



Title	Regulation of the Gene Expression of Glucokinase and L-Type Pyruvate Kinase in Primary Cultures of Rat Hepatocytes by Hormones and Carbohydrates
Author(s)	松田, たみ子
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37187">https://hdl.handle.net/11094/37187</a>
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=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>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

氏名・(本籍)	まつ 松 田 たみ子
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 9667 号
学位授与の日付	平成3年3月26日
学位授与の要件	医学研究科 生理系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	Regulation of the Gene Expression of Glucokinase and L-Type Pyruvate Kinase in Primary Cultures of Rat Hepatocytes by Hormones and Carbohydrates (ラット初代培養肝細胞におけるホルモン及び糖質によるグルコキナーゼとL型ピルビン酸キナーゼの遺伝子発現の調節)
論文審査委員	(主査) 教授 田中 武彦 (副査) 教授 田川 邦夫 教授 岡本 光弘

### 論文内容の要旨

#### (目的)

グルコキナーゼ(GK)とL型ピルビン酸キナーゼ(LPK)は、肝臓の糖代謝の調節に重要な役割を果たしている酵素である。ラットの肝臓におけるこれらの酵素の発現は、食餌やホルモンによって調節されている。すなわち、高糖質食で誘導され、絶食や糖尿病では抑制される。また糖尿病ラットにインスリンを投与すると、これらの酵素は正常値に回復するが、グルカゴンやcAMPはグルコースやインスリンによる誘導を抑制する。これらの制御は主に転写レベルでなされている。このように両酵素は同様の調節を受けるが、その調節機序は同じではないものと考えられる。たとえば、食餌性グルコースやインスリンによる誘導はGKのほうがLPKよりも早くみられるし、食餌性フルクトースとグリセロールによりLPKは誘導されるが、GKは誘導を受けない。このLPKに対するフルクースの作用機序は血漿インスリンレベルによって異なり、正常ラットでは転写レベルで、糖尿病ラットでは転写後のレベルで主として作用していると考えられる。以上の結果はin vivoでの研究から得られたが、in vivoでの実験は多くの因子によって影響を受けるので、ホルモンや糖質の個々の作用について明確な結論を得ることは困難である。したがってこれらを分離して解析するためには培養細胞を用いる必要がある。本研究ではラット初代培養肝細胞を用いてGKとLPKの遺伝子発現に及ぼすインスリンと糖質及びその代謝産物の影響を調べた。

#### (方法)

コラゲナーゼ灌流法で分離したラット肝細胞をシャーレに接着させ、無血清ウイリアムズE培地で一晩培養した後、ホルモン及び糖質を添加した。GK、LPK、 $\beta$ -actinのmRNA量の測定はチオシ

アン酸ゲアニジン／塩化リチウム法で調製した total RNA を用い、<sup>32</sup>Pでラベルしたラットの GK と LPK の cDNA 及びヒト  $\beta$ -actin の遺伝子断片をプローブとしてノーザンプロット法、ドットプロット法で行った。

(成 績)

- (1)  $0.1 \mu M$  の濃度のインスリン添加により、GK と LPK の mRNA は経時に増加した。すなわち、GK はインスリン添加直後より急速な増加を示し、12 時間後に最大値に達した。LPK は 6 時間以後から増加し始め 24 時間後にはほぼ最大値に達した。両 mRNA に対するこれらのインスリン作用はその濃度に依存し、 $10 nM$  で最大効果が示された。
- (2) LPK mRNA に対するインスリン作用は培地中の糖質やその代謝産物によって影響を受けた。すなわち、グルコース存在下ではその濃度に依存して著明な mRNA の増加がみられたが、2-デオキシグルコースやピルビン酸の存在下ではインスリン作用は認められなかった。フルクトースやグリセロール存在下でインスリン作用は認められたが、その程度はグルコース存在下でよりも非常に弱いものであった。どの糖質もインスリンの非存在下では効果が認められなかった。これらの結果からインスリンによる LPK mRNA の誘導はグルコースの代謝産物を必要とし、この物質はフルクトースやグリセロールからもある程度できることが示唆された。一方、GK mRNA のインスリンによる誘導は LPK とは対照的にグルコースが存在しなくても、また 2-デオキシグルコースの存在下でも同様に認められた。
- (3) 両 mRNA に対し、デキサメサゾンは単独では抑制的に作用したが、インスリンと共に存在するとその作用を著明に増強した。 $T_3$  は単独またはデキサメサゾンとの共存下では両 mRNA に対しそれほど影響を与えたが、インスリンとデキサメサゾンによる GK mRNA の誘導のみを著明に増加させた。cAMP は両 mRNA に対するインスリン作用を完全に抑制した。
- (4) 両 mRNA に対するインスリン作用はタンパク合成阻害剤のシクロヘキシミドにより抑制された。また、プロテインキナーゼ C の阻害剤である H7 によっても抑制されたが、ホルボールエステルは両 mRNA に影響を与えたかった。

(総括)

初代培養肝細胞を用いて GK 及び LPK の遺伝子発現に及ぼすホルモンと糖質の影響を検討した。GK と LPK mRNA は共にインスリンの濃度依存性に誘導されたが、その機序は異なっていた。すなわち GK に対するインスリン作用はグルコースの存在を必要としないが、LPK の場合はグルコースの代謝と密接に関係していることが示唆された。デキサメサゾンは LPK と GK に、 $T_3$  は GK に対するインスリン作用に permissive action のあることが認められた。両 mRNA に対するインスリン作用は共にタンパク質合成を必要とした。H7 はインスリン作用を抑制したが、ホルボールエステルの作用は認められなかったので、プロテインキナーゼ C は関与していないものと考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は初代培養肝細胞を用い、インスリンによるグルコキナーゼとL型ピルビン酸キナーゼの遺伝子発現の制御機構を解析したもので *in vivo* での研究をさらに発展させた。則ち、両遺伝子に対するインスリン作用に於けるグルコース代謝の必要性の有無、種々の糖質やその代謝産物との関係、グルココルチコイドや甲状腺ホルモンとの関係、タンパク質合成の必要性の有無等に関して新知見を得た。

これらの結果はインスリンによる遺伝子発現の制御機構の解明に寄与する所が大きく、学位論文として充分に値するものと考える。