Osaka University Knowledge Archive

Title	Cloning of a novel kinase (SIK) of SNF1/AMPK family from high salt diet-treated rat adrenal
Author(s)	王, 志農
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41783
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

【 4 】

氏　　名	王（おう）　志（し）　農（のう）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学 位 記 番 号	第　14872　号
学位授与年月日	平成11年6月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科　生理系専攻
学 位 論 文 名	Cloning of a novel kinase (SIK) of SNF1/AMPK family from high salt diet-treated rat adrenal (高塩食処理ラット副腎からクローニングしたSNF1/AMPKファミリーに属する新規キナーゼ)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 岡本 光弘 (副査) 教 授 谷口 直之　教 授 高井 義美

論 文 内 容 の 要 旨

血中 Na^+/K^+ 濃度は副腎皮質のステロイドホルモン産生能を調節する重要な因子の1つである。ラットを高 Na^+ または K^+ 食で処理すると、副腎皮質細胞の細胞増殖、ミトコンドリア密度、ステロイドホルモンの合成や分泌に関わる種々の遺伝子の発現に変動をもたらせることが報告されている。副腎皮質細胞の血中塩濃度に対する応答はアンジオテンシンIIや副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）等ペプチドホルモンを介した経路と血中塩濃度自身が Ca^{2+} を介したシグナル伝達を活性化させる経路が存在する。しかしながら、これらのシグナルが副腎皮質の細胞内でいかなる経路により細胞機能を調節しているかは明らかにされていない。そこで本研究は副腎皮質機能のシグナル伝達に関与すると予想される分子をcDNAサブトラクション法により単離することを目的として行った。

(方法)

cDNAサブトラクション法により、高カリウム摂取を行ったラット副腎皮質で特異的に発現するcDNA断片の単離を行った。得られたcDNA断片の塩基配列をもとにRACE法を利用し、タンパクをコードする領域の5′-端、3′-端の塩基配列を決定した。決定した5′-端、3′-端でプライマーを作成し、再度PCRにより全長cDNAを単離した。

全長cDNAをグルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）との融合ベクターに導入し、大腸菌にてタンパクを発現させ、グルタオチン-カラムにて融合タンパクを精製した。精製した融合タンパクはin vitroで自己リン酸化活性の有無の検討に利用した。

高 Na^+、高 K^+ 食を1週間摂取したラット、またはACTH(0.1 mg/日)を1週間連続投与したラットの副腎から精製したRNAを用いノーザン法により遺伝子の発現誘導を検討した。さらに、マウス副腎皮質由来細胞（Y-1）をACTH（1 μM）の存在下で培養し、ACTHの副腎皮質細胞に対する直接的な効果を検討した。

(結果及び考察)

サブトラクション法により得られた高 K^+ 摂取したラット副腎特異的cDNAの塩基配列と既存の遺伝子とのホモロジーをデータベースを利用し検討した結果、本遺伝子がコードするタンパクはSNF1/AMPKファミリーに属する新規のプロテインキナーゼであることが示唆された。また、本遺伝子がコードするタンパクにはPEST配列というタ

ンパク分解に関与するドメインを有することが明らかとなった。

本遺伝子の Na^+/K^+ 摂取時での副腎皮質における発現量について詳しく検討したところ、正常の飼料ではほとんど発現が見られないが、高塩摂取時（Na^+、K^+ 共に）に発現誘導が観察された。そこで、本遺伝子を塩誘導性キナーゼ（SIK）と名付けた。

自己リン酸化活性をGST-SIK融合タンパクにて検討した結果、融合タンパクと分子量が一致する位置に自己リン酸化活性に由来すると予想されるリン酸化タンパクが検出された。

ACTHのSIK発現誘導に関する効果を検討した結果、ACTH投与ラットで投与後1日目からSIKの高い誘導が観察された。さらに副腎皮質由来細胞株であるY-1細胞をACTHで刺激すると、ステロイド合成酵素のmRNA誘導が検出するとされている時間よりも早く（約1時間以内に）からこの遺伝子のmRNA誘導が観察された。

（総括）

高塩処理ラット副腎から単離した遺伝子（SIK）は予想されるタンパクの1次構造から、新規のプロテインキナーゼであることが示唆された。また、SIKタンパクは半減期の短いタンパクであることも予想された。副腎皮質におけるSIKのmRNA誘導は高塩処理のみならずACTH処理でも誘導される。これらのことから、SIKは副腎皮質のステロイド合成を含む機能に関与する新規なシグナル伝達分子であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本論文は、新規タンパクリン酸化酵素（SIK）のcDNAをラット副腎皮質から高塩処理時に特異的に誘導される遺伝子として単離したことを報告したものである。SIKは一次構造上、ストレスによって活性化されるリン酸化酵素SNF-1/AMPKファミリーに属することが示唆された。SIKのmRNAはラット副腎において高塩処理のみならず、副腎皮質刺激ホルモンによっても誘導された。一方、副腎皮質細胞でのSIK mRNAの高発現はステロイド合成酵素のmRNAの発現を抑制した。SIKが属するSNF-1/AMPKファミリーは脂肪酸やステロールの合成阻害に関与することが報告されていることを考慮すると、SIKも副腎皮質においてステロイド合成の抑制的制御に関わるものと考えられる。本論文は副腎皮質での新たなステロイド合成の調節分子を同定したもので、博士（医学）の学位授与に値する。