

## 平成14年度自治医科大学研究奨励金研究成果報告

### グレリンによるインスリン分泌調節機構の解明

生理学講座統合生理学部門 出崎 克也

グレリンは、オーファンレセプターである成長ホルモン放出促進因子受容体 (GHS-R) の内因性リガンドとして胃から精製された新規ペプチドであり (Nature 402, 1999), 摂食中枢である視床下部弓状核にも局在する。グレリンは、強力な成長ホルモン放出と摂食亢進作用を持ち、摂食障害の治療への応用が期待されており、また、心不全ラットにおける体重増加と心機能改善が報告されている。一方、GHS-R は全身組織に広く分布しており、より広範な生理作用が推察されるが、未だ明らかにされていない。胃のグレリン産生細胞は、膵ランゲルハンス島の  $\alpha$  細胞に類似していることから、膵島におけるグレリンの存在および血糖調節への関与が示唆される。そこで本研究では、膵におけるグレリンのインスリン分泌調節機構を明らかにすることを目的とした。

#### 1. グレリン投与による血糖値の変化

一晩絶食させたマウスの腹腔内にグレリン (0.1-10nmol/kg) を投与すると、容量依存的に血糖値の上昇が観察された。一方、グレリン受容体 (GHS-R) 拮抗薬 ([D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 および [D-Arg<sup>1</sup>, D-Phe<sup>6</sup>, D-Trp<sup>7,9</sup>, Leu<sup>11</sup>]-substance-P) は、マウス血糖値を低下させた。

#### 2. 膵島におけるグレリンおよび GHS-R の局在

膵ランゲルハンス島におけるグレリンの局在を免疫組織化学的に検討した結果、ラット膵島においてグレリンの局在が観察された。さらに、RT-PCR 法を用いてラット膵島における mRNA の検出を行った結果、グレリンおよび GHS-R の mRNA の発現が確認された。

#### 3. グレリンのインスリン分泌抑制作用

ラット膵臓からコラゲナーゼ法により単離したランゲルハンス島を用いて、ELISA 法にてインスリン分泌を測定した。その結果、グレリン

(10nM) はグルコース (8.3mM) 誘発インスリン分泌を抑制した。一方、低濃度グルコース (2.8 mM) 条件下では、グレリンはインスリン分泌に影響しなかった。さらに、グレリン受容体 (GHS-R) 拮抗薬は、グルコース (5.6mM) 存在下でのインスリン分泌を増加した。

#### 4. 細胞内 Ca<sup>2+</sup>動態に対するグレリン作用

ラット膵臓ランゲルハンス島に Ca<sup>2+</sup>感受性蛍光色素 (fura-2/AM) を負荷し、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の変化を蛍光画像解析法を用いて測定した。その結果、グレリン受容体 (GHS-R) 拮抗薬は、膵島組織におけるグルコース刺激 (5.6-22.3mM) による細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇を有意に増加した。さらに、ラット膵臓ランゲルハンス島から単離した  $\beta$  細胞を用いて細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度を測定した結果、グレリン (10nM) はグルコース刺激による膵  $\beta$  細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度増加反応を抑制したが、トルブタミド、KCl およびアセチルコリン刺激による Ca<sup>2+</sup>濃度増加には影響しなかった。

本研究の結果から、内在性のグレリンが空腹時における過度な低血糖状態を防御している可能性が考えられる。その機序として、膵島内に存在するグレリンが膵臓  $\beta$  細胞におけるグレリン受容体に作用し、ATP 依存性 K チャネルの閉鎖過程より上流 (おそらくグルコース代謝過程) を阻害することによりインスリン分泌を抑制することが示唆される。今後、糖尿病や肥満とグレリン作用との関連を解明することにより、グレリンの病態生理学的意義を明らかにする予定である。

#### 筋分化過程に関わるスプライシング調節因子の同定と機能解析

生化学講座機能生化学部門 坂下 英司

多くの遺伝子において細胞、組織、あるいは

発生段階特異的なスプライシングバリエーションが報告され、選択的スプライシングが分化や発生過程に重要な役割を果たしていることが示唆されている。筋分化過程においては、筋芽細胞から筋管細胞への分化時に ATP 合成酵素  $\gamma$  サブユニット ( $F_{1\gamma}$ )、 $\alpha$ -、 $\beta$ -トロポミオシン、N-CAM など多くの遺伝子にスプライシング様式の変換が見られ、これらの分子変換が筋系の細胞機能に重要な役割を果たしていると考えられる。しかしながら、その調節機構の詳細に関しては不明な点が多い。我々は、線維肉腫細胞を用いた酸性刺激による可逆的な筋型スプライシング誘導系を確立していることから、この系を利用して、 $F_{1\gamma}$  をモデル遺伝子とする筋特異的スプライシング調節機構の解明を目指している。 $F_{1\gamma}$  は、心筋や骨格筋、酸性刺激下の線維肉腫細胞で、エキソン 9 が除外されるスプライシング様式をとる。これまでの解析で、エキソン 9 の除去にはエキソン 9 内のスプライシングサイレンサー配列が関与していることを明らかにした。そこで、本研究ではエキソン 9 選択に関するタンパク質性調節因子の同定を目的とした。

刺激前の線維肉腫細胞核抽出液を用いた *in vitro* 結合解析では 48kDa のタンパク質がエキソン 9 に結合することがわかった。また、酸性刺激後の核抽出液を用いた解析では 40kDa のタンパク質がエキソン 9 上のサイレンサー配列特異的に結合することがわかった。次にエキソン 9 に対するアフィニティ精製を行い、質量分析装置を用いたペプチドマスフィンガープリント法によるエキソン 9 結合タンパク質の同定を試みた。その結果、48kDa の候補因子として、RNA 結合タンパク質である La タンパク質、細胞増殖関連因子 2G4 が同定された。これら因子のスプライシングと関わりは不明であり、現在解析中である。40kDa の候補因子として heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 (hnRNP A3) と hnRNP A1 が得られた。そこで、hnRNP A3、hnRNP A1 が  $F_{1\gamma}$  ミニ遺伝子のスプライシングに及ぼす影響を *in vivo* スプライシング系で検討した。残念ながら筆者らは hnRNP A3 の全長 cDNA を得ることができていない。そこで、選択的スプライシングにより 47 アミノ酸短い A3 のアイソフォームを用い

たが、 $F_{1\gamma}$  の筋型スプライシングを促進する効果は見られなかった。今後、全長の cDNA を用いて検討する必要がある。興味深いことに、hnRNP A1 には筋型スプライシングをサイレンサー配列特異的に促進する活性があることがわかった。

本研究により、 $F_{1\gamma}$  の筋特異的スプライシングに関わる調節候補分子を同定した。A 型の hnRNP はエキソン上の特異的な配列に結合して、オリゴマーを形成し、エキソンをマスクするというスプライシング抑制モデルが提唱されている。それゆえ hnRNP1 A1 や A3 が  $F_{1\gamma}$  のエキソン 9 の除去に関わっていることは十分考えられる。実際に、hnRNP A1 は  $F_{1\gamma}$  のエキソン 9 を除去する活性を有した。しかしながら、hnRNP A1 や A3 の発現量は線維肉腫細胞を酸性刺激しても顕著な増加を示さなかった。それゆえ、酸性刺激による筋特異的スプライシング誘導は調節因子の量的変動によるのではない可能性も考えられた。我々はプロテインキナーゼ C による活性化が筋特異的エキソン除去に関与している結果を得ていることから、今後、hnRNP A1 や A3 の質的变化とシグナル伝達との関わりに着目し、さらに検討を進めていく予定である。

The Adenovirus E1A and E1B19K genes provide a helper function for transfection-based Adeno-associated virus vector production

Takashi Matsushita,  
Department of Virology

## Introduction

Adeno-associated virus (AAV) vectors have a unique set of desirable properties that make them the gene therapeutics of choice for clinical applications requiring long-term gene expression from post-mitotic tissues. For efficient AAV vector production, the adenoviral E1, E2A, E4, and VA RNA regions are required. Although it has been well established that the adenoviral E2A, E4, and VA