



Regulation by glucagon of serine: pyruvate / alanine: glyoxylate aminotransferase gene expression in cultured rat hepatocytes

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-28 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 内田, 千晴 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1566

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 289号	学位授与年月日	平成10年12月 2日
氏名	内田千晴		
論文題目	Regulation by glucagon of serine:pyruvate/alanine : glyoxylate aminotransferase gene expression in cultured rat hepatocytes (培養ラット肝細胞におけるセリン：ピルビン酸 / アラニン：グリ オキシル酸アミノ基転移酵素の遺伝子発現のグルカゴンによる抑 制)		

博士(医学) 内田千晴

論文題目

Regulation by glucagon of serine:pyruvate/alanine:glyoxylate aminotransferase gene expression in cultured rat hepatocytes

(培養ラット肝細胞におけるセリン：ピルビン酸/アラニン：グリオキシル酸アミノ基転移酵素の遺伝子発現のグルカゴンによる制御)

論文内容の要旨

〔はじめに〕

セリン：ピルビン酸アミノ転移酵素（以下SPTと略）は、ラット肝臓ではミトコンドリアとペルオキシソームの両方に存在し（それぞれのオルガネラのSPTをSPT_m、SPT_pと略す）、SPT_mのみがグルカゴンにより著しい誘導を受ける。SPTの遺伝子は単一であるが、第1エクソンに転写開始部位が2箇所存在するために、SPT_mとSPT_pそれぞれに対応する2種類のmRNA、SPT_m-mRNAとSPT_p-mRNAが合成される。SPT_m-mRNAは遺伝子のより上流側から合成されるため、SPT_p-mRNAよりも5'末端領域が長い。本研究の目的はグルカゴンによるSPT_m-mRNA量の選択的増大の機構についての詳細な情報を得ることである。そこでグルカゴンから下流の情報伝達系、遺伝子転写への影響などについて検討を行った。

〔材料ならびに方法〕

初代培養肝細胞を無血清培地で16~18時間、あるいは2時間培養後、グルカゴンその他の薬物を培地に加えた。一定時間培養後にRNAを抽出し、mRNA量の変動をノザンプロット法により解析した。転写活性は培養肝細胞から単離した核を用いるRun-onアッセイ法により測定、定量化した。また、この実験系においても、グルカゴン刺激により、SPT_m-mRNAのみが選択的に誘導されることを確認するために、リボヌクレアーゼプロテクション法により、グルカゴン刺激有無の条件下でmRNAの5'末端の長さを調べ、SPT_m-mRNA量とSPT_p-mRNA量の比較をした。

〔結果〕

無血清培地で16~18時間前培養した肝細胞を0.5μMのグルカゴンで刺激すると、刺激後2時間でSPT_m-mRNAの蓄積が確認され、その量は4時間から6時間後に最大量に達した。血清の有無に関わらず、刺激後0-1時間ではSPT_m-mRNAはほとんど検出されなかった。最大効果を与えるグルカゴン濃度は0.5μMであり、約20nMで半分の効果が得られた。Run-onアッセイ法を用いて転写活性を測定した結果、グルカゴン刺激後のSPT_m-mRNA量の増大は、SPT遺伝子の転写活性化によるものであることが明らかとなった。SPT遺伝子の転写活性はグルカゴン刺激後0~40分ではほとんど測定できないが、60分後で顕著となり、90分後で最大となった。また、リボヌクレアーゼプロテクション法によって、グルカゴンはSPT_m-mRNAのみを選択的に誘導することも確認された。

グルカゴンのかわりにcAMP誘導体である8-Bromo-cAMPで刺激してもグルカゴンとほぼ同じ効果が得られたが、プロテインキナーゼCの活性化剤であるTPA (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate) やカルシウムイオノフォアのA23187は単独でも両者の組み合わせでもSPT_m-mRNAを誘導できなかった。むしろTPAとA23187は、グルカゴンあるいは8-Bromo-cAMPによるSPT_m-mRNAの誘導を阻害する傾向を示した。またグルカゴン、あるいは8-Bromo-cAMPによるSPT_m-mRNAの誘導はAキナーゼ

の特異的阻害剤であるH89でほぼ完全に抑制された。

蛋白質合成阻害剤のシクロヘキシミド、糖質コルチコイドのデキサメサゾンも同様な抑制効果を示した。これらの薬剤の阻害効果について培養条件をいくつか変えて調べたところ、次のような興味深い結果が得られた。デキサメサゾンをグルカゴン刺激後30分経ってから添加すると、最初からデキサメサゾンとグルカゴンとの共存下で培養した時と同じように、SPT 遺伝子の転写活性は完全に阻害された。またシクロヘキシミドについては、薬物刺激前に行う無血清培養の時間の違いによって異なる影響が観察された。すなわち、シクロヘキシミドとグルカゴンを添加する前の16時間を無血清状態にした場合、グルカゴンによる転写活性上昇はシクロヘキシミドにより完全に抑制されたが、16時間を血清存在の条件で培養し、引き続き無血清培養を2時間に短縮すると、シクロヘキシミドの転写抑制効果は減少した。しかも、後者の条件下では、SPT 遺伝子の転写活性は前者の条件に比べ速やかに上昇し、グルカゴン刺激後20分で顕著となった。

〔考察〕

cAMP/Aキナーゼを介する転写に関わる核内転写因子の代表的なものとしてCREBが報告されている。CREBはCRE (cAMP応答性領域) に特異的に結合する蛋白質である。CREに結合したCREBはAキナーゼによってリン酸化されて転写活性化に働く。CREB以外にもCRE結合蛋白質は報告されており、これらの蛋白質因子はcAMP応答遺伝子に直接作用してその転写を速やかに活性化(通常30分以内で最大)する。本研究で興味深い点は、cAMPを介するSPT 遺伝子の転写は、転写活性の顕著な上昇までに40分以上必要である点、および蛋白質合成阻害剤シクロヘキシミドにより転写活性化が抑制される点である。これはグルカゴンによるSPT 遺伝子の発現にはcAMP/Aキナーゼが依存的に新規合成される蛋白質因子が必要であるという可能性を提示している。この新たな蛋白質因子は血清存在の培養条件においては、ある程度は合成されているらしい。無血清状態が長いと分解されて枯渇してしまい、cAMP 刺激後の新たな合成を待たなければSPT 遺伝子の転写を活性化できないと想像される。

〔結論〕

グルカゴンは主に、cAMP/Aキナーゼ系の信号伝達系を介してSPT 遺伝子の転写活性上昇を引き起こすことにより、SPTm-mRNA 合成を選択的に誘導することが明らかとなった。転写活性化に必要な因子の少なくとも一つは、刺激後に新規合成される蛋白質と考えられる。ラットSPT 遺伝子は2箇所の転写開始部位を持つことから、二重プロモータ遺伝子と予想されるが、新規合成される転写因子は一方のプロモータからの転写開始のみに寄与するらしい。本論文の実験結果から、SPT 遺伝子の誘導発現はAキナーゼ/CREBを介する階層的遺伝子発現の一例である可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

ラットSPT 遺伝子は単一遺伝子であり、その第一エクソン内に転写開始部位が2箇所存在する。各々の転写開始部位由来の遺伝子産物は異なる細胞内局在型、すなわちミトコンドリア局在型(SPTm)とペルオキシソーム局在型(SPTp)として発現する。興味深いことは、ラットへのグルカゴン投与により、5'上流側転写開始部位由来のmRNA(SPTm-mRNA)のみが著しく増量し、その結果SPTm活性の上昇が観察されることである。このグルカゴンによるSPTm-mRNA量の選択的増大の機構を解析するため、申請者は初代培養肝細胞を用いて、グルカゴンから下流の情報伝達系、遺伝子転写への影響などについて検討を行った。

種々の薬剤刺激後にSPTm-mRNA量の比較（ノザンプロット法）、mRNAの合成開始部位の確認（リボヌクレアーゼプロテクション法）、及び転写活性の測定（単離核を用いるrun-on転写活性測定法）を行った結果、グルカゴンは主に、cAMP/Aキナーゼ（PKA）系の情報伝達系を介してSPT遺伝子の転写活性上昇を引き起こすことにより、SPTm-mRNA合成を選択的に誘導することがわかった。この誘導はTPA及びA23187の共存により阻害されることから、Ca²⁺/Cキナーゼ系の情報伝達系は拮抗的に作用すると考えられた。

蛋白質合成阻害剤シクロヘキシミド（CHX）を共存させるとグルカゴン/cAMP応答性のSPTm-mRNA合成は抑制された。この時、薬剤添加の前処置である無血清培養時間を短縮すると、グルカゴンによるSPT遺伝子の転写はより速やかに活性化され、しかもCHXの阻害効果は押さえられた。しかし同じくcAMP応答性に転写活性化を受けるホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ（PEPCK）発現へのCHXの影響は全く観察されなかった。これらの結果から申請者は、cAMP刺激によるSPTm-mRNA誘導には新たな蛋白因子の合成が必要であること、この蛋白因子は血清存在の培養条件においては、ある程度は合成されているが無血清状態が長いと分解されて枯渇してしまい、cAMP刺激後の新たな合成を待たなければSPT遺伝子の転写を活性化できないと推測した。SPT遺伝子の誘導発現は、PEPCK遺伝子の発現機構、すなわちcAMP/PKAで活性化された因子（CREB）が直接標的遺伝子上流に作用して転写開始を促進する機構とは異なり、PKA/CREBを介する階層的遺伝子発現の一例である可能性が示された。

またデキサメサゾン（Dex）は通常、糖新生に関わる酵素（PEPCK、SPTなど）の誘導に対して許容的に働く（PEPCKはその例）が、グルカゴン応答性のSPTm-mRNA合成に対しては抑制効果を示した。DEXは既に最大活性を示すSPT遺伝子の転写を速やかにオフの状態にすることから、上記のcAMP応答性2次因子の発現を阻害するのではなく、転写制御因子のSPT遺伝子への結合あるいは転写因子間の相互作用を阻害することが予想された。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) SPT遺伝子のペルオキシソームへの標的シグナルについて
- 2) インスリンのSPT遺伝子に対する効果について
- 3) TPA、A23187が実験系において確かに効いているという証拠
- 4) TPA、A23187がcAMPによるSPTm誘導を抑制する機序について
- 5) グルカゴンがSPTm-mRNAの安定性に影響する可能性について
- 6) グルカゴンがSPTmを誘導する際に血清が関与するメカニズムについて
- 7) SPT遺伝子のプロモーター領域の解析について
- 8) SPT遺伝子のプロモーターを組み込んだレポーター遺伝子によるCATアッセイについて
- 9) HepG2細胞など、初代培養肝細胞以外の実験系について
- 10) デキサメサゾンがグルカゴンによるSPTm誘導を抑制する機序について
- 11) 核内受容体、AP-1などがSPT遺伝子に影響する可能性について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 教授 中村 浩 淑

副査 教授 小出 幸夫 副査 助教授 上里 忠良