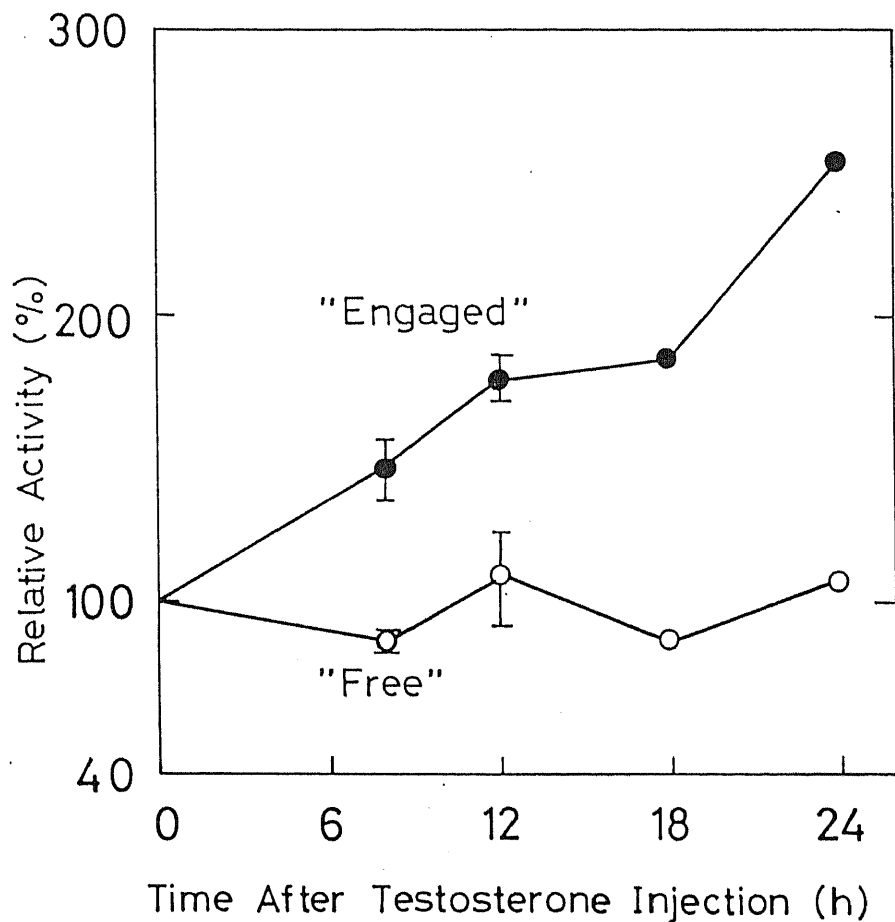


Fig.8 Variation of "engaged" and "free" RNA polymerase I activities of rat prostates after the administration of testosterone to castrated rats. Nuclei were isolated by Method II and enzymic activities ("engaged", • ; "free", o) of nuclei were measured at different time periods after a single testosterone injection (10 mg/kg body wt). Values shown are expressed as percentage of control. Each point ($M \pm SE$) is the average of 3-4 independent experiments (5-8 animals for each point of each experiment). 100 % values are 9.62 ± 0.87 pmol UMP/10 min/100 μ g DNA and 8.05 ± 0.46 pmol UMP/10 min/100 μ g DNA for "engaged" and "free" RNA polymerases, respectively.

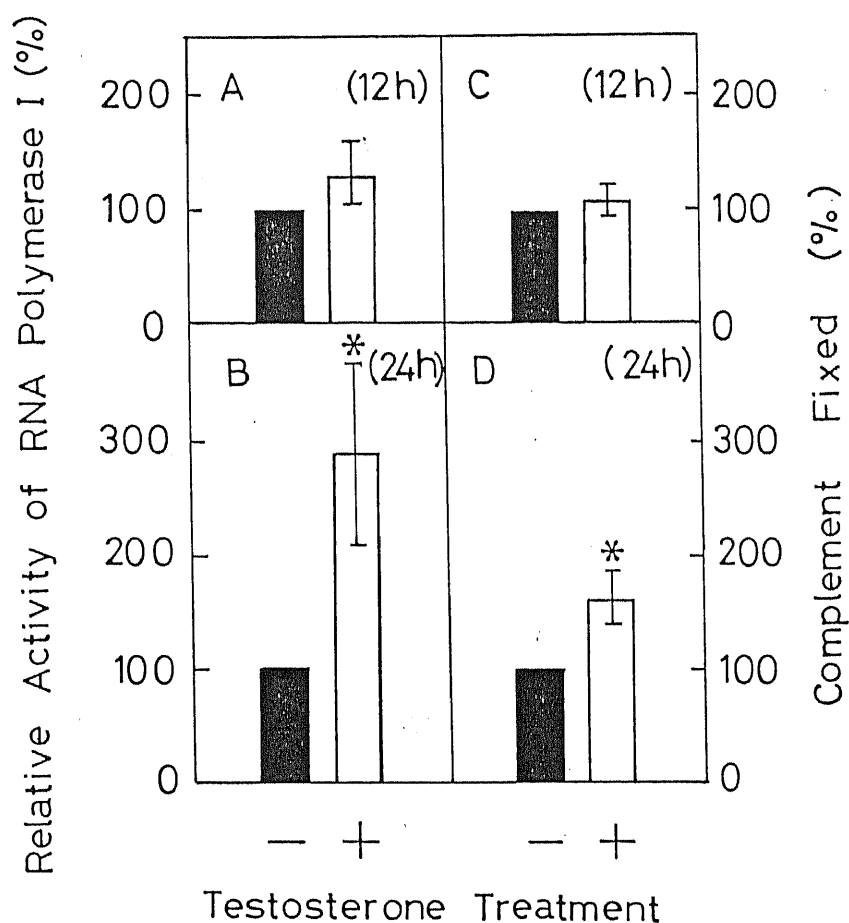


Fig.9 Total activity and content of RNA polymerase I in the solubilized preparation from prostatic nuclei of castrated or androgen-primed rats. At 12 h (A, C) or 24 h (B, D) after the injection of testosterone propionate to castrated rats, RNA polymerase I was solubilized from the nuclei which were isolated by Method II and the activity or the amount was determined biochemically (A, B) or immunologically (C, D), respectively. Data are shown expressed as the percentage of values of castrated control. 100 % values were 2,256 cpm/10 min/100 μ g DNA for 12 h-experiments and 2,262 cpm/10 min/100 μ g DNA for 24 h-experiments. * , $p < 0.05$

により12時間では、酵素活性、及び酵素蛋白量とも変化しないが、テストステロン投与24時間には酵素活性で2位以上、酵素蛋白量で50%前後の増加を示しており、ラット前立腺核内のRNA polymerase Iはテストステロン投与により12時間ではまだ新たな蛋白合成による増加は示さないが、24時間後では新たな酵素の蛋白合成が起きていることが明らかになった。そこでテストステロン投与後12時間以内の"engaged"の増加はどのような理由によるものかという問題が生じたが、これは以後の節にゆずることにする。

第4節 前立腺単離核のRNA polymerase Iの活性に対する cycloheximide の影響

はじめに述べたように、肝臓 (Muramatsu et al, 1970; Mishima et al, 1979), 子宮 (Nicolette and Babler, 1974), 前立腺 (Hosoya et al, 1978)などで、cycloheximide 投与により単離核のRNA polymerase Iの"engaged" formの活性が減少することが示され、これに short-lived protein の関与があることが示唆されている。前立腺の場合、この short-lived protein がアンドロゲン依存性であるか知ることは今後の研究を進めていく上で非常に必要なので、この点を調べることにした。このため cycloheximide を正常ラットの他に、去勢ラットにも投与し、それから得られた前立腺の単離核の"engaged"と"free" form活性を測定することにした。

[材料と方法]

核の単離操作、及びRNA polymerase Iの活性測定は第2節で述べた。cycloheximideは生理食塩水に溶かし(10mg/ml) 250gのラットに対し、0.75 ml (high dose), 又は0.1 ml (low dose)を腹腔内へ注射し、対照群には生理食塩水のみを0.75 ml, 又は0.1 ml投与した。

[結果]

Fig. 10 に、正常、及び去勢ラットの腹腔内に cycloheximide を投

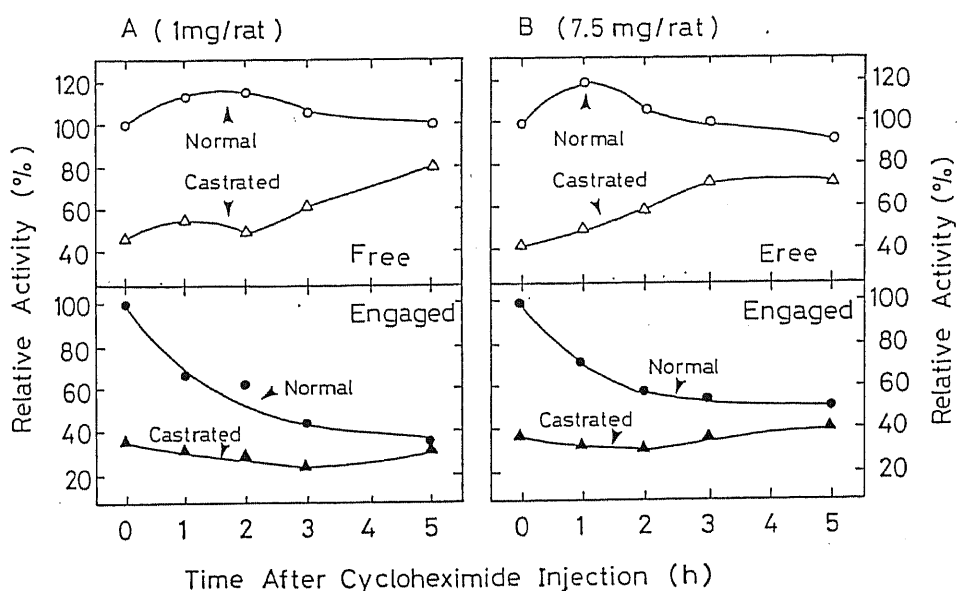


Fig.10 Effect of cycloheximide administration on the activities of "engaged" and "free" RNA polymerase I in the nuclei of normal and castrated rats. Normal and 48 h-castrated rats were injected with cycloheximide at the time indicated before sacrifice. The nuclei were isolated by Method II. One group consisted of 5-6 rats. values shown are expressed as percentage of normal rats (no cycloheximide treatment). Open and closed circles denote the values of "free" and "engaged" of castrated rats, respectively. Cycloheximide injected was 4 mg/kg body wt in (A), and 30 mg/kg body wt in (B). 100 % of "engaged" enzyme activity of normal rats was 34.5 and 20.3 pmol/10 min/100 μ g DNA in (A) and (B), respectively.

与した時の RNA polymerase I の "engaged" form と "free" form の活性変化を示した。panel B は high dose, panel A は low dose の cycloheximide を投与したもので、それぞれ上段は "free" form, 下段は "engaged" form の活性である。

まず注目すべきことは、cycloheximide の high dose と low dose の間の差はほとんど見られず、いずれも同様な結果が得られていることである。次に "engaged" form 活性についてみると、正常ラットの場合、cycloheximide 投与後、急激に減少して、3 時間後には初めの約 50% になること、そしてこれは去勢ラットのレベルにほとんど等しいことである。又去勢ラットに cycloheximide を投与した場合は、"engaged" form の活性はほとんど変化しない。"free" form の活性については、正常ラットの場合、cycloheximide 投与後、初めやや増加し、ついで減少に転ずるが、去勢ラットの場合は、初め変化がなく、2 時間あたりから次第に増加するという結果が得られた。Fig. 11 は去勢後 52 時間のラットにテストステロンを投与して、8 時間後にラットを殺すが、その殺す 30 分、60 分、90 分前に cycloheximide を投与した時の "engaged" form と "free" form の RNA polymerase I の活性を無処置群（去勢しただけのもの）と比較したものである。"engaged" form はテストステロンを投与して 8 時間後には、約 50% の活性増加を示したが、cycloheximide をラットを殺す、そのそれぞれグラフに示した時間だけ前投与しておく、アンドロゲンに依存して促進された活性は 60 分後には阻害を受け、90 分後にはほぼ去勢レベルまでその活性が減少していた。一方 "free" form の場合は、全体的にあまり変化はしていなかった。

〔考察〕

始めに述べたように、cycloheximide の作用は、RNA polymerase I の initiation に必要な蛋白因子（これは半減期が 1.3 時間程度の short-lived protein）の合成が阻害されるためであると考えられる人が多いが、その他の可能性を主張する人もある。Grummt と Grummt (1976) や Stoyanova と Dabeva (1980) は、肝の

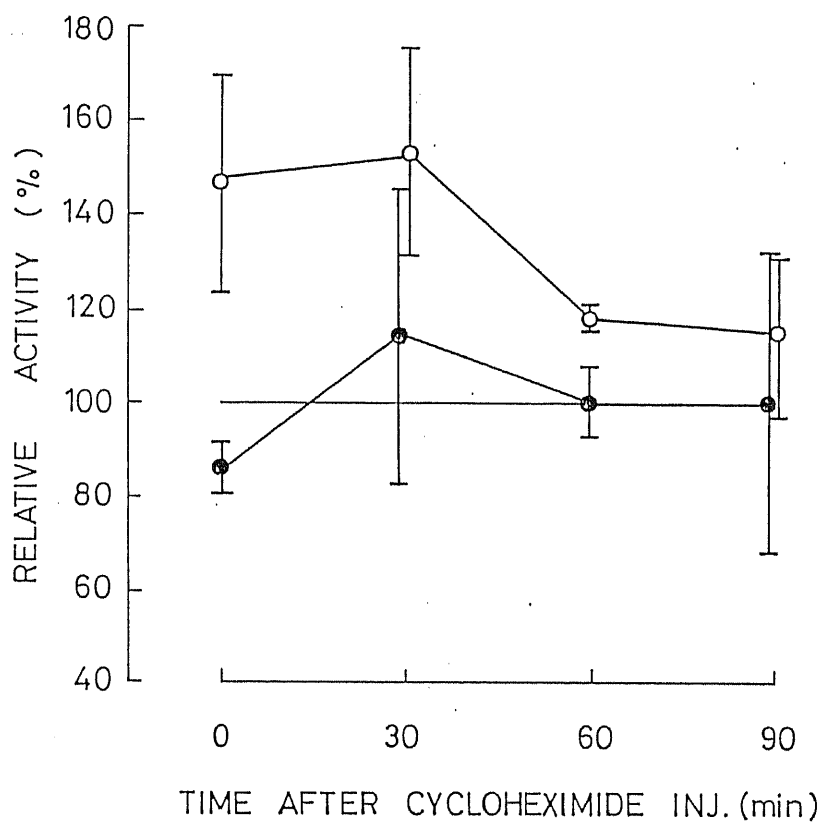


Fig. 11 In vivo effect of cycloheximide on RNA polymerase I activities in isolated prostatic nuclei of testosterone-primed castrated rats. 8 hr after the injection of testosterone into castrated rats, cycloheximide (7.5 mg/rat) was injected intraperitoneally at 30 min, 60 min, and 90 min prior to killing. Prostatic nuclei were isolated by Method II and assayed for RNA polymerase I. The activity was expressed as a percentage of control (castrated rat). "engaged" form, (-o-); "free" form, (-●-).

rRNA 合成に対する cycloheximide の効果は Nucleotide pool に影響を与えるために出てくるくのあると主張しているが, Mishima ら (1979) が Ehrlich の腹水癌で調べたところ, そのようなことは見出されなかった。Stoyanova と Dabeva (1980) は肝で, cycloheximide の Low dose と high dose の影響を見ると, 前者では全く rRNA 前駆体合成への影響がなく, 後方で阻害が出ると述べているので, 前立腺について両者を比べてみたが, Fig. 10 に示したように両方とも同じように阻害されるという結果が得られている。しかも前立腺の場合は, 去勢したものの rRNA 合成に対しては cycloheximide は全く影響していない。

これらのことから, cycloheximide は short-lived protein の合成をおさえることにより, rRNA 合成に影響を与えているという考えは現状では最も受け入れ易いように思われる。

以上は "engaged" form に関することであるが, "free" form に関しても注目すべき点が二つある。一つは正常ラットの場合に見られる初期の一過性の活性上昇である。これは "engaged" form の termination 後に cycloheximide による short-lived protein 合成阻害のため, reinitiation が止ったためではないかと考えられる。つまり, これは "engaged" → "free" の変換がここに表われているのであろう。もう一つは, 去勢ラットの場合, cycloheximide 投与後の "free" の変化は予想されなかったのだが, 2~3 時間後に次第に増加するという現象が high dose でも low dose でもみられたことである。これに対する合理的説明はむずかしい。

第5節 RNA polymerase I を制御する蛋白性因子に関する2つの実験

前章までの実験から, 前立腺の場合, アンドロゲン依存性の RNA polymerase I の活性に, short-lived protein の関与がある可能性が高くなってきたが, これを確実に証明するには, 実際このよ

うな機能をもった蛋白質を単離する必要がある。しかし、この蛋白質は量的に非常に少量であると考えられるし、またもし分解が早いために short-lived だとすれば、単離はかなり困難であると考えられる。そこで別の方法で、この蛋白質の存在に対して支持、あるいは不支持を与えうるような実験を行ってみる必要がある。ここではそのうち、比較的容易に行える2つの実験を行ってみることにした。

その一つは、 α -amanitin を用いる方法である。問題の short-lived protein の mRNA がアンドロゲン依存性であって、この半減期も小さいとすれば、 α -amanitin 処理で RNA polymerase II の活性を押えることにより、RNA polymerase I の "engaged" form の活性もおさえられるはずである。

二番目の実験は、アンドロゲン投与後に速かに核に入ってゆく蛋白質があるかどうかを見ることである。そのためには、子宮の細胞質におけるエストロゲンによる induced protein (IP) の検出法を見習って、 ^{14}C と ^3H ラベルのロイシンを使用する方法を用いることにする。

〔材料と方法〕

正常、及び去勢したラット前立腺をカミソリで一葉につき、7~8片にスライスし、95% O_2 - 5% CO_2 で飽和させた Eagle's MEM (3 ml) 中で 37°C 90 分間、 α -amanitin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 存在下、あるいは非存在下で、95% O_2 - 5% CO_2 を送り込みながら、インキュベートする。インキュベート後、組織は 0.32 M sucrose - 1 mM MgCl_2 で入念に洗浄後、ホモジナイズし、Method I (第2節) で核を単離し、RNA polymerase I 及び II の "engaged" form の活性を測定する。

又、核への蛋白質の取り込みの実験では、去勢 60 時間後のラット前立腺を上と同じようにカミソリでスライスし、Eagle's MEM 中でインキュベートするわけだが、まず、スライスした前立腺を 37°C 60 分インキュベート後、二つのグループに分け、一方のグループは

80 μCi [^3H] ロイシン (比活性 60 Ci/mmol) と $2 \times 10^{-6} \text{ M}$ のテストステロンプロピオネートを加えた Eagle's MEM に、もう一方のグループは 20 μCi [^{14}C] ロイシン (比活性 300 mCi/mmol) だけを加えた Eagle's MEM 中に入れ、更に 37°C , 90 分インキュベートする。インキュベート終了後、両グループの組織を混合し、0.32 M sucrose 溶液で 3 回洗った後、Method I で核を単離する。単離核は 0.32 M sucrose-1 mM MgCl_2 -1% Triton X-100 で suspend 後、10 分、氷中で放置した後、3000 rpm 10 分の遠心により球殿を得る。これを更に、0.32 M sucrose-1 mM MgCl_2 で 2 回洗浄後、DNase I (60 U ニット/ml) で、 4°C 30 分、処理して、SDS-尿素で可溶化後 (第 3 章、第 2 節で述べた)、7.5% の SDS-ゲイスワゲル電気泳動にかけ、泳動後、ゲルを 2 mm 間隔にスライスした後、ゲルは counting vial 中で 0.5 ml の 30% H_2O_2 を加えて、 50°C で 12 時間インキュベートを行い、ゲルを完全に溶かした後、トリエンシンチレーターを 12 ml 加えて、 ^3H と ^{14}C のカウントを測定した。

〔結果と考察〕

第一の実験の主眼は short-lived protein の mRNA 合成を触媒する RNA polymerase II を α -amanitin によって阻害した時、RNA polymerase I の活性がどう変化するかをみることであるが、この α -amanitin をどの程度注射すればよいかまず検討しなければならない。このため、普通肝の RNA polymerase II の阻害に用いる量即ち、1 匹に 250 ~ 350 μg を注射したところ、たしかに肝の活性は約 80% 阻害されていたが、前立腺の活性は 10 ~ 20% しか阻害されていなかった。これは α -amanitin が肝臓で破壊されるために前立腺まで十分量回ってこないのか、或は前立腺細胞への侵入がむずかしいのか不明であるが、もっと少量の α -amanitin を投与してみる必要がある。しかし α -amanitin は非常に高価な薬品であって、今回の実験に必要な量を手に入れることは不可能なので、in vitro の系で試すことにした。そのため、前立腺をスライスして Eagle's MEM 中で RNA polymerase II を阻害する α -amanitin 濃度を測定したと

ころ、肝組織の場合用いる量（即ち $0.3 \sim 1.0 \mu\text{g/ml}$, Davis and Griffiths, 1974; Lindell et al, 1978）の10倍量で十分活性が押えられることがわかった。しかし上で述べたように、前立腺の場合は α -amanitin が核へ入りにくい可能性もあるのでさらに量を増やして $100 \mu\text{g/ml}$ でインキュベートすることにした。なおこの量で前立腺スライスをインキュベートする限り、RNA polymerase III は全く阻害されなかった。

以上のような準備をした上で、まず正常ラット前立腺を調べてみた。即ち前立腺を二分した上で各々をスライスし、一方に α -amanitin を加え、他方には加えずに90分インキュベート後、組織を洗って核を単離して、RNA polymerase I, II の "engaged" form の活性を測定した。

Fig. 12. B に示すように、この実験系では α -amanitin 存在下でのインキュベートによって、RNA polymerase II の活性はほとんど完全に抑えられていることがわかる。Fig. 12. A には、RNA polymerase I の活性を示してあるが、明らかに RNA polymerase I も α -amanitin によって15%減少していることがわかる（実験は4回行ない、 $P < 0.01$ ）。去勢ラットの前立腺で同様なことを行ってみたところ、この場合には RNA polymerase I に対する α -amanitin の作用は全く見られなかった（Fig. 12. A）。

これらのデータは cycloheximide 投与による蛋白合成阻害の実験結果より考えられたアンドロゲン依存性の RNA polymerase I の活性が、蛋白性因子により制御されているという仮説と全く矛盾しないばかりか、この半減期の短い蛋白性因子の mRNA も同様に、半減期の短いものであることを示している。

第2の実験は、アンドロゲン投与後、速かに核内に入ってくる蛋白があるかどうかに関するものである。

細胞質には、エストロゲンによって非常に速かに（30分以内）子宮細胞内に induce される蛋白があることは Notides と Gorski 氏（1966）の報告以来、多くの例がある（Sömjen et al, 1973；

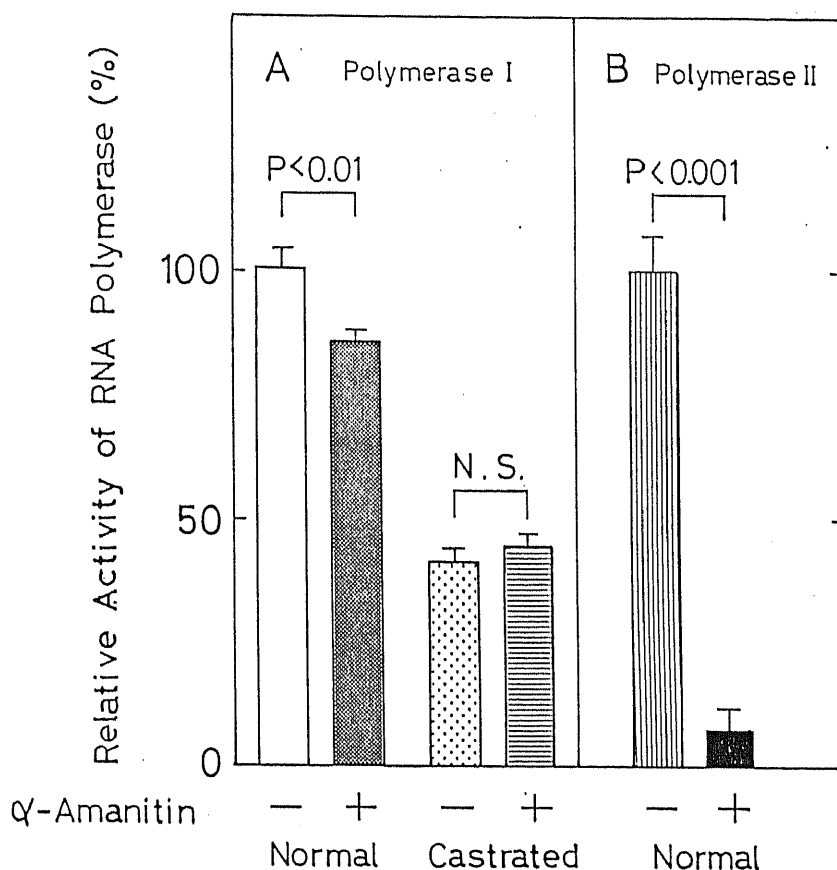


Fig.12 Changes of RNA polymerase I and II activities when α -amanitin was added in the incubation medium with prostatic slices. Prostatic slices from four to seven normal or 60-h castrated rats were incubated in the presence (100 $\mu\text{g/ml}$) or absence of α -amanitin for 90 min at 37°C. The nuclei were isolated by Method II and the activities of RNA polymerase I and II in the nuclei were assayed using the standard assay medium for "engaged" RNA polymerase I except that 4 mM MgCl_2 was replaced by 1.0 mM MnCl_2 . Data shown are expressed as percentage of the values of normal rats without the drug. At least three experiments were performed and the data were expressed by the mean $\pm$ SE. (A) RNA polymerase I. 100 % value was 30.37 ± 4.90 pmol UMP/10 min/100 μg DNA. (B) RNA polymerase II. 100 % value was 13.88 ± 1.82 pmol UMP/10 min/100 μg DNA.

Mayol and Thayer, 1970; Katzenellenbogen and Williams, 1974)。これは IP (Induced Protein) と名づけられ、最近 Creatine Kinase であると同定された (Seeger and Beach, 1983)。しかしこのような蛋白が核内にも見出されたという報告はまだない。前立腺の場合も、アンドロゲンによって、細胞質に IP が生ずるかどうかを調べた人がある (Mainwaring et al, 1975; Amdo, 1979) が、この IP の出現は見られていない。しかし考えてみると、今回問題にしている short-lived protein が速かに核内に入るとすれば、そのために、細胞質に見出すことが出来なくなっているのではないかと考えられる。そこで却って核内にアンドロゲンによって速かに induce される蛋白が発見される可能性があると思い、試してみた。

その結果を Fig. 13 と Fig. 14 に示す。37°C 90 分の間に合成された蛋白のうちアンドロゲンに依存した蛋白の核内への取り込みは $3H/14C$ の比の増加している部分に見られる。Fig. 13 はテストステロンの存在下で前立腺スライスをインキュベートした場合、Fig. 14 は、エストラジオールでインキュベートした時の電気泳動のパターンである。

これからわかるように、テストステロンでの場合のみ (Fig. 13)、 $3H/14C$ のピークが得られる。それらの分子量は約 20K, 約 100K, 約 70K であるが、Gorsky らの IP のときのように鋭いピークは得られなかった。もっとよい条件が見出されれば、このうちのどれかがもっとはっきりとしたピークとして得られるかも知れない。従って、実験としてはまだ十分とは言えないが、この程度のインキュベーションの時間で核内に現われてくる蛋白質が十分にありうることは示したと言えよう。ただし、ここに示した蛋白質が、RNA polymerase I の転写に関係する short-lived protein であるかどうかは不明であって、この点については今後更に検討してゆかなければならない。

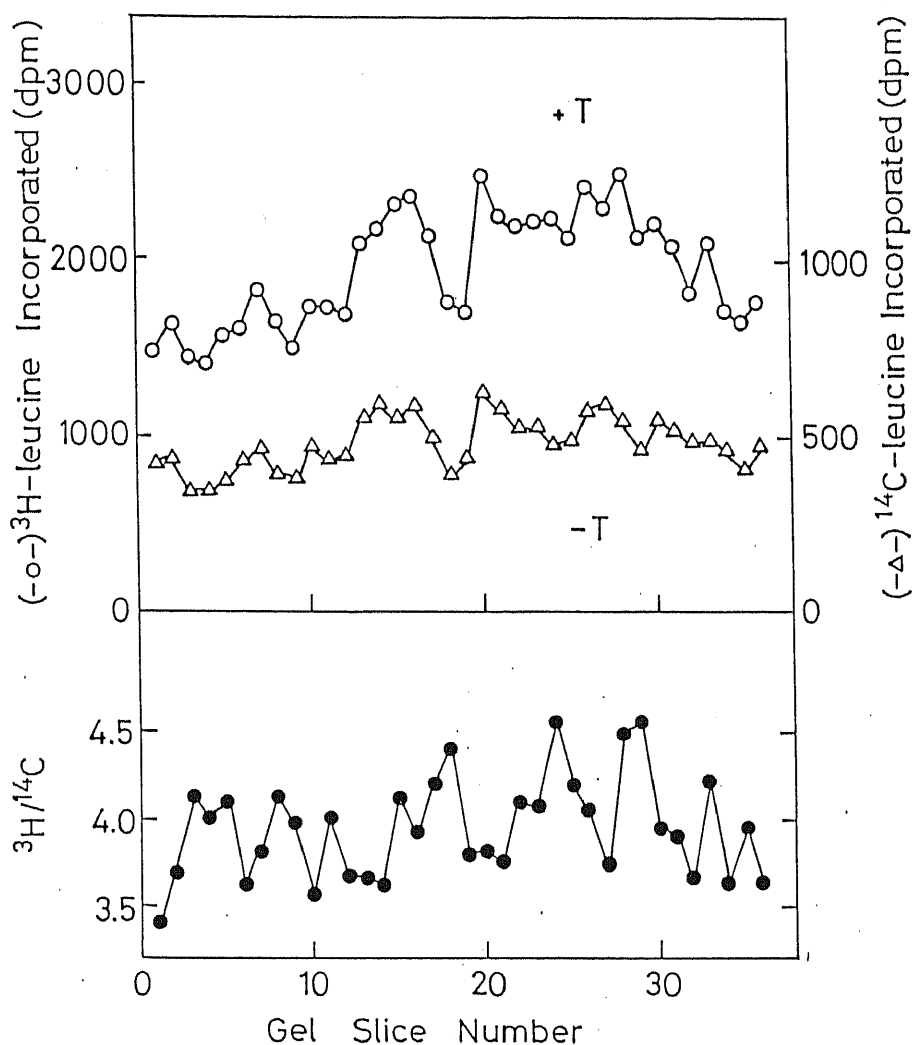


Fig. 13 Electrophoretic distribution on polyacrylamide gel of prostatic nuclear proteins synthesized in vitro for a 90 min incubation with $2\text{ }\mu\text{M}$ testosterone. Prostates were first incubated in Eagle's MEM for 60 min at 37°C and then allowed to incorporate labeled leucine (^3H for testosterone-treated and ^{14}C for control) with either $2\text{ }\mu\text{M}$ testosterone or ethanol only (0.5 %) for 1.5 hr at 37°C . Control and testosterone-treated prostates were homogenized together. After nuclei were isolated as described in Materials and Methods, nuclear proteins were separated by polyacrylamide gel electrophoresis.

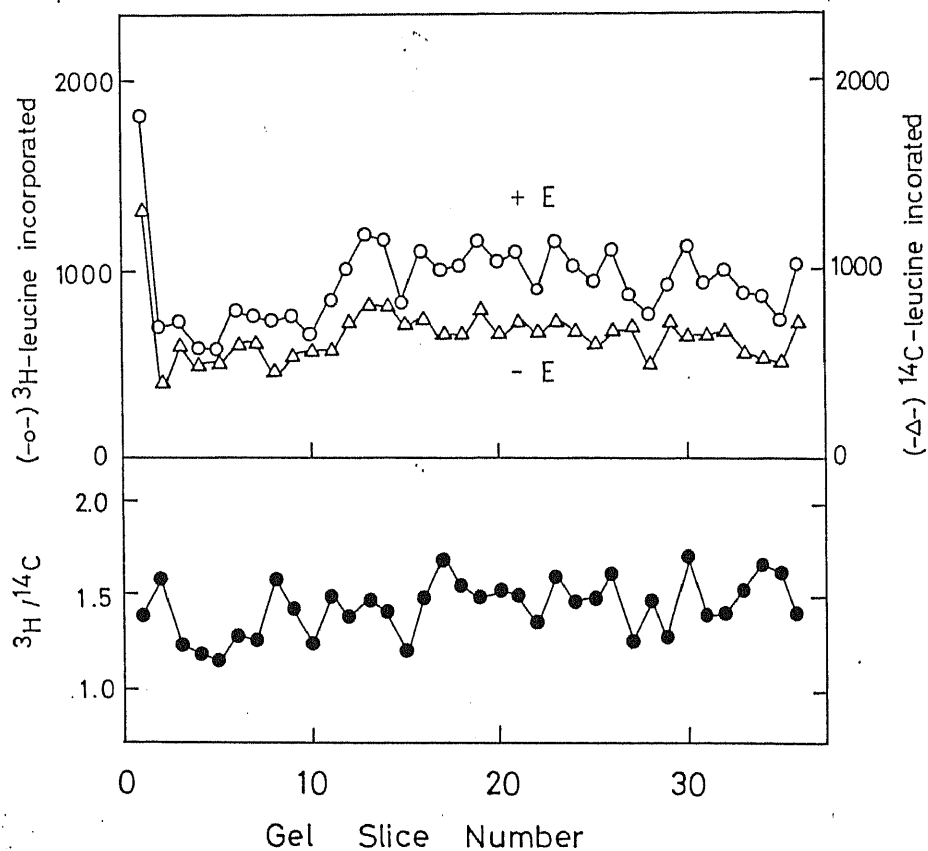


Fig.14 Electrophoretic distribution on polyacrylamide gel of prostatic nuclear proteins. Experiment was carried out by the same method described in the legend of Fig. 13 except that testosterone was replaced by $0.1 \mu\text{M}$ $17-\beta$ estradiol.

第6節 総括

この章の研究においては、種々の処理をしたラットの前立腺の核を単離し、そのRNA合成能を測定することが主要な操作になっている。そこで、核離核のRNA polymeraseの活性測定法の条件を初めによく検討しておく必要があった。肝臓(Widnell and Tata, 1966; Chambon et al, 1968; Novello and Stikpe, 1969; Hulbert et al, 1969), 腎臓(Jänne et al, 1976), 子宮(Bouton et al, 1977)の核などではこれまで諸条件の検討が比較的によくなされていたが、前立腺の核についてはまだ十分でなく、特に"free" formの活性が小さいこともあって誤差を小さくするアッセイ法が必要であった。そこでRNA polymerase Iの活性に大きな影響を与えるイオン強度、2価のカチオンの至適条件などを求めた。前立腺単離核のRNA polymerase I("engaged" form)の至適条件は Mg^{2+} 2~4 mM, 硫酸 50 mMであった。これは子宮の場合(Bouton et al, 1977)の Mg^{2+} 2~4 mM, 肝臓の場合は、 Mg^{2+} 6 mM(Roeder and Rutter, 1969), または 4 mM(Chesterton and Butterworth, 1971), 硫酸は 50 mM以下(Roeder and Rutter, 1969)であるから、大体似たようなものであった。また今回は更に"free" formの活性をより正確に測定すべく、核からの流出, polyd(A-T)量や Actinomycin Dなどの量にも検討を加えた。この結果タイムコースは"engaged" formについてはすくなくとも15分, "free" formについては60分にわたって直線的に進行するようになり、両者とも十分なアッセイをできる条件を整えることができた。

即に述べたように、cycloheximideや puromycin をラットに投与すると、単離核のRNA polymerase I("engaged" form)の活性が減少するという現象は、多くの組織で知られている。そしてこの間に酵素量はほとんど変化していないので、これらの薬物の作用はこの酵素の"engaged"化に関係している short-lived Protein

の合成を阻止することにあると考えられている。今回の実験結果もそれを支持するが、今回新たに明らかになったことは、前立腺の場合、この short-lived protein の合成が完全にアンドロゲン依存性であるということである。即ち Fig. 10, Fig. 11 で示したように、アンドロゲンにより増加した分だけ cycloheximide で活性が押えられている。即ち前立腺核での rRNA 合成にはアンドロゲンに依存した部分と、アンドロゲンに依存しない部分があることがわかった。このようなことが他のホルモンとその標的組織にも起っているかどうかは明らかではないが、子宮の場合のデータ (Nicolette and Bahter, 1974) は同じようなことを示唆している。又肝臓の場合も (Muramatsu et al, 1970; Mishima et al, 1979; Matsui, 1984) cycloheximide で核の RNA polymerase I の活性は完全に押えられていない。肝臓は多くのホルモンによって支配されているので、これらのホルモンの総和の形でみると、前立腺の場合と同様なことが言える可能性がある。これらのことから、外からの刺激に反応する rRNA 合成は、その組織自体の生存に必要な rRNA 合成とは区別されて起きている可能性が示唆される。つまりここで論じている RNA polymerase I の活性を制御する因子は、細胞の外界からの刺激に反応してその刺激に特異的に附加的な rRNA 合成を引き起こす因子の一つであろうと考えられる。この点に関して、rRNA 合成ではないが、肝で、グルコシルチコイドによるトリプトファンオキシゲナーゼ (Delap and Feigelson, 1978) や α -zu-グロブリン (Chen and Feigelson, 1979) の mRNA の誘導が、又ヒナの輸管におけるオバルブミン、及びユニアルブミンのエストロゲンによる mRNA の誘導がやはり蛋白合成阻害剤で阻害される (McKnight, 1978) という報告もあることは興味深い。

このアンドロゲン依存性の部分の rRNA 合成に必要な short-lived protein は、それではどのようにして RNA polymerase I の "engaged" form の活性変化を引き起こしているかというのが次の問題になる。

先に示した実験結果 (Fig. 8 と Fig. 9) はアンドロゲンによって total と "free" 活性が変化しないときに "engaged" 活性が増加することを示している。同じようなことは Brine Shrimp Artemia salina の休止 (dormant) 状態にある encysted gastrulae が湿気を得て発育を開始するときにも見られることが報告されており, "free" form でも "engaged" form でもない polymerase I の form があることが示唆されている (Hentshel and Tata, 1977)。前立腺の場合も去勢するとこのような状態がでてくると考えられ, これをかりに "dormant" form と名づけると, さきに述べた short-lived protein には, この "dormant" form を直接, または間接に "engaged" form にする働きがあると考えられる。勿論, この "dormant" form は今回の実験結果をよく説明するための作業仮説であり, これが実際どのような形になっているのか, また, short-lived protein がいかんして "dormant" を "engaged" にするのかわかる点についてはまだ一切不明であるが, 最近, Xenopus laevis の rDNA と RNA polymerase I の相互作用について得られた次の知見 (Moss, 1983) が, 示唆的である。これによると, NTS (non transcribed spacer region) には, rDNA の initiation site と同じ塩基配列 (Bam Island) をもつ部位がいくつも存在し, ここで RNA polymerase I の転写が始まり, これが NTS に結合した (転写はしていない) RNA polymerase I を真の initiation site に loading させる driving force になっている。このような rDNA の NTS に結合している酵素が今回仮定した "dormant" form かどうかはまだ不明であるが, 少なくとも "free" でも "engaged" でもない form があることは確かであると考えてよからう。

今後は, 今回の研究結果の土台に立って, 種々のアンドロゲン状態における前立腺の DNA の NTS 及び initiation site の RNA polymerase I の結合状態を調べることにより, "dormant" form の実態及び short-lived protein の作用の本質にせまってゆ

く必要があると考えられる。

第3章

ラット前立腺核小体蛋白質磷酸化に及ぼすアンドロゲン (*in vivo*) ポリアミン, cyclic nucleotides (*in vitro*) の影響

第1節 序論

前章の実験から言えることの一つは、前立腺の rRNA 合成のうちほぼ半分はアンドロゲン依存性ではなく(つまり去勢した時も、rRNA 合成が行われている)、残り半分がアンドロゲンにより支配されていることである。そして既に述べたように、アンドロゲンの初期の制御は非常に速やかに作られる mRNA を介する short-lived Protein を通じて、結局 "dormant" form の RNA polymerase I が活性化すると考えられる。しかしこの蛋白質が直接作用するのか、あるいはいくつかの step を経て作用するのか、またどのように作用するのかについては、まだ不明であり、今後 *in vivo* から *in vitro* へと次第に糸を単純化しつつ追求してゆかなければならない。そのためには種々のアプローチがあると考えられるが、筆者は主に次の二つの理由から、まず核小体の蛋白質の磷酸化について調べてみる必要があると考え、本章の実験を開始した。

その第一は、一般に非ヒストン蛋白質の磷酸化が転写調節に関与していると考えられている上に (Kleinsmith, 1978), 最近種々のホルモンが非ヒストン蛋白質の磷酸化に影響を与えていることを示す報告もでてきていることである。たとえば CAMP では Cho-Chung と Redler (1979) が、甲状腺ホルモンでは Bernal ら (1978) や Tanningher (1977) が、エストロゲンでは Chohen, Kleinsmith (1976) が、又アルドステロンでは Liew ら (1973) が、グルココルチコイドでは Bottoms と Jungmann (1973) の報告があり、今ここで問題にしているアンドロゲンでは Ahmed らが (Ahmed and Ishida, 1971; Ahmed and Wilson, 1975), ラット前立腺核

の非ヒストン kinase の活性がアンドロゲンで促進されることを示している。この磷酸化が rRNA 合成調節に結びつくかどうかはまだ不明だが、Physarum polycephalum の場合、分子量 70K の核小体蛋白がポリアミン-dependent protein kinase により磷酸化をうけた後 rRNA のプロモーターの近傍に結合することにより、rRNA 合成を制御しているといわれている (Atmar et al, 1978; Daniels et al, 1981; Kuehn et al, 1979)。ラット前立腺においてもこのような rRNA 合成を制御する磷酸化蛋白が同様に存在する可能性がある。

第二の理由は、RNA polymerase I 分子自身が磷酸化されることによって活性が促進されるという報告があることである。RNA Polymerase 分子が磷酸化をうけるというのは I に限らず、II, III でも報告されている (Breant et al, 1983; Buhler et al, 1976; Lee and Jungmann, 1981; Jankowski and Kleczkowski, 1980) が、RNA polymerase I の場合は特にそのサブユニットの磷酸化が詳しく調べられており、ラット肝において CAMP-dependent protein kinase が RNA polymerase I のサブユニットを磷酸化すると同時に転写活性を高めること (Martelo and Hitsch, 1974; 1976)、仔牛胸腺においても RNA polymerase I のサブユニットの一つが CAMP independent protein kinase のものであるという報告が出されている (Rose et al, 1981)。そこで、ラット前立腺においても RNA Polymerase I の活性化の機構に Polymerase I のサブユニットの磷酸化が関与しているかどうか調べる必要がある。

これらの理由により、本章ではラット前立腺より rRNA 合成の場である核小体を単離して、in vitro で γ -[32 P]ATP とともにインキュベートすることにより、endogenous な protein kinase により核小体蛋白の磷酸化を行わせる時、1) 去勢、及びテストステロン (in vivo) 2) ポリアミン 3) CAMP, CGMP, その他の影響があるかどうか調べるとともに、これら磷酸化蛋白の中に

tRNA 合成の制御に關係する可能性のあるものがあるかどうか探究することにした。

第2節 ラット前立腺核小体蛋白の磷酸化に及ぼす去勢の影響

前立腺核小体を構成している蛋白質のうち endogenous な protein kinase によって特に磷酸化されやすい蛋白質があるかどうか、あるとすればそれが去勢によって変化するかどうかを調べてみた。

〔材料と方法〕

体重 250 - 350 g のウイスター系雄ラットを使用し、睪丸摘出はペントバルビタール麻酔下で行い、その 48 時間後のラット前立腺を使用した。

これらのラットから第2章第2節と同じ方法で前立腺を摘出し、核を単離し、更に次に述べるように Higashinakagawa ら (1972) の方法に従い、核小体を単離した。なお操作は特別に述べない場合はすべて $0^{\circ}\sim 4^{\circ}\text{C}$ で行う。

単離核を 0.34M sucrose - 0.05mM MgCl_2 10ml に suspend した後、KUBOTA Insonator 200M で $165\sim 180\text{W}$ の出力で 20 秒を 12 - 14 回、間に 20 秒づつの休止を置き、Sonication 後、 20ml の 0.88M sucrose - 0.05mM MgCl_2 - 1mM PMSF の上にしずかに上層し、 $1500\times g$ で 40 分遠心し、その沈殿を核小体とする。通常この沈殿を 0.15ml の 0.34M sucrose - 0.05mM MgCl_2 - 1mM PMSF - 1mM DTT で suspend してから使用した。

磷酸化反応 反応溶液 (0.20ml) は次の成分を含む: 50mM Tris-HCl (pH 7.5), 100mM NaCl, 5mM MgCl_2 , 1mM DTT, $1\sim 2\text{ }\mu\text{Ci}$ γ - $[^{32}\text{P}]$ ATP ($5\sim 30\text{ }\mu\text{Ci}/\text{mmol}$), 1mM PMSF, 蛋白量として $300\sim 500\text{ }\mu\text{g}$ に相当する核小体画分。

反応は γ - $[^{32}\text{P}]$ ATP 以外の反応溶液を 37°C で 5 分間ブレインキューベートを行った後、 γ - $[^{32}\text{P}]$ ATP を加えて反応を開始、10 分間、 37°C でインキューベートする。この後の操作は通常以下に述べる操作

を行なったが、実験によつては20% PCAで反応を止め、その沈殿をエタノール:エーテル(1:1)で2回、エーテルで1回沈殿を洗い、SDS-尿素で可溶化後、電気泳動を行なった。上記の反応溶液は270 μ l の SDS 溶液 (0.167 M Tris-HCl (pH 6.8), 5.3% SDS, 13.3% (v/v) β -メルカプトエタノール) を加え、直ちに100°Cで2分間インキュベート後、尿素を350 mg 加えて1時間室温で攪拌後、遠心してその上清を以下の電気泳動に用いた。

SDS-ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動とオートラジオグラフィ 電気泳動は Laemmli (1970) の方法に従った。先の遠心上清を50 μ l, あるいは70 μ l づつ、ゲルに (140 X 140 X 1 mm) のせ、初期泳動 15 mA, 本泳動 25 mA の定電流により蛋白を泳動した。蛋白固定、及び蛋白染色は 1% Coomassie Brilliant Blue (R250) - 10% 酢酸 - 25% メタノール中で1時間〜1晩行い、脱色は50% メタノール, 7% 酢酸で行った。ゲルは更にろ紙の上でゲルドライヤーを用いて乾燥し、オートラジオグラフィを行なった (Fuji RXフィルムを使用)。

[結果]

正常及び去勢ラットより核小体を単離し、上で述べたように $[^{32}\text{P}]$ ATP とインキュベートしてから SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、オートラジオグラフィを行った結果を Fig. 15 に示す。ここで lane 1 と 2 は正常ラット, lane 3 と 4 は去勢ラットのものであり, lane 2 と 4 はそれぞれインキュベーション medium に 1 mM の スパルミン を加えた時の結果である (またこのどの lane の実験の場合でも PMSF は加えていない。又各 lane にのせる蛋白量は等しくなるようにしてある)。

これからわかるように、正常ラットの場合多くの蛋白が、燐酸化されている。特に強く燐酸化されているのか 100 K と 35 K でありついで 77 K, 64 K, 59 K, 56 K などの蛋白に ^{32}P が入っている。去勢48時間のもの (lane 3 と 4) では、これらの蛋白の燐酸化は全体として減少しているが、56 K の蛋白の燐酸化はほとんど変化が

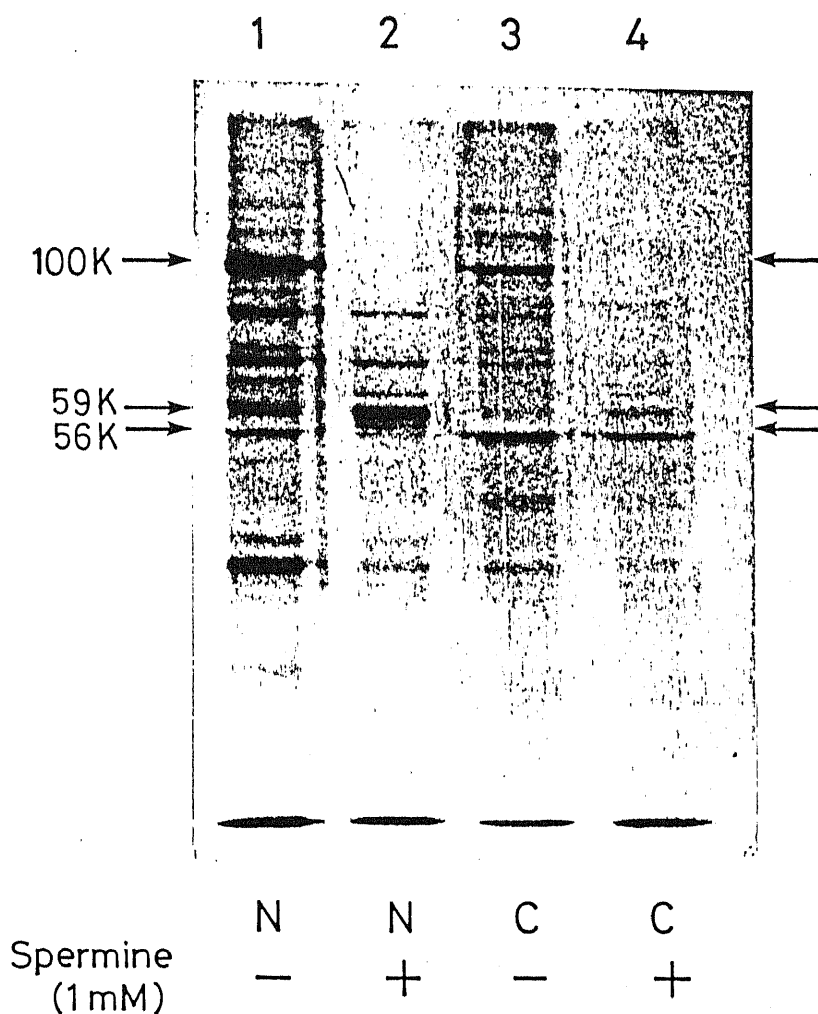


Fig. 15 Effect of castration and 1 mM spermine (in vitro) on the phosphorylation in rat prostatic nucleoli. Nucleolar suspension isolated from normal and castrated rats (48 h) were preincubated for 5 min at 37°C and phosphorylation carried out for 10 min at 37°C by adding of γ -³²P-ATP under the standard conditions without PMSF and in the presence or absence of 1 mM spermine. Phosphorylated proteins were run on SDS- 10 % acrylamide gel electrophoresis followed by autoradiography. Nucleoli from normal rats (lane 1,2); castrated rats (lane 3,4). 1 mM spermine was added to the phosphorylation mixture (lane 2,4).

なかった。1mMのスペルミンを加えた時の顕著な変化は、正常及び去勢のどちらでも100Kの蛋白質の磷酸化が消失し、その代りに59Kの磷酸化が増加していることである。

〔考察〕

正常と去勢とを比べると (lane 1と3), 磷酸化される蛋白質の種類はほとんど変わりはないが、その磷酸化の程度が違う。ゲルにのせた蛋白量はどのlaneでも等しく、蛋白染色でもほとんど差がないので、この変化は去勢によってProtein Kinaseの活性が変化していることを示唆する。ただここで注目すべきことは、去勢により多くの蛋白質の磷酸化が減少しているのに、56Kの蛋白だけはむしろ増加傾向にあることである。Goueliらはラット前立腺の核内のProtein Kinaseの中で、去勢により活性が増加する画分を得ている (Goueli et al, 1980) ことから去勢によってすべての蛋白質の磷酸化が減少するわけではないことがわかるが、その生理的意義は今のところ不明である。

スペルミンを加えた時、100K蛋白質の磷酸化が消失し、代りに59Kの磷酸化が増加した問題については後でまとめて検討する。

第3節 前立腺核小体蛋白質の磷酸化に及ぼすテストステロン投与の影響

前節で正常ラットと去勢ラットの前立腺核小体の磷酸化を比べたが、分子量からみて両者の間に全く異っている蛋白質の磷酸化は見出されなかった。正常ラットの場合、アンドロゲンは常時十分に、また長く供給されており、アンドロゲンによる二次的またはそれ以上の影響もすべて加わっているので、これと去勢ラットを比べることはアンドロゲンの初期効果を調べるには適当でないと考えられる。そのためにはむしろ、去勢ラットにアンドロゲンを投与し、少なくとも12時間以内におこる変化を調べる必要がある。そこで、ここではこのような初期作用に焦点をあてて調べてみた。

[材料と方法]

去勢48時間後のラット(5~7匹)にテストステロンを、体重250gのラットに対して2.5mg(0.1mlの綿実油に溶かす)を皮下に投与、12時間後に前立腺を摘出した。又対照群は綿実油(0.1ml)のみを同様に皮下に投与し、12時間後に前立腺を摘出した。以後の操作は第2節の[材料と方法]と同じである。

二次元電気泳動 二次元電気泳動はO'Farrell(1975; 1977)の方法に従う。一次元目は内径0.25mm、長さ13cmのゲル管を用いゲルは以下のように調製する。30%(w/v)アクリルアミド-1.5%(w/v) BIS 1.6ml, 0.004%(w/v) リボフラビン 1.5ml, 0.45%(v/v) TEMED 1.5ml, 1.5%(w/v) APS 0.08ml, 40%両性担体(Ampholine) 0.6ml, 尿素 6.13g, 20%(w/v) Nonidet P-40 1.2ml, 蒸留水 1.0ml。ゲルを泳動槽にセットし、上槽に0.02M NaOH, 下槽には0.01M 燐酸溶液を使用する。初期泳動は200V 15分 300V 30分, 400V 30分行ない、上槽のNaOH溶液をのぞいた後ゲル上に試料液50 μ l(2%(w/v) Ampholine, 8.5M 尿素, 2%(w/v) Nonidet P-40, 5%(v/v) β -メルカプトエタノール)をのせた後上槽に0.02M NaOHを再度みだし、本泳動を400Vで12~13時間, 800Vで1時間泳動する。ここで使用したAmpholineはpH3.5~10:pH4~6(4:1)に混合したものを、又上槽の0.02M NaOHとゲル、及び試料溶液との境界面が直接触れないように2%(w/v) Ampholine, 5M 尿素, 2%(w/v) Nonidet P-40 20 μ lを保護層として用いた。泳動の終了した一次元目のゲルは0.0625M Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 5% β -メルカプトエタノール中でゆすり攪拌しながら30分インキュベートし、ゲルを平衡化後、2次元目の収縮ゲルの上端に1%のアガロースを含む平衡化溶液を使ってゲルを固定した後、20mA一定の電流で電気泳動する。以後の操作、及び二次元目のゲルの組成は一次元のSDS-スラブゲル電気泳動と同じである。

燐酸化蛋白の定量 実際に電気泳動により分離された蛋白の燐酸

基の取り込みを測定する場合は、乾燥後のゲルからカッターで目的とする染色された蛋白部分を切り出し、30% H_2O_2 0.3 ml 中で45℃で2時間インキュベート後、トルエン系シンチレーターを加えて1晩放置後に液体シンチレーションカウンターで ^{32}P のカウントを測定した。

〔結果〕

上で述べたように、去勢ラットにテストステロンを投与後、12時間の前立腺を取り出し、その核小体蛋白の磷酸化を去勢のものとは比べると Fig. 16 の lane 1と2からわかるように、100 Kの蛋白の磷酸化が顕著に増加していることがわかる。この他にも160 K, 77K 36Kのペプチドの磷酸化がやや増加する。これらの再現性は数回の実験により確かめられた。

尚 lane 3と4は2 mMのスペルミンを lane 5と6は5 μ MのcAMPとcGMPを加えてインキュベーションした場合で、ほとんど変化がないことがわかる。

又蛋白染色では (Fig. 17), 去勢の lane とテストステロンを投与した lane では、それぞれのペプチドの蛋白量には差が見られなかったため、テストステロンによるこのような効果は、核小体に結合した endogenous な Protein Kinase の活性化によるものと考えられる。

次に、この100 Kの蛋白はかなりはっきりとアンドロゲン投与により、磷酸化が増加するので、二三の点についてもう少し詳しく調べてみた。

まずアンドロゲン投与4, 8, 12時間後の放射活性を測定し、比較してみた (Table 1)。これは各々3本ずつ電気泳動した後、100 Kの蛋白バンドを切り取って得られた ^{32}P のカウントの平均値を示している。これからわかるように、この100 Kの磷酸化はテストステロン投与後、少なくとも4時間で既にコントロールに比べて磷酸化は250%も増加しており、その後12時間までほとんど変化していない。

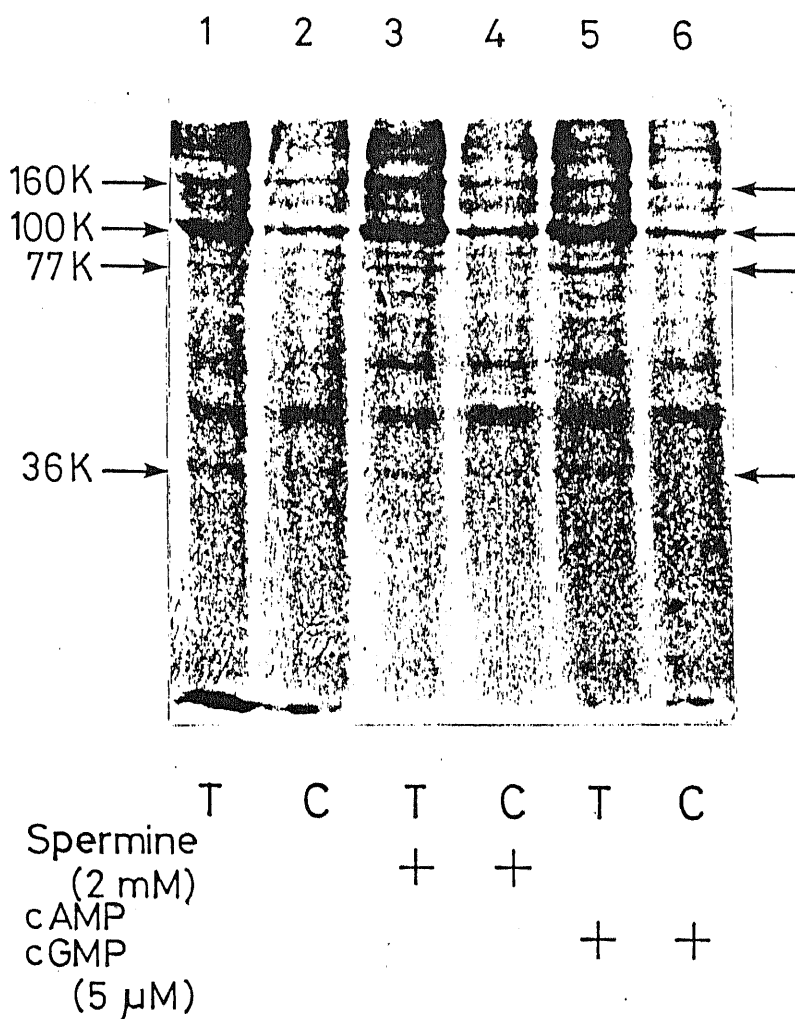


Fig. 16 Autoradiography of androgen dependent phosphorylation of nucleolar proteins. At 48 hr after castration, rats were injected subcutaneously with testosterone (2.5 mg/rat) in 0.1 ml of cotton seeds oil and sacrificed 12 hr after injection. Control rats were injected with the vehicle without the reagent. Prostatic nucleoli were isolated and phosphorylation reaction were carried out in the presence of 1 mM PMSF with none (lane 1,2); 2 mM spermine (lane 3,4), 5 μM cAMP and 5 μM cGMP (lane 5,6).

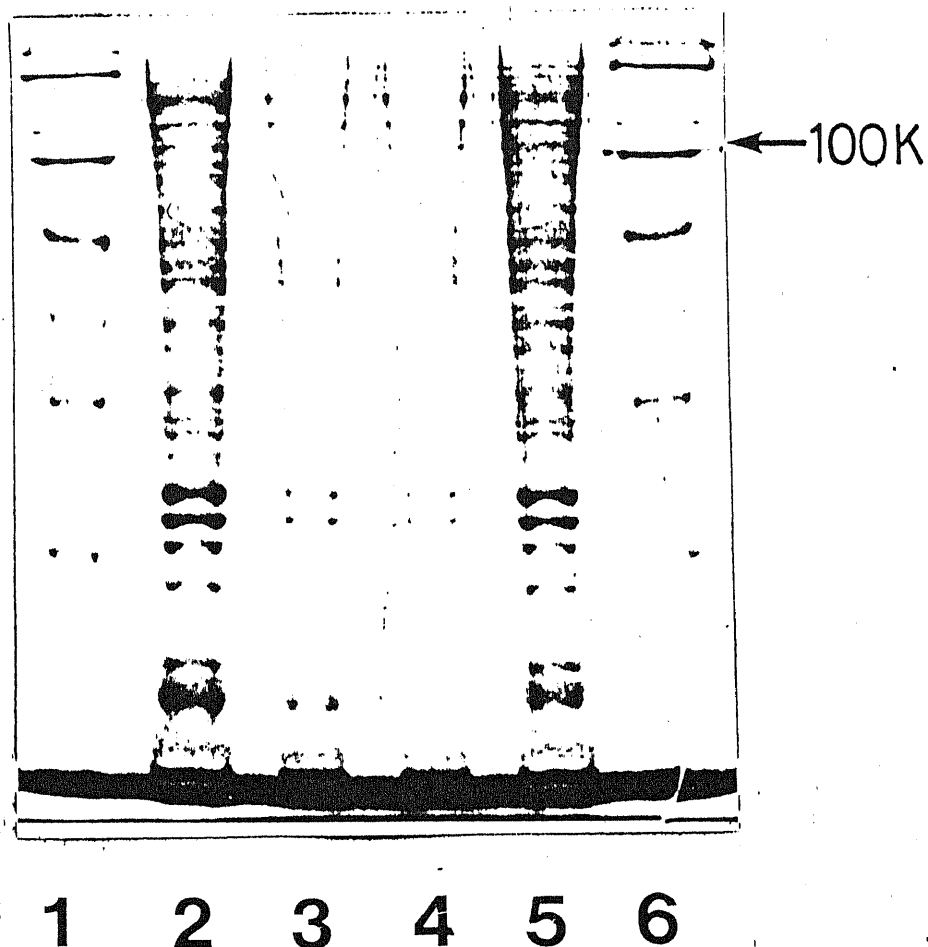


Fig. 17 SDS-polyacrylamide gel electrophoretic pattern of nucleolar proteins. The gel were stained with silver: lane 1 and 6, standard protein; lane 2, castrated control (20 µg protein); lane 3, castrated control (10 µg protein); lane 4, testosterone treated (12 h), (20 µg protein); lane 5, testosterone treated (12 h), (10 µg protein).

Table 1. In Vivo Effect of Testosterone on
Phosphorylation of Nucleolar 100K Phosphoprotein

Time after testosterone injection (hr)	CPM of ^{32}P	relative activities
0	111	100
4	411	370
8	414	373
12	399	359

次にこの蛋白の等電点を定めるため、去勢+テストステロン投与(12時間)の核小体の磷酸化蛋白を O'Farrell (1975, 1977) の方法により二次元電気泳動を行ない、その等電点を調べてみた。この時のオートラジオグラフィーを Fig. 18 に示す。磷酸化された分子量 100 K の蛋白のスポットが2点みられ、それぞれ等電点が 6.0 と 5.6 であり、2つの分子種から成っていることが明らかになった。しかし等電点 5.6 のスポットは実験により、消えたり薄くなったりするので、等電点 6.0 のスポットがメインスポットであろうと思われる。

次にこの 100 K の蛋白、及び、アンドロゲンに依存して磷酸化が促進された他の磷酸化蛋白が RNA polymerase I のサブユニットであるかどうか調べてみた。ラット肝より精製された RNA polymerase I (Matsui, 1984) と、これらの磷酸化蛋白の分子量を比較したのが Fig. 19 である。これは、ラット前立腺核小体のアンドロゲンにより促進を受ける磷酸化蛋白は、ラット肝の RNA polymerase I のサブユニットとは一致しないことを示す。

[考察]

去勢ラットにテストステロンを投与するとき、新たな蛋白質の磷酸化は見られず、それまでも多少磷酸化されていた数個の蛋白質の磷酸化が増加するという結果が得られた。

これらの蛋白質は肝の精製 RNA polymerase I のサブユニットと一致せず、アンドロゲンによって RNA polymerase I の磷酸化が促進される可能性は少ないように思われる。

アンドロゲンによってその磷酸化が特に促進されるのは分子量 100 K の蛋白であることがわかったが、これが核小体における RNA 合成とどのような関係があるか今のところは不明である。しかし後述するように、この蛋白は肝細胞やヘパトーマの核小体蛋白 C23 とよくその性質が似ており、前立腺核小体においても RNA 合成との関連が出てくる可能性が大きい。

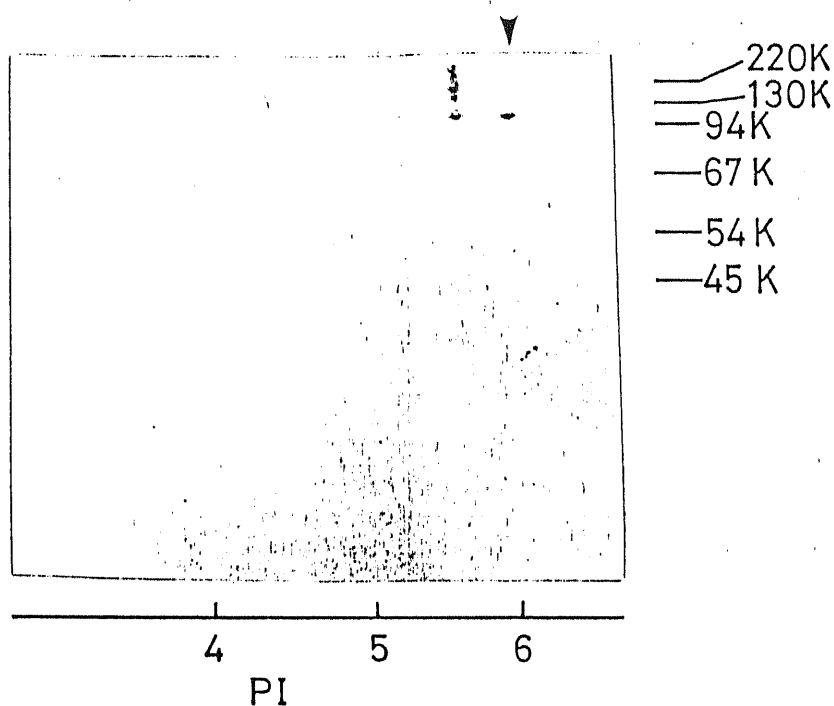


Fig. 18 Two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of testosterone treated (12 h) rat nucleolar phosphoproteins. Nucleoli was isolated from testosterone administrated to castrated rats (48 h) and phosphorylated for 10 min under the standard conditions in the presence of 1 mM PMSF. After nucleolar sample was solubilized in SDS-urea, the first dimension was carried out by isoelectric focusing and second dimension, 10 % SDS polyacrylamide gel electrophoresis. After gel was dried, it was autoradiographed.

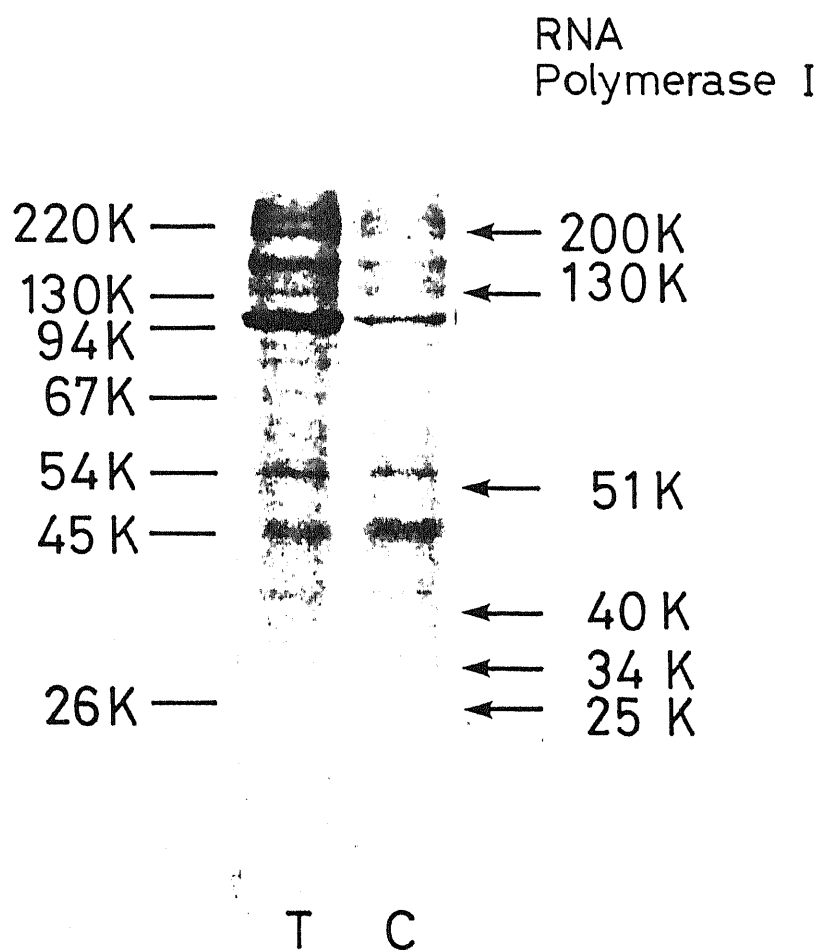


Fig. 19 The comparison of phosphoproteins of prostatic nucleoli to molecular weight of subunits of RNA polymerase I purified from rat liver.

第4節 ポリアミン及び cyclic Nucleotides の影響

Kuehn らは Physarum polycephalum の核小体に存在する分子量 70 K のポリアミン依存性のリン酸化蛋白が rDNA に結合し, rRNA 合成を御執していることを報告 (Atmar et al, 1978; Daniels et al, 1981; Kuehn et al, 1979) している。又, ラット前立腺核でも Ahmed らにより (1975; 1980), 核内の Protein kinase がポリアミンにより活性化されることを見い出している。又 cGMP により核小体内のヒストン kinase が (Linnalakankkunen and Mäenpää, 1979), マウス腹水癌でも核小体結合性の Protein kinase が (Kawashima and Izawa, 1977), それぞれ活性化されることが報告されている。そこで, ラット前立腺核小体のリン酸化においても, ポリアミン, cyclic nucleotides の効果があるかどうか調べてみる必要があり, 本節の実験を行った。

[材料と方法]

リン酸化の方法は第2節の方法に従うが, 各実験ごとの特殊な操作は各図の説明のところで述べた。又, 核小体蛋白へのリン酸基の全取り込み量を測定する場合は以下のように行った。正常ラット前立腺より調製した核小体を第2節と同じようにリン酸化し (ただし 1mM の PMSF は加えない), 反応停止は 30% PCA を 0.2 ml 加える。水中で 20 分間放置後, GF/C グラスフィルター上で沈澱を 5% PCA-1% ピロリン酸ナトリウム溶液で 3 回洗った後, エタノール: エーテル (1:1) で洗い, 乾燥後, トルエン系シンチレーター 6ml で ^{32}P のカウントを測定する。

[結果]

正常ラットの前立腺核小体を 1mM のスベルミンとインキュベートした時のタイムコースを Fig. 20 に示す。スベルミン存在下, 非存在下とも 37°C のインキュベーションで ^{32}P の取り込みは飽和するが最大の取り込みは 1mM のスベルミン存在下の方が 50% ほど高い。

次に cyclic nucleotide の効果を調べてみた。正常ラットの前立

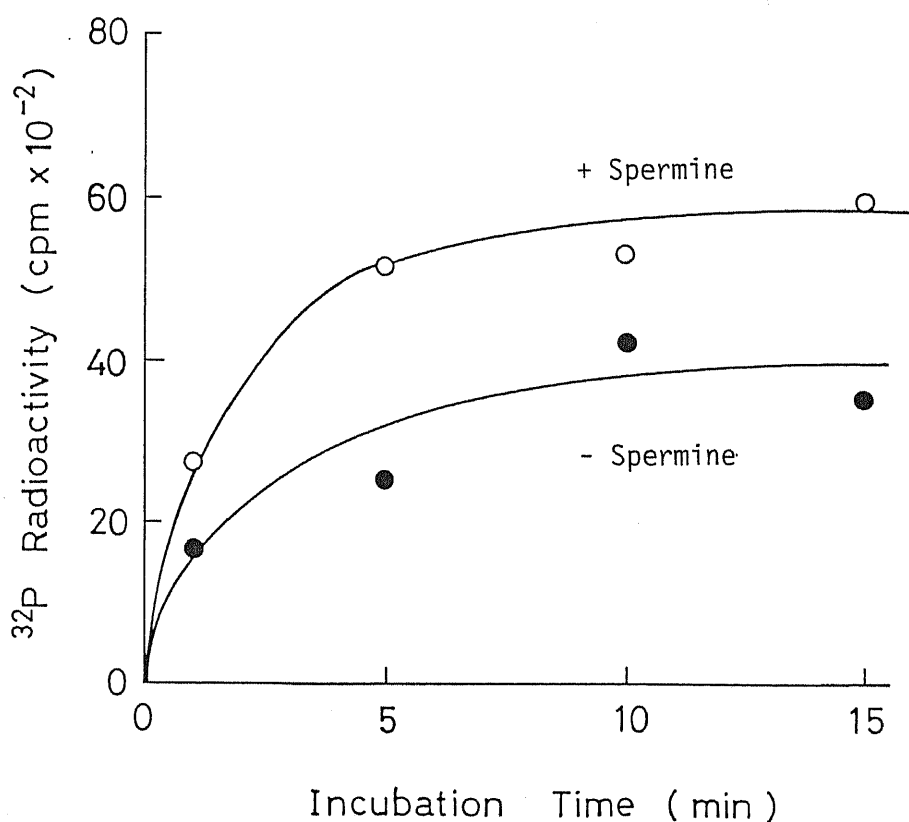


Fig. 20 Time course of incorporation of ^{32}P into nucleolar phosphoproteins from normal rat ventral prostate in the presence or absence of 1 mM spermine. Nucleolar suspension isolated from normal rat prostates in the phosphorylation mixture was preincubated for 5 min at 37°C and incubated with ^{32}P -ATP for the period indicated in the figure. The reaction was stopped by addition of same vol of 30 % TCA and TCA-insoluble materials and collected on GF/C filters (Whatman), washed with 5% TCA-1 % sodium pyrophosphate and ethanol:ether(1:1) and dehydrated. Radioactivity was determined in a liquid scintillation counter.

腺核小体を γ -[^{32}P] ATP と 30 分 インキュベートすると, PMSF 非存在下で 1 mM スペルミン, 1 mM スペルミジン, 5 μM CAMP または 2 μM CGMP を加えると Fig. 21 のようなパターンが得られた。この図は CAMP や CGMP では何の変化も生じないが、ポリアミン存在下では正常前立腺核小体の場合みられる 100 K 蛋白の磷酸化が減少し、その代りに 59 K の蛋白質の磷酸化が増加していることを示す。この効果はスペルミンの場合 0.25 ~ 0.5 mM すでに見られる (Fig. 22)。又ここに示していないが、スペルミジンでは 5 mM からこのような効果が見られたが、プロテッシンでは、10 mM までポリアミン濃度を上げてみたが、そのような効果は見られなかった。去勢ラットの場合はすでに Fig. 15 で示したが、やはり正常ラットと同じ結果が得られた。

このようなポリアミンの効果は PMSF 非存在下で見られ、PMSF を 1 mM, インキュベーション中に加えておくと見られなくなる (Fig. 23)。このことは既に Fig. 16 でも示した。

[考察]

上で述べたようにラット前立腺核小体でこれまで調べた限りでは CAMP, CGMP では全く影響は見られなかった。又 CAMP の影響についてしてみると、核内での磷酸化の反応に CAMP が関与しているという報告はいくつかあるが (Johnson and Allfrey, 1972; Johnson and Hadden, 1975; Cho-Chung and Redler, 1979), CAMP は核内の磷酸化にはあまり関与していないとする報告も (Ahmed and Wilson, 1978) 多い。ラット前立腺でもやはり CAMP の影響は見られなかった。そこで本章で述べている核小体蛋白の磷酸化に働いている Kinase は cyclic nucleotide dependent protein kinase ではないと考えられる。

なお [結果] では述べなかったが、予備実験において、 γ -[^{32}P] ATP を γ -[^{32}P] GTP に置きかえたところ同じような磷酸化の結果を示したことから (Yamaguchi, 1983), 核内に最近見出された VII type の CAMP independent Protein Kinase (Duceman

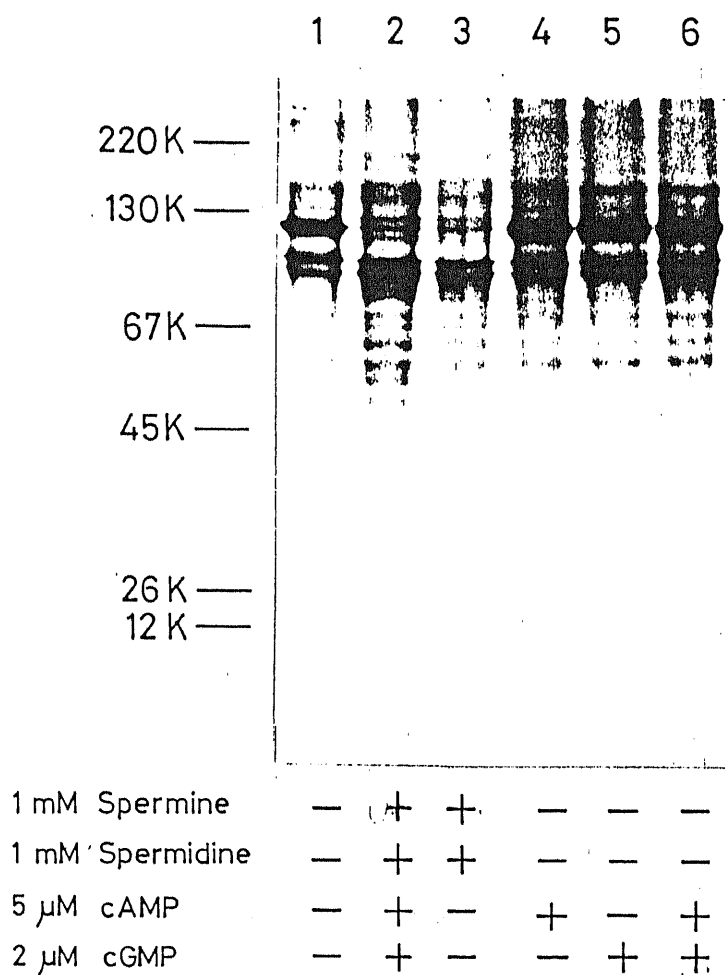


Fig. 21 Effect of polyamines and cyclic nucleotides on the incorporation of ^{32}P into the nucleolar proteins from normal rat prostates. Isolated nucleoli were phosphorylated in the presence or absence of polyamines and/or cyclic nucleotides. ^{32}P incorporated sample was precipitated by 30 % TCA, washed, and run on a SDS-10 % polyacrylamide gel electrophoresis. The following proteins as standard were used; myosin (220,000), β - galactosidase (130,000), bovine serum albumin (67,000), ovalbumin (45,000) and α -chymotrypsinogen (26,000).

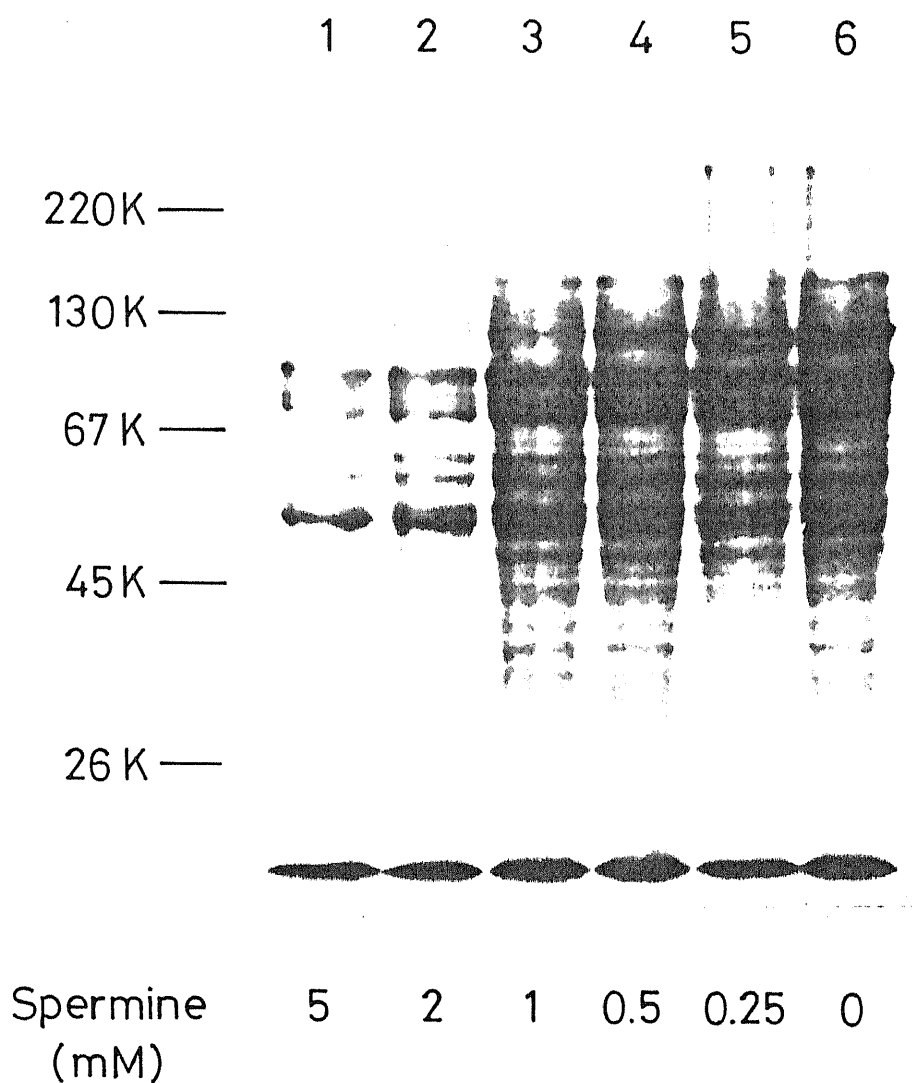


Fig. 22 Spermine effect on the phosphorylation of rat prostate nucleoli proteins. Nucleoli were incubated with γ - ^{32}P -ATP in the presence of various amounts of spermine for 30 min. The final concentration of added spermine in the reaction mixture was: lane 1, 5; lane 2, 2.5; lane 3, 1; lane 4, 0.5; lane 5, 0.25; lane 6, 0 mM.

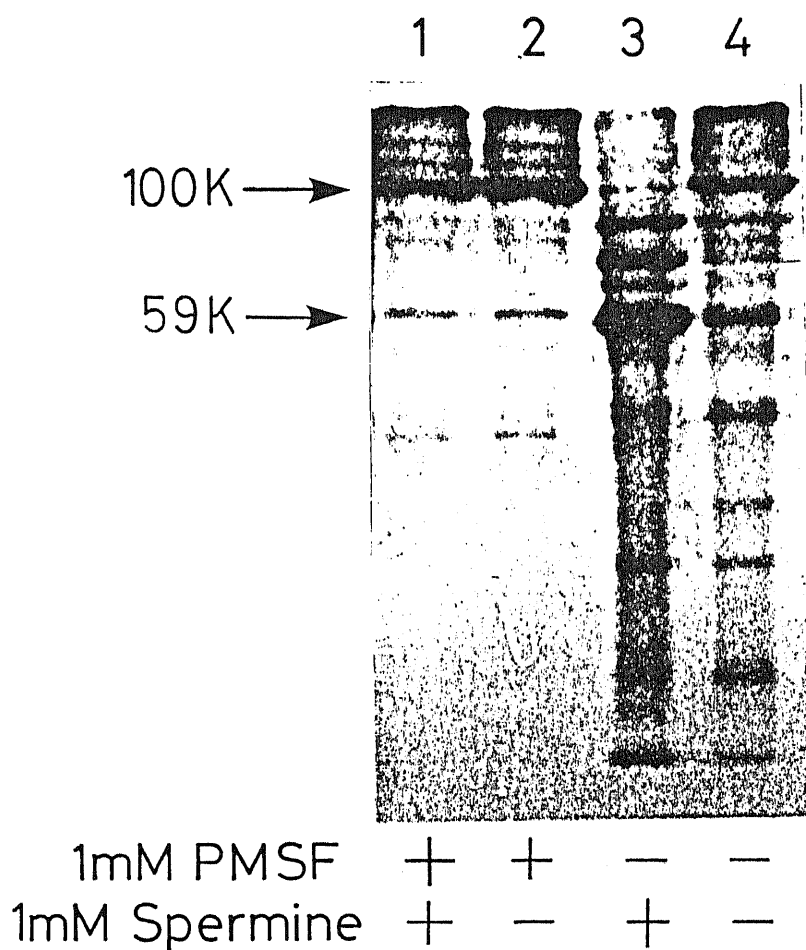


Fig. 23 Effect of PMSF on spermine-dependent dephosphorylation of 100 K nucleolar protein. Nucleoli isolated from normal rat prostates were phosphorylated in the presence of 1 mM PMSF and/or 1 mM spermine under the standard conditions. The reagents added were: lane 1, 1 mM PMSF + 1 mM spermine; lane 2, 1 mM PMSF; lane 3, 1 mM spermine; lane 4, none.

et al, 1981; Dahmus, 1976) によって磷酸化されている可能性がある。

又, Ca^{2+} , Calmodulin, それぞれ単独, あるいは共存させて磷酸化を行って見たが, これらの効果は見られなかった。

Fig. 15, 21, 23, の実験では, ポリアミン, 特にスperlミンの存在下では 100 K 蛋白の磷酸化が減少している。この原因としては, 核小体に endogenous な Phosphatase, または Protease が特異的に活性化される可能性が考えられる。しかし予備実験において, ラット前立腺核内の Phosphatase 活性を阻害するホモアルギニンや MoO_4^{2-} (Wilson and Ahmed, 1976, 1978) をインキュベーションミediumに加えて, 磷酸化反応を行ったが, Phosphatase 阻害剤の効果は見られなかった。Phosphatase の可能性は除外された。それよりも, 電気泳動のゲルの蛋白染色 (図は示していない) で, スperlミンにより, その 100 K の蛋白のバンドが消失すること, 又 Protease 阻害剤である PMSF でスperlミンの効果, 即ち, 100 K 蛋白の減少と 56 K 蛋白の磷酸化の増加が見られなくなることより, スperlミンは 100 K 蛋白の Protease に対する感受性を高めていると考えられる。又 100 K の磷酸化のオートラジオグラフィーの黒化度がスperlミン存在下で得られた 56 K 蛋白の磷酸化のそれと見かけ上等しいことより, スperlミン存在下において, 37°C のインキュベーション中に, 切断された 100 K のフラグメントが, 56 K の磷酸化バンドとしてオートラジオグラフィー上で観察されたのではないかと考えられる。(この点についてはさらに後につれる)。

第5節 総括

はじめに述べたように, ラット肝 (Hirsch and Martero, 1974, 1976) や, 仔牛胸腺 (Rose et al, 1981) の RNA polymerase I のサブユニットが磷酸化されることに対応して, ラット前立腺においても RNA polymerase I のサブユニットが磷酸化されるか, また

それがアンドロゲン依存性であるか、更にはその磷酸化によって RNA polymerase I の転写活性が促進されるかどうかを調べることは非常に興味ある問題である。そこでラット肝より精製された RNA polymerase I のサブユニットの分子量と、アンドロゲンにより促進されたラット前立腺核小体の磷酸化蛋白を比較してみたわけだが、結果は、両者の蛋白は分子量で一致しなかった。この結果より、少なくとも、ラット前立腺核小体の endogenous な protein kinase による磷酸化反応においては、アンドロゲンが RNA polymerase I のサブユニットの磷酸化反応を通して RNA 合成を制御している可能性は少ないように思われる。

次に調査すべきことは、核小体蛋白の磷酸化に及ぼすポリアミンの影響であった。これはさきに述べたように、Physarum polycephalum で興味ある結果が得られている (Kuehn et al, 1979; Atmar et al, 1978) 上に、Morris ヘパトーマではスベルミンが RNA polymerase I のサブユニットの磷酸化を促進し、これが合成 RNA 鎖を長くする働きがあるという報告があるからである (Jacob et al, 1981)。その上、ポリアミンはラット前立腺でアンドロゲンによってその合成が調節されているという報告もあるので (Williams - Ashman et al, 1969) ポリアミンの効果について、今回注意して何度も調べてみたが、RNA polymerase I のサブユニットを含めて、核小体蛋白の中にポリアミンに特異的に磷酸化の促進を受けるものはなく、ポリアミンに依存した核小体蛋白の磷酸化の促進を通じて RNA polymerase I の活性を制御するという説を支持するデータは得られなかった。

又ポリアミンの他に磷酸化を促進させる因子として知られている CAMP, CGMP, Ca^{2+} , calmoduline でも試してみたが、前立腺核小体では磷酸化に全く影響が見られなかった。又、 γ - $[^{32}P]$ ATP を γ - $[^{32}P]$ GTP に置き換えて磷酸化させると γ - $[^{32}P]$ ATP の場合と同じように磷酸化が進むことがわかっているため、今回問題にしている核小体に endogenous な Protein kinase は CAMP-independent

な NII Kinase (Dahmus, 1976; Rose et al, 1981) か, あるいは又それによく似た Protein kinase であろうと思われる。

ところで今回の実験において, ラット前立腺核小体にはアンドロゲンにより特異的に, しかも速やかに磷酸化が促進される蛋白がいくつかあることが見出された。アンドロゲンにおいてこのような報告はまだなく, これが世界で初めての報告だと思われる。中でも, 分子量 100 K をもつアンドロゲン依存性の磷酸化蛋白は次のような注目すべき性質をもつ。(1) 正常ラット前立腺核小体蛋白の中で最も強く磷酸化をうける。(2) 去勢ラットにアンドロゲンを投与した場合, 非常に早く (投与後 4 時間以内) その磷酸化は飽和に達する。(3) 酸性蛋白で, $PI = 6.0$, そのほか, しばしば $PI = 5.6$ の分子種も得られることがある。(4) PMSF 非存在下, ポリアミン (特にスペルミン) 存在下で消失する。この時, 代りに分子量 56 K のフラグメントが得られる。おそらく, 100 K はポリアミン依存性のプロテアーゼの作用により切断され, この磷酸化のアクセプター部位をもつフラグメント (56 K) が生じたものであろう。(5) CAMP, CGMP, ポリアミン, Ca^{2+} , Calmoduline はこの 100 K 蛋白の磷酸化に影響を与えなかった。

第3節でも少し触れたが, ラット前立腺核小体の 100 K 蛋白は, Olson らがラット正常肝 (Olson et al, 1978; Kang et al, 1975), ヘパトーマ (Olson et al, 1983; 1975; 1974) で発見した核小体蛋白の C23 とその性質が非常によく似ている。この C23 はこれらの核小体における主要な蛋白であり, 非常に磷酸化され易いこと, 分子量が 110 K であり, PI も 5.3 の酸性蛋白であるからである。マウス腹水癌の核小体にも 110 K の磷酸化蛋白が見出されており (Kawashima and Ijawa, 1977), 同種の蛋白だと考えられている。C23 はカルボキシル基末端の方のペプチドにアスパラギン酸グルタミン酸の富む部位があり, ここを磷酸基のアクセプター部位としているユニークな磷酸化蛋白であることが最近明らかになった (Ra0 et al, 1982)。

この C23 の機能についてはまだ最終的な結果は得られていないが核小体オーガナイザー (NOR) に結合しており (Morton et al, 1983), 特に細胞増殖が盛んな細胞においてその磷酸化が顕著に起きていること (Olson et al, 1978; Kang et al, 1975; Ballal et al, 1975), rDNA のリンカー部分に高い親和性をもつこと (Olson et al, 1983) から, この蛋白が rRNA 合成制御に関係する重要な蛋白であるとみなされている。

従って、前立腺核小体の 100 K 蛋白も、磷酸化の結果、rDNA の転写反応に影響を与えている可能性が十分考えられる。即ちアンドロゲンはこの 100 K 蛋白の磷酸化を通じて rRNA 合成の制御を行っているのではないかと推定される。

しかしながら、アンドロゲンはどのようにして 100 K 蛋白の磷酸化を触媒する protein kinase を活性化するのか、また 100 K 蛋白は磷酸化された後、どのようにして rDNA 転写に影響を与えるのかについては一切不明であり、今後の興味ある主題であると考えられる。

第4章

アンドロゲン依存性マウス乳癌（シオノギ癌 SC/15）とそのサブライン（CS-1とCS-2）におけるrRNA合成に対するアンドロゲン依存性

第1節 序論

前章までの研究はアンドロゲン依存性組織として最もよく用いられるラットの腹部前立腺を用いて行ったものである。生体内にはこの他にもアンドロゲン依存性組織がある（例えば精嚢、顎下腺、腎臓など）が、実験動物の自然発生癌の中にもアンドロゲン依存性のものがあり、これを用いると、後述するように、又別の利点があり新たな展望も開ける可能性がある。本研究で用いたものはこれらの中でも比較的よく用いられているマウス乳癌由来のシオノギ癌 SC/15 である。

1964年、塩野義製薬研究所の峰下、山口は、DD/S 系マウスの雌の乳腺に自然発生した腫瘍を近交系の雄マウスに継代中、第19代目以降において雄マウスに移植可能で雌マウスに全く移植できない乳癌を得た。即ち、もともとアンドロゲン依存性でない乳癌より、アンドロゲン依存性の乳癌が得られ、SC/15と名づけられた (Mineshita and Yamaguchi, 1964; 1965)。この組織の性情は後の継代移植でも保持されているが、更に組織培養でもアンドロゲン依存性のラインが確立されている (Bruchovsky et al, 1975; Bruchovsky and Rennie 1978; Lefebvre et al, 1982; Yates and King, 1981)。

ところで、ホルモン依存性移植腫瘍を継代していると、しばしばホルモン依存性を失いながら、発育の促進がおこることがよく知られている (Otsuka, 1979)。SC/15の場合もいくつかの研究室でアンドロゲン依存性を喪失した株がいくつか報告されている (Bruchovsky and Rennie, 1978; Bruchovsky et al, 1975)。本報では

更に、この SC115 のサブラインも用いた。これは千葉大学医学部の泌尿器科教室において、SC115 を DD/S 系マウスに継代移植中に得られたアンドロゲン依存性を半ば失った株と、全く依存性を消失した株で、Chiba subline 1 (CS-1) および、Chiba subline 2 (CS-2) と名づけられたものである (Wakisaka et al, 1980; Fuse et al 1983)。これらは、増殖に対するアンドロゲン依存性の原因がまだ不明であり、その研究はそれ自体興味あるものであるが、更に次の 2 つの理由からも重要であると考えられる。

一つは臨床的見地からのものである。ヒト前立腺癌は、アンドロゲン依存性の癌であり、アンチアンドロゲン療法が試みられているが、治療中にアンドロゲン依存性を失い、この療法が効果をもたなくなることがある。このようなアンドロゲン依存性の変化の原因はまだ不明であり、このため適切な対策が得られていないが、SC115 とそのサブラインのアンドロゲン依存性の変化の機構が、アンドロゲンの依存性変化を見せる前立腺癌の場合のよいモデルシステムとして、その分子機構解明に役立てられるかも知れらると思われる。

第二は rRNA 合成と細胞増殖との関係である。細胞の増殖は多くの場合、rRNA 合成が不可欠の前提条件になっている。そこでアンドロゲン依存性の差が rRNA 合成に対するアンドロゲンの作用と結びつく可能性がある。もしもそうであれば、アンドロゲンによる rRNA 合成の制御機構の研究にも多くの寄与をすることも期待される。以上の理由により、千葉大学医学部泌尿器科と協同して、この問題を研究することにした。

第 2 節 SC115 とそのサブライン (CS-1 と CS-2) の細胞増殖と細胞質のアンドロゲンレセプターの比較

さきに述べた如く、SC115 は塩野義製薬研究所において確立された、完全にアンドロゲン依存性の腫瘍である。即ちこれは雄マウスにのみ移植可能で雌マウスに全く移植できない (Minesita and

Yamaguchi, 1964)。これを千葉大学医学部泌尿器科で継代移植中にアンドロゲン依存性が半は消失したサブライン(CS-1)が得られ、その増殖曲線、細胞動態、細胞質におけるステロイドレセプターの定量が行われた(Wakisaka et al, 1980)。その後更に、このCS-1を雌マウスに継代移植中、アンドロゲン依存性を全く失ったサブライン(CS-2)が得られたので、この節ではこれら3種の腫瘍組織の増殖曲線と細胞質レセプターの動態を示すことにする。なお、この節で示すデータは千葉大学医学部泌尿器科で測定されたものである。

[材料及び方法]

SC115は1978年、塩野義製薬研究所より供与されたもので、CS-1はこれから得られたサブラインで、雄雌両マウスに可移植性になったもの(Wakisaka et al, 1980)、又CS-2は、CS-1を更に雌に移植中にアンドロゲン依存性を完全に失った腫瘍である(Fuse et al, 1983)。

これらの腫瘍をDD/S系マウス(体重24g)の頸部に移植後、20日目にマウスから各腫瘍を摘出し、以下の実験に用いた。又マウスに去勢をほどこす場合には、腫瘍移植後16日目に去勢を行った。又テストステロンを投与する時は、テストステロンプロピオネート(0.2mg)を0.1mlのゴマ油に溶かして、各実験で示した時間にマウスに投与した。腫瘍の大きさは腫瘍の直径、あるいは湿重量の平均値で表わした。

サイトゾールレセプターの定量は次のように行、た。腫瘍を摘出し、組織を10mM Tris-HCl (pH 7.4) - 1mM β -メルカプトエタノール - 10% グリセロール中でホモジナイズし、105000Xgで1時間遠心して、その上清を得る。これを種々の濃度の3H-R1881と4℃2時間インキュベートし、0.5% dextran - 0.05% charcoalを加えて結合していないステロイドを除いた後、Schatchardによる解析法(Schatchard, 1949)で解離定数(Kd)および最大結合部位数(MBS)を求めた。

〔結果と考察〕

(1) SC115, CS-1, CS-2, の細胞増殖に対するアンドロゲンの依存性

Fig.24はSC115, 及びCS-1, Fig.25はCS-2をマウスに移植した後の腫瘍の大きさの変化を示したものである。SC115, CS-1はどちらも雄マウスに移植したものであるが(Fig.24), CS-1の増殖速度の方がSC115よりも早い傾向にある。又移植後16日目に去勢すると, SC115ではその増殖が止まるが, CS-1の増殖は完全には止まらず, 増殖速度が去勢しない対照群より遅くなっているのがわかる。一方, CS-2の場合は雄マウス, 雌マウス, 及び始めから去勢した雄マウスの3者に移植して比較してみた(Fig.25)。3種のマウスの皮下に移植されたCS-2の発育速度は3者間には有意な差は見とめられず, CS-2はアンドロゲン依存性を完全に失った株であることが示めされた。次に, アンドロゲン依存性をもったオリジナルな株であるSC115, 及びアンドロゲン依存性を半分消失したと考えられるCS-1について, 去勢雄マウスにテストステロンを投与して投与後の腫瘍の大きさの変化を, 摘出した腫瘍の湿重量を測定することにより調べてみた。雄マウスに腫瘍を移植後, 16日目に対照群以外のマウスを去勢して, 移植20日後に腫瘍を摘出するか, その6, 12, 18, 24, 36時間前にテストステロンを投与しておく(Fig.26)。SC115では去勢4日で腫瘍の湿重量が50%近く減少した。マウスを殺す前にテストステロンを投与しておく, テストステロンは, 去勢の時の湿重量の減少を打ち消す効果を示した。CS-1においても同様に実験したところ, SC115とほぼ同じ結果が得られたが, 去勢群の腫瘍湿重量の減少はSC115の場合よりも小さく, またテストステロンを投与した場合でも, その腫瘍湿重量減少を打ち消す効果はSC115よりも低かった。これらのデータは, ここで用いた3種のシオノギ乳癌のアンドロゲン依存性を明瞭に示しており, 腫瘍の生長に対するアンドロゲン依存性は $SC115 > CS-1 > CS-2$ だと結論づけられ, CS-2に関しては, 雄, 雌, 及び去勢した雄マ

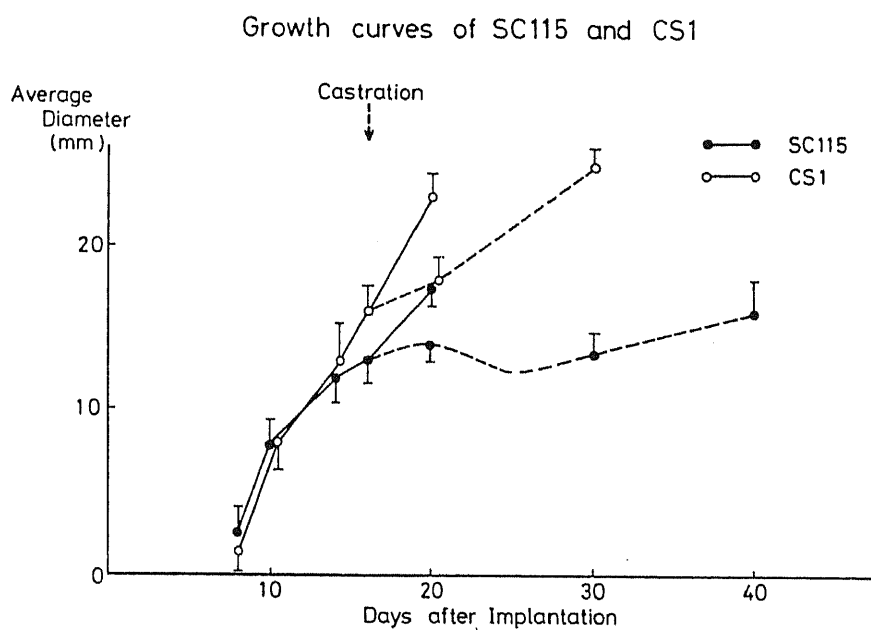


Fig. 24 Growth of SC115 and CS-1 on male mice. Castration was performed to indicated mice on 16th day after the transplantation.

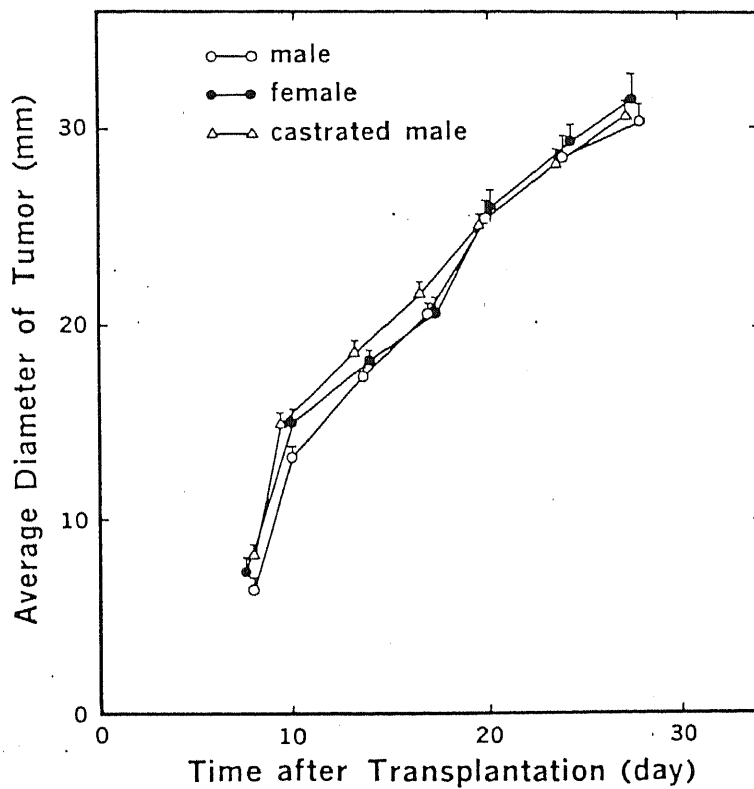


Fig. 25 Growth of CS-2 on male, female, and castrated male mice. Values are shown as means $\pm$ S.E.

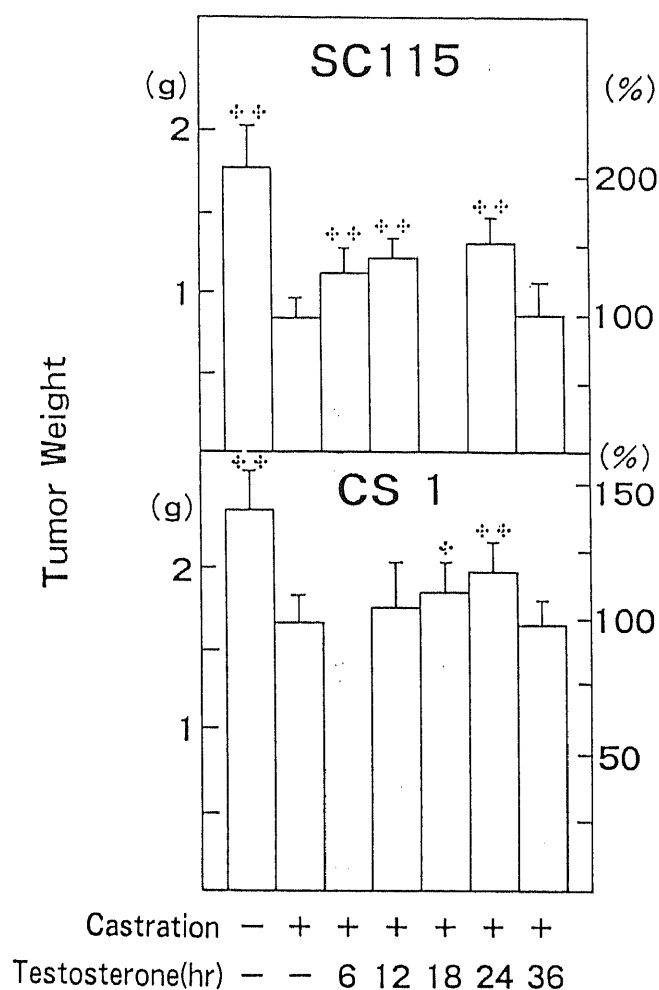


Fig. 26 Weight of SC 115 (upper) and CS-1 (lower) on the 20th day after tumor transplantation to mice of DD/S strain. Castration was performed to indicated mice on the 16th day after the transplantation and all animals were sacrificed on the 20th day. A single injection of testosterone propionate (0.2 mg/mouse) was given at the indicated hours before sacrifice. Fifty mice were used for calculation of $M \pm SE$. for each column. Statistically significant differences from the values in the castrated mice without testosterone, *: p 0.05, **: p 0.01 .

ウスに対して、その発育に全く有意な差がみとめられなかったの
完全にアンドロゲン非依存性であることがわかった。

(2) 細胞質レセプターの定量と動態

これら3種の腫瘍のアンドロゲンに依存した増殖速度に差のあることは、どのような機構によるものかを調べる手はじめとして、各腫瘍の細胞質内のアンドロゲンレセプターを定量してみた。雄マウスに移植してある場合は腫瘍を摘出する48時間前にマウスを去勢した。Fig. 27はリガンドとして ^3H -R1881を用いた時のSchatchardプロットであるが、アンドロゲン非依存性のCS-2のサイトゾルの中にも他の2種の腫瘍と同じようにアンドロゲンレセプターがあることがわかる。このSchatchardプロットから計算によりレセプターの解離定数(Kd)及び最大結合部位数を出してみるとTable 2. のようになった。しかしKd, 及び最大結合部位数とも3種の腫瘍の増殖速度に対するアンドロゲン依存性の差を説明するほどの差は見られない。

第3節 核内におけるアンドロゲンレセプター複合体の挙動

前節の実験から、SC115, CS-1, CS-2, の増殖に対するアンドロゲン依存性の差が細胞質におけるアンドロゲンレセプターの相違によるものとは考えにくいので、次にこれらの核内移行と核内分布又遺伝子に対する作用の差について検討することにした。

一般にステロイドレセプター複合体は、特定の遺伝子に働いた後1~2時間後には再び細胞質へもどることが知られている(これを *replenishment* と呼ぶ)。そこで、細胞質のアンドロゲンレセプター複合体の核内への移行と *replenishment* を3種の腫瘍の間でどのような差があるかについて詳しく調べられたが(Fuse et al, 1983), ここでも殆ど、差は見られなかった。そこで核内におけるアンドロゲンレセプター複合体の分布、及びRNA合成に対する作用に差があるのではないかと考えられ、まず、核マトリックスへの

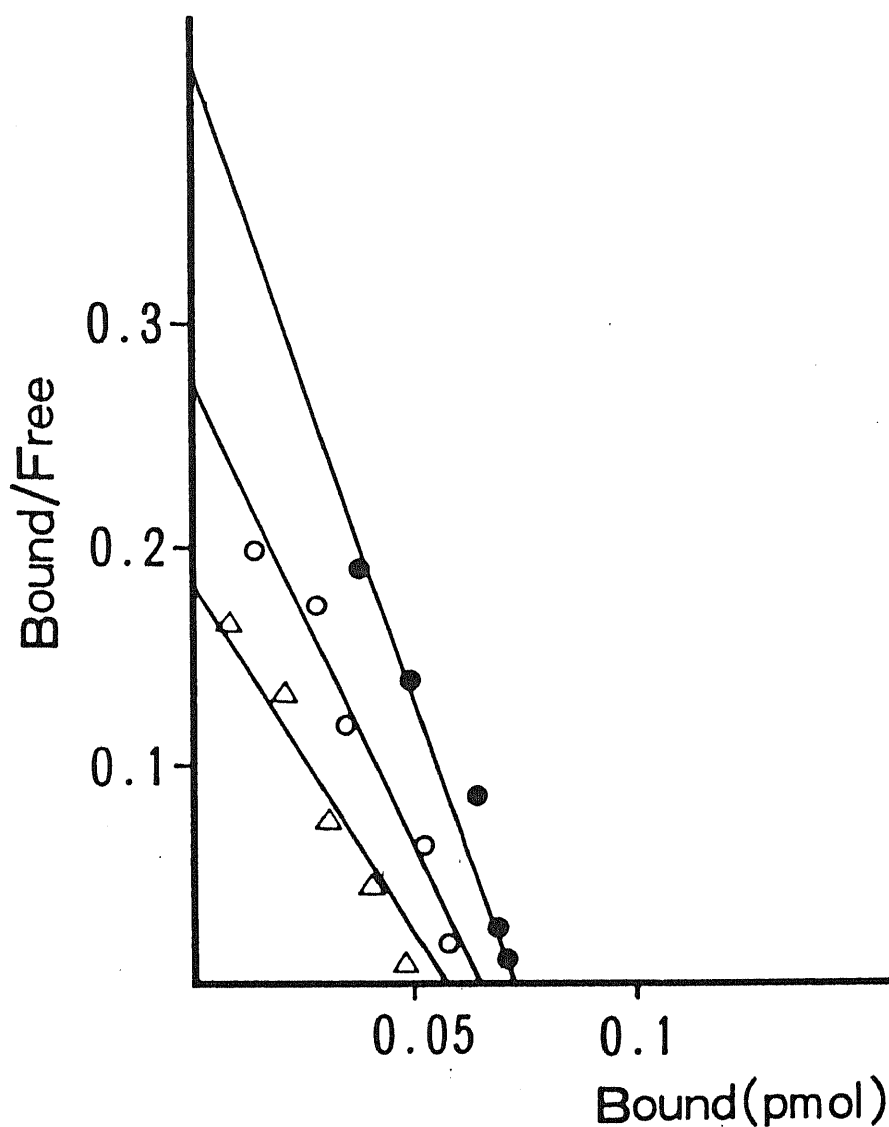


Fig. 27 Scatchard plot of binding to ^3H -R 1881 of cytosols from SC115, CS-1 and CS-2. Cytosols of SC115 ($\bullet$), CS-1 ($\circ$) and CS-2 (Δ) were incubated with various concentration of ^3H -R 1881 at 4°C for 16 hr.

Table 2. Binding of cytosols from SC-115, CS-1 and CS-2 to ^3H -R 1881

	Kd (10 nM)	Maximum binding site (f mol/mg protein)
SC 115	0.36 ± 0.06	17 ± 2
CS-1	0.43 ± 0.11	11 ± 2
CS-2	0.49 ± 0.15	9 ± 1

Data are shown as Mean+S.E.

Table 3. Binding of Nuclear Matrix from SC115, CS-1 and CS-2 to ^3H -DHT

	Kd (nM)	Maximum binding sites (fmol/100 μg DNA equi.)
SC115	4.02	21.2
CS-1	4.69	12.9
CS-2	6.56	20.7

アンドロゲンレセプター複合体の結合を調べてみた。核マトリックスについて調べたわけは、前立腺の場合、核内に移行したアンドロゲンレセプターの50~70%が、核マトリックスに結合していること (Barrack, 1983; Barrack and Coffey, 1980; 1982), またヒト前立腺では癌化により (Barrack et al, 1983), イヌ前立腺では肥大により (Meikle et al, 1982), 核マトリックスへのアンドロゲンレセプター複合体の結合の分布が異なってくることなどの報告があるからである。そこで3種の腫瘍の核マトリックスを単離し、これに結合しているレセプターを exchange 反応法で定量することを試みた。

[方法]

(1) 核マトリックスの調製法

壊死部分を取り除いた組織をハサミで細片にした後, Coffey 等の方法 (Coffey et al, 1980) に準じて核マトリックスを調製した。操作はすべて $0^{\circ}\sim 4^{\circ}\text{C}$ で行なう。組織はまず, 10倍量の 0.25M sucrose - 1mM MgCl_2 - 1mM PMSF - 50mM Tris-HCl (pH 7.4) (以下 buf. A と略す) でホモジナイズ後, 2000rpm ($700\times g$) で遠心して核を落とし, 10倍量の buf. A で核の沈澱を洗った後, buf. B (buf. A の 0.25M sucrose を 2.2M にしたもの) でホモジナイズ後, 22000rpm で60分遠心して核の沈澱を得る。この時, buf. B を 5ml , ベッドとして遠心チューブの下層にしいておく。核は 0.1% Triton X-100 を含んだ buf. A にサスペンド後, 10分間放置後, 3000rpm で10分間遠心し, 沈澱を今度は組織の湿重量と同量の 10mM Tris-HCl (pH 7.4) - 5mM MgCl_2 - 1mM PMSF でサスペンド後, そのサスペンションよりピペットで $50\mu\text{l}$ 取り (DNA 定量用画分) 残りのサスペンションに DNase I (1000ug/ml) を最終濃度 $15\mu\text{l/ml}$ となるように加え, 4°C 30分インキュベートする。 3000rpm 10分間遠心後, その沈澱に 30ml の 10mM Tris-HCl (pH 7.4) - 0.2mM MgCl_2 - 1mM PMSF (以下 buf. C と名づける) を加え, 15分間インキュベート後, 3000rpm での遠心後, 2M の

NaCl を含んだ buf. C で 30 分間の抽出を 2 回行い, 2M の NaCl で抽出されない残渣を得る。この残渣が核マトリックスであるが, これを更に 10mM Tris-HCl (pH 7.4) - 1.5mM EDTA (以下 buf. D と略す) で洗浄した後, 再び buf. D でサスペンドして, これを核マトリックスサスペンションとする。

(2) ^3H -DHT exchange 反応

このように調製した核マトリックスサスペンションは単離核の時点での DNA 量が $600\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように調製後, 0.5ml の buf. D 中で ^3H -DHT (比活性 $110\text{ ci}/\text{mmol}$, $208\text{ ci}/\text{mmol}$) $0.25\text{ nM} \sim 10\text{ mM}$ 存在下で 16~20 時間, インキュベートする。又, 非特異的な ^3H -DHT の結合を測定するために 100 倍量の非放射性 DHT を加えて, 同時にインキュベートを行う。exchange 反応終了後, 核マトリックスを buf. D で 3 回洗い, 最後にエタノールを 1ml 加えて 2 時間, 37°C でインキュベートして ^3H -DHT を溶出させ, トルエン系シンチレーター 6ml を加えて ^3H のカウントを測定した。特異的な ^3H -DHT の結合は 100 倍量の非放射性 DHT を含まないチューブのカウントから 100 倍量の非放射性の DHT を入れたチューブのカウントを差し引いた値とし, 核を単離した時点の DNA に相当する $100\mu\text{g}$ DNA あたりの DHT の結合を $f\text{ mol}$ として表わした。

[結果] SC115, CS-1, CS-2 の腫瘍組織より核マトリックスを調製し, そのマトリックスに結合しているアンドロゲンレセプター複合体を ^3H -DHT を用いた exchange 反応により定量した結果を Table 3 に示す。これは単離核の DNA $100\mu\text{g}$ 当りに換算した値で示してあるが, 最大結合部位数は 3 者の間に大きな差は見られなかった。また K_d も 4.0 nM と 6.6 nM の間にあり, あまり差がなかった。

[考察]

3 種の腫瘍の核内のアンドロゲンレセプター複合体の分布を調べるために, 核マトリックスへの結合を調べてみたが, 3 種の腫瘍のアンドロゲン依存性を示すのに有利なデータは得られなかった。

ラット前立腺では (Barrack and Coffey, 1980) 核マトリックス

の最大結合部位数は $97 \text{ fmol}/100 \mu\text{g DNA equiv.}$ で、この値に比べると、シオノギ乳癌 SC115 の $20 \text{ fmol}/100 \mu\text{g DNA equiv.}$ という値は約 $1/5$ であり、そのため3者間に差がはきり出て来なかったのかも知れない。しかし、アンドロゲンに全く非依存性の CS-2 において細胞質、及び核マトリックスにアンドロゲンレセプターが他のアンドロゲン依存性の腫瘍と同じレベルで存在していることは明らかであり、従来 くなされているように、レセプター複合体のクロマチン上のアクセプター部位への結合数、あるいは親和力の強さからのみ、ステロイドホルモンの生理的強さを論ずることは不適切であることがわかった。

第4節 単離核の RNA polymerase I, II の活性に及ぼすアンドロゲンの効果

以上の事実より、増殖に対するアンドロゲン依存性の異なっているシオノギ乳癌 SC115, CS-1, CS-2 では3者ともアンドロゲンレセプターをもち、アンドロゲンに対する解離定数、及び最大結合部位数において、細胞質レセプター、及び核マトリックスに結合したレセプターには、3者間で差がみられないこと、更には、これらのステロイドレセプター複合体の細胞質からの depletion、及び replenishment も3者同様な挙動を示していることがわかった。で、アンドロゲン依存性の異なるこれら3種の腫瘍間のアンドロゲン依存性の差は腫瘍細胞の核内におけるレセプター複合体の DNA やクロマチンに対する相互作用（単なる結合だけではない）に何らかの差があるためと考えられる。そこで、遺伝情報発現の第一段階と考えられる RNA 合成に対するアンドロゲン依存性について調べることにした。

【方法】 SC115, CS-1, CS-2 のマウスへの移植、及び in vivo での処理は第2節と同じである。又核の単離法は第2章第2節で前立腺に用いた方法と同じ単離方法を用いた。単離核における RNA

Polymerase I, II の活性測定も第2章第 節の方法を用いた。ただし RNA polymerase II の活性を測定する場合は 4mM の Mg^{2+} の代わりに 1mM の Mn^{2+} に置き換え RNA polymerase I, II の活性を同時に測定した。

[結果]

各腫瘍の RNA 合成能は、組織から核を単離し、単離核内の RNA polymerase 活性を指標とした。

まず第1に SC115 担癌マウスを去勢した後、種々の量のテストステロンを腹腔内に投与し、RNA polymerase I 及び II の活性変化を調べた (Fig. 28)。去勢は SC115 を移植後 16 日目に行い、19 日目にテストステロンを図中に示したように $10 \sim 800 \text{mg}$ / マウスに投与後、腫瘍を摘出して核を単離した。この図からわかるようにテストステロン投与後 24 時間後の RNA polymerase 活性は、全活性、polymerase I, polymerase II とも、テストステロン量が増えると増加するが polymerase I で 0.2mg / マウス、polymerase II で 0.1mg / マウスの投与量あたりからその活性はプラトーに達する。そこで以後、テストステロンを投与する時は 0.2mg / マウスの量を与えることにした。

この条件でまず、その増殖がアンドロゲン依存性である SC115、及び CS-1 について単離核における RNA polymerase I 及び II の活性を調べてみたところ、それらの酵素活性は去勢やテストステロン投与により著しく変化することがわかった (Fig. 29)。SC115 の RNA polymerase I の活性は去勢により正常群の約 60% に減少し、テストステロン投与により 12 時間で正常群のレベルにまで回復し、24 時間でピークをむかえる。CS-1 の RNA polymerase I の活性は SC115 の場合と同じように変化するが、しかし、その変化の度合は去勢によっても、あるいはテストステロン投与によっても、SC115 の場合より小さかった。又増殖においてアンドロゲン非依存性の CS-2 の RNA polymerase I の活性はほとんど変化しなかった (Fig. 30)。

一方、RNA polymerase II の活性も調べたところ SC115, CS-1,

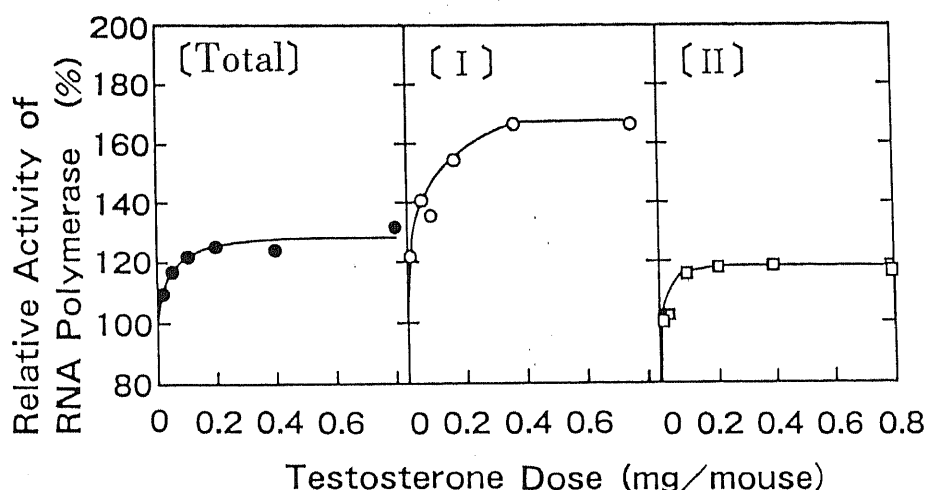


Fig. 28 Relationship between RNA polymerase activities in isolated nuclei of SC 115 tissues and testosterone dose injected into tumor-bearing castrated mice. Mice bearing SC 115 were castrated on the 16th day after tumor transplantation and were sacrificed on the 20th day. Various amounts of testosterone propionate were injected 24 hr before sacrifice. The total RNA polymerase activity, RNA polymerase I and RNA polymerase II activities in isolated nuclei were measured as described in Materials and Methods, and denoted as "Total", "I" and "II" in the figure. Each point shows the mean obtained from 2-3 experiments performed independently, which used 5-7 mice in each determination. Data are calculated with the values of castrated non-androgenized mice being 100 %. The absolute values for these mice (p mol UMP incorporated /10 min/ 100 μ g DNA) were 69.2, 21.9, 47.4 for "Total", "I" and "II", respectively.

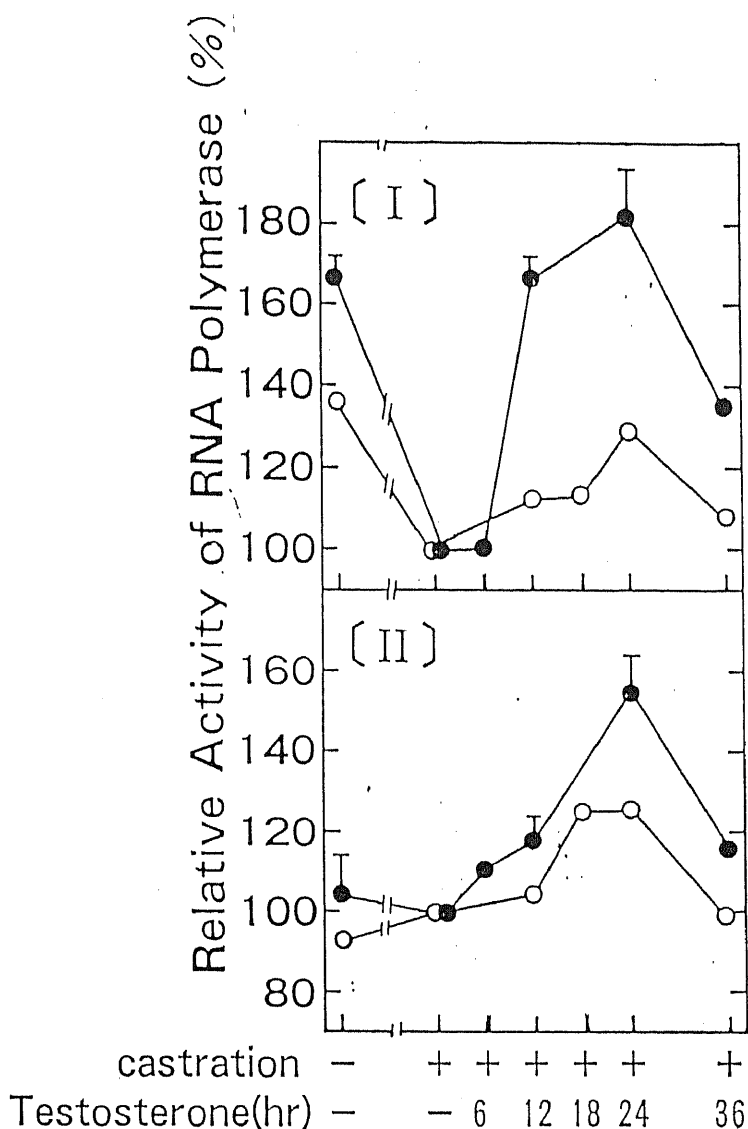


Fig. 29 Effect of castration and testosterone treatment on RNA polymerase activities in isolated nuclei of SC115, and CS-1. Animals used in these determinations were the same as shown in Fig. 26. Values are depicted as $M \pm S.E.$ of three or more experiments or the means of two experiments. Closed circles and open circles refer to values of SC115 and CS-1, respectively. Data are calculated with the values of castrated non-androgenized mice (untreated control) being 100 %.

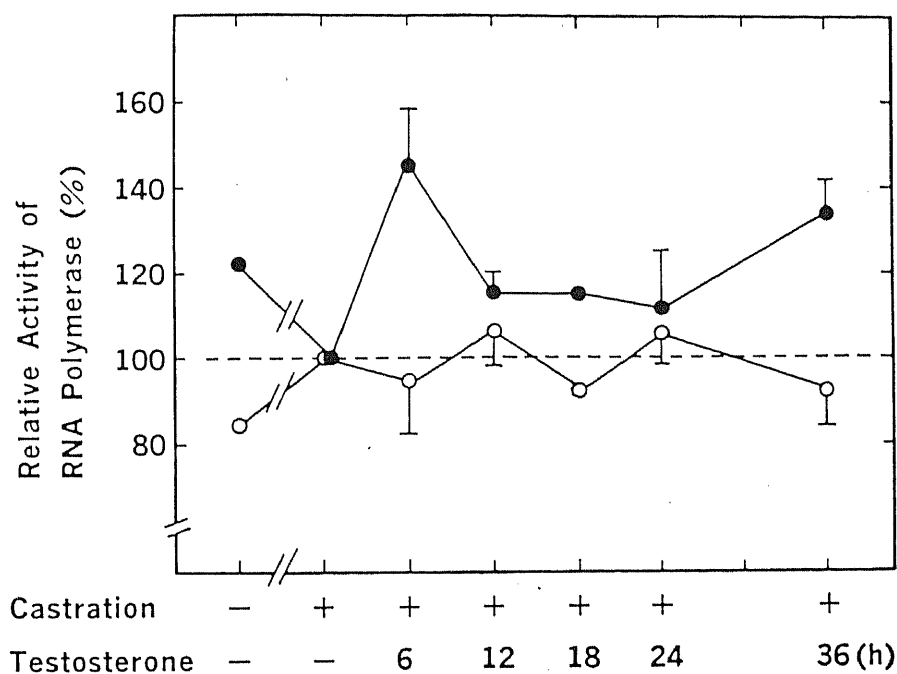


Fig. 30 Effect of castration and testosterone treatment on RNA polymerase I and II activities in isolated nuclei of CS-2. Mice-bearing CS-2 were castrated and treated with 0.2 mg of testosterone and, at the time indicated, RNA polymerase I (o) and II (●) activities in isolated nuclei were assayed. Data were calculated with the values of non-androgenized mice (untreated control) being 100 %. The absolute values of these mice (p mol UMP incorporated /10 min/100 μ g DNA) were 11.3 and 16.3 for RNA polymerase I and II, respectively. Each point is the average of two experiments ($M \pm SE$) or the average of two experiments (5-7 animals for each experiments).

CS-2 とも去勢により RNA polymerase II の活性減少は示さず、テストステロン投与により、SC115、及び CS-1 では 24 時間をピークにそれぞれ、50%、20%、の活性増加を示し、CS-2 でも 6 時間をピークに 40% の活性増加をみせていた (Fig. 29, Fig. 30)。

〔考察〕

以上の結果のうち、テストステロン投与 24 時間の活性を Table 4 にまとめてみた。3 種の腫瘍の増殖に対するアンドロゲン依存性とそれぞれの RNA polymerase I 活性に対するアンドロゲン依存性の差がよく対応していることが明らかになった。

RNA polymerase II の場合は、去勢によって変化せず、アンドロゲン投与後 24 時間では SC115 は 60%、CS-1 は 20% 上昇して、去勢よりもはるかに上のレベルに達しているが、CS-2 では却って去勢により減少、アンドロゲンによって 6 時間後に 50% 上昇する。このようにかなり不規則な変化を示すので、増殖に対するアンドロゲン依存性の差と明白な対応をみることは困難である。

第 5 節 総括

アンドロゲン依存性の变化したサブラインは我々のグループだけでなく、多くの研究室で得られているが、中でも Bruchovsky らは (1975)、これらの株の細胞質のアンドロゲンレセプターを比較し細胞質中のアンドロゲンレセプターの量の変化が腫瘍のアンドロゲン依存性のマーカーになり得ないことを報告している。最近、この点に関して Seike らは (1983)、彼らの得たアンドロゲン非依存性株はオリジナルな SC115 に比べてアンドロゲンレセプター複合体の核への結合時間が短いことから、これらの腫瘍のアンドロゲン依存性の差の原因は、アンドロゲンレセプター複合体の核内での retention time の差であると主張している。しかし筆者が本章で使用した SC115 と 2 種のサブラインは、細胞質中のアンドロゲンレセプターの質や量には大きな差がなく、更にはアンドロゲンレセプ

Table 4. Comparison of the stimulation by androgen for RNA polymerase activities in isolated nuclei of CS-2 with those of SC115 and CS-1.

Cell line		Relative RNA polymerase activity (%)		
		CS 2	CS 1	SC 115
RNA polymerase I	Castrated control	100	100	100
	24 h after testosterone injection	106±7	140 (2)	182±33 (3)
		p<0.01		
RNA polymerase II	Castrated control	100	100	100
	24 h after testosterone injection	111±14 (3)	109 (2)	155±24 (3)
		p<0.05		

a. Stands for "not significant".

b. The number of experiments.

ター複合体の depletion, replanishment の差, 即ち, アンドロゲンレセプター複合体の核への retention time にもほとんど差がない。又, アンドロゲン依存性の異なる3種の腫瘍の研究から得られた結果によると, アンドロゲン依存性の原因を単にステロイドレセプター複合体の結合量, 及び結合時間だけで評価することは出来ないように思われ, ステロイドレセプター複合体の核内分布や, フロマチン, あるいはDNA上の特異的なアクセプター部位の結合など, より詳細な検討が必要だと思われる。

最近, このアンドロゲンレセプター複合体の核内での結合に関して核マトリックスへの結合性がよく調べられている (Buttayan et al, 1983; Barrack and Coffey, 1980)。この核マトリックスはDNA合成 (Robinson et al, 1982; Small et al, 1982; Valenzuela et al, 1983), RNA合成 (Jackson et al, 1981; Mariman et al, 1982; Ciejeik et al, 1982; Ross et al, 1982) に関与している可能性が示唆されており, イヌの前立腺肥大 (Meikle et al, 1982) や, ヒト前立腺癌 (Barrack et al, 1983) などの増殖性の細胞でも, アンドロゲンレセプター複合体の結合性が異なっていることが明らかにされている。そのため筆者らも3種のシオノギ癌のアンドロゲン依存性の差をこの核マトリックスへの結合性の差に帰因できるかどうか調べてみたが, 肯定的な結果は得られなかった。

そこで次に, ステロイドホルモンの遺伝情報発現の最初のステップであるRNA合成, 特にRNA Polymeraseの活性変化に着目した。特に第2章で述べたように, アンドロゲン依存性組織ではrRNA合成の一部がアンドロゲンにより制御されており, この点に差のある可能性があるからである。

本章での実験結果はSC115, CS-1, CS-2で去勢及びテストステロン投与により, 核内のRNA Polymerase活性がどのように変化したかを示しているが, 特にRNA Polymerase Iの活性の変動に興味ある結果が得られた。即ち担癌マウスを去勢すると, RNA

polymerase I の活性の減少がおきるが、アンドロゲン依存性の最も高い SC115 で、その活性減少が最も大きく、ついで CS-1 であり、アンドロゲン非依存性の CS-2 においては RNA polymerase I の活性は去勢により全く変化しなかった。またテストステロン投与によっても、酵素活性のアンドロゲン依存性は同様の傾向を示し、SC115、CS-1 で去勢による活性減少はよく回復していたが、CS-2 ではやはり変化はなかった。

SC115 の培養細胞において、アンドロゲンを加えると細胞の増殖速度の増加と rRNA の蓄積が平行するという報告 (Jagus, 1979) があるが、これは今回の結果と一致しており、今回用いた 3 種のシオノギ癌の増殖に対するアンドロゲン依存性の差は RNA Polymerase I のアンドロゲン依存性に帰因されるものと思われる。

第5章

まとめ

ステロイドホルモンの Primary action は、レセプター蛋白質と複合体を作って、遺伝子またはその近傍の蛋白質と結合することによって、その発現を制御することにあるとみられている。従って、一般に mRNA 合成に注目されているけれども、アンドロゲンの場合は rRNA 合成の促進の方が顕著であり、この点に関して多くの研究がなされている。しかし、その作用機構についてはまだ不明な点が多い。この rRNA 合成促進作用は細胞増殖、または癌化においてもその前提をなすものであって、詳しく研究する必要がある。

アンドロゲンの標的器官として最もよく用いられるものに前立腺があるが、マウス乳癌由来の SC115 とそのサブライン (CS-1 と CS-2) は、増殖に対するアンドロゲン依存性の獲得とその消失の問題を研究する糸として有益なものと考えられたので、これについて研究を行った。細胞質におけるレセプター蛋白質の動態、核マトリックスへの結合、RNA polymerase I, II の活性などを調べた結果、増殖に対するアンドロゲン依存性は RNA polymerase I の活性の変化にもっともよく反映されていることがわかった。そこで RNA polymerase I の活性に対する作用が、アンドロゲンレセプター複合体が核内に入った後、どのような process を経て、引き起こされるかというところに焦点をおくべきであることが再確認された。(又、この糸が今後、アンドロゲン依存癌のホルモン療法とその再燃の問題のモデル糸として非常に有効な糸であることも明らかになった。)

そこで次に、このアンドロゲンの rRNA 合成制御の機構に立ち入るために前立腺を用いた2つの糸を作り、研究を行った。

その一つは、前立腺単離核の糸を用いるもので、種々の条件下のラットから取り出した核の RNA polymerase I の "engaged" form

と "free" form の活性を測定した。第2章で述べたように、この実験の結果から、rRNA合成にはアンドロゲンに依存する部分と依存しない部分があること、アンドロゲンに依存する部分は cycloheximide に sensitive で short-lived protein が関与していることが示された。又去勢すると "free" form でも, "engaged" form でもない第3の form ("dormant" form) が生じ、アンドロゲンによりこれが "engaged" form に変換する過程で上の short-lived protein が関与している可能性が大きい。

第二の方法は、更に糸を単純化するために核小体を単離し、この中の蛋白に対する磷酸化を調べるものである。これは RNA polymerase I それ自身、あるいは又、核小体の非ヒストン蛋白が、磷酸化されることにより、rRNA合成が促進される可能性があったからである。結果は第3章で述べたように、RNA polymerase I のサブユニットのアンドロゲンに依存した磷酸化は見られなかったが、今回始めて、核小体内にアンドロゲンに依存した4つの非ヒストン蛋白の磷酸化が見出された。中でも特に顕著に磷酸化される分子量 100 K の非ヒストン蛋白が見出された。これは rRNA合成の制御に関与していると考えられている肝の C₂₃とその性質がよく似ているため、ラット前立腺でも、この分子量 100 K の磷酸化蛋白がアンドロゲンに依存した rRNA合成促進に関係している可能性が示唆された。

以上、ラット前立腺とマウス乳癌 SC115 とそのサブラインを用いた研究により、rRNA合成に対するアンドロゲンの制御作用についてのいくつかの新知見が得られ、またこの制御作用についての研究すべき焦点が明らかになった。これらは今後のこの方面の研究の発展の基礎としての役割を果たすものと考えられる。

謝辞

終りに臨み、本研究の機会をお与えくださり、終始御懇切な御指導、御鞭撻をいただき、さらに本論文の御校閲を賜りました恩師千葉大学薬学部細谷東一郎教授に衷心より感謝の意を表します。

またシオノギ乳癌の研究においては、終始温かい御指導と御助言をいただきました千葉大学医学部の島崎淳教授、脇坂正美博士、宮内大成博士に謹しんで厚く御礼申し上げます。

さらに終始御鞭撻を賜りました東京大学医学部村松正実教授、五十嵐徹也博士に厚く御礼申し上げます。

又本研究遂行にあたり、御助言をいただきました千葉大学薬学部五十嵐一衛助教授に深く感謝致します。

また本研究に協力して下さった、菅谷一恵、蓮沼園恵、前島直美、小野美千代、山口順子、浦田昌宏、桜田純次、松井英則、矢沢秀典、西岡佐知子、諸氏の方々に厚く御礼申し上げます。

ABBREVIATIONS

APS	Ammonium Persulfate
ATP	Adenosine-5'-triphosphate
BIS	N,N-Methylene-bis(acrylamide)
CTP	Cytidine-5'-triphosphate
cAMP	Adenosine-3',5'-cyclic Monophosphate
cGMP	Guanosine-3',5'-cyclic Monophosphate
DNase I	Deoxyribonuclease I
DHT	Dihydrotestosterone
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Disodium Ethylenediaminetetraacetate
GTP	Guanosine-5'-triphosphate
MEM	Minimum Essential Medium
PCA	Perchloric Acid
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluoride
Poly d(A-T)	deoxyriboadenylate-deoxyribothymidylate heteropolymer
R-1881	Methyltrienolone
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TCA	Trichloroacetic Acid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine
Tris	tris-(Hydroxymethyl)aminomethane
UTP	Uridine-5'-triphosphate

REFERENCES

- Ahmed, K. and Ishida, H. (1971) *Mol. Pharmacol.* 7, 323-327
- Ahmed, K. and Wilson, M. J. (1978) *The Cell Nucleus*
vol 6 409-459
- Ahmed, K. and Wilson, M. J. (1975) *J. Biol. Chem.* 250
2370-2375
- Ando, T. (1979) Master's Thesis (in Japanese), University
of Chiba, Chiba, Japan.
- Atmar, V., Daniels, G. R. and Kuehn, G. D. (1978) *Eur. J.*
Biochem. 90, 29-37
- Ballal, N. R., Kang, Y.-J., Olson, M. O. J. and Busch, H. (1975)
J. Biol. Chem. 250, 5921-5925
- Barrack, E. R. and Coffey, D. S. (1980) *J. Biol. Chem.* 255,
7265-7275
- Barrack, E. R. and Coffey, D. S. (1982) *Recent Prog. Horm.*
Res. 38 133-195
- Barrack, E. R., Bujnovszky, P. and Walsh, P. C. (1983) *Cancer*
Res. 43, 1107-1116
- Barrack, E. R. *Endocrinology* (1983) 113 430-432
- Benecke, B. J., Terencz, A. and Seifart, K. H. (1973) *FEBS*
Lett. 31, 53-58
- Berezney, R. and Coffey D. S. (1974) *Biochem. Biophys. Res.*
Commun. 60, 1410-1417
- Berezney, R. and Coffey D. S. (1977) *J. Cell Biol.* 73,
616-636
- Bernal, J., Coleoni, A. H., Degroot, L. J. (1978)
Endocrinology 102 452-459
- Bottoms, G. D. and Jungmann, R. A. (1973) *Proc. Soc. Exp.*
Biol. Med. 144, 83-88

- Bouton, M.M., Caurvalin, J.C. and Boulieu, E.E. (1977)
J. Biol. Chem. 252, 4607-4612
- Breant, B., Buhler, J.-M., Sentenac, A. and Fromagetot, P.
(1983) Eur. J. Biochem. 130 247-251
- Bruchovsky, N. and Rennie, P.S. (1978) Cell 13, 273-280
- Bruchovsky, n., Sutherland, D.J.A., Meakin, J.W. and
Minesita, T (1975) Biochim. Biophys. Acta. 381, 61-71
- Buhler, J.-M., Iborra F., Sentenac, A. and Fromageot, P.
(1976) Febs Lett. 71 37-41
- Burton, K (1956) Biochem. J. 62, 315-323
- Buttayan, R., Olsson, C.A. and Kallos, J. (1983) J. Biol. Chem.
258, 14336-14370
- Caizergues.-Ferrer, M., Bouche, G. Amalric, F., Zalta, J.-P.
(1980) Eur. J. Biochem. 108 399-404
- Chambon, P., Ramuz, M., Mandel, P. and Doly, J. (1968) Biochim.
Biophys. Acta. 157, 504-519
- Chandler, V.L., Maler, B.A. and Yamamoto, K.R. (1983) Cell 33,
489-499
- Chen, C.-L. and Feigelson, P. (1979) Proc. Natl. Sci. USA. 76,
2669-2673
- Chesterton, C.J. and Butterworth, P.H.W. (1971) Eur. J. Biochem.
19, 234-237
- Cho-Chung, Y.S., Redler, B.H. (1979) Science 197, 272-275
- Chuang, D.M. Hollenbeck, R. and Costa, E. (1976) Science
193, 60-62
- Ciejek, E.M., Nordstrom, J.L., Tsai, M.-J. and O'Malley, B.W.
(1982) Biochemistry 21, 4945-4953
- Cohen, M.E., Kleinsmith, L.J. (1976) Biochim. Biophys.
Acta. 435 159-166
- Dahmus, M.E. (1981) J. Biol. Chem. 256, 3332-3339

- Dahmus, M.E. (1981) J.Biol.Chem. 256, 3319-3325
- Dahmus, M.E. (1976) Biochemistry 15, 1821-1876
- Daniels, G.R., Atmar, V.J. and Kuehn, G.D. (1981) Biochemistry 20, 2525-2532
- Davis, P. and Griffiths, K. (1974) Biochem.J. 140, 565-567
- Delap, P. and Feigelson, P. (1978) Biochem.Biophys.Res.Comm. 82, 142-149
- Dische, Z. (1930) Microchemie 8, 4-32
- Duceman, B.W., Rose, K.M. and Jacob, S.T. (1981) J.Biol. Chem. 256, 10755-10758
- Frey, A. and Seifart, K.H. (1982) Mol.Cell.Endocrinol. 28, 161-172
- Fuse, H., Akimoto, S., Sato, R., Miyauchi, T., Wakisaka, M., Hosoya, T. and Shimazaki, J. (1983) Endocrinol. Japon. 30, 189-197
- Garvey, J.S., Cremer, N.E. and Sussdorf, D.H. (1977) Methods in immunology, Third Ed. pp.379-410, W.A.Benjamin Inc, London
- Goldberg, M.I., Periard, J.-C. and Rutter, W.J. (1977) Biochemistry 16, 1655-1664
- Goueli, S.A., Steer, R.C., Wilson, M.J. and Ahmed, K. (1980) Eur.J.Biochem. 113, 45-51
- Grummt, I. and Grummt, F. (1976) Cell 7, 447-453
- Hentshel, C.C. and Tata, J.R. (1977) Dev.Biol. 57, 293-304
- Higashinakagawa, T., Muramatsu, M. and Sugano, H. (1972) Exp.Cell Res. 71, 65-74
- Hirsch, J. (1974) Biochem.Biophys.Res.Comm. 58, 1008-1015
- Hirsch, J. and Martelo, O.J. (1976) J.Biol.Chem. 251, 5408-5413

- Hodge, L.D., Mancini, P., Davis, F.M. and Heywood, P. (1977)
72, 194-208
- Hosoya, T., Nagai, Y., Inagaki, T. and Hayashi, M. (1978)
J. Biochem. (Tokyo) 84, 1519-1528
- Hulbert, B., Miller, E.G. and Vaughan, C.L. (1969) Adv. Enz.
Reg. 7, 219-233
- Hynes, N., Ooyen, A.J.J., Kennedy, N., Herrlich, P., Panya, H. and
Groner, B. (1983) Proc. Natl. Sci. USA 80, 3637-3641
- Igarashi, T., Okazaki, T. and Ogata, E. (1983) Hormone to
Rinsho (in Japanese) 17-22
- Jackson, D.A., McCready, S.J. and Cook, P.R. (1981) Nature
292, 552-555
- Jacob, S.T., Duceman, B.W., Rose, K.M. (1981) Medical Biol.
59, 381-388
- Jänne, O., Bullock, L.P., Bardin, C.W. and Jacob, S.T. (1976)
Biochim. Biophys. Acta. 418, 330-340
- JanKowski, J.M. and Kleczkowski, K. (1980) Biochem. Biophys.
Res. Commun. 96, 1216-1224
- Jensen, E.V. and Jacobson, H.I. (1960), In, "Biological
Activities of Steroids in Relation to Cancer, Ed. Pincuss,
G., and Vollmer, E.P., p.161 Academic Press, N.Y.
- Johnson, E.M. and Allfrey, V.G. (1972) Arch. Biochem.
Biophys. 152 786-794
- Johnson, E.M. and Hadden, J.W. (1975) Science 187 1198-
1200
- Kadohama, N. and Anderson, K.M. (1977) Can. J. Biochem.
55 513-520
- Kang, Y.-J., Olson, M.O.J., Jones, C. and Bush, H. (1975)
Cancer. Res. 35, 1470-1475
- Kanungo, M.S. and Thakur M.K. (1979) Biochem. Biophys.

- Res. Commun. 86, 14-19
- Katzenellenbogen, B.S. and Williams, L.B. (1974) Proc. Natl. Sci. USA. 71, 1281-1285
- Kaufmann, S.H., Coffey, D.S. and Shaper, J.H. (1981) Exp. Cell Res. 132, 105-123
- Kawashima, K. and Izawa, M. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 74, 265-272
- Kawashima, K. and Izawa, M. (1976) Mol. Biol. Reports. 3, 113-119
- Kellas, B.L., Austoker, J.L., Beebe, J.C. and Butterworth, P.H.W. (1977) Eur. J. Biochem. 72, 583-594
- King, R.J.B. and Mainwaring, W.I.P. Steroid-Cell Interactions. London, Butterworth.
- Kleinsmith, L.J. and Allfrey, V.G. (1969) Biochim. Biophys. Acta. 175, 123-135
- Kleinsmith, L.J. (1978) The Cell Nucleus. vol 6 221-261 by Academic press Inc.
- Konstantinova, I.M., Hanocq, F., Vorob'v, V.I. (1980) FEBBS. Let. 121, 299-302
- Kranias, E.G. and Jungmann, R.A. (1978) Biochim. Biophys. Acta. 517, 439-446
- Kuehn, G.D., Affortter, H.-U., Atmar, V.J., Seebeck, T., Gubler, U. and Braun, R. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76, 2541-2545
- Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680
- Lefebvre, Y.A., Caskey, J.J. and Kline, L.D. (1982) J. Steroid Biochem. 609-614
- Liao, S., Barton, R.W. and Linn, A.H. (1966) Proc. Natl. Sci. USA. 55, 1593-1600
- Liao, S. and Linn, A.H. (1967) Proc. Natl. Sci. USA. 57, 379-386
- Liew, C.C., Suria, D. and Gornall, A.G. (1973) endocrinology

93. 1025-1034

Lindell, T.J., O'Malley, A.F.O. and Peglisi, B. (1978)

Biochemistry 17, 1154-1159

Linalak-Kankkunen, A., Moenpää, P.H. (1979) Biochim. Biophys. Acta
587, 324-332

Liu, A.L.-C., Walter, U., Greengard, P. (1981) Eur. J. Biochem.
114, 539-548

McKnight, G.S. (1978) Cell 14, 403-413

Mainwaring, W.I.P., Mangan, F.R., Wilce, P.A. and Milroy, E.G.P.

(1975) Current Research on the Action of Androgenic Steroids
197-231

Mainwaring, W.I.P., Mangan, F.R. and Peterken, B.M. (1971) Biochem.
J. 123, 619

Mariman, E.C.M., Van Eekelen, C.A.G., Reinders, R.J., Berns,
A.J.M. and Venrooij, W.J. (1982) J. Mol. Biol. 154, 103-119.

Martelo, O.J., Hirsch, J. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun.
58 1008-1015

Matsui, M. (1984) Master's Thesis (in Japanese), University
of Chiba, Chiba, Japan.

Matsumoto, K., Sato, B. and Kitamura, Y. (1982) Hormonal
Regulation of Mammary Tumors. vol 1. Steroid
Hormones 216-244 edited by Benjamin S. Leung published
by Eden Press Inc.

Mayo, K.E. and Palmiter, R.D. (1982) J. Biol. Chem. 257,
3061-3067

Mayol, R.F. and Thayer, S.A. (1970) Biochemistry 9, 2484-
2489

Meikle, A.W., Stringham, J.s., Wood, J.S. and Taylor, G.A.
(1982) Biochem. Biophys. Res. Commun. 108, 89-94

Michell, B. (1983) TIBS 8, 263-164

- Miltholland, R.J., Margot, M.I.P. and Resen, F. (1979)
 Biochem. Biophys. Res. Commun. 88, 993-997
- Minesita, T. and Yamaguchi, K. (1964) Steroids 4 815-830
- Minesita, T. and Yamaguchi, K. (1965) Cancer Res. 25,
 1168-1175
- Mishima, Y., Matsui, T. and Muramatsu, M. (1979) J. Biochem.
 (Tokyo) 85, 807-818
- Moss, T (1983) Nature 302, 223-228
- Muramatsu, M., Shimada, N. and Higashinakagawa, T. (1970)
 J. Mol. Biol. 53, 91-106
- Nagai, Y., Inagaki, T., and Hosoya, T. (1975) Seikagaku
 (in Japanese) 47, 446
- Nicolette, J.A. and Babler, M. (1974) Arch. Biochem. Biophys.
 163, 263-270
- Noniteds, A. and Gorski, J. (1966) Proc. Natl. Sci. USA. 56,
 230-235
- Novello, F. and Stirpe, F. (1969) Biochem. J. 112, 721-727
- O'Farrel, P.H. and Goodman, H.M. (1977) Cell 12, 1133-1142
- O'Farrel, P.H. (1975) J. Biol. Chem. 250, 4007-4021
- Olson, M.O.J., Orrick, L.R., Jones, C. and Bush, H. (1974)
 J. Biol. Chem. 249, 2823-2827
- Olson, M.O.J., Ezrailson, E.G., Guetzow, K. and Bush, H. (1975)
 J. Mol. Biol. 97, 611-619
- Olson, M.O.J., Hatchett, S., Allan, R., Howkins, T.C. and Busch, H.
 (1978) Cancer Res. 38, 3421-3426
- Olson, M.O.J. and Thompson, B.A. (1983) Biochemistry 22,
 3187-3193
- Olson, M.O.J., Rivers, Z.M., Thompson, B.A., Kao, W.-Y. and
 Case, S.T. (1983) Biochemistry 22, 3345-3351
- O'Malley, B.W., Tsai, M.-J., Tsai, S.Y. and Towle, H.C. (1978)

- Cold Spring Harbor Symp.Quont.Biol. 42, 605-615
- Onishi,T.,Matsui,T. and Muramatsu,M. (1977) J.Biochem.
(Tokyo) 82, 1109-1119
- Otsuka,K. (1979) Nihon Hinyokaishi (in Japanese) 70,
1210-1220
- Rao,S.V.V.,Mamrack,M.D.,Olson.M.O.J.(1982) J.Biol.Chem.
257, 15035-15041
- Reeder,R.H.,Roeder,R.G. (1972) J.Mol.Biol. 67, 433
- Rittshof,D. and Traugh,J.A. (1982) Eur.J.Biochem. 123,
333-336
- Robinson,G.A.,Butcher,R.W. and Sutherland (1971) Cyclic AMP
by Academic Press , N.Y.
- Roeder,R.G. and Rutter,W.J.(1970) Proc.Nat.Sci.USA. 65,
675-682
- Roeder,R.G. and Rutter,W.J. Nature (1969) 224, 18
- Rose.K.M.,Bell,L.E.,Siefken,D.A. and Jacob,S.T. (1981)
J.Biol.Chem. 256, 7468-7477
- Rose,K.M.,Stetler,D.E. and Jacob,S.T. (1981) Proc.Natl.
Acad.Sci.USA. 78, 2833-2837
- Robinson,S.I.,Nelkin,B.D. and Vogelstein,B. (1982)-Cell
28, 99-106.
- Ross,D.A.,Yen,R.-Y. and Chae,C.-B. (1982) Biochemistry
21, 764-771
- Schmid,W. and Sekris,C.E. (1973) 312, 549-554
- Seeger,J.I. and Beach,T.A. (1983) Biochem.Biophys.Rescommun.
111, 156-165
- Small,D.,Nelkin,B. and Vogelstein,B. (1982) Proc.Natl.
Acad.Sci.USA 79, 5911-5915

- Somjen,D.,Somjen,G.,King,R.J.B.,Kaye,A.M. and Lindner,H.R.
(1973) Biochem.J. 136, 25-33
- Styanoba,B.B. and Dabeva,M.D.(1980) Biochim.biophys.
Acta. 608, 358-367
- Stoyanova,B.B. and Hadjilov,A.A.(1979) Eur.J.Biochem.
96, 349-356
- Taningher,M.,Molinari,M.P.,Cesarone,C.F. (1977)
Endocrinology 101, 1221-1227
- Udvardy,A. and Seifart,K.H. (1976) Eur.J.Biochem. 62,
353-363
- Valenzuela,M.s.,Muller,G.C. and Dasgupta,S. (1983)
Nucleic.Acid.Res. 7, 2155-2164
- Van Eekelen,C.A.G.,Salden,M.H.L.,Habets,W.J.A.,Van de
Putte,L.B.L. and Van VenRooij,W.J. (1982) Exp.Cell
Res. 141, 181-190
- Viarengo,A.,Zoncheddu,A.,Taningher.M. and Orunesu,M.
(1975) Endocrinology 97, 955-961
- Yagus,R. Exp.Cell Res. (1978) 118, 115-125
- Yamamoto,K.R. and Alberts,B.M. (1976) Anu.Rev.Biochem. 45,
721
- Yamaguchi,J. (1983) Graduation Thesis (in Japanese),
University of Chiba,Chiba,Japan.
- Yates,J. and King,R.J.B. (1981) Cancer Res. 41, 258-262
- Yu,F.-L. (1974) Nature 251, 344-345
- Yu,F.-L. (1975,a) Biochim.Biophys.Acta. 395, 329-336
- Yu,F.-L. (1975,b) Biochem.Biopys.Res.Comm. 64, 1107-1115
- Wakisaka,M.,Ohwada,H.,Nozumi,K. and Shimazaki,J. (1980)
Gann 71, 1-7
- Widnell,C.C. and Tata,J.R. (1966) Biochim.Biophys.Acta.
123, 478-492

Williams-Ashman, H.G., Pegg, A.E. and Lockwood, D.H. (1969)

Adv. Enz. Regulation 7, 291-323

Wilson, M.J. and Ahmed, K. (1976) Biochem. Biophys. Acta.

429 439-447

Wilson, M.J. and Ahmed, K. (1978) Exp. Cell Res. 117 71-78

掲載雑誌目録

- 1) N.Suzuki, M.Wakisaka, T.Miyauchi, J.Shimazaki and T.Hosoya. (1983)
Endocrinol. Japon. 30,(1) 15-21 "Effect of Sex Hormones on RNA
Synthesis of Androgen-dependent Mouse Mammary tumor (Shionogi
Carcinoma)"
- 2) N.Suzuki, M.Urata, T.Miyauchi, M.Wakisaka, J.Shimazaki and T.Hosoya
(1983) Endocrinol.Japon. 30 (5), 657-661 "In Vivo Effect of
Androgen on RNA Synthesis in Nuclei from Androgen-independent
Subline of Shionogi Carcinoma (CS 2)"
- 3) N.Suzuki, T.Hosoya, T.Igarashi and M.Muramatsu J.Biochem.
in press. "Changes in Template-engaged and Free RNA Polymerase I
Activities in Isolated Nuclei from Rat Ventral Prostates after
Treatment with Testosterone and Cycloheximide"