



Title	ラット肝グルコルチコイドレセプターの存在様式の多様性について
Author(s)	笠山, 宗正
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35593
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	笠	山	宗	正
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	7536	号	
学位授与の日付	昭和	62年	2月	13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	ラット肝グルコルチコイドレセプターの存在様式の多様性について			
論文審査委員	(主査) 教授 岸本 進			
	(副査) 教授 垂井清一郎 教授 松本 圭史			

論文内容の要旨

[目的]

ステロイドホルモンレセプターはcell systemにおいて多様な存在様式をとり得ることが報告されているが、これはステロイド結合蛋白と他の細胞質因子とのinteractionやプロテアーゼによる蛋白分解に基づくものと考えられる。最近、レセプターの非活性化型はステロイド非結合蛋白を含むoligomerとして存在することが明らかにされたが、活性化型レセプターに関しても monomerとする意見と oligomerとする意見があり一定の見解が得られていない。本論文では、ラット肝グルコルチコイドレセプター(G R)の構造の多様性とその転換について、蛋白分解による修飾を除去した条件で検討した。

[方法]

- (1) 両側副腎摘出ラット肝より2倍容量の50mMリン酸カリ－1.5mM EDTA (K P E) 緩衝液にてサイトゾールを調製し、40nMの[³H]Triamcinolone acetonide (TA) と0℃3時間インキュベートし[³H]TA-G R複合体を得た。レセプターの活性化は25℃30分の加温または0.4M KCl域は0.1M NaSCN 30分の処理により行った。さらに種々の濃度のRNase AまたはT₁、ロイペプチジン域はT L C K存在下で活性化操作を行った。
- (2) DNA-セルロースはAlbertとHerrickの方法により調製し、[³H]TA-G R複合体の総合量を測定した。
- (3) [³H]TA-G R複合体を含むサンプルをショ糖密度勾配法(SDG)により分画し、各分画の[³H]TA結合をhydroxylapatite法により測定し沈降定数を求めた。
- (4) [³H]TA-G R複合体をDEAE-cellulose (DE52) カラムにかけ5mM リン酸カリ－1.5mM

EDTA-10mMモリブデン酸(Mo)(KPE Mo 5)緩衝液で洗浄後, 0-400mM KCl-KPE Mo 5緩衝液の直線濃度勾配により溶出させ, 各分画の放射活性を測定した。

- (5) 20mM Mo存在下でphosphocellulose(P11)及びDE52により部分精製したGRを[³H]dexamethasone 21-mesylate(DM)と0±2時間インキュベートし[³H]DM-GR複合体を形成した後55%硫酸で沈澱しMoを除去, 0.1M NaSCN処理によりGRを活性化し再びP11にかけ約1,000倍の精製度の標品を得た。

[成績]

- (1) GRのoligomer構造:[³H]TA-GR複合体を低塩下SDGで解析すると, その沈降定数は10.1±0.6S(mean±SDM)(n=5)を示し, これはMoを含むSDGにおける沈降定数と有意差を認めなかった。[³H]TA-GRを25±30分加温すると, ~10Sピークの他に7.3±0.5S(n=7)のピークが出現し, DNA-セルロースとの結合のピークは後者に一致した。
- (2) 活性化型[³H]DM-GR複合体の部分精製:[³H]DMによりアフィニティラベルし部分精製した活性化型[³H]DM-GR複合体はSDS-PAGEで分子量~94kDaとして認め蛋白分解を受けていないことを確認した。さらにこの部分精製GRは低塩下SDGで4.7±0.1S(n=3)を示し, これは肝サイトゾール添加により7.0Sに推移した。
- (3) GR構造に及ぼすMo及びRNaseの影響:サイトゾール中活性化型~7S[³H]TA-GR複合体をRNase AまたはRNase T₁で処理すると4.9S±0.2S(n=3)に転換し, ~7SがRNAまたはribonucleoproteinを含むoligomerであることが示唆された。Moにより安定化した非活性化型GRはRNase非感受性であり~10S構造を維持していた。

活性化型~7SはMoを含むSDGでは, 5.0±0.3S(n=11)としてみられ, Moが活性化型レセプターにも作用し~7S oligomerを~5S monomerに転換させることを明らかにした。

- (4) GR構造に及ぼすプロテアーゼインヒビターの影響:GR構造の多様性におけるプロテアーゼの関与を検討するため, ロイペプチド(Leu)とTLCKの影響を調べた。その結果, Leuは濃度依存性にGRの活性化を抑制することを, DNA-セルロースとの結合, 沈降定数, DE52からの溶出パターンの3種の定義により確認した。さらにLeuは活性化型GRに対しても作用し~7Sを~5Sに転換させた。一方TLCKは, GRの活性化を抑制せず活性化型GRのみを凝集させる作用を示した。

[総括]

- (1) ラット肝GRは~10S非活性化型oligomer, ~7S活性化型oligomer, ~5S活性化型monomerの3種類の存在様式をとり得る。
- (2) ~10S非活性化型レセプターは, cell free systemでは容易に活性化型レセプターに変換するが, MoおよびLeuにより安定化される。
- (3) ~7S活性化型レセプターはRNAまたはribonucleoproteinを含むoligomerであり, 高塩下で~5S monomerに可逆的に転換する。Mo及びLeuは~7Sから~5Sへの転換に作用し, 活性化型レセプターに対しても作用点を持つことが示された。

論文の審査結果の要旨

グルココルチコイドレセプター（G R）は、多様な構造をとり得ることが知られているが、その構造や生物学的意義についてはまだ充分知られていない。本研究では、ラット肝のG Rは、10 S oligomen, 7 S oligomen, 5 S monomeryの3種の形態をとり得ることを明らかにし、モリブデシ酸, RNase leupeptinを用いてその相互交換について検討を加えたものであり、G Rについて興味ある知見を加えたものである。