

氏 名	しら いし あき ひこ 白 石 彰 彦
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2445 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 内 科 系 専 攻
学位論文題目	A novel glucokinase regulator in pancreatic β cells: precursor of propionyl CoA carboxylase β subunit interacts with glucokinase and augments its activity (膵 β 細胞における新しいグルコキナーゼ制御因子：プロピオニル CoA カルボキシラーゼ β サブユニットの前駆体はグルコキナーゼと相互作用し、その活性を上昇させる。)
論文調査委員	(主 査) 教 授 井 上 一 知 教 授 中 尾 一 和 教 授 清 野 裕

論 文 内 容 の 要 旨

肝細胞において、グルコキナーゼの制御因子 (GKRP) は Fructose-6-phosphate (F6P) の存在下でグルコキナーゼ (GK) と複合体を形成し、グルコキナーゼの活性を低下させる事が知られている。また、GKRP はグルコキナーゼを核内に輸送する担体としても働いており、肝細胞内での糖代謝調節に重要な役割を担っている。一方、グルコキナーゼは膵 β 細胞においても発現しグルコースセンサーとしてインスリン分泌の調節に関与しているが、肝細胞のグルコキナーゼとは N 末端のアミノ酸配列が異なる。また、膵 β 細胞では GKRP やそれに相当するグルコキナーゼ制御因子の存在は報告されていない。そこで膵 β 細胞における GKRP 相当物質の同定を試みた。

膵 β 細胞特異的グルコキナーゼの cDNA を PCR 法によりラットの膵島より精製した cDNA からクローニングした。Yeast Two Hybrid System により、これと結合しうるタンパクをコードする遺伝子を検出するべく、HIT-T15細胞より作成した cDNA ライブラリーを用いてスクリーニングを行った。得られた遺伝子のコードするタンパク質を GST-Fusion 蛋白として精製し、GST-Pull Down Assay とウエスタンブロッティングにより蛋白レベルでグルコキナーゼと結合することを確認した。同定されたタンパク質がグルコキナーゼ活性に影響を及ぼすかどうかを検討するため、グルコキナーゼを GST-Fusion 蛋白として精製し (GST-GK)、Fluorometric Assay によりこの蛋白の存在下と非存在下でグルコキナーゼ活性を測定した。

Yeast Two Hybrid System により propionyl CoA carboxylase β subunit の前駆体 (p β PCCase) の 5' 末端側の 25% を欠く、残りの 75% と完全な相同性を示す cDNA を検出した。p β PCCase はミクロゾームで産生された後、サイトゾルを經由してミトコンドリアに取り込まれ、プロテアーゼにより N 末端側の約 7.5KDa のペプチドが切断されて mature β PCCase となり、同様にして作られた mature α PCCase と $\alpha_2\beta_2$ の 4 量体を形成し propionyl CoA Carboxylase を構成する。そこで p β PCCase がタンパク質レベルでもグルコキナーゼと結合することを確認するため、ラット膵島より精製した cDNA から PCR 法により、p β PCCase の遺伝子の全長をクローニングした。GST Fusion 蛋白として精製した p β PCCase (GST-p β PCCase) がラットの膵島、肝からの抽出液中のグルコキナーゼとの結合を確認するため GST-Pull Down Assay と抗グルコキナーゼ抗体を用いたウエスタンブロッティングを行い両者の結合を確認した。また合成した GST-GK からプロテアーゼ処理により GST tag を除去して精製したグルコキナーゼと GST-p β 3PCCase が結合することについても確認した。これとは逆に GST-GK を用いてグルコキナーゼがラット膵島抽出液中の p β PCCase と結合することを、同様の方法で確認した。次に GST-p β PCCase の GST-GK への影響を検討したところ、GST-p β PCCase は GST-GK の活性 (V_{max}) を 23% 上昇させ、 K_m を 18% 低下させた。

以上の研究から、膵島 p β PCCase はグルコキナーゼと結合することが示され、グルコキナーゼの活性を増大させること

が明らかとなった。よって p β PCCase は膵 β 細胞におけるグルコキナーゼ制御因子としてグルコース感受性やインスリン分泌、グルコキナーゼの局在に関与していることが示された。

論文審査の結果の要旨

肝細胞において、グルコキナーゼの活性や細胞内局在に影響を与える制御因子、GKRP の存在が知られている。GKRP はグルコキナーゼを細胞質から核内に輸送する担体として働くことで、肝細胞内での糖代謝調節に重要な役割を担っている。一方、グルコキナーゼは膵 β 細胞においても発現し、グルコースセンサーとしてインスリン分泌の調節に関与している。しかし膵 β 細胞では GKRP やそれに相当するグルコキナーゼ制御因子は報告されていない。申請者は膵 β 細胞における GK 制御因子として p β PCCase を同定した。この p β PCCase は Yeast Two-Hybrid System により GK と相互作用することから明らかにされた。また、p β PCCase は GST-Pull Down Assay とウエスタンブロッティングにより蛋白レベルでラット膵島と肝細胞抽出液中のグルコキナーゼと結合することが確認された。GST Fusion 蛋白として精製した p β PCCase 蛋白は同様にして精製された GK 蛋白の活性を23%上昇させ、 K_m を18%低下させた。つまり膵島 p β PCCase はグルコキナーゼと結合し、グルコキナーゼの活性を増大させることが明らかとなった。なお、p β PCCase、グルコキナーゼとも β 細胞の細胞質に局在した。よって p β PCCase は膵 β 細胞におけるグルコキナーゼ制御因子としてグルコース感受性やインスリン分泌、グルコキナーゼの局在に関与していることが示された。

以上の研究は、膵ラ氏島におけるグルコース応答性インスリン分泌機構の解明に貢献し、糖尿病学の発展に寄与するところが多い。

従って本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成14年1月7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。