

氏 名	ほそ だ ひろ し 細 田 洋 司
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2449 号
学位授与の日付	平 成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	医 学 研 究 科 脳 統 御 医 科 学 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Purification and characterization of rat des-Gln14-Ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. (新たな内因性成長ホルモン分泌促進ペプチド des-Gln14-Ghrelin のラット胃からの精製と構造決定)
論文調査委員	(主 査) 教 授 中 尾 一 和 教 授 千 葉 勉 教 授 成 宮 周

論 文 内 容 の 要 旨

成長ホルモン (GH) は下垂体前葉から分泌されるが、その分泌調節は視床下部からの2つのホルモン、すなわち促進因子の成長ホルモン放出ホルモン (GHRH) と抑制因子のソマトスタチンによって制御されていると考えられてきた。近年、成長ホルモン分泌促進因子 (growth hormone secretagogue; GHS) と呼ばれる合成化合物の開発によって、新たな GH 分泌調節機構の存在が明らかになってきた。GHS とは GH 分泌促進活性を示す一群のペプチド性および非ペプチド性化合物の総称で、GHRH とは異なる受容体を介して GH 分泌を刺激する。1996年に GHS に対する特異的な受容体 (GHS-R) がクローニングされ、内在性 GHS の存在が強く示唆された。GHS-R は膜7回貫通型の G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の一つである。

本研究では GHS-R の安定発現細胞系を樹立し、細胞内 Ca イオン濃度の上昇活性を指標に内因性リガンドの検索を行った。ラット全身組織について検索した結果、胃組織抽出物のゲル濾過画分に強い活性を見出し、活性ペプチドを単離・精製した。ペプチド・シークエンサー及び質量分析計を用いて構造解析を行ったところ、本ペプチドはアミノ酸28残基からなり、3番目のセリン残基が n-オクタノイル化された新規ペプチドであることが判明した。また、この O-n-オクタノイル化はその活性発現に必須であった。この新規 GH 分泌促進ペプチドはグレリン (ghrelin) と名付けられた (参考論文1) グレリンの精製過程において、さらに別の活性画分を認め、精製・構造解析を行った。その結果、もう一つのリガンドはアミノ酸27個で、グレリンの14番目のグルタミン残基が欠如していることが明らかになり、3番目のセリン残基は同様に n-オクタノイル化されていた。本ペプチドはラット胃から同定されたグレリン第2の分子型で、des-Gln14-ghrelin と名付けられた。ラットの胃 cDNA library からこれら2つのペプチドの cDNA クローニングおよびゲノム遺伝子構造解析の結果、ラット・グレリンと des-Gln14-ghrelin の遺伝子は単一で、alternative splicing によりこの2種類のペプチドの前駆体 mRNA が生じることが判明した。これはグレリン分子中の13-14番目に2残基連続してグルタミンが存在し、これをコードする CAG codon の AG が splicing のシグナルとしてはたらくことにより、グルタミンが1残基欠落するためである。このように生理活性ペプチド内の alternative splicing により2つの分子種が生合成されるのは今回のグレリンが初めてである。グレリンと des-Gln14-ghrelin は、GHS-R 発現細胞内の Ca イオン濃度上昇活性およびラットにおける GH 分泌活性において生物活性は同等であった。グレリンに特異的なラジオイムノアッセイ (参考論文2) を用いて、グレリンおよび des-Gln14-ghrelin の胃組織内含量を検討したところ、des-Gln14-ghrelin はグレリンの4分の1程度存在することが明らかになった。

グレリンの同定によって、新たに胃一下垂体経路による GH の分泌調節系の存在が明らかになった。またラット胃においては、グレリンと des-Gln14-ghrelin の2つの分子型が存在し、血中ホルモンとして機能していると考えられる。

論文審査の結果の要旨

ラット胃からの成長ホルモン分泌促進ペプチド「グレリン (Ghrelin)」の発見により、胃一下垂体経路による新たな成長ホルモン (GH) 分泌調節機構の存在が明らかになった。

申請者は、本研究で、グレリン・ファミリーのペプチドである des-Gln14-ghrelin をラット胃より単離、同定した。des-Gln14-ghrelin は14番目のグルタミン残基の欠如以外28残基のグレリンと全く同じであり、3番目のセリン残基がオクタン酸によるアシル化修飾を受けていた。また、GH 分泌刺激活性の強さもグレリンと同じであった。遺伝子解析の結果、グレリンおよび des-Gln14-ghrelin の遺伝子は単一で、グルタミンをコードする CAG codon の AG が splicing のシグナルとしてはたらくことにより、alternative splicing でこの2種類のペプチドの前駆体 mRNA が生じることが明らかとなった。これは、生理活性ペプチド内の alternative splicing により2つの分子種が生合成される初めての例である。ラット胃において des-Gln14-ghrelin はグレリンの4分の1程度存在し、この2つの分子型が血中ホルモンとして機能していると考えられた。

以上の研究は新規内因性成長ホルモン分泌促進ペプチド「グレリン」の構造と生合成に関する新たな知見であり、生理活性ペプチド研究の発展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものとして認める。

なお、本学位授与申請者は、平成14年1月9日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。