The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ラット肝より部分精製した”活性型”レセプター・グルココルチコイド複合体の核，クロマチン，DNA-セルロースへの結合に及ぼすピロリン酸及びATPの効果
Author(s)	堀内，正嗣
Citation	大阪大学，1984，博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34783
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【40】

氏名・（本籍）	堀内正嗣（ほりうち まさつぐ）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 6584 号
学位授与の日付	昭和59年8月6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	**ラット肝より部分精製した“活性型”レセプター・グルココルチコイド複合体の核，クロマチン，DNA−セルロースへの結合に及ぼすピロリン酸及びATPの効果**
論文審査委員	（主査）教授 坂本 幸哉 （副査）教授 田中 武彦　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（G）は標的細胞の細胞質中に存在する特異的レセプターと結合し，“活性型”レセプター・G複合体へと変換された後に，核へ移行結合しG特有の遺伝子情報を発現すると考えられている。またこの作用機構の各過程は複雑に調節されているが，その詳細については不明な点が多い。私達の研究室では，“活性型”レセプター・G複合体が核やクロマチンに結合する過程に焦点を当てて研究を続けているが，ピロリン酸（PPi）は“活性型”レセプター・G複合体の核への結合を著明に促進する事及び，ATPは細胞質中に存在する高分子物質に作用する事により，“活性型”レセプター・G複合体の核への結合を調節している事を見出した。本研究においては“活性型”レセプター・G複合体の核，クロマチン及びDNA−セルロースへの結合に与えるPPiの効果をATPとの相互作用を中心に検討し，“活性型”レセプター・G複合体のアクセプターへの結合様式を解明しようと試みた。

（方法ならびに成績）

1）“活性型”レセプター・G複合体の核，クロマチン，DNA−セルロースへの結合に及ぼす高分子性，低分子性移行結合調節物質等の影響を除く為に，副腎摘除ラット肝よりCliment等の方法を一部改良し，“活性型”レセプター・〔^{3}H〕Triamcinolone acetonide（TA）複合体を約3,000倍に精製した。以下全ての実験にこの標品を用いた。この精製“活性型”レセプター・〔^{3}H〕TA複合体を低塩濃度下でショ糖密度勾配遠心法及びSephadex G−150ゲルロ過で解析すると沈降定数約4.2 S，分子量約98,000の位置に単一の放射活性のピークを認めた。この結果は部分精製した標品中のほとんどが“活性型”レセプター・G複合体であり，“非活性型”レセプター・G複合体及び蛋白分解酵素で

レセプターの一部が欠損したメロレセプター等の含量が非常に少ない事を示している。

2）核は副腎摘除ラット肝より単離し，同単離核よりクロマチンを調製した。“活性型”レセプター・〔^{3}H〕TA複合体の核，クロマチン，DNA−セルロースへの結合assay反応液は，最終容量を0.5 mℓとし，1.8 pmolの“活性型”レセプター・〔^{3}H〕TA複合体に対し，2×10^{6}個の核（約20μg DNAに相当），20 μg DNAに相当するクロマチンまたはDNA−セルロース（native calf thymus DNA）を用いた。反応液を0℃，90分間incubateし洗浄後，各々のアクセプターへの“活性型”レセプター・〔^{3}H〕TA複合体の結合量を測定した。PPi（2－7 mM）を反応液に添加すると，“活性型”レセプター・〔^{3}H〕TA複合体の核への結合量は，約1.8倍に増加した。5 mMのATP，ADP，AMP，リン酸添加ではほとんど影響が認められなかった。クロマチンをアクセプターとして用いた系においても，PPiは同様の効果を示したが，“活性型”レセプター・〔^{3}H〕TA複合体のDNA−セルロースへの結合にはほとんど影響を与えなかった。この現象は“活性型”レセプター・G複合体上には，クロマチン結合部位とは別にDNA結合部位が存在する事を示唆するものである。

3）反応液中にPPiと同時にATPが存在すると，PPiによる“活性型”レセプター・〔^{3}H〕TA複合体の核結合促進効果は減弱され，加えたPPi，ATPの容量依存的に“活性型”レセプター・〔^{3}H〕TA複合体の核への結合は次第に阻害を受ける様になる。このATPと同様の効果はADPでもある程度認められたが，AMPではほとんど認められなかった。また，ATPとPPiの同時添加により，“活性型”レセプター・〔^{3}H〕TA複合体のクロマチン及びDNA−セルロースへの結合は阻害された。

4）緩衝液で平衡化したATP−アガロース（0.7 μmol）のスラリーに1.8 pmolの“活性型”レセプター・〔^{3}H〕TA複合体を加え，総量を0.5 mℓにした。反応液を0℃，90分間incubateし洗浄後，“活性型”レセプター・〔^{3}H〕TA複合体のATP−アガロースへの結合量を測定した。PPi（～10mM）は“活性型”レセプター・〔^{3}H〕TA複合体のATP−アガロースへの結合を約1.5倍に増加した。この結果は“活性型”レセプター・〔^{3}H〕TA複合体のPPi結合部位はATPとは異なっている事を示すものである。またADP−及びAMP−アガロースへの“活性型”レセプター・〔^{3}H〕TA複合体の結合量はATP−アガロースに比べると各々約12%及び16%であった。またPPiは“活性型”レセプター・〔^{3}H〕TA複合体のADP−アガロースへの結合をわずかに促進するが，AMP−アガロースへの結合にはほとんど影響を与えなかった。

5）“活性型”レセプター・〔^{3}H〕TA複合体をPPi及びATPで前処理し，ショ糖密度勾配遠心法及びSephadexG−150ゲルロ過で解析した。しかし，上記処理をしても“活性型”レセプター・〔^{3}H〕TA複合体の沈降定数（約4.2 S），分子量（約98,000）に著明な変化は認められなかった。

（総　括）

1）PPiは“活性型”レセプター・〔^{3}H〕TA複合体の核，クロマチンへの結合を著明に促進するが，DNAセルロースへの結合にはほとんど影響を与えなかった。

2）ATP単独では“活性型”レセプター・〔^{3}H〕TA複合体の核，クロマチン，DNA−セルロースへの結合にほとんど影響を与えないが，PPiとの同時添加により，これら全てのアクセプターに対する“活性型”レセプター・〔^{3}H〕TA複合体の結合を阻害した。

3）PPiは“活性型”レセプター・〔^{3}H〕TA複合体のATP−アガロースへの結合を促進した。

4）PPi，ATPは“活性型”レセプター・〔^{3}H〕TA複合体の沈降定数，分子量に顕著な変化を与えなかった。

5）以上の結果より，PPi及びATPは“活性型”レセプター・G複合体上の異なった部位に結合し，“活性型”レセプター・G複合体のクロマチン及びDNA結合部位にアロステリックな変化を引き起こす事により，クロマチン及びDNAに対する結合性に影響を及ぼしていると推測される。

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，クロマチン，DNAへの結合に与えるPPi，ATPの効果を分子レベルで詳細に解明したものであり，レセプターのアクセプターへの結合様式の解明に大きな進歩を与えるものである。また，本論文は蛋白合成や核酸代謝に関連した多くの酵素がATP−PPi exchange reactionを触媒している事からも，今まで詳細が不明であった核内におけるグルココルチコイドの特異的遺伝子発現機構の解明に大きく貢献するものであり，独創的な研究として高く評価される。