

Title	レセプター・グルコシル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	
Issue Date	
oaire:version	
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【36】

氏名・(本籍)	うえ	だ	きよ	たか
	上	田	清	隆
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・[³H] 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 [20 μl (120 μg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、[³H] 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 (10 μ g 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 $^{\circ}$ C, 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 \geq H4 \gg 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 (20 mM, 60分で, 70% 溶出)。しかし, ビタミン B₆ 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 NaBH₄ 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ロ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, 20 mM PALP で溶出することができた。PALP 以外のビタミン B₆ 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 \geq H4 \gg 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きであった。

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、グ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。