



Title	ラット肝グルコシ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、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

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 (GR) 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-1.5mMEDTA (KPE) 緩衝液にてサイトゾールを調製し、40nMの $[^3\text{H}]$ Triamcinolone acetonide (TA) と0℃3時間インキュベートし $[^3\text{H}]$ TA-GR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 T_1 、ロイペプチン域はTLCK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、 $[^3\text{H}]$ TA-GR複合体の総量を測定した。
- (3) $[^3\text{H}]$ TA-GR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 $[^3\text{H}]$ TA結合をhydroxylapatite法により測定し沈降定数を求めた。
- (4) $[^3\text{H}]$ TA-GR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 $[^3\text{H}]$ dexamethasone 21-mesylate (DM) と 0 ± 2 時間インキュベートし $[^3\text{H}]$ 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: $[^3\text{H}]$ TA-GR複合体を低塩下SDGで解析すると, その沈降定数は $10.1 \pm 0.6\text{S}$ (mean \pm SD) ($n=5$) 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。 $[^3\text{H}]$ TA-GRを 25 ± 30 分加温すると, $\sim 10\text{S}$ ピークの他に $7.3 \pm 0.5\text{S}$ ($n=7$) 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 $[^3\text{H}]$ DM-GR複合体の部分精製: $[^3\text{H}]$ DMによりアフィニティラベルし部分精製した活性化型 $[^3\text{H}]$ DM-GR複合体はSDS-PAGEで分子量 $\sim 94\text{kDa}$ 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 $4.7 \pm 0.1\text{S}$ ($n=3$) 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 $\sim 7\text{S}$ $[^3\text{H}]$ TA-GR複合体をRNase AまたはRNase T₁で処理すると $4.9\text{S} \pm 0.2\text{S}$ ($n=3$) に転換し, $\sim 7\text{S}$ 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 $\sim 10\text{S}$ 構造を維持していた。

活性化型 $\sim 7\text{S}$ はMoを含むSDGでは, $5.0 \pm 0.3\text{S}$ ($n=11$) としてみられ, Moが活性化型レセプターにも作用し $\sim 7\text{S}$ oligomerを $\sim 5\text{S}$ 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, ロイペプチン (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 $\sim 7\text{S}$ を $\sim 5\text{S}$ 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 $\sim 10\text{S}$ 非活性化型oligomer, $\sim 7\text{S}$ 活性化型oligomer, $\sim 5\text{S}$ 活性化型monomerの3種類の存在様式をとり得る。
- (2) $\sim 10\text{S}$ 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) $\sim 7\text{S}$ 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 $\sim 5\text{S}$ monomerに可逆的に転換する。Mo及びLeuは $\sim 7\text{S}$ から $\sim 5\text{S}$ 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 (GR) 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 GR 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、モリブデン酸, RNase len-peptin 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、GR について興味ある知見を加えたものである。