Osaka University Knowledge Archive

Title	モノクロナール抗体を用いたノントランスフォーム型ステロイドレセプターの分子構造の解析
Author(s)	中尾, 皖英
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36954
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【39】

氏名・(本籍)	中尾皖英（なかお きよひで）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 8788 号
学位授与の日付	平成元年7月5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	**モノクロナール抗体を用いたノントランスフォーム型ステロイドレセプターの分子構造の解析**
論文審査委員	(主査) 教授 岸本 進 (副査) 教授 坂本 幸哉　教授 松本 圭史

論文内容の要旨

(目　的)

ステロイドホルモンの作用機作は，まずステロイドホルモンが濃度勾配にしたがって細胞内に入り，レセプターと結合してステロイドホルモン・レセプター複合体（S・R複合体）を形成する。このS・R複合体がクロマチンと強固に結合してその作用を発現するためには，トランスフォーメイションといわれる過程が必要である。この機構を解明するため，ノントランスフォーム型を安定化するモリブデン酸存在下でプロゲスチンレセプター（PgR）を部分精製後，これを抗原として作製したモノクローナル抗体を使用して，ノントランスフォーム型のサブユニット構造を解析した。

(方法ならびに成績)

1．抗プロゲスチンレセプターモノクロナル抗体の作製

家兎子宮サイトゾールをモリブデン酸添加リン酸緩衝液（PGTMA）にて作製し，[^{3}H] R－5020にて標識，ハイドロキシアパタイトおよびDEAEセルロースカラムで精製した。このレセプター標品をマウス（BALB／c）に免疫。その脾細胞とミエローマ細胞（P3$_x$63Ag8.653）よりハイブリドーマを作製し，スクリーニングおよびクローニングを行なった。その結果持続的に抗プロゲスチンレセプター抗体を産生するKN382／EC1株を確立した。

2．KN382／EC1産生抗体の特性

モリブデン酸を含む5mM PGTMA緩衝液で作製したサイトゾール [^{3}H] R－5020にて標識後，精製した抗体とインキュベートした。インキュベーション後100mM PGTMA緩衝液にて作製した5－20%庶糖密度勾配にて沈降係数を測定した結果，家兎及びヒト乳癌細胞株MCF－7のPgRと本抗体

は結合した。しかしラット，モルモット子宮およびニワトリ卵管PgRはこの抗体とは反応せず，種特異性の存在することが示された。なお庶糖密度勾配法にて，モリブデン酸非存在下では，この反応は観察されなかった。しかし高速液体クロマトで分析時間を短縮すると，モリブデン酸を必ずしも必要としなかった。

次に精製した本抗体を^{125}Iで標識してサイトゾールと反応させ，S値の変化を観察した。^{125}I標識抗体のピークそのものは7Sであるが，モリブデン酸非存在下では7.8−8.0Sモリブデン酸存在下では11Sとなった。すなわち，この抗体はステロイド結合サブユニット以外の蛋白と結合しており，ステロイド結合蛋白を指標とすると，モリブデン酸非存在下では抗原，抗体複合体からステロイド結合サブユニットが解離しやすいため，この蛋白との結合を検出できないと考えられる。

そこでこの抗体がいかなる蛋白と結合しているか同定するために，精製した抗体をアフィゲル10に結合させて，アフィニティカラムを作製した。このカラムにPGTMA緩衝液で作製したウサギ子宮サイトゾールを結合させて，100mM PGTMA緩衝液で洗浄後，SDS含有の電気泳動資料作製用緩衝液で溶出されてきたものをSDS−PAGEにかけるとクマジーブルーで59KDaおよび92KDaの蛋白がほぼ等量検出できた。さらにニトロセルロース膜に転写して再び抗体と反応させると，59KDaの位置のみバンドが見られ，この抗体は59KDa蛋白を認識することが判明した。次にステロイド結合蛋白を同定するため，サイトゾールを^{3}H−R5020でフォトアフィニティー標識を行い，上記のアフィニティーカラムに結合したものをSDS−PAGE後オートラジオグラフで解析すると，116KDaと90KDaのバンドが検出された。これは標識時に大量の非標識ステロイドを加えると消えるため特異的なステロイド結合部位と考えられる。以上よりサイトゾール中に59KDaと92KDaの蛋白が非共有的に結合した型で過剰に存在し，ステロイド結合サブユニットがノントランスフォーム型を形成しやすい環境を作っていると考えられる。

この抗体は，家兎肝グルココルチコイドレセプター，さらに家兎子宮エストローゲンおよびアンドローゲンレセプターとの結合が認められ，59KDa蛋白は他のノントランスフォーム型ステロイドレセプターとも共通のサブユニットであると考えられる。

（総　　括）

ノントランスォーム型ステロイドレセプターは，少なくとも59KDa，92KDa蛋白，およびステロイド結合サブユニットの三種の構成成分よりなるヘテロの多量体であると考えられる。そして59KDa，92KDa蛋白が共同してトランスフォーメイションをコントロールしている可能性が考えられる。

論文の審査結果の要旨

この論文は，ステロイドホルモンの作用発現機作上重要な過程であるトランスフォーメイション機構を解明しようとしたものである。著者がノントランスフォーム型プロゲステン受容体を抗原として作製した抗体は，59KDaの新しいノントランスフォーム型ステロイド受容体のサブユニットを認識してい

た。そしてこの蛋白はステロイド受容体のトランスフォーメイションをコントロールしている可能性があり，重要なファクターと考えられる。よって医学博士授与に値すると考えられる。