

コロイド金標識アンドロゲンによる犬の 精巣内アンドロゲンレセプターの検索

奈良県立医科大学第2解剖学教室

奥田喜一, 橋本研二, 中山正成, 山本浩司

HISTOCHEMICAL STUDY ON ANDROGEN RECEPTOR IN CANINE TESTIS BY AN ANDROGEN LABELED WITH COLLOIDAL GOLD

YOSHIKAZU OKUDA, KENJI HASHIMOTO, MASANARI NAKAYAMA
and HIROSHI YAMAMOTO

The 2nd Department of Anatomy, Nara Medical University

Received August 29, 1989

Summary: With a colloidal gold-labeled androgen (5α -dihydrotestosterone), the androgen receptor was specifically identified in the nucleus of Sertoli cell in the canine testis by doublely stained post-embedding method in an electron microscopic study.

The binding of dihydrotestosterone to the androgen receptor was partially blocked by pre-staining with testosterone. The androgen receptor was confirmed to localize at diffused chromatin only and nucleolus, condensed chromatin, interchromatin granules, perichromatin granules and nuclear sap were scarcely stained.

Index Terms

colloidal gold labeled androgen, canine testis, androgen receptor, electron microscopic study

緒 言

精巣での精子形成にはアンドロゲンが重要な働きをしている。このアンドロゲンは精巣の間質にある Leydig 細胞が脳下垂体から分泌されるゴナドトロピン (主に LH) の指令によりコレステロールなどから合成、分泌され¹⁾、精細管内に入り精子形成に働いていると考えられている。精細管内に占める全細胞核内に存在するアンドロゲンを調べると Testosterone (63%), 5α -Dihydrotestosterone (14%), Androstanediols (23%) であり、しかも Testosterone と Dihydrotestosterone の核内での存在形態は、Testosterone は種々の核タンパク質と結合しているが、Dihydrotestosterone はゲル濾過では一本のピーク、イオン交換セルロースでは二本のピークで表されるタンパク質に結合していることが Booth (1975)²⁾, Wright et al. (1979)³⁾ らにより報告されてい

る。この Dihydrotestosterone-タンパク質複合体のゲル濾過およびイオン交換セルロースでの物理化学的性状は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おり⁴⁾、核内での遺伝子発現に関わっているホルモンは dihydrotestosterone が有力視されている。この Dihydrotestosterone のアンドロゲンレセプターへの特異的結合を利用すれば、組織内のレセプターを検出することが可能である。当該教室ではこれまでに種々の低分子リガンドにコロイド金標識してレセプターの検出を電子顕微鏡学的に検討してきた。宮高 (1983)⁵⁾ がインシュリン-BSA-Gold でインシュリンレセプターを、牧浦 (1985)⁶⁾ がトリヨードチロニン (T3)-BSA-Gold でチロキシンレセプターを、また Beppu (1989)⁷⁾ がコロイド金標識したエストロゲンやプロゲステロンでそれぞれのレセプターの細胞内局在について検討を行い、これらのコロイド金法が有用であることを示してき

た。今回、この方法を用いてコロイド金標識 dihydrotestosterone と testosterone で成犬の精細管内のアンドロゲンレセプターの細胞内の局在について、電子顕微鏡学的に検索した結果を報告する。

方法と材料

材料

精巣は当院に来院した外見的に正常と思われる雑種の成犬(雄2歳)の去勢手術により得た。Testosterone 17 β -hemisuccinate-BSA, 5 α -dihydrotestosterone 17 β -hemisuccinate-BSA は Makor Chemical Co. より購入した。LR White resin (medium grade) は London Chemical Co. より購入した。その他の試薬類は試薬特級および電子顕微鏡用試薬を使用した。

方法

(1) 精巣の固定と包埋

去勢手術により摘出した精巣を直ちに氷冷した 2.5% glutaraldehyde-0.1M リン酸緩衝液中で 1-2mm³ に細切りし、4°C で 2 時間固定した。固定後、0.25M Sucrose で一昼夜洗浄し、上昇アルコールシリーズで脱水後、Quetol 812 エポキシ樹脂および LR White に包埋し、加熱重合した。超薄切片は Nickel grid (200-300mesh) にのせ、使用時まで 4°C に保存した。

(2) コロイド金標識リガンドの作成

(a) 金コロイドの作成

17nm および 5nm コロイド金は Slot and Geuse (1985) らの方法により作製した。17nm コロイド金は 48ml の 0.01% HAuCl₄-4H₂O を 60°C に温め、1% クエン酸ナトリウム 2ml を加え、ワインレッド色になるまで加温し、さらにコロイド金を安定化させるために 5 分間煮沸した。5nm コロイド金の作製は 1% クエン酸ナトリウムを加える際に、1% タンニン酸を 0.5ml, 25mM 炭酸カリウムを 0.5ml を加えて 17nm コロイド金の場合と同様に作成した。

(b) コロイド金標識リガンドの作成

アンドロゲン結合 BSA のコロイド金標識の方法は Roth(198) らの方法で行った。0.05mg の testosterone-BSA を 0.1ml の再蒸留水に溶かし、pH 未調製の金コロイド溶液(pH5.3)10ml に加えてよく混ぜた後、0.15ml の 5% polyethylene glycol を加え、標識したコロイド金溶液を安定化させた。この液を 5% glycerin, 0.05% polyethylene glycol, 0.02% Na₂S₂O₃, 0.01% Triton X-100 (GPNT) に重層し、日立 PRS65T ローターで 17nm は 24,000rpm, 5nm は 27,000rpm で 4°C, 30 分間遠心した。得られた沈査を Slot and Geuse(1985) らの方法でコロイ

ド金粒子径を揃えた。GPNT を含む 10-30% の linear glycerin density gradient にこの沈査を重ねし、日立 RP40T ローターで 14,000rpm, 4°C, 30 分間遠心した。

当該バンドを集め、4°C に使用時まで保存した。5 α -dihydrotestosterone の標識も同様に行った。

(3) Postembedding 法による染色

(a) 一重染色法

犬の精巣の超薄切片を 0.05% Triton X-100-phosphate buffered saline (pH7.4) (TBS) で 37°C, 10 分間、前処理した後、適宜に TBS 溶液で希釈したそれぞれの 17nm コロイド金標識ステロイドホルモンで 37°C, 30 分間湿箱中で反応させた。反応後 0.05% Tween 20-phosphate buffered saline (pH7.4) (TWBS) で室温下、3-6 時間洗浄を行った。さらに蒸留水で洗浄後、酢酸ウラニール、レイノルド液で染色し、透過型電子顕微鏡 (JEOL 1200EX) で観察した。

(b) 二重染色法

17nm コロイド金標識 5 α -dihydrotestosterone と 5nm コロイド金標識 testosterone による同一表面上での染色を行った。TBS で前処理後、TBS で希釈したコロイド金標識 dihydrotestosterone で 37°C, 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 で希釈したコロイド金標識 testosterone を同一表面で 37°C, 30 分間反応させた後、TWBS で 3-6 時間洗浄を行い、前記と同様にカウンター染色して電顕観察した (D-T assay)。また逆の二重染色 (T-D assay) も同様に行った。

(4) 金粒子の数と面積測定

細胞内での核と細胞質の金粒子の数はそれぞれコロニーカウンターで数えた。核と細胞質の面積はライツ半自動画像解析装置 (Leitz-A.S.M.) で測定した。

結果と考察

コロイド金標識ステロイドホルモンの作成はステロイドホルモンそれ自身が水に不溶なのでコロイド金標識することはできない。そこでこれを可溶化するためと、またコロイド金と結合させるために、ステロイドホルモンをキャリアーであるタンパク質と結合させる必要がある。その方法と物理化学的な性状に関しては Dean (1971)¹⁰⁾ らが報告している。しかしこのステロイドホルモン-BSA 結合物は現在数社より市販されており、この市販されたものを今回使用してコロイド金標識を行った。コロイド金の作成は Slot & Geuse (1985)⁸⁾ の方法で 17nm と 5nm の 2 種類を作成し、標識は Roth(1978)⁹⁾ らの方法で行った。この概要を Fig. 1 に示した。さらに

標識したコロイド金粒子径を揃えるためにグリセリン密度勾配遠心した。この作成したコロイド金標識ステロイドホルモンが組織中のホルモンレセプターに対して特異的結合活性があるかどうかを検索するために17nmコロイド金標識テストステロン(TBG), およびジヒドロテストステロン(DHTBG)を連続希釈して, 犬の精巣の精細管をそれぞれ染色した。精細管内のセルトリ細胞で得た結果を Table 1 に示した。今回作成したものを各々20-80倍希釈した時, 細胞中の核内にある金粒子数の単位面積当りの比(N/N+C)はTBGでは60倍希釈のものが最も良く, DHTBGでは40倍希釈のものが最も良かった。またこの希釈率の場合に両者ともに核に75%以上

の金粒子が観察されたが, 他の希釈率でも63-69%でコロイド金標識アンドロゲンがいずれの希釈率の場合も核に特異的に結合していることを示したことからアンドロゲンをコロイド金標識してもなおこの結合活性は保持していると考えられる。

Fig. 2は同一切片上で異なる粒子サイズのコロイド金で標識したテストステロン(5nm TBG), とジヒドロテストステロン(17nm DHTBG)で二重染色し, セルトリ細胞内の核と細胞質でのジヒドロテストステロンによる金粒子の単位面積当りの数のみをグラフにした結果である。T-D assayはTBGで最初に染色し, 同一表面上でDHTBGで後染色した場合を示し, D-T assayはその逆

COLLOIDAL GOLD LABELING to ANDROGEN HORMONE

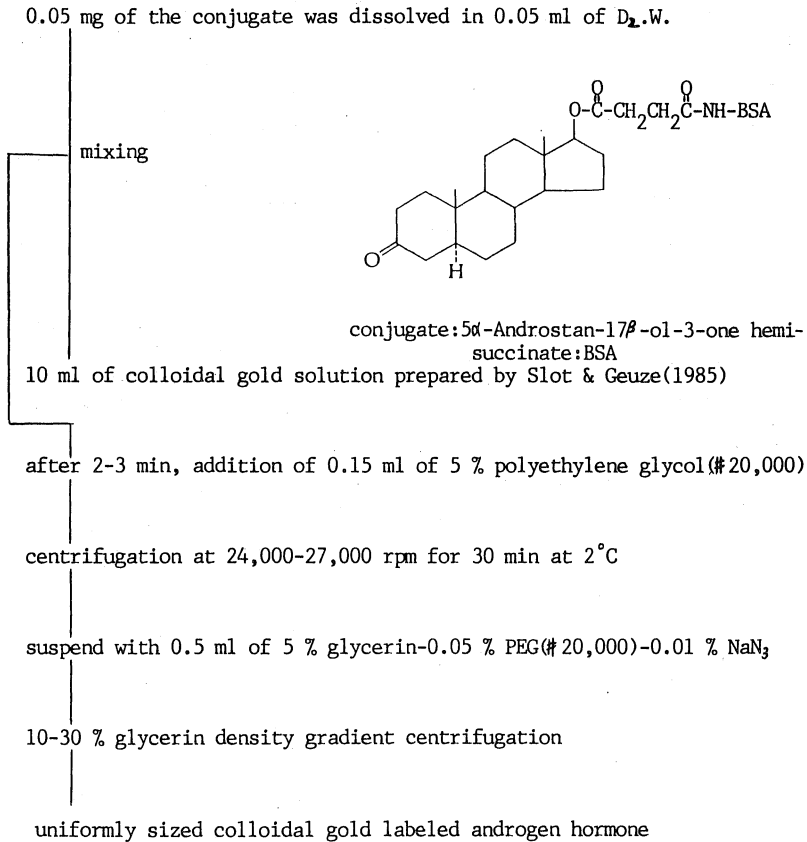


Fig. 1. The labeling profile of the dihydrotestosterone : BSA with the colloidal gold.

である。いずれの場合も TBG は過剰の 20 倍希釈を用い、DHTBG は 40 倍希釈を用いた。T-D assay での核内の DHTBG の金粒子の数は 1.20 ± 0.15 、D-T assay での核内の DHTBG の金粒子の数は 4.09 ± 0.16 で T-D assay ではジヒドロテストステロンの結合物の大部分へテストステロンでマスクされていることが示された。逆にジヒドロテストステロンで最初に染色した場合を T-D assay の場合と DHTBG の金粒子数を比較するとやく 3.4 倍近い値を示し、ジヒドロテストステロンが特異的にある特定のタンパク質へ結合することを示した。金粒子数で Table 1 で示した結果とも一致することが示された。しかし T-D assay では約三分の一のジヒドロテストステロン結合タンパク質はマスクされていないことを示しているが、これは両者の assay の反応時間と反応温度が同一条件であることから、テストステロンとジヒドロテストステロンの親和定数の違いによる結果と考えられる¹⁾。一方、細胞質中の D の金粒子の数は T-D assay では 0.34 ± 0.06 、D-T assay では 1.38 ± 0.13 であり、Table 1 で示した結果とも一致し、細胞質中にも細胞全体の約 2 割のレセプターが存在しており、新合成のレセプターが認識されているのかもしれない。この二重染色の結果は Wright and Franken (1979)²⁾ の報告に述べられているようなジヒドロテストステロン特異的の結合物が核内にあることを示した結果と一致し、これがアンドロゲンレセプターと考えられ、今回のコロイド金標識ジヒドロテストステロンがこれを認識していると考えられる。

次に、このアンドロゲンレセプターの精細管内の各細胞内局在についてセルトリ細胞で見ると、Fig. 3 に示すようにジヒドロテストステロンは核内の diffused

chromatin 領域へ結合を示し、核小体、interchromatin granules, perichromatin granules や、ここでは示していないが condensed chromatin への結合はほとんど見られなかった。アンドロゲンレセプターの細胞内の存在

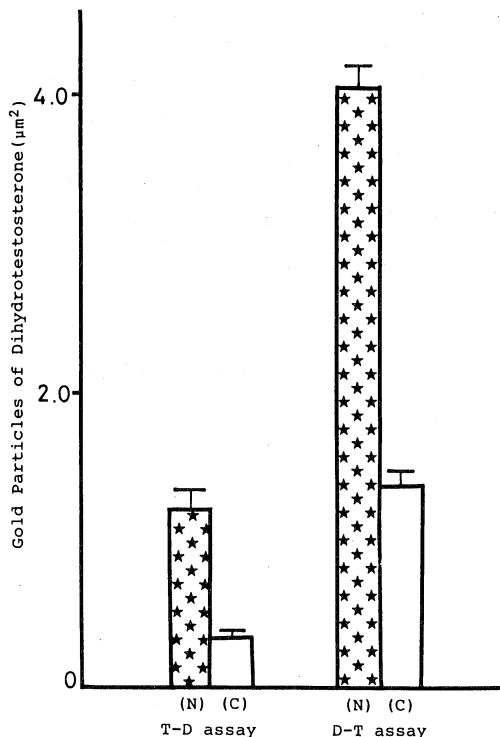


Fig. 2. The density of the dihydrotestosterone gold particles in a nucleus of a Sertoli cell of a canine testis by doubly stained post-embedding method. T-D and D-T assays were described in materials and methods.

Table 1. Density of the gold particles in a Sertoli cell

TBG	(D)	NUCLEI(N)	CYTOPLASM(C)	N/N+C
	×20	18.16±0.62	8.64±0.36	6.77±0.11
	×40	10.65±0.57	4.09±0.45	7.23±0.26
	×60	8.92±0.39	2.80±0.53	7.72±0.32
	×80	5.78±0.29	2.50±0.29	7.02±0.25
DHTBG				
	×20	17.48±1.05	8.52±0.51	6.72±0.09
	×40	6.12±0.39	2.02±0.15	7.50±0.21
	×60	3.98±0.03	1.74±0.07	6.96±0.10
	×80	4.13±0.22	1.78±0.22	7.00±0.32

TBG is an assay by the colloidal gold labeled testosterone and DHTBG is an assay by the colloidal gold labeled dihydrotestosterone. (D) is a ratio of the dilution of each steroid labeled with colloidal gold. (mean±S.E)

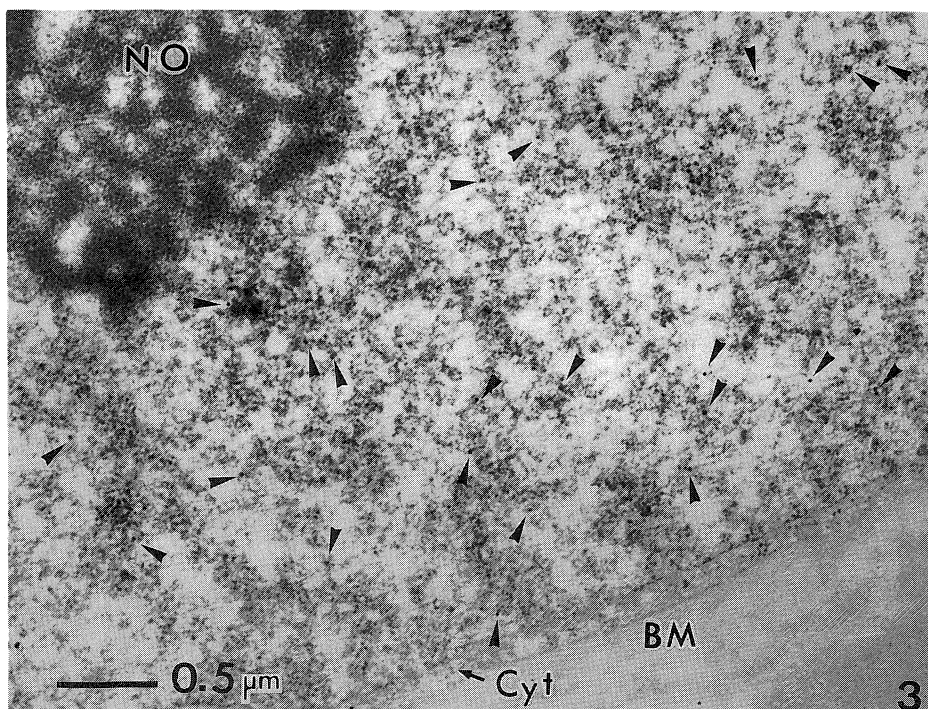


Fig. 3. The dihydrotestosterone gold (arrowhead) was stained in a Sertoli cell of canine testis. Nucleolus(NO), cytoplasm(Cyt) and basement membrane(BM).

形態には非活性型と活性型の2種類あり¹²⁾、これらが核内でどのような分布をしているかは不明であったが、活性型も非活性型のレセプターも diffused chromatin 上にあるとの結果を我々の最近の実験結果が示しているが^{13,14)}、今回、得られた結果はコロイド金標識したジヒドロテストステロンがこの両者を認識しているのか、或は非活性型のレセプターのみを認識しているのかは不明である。

結 語

bovine serum albumin に結合させたアンドロゲンをコロイド金標識する方法でも精巣組織内のアンドロゲンレセプターを検出し、これが細胞核内に特異的に存在することを電子顕微鏡による組織学的研究で示した。

この論文の一部は第64回日本解剖学会近畿地方会(1988年、関西医大)にて発表した。

文 献

- 1) Neaves, W.B.: *Contraception* 11: 571, 1975.
- 2) Booth, W.D.: *Reprod. Fertil.* 42: 459, 1975.
- 3) Wright, W.W. and Franken, A.L.: *Endocrinology* 104: 1580, 1979.
- 4) Chang, C.H., Rowley, D.R., Lobl, T.J. and Tindall, D.J.: *Biochemistry* 21: 4102, 1982.
- 5) 宮高和彦: *奈医誌*. 34: 105, 1983.
- 6) 牧浦宏男: *奈医誌*. 36: 626, 1985.
- 7) Beppu, K.: *J. Electron Microsc. in press.*
- 8) Slot, J.W. and Geuse, H.J.: *Eur. J. Cell Biol.* 38: 87, 1985.
- 9) Roth, J., Bendayan, M. and Orcl, L.: *J. Histochem. Cytochem.* 26: 1074, 1978
- 10) Dean, F.D.G., Exley, D. and Johnson, M.W.: *Steroids* 18: 593, 1971.
- 11) Liao, S. and Liang, T.: *Method in Enzymology* 36: 313, 1975.
- 12) Rowly, D.R., Premont, R.T., Johnson, M.P., Young, C.Y.F. and Tindall, D.J.: *Biochemistry* 25: 6988, 1986.
- 13) 中山正成, 奥田喜一, 橋本研二, 別府謙一, 山本浩司: *奈医誌*. 40: 315, 1989.
- 14) 中山正成, 橋本研二, 奥田喜一, 山本浩司: *奈医誌*. 40: 630, 1989.