



|              |  |
|--------------|--|
| Title        | ラット肝グルコルチコイド未結合レセプターの精製と特性解析   |
| Author(s)    | 三井, 泰正   |
| Citation     | 大阪大学, 1987, 博士論文   |
| Version Type |  |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/35867">https://hdl.handle.net/11094/35867</a>  |
| 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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 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

## 【48】

|         |                                |
|---------|--------------------------------|
| 氏名・(本籍) | 三井泰正                           |
| 学位の種類   | 医学博士                           |
| 学位記番号   | 第7857号                         |
| 学位授与の日付 | 昭和62年8月3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  | ラット肝グルココルチコイド未結合レセプターの精製と特性解析  |
| 論文審査委員  | (主査)教授坂本幸哉<br>(副査)教授岸本進 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、標的細胞の特異的なレセプター(R)と結合し、複合体(RGC)を形成する。このRGCは、細胞内の様々な要因により活性化され、活性型RGCに変換される。この活性型RGCは核に移行して、クロマチンの特異的な構成成分(非ヒストン蛋白やDNAの特異的塩基配列)と結合し、遺伝子発現調節機構を介して、G作用を発現すると考えられる。Gが既に結合しているRGCの特性については多くの研究がなされ、その分子作用機構の概観は明らかになって来たが、未結合Rに関しては、その極度な不安定さ故に殆ど未知である。

そこで、副腎摘除ラット肝細胞質画分に存在する未結合GRの安定化と部分精製を試み、その特性について検討を加えた。

## [方法ならびに成績]

- 体重180-250gまで成長したドンリュウ系雄ラットを、副腎摘除して3日目に、断頭にて屠殺し肝可溶性画分を得た。この画分を、1%ストレプトマイシン及び0.075%硫酸プロタミンで処理し、生じた沈澱から160mMリン酸緩衝液(pH7.4, 20°C)を用いて抽出した。その抽出液をCMセルロース及びDEAEセルロースカラムにかけ、約3500倍程度の高度精製標品を得た。
- 精製標品の結合キネティックスを、スキャッチャードプロットで示すと、トリアムシノロンアセトナイト(TA)に対しては $K_d = 4 \times 10^{-9} M$ 、デキサメサゾン(Dex)に対しては $K_d = 5.3 \times 10^{-9} M$ であった。これらのKd値は、粗抽出液で求めた値とほぼ一致した。また精製標品の各種ステロイドホルモンに対する親和性を検討すると、TAやDexに対して高くエストロゲンやテストステロンに対しては低く、

明らかにGに特異性を示した。これらの結果は、これまで知られてきたGRの特徴とよく一致した。

3. 未結合Rを[<sup>3</sup>H]Dex-21-Mesylate(Mes)と共有結合させた後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行うと、分子量約95,000の位置に特異的な放射活性が検出された。

4. 精製未結合Rに、モリブデン酸存在下でRの活性化を促進する物質として知られているATPやピロリン酸を添加し、核への結合能を調べると、0°C、30分、あるいは20°C、30分インキュベートした条件下では殆ど核への移行結合が認められなかった。しかし、モリブデン酸を除いて同様の実験を行うと、著明に核への移行結合が見られた。特にピロリン酸添加を行った場合は、さらに顕著な核への移行結合を示した。このことより、ピロリン酸はRの機能と明らかに係わり合っており、精製未結合Rは活性型RGCの性質(ピロリン酸により活性型RGCの核への結合量が上昇する)を有していた。

5. 精製未結合Rをバーティカルローターを用いて、5-20%ショ糖密度勾配遠心法で解析を行った。精製未結合Rを[<sup>3</sup>H]TAと前もって結合させ、モリブデン酸存在、低塩濃度下で0°C、30分間放置し、その試料をモリブデン酸非存在、低塩濃度下で遠心を行うと、7Sに沈澱した。また20°C、30分加温したもののは4.5Sに沈降した。さらに、ATPやピロリン酸、また、0.4MKCIを添加して、0°C、30分間インキュベートした後遠心を行うと、活性型Rの沈降定数(4.5S)を得た。一方、精製未結合Rをショ糖密度勾配遠心にかけた後分画し、[<sup>3</sup>H]TAと結合させその沈降定数を調べると、モリブデン酸存在非存在とも9.5Sの沈降定数が得られた。同様の実験を高塩濃度下で行っても、やはり9.5Sの沈降定数が得られた。従って9.5SのRが7Sや4.5に変換されるためには、Gの結合が必須であることを示唆した。

### [総括]

1. 未結合GRを副腎摘除ラット肝上清から高度精製した。精製度は約3500倍であった。

2. 未結合R精製標品の親和性はTAやDexに対して高く、エストロゲンやエツトステロンに対しては低く、明らかにGに特異性を示した。TAに対するKdは約 $4 \times 10^{-9}$ M、Dexに対しては $5.3 \times 10^{-9}$ であった。

3. 精製未結合Rの核への結合能を、ATPやピロリン酸を添加し検討してみると、モリブデン酸存在下では0°C、30分、あるいは、20°C、30分インキュベートしたものは、殆ど核への移行結合が認められなかった。しかし、モリブデン酸を除くと、著明に核への移行結合を示した。

4. 精製Rと[<sup>3</sup>H]Dex-21-Mesが共有結合した複合体のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動では分子量約95,000の位置に特異的放射活性が見られた。

5. 精製未結合Rをショ糖密度勾配遠心にかけたあと、分画し、[<sup>3</sup>H]TAと結合させその沈降定数を調べると高塩濃度(0.41MKCI)下でも約9.5Sであった。従って9.5Sのオリゴマーが7Sや4.5に変換されるためには、Gの結合が必須であることを見出した。

## 論文の審査結果の要旨

本論文はグルココルチコイドレセプターの、特にホルモンが結合していない未結合グルココルチコイドレセプターに関して精製及びその特性を解析したものである。

既にホルモンが結合されているグルココルチコイドレセプター複合体においては数多くの研究がなされているが、本研究では極度な不安定さ故にその精製が非常に難しく、殆ど未知の分野のままである未結合グルココルチコイドレセプターの高度精製に初めて成功し、その特性解明に重要な示唆を与えており、今後グルココルチコイドホルモンの分子作用機構解明の進歩に大いに貢献することは確実である。従って博士論文として十分価値あるものと認める。