

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、 ＜a href="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

氏名・(本籍)	こく	ふ	い	お
	国	府	育	央
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变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、MT I - II は軽度阻害作用をし、MT I - 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、MT I - 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、MT I - 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、キモトリプシンの処理によりMT I - II, - III には影響なかったが、MT I - 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MT I - I が高活性型に変換されたり、混入しているMT I - 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MT I 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、MT I によって影響を受けなかった。従って、MT I 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MT I の経時的变化を調べたところ、MT I - I は肝切除1日目から3日目に、MT I - II は1日目から4日目に、MT I - 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、肝切除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MT I 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、MT I の阻害活性の上昇が考えられた。

- 8) グルコルチコイドレセプター陽性、グルコルチコイド抵抗性細胞であるA H130腹水肝癌細胞のMT I - 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MT I - 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、腫瘍細胞のグルコルチコイド抵抗性の一要因として、MT I 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(MT I - I, - II, - III)〕を以前より解像度よく分離した。
- 2) いずれのMT I 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、MT I - III のみ強い阻害作用を示した。また、RNase A よりMT I - III が、トリプシン、キモトリプシンによりMT I - I の阻害活性が強くなった。
- 3) MT I 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、MT I 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。