

Title	Purification and characterization of a macromolecular-translocation inhibitor III of activated glucocorticoid-receptor-complex binding to nuclei from rat liver
Author(s)	刘, 鋼
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39034
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〈/a〉をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	劉 鋼
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 11763 号
学位授与年月日	平成7年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学位論文名	Purification and characterization of a macromolecular-translocation inhibitor III of activated glucocorticoid-receptor-complex binding to nuclei from rat liver (“活性型”グルココルチコイド・レセプター複合体の核結合を阻害する高分子性阻害因子の精製と特性)
論文審査委員	(主査) 教授 中村 敏一 (副査) 教授 岡本 光弘 教授 谷口 直之

論文内容の要旨

【目的】

グルココルチコイドホルモン (G) は、その標的細胞内で特異的レセプター (R) に結合し、さらに活性化の過程を経て、“活性型” GR 複合体 (GRC) に変換される。その後、この活性型 GRC は核内に移行し、標的 DNA 塩基配列 [G response element (GRE)] に結合して、G 作用を発現すると考えられている。細胞質中には、この移行結合の過程を調節する物質の存在が知られている。我々は、ATP 存在下で移行結合を促進する因子 [ATP-Stimulated Translocation Promoter (ASTP)] と、逆の作用を持つ移行阻害因子 [Macromolecular Translocation Inhibitor (MTI)] の存在を報告してきた。更に、我々は、DEAE-cellulose column による MTI の分離精製を試み、ラット肝臓には少なくとも三種類の MTI 活性 (MTI-I, II, III) が存在する事を証明して来た。本研究において、私は、MTI の内、特に MTI-III に注目し、その高度精製法の開発を行い、その精製標品の生化学的諸特性を解析し、MTI-III の作用機構について検討した。

【方法】

- 1) 活性型 GRC の精製：副腎摘除ラット肝細胞質から、活性型 GRC [$[^3\text{H}]$ Triamcinolone acetonide (TA)・レセプター複合体] を約3,000倍に精製した。以下、全ての実験はこの高度精製活性型 GRC を用いた。
- 2) MTI-III の阻害活性の測定：反応液は、最終容量を250 μl とし、ラット肝精製単離核 (1×10^6 nuclei, 約10 μg DNA) と活性型 GRC (50,000dpm, 0.75pmol) を用い、4 $^{\circ}\text{C}$ で90分間 incubation の後、核に結合した GRC 量を測定した。MTI-III の阻害活性は、活性型 GRC の核への結合量を20%減少させるものを1 unit とした。

【成績】

- 1) MTI-III の精製と諸特性の解析：副腎摘除ラット肝細胞質画分から、DEAE-cellulose、酸処理、ゲル濾過 (Sephadex G-75)、S-Sepharose、MonoS 等によって MTI-III を電気泳動的に単一にまで精製した (4500倍)。以下、この精製標品を用いて、その生化学的諸性質について解析した。SDS 電気泳動で測定した分子量は69,000、ゲル濾過では68,000であった。その沈降定数は3.7Sであった。精製したMTI-III は、2 μg で GRC の核結合を50%阻害した。また単離核の代わりに、DNA-cellulose や Histone-agarose を用いて実験を行っても、MTI-III はほぼ同様の阻害率を示した。更に、MTI-III は活性型 GRC と GRE を含む57bp のマウス乳癌ウイルスの Long Terminal Repeat 部分 (MMTV-LTR) との結合も阻害した。

2) MTI-Ⅲの阻害作用機構の解析：精製MTI-Ⅲと活性型 GRC 及び MMTV-LTR の相互作用を glycerol 密度勾配遠心方法で解析した。活性型 GRC (沈降定数4.2S) を MTI-Ⅲと 4℃, 15分間 incubation すると、両者は結合して、約 6.8S に沈降した。この MTI-Ⅲと GRC の複合体に MMTV-LTR は結合できなかった。MTI-Ⅲ非存在下で、GRC と MMTV-LTR は結合し、約7.2S に沈降した。この GRC-MMTV-LTR 複合体に MTI-Ⅲを添加し、4℃で15分間 incubation すると、約60%の GRC が GRC-MMTV-LTR 複合体から解離し、GRC-MTI-Ⅲ複合体を形成した。同様の条件下で30分間 incubation すると、約90%の GRC が GRC-MMTV-LTR 複合体から解離し、MTI-Ⅲと複合体を形成した。以上の結果より、MTI-Ⅲの阻害作用機構は、MTI-Ⅲ活性型 GRC と直接接合する事により、GRC と GRE を阻害する事が分かった。

3) MTI-Ⅲと hsp70との異同についての解析：分子量が MTI-Ⅲと近似し、GRC と相互作用する事が示唆されている hsp70と MTI-Ⅲの異同について、抗 hsp70モノクローナル抗体を用いて、western blotting 方法で実験を行った。広く hsp70family と交叉反応する事が知られている抗 hsp70抗体は精製 MTI-Ⅲとは反応しなかった。従って、MTI-Ⅲは hsp70family の一員ではなく、新規の GRC 結合蛋白である。

【総括】

1) ラット肝グルコルチコイド・レセプター核結合阻害因子-Ⅲ (MTI-Ⅲ) を電気泳動的に単一にまで (約4500倍) 精製した。MTI-Ⅲの分子量は約68,000で、その沈降定数は3.7S であった。

2) MTI-Ⅲは GRC と核や DNA-cellulose 及び Histone-agarose の結合を阻害した。更に、MTI-Ⅲは GRC と標的 DNA 塩基配列 GRE を含む MMTV-LTR は結合を阻害した。

3) MTI-Ⅲの作用機構は直接 GRC と結合し、MTI-ⅢGRC 複合体を形成する事により GRC と DNA 結合を阻害することが示唆された。

4) MTI-Ⅲは hsp70family の一員ではなく、新規 GRC 結合蛋白であった。

論文審査の結果の要旨

グルコルチコイドホルモン (G) は、その標的細胞内で特異的レセプター (R) に結合し、さらに活性化の過程を経て、“活性型” GR 複合体 (GRC) に変換される。その後、この GRC は核内に移行します。最終的には標的 DNA 塩基配列 [G response element (GRE)] に結合して、G 作用を発現すると考えられています。この GRC の核への移行と、GRE に結合する step は遺伝子発現調節機構上重要な調節 step と考えられます。細胞質中には、この移行結合の過程を阻害する高分子性阻害物質 MTI (Macromolecular Translocation Inhibitor) の存在が知られている。本研究において MTI の内、特に MTI-Ⅲに注目し、その高度精製法の開発を行い、その精製標品の生化学的諸特性を解析し、MTI-Ⅲの作用機構について検討した。

その結果、MTI-Ⅲを電気泳動的に単一にまで精製した。MTI-Ⅲはゲル濾過による分子量6万8千、SDS-PAGE 電気泳動による分子量は約6万9千です。その沈降定数は約3.7S でした。MTI-Ⅲは核や chromatin, DNA-cellulose, Histone-agarose への GRC 結合を阻害した。更に、MTI-Ⅲは GRC と標的 DNA 塩基配列 GRE を含む MMTV-LTR の結合を阻害した。MTI-Ⅲの作用機構は直接 GRC と結合し、MTI-Ⅲ-GRC 複合体を形成する事により GRC と DNA 結合を阻害する事が示唆された。MTI-Ⅲは hsp70family の一員ではなく、新規の GRC 結合蛋白であった。

本論文は“活性型” GRC の核結合を阻害する高分子物質の精製と生化学的特性について述べたものであり、グルコルチコイド作用機構の解析に大いに貢献している。今後の発展が期待される独創的な研究である。学位論文として価値あるものと認める。