

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、 〈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	林 星 子
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・プロテインキナーゼである。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 ($10^{-15} \sim 10^{-6} \text{M}$) 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、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。