

Title	“活性型”レセプター・グルコシルチコイド複合体の核結合を増大させるATP感受性促進物質の精製と特性
Author(s)	岡本, 一起
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/34676
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名・(本籍)	岡 本 一 起
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 6805 号
学位授与の日付	昭和60年3月25日
学位授与の要件	医学研究科 生理系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	“活性型”レセプター・グルココルチコイド複合体の核結合を増大させる ATP 感受性促進物質の精製と特性
論文審査委員	(主査) 教授 坂本 幸哉 (副査) 教授 山野 俊雄 教授 松本 圭史

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

グルココルチコイドホルモンは標的細胞の核内で特異的遺伝子発現に至るまでに1), 細胞質レセプターと結合し, レセプター・グルココルチコイド複合体(RGC)を形成する(Binding) 2), このRGCが“活性型”RGCに変換される(Activation) 3), この“活性型”RGCが核に移行結合する(Translocation)という少なくとも3つのStepでSignalが伝達されと考えられている。我々は, このTranslocation Stepの分子機構やその調節因子に興味を持ち解析を行ない, これまでに“活性型”RGCの核やクロマチンへの結合を調節していると考えられる多くの低分子性物質(Low-molecular weight translocation modulators, ATP, PPi)や高分子性の阻害物質(Macromolecular translocation inhibitors (MTI-I, II, III))を見出し報告してきた。本研究においては, さらにATPにより核結合を促進する高分子性移行結合促進物質(ATP-stimulated translocation promoter (ASTP))を見出し, 高度に精製を行ない, その物理化学的諸特性を解析したので報告する。

(方法ならびに成績)

- 1) “活性型”RGCの精製; 副腎摘除ラット肝よりCliment等の方法を一部改良して, “活性型”RGC (“活性型”レセプター・ ^3H Triamcinolone acetonide (TA)複合体)を約3,000~5,000倍に精製した。以下, 全ての実験にこの“活性型”RGCの高度精製標品を用いた。
- 2) Nuclear (Chromatin) binding assay; 反応液は, 最終容量を0.5 mlとし, “活性型”RGC (1.8 pmol)と副腎摘除ラット肝より単離した核(2×10^6 個, 約20 μg DNA)やクロマチン(約20 μg DNA)を用いた。このassay系にラット肝細胞質より抽出した諸因子を添加した。反応液を0°C, 90分間

incubate し、3回洗浄後、“活性型”RGCの核やクロマチンへの結合量を測定した。

3) MTIs と ASTP の分離精製；副腎摘除ラット肝細胞質画分を DEAE セルロースカラムに添加し、0 - 0.5 M NaCl gradient で溶出すると 0.1 M NaCl 溶出域、0.2 M 溶出域、0.3 M 溶出域にそれぞれ核結合阻害活性が認められた。これを溶出順に Peak-I (MTI-I), Peak-II (MTI-II), Peak-III (MTI-III) と呼んでいる。次に、これら Peak に対する ATP の影響を検討すると Peak-I の画分に 5 mM ATP 存在下で核結合を約 2 倍増加させる核結合促進活性が認められた。Peak-II は ATP 添加によりその阻害活性が消失した。Peak-III の阻害活性は ATP の影響を受けなかった。私は、Peak-I に含まれる ATP 感受性核結合促進活性と阻害活性は異った物質の作用ではないかと考え分離を試みた。Peak-I を 60°C, 15 分間熱処理後遠心し、その上清に含まれる阻害活性と促進活性を測定すると阻害活性 (MTI-I) は完全に失活したが、促進活性 (ASTP) はほとんど影響を受けなかった。DEAEセルロース・カラムクロマトグラフィーで MTI-I, II, III を分離した条件よりさらに緩やかな NaCl gradient (0 - 0.13 M) を用いて溶出すると MTI-I は、0.10 M NaCl 溶出域に、ASTP は、0.025 M 溶出域に分離できた。こうして分離した MTI-I は、ATP の影響を受けなかった。次に ASTP の精製と諸特性の解析を試みた。

4) ASTP の精製と諸特性の解析；副腎摘除ラット肝細胞質画分から硫酸分画、DEAEセルロース・カラムクロマトグラフィー、ゲルろ過 (Bio-Gel A-0.5m), 熱処理, CMセルロース・カラムクロマトグラフィー等により、ASTP を高度 (約 1,000 倍) に精製した。以下、この標品を用いて、その物理化学的性質について解析した。分子量は 93,000 で沈降定数は 7.0 S, pI は約 4.5 であった。ASTP の活性発現には、ATP が必要で、ADP, AMP は無効であった。また単離核の代わりに、核より調整したクロマチンや DNA セルロース (native calf thymus, 20 µg DNA) をアクセプターとして用いて、assay を行なうと ASTP は“活性型”RGC のクロマチンへの結合量を増大させるが、DNA セルロースへの結合量には変化を与えなかった。RNase A 及び T₁ 処理は ASTP 活性に影響を与えなかったが、トリプシン処理により活性は著明に低下した。精製標品について、温度感受性を検討すると 60°C, 5 分ではほとんど活性は保たれているが、15 分ではやや失活が認められた。100°C, 15 分では完全に失活した。

(総括)

1) “活性型”RGC の核移行結合を調節する生体高分子物質の分離解析を行ないラット肝細胞質画分より ATP 感受性核結合促進物質 (ATP-stimulated translocation promoter (ASTP)) を見出した。

2) ASTP を高度 (約 1,000 倍) に精製した。

3) ASTP は“活性型”RGC の核やクロマチンへの結合量を増大させるが DNA セルロースへの結合量には変化を与えなかった。

4) その物理化学的性質を解析すると、M.W. ≈ 93,000, 沈降定数 ≈ 7.0 S, pI ≈ 4.5 のタンパク質性物質であった。ASTP 活性の発現には ATP が必要で ADP, AMP は無効であった。

論文の審査結果の要旨

本論文は“活性型”レセプター・グルココルチコイド複合体の核結合を増大させる生体高分子物質の発見とその生化学的特性について述べたものであり、グルココルチコイド作用機構の解析に大いに貢献している。今後の発達が期待される独創的な研究である。