ヒト前立腺における Estramustine binding protein (EMBP) の研究

群馬大学医学部泌尿器科学教室

湯 浅 久 子, 今 井 強 一
深 堀 能 立, 山 中 英 寿

Studies on Estramustine-Binding Protein in the Human Prostate

**Hisako YUASA, Kyoichi IMAI,
Yoshitatsu FUKABORI and Hidetoshi YAMANAKA**

Department of Urology,
Gunma University School of Medicine,
Maebashi, Japan

In the present study, size exclusion HPLC was used to analyse the properties of Estramustine-binding protein (EMBP) in the cytosol of human benign prostatic hypertrophy (BPH). The typical size exclusion HPLC separation profile of ^3H -Estramustine-labelled cytosol of BPH showed four radioactive peaks that corresponded to the V_0 , 250K, 68K and 45K protein regions. The specific binding protein for Estramustine is contained mainly in the 250K protein region and in part in the V_0 region. In the presence of sodium molybdate, the specific Estramustine binding to a 250K protein was increased to a level which was about 2.5 times as much as the value in the absence of sodium molybdate. The specific Estramustine binding to a 250K protein under the condition of no DCC treatment and the addition of sodium molybdate was 600% of the value obtained under the condition of DCC treatment and no addition of sodium molybdate. These results suggested that sodium molybdate stabilized the specific Estramustine-binding activity to a 250K protein and that specific Estramustine binding to a 250K protein seemed to be weaker than the binding of androgen to androgen receptor.

緒 言

雄性副性器の1つである前立腺は外分泌腺としての性質をもち、種々の蛋白を生成し、導管を通して尿道に分泌している。これら前立腺分泌蛋白のうちの1つが、数種の steroid hormones^{7) 5)}, cholesterol⁴⁾ および前立腺癌の治療薬剤である Estracyt[®] の主要体内代謝産物である Estramustine と結合すること^{5) 17)} がラット前立腺で明らかになった。この蛋白についての研究は、いくつかの研究グループにより独立しておこなわれたために、この蛋白には、それぞれ異った名称がついている。Liao ら¹¹⁾ は α -protein と名付け、Heyns ら⁷⁾ は prostatic binding protein とよび、Lea ら¹⁰⁾ は

prostatein と名付けている。又、この蛋白は estramustine と比較的高親和性をもって結合するために、Estramustine binding protein (EMBP) ともよばれている^{3) 16)}。

私共は、既に Size exclusion high pressure liquid chromatography (Size exclusion HPLC) を用いて、ラット前立腺 EMBP の性状について解析をおこない分子量 45,000 及び 25,000 の 2 つの binding components があることを明らかにした^{17) 18)}。

今回、ヒトの前立腺肥大症 (Benign prostatic hypertrophy, BPH) 組織の EMBP の性状について、Size exclusion HPLC を用いて検討をおこない、若干の知見を得たので、ここに報告する。

材 料 と 方 法

1) 実験材料：前立腺被膜下摘除術により得られた BPH 組織は、摘出後すみやかに液体窒素にて凍結させ、 -80°C 下にて実験に供するまで保存した。又、摘出組織の 1 部を 10% ホルマリン液にて固定し、H-E 染色し、病理学的に BPH であることを確認した。

2) 試薬： ^3H -Estramustine [(2, 4, 6, 7- ^3H)-estradiol-17 β -3N-bis-(2-chloroethyl) carbamate, 比活性 104 Ci/mmol] および Estramustine は AB-Leo 社 (Sweden) より提供された。Trizma Base, Trizma HCl, DL-dithiothreitol, EDTA-disodium salt, 等は Sigma 社より購入した。Dextran (MW 60,000) は半井化学より、Scintillation liquid (ACS II) は Amersham 社より購入した。

3) BPH 組織サイトソールの調整：

-80°C にて保存されていた BPH 組織を短時間液体窒素中に入れた後、粉末状にする。粉末状となった BPH 組織に約 3 倍量の 10 mM Tris-HCl, pH 7.2-1 mM EDTA-0.1 mM dithiothreitol 10% glycerol (TEDG buffer) を加え、polytron PT-10 (Kinematica, Switzerland) を用いてホモジナイズした。ホモジネートを日立 RP 80 T ロータにて 105,000 $\times g$, 60 分間遠心し、得られた上清をサイトソール分画とした。

4) ^3H -Estramustine 標識サイトソール分画の調整：一定量のサイトソールを ^3H -Estramustine ($1 \times 10^{-8} \text{ M}$) と共に、 0°C , 3 時間インキュベートし、これを ^3H -Estramustine 標識サイトソール分画として使用した。

5) Dextran coated charcoal (DCC) 処理法：実験上、DCC 処理を必要とした場合には、次のように行った。1.5 ml の 0.005% dextran-0.5% charcoal 溶液を 800 $\times g$, 15 分間遠心。この charcoal pellet に ^3H -Estramustine 標識サイトソール、0.5 ml を加え、混和した後に、1,200 $\times g$, 15 分間遠心し、上清を得た。この上清を DCC 処理サイトソールとした。

6) Size exclusion high pressure liquid chromatography：300 μl の ^3H -Estramustine 標識サイトソールを Size exclusion HPLC カラムに注入した。HPLC は東洋曹達工業製 HLC-803A 型汎用型高速液体クロマトグラフを用い、 4°C 低温下にて施行された。溶出分離条件は次の如くであった。装 置：Toyo Soda HLC-803A

カラム：TSK-GEL GSWP + G3,000 SW (7.5 mm ID, 600 mm $\times$ 2)

溶離液：0.075 M phosphate buffer (pH 7.2)

流速および圧：1.0 ml/min, 56 Kg/cm²。

検出器：UV (280 nm)

温 度： 4°C 。

カラムより溶出された液を2,112Redirac fraction collector (LKB)を用いて、0.5mlずつ分取した。分取された各フラクションにACS II, 3mlを加え、混和し、液体シンチレーションカウンター (ULTROBETA, 1,210, LKB) にて放射活性を測定した。

7) 蛋白量測定：サイトソール蛋白量測定はLowryらの方法¹³⁾に準じて行われた。

結 果

1) 標準蛋白の Size exclusion HPLC による分離：Toyo Soda TSK-GEL G 3000 SW カラムを用いた標準蛋白校正曲線はFig.1のごとくであった。標準蛋白 (Boehringer) として, Ferritin, Aldolase, BSA, Eggalbumin, Chymotrypsinogen, Cytochrom Cを使用した。溶離液として0.075 M phosphate buffer (PH7.2) を用いての各標準蛋白の溶出分離は十分に満足のいくものであった。

Fig. 1. Calibration curve for G3000SW type Gel for the measurement of protein molecular weight.

2) ヒト前立腺肥大症 (BPH) 組織サイトソールに存在する EMBP の Size exclusion HPLC 溶出パターン：³H-Estramustine を BPH 組織サイトソール分画と共に、0℃、3時間インキュベートした。得られた³H-Estramustine 標識サイトソールを Size exclusion HPLC カラムに注入し、溶出分離をおこなった。その溶出パターンはFig.2の如くであった。Vo, 250 K, 68 K, 45 K に一致して、4つの放射活性ピークがみられた。100倍過剰量の非標識 Estramustine をインキュベーション時に同時添加すると、Vo, 250 K, 45 K の放射活性に抑制がみられた。特に250 K 蛋白と³H-Estramustine との結合の抑制が、より強くみられた。この結果は、Estramustine specific binding protein の大部分は250 K 蛋白領域に、一部 Vo 領域、45 K 領域に含まれていることを示している。

300 μ l of ^3H -Estramustine labelled cytosol was injected into size exclusion HPLC.

Fig. 2. A typical separation profile of ^3H -Estramustine labelled cytosol of human BPH by means of size exclusion HPLC.

3) 250 K 蛋白のホルモン結合特異性: Table 1 は 250 K 蛋白のホルモン結合特異性を検討したものである。100 倍過剰量の非標識ホルモン添加時の抑制率が比較されている。Estramustine に一番特異性が高く, $\text{E}_2-17\beta$, R 5020, DHT の順に低くなり, cortisol では全く抑制がみられなかった。この結果は, BPH 組織サイトソールには Estramustine に対して, 比較的結合特異性の高い 250 K 蛋白が存在することを示している。

Table 1. Competition for the binding of ^3H -Estramustine to a 250K protein in human BPH cytosol.

A 100 fold excess of competitor($3 \times 10^{-6}\text{M}$)	Inhibition rate (%)
None	0
Estramustine	60.4
Estradiol- 17β	25.5
R5020	23.7
DHT	7.9
Cortisol	0

Each value is the mean of two determinations.

4) 250 K 蛋白と Estramustine との結合に対する DCC 処理効果: 0.005% dextran-0.5% charcoal 溶液で ^3H -Estramustine 標識サイトソールを処理 (charcoal の最終濃度は 1.5% となる) してから, Size exclusion HPLC にて溶出分離した。250 K 蛋白と ^3H -Estramustine との特異的結合は, DCC 処理を全く行わないで, Size exclusion HPLC にて溶出分離したときのそれを 100% とすると, 32% であった。尚, この場合にはホモジナイズから HPLC 溶出まで, 全操作は 10 mM Sodium Molybdate 存在下でおこなわれている。0.005% dextran-0.5% charcoal 溶液の 10 倍希釈溶液で同様に処理した場合には DCC 処理を全く行わなかった場合に比較して, 47.3% の減少がみられた (Table 2.)

Table 2. Effect of DCC treatment on the specific binding of ^3H -Estramustine to a 250K protein in human BPH cytosol in the presence of sodium molybdate.

DCC treatment	Specific binding of ^3H -estramustine to 250K protein (DPM)
No	10750 (100%)
0.05% DCC	5668 (52.7%)
0.5% DCC	3438 (32.0%)

Fig. 3. Effect of DCC treatment and/or sodium molybdate on the separation profile of ^3H -Estramustine labelled cytosol of human BPH.

5) 250 K 蛋白と Estramustine との結合に対する DCC 処理と Sodium Molybdate 添加の効果:

DCC 処理及び Sodium Molybdate 添加の EMBP への影響を検討したものが Fig. 3 であり, さらに 250 K 蛋白への Estramustine の特異的結合に焦点を合わせてまとめたものが, Table 3 である。DCC 処理としては, ^3H -Estramustine 標識サイトソールを 0.005% dextran-0.5% charcoal 溶液で処理した。(charcoal の最終濃度は 1.5% となる。)又, Sodium Molybdate 添加という場合には, ホモジナイズから Size exclusion HPLC 溶出まで, 全操作は 10 mM Sodium Molybdate 存在下でおこなわれている。DCC 処理下においては, Sodium Molybdate の添加効果はみられないが, DCC 処理なし, Sodium Molybdate 添加のときの 250 K 蛋白への Estramustine の特異的結合は, DCC 処理なし, Sodium Molybdate 添加なしのときに比較して, 約 600% の増加が観察された。

Table 3. Effect of DCC treatment and/or sodium molybdate addition on the specific Estramustine binding to a 250K protein in human BPH cytosol.

0.5%DCC treatment	Addition of sodium molybdate	Specific binding of ^3H -estramustine to 250K protein (%)
+	—	100
+	+	117
—	—	232
—	+	585

考 察

前立腺は種々の蛋白を生成し, それらを導管を通して尿道に分泌している。前立腺癌治療薬剤である Estracyt[®] の研究途上に偶然に見い出された Estramustine binding Protein (EMBP) も又, 前立腺分泌蛋白のひとつである。Forsgren ら¹¹⁾ はラット前立腺腹葉の EMBP のアミノ酸組成を分析しているが, Prostatic binding protein⁸⁾, α -p protein⁴⁾, Prostatein¹⁰⁾ のアミノ酸組成との類似性が高く, さらにその他の物理化学的性質から, これらの蛋白は同一のものである可能性は高い。前立腺 EMBP の研究は, これまで主にラット前立腺腹葉を用いておこなわれてきており, ヒト前立腺 EMBP の研究は少ない。Fig. 2 に見られる様に, ヒト前立腺肥大症組織の ^3H -Estramustine 標識サイトソールを Size exclusion HPLC にて溶出分離させたところ, V_0 , 250 K, 68 K (アルブミン領域) 及び 45 K に一致して, 4 つの放射活性をみた。一方, ラット前立腺腹葉, 背葉, 側葉の場合には, 低塩処理という全く同一条件のもとでの Size exclusion HPLC 溶出分離にて分子量 45 K 及び 25 K 領域に 2 峰性放射活性ピークを認め, 前立腺前葉では, V_0 , 45 K, 25 K 領域に放射活性ピークをみた¹¹⁾。

ヒト EMBP もその native protein はラット前立腺腹葉 EMBP と同じく分子量 45 K であると仮定すると, 低塩条件において高分子化しやすいということが推測される。この 250 K 高分子化 EMBP について, どのような状態で高分子しているのかという構造解析の研究は現在進行中である。とまれ, ヒト前立腺肥大症サイトソールにおいては, Estramustine と結合する 250 K 蛋白の存在が, その特徴である。そこで, 以後前立腺肥大症の 250 K 蛋白に焦点を合わせて, いくつかの検討をおこ

なった。まず、250 K 蛋白と Estramustine との結合力の強さを DCC 法により検討をおこなったところ (Table 2), 最終濃度 0.15% という低濃度にて, Estramustine の 250 K 蛋白との特異的結合は約 50% の減少がみられた。このことは, アンドロゲンとアンドロゲンレセプターとの結合に比較して, 250 K 蛋白と Estramustine との結合がより弱いことを示している。又, 250 K 蛋白と Estramustine との結合解析に DCC 法を用いることは適切ではないことを示唆している。

Sodium Molybdate はステロイドホルモンレセプターのステロイドとの結合力を安定化させ, レセプターの核への translation を阻止する作用をもっていることが報告されている^{1) 2) 9) 19)}。EMBP と Estramustine との特異的結合への Sodium Molybdate の添加効果は, DCC 処理をすると, ほとんど消失するが, DCC 処理をしない場合には, Sodium Molybdate の添加効果がみとめられた。特に, 250 K 蛋白と Estramustine との特異的結合に対して強くみとめられ, 約 250% の増加を示した。この結果は, ヒト前立腺肥大症組織 EMBP の Estramustine との結合力は Sodium Molybdate により安定化され, 特異的結合が増加することを示唆しており, 興味深い。

前立腺サイトソールに存在する EMBP の生理的意義については, 現在のところ明らかではない。しかし, Pousette ら¹⁴⁾ は, *in vitro* 実験により, アンドロゲンレセプターの核へのとり込みを EMBP は抑制する作用をもっていることを報告している。又, Liao らも¹²⁾、この蛋白がラット前立腺腺葉の Androgen-Receptor complex の核移行の調節及び recycling に関与していることを予測しており, 今後の研究課題である。

結 論

- 1) ヒト前立腺肥大症サイトソールには Estramustine binding protein (EMBP) が存在する。
- 2) この蛋白は, 低塩条件下では, ラット前立腺のそれに比較して, 高分子化しやすく 250 K 蛋白の存在が, その特徴である。
- 3) 250 K 蛋白は, 他のステロイドホルモンに比べて, Estramustine に対して高い結合親和性をもっている。
- 4) Sodium Molybdate はこの結合能を増加させる作用がある。
- 5) アントロゲンとレセプターとの結合に比べて, この結合は比較的弱い。故にヒト前立腺肥大症の EMBP の結合解析に DCC 法を用いるのは適切ではない。

文 献

- 1) Anderson, K.M., Bonomi, P.D., Hendrickson, C. and Economou, S.: Stabilization of human breast cancer progesterone receptor by sodium molybdate. *Clinica. Chemica. Acta*, 103: 367–373, 1980.
- 2) Anderson, K.M., Phelan, J., Marogil, M., Hendrickson, C. and Economou, S.: Sodium molybdate increases the amount of progesterone and estrogen receptor detected in certain human breast cancer cytosols. *Steroids*, 35: 273–280, 1980.
- 3) Björk, P., Forsgren, B., Gustafsson, J.A., Pousette, A. and Högberg, B.: Partial characterization and “quantitation” of a human prostatic estramustine binding protein. *Cancer Res.*, 42: 1935–1942, 1982.
- 4) Chen, C., Schilling, K., Hiipakka, R.A., Huang, I.Y. and Liao, S.: Prostate α -protein. Isolation and characterization of the polypeptide components and cholesterol binding. *J. Biol. Chem.*, 257: 116–121, 1982.
- 5) Forsgren, B., Gustafsson, J.A., Pousette, A. and Högberg, B.: Binding characteristics of

a major protein in rat ventral prostate cytosol that interacts with estramustine, a nitrogen mustard derivatives of 17 β -estradiol. *Cancer Res.*, 39: 5155–5164, 1979.

6) Forsgren, B., Björk, P., Carlstrom, K., Gustafsson, J.A., Pousette, A. and Hogberg, B.: Purification and distribution of a major protein in the rat prostate that binds estramustine, a nitrogen mustard derivative of estradiol-17 β . *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 76: 3149–3156, 1979.

7) Heyns, W. and De Moor, P.: Prostatic binding protein: A steroid-binding protein secreted by rat prostate. *Eur. J. Biochem.*, 78: 221–230, 1977.

8) Heyns, W., Peeters, B., Mous, J., Rombauts, W. and De Moor, P.: Purification and characterization of prostatic binding protein and its subunits. *Eur. J. Biochem.*, 89: 181–186, 1978.

9) 今井強一, 態坂文成, 小林幹男, 高橋康男, 高橋悦子, 山中英寿: ヒト前立腺におけるプロゲステロン特異的結合蛋白の研究 (第III報), *Sodium molybdate* 効果をめぐって, *日内分泌会誌*, 61: 816–822, 1985.

10) Lea, O.A., Petrusz, P. and French, F.S.: Prostatein: A major secretory protein of the rat ventral prostate. *J. Biol. Chem.*, 254: 6196–6202, 1979.

11) Liao, S., Tymoczko, J.L., Castaneda, E. and Liand, T.: Androgen receptors and androgen dependent initiation of protein synthesis in the prostate. *Vitam. Horm.*, 33: 297–318, 1975.

12) Liao, S., Mezzetti, G., Chen, C., Smythe, S., Hiipakka, R.A., Loo, R., Schilling, K. and Rossini, G.P.: Alpha protein and spermine binding protein of rat ventral prostate, 3-11. Ed. by G.P. Murphy and A.A. Sandberg, *Prostatic Cancer and Hormone Receptors*, Alan R. Liss, Inc., New York, 1979.

13) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265–275, 1951.

14) Pousette, A., Björk, P., Carlstrom, K., Forsgren, B., Högborg, B. and Gustafsson, J.A.: Influence of prostatic secretion protein on uptake of androgen-receptor complex in prostatic cell nuclei. *The Prostate*, 2: 23–33, 1981.

15) Rowley, D.R., Chang, C.H. and Tindall, D.J.: Effects of sodium molybdate on the androgen receptor from the R3327 prostatic tumor. *Endocrinology*, 114: 1776–1783, 1984.

16) Yamanaka, H., Imai, K., Yuasa, H. and Shida, K.: Mechanism of retention of estramustine in rat prostate and results of a clinical trial of Estracyt in Japan. *The Prostate, Suppl.* 1: 95–102, 1981.

17) 山中英寿, 湯浅久子, 小屋 淳, 中井克幸, 上原尚夫, 古作 望, 松村嘉夫, 志田圭三: ラット前立腺 EMBP の性状, *ホルモンと臨床*, 30: 1113–1117, 1982.

18) Yamanaka, H., Yuasa, H., Kosaku, N., Bashirelahi, N. and Shida, K.: Analysis of estramustine binding protein (EBP) in rat dorsal prostate by means of high pressure liquid chromatography. *Endocrinol. Japon.*, 29: 669–674, 1982.

(受付日: '85. 12. 17)