



Activation of adenylate cyclase by islet amyloid polypeptide with C00H-terminal amide via calcitonin gene-related peptide receptors on rat liver plasma membranes

森下, 智行

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1992-12-22

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1687

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001687>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	森 下 智 行 (岡山県)
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	博ろ第1330号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与の日付	平成4年12月22日
学位論文題目	Activation of Adenylate Cyclase by Islet Amyloid Polypeptide With COOH-Terminal Amide via Calcitonin Gene-Related Peptide Receptors on Rat Liver Plasma Membranes. ラット肝細胞膜上におけるCOOH末端アミド化膵島内アミロイドポリペプチドのカルシトニン遺伝子関連ペプチド受容体を介するアデニレートサイクレーズの活性化
審査委員	主査 教授 千 原 和 夫 教授 春 日 雅 人 教授 千 葉 勉

論文内容の要旨

要 約

COOH末端アミド化ヒトおよびラットの膵島アミロイドポリペプチド (IAPP-NH₂) は、¹²⁵I で標識した [Tyr^o] rat α -calcitonin gene-related peptide (CGRP) のラット肝細胞膜への特異的結合を容量依存性に置換したが、それに反してヒト非アミド化IAPP (IAPP-COOH) は効果がなかった。一方、ヒトおよびラットIAPP-NH₂は、肝細胞膜に於いてアデニレートサイクレーズの活性を容量依存性に惹起し、これらの効果はCGRP受容体アンタゴニストであるCGRP-I (8-37) によって有意に阻害された。しかしヒトIAPP-COOHは効果がなかった。更に、アデニレートサイクレーズの活性を惹起するヒトとラットのIAPP-NH₂の50%有効量 (EC₅₀) は、標識物の結合を阻害する上で必要な50%阻害量 (IC₅₀) とほぼ同等であった。この様に、IAPP-NH₂は、ラット肝細胞膜上のCGRP受容体に対して結合し、アデニレートサイクレーズ活性を上昇させる。

(序文)

アミロイド沈着はNIDDMやInsulinoma患者の膵ラ氏島にしばしばみられる。2つのグループがこれらの患者から amyloid 蛋白を単離精製し、IAPPあるいは amylin と命名した。IAPPは免疫組織化学的に膵 β 細胞の分泌顆粒より分泌されており、更に三家らはヒトインスリノーマ患者からIAPPをコードするcDNAをクローニングし、これが典型的な signal peptide を有する prohormone 様物質であると予想した。この事実はIAPPが膵ランゲルハンス島から分泌され、ホ

ルモンとして重要な意義をもっているという可能性を示している。

一方、以前の研究で、我々はラット肝細胞膜上に、アデニレートサイクレース活性と連関するCGRP受容体の存在を認め、CGRPが肝に於いて糖代謝に影響を与えているという可能性を示唆した。興味深い事にヒトIAPPは37のアミノ酸からなるポリペプチドであるが、システイン残基を2と7番目に持っており、ヒトCGRP-IとCGRP-IIとはそれぞれ43と46%のホモロジーがあり、更にラットIAPPはラット α -CGRPと β -CGRPとそれぞれ49と46%のホモロジーがある事が明らかとなった。

そこで本研究では、IAPPがラット肝細胞膜上においてCGRP受容体に結合することによりアデニレートサイクレースを活性化するか否かを調べてみた。さらに前駆体の並びからIAPPはC末端がアミド化されて分泌されていると予想されたので、我々は、CGRP受容体におけるC末端アミド化IAPP (IAPP-NH₂) と非アミド化IAPP (IAPP-COOH) の効果を比較検討した。

(方法)

合成¹²⁵I-[Tyr^o] rat α -CGRP、 β -CGRPとラットIAPP-NH₂はペニンスラ社から購入した。ヒトCGRP-I (8-37)、ラット α -CGRPの非アミド化ホルモン (α -CGRP-COOH)、IAPP-COOH、ヒトIAPP-NH₂は中嶋らにより合成された。

ラット肝細胞膜を既報の方法で作成し、¹²⁵I-[Tyr^o] rat α -CGRPをトレーサーとしてCGRP受容体に対するIAPPの結合能を検討した。次に、IAPPのアデニレートサイクレース(AC) 活性に対する効果を調べた。なお、AC活性はATPからのcAMP合成能により求めた。

(結果と考察)

¹²⁵I-[Tyr^o] rat α -CGRPの肝細胞膜に対する特異的結合は α -CGRPや β -CGRPばかりでなくヒトやラットのIAPP-NH₂によっても容量依存性に置換された。しかしながら、ヒトやラットのIAPP-NH₂では、その50%最大阻害に必要な量(IC₅₀)は、CGRPのそれに比べて10⁵倍多く必要であった。一方、 α 、 β -CGRPとヒト、ラットIAPP-NH₂はラット肝細胞膜に於いて容量依存性にアデニレートサイクレース活性を惹起させたが、この際にも、アデニレートサイクレース活性化の50%最大効果を得るのに要する量(EC₅₀)は結合実験のIC₅₀にそれぞれほぼ匹敵した。以上の成績から標識CGRPの一部がIAPP-NH₂の特異的受容体に結合し、この結合が非標識IAPP-NH₂によって置換されたものであると考える事も可能である。しかしながら、以前我々はラット肝細胞膜における標識CGRPの結合部位は、唯一の親和性である事を明らかにしたので、こうした可能性は少ないと思われる。さらに、この実験でヒトとラットIAPP-NH₂によって惹起したアデニレートサイクレース活性の上昇はCGRP受容体のアンタゴニストであるヒトCGRP (8-37) により有意に抑制された。この事実はIAPP-NH₂が肝細胞膜のCGRP受容体に結合することによってアデニレートサイクレースを活性化したことを強く示唆する。事実、IAPP-NH₂はCGRPとNH₂末端ばかりでなくCOOH末端にも相同性があるが、我々は

以前CGRPのCOOH末端部がその受容体結合に重要である事を示した。しかし我々はこの実験でラット肝細胞膜における標識IAPP-NH₂の結合実験は行っていないので、IAPP-NH₂が肝細胞膜のそれ自身の特異的受容体に結合してアデニレートサイクレス活性を惹起している事は否定する事はできない。

これに反して、CGRP-COOHやIAPP-COOHは、10⁻⁶Mという高濃度でも標識CGRPの結合を阻害したりアデニレートサイクレス活性を惹起させたりしなかった。これらの結果から、CGRP受容体結合には、COOH末端のアミド化が重要であると思われる。以上に加えて、IAPPはCOOH末端がアミド化されて分泌され、更に免疫活性のあるIAPP-NH₂がヒトの脾臓や血清に存在していると言う事実は、IAPP-NH₂がホルモンの役割を果たしている可能性を強く示唆している。

CooperらはCGRPやIAPPが末梢の骨格筋でのグリコーゲン合成を抑制する成績を報告している。曾和らは犬においてin vivoでIAPP-NH₂がインスリン抵抗性示すという成績を示している。しかし一方、中里らは最近ヒトのIAPP-NH₂の特異的抗体を使用し、ヒトの血清でのIAPP-NH₂濃度が13.5±4.8pg/mlであると報告したが、この濃度は我々の行った実験でアデニレートサイクレスの有意な上昇を生じた濃度(10⁻⁸M)より低い。しかし、Cooperらは、IAPP-NH₂は非糖尿病患者の血中ではCGRPより10倍以上高い濃度で循環していると報告している。更に、IAPP-NH₂は脾臓ばかりでなく、胃や上部消化管に存在しており、従ってIAPP-NH₂の濃度は、末梢血より門脈血の方がより高い事と想像される。以上から、IAPP-NH₂が肝のCGRP受容体を介して、どのような糖代謝調節の役割を担っているのか、今後の研究が待たれる。

論文審査の結果の要旨

NIDDMやInsulinoma患者の膵ラ氏島にしばしば沈着するアミロイド蛋白はIslet Amyloid Polypeptide (IAPP)あるいはアミリンとして知られているが、その生理作用や疾病における意義についてはほとんど明らかではない。しかしアミリンをコードするCDNAの塩基配列の解析により、アミリンのN端にシグナルペプチドが存在すること、免疫組織化学的に膵β細胞の分泌顆粒にアミリンが含有されることより、アミリンは膵ラ氏島より分泌されることが推測される。ヒトアミリンは37個のアミノ酸よりなるポリペプチドであるがCalcitonin Gene-Related Peptide (CGRP)とアミノ酸配列上約46%の相同性があり、特にN端部、C端部に相同性が高いことが知られている。本申請者達の研究グループは、以前の研究でラット肝細胞膜上にアデニレートサイクレス活性と関連するCGRP受容体の存在を証明し、CGRPが肝臓において糖代謝に関与する可能性を指摘した。そこで、本研究ではアミリンの生理作用の一端を明らかにするため、アミリンがラット肝細胞膜上においてCGRP受容体に結合することによってアデニレートサイクレスを活性化するか否かを調べた。ラット肝細胞膜を既報の方法で作製し、¹²⁵I [Tyr⁰] rat α-CGRPをトレーサーとしてCGRP受容体に対するアミリンの結合能を検討した。¹²⁵I [Tyr⁰] rat α-CGRPの肝細胞膜に対す

る特異的結合は α -CGRPや β -CGRPばかりでなくヒトおよびラットのアミリンによっても容量依存性に置換された。しかし、50%最大阻害に必要な量 (IC_{50}) はCGRPに比べてアミリンの場合 10^5 倍多かった。また、ラット肝細胞膜におけるアデニレートサイクレス活性に及ぼす効果を調べたところ、 α 、 β -CGRPとヒト、ラットアミリンは容量依存性にアデニレートサイクレス活性を惹起させたが、その50%最大効果を得るのに要する量 (EC_{50}) は結合実験の IC_{50} と同様に 10^5 倍大であった。この成績より肝細胞膜にアミリンの特異的受容体が存在し、標識CGRPがアミリン受容体に結合、非標識アミリンにより置換された可能性もある。しかし、申請者達は既にラット肝細胞膜における標識CGRPの結合部位は唯一の親和性であることを明らかにしており、さらにアミリンによるアデニレートサイクレス活性の上昇はCGRP受容体のアンタゴニストであるヒトCGRP (8-37) により有意に抑制されたことにより、アミリンは肝細胞膜のCGRP受容体に結合することによってアデニレートサイクレスを活性化した可能性が高いと思われる。肝のCGRP受容体への結合においてCGRPのCOOH末端部が重要であることを申請者達は以前見出しているが、本研究においてC端アミドを取り除いたCGRP-COOHやアミリン-COOHは 10^{-6} Mという高濃度でも標識CGRPの結合を阻害したりアデニレートサイクレス活性を上昇させることは無かった。したがってCGRP受容体結合にはCOOH末端のアミド化が重要であると思われる。一方、肝細胞膜CGRP受容体にアミリンが結合して作用を発揮するとしても、アミリンが果たして肝臓に 10^{-8} Mという比較的高濃度で存在するのかという疑問は出てくる。しかしアミリンは膵臓のみならず胃や上部消化管に存在しており、門脈血中濃度は末端血よりかなり高い可能性が考えられること、またCGRPよりも10倍以上高濃度でアミリンが血中に存在することより、アミリンが生理作用を示す可能性は十分考えられる。CooperらはCGRPやアミリンが骨格筋でのグリコーゲン合成を抑制することを報告しているが、肝臓においてグリコーゲン合成調節を含めて糖代謝に関与するか否か現在のところ明らかでなく、今後の研究が待たれる。

本研究はアミリンの作用機構について肝細胞膜を用いてCGRP受容体への結合能およびアデニレートサイクレス活性に及ぼすアミリンの効果を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった肝細胞膜CGRP受容体へのアミリンのクロスオーバー現象をはじめて見出し、アミリンの作用機序について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。