The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	グルココルチコイド・レスプター複合体の核への移行結合を阻害する物質の特性と肝部分切除後再生肝における変動
Author(s)	国府, 育央
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36935
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

【100】

氏名・(本籍)	国府育央（こくふいくお）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 8955 号
学位授与の日付	平成2年2月2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	**グルココルチコイド・レセプター複合体の核への移行結合を阻害する物質の特性と肝部分切除後再生肝における変動**
論文審査委員	(主査) 教授 森 武貞 (副査) 教授 坂本 幸哉　教授 谷口 直之

論文内容の要旨

（目　的）

グルココルチコイドは，細胞質に存在するレセプターと結合し，グルココルチコイド・レセプター複合体（GRC）を形成し，さらに活性型GRCに変換される。この活性型GRCが細胞質から核へ移行結合する。さらにグルココルチコイド感受性遺伝子の5′上流の特異的DNA塩基配列（GRE）を認識して結合し，遺伝子発現調節を介してホルモン作用を発現すると考えられている。この移行結合を阻害する物質としてMacromolecular translocation inhibitor（MTI）の存在が知られているが，我々の研究グループは，MTIは少なくとも三種類（MTI－I，－II，－III）存在することを報告してきた。そこで私はこれらMTIの生化学的特性と生理的意義の解明の一環として，ラット肝細胞質画分よりMTI－I，－II，－IIIを部分精製してその特性を解析し，さらに肝臓部分切除後再生肝における経時的変化と腫瘍細胞における動向を検討した。

（方法ならびに成績）

1）副腎摘除ラット細胞質画分より，DEAE－セルロースクロマトグラフィーを用い，stepwise法にて，MTI－I（0.1 M NaCl），MTI－II（0.2 M NaCl），MTI－III（0.3 M NaCl）を分離精製した。この方法は以前の直線的濃度勾配溶出法に比べ，混入もなく，MTI画分間の分離も改良された。

2）約3,000倍精製したGRCのラット単離核への結合に関しては，MTI－I，－II，－III画分とも著名に阻害した，

3）活性型GRCのDNA—セルロースへの結合に対するMTIの影響を調べたところ，MTI－Iは

阻害作用を示さず，ＭＴＩ－Ⅱは軽度阻害作用をし，ＭＴＩ－Ⅲは著名に，濃度依存的に阻害作用を示した。

4）RNase Ａの処理により，ＭＴＩ－Ⅲの阻害活性が約40％強くなった。この作用機作を解明するために，ゲル濾過を行なったところ，RNase Ａ処理により分子量が28,000から26,000と小さくなった。従って，ＭＴＩ－ⅢにＲＮＡが結合して，その作用修飾に関与していることが示唆された。

5）トリプシン，キモトプシンの処理によりＭＴＩ－Ⅱ，－Ⅲには影響なかったが，ＭＴＩ－Ｉの阻害活性はそれぞれ2.3倍，2.0倍となった。従ってプロテアーゼ処理によりＭＴＩ－Ｉが高活性型に変換されたり，混入しているＭＴＩ－Ｉ活性を阻害する因子が消化された可能性が示唆された。

6）活性型ＧＲＣとＭＴＩをインキュベートした後に，活性型ＧＲＣをショ糖密度勾配で沈降定数を調べたところ，いずれも約4.2Ｓであり，活性型ＧＲＣの沈降定数は，ＭＴＩによって影響を受けなかった。従って，ＭＴＩが活性型ＧＲＣと強く直接結合したり，あるいはプロテアーゼとして作用するという機作は，否定的であると考えられた。

7）70％肝臓切除後再生肝におけるＭＴＩの経時的変化を調べたところ，ＭＴＩ－Ｉは肝切後１日目から３日目に，ＭＴＩ－Ⅱは１日目から４日目に，ＭＴＩ－Ⅲは２日目から４日目にそれぞれ有意に阻害活性の増強がみられた。

　また，肝切除後再生肝におけるＤＮＡ合成期を調べるためにチミジンのＤＮＡへの取り込みについて実験を行なったところ，肝切後１日目にピークを示し２日目から４日目に比較的高値を示した。従って，これらＭＴＩに肝切除後１日目から４日目すなわちＤＮＡ合成期とそれに引き続いて起こる細胞分裂の時期に強い阻害作用を示した。以上のことより，肝切除後再生肝において，術後のグルココルチコイドレベルの上昇にもかかわらず，活発にＤＮＡ合成や細胞分裂が行なわれている一要因として，ＭＴＩの阻害活性の上昇が考えられた。

8）グルココルチコイドレセプター陽性，グルココルチコイド抵抗性細胞であるＡＨ130腹水肝癌細胞のＭＴＩ－Ｉ，－Ⅱ，－Ⅲの阻害活性を測定すると正常ラット肝に比べ，それぞれ８倍，４倍，３倍高値を示した。また，吉田肉腫のＭＴＩ－Ｉ，－Ⅱ，－Ⅲの阻害活性は，それぞれ10倍，11倍，12倍高値を示した。このことより，腫瘍細胞のグルココルチコイド抵抗性の一要因として，ＭＴＩの強い阻害作用も関与している可能性が示唆された。

（総　　括）

1）ラット肝可溶性画分より活性型ＧＲＣの核への移行結合を阻害する物質〔少なくとも三種類（ＭＴＩ－Ｉ，－Ⅱ，－Ⅲ）〕を以前より解像度よく分離した。

2）いずれのＭＴＩも活性型ＧＲＣの核への結合を著名に阻害するが，活性型ＧＲＣのＤＮＡ－セルロースへの結合に関しては，ＭＴＩ－Ⅲのみ強い阻害作用を示した。また，RNase ＡよりＭＴＩ－Ⅲが，トリプシン，キモトリプシンによりＭＴＩ－Ｉの阻害活性が強くなった。

3）ＭＴＩがＧＲＣに直接強く結合したり，あるいはプロテアーゼとして作用するという機作は，否定的であると考えられた。

4）ＤＮＡ合成や細胞分裂がさかんな時に，ＭＴＩは強い阻害作用を示し，生理的に大きな役割を果た

していると考えられた。

論文の審査結果の要旨

本研究は，活性型グルココルチコイドレセプター複合体（ＧＲＣ）が細胞質からクロマチンへ移行し結合する際の調節物質である高分子性移行結合阻害物質（ＭＴＩ）について生化学的解析を行ない，さらに生理的動態の解析を行なったものである。ラット肝可溶性画分より，ＭＴＩの部分精製を行ない，少なくとも３種類の標品を得た。これらＭＴＩの生理的変動を再生肝モデル系で検討すると，ＤＮＡ合成期や細胞分裂期に，強い阻害活性を示すことを見いだした。また，部分グルココルチコイド抵抗性を示す腫瘍細胞で，ＭＴＩはさらに強い阻害活性を示すことを見いだした。これらの知見は，グルココルチコイド抵抗性成立機構の解明に重要な研究であり，医学博士の学位を授与するに値するものと思われる。