



Title	エストロゲン応答性マウス睾丸間質細胞腫樹立細胞株のエストロゲンレスプターの解析
Author(s)	宮下, 義博
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36740
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)	宮 下 義 博
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 8827 号
学位授与の日付	平成元年 8 月 12 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	エストロゲン応答性マウス辜丸間質細胞腫樹立細胞株のエストロゲンレセプターの解析
論文審査委員	(主査) 教授 岸本 進 (副査) 教授 谷澤 修 教授 松本 圭史

論文内容の要旨

〔目 的〕

エストロゲンレセプター (ER) は DNA に結合して遺伝子発現を制御している蛋白の一つである。ER の分子性状の転換と核への親和性の増大は遺伝子活性化に必要とされているが、この過程におけるホルモン結合の役割については不明な点が多い。これを解明するべき方法の一つとして、核への親和性や分子性状が通常の標的細胞とは異なる ER を持つ細胞を見いだすことが有用と思われる。今回エストロゲン応答性を示すマウス辜丸間質細胞腫由来の細胞株において、ER の細胞内局在の変異と特異な分子性状が見いだされたので検討を加えた。

〔方 法〕

マウス辜丸間質細胞種由来の樹立細胞株 B-1 は、10% fetal calf serum (FCS), 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Insulin, 10^{-8}M estradiol (E_2)-MEM で継代維持した。細胞増殖実験や [^3H] E_2 binding assay の開始前 2 - 6 日間は、0.01% デキストラン - 1% チャコール処理をした 10% FCS と 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Insulin を含む phenol red-free MEM で培養した。

細胞をホモゲナイズし、800xg, 5 分につづく 105,000xg, 60 分の遠沈にてサイトゾール分画を得た。800xg, 5 分の遠沈沈澱を 0.1% TritonX 処理したものを粗核分画, 0.4M KCl で抽出したものを核抽出分画とした。粗核分画を 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の DNaseI で処理することによって得られた ER を DNaseI 可溶性 ER とした。各分画の ER は、ハイドロキシアパタイトスラリーに結合させて洗浄のち [^3H] E_2 binding assay を行った。500nM の非標識 Diethylstilbestrol の存在下および非存在下で 5 nM [^3H] E_2 と 4 $^{\circ}\text{C}$, 18 時間 incubation を行った。また、各分画の ER を 30-45 $^{\circ}\text{C}$ で 1 - 3 時間ホルモンがない状態

で熱処理後、5 nM [^3H]E₂ と 4 °C、18時間で binding assay を行って熱安定性を比較した。

ER の分子サイズは高塩濃度下での 5 - 20% の蔗糖密度勾配法と Sephacryl S-300 を用いたゲルろ過にて検討した。ER のリン酸化の実験では、細胞を 20 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$, [^{32}P]PO₄³⁻ で 6 時間標識してサイトゾールを調製し、ビーズに固定した抗 ER モノクローナル抗体に結合後、抽出して部分精製した。

〔成 績〕

Whole cell binding assay では高親和性 (解離定数 Kd : 0.2nM) と低親和性 (Kd : 2nM) の ER が等比で認められたが、細胞を vanadate 存在下で培養すると高親和性 ER のみが認められるようになった。この結果は ER にリン酸化がおこっている可能性を示唆した。細胞を [^{32}P]PO₄³⁻ で標識して immunoaffinity column で精製することによりリン酸化 ER を同定しえた。細胞をホモゲナイズしたあとでは、ER は 96% が核分画に回収され、ホルモン非結合の状態でも核と強固に結合していると考えられた。0.4M KCl で抽出した非結合型核 ER (ER_{nKCl}) は、蔗糖密度勾配法では 6.0 S の位置に沈降し、ゲルろ過からは Stokes 半径は 5.5nm であった。分子量は 140,000 と計算された。一方、DNaseI で可溶化された ER (ER_{nDNA}) の沈降定数は 4.6 S, Stokes 半径は 3.3nm で分子量は 65,000 であった。SDSPAGE で ER 蛋白を分析すると、65,000 の位置にのみ [^3H]tamoxifen azirizine-ER 複合体が認められた。ラット ERcDNA をプローブとして Northern hybridization を行くと、6.2kb の ER mRNA のみ認められた。

これらの結果から、0.4M KCl 抽出では homodimer または hetero-oligomer 構造の ER_{nKCl} が、DNaseI 処理では ER monomer が可溶化されたと考えられる。ER_{nKCl} は熱に対して安定であったが、ER_{nDNA} は熱に対し容易にホルモン結合能を消失した。ER の機能については B-1 細胞の増殖を指標にした。E₂ の添加により B-1 細胞の増殖の促進が観察された。

〔総 括〕

通常の ER はホルモン非存在下ではサイトゾールに回収されるが、B-1 細胞の ER の多くは核分画に回収された。また、一般にホルモン非結合 ER は熱に不安定である。0.4M KCl の高塩濃度下で 5 ~ 6 S の多量体構造をとるホルモン非結合 ER というのもこれまで報告されていない。以上を考慮すると B-1 細胞の ER は次のような点で通常の ER とは異なる性質を持っている。(1)多くはホルモン非結合状態でも核に強固に結合して存在した。(2)ホルモン非結合状態で高塩濃度下で多量体 (沈降定数 6.0 S) として存在した。(3)多量体構造をとってホルモン結合能が熱に対して安定化していた。

これらの性質は B-1 細胞の ER 蛋白分子の大きな変異の存在を疑わせたが、SDSPAGE や Northern hybridization の結果からは、ホルモン結合単量体は単一で、しかも大きなアミノ酸領域の脱落はないと考えられた。ホルモン結合調節機構の一つであるリン酸化反応も認められた。また、ホルモン非結合 ER 多量体は、ホルモン結合活性型 ER 多量体とほぼ同じ分子量を持っていたが、細胞の増殖が E₂ により促進されたので、ホルモンがない状態では十分に機能しないと考えられた。

論文の審査結果の要旨

本研究は、エストロゲン応答性増殖を示すマウス睾丸間質細胞腫の樹立細胞株(B-1)のエストロゲンレセプターを解析し、通常とは異なる特性を見いだした。この細胞のレセプターはホルモン非結合状態においても核と強固に結合して存在し、0.4M KClの高塩濃度下で多量体構造をとっていた。これらの特性の発見は、エストロゲンレセプターの作用機序を考察するうえで大きな意味を持つ。