

Title	グルココルチコイド・レセプター複合体の核への移行結合調節因子の研究
Author(s)	寺田, 雅子
Citation	大阪大学, 1980, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32487
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	寺 田 雅 子
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 4850 号
学位授与の日付	昭和55年3月18日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	グルココルチコイド・レセプター複合体の核への移行結合調節因子の研究
論文審査委員	(主査) 教授 坂本 幸哉 (副査) 教授 熊原 雄一 教授 宮井 潔

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

ステロイドホルモンは、ほぼ共通した作用機構を有している。ステロイドホルモン標的細胞質中には、活性型ステロイド・レセプター複合体 (SRC) が核へ移行結合するのを阻害する高分子性移行結合阻害物質 (MTI) が存在し、これが核での SRC のアクセプター部位に対する見かけ上の飽和現象をひき起すことが知られている。今回、MTI 以外にも、活性型グルココルチコイド・レセプター複合体 (GRC) の核への移行結合を阻害する低分子性の物質の存在を検知出来たので、さらに、その物質の特性、阻害様式などの検討を試みた。

〔方法ならびに成績〕

- I. 活性型レセプター・(^3H) トリアムシノロン・アセトナイド複合体 (R-(^3H)TA) の部分精製
GRC は非活性型ではホスホセルロースとの親和性が低いが、活性型では高くなる。この性質を利用して R-(^3H)TA の精製をおこない、約3000倍の精製度の標品を得た。
- II. 活性型 R-(^3H) TA の核への移行結合
2 × 10⁶個の精製核に、種々濃度の活性型 R-(^3H) TA を加えて 0℃、90分間インキュベートし核への移行結合を測定した。移行結合は活性型 R-(^3H) TA の加えた量に比例して増加した。この様に見かけ上の核の飽和が認められないので、粗抽出液中の MTI は精製過程で除去され、この精製標品には MTI の混在が非常に少ないと考えられる。
- III. 活性型 R-(^3H) TA の核への移行結合におよぼす透析脱レセプター細胞質画分の影響
肝可溶性画分を 37℃、30分インキュベートして、レセプターを失活させ、脱レセプター細胞質画

分 (RFC) を得た。この RFC 5 mg を、核 2×10^6 個、2.7 pmole の R-(^3H)TA より成る反応溶液に添加すると 48% の移行結合阻害が認められた。RFC を透析すると透析時間の経過につれて阻害率は増強した。また、透析、非透析 RFC 共に蛋白量の増加につれて阻害率は増加した。

IV. Sephadex G-25 カラムによる低分子物質の分離

Sephadex G-25 カラムによる低分子物質の分離を試みた。その結果、高分子画分 (すでに知られている MTI とと思われるが) では著しい阻害効果を示した。低分子画分でも明らかに移行結合阻害が認められた。さらに、低分子画分を集めて検討を加えると、反応溶液に加えた低分子画分が増加するほど阻害が増強され、やがて平衡に達した。また RFC を限外濾過器に通して得た濾液で実験してみても Sephadex G-25 低分子画分と同様の結果が得られた。

V. 低分子画分と透析高分子物質との混在による移行結合の阻害効果

透析により、透析内液の高分子物質の阻害効果が増強された。これを逆方向より証明する為、透析高分子物質の一定量に、低分子物質を加え、低分子物質を増加させていくと、透析高分子物質の阻害効果は減少し、透析前の RFC の阻害率に近い値まで減少した。さらに低分子物質を増加させると、逆に阻害率は高くなった。

VI. ピリドキサル・5'-リン酸 (PLP) による移行結合阻害

PLP を加えて、移行結合阻害を検討すると、透析高分子物質のみで PLP を含まない場合よりもさらに一層、阻害の増強が認められた。このことは、V の低分子物質と透析高分子物質の混在における阻害様式と、異なることを示唆している。

VII. 低分子物質の阻害様式

i) 低分子物質添加核と無添加核への R-(^3H) TA の結合

前もって核に低分子物質を添加したもの、無添加のもの、それぞれ 0°C 、60 分インキュベートしたのち核を再分離し、洗滌後、活性型 R-(^3H) TA と反応させた。結果、両者の移行結合に差は認められず、核との直接の interaction はなかった。

ii) Computer Simulation Model System による阻害様式の検討

一定量の R-(^3H) TA に、一定量の低分子物質、または、透析高分子物質と、核を 5 倍にわたって変量させたものを加え反応させた。結果、低分子物質、透析高分子物質共に、total acceptor site concentration に対する acceptor bound receptor-steroid concentration の比が一定であるので、computer simulation model II に相当し、R-(^3H) TA と直接結合していることが推定された。

[総括]

- 1) ラット肝臓の RFC を透析すると、活性型 R-(^3H) TA の核への移行結合阻害が増強された。
- 2) Sephadex G-25 カラムのゲル濾過法により、RFC から低分子画分と、高分子画分を分離し、それらの阻害作用を検討すると、両者共、活性型 R-(^3H) TA の核への移行結合阻害を示した。低分子物質の阻害程度は高分子物質のそれに比し弱い、明らかに阻害した。
- 3) 低分子物質と高分子物質とを適当な量で混在させると阻害が減弱され、高分子物質に対して低分

子物質を高濃度に増加させていくと、再び阻害が増強した。

- 4) PLPを高分子物質に加えた場合、単に高分子物質の阻害が増強されていくのみで、PLPは、明らかに低分子物質とは阻害様式が異なる。低分子物質はPLPそのものではないと考えられる。
- 5) 低分子物質はSRCに結合し、すでに報告されている高分子物質と同様の阻害様式であった。
- 6) ラット肝細胞質中には、少なくとも2種類の移行結合調節物質が存在し、1つはすでに知られている高分子物質 (MTI) であり、もう1つは本稿で述べた低分子物質 (Low-Molecular Weight Translocation Modulator (s)) である。

論文の審査結果の要旨

グルココルチコイドホルモンは、まずステロイドが標的細胞質に存在するレセプター蛋白と特異的に結合し、このホルモン・レセプター複合体が活性化を受け“活性型複合体”に変換されて、核、クロマチンに結合し、この結合が遺伝子発現を調節し、このステロイドに特有な生物化学的变化を惹起されると考えられている。グルココルチコイド作用は、レセプター蛋白以外にも多くの調節点で複雑に調節を受けている事が知られて来た。その一つに活性型複合体が核、クロマチンに移行結合するのを阻害する“高分子性”移行結合阻害物質 (macromolecular translocation inhibitor) の存在が知られている。本論文では、この高分子性阻害物質以外にも“低分子性”移行結合調節物質 (low molecular translocation modulator) が存在することを見出し、高分子性物質の阻害作用を調節していることを明らかにしている。

これはグルココルチコイド作用調節機構上の新知見としてのみならず、さらにグルココルチコイド不感受性成立機構の解明に大きく貢献が期待出来、独創的な研究として高く評価される。