



# Testosterone dependent regulation of the enzymes involved in DNA synthesis in the rat ventral prostate

奥田, 喜啓

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1991-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0998

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000998>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	おく だ よし ひろ (大阪府) 奥 田 喜 啓
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博い第735号
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
学位授与の日付	平成3年3月31日
学位論文題目	TESTOSTERONE DEPENDENT REGULATION OF THE ENZYMES INVOLVED IN DNA SYNTHESIS IN THE RAT VENTRAL PROSTATE (ラット腹側前立腺における DNA 合成関連酵素のテストステロン依存性について)
審査委員	主査 教授 守 殿 貞 夫 教授 望 月 眞 人 教授 尾 原 秀 史

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【緒言】

雄性哺乳類の副性器は、その成長と機能においてアンドロゲンの支配を強く受けている。雄性動物を去勢すると、前立腺は萎縮し、テストステロンを投与することにより回復することはすでに知られている。しかし、アンドロゲンによる副性器の細胞増殖調節の機構については未だ不明な点が多く、DNA 合成能調節に関する報告は極めて少ない。今回我々は初めて、ラット前立腺組織における DNA 合成関連酵素、DNA polymerase  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  (以下 pol  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) および topoisomerase I (以下 topo I) を、去勢後およびテストステロン投与後に測定し、これら酵素活性の変動から前立腺のアンドロゲン依存性を検討し、若干の知見を得たので報告する。

### 【方法】

#### 1. 実験動物

実験には10週齢 (270-290 g) Wistar 系雄性ラット (日本クレア, 東京) を使用した。最初に5匹のラットの腹側前立腺を摘出, これを0日目とし, その他のラットにはすべて両側去勢術を施行した。まず去勢後3, 7, 9, 10, 11, 14日目に, いずれも5匹ずつ腹側前立腺を摘出し, これらを非投与群とした。一方, それ以外のラットには去勢後7日目より連日テストステロン (0.3mg/0.2ml オリーブ油) 皮下注射を行い, 去勢後9, 10, 11, 14日目に同様に5匹ずつ腹側前立腺を摘出し, これらを投与群とした。なお, 非投与群にも7日目より連日0.2mlオリーブ油を皮下注射した。

#### 2. 酵素活性測定

摘出した腹側前立腺の重量を測定した後、9倍容量のbufferにてホモジェナイズし、超音波処理を30秒間行った。この一部はDNA量、蛋白量測定のためストックした。30,000×g、10分間遠心分離後、その上清をpol  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ およびtopo I活性測定に用いた。DNA量はLabarcaらの方法により、蛋白量はLowry法により測定した。

#### 1) DNA polymerase 活性測定

方法は既報に準じた。調製した上清5  $\mu$ lと、テンプレート、プライマーおよび一部 [ $^3$ H] で標識したヌクレオチドを含んだそれぞれの活性に適したmixture 20  $\mu$ lとを、37°C、30分、インキュベートし、取り込まれた [ $^3$ H] 量を測定した。各酵素ともラット前立腺組織1mgDNA量あたり、一時間にとりこまれるヌクレオチド量にて比較した。

#### 2) Phosphocellulose column chromatography

テストステロン投与群および非投与群における去勢後11日目の前立腺の crude extract をbufferで希釈し、同じ液で平衡化したリン酸セルロースカラム (0.7×18.0cm) に向け、0~1.0 M-KClの濃度勾配25mlを用いて溶出した。それぞれの分画から5  $\mu$ lとりだしDNA polymerase 活性を測定し、crude extract での結果と比較検討した。

#### 3) Topoisomerase I 活性測定

調製した上清とスーパーコイルDNA (plasmid pBR 322) を30°C、5分間、インキュベートし、スーパーコイルDNAを緩和させ、これをアガロースゲル電気泳動でモニターした。酵素活性は、前立腺組織0.15  $\mu$ g DNAを含む上清によるスーパーコイルDNAの緩和度によって比較した。スーパーコイルDNAの緩和度は、デントメーター (島津 CS-930) にて測定した。

### 【結果】

#### 1. 重量, 蛋白量, DNA 量

前立腺重量は去勢後急速に減少し、14日目まで低下し続けたが、テストステロン投与によって回復した。同様にDNA量、蛋白量も去勢後減少し、テストステロン投与によって著明に回復した。DNA量は投与開始後7日目 (去勢後14日目) に去勢前の値を上回った。

#### 2. DNA polymerase $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ 活性の動態

pol  $\alpha$ 活性は去勢後低下し、14日目には去勢前の41.2%まで低下したが、テストステロン投与群においては投与開始48時間後 (去勢後9日目) に上昇し始め72時間後に急激に上昇し、去勢前にくらべ約2.5倍、同日の非投与群にくらべ約6倍の値を示した。pol  $\beta$ 活性も去勢後低下し、去勢後14日目には去勢前の8.5%まで低下した。投与群では投与開始3日目 (去勢後10日目) 以降有意な上昇を認め、非投与群にくらべ約6倍の値を示したが、去勢前の値を上回らなかった。pol  $\gamma$ 活性についてもpol  $\beta$ 活性とほぼ同様の所見であった。

一方、テストステロン投与群および非投与群の去勢後11日目における、リン酸セルロースカラムにより溶出されたpol  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 活性は、それぞれ crude extract で得られた結果と一致しており、非投与群にくらべ投与群では明らかに上昇していた。

### 3. Topoisomerase I 活性の動態

topo I 活性は去勢後7日目より減少し14日目まで低値を示した。9日目以降では、スーパーコイルDNAの緩和はほとんど見られなかった。テストステロン投与群においては投与開始後48時間（去勢後9日目）より topo I 活性は上昇し始め、投与開始後7日目（去勢後14日目）に最高値を示した。この時点でスーパーコイルDNAはほとんど緩和状態に移行していた。

#### 【考察】

今回の実験でこれらのDNA合成関連酵素の活性が、去勢後ラット前立腺においていずれも減少し、テストステロンを投与することにより上昇することが確かめられた。特に pol  $\alpha$  はテストステロンに強く依存している傾向がみられたが、これは pol  $\alpha$  がDNA複製に中心的な役割を果たしているためと思われる。一方DNA修復を主に担っている pol  $\beta$  や、ミトコンドリアDNA複製に関与している pol  $\gamma$  は、テストステロン投与下においても正常値を大きく上回ることはなかったが、これらの酵素は核内および細胞内の活性を維持できるように調節されているものと思われた。またDNA複製の際、未複製部分の超らせん（スーパーコイル）構造を解消する機能をもつ topo I 活性もテストステロンに大きく依存していた。

テストステロンは前立腺細胞に入ると、5 $\alpha$ 還元酵素によってジヒドロテストステロンに代謝され、ついでアンドロゲン・レセプターと結合し、核内DNAアンドロゲン応答部位と結合し、mRNAの合成促進を介してタンパク合成を高める。この時若干の mRNA がまず合成され、それが細胞全体の構成成分の増加につながるのであるが、DNA合成能を調節する過程は依然十分に解明されていない。今回の実験でこれらDNA合成関連酵素の活性が、テストステロンに依存して変化することが確かめられ、アンドロゲンによるこれら酵素群の活性変化により、前立腺における細胞増殖の調整がなされている可能性が示唆された。またこれら酵素活性の変動は、DNA量の変化と平行しており、ヒト生体内組織の細胞においては通常困難とされるDNA合成能の評価を、これらの酵素活性を測定することより推測できることを示しており、このことはヒト前立腺癌や前立腺肥大症におけるアンドロゲンの影響を解明する手掛かりとなるものと考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

雄性哺乳類の副性器は、その成長と機能においてアンドロゲンの支配を強く受けている。雄性動物を去勢すると、前立腺は萎縮し、テストステロンを投与することにより回復することはすでに知られている。しかし、アンドロゲンによる副性器の細胞増殖調節の機構については未だ不明な点が多く、DNA合成能調節に関する報告は極めて少ない。今回我々は初めて、ラット前立腺組織におけるDNA合成関連酵素、DNA polymerase  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  (以下 pol  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) および topoisomerase I (以下 topo I) を、去勢後およびテストステロン投与後に測定し、これら酵素活性の変動から前立腺のアンドロゲン依存性を検討し、興味ある知見を得た。

## 【方法】

1. 実験動物：最初に5匹のラットの腹側前立腺を摘出し、その他のラットにはすべて両側去勢術を施行した。まず去勢後3, 7, 9, 10, 11, 14日目に、いずれも5匹ずつ腹側前立腺を摘出し、これらを非投与群とした。一方、それ以外のラットには去勢後7日目より連日テストステロン皮下注射を行い、去勢後9, 10, 11, 14日目に同様に5匹ずつ腹側前立腺を摘出し、これらを投与群とした。
2. 酵素活性測定：摘出した腹側前立腺をホモジェナイズし、超音波処理を行った。遠心分離後、その上清を  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  および topo I 活性測定に用いた。
  - 1) DNA polymerase 活性測定：調製した上清と、テンプレート、プライマーおよび一部 [ $^3\text{H}$ ] で標識したヌクレオチドを含んだそれぞれの活性に適した mixture とをインキュベートし、取り込まれた [ $^3\text{H}$ ] 量を測定した。
  - 2) Phosphocellulose column chromatography：テストステロン投与群および非投与群における去勢後11日目の前立腺の crude extract をリン酸セルロースカラムにかけ、KCl 濃度勾配にて溶出し、それぞれの分画からDNA polymerase 活性を測定した。
  - 3) Topoisomerase I 活性測定：調製した上清とスーパーコイルDNA (plasmid pBR 322) をインキュベートし、スーパーコイルDNAを緩和させ、これをアガロースゲル電気泳動でモニターした。

## 【結果】

### 1. 重量, 蛋白量, DNA 量

前立腺重量, DNA 量, 蛋白量はいずれも去勢後急速に減少し, 14日目まで低下し続けたが, テストステロン投与によって著明に回復した。

### 2. DNA polymerase $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ 活性の動態

pol  $\alpha$  活性は去勢後低下し続けたが, テストステロン投与群においては投与開始48時間後(去勢後9日目)に上昇し始め, 72時間後に急激な上昇を認め, 去勢前にくらべ約2.5倍, 同日の非投与群にくらべ約6倍の値を示した。pol  $\beta$  活性も去勢後低下し, 投与群では投与開始3日目を以降有意な上昇を認めたが, 去勢前の値を上回らなかった。pol  $\gamma$  活性についても pol  $\beta$  活性とほぼ同様の所見であった。

一方, リン酸セルロースカラムにより溶出された pol  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  活性も, crude extract で得られた結果と一致していた。

### 3. Topoisomerase I 活性の動態

topo I 活性は去勢後7日目より減少し, 14日目まで低値を示した。テストステロン投与群においては投与開始後48時間より topo I 活性は上昇し始め, 投与開始後7日目に最高値を示した。

## 【考察】

今回の実験でこれらの DNA 合成関連酵素の活性が, テストステロンに依存して変化することが明らかとなり, アンドロゲンによるこれら酵素群の活性変化により, 前立腺における細胞増殖の調節

がなされている可能性が示唆された。またこれら酵素活性の変動は、DNA量の変化と平行しており、ヒト生体内組織の細胞においては通常困難とされるDNA合成能の評価を、これらの酵素活性を測定することより推測できることを示しており、このことはヒト前立腺癌や前立腺肥大症におけるアンドロゲンの影響を解明する極めて有力な手掛かりとなるものと考えられた。

本研究は、ラット前立腺におけるDNA合成の調節機構を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかったDNA合成関連酵素のテストステロン依存性について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。

よって本研究者は医学博士の学位を得る資格があると認める。