

Title	Presence of glucagon- (1-21) -like immunoreactive substance in the dog small intestinal mucosa
Author(s)	伊藤, 秀彦
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/37605">http://hdl.handle.net/11094/37605</a>
DOI	
rights	
Note	

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

【 29 】

氏名・(本籍)	い	とう	ひで	ひこ
	伊	藤	秀	彦
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	9 2 7 9	号	
学位授与の日付	平成 2 年 7 月 11 日			
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当			
学位論文題目	Presence of glucagon-(1-21)-like immunoreactive substance in the dog small intestinal mucosa (イヌ小腸粘膜におけるグルカゴン(1-21)様免疫活性物質の存在)			
論文審査委員	(主査) 教授	垂井清一郎		
	(副査) 教授	矢内原千鶴子	教授	荻原俊男

論文内容の要旨

〔目的〕

グルカゴン関連ペプチドの分子構造と生理作用に関するこれまでの報告によれば、豚グルカゴンよりC端8ケのアミノ酸が少ないグルカゴン(1-21)は、豚グルカゴンと同等の腸管平滑筋弛緩作用を有する最小ペプチドであり、且つそのラット腸粘膜に対する trophic 作用は、豚グルカゴンより強力であると考えられる。一方、小腸におけるグルカゴン様免疫活性物質(gut glucagon-like immunoreactivity, gut GLI)はRIAにおいてグルカゴンC端特異抗体では認識されず、N端抗体にのみ認識されるペプチドと定義されており、現在までに glicentin, oxyntomodulin の存在が明らかにされているが、その他の分子形については明らかでない。そこで、この強力な生理活性をもつグルカゴン(1-21)が腸粘膜に存在し、gut GLIの一分子形となりうるか否か検討した。

〔方法〕

各グルカゴン免疫活性物質測定は、次の3種類の抗体を用いて検討した。

- ① AGS18: 豚グルカゴンC端を特異的に認識し、豚グルカゴン免疫活性を測定しうる。
- ② OAL196: 豚グルカゴンN端側を認識し、total GLIを測定しうる。
- ③ K291: グルカゴン(1-21)のC端部分を認識し、グルカゴン(1-21)様免疫活性(G21-IR)を測定しうる。

グルカゴン(1-21)はJ. Picazo博士より提供を受け逆相HPLCにて純度を確認した上使用した。雑種犬の腸粘膜を酢酸(0.5M酢酸にて15分間煮沸)あるいは酸・エタノール(7.5%エタノール)

ール/0.2M HC1にて5分間ホモゲナイズ)処理し,得られた抽出液中の total GLI, G21-IRを測定した。更に抽出液をアセトンにて処理した後(2倍量次いで8倍量のアセトンを加え遠沈し,2度目の沈澱を1M酢酸にて溶解)ゲル濾過及び3種類のHPLC(Nucleosil 5C<sub>18</sub>, MonoSHR5/5, PepRPC HR5/5カラム)により連続して分析した。分析は各クロマトグラフィーのG21-IR(K291にて測定)のピーク分画を更に次のカラムに供することにより実施した。

#### [成績]

- (1) グルカゴン(1-21)は,グルカゴンN端抗体(OAL196)とは良好に反応するが,グルカゴンC端特異抗体(AGS18)とは全く結合せず,RIA上gutGLIとして測定された。
- (2) K291を用いたRIA系において,グルカゴン(1-21)は抗体K291と良好に反応するが,グルカゴン, oxyntomodulin, グルカゴン(1-20)及びグルカゴン(1-22)はいずれもK291とほとんど反応せず,免疫交差性はグルカゴン(1-21)の0.05%以下であった。故にK291はグルカゴン(1-21)のC端部分を特異的に認識していると考えられた。腸粘膜抽出物の希釈曲線はグルカゴン(1-21)の標準曲線とよく一致し,腸粘膜抽出物中にG21-IRの存在することが証明された。
- (3) イヌ腸粘膜中のG21-IRは,十二指腸より結腸まで広く存在し,回腸末端で最も高濃度認められた。このG21-IR分布はtotalGLIの分布様式とはほぼ一致し,G21-IR濃度はtotalGLIの約5%であった。
- (4) 小腸粘膜抽出物のゲル濾過により,G21-IRはウマ心筋チクロームC(分子量12,384)のやや大分子側(ピークI),oxyntomodulin(分子量4,421)のやや大分子側(ピークII),グルカゴン(1-21)標準(分子量2,444)の位置(ピークIII)に主として3つのピークとして溶出された。次いでこのピークIII分画を3種類のHPLCカラムにより連続して分析したところ,どのstepにおいてもグルカゴン(1-21)標準と一致する位置にG21-IR,GLI両免疫活性を有するピークが溶出され,しかも最終段階の逆相HPLCでは単一ピークとして認められた。ピークI,IIはグルカゴン(1-21)分子とそのN端側への延長部分を含む未知のペプチドと考えられた。

#### [総括]

- 1) グルカゴン(1-21)は2種のグルカゴン抗体を用いたRIA系にて,gutGLIとして認識された。
  - 2) イヌ小腸粘膜にグルカゴン(1-21)様免疫活性物質が存在した。
  - 3) グルカゴン(1-21)様免疫活性物質は主として3つの分子形よりなり,最小分子形はグルカゴン(1-21)そのものと考えられた。
- 以上,グルカゴン(1-21)は,第3のgutGLIとして腸粘膜に存在することが明らかとなった。

## 論文審査の結果の要旨

グルカゴン（1-21）は腸平滑筋弛緩作用、腸粘膜の trophic 作用において、豚グルカゴンと比較し同等以上の活性を有することが知られている。本研究は、グルカゴン（1-21）のC端部分を特異的に認識する抗体と、ゲル濾過及び3種類のHPLCカラムを用い、犬の小腸粘膜中にこのグルカゴン（1-21）が存在することを明らかにした。また、グルカゴン（1-21）はRIAにおいて、gut GLIとして認識され、glicentin, oxyntomodulinについて第3のgut GLIとなることをも明らかにした。この成績は、gut GLIの新しい生理作用として、特に腸管における粘膜の増殖や平滑筋運動との関与を考慮する上で重要であり、学位に値すると判断される。