The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	レセプター・グルココルチコイド複合体のクロマチン結合様式の解析 ： レセプターとヒストンの相互作用
Author(s)	上田, 清隆
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36051
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

【36】

氏名・(本籍)	上田清隆（うえだ きよたか）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 8606 号
学位授与の日付	平成元年3月24日
学位授与の要件	医学研究科内科系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**レセプター・グルココルチコイド複合体のクロマチン結合様式の解析：レセプターとヒストンの相互作用**
論文審査委員	(主査) 教授 吉川 邦彦 (副査) 教授 坂本 幸哉　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，その標的細胞の核内で特異的遺伝子の発現調節を行うことにより，その作用を発現していると考えられている。Gはまず細胞質レセプターと結合し，レセプター・G複合体（GRC）を形成する。このGRCが活性化され，核に移行結合する。これら各ステップの機構については，最近かなり解明されてきた。しかし，活性型GRCの核内での動向，すなわち，クロマチンタンパク質への結合からその最終結合部位であるDNAのglucocorticoid response elements（GRE）に至るまでの機構については，未だ殆ど解明されていない。一方，ヒストンは，DNAの転写過程に非常に重要な役割を果たしているにもかかわらず，G作用機構との関係においては未知である。従って，本研究では，核内タンパク質，特にヒストンに注目し，DNA，ヒストン，GRCの相互関係について，in vitro の実験系を用いて解析し，これらのG作用機構への関与について検討した。

〔方　法〕

1）活性型GRC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GRC（活性型レセプター・[^{3}H] Triamcinolone acetonide 複合体）を約3,000 倍に精製した。以下，これを活性型GRCの部分精製標品として用いた。

2）活性型GRCのヒストンアガロースへの結合：ヒストンアガロース〔20μl（120μgヒストン)〕，及び部分精製した活性型GRC〔0.5 pmol（30,000 DPM）〕を用いた。このassay 系に諸因子を添加した。反応液を0℃，10分間incubateし，3回洗浄後，[^{3}H] GRCのヒストンアガロースへの結合量を測定した。

3）活性型GRCのDNAセルロースへの結合：DNAセルロース（10μg DNA），及び，部分精製した活性型GRC〔0.8 pmol（55,000 DPM）〕を用いた。このassay系に，種々のヒストン分子種（ヒストンH1，H2A，H2B，H3，H4）を添加した。反応液を，0℃，60分incubateし，3回洗浄後，[^{3}H]GRCのDNAセルロースへの結合量を測定した。

〔成　績〕

1）部分精製した活性型GRC（4.2 S，MW：98,000）をヒストンアガロースカラムに添加したところ，非常に強固に結合した。3M KCl や50% ethylene glycol で，溶出を試みたが溶出できなかった。しかし，20 mM pyridoxal 5'－phosphate（PALP）により効率よく回収できた。回収したGRCは，4.2 S型を保っていた。

2）活性型GRCがどのヒストン分子種に結合するかを検討した（ヒストンアガロースと活性型GRCの結合反応における各ヒストン分子種による競合阻害で解析した）。活性型GRCのヒストンアガロースへの結合は，ヒストンH3，及びH4で特に強く阻害され，ヒストンH2A，H2B で軽度に阻害された。ヒストンH1とは，ほとんど競合しなかった。親和性の順位は，ヒストンH3≧H4 ≫ H2A＞H2B であった。

3）活性型GRCのDNAセルロースへの結合量は，ヒストンH3，及びH4 の添加により著名に増大し，ヒストンH2A，及びH2B により軽度増大した。一方，ヒストンH1により著しく抑制された。DNA とヒストンは，非常によく結合することが知られているので，ヒストンH3，H4によるGRCの結合量の増大は，DNAセルロースに結合したこれらヒストンに活性型GRCが結合した結果であると推定される。また，ヒストンH1による抑制は，DNA セルロースに結合したヒストンH1と GRC が結合しなかったためと考えられる。

4）ヒストンアガロースに結合した活性型GRCは，PALPにより，量，及び時間依存性に溶出された（20mM，60分で，70%溶出）。しかし，ビタミンB_6誘導体である，pyridoxalでは一部が溶出されるのみであり，pyridoxamine, pyridoxamine 5'－phosphate，pyridoxine では，ほとんど溶出されず，この効果はPALP に極めて特異的であった。

5）活性型GRCは，PALPと$NaBH_4$ で前処理したヒストンアガロースにも，無処置のヒストンアガルースと同様に結合した。これは，PALPがGRCのリジン残基とSchiff塩基を形成することによりヒストンとの結合を減弱させていることを示唆している。

6）これまで活性型GRCとヒストンとの相互作用について解析してきた。そこで，非活性型GRCをヒストンアガロースカラムにかけて検討してみると，非活性型GRCもヒストンアガロースに結合した。しかし，非活性型GRCとヒストンとの結合は，活性型GRCよりも弱い結合であった。

〔総　括〕

1）活性型GRCは，非常に強固にヒストンと結合したが，20mM PALPで溶出することができた。PALP以外のビタミンB_6誘導体では，ほとんど溶出できなかった。

2）活性型GRCのヒストンの各分子種に対する親和性の順序は，ヒストンH3≧H4 ≫ H2A＞H2B であった。ヒストンH1 とは，結合しなかった。

3）活性型GRCのDNAセルロースへの結合は，ヒストンH3及びH4 により著名に増大し，ヒストンH1

により強く抑制された。

4）活性型GRCの方が，非活性型GRCよりも，ヒストンに対する親和性は大であった。

5）以上の結果は，活性型GRCがクロマチン構成成分であるコアヒストン（特にヒストンH3，H4）に結合して，クロマチンを転写可能な構造に変換させ，DNAのGRE部位への結合を容易ならしめている機構の可能性を示唆している。

論文の審査結果の要旨

本論文は，クルココルチコイド分子作用機構，特に活性型レセプター・グルココルチコイド複合体とDNA，そしてヒストンとの相互作用について研究したものである。活性型グルココルチコイドとヒストンが強く結合することを初めて明らかにし，グルココルチコイド作用機構におけるヒストンの重要性を示唆した。今後のグルココルチコイド遺伝子発現調節機構におけるクロマチン上のステップの解明に貢献する，興味深い研究である。