The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Salt-Inducible Kinase Is Involved in the ACTH/cAMP-Dependent Protein Kinase Signaling Y1 Mouse Adrenocortical Tumor Cells
Author(s)	林, 星子
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43721
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

【27】

氏　　名	林（りん）　星（せい）子（こ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　16824　号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学　位　論　文　名	Salt-Inducible Kinase Is Involved in the ACTH/cAMP-Dependent Protein Kinase Signaling Y1 Mouse Adrenocortical Tumor Cells （マウス副腎皮質ガン細胞由来Y1細胞における塩誘導性キナーゼのACTH/cAMPシグナル系への関与）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　岡本　光弘 （副査） 教　授　三木　直正　　教　授　宮崎　純一

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

下垂体から分泌される副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）は副腎皮質細胞に作用しcAMPを主な2次メッセンジャーとする情報伝達系によって、ステロイドの分泌、ステロイド合成酵素の誘導、細胞増殖を促進することが知られている。

しかしステロイド合成酵素の誘導が起こるには数時間を要する。この現象を説明するために、cAMP以外の2次メッセンジャーが存在する可能性や、cAMPによって他の因子が新たに合成されてシグナル伝達系を修飾する可能性が示唆されているが、その分子機構は不明確である。

塩誘導性キナーゼ（SIK）は高ナトリウム食あるいは高カリウム食を投与したラットの副腎皮質において特異的に誘導される新しい遺伝子として単離された。SIKはN-末端側にキナーゼ領域をもち、SNF1/AMPKファミリーに属するセリン・スレオニン・プロティンキナーゼである。これまでの研究の結果、SIKは副腎皮質由来のY1細胞をACTHで刺激すると誘導されることが明らかとなった。本研究はACTHによるSIKの誘導現象とSIKのステロイド合成系に対する役割を解明することを目的とした。

【方法ならびに成績】

ラットの各組織におけるSIKの発現の程度をノーザンブロット法で検討した。その結果、SIKは副腎、卵巣、脳で発現していること、さらにACTH刺激後のラットでは副腎と卵巣での発現量が増加することが明らかとなった。SIKが副腎皮質のステロイドホルモン分泌の調節に関わる可能性を考え、副腎皮質ガン細胞由来のY1細胞を用いてその機能の解析を行った。Y1細胞をACTH(10^{-15}～10^{-6}M)で処理した後RNAを抽出し、SIKmRNAの変動を検討した。同時にY1細胞内に蓄積するcAMP量を測定した。その結果、ACTHの濃度が10^{-11}M以上になるとSIKmRNAが誘導され、このとき細胞内のcAMP量が増加することが明らかとなった。またY1細胞にForskolinや8-Br-cAMPを投与した場合にも、SIKmRNAの発現が見られた。この現象はY1細胞のPKA低発現変異株であるKin-7細胞では見られなかった。さらにKin-7細胞にPKAを強制発現させるとSIKmRNAの発現が見られた。これらの結果から、ACTHによるSIKmRNAの発現誘導はcAMP/PKA経路を介すると結論した。

Y1細胞をACTHとインキュベートし、SIKのmRNA、タンパク質量、キナーゼ活性の変動を時間を追って追跡

した。同時にステロイド産生にかかわる遺伝子であるCYP11A（コレステロール側鎖切断酵素）とStAR（Steroidogenic Acute Regulatory Protein）のmRNAを測定した。その結果、SIKのmRNA、タンパク質、酵素活性はACTH刺激後30分以内に誘導され、これらのレベルは2時間後にピークに達し、それ以後徐々に低下し6時間後には基礎レベルに復帰した。一方CYP11AとStARの遺伝子発現は約6時間後から有意に上昇した。さらにSIKを強制発現させた変異Y1細胞株を樹立し、この細胞をACTHで刺激したところCYP11AmRNAの発現は抑制された。

つぎにCYP11A遺伝子のプロモーター領域をルシフェラーゼ・レポーターに結合させたコンストラクトを作成してY1細胞に導入し、CYP11Aの遺伝子発現を解析する実験系を作った。この実験系を用いてforskolin刺激によるCYP11A遺伝子の活性化を観察し、同時にSIKを共発現させた場合と比較した。その結果、forskolin刺激によって上昇するCYP11A遺伝子プロモーター活性はSIKを共発現させると抑制されることが示された。

【総括】

Y1細胞におけるACTHによるSIKmRNAの誘導はcAMP/PKA経路を介することがあきらかとなった。また、ACTHによるSIKの誘導はCYP11A遺伝子の発現を抑制するように働くことが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究では高塩食を投与したラットの副腎皮質に特異的に誘導される新規のプロテインキナーゼ（SIK）のステロイドホルモン生合成における役割を解明した。

副腎皮質ガン細胞由来のY1細胞をACTHで刺激したところ、SIK遺伝子は極めて早期にcAMP/PKA経路を介して発現した。一方、ステロイドホルモン産生にかかわる遺伝子であるCYP11A（コレステロール側鎖切断酵素）遺伝子とStAR（Steroidogenic Acute Regulatory Protein）遺伝子はACTH刺激後8時間で発現した。SIKを過剰に発現するY1細胞株を樹立し、この細胞をACTHで刺激したところCYP11A遺伝子の発現は抑制された。またCYP11A遺伝子のプロモーター領域をルシフェラーゼ・レポーターに融合させたコンストラクトを作成してY1細胞に導入し、CYP11Aの遺伝子発現を解析する実験を行った結果、foskolin刺激によって上昇するCYP11A遺伝子プロモーター活性はSIKを共発現させると抑制された。このことはACTHによるステロイド産生応答のごく初期にSIKがステロイド産生を抑制することを示しており、ACTH刺激後ステロイド分泌が起こるまでに潜在期があることを良く説明する。以上、本研究はステロイドホルモン分泌応答の細胞内情報伝達機構に新たな知見を与えるものであり、博士（医学）の学位授与に値するものと考えられる。