



Title	Expression and distribution of glucose-6-phosphatase catalytic subunit messenger RNA and its changes in the diabetic state.
Author(s)	新宮, 良介
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40870
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	新宮良介
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第13440号
学位授与年月日	平成9年11月4日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Expression and distribution of glucose-6-phosphatase catalytic subunit messenger RNA and its changes in the diabetic state. (グルコース-6-フォスファターゼ遺伝子の組織分布と糖尿病状態における発現の変化)
論文審査委員	(主査) 教授 松澤 佑次 (副査) 教授 萩原 俊男 教授 宮崎 純一

論文内容の要旨

【目的】

肝は生体の糖恒常性の維持という観点から重要な臓器である。生理的な血中グルコース濃度は、肝からの糖産生と筋などの末梢組織での糖利用とのバランスによって、維持されており、特に空腹時の血糖維持は、肝からの糖産生に依存している。インスリン非依存型糖尿病 (NDDM) では、肝糖産生の亢進が認められ、空腹時血糖値と強く正相関することが知られ、さらに、肝糖産生亢進の主な原因是、グリコーゲン分解よりはむしろ糖新生系活性の亢進によるものと考えられている。そこで、本研究では、糖尿病における高血糖成立機序を明らかにするべく、肝糖新生系酵素遺伝子の発現調節機構を詳細に分析することを目的として、肝糖新生系の最終段階の律速酵素である、Glucose-6-phosphatase (G6Pase) に注目し、遺伝子構造、遺伝子発現の組織分布を明らかにすると共に、糖尿病モデル動物において、インスリンによる発現調節について検討した。また、糖尿病状態における肝糖産生機構の全体像を知るために、糖新生系および解糖系の各酵素群の酵素活性と遺伝子発現を、NIDDM モデルラットにおいて検討した。

【方法】

1. rat liver G6Pase catalytic subunit cDNA 全長の cloning

雄性 5 週令 SD ラット肝より acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform (AGPC) 法で抽出した total RNA に対して、random primer を用いて、first strand cDNA を作成した。マウス G6Pase catalytic subunit cDNA 配列を参考にした primer を作成し、coding region の cDNA を reverse-transcription (RT) polymerase chain reaction (PCR) cloning した。ついで、5' および 3' non-coding region について、Rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法により cDNA を単離し、これらを dideoxy 法にて全塩基配列を決定した。

2. G6Pase mRNA 発現の検討

24時間絶食後の雄性 5 週令 SD ラットの肝、腎、脾、副腎、心、筋、精巣、臍ラ氏島、臍、脂肪、胃、十二指腸、空腸、回腸、大腸、脳、肺の各組織から AGPC 法にて total RNA を抽出し、G6Pase mRNA 発現の組織分布をノザン分析および RT-PCR により検討した。また、マウスで streptozotocin (STZ) 糖尿病動物を作成し、インスリン欠乏

状態(ケトーシス)群に対するインスリン投与の有無によるG6Pase遺伝子の発現様式を、肝、腎においてノザン分析で検討した。

3. NIDDM モデルラットにおける肝糖代謝の検討

肥満を伴うNIDDMのモデル動物であるOtsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラットと、対照としてLong Evans Tokushima Otsuka (LETO) ラットを用いた。生後16, 28, 40週令において、自由摂食時に血糖および血中インスリン、グルカゴン濃度を測定した。また、肝での解糖系酵素(glucokinase(GK), liver type phosphofructokinase(PFK-L), liver type pyruvate kinase(LPK))と糖新生系酵素(G6Pase, fructose 1, 6-bisphosphatase(FBPase), phosphoenolpyruvate carboxykinase(PEPCK))の酵素活性とmRNAの発現量を測定した。

【成績】

1. rat liver G6Pase catalytic subunit cDNAの構造

全長は2275 base pair (bp) で、coding regionは1071 bpで357個のアミノ酸をcodeしていた。マウス、ヒト配列とのhomologyは、coding regionの塩基レベルで、各々93.1%, 84.5%, アミノ酸レベルで94.1%, 89.9%であり、種間に高い保存性を認めた。

2. rat liver G6Pase mRNAの組織分布

ノザン分析では、肝、腎に極めて強い発現を示し、脾、副腎に弱い発現を認めた。RT-PCRでは、検討した全組織でmRNAの存在を確認した。

3. STZ 糖尿病マウスの肝、腎におけるG6Pase遺伝子のインスリンによる発現調節

Control無処置群、糖尿病ケトーシス群、インスリン投与群でG6Pase mRNAの発現を比較したところ、肝においては、control(自由摂食時)群ではmRNA発現量が極く弱かったのに対して、STZ投与ケトーシス群では著増し、さらにインスリン投与によりcontrolのレベルまで抑制された。これに対して、腎ではcontrolですでに高い発現を認め、これはSTZ、インスリン投与のいずれにおいても変化しなかった。

4. OLETF ラットにおける肝糖代謝酵素の活性とmRNA発現量

16, 28, 40週のいずれにおいても、OLETFでは血糖、インスリンレベルは高く、特に16週では明らかな高インスリン血症を示した。グルカゴンには有意な差は無かった。GK, LPKの酵素活性とmRNA量はOLETFで上昇していた。また、OLETFではG6Pase, FBPaseの酵素活性、mRNA発現量が高インスリンレベルでも抑制されておらず、上昇していた。

【総括】

本研究では、rat liver G6Pase catalytic subunitのmRNA構造を明らかにし、その結果、肝糖産生の調節機構を糖新生系、解糖系に関与する全ての律速酵素について、遺伝子レベルで総合的に検討することを可能とした。mRNA発現の組織分布の検討からは、筋、臍ラ氏島でmRNAの発現が確認されたことは、これらの組織における糖新生系の役割を糖尿病の病態生理から考える上で有意義である。つまり、筋でのglucose uptake, utilizationや、臍beta細胞でのglucose sensing機構などにおいて、糖新生系が関与している可能性を示唆するものと考えられる。しかし、今回の検討により、従来考えられていた、肝、腎、小腸、脳などの他に広範な組織でその発現が確認されたが、これらの組織における本遺伝子の発現の意義については、今後の検討が必要である。また、STZ糖尿病動物での検討からは、主要な糖産生臓器である、肝、腎において、インスリンによるG6Pase遺伝子の発現調節機構が一様ではないことが明らかとなった。

肥満NIDDMモデルであるOLETFラットの検討では、摂食時や高インスリン血症時において、本来その発現が抑制されているはずの糖新生系酵素の活性が、むしろ亢進していることが明らかとなった。これは、本モデル動物では、肝でのインスリン作用不全、すなわちある種のインスリン抵抗性が存在していることを示すものと考えられた。すなわち、ヒトのNIDDMにおいても、初期に肥満を伴う例では、肝におけるインスリン抵抗性が、糖尿病の成立あるいは進展のメカニズムの一つとして関与している可能性を示唆するものである。

論文審査の結果の要旨

本研究は、肝糖新生系の最終段階の律速酵素である、グルコース-6-フォスファターゼ (G6Pase) の cDNA クローニングを行い、同遺伝子の組織特異的な発現様式を検討することによって、従来、タンパクレベルで示唆されていた、本酵素の生理的意義を分子生物学的に明らかにしたものである。特に肝、腎などの糖新生が活発に行われる組織以外にも、G6Pase の発現があることを明らかにしたことは、組織内グルコース代謝を詳細に分析する上で重要な意義を有する。これらの検討を基盤として、さらに G6Pase の糖尿病病態への関与を検討するため、インスリン欠乏、インスリン抵抗性の両モデル動物を用いて、本遺伝子の発現調節を分析した。その結果、糖尿病の主要な病因、病態を規定する、上記いずれの状態においても、G6Pase 遺伝子の発現増強、ないしはインスリンによる同遺伝子発現の抑制不全が存在することが判明した。このことから、糖尿病における肝糖産生の亢進には、G6Pase 遺伝子の発現亢進が関与することが示された。

以上のように、本研究は、糖尿病発症とその病態の進展における肝糖新生系の関与のメカニズム解明に新たな道を開くものであり、学位に値すると認めるものである。