



Title	Somatostatin induces hyperpolarization in pancreatic islet $\alpha$ cells by activating a G protein-gated K <sup>+</sup> channel
Author(s)	松田, 由喜子
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41693">https://hdl.handle.net/11094/41693</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="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;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	まつ だ ゆ き こ 松 田 由 喜 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 4 5 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平成11年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学 位 論 文 名	Somatostatin induces hyperpolarization in pancreatic islet $\alpha$ cells by activating a G protein-gated K <sup>+</sup> channel (膵臓ラ氏島 $\alpha$ 細胞においてソマトスタチンはG蛋白質制御性カリウムチャネルの活性化を介して膜電位を過分極する)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 倉 智 嘉 久  (副査) 教 授 福 田 淳 教 授 三 木 直 正

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【目的】

様々な神経伝達物質やホルモンは膵臓ラ氏島からのホルモン分泌を抑制する。 $\beta$ 細胞からのインスリン分泌はノルアドレナリンやソマトスタチンやガラニンによって抑制される。一方、 $\alpha$ 細胞からのグルカゴン分泌はソマトスタチンによってのみ抑制されることが知られている。これら神経伝達物質やホルモンの分泌抑制効果は膜電位変化と密接に関わっていることが、脳や脳下垂体において詳細に研究されてきた。しかし、膵臓ラ氏島における分泌細胞、特にグルカゴン分泌を行なう $\alpha$ 細胞に関しては全く知られていない。 $\alpha$ 細胞から分泌されたグルカゴンは、それ自身または $\beta$ 細胞からのインスリン分泌を調節することにより、生体内の血糖調節という重要な役割を果たしている。本研究では、グルカゴン分泌を抑制的に制御するソマトスタチンの膜電位に対する効果およびその作用機序を調べ、関与するイオンチャネルの分子同定を行なうことを目的とした。

### 【方法ならびに成績】

8週齢マウスから膵臓ラ氏島を単離し、単一細胞に分離して1～6日間培養した。グルコース非存在下で自発発火を行なうこと、または分泌物質であるグルカゴンの発現をRT-PCR法により検出することにより、 $\alpha$ 細胞を確認し、patch-clamp法を用いて電気生理学的解析を行なった。

perforated patch-clamp法により $\alpha$ 細胞の膜電位変化を測定すると、ソマトスタチンは膜電位を $\sim -70$ mVにまで過分極させた。この過分極効果はATP感受性カリウムチャネルのブロッカーであるSU剤（トルブタミド）存在下でも抑制されず、百日咳毒素処理により抑制された。さらにpipette内にGTPが存在する条件で、whole-cell patch-clamp法を行なったところ、ソマトスタチンで膜電位過分極を起こしているチャネルはATP感受性カリウムチャネルではなく、三量体G蛋白質Gi/oを介して活性化された内向き整流性カリウムチャネルであることが示唆された。このソマトスタチンで活性化されるカリウムチャネルの単一チャネルの性質を、single channel recordingにより詳細に解析した。細胞内側にG蛋白質活性化剤であるGTPおよびGTP $\gamma$ Sを加えることにより、脳で報告されているG蛋白質制御性カリウムチャネルとよく似た性質のチャネルが活性化された。さらに、牛脳から精製されたG蛋白質の $\beta\gamma$ サブユニットによってもこのカリウムチャネルは活性化された。

そこで、我々は既に報告されているK<sub>G</sub>チャネルの各サブユニットmRNAの膵臓ラ氏島における発現をRT-PCR

法により調べたところ、Kir3.2c および Kir3.4 の発現のみが検出された。各サブユニットを特異的に認識する抗体を作製し、膵臓ラ氏島の免疫組織学的解析を行なったところ、mRNA の発現結果と一致して、膵臓ラ氏島において蛋白質レベルでも、Kir3.2c および Kir3.4 の発現が認められた。またその局在は、Kir3.2c においては  $\alpha$  細胞の存在する膵臓ラ氏島辺縁に強く、Kir3.4 は膵臓ラ氏島全体に一樣に認められた。Kir3.2c の局在が  $\alpha$  細胞と一致することを検討するために、グルカゴンと Kir3.2c に対する抗体で二重染色を行なうと、Kir3.2c は  $\alpha$  細胞に存在することが明らかとなった。以上の結果から、 $\alpha$  細胞に発現する  $K_c$  チャンネルは Kir3.2c および Kir3.4 により構成されている可能性が示唆された。

さらに、Kir3.2c、Kir3.4 およびムスカリン受容体を HEK293T 細胞に発現させ、patch-clamp 法により単一チャンネルの性質を調べた。アセチルコリンで活性化された Kir3.2c/Kir3.4 チャンネルは、シングルチャンネルコンダクタンスが  $\sim 30$  pS で、open time が  $\sim 0.2$  ms の速いカイネティクスを示した。この性質は  $\alpha$  細胞でソマトスタチンにより活性化される  $K_c$  チャンネルと一致した。

#### 【総括】

ソマトスタチンは G 蛋白質制御性カリウムチャンネルの活性化を介して、膵臓ラ氏島  $\alpha$  細胞の膜興奮を抑制すること、膵臓ラ氏島の G 蛋白質制御性カリウムチャンネルは  $\beta$  細胞ではなく主に  $\alpha$  細胞で発現／機能していること、を明らかにした。さらに、この  $\alpha$  細胞で働く G 蛋白質制御性カリウムチャンネルは、Kir3.2c および Kir3.4 で構成されている可能性が強く示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

本申請者は、本研究において、マウス膵臓ラ氏島からグルカゴンを分泌する  $\alpha$  細胞を単離し、ソマトスタチンにより活性化されるカリウムチャンネルを電気生理学、分子生理学および免疫組織学的手法を用いて解析した。その結果、(1)ソマトスタチンは G 蛋白質制御性カリウムチャンネルの活性化を介して、 $\alpha$  細胞の膜興奮を抑制すること、(2)膵臓ラ氏島の G 蛋白質制御性カリウムチャンネルは  $\beta$  細胞ではなく主に  $\alpha$  細胞で機能していること、を明らかにした。さらに、この  $\alpha$  細胞で働く G 蛋白質制御性カリウムチャンネルは、Kir3.2c および Kir3.4 で構成されている可能性を示唆した。

本研究は、実験結果自体の意義もさることながら、今後の発展性にも期待できるものがあり、生命科学への貢献度が極めて高い研究といえる。したがって、学位授与に十分値すると考えられる。