

氏名(本籍) 橋本 哲也(滋賀県)

学位の種類 博士(医学)

学位記番号 博士第496号

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位授与年月日 平成17年3月25日

学位論文題目 Regulation of ATP-Sensitive Potassium-Channel Subunit Kir6.2
Expression in Rat Intestinal Insulin-Producing Progenitor Cells

(ラット・インスリン産生小腸幹細胞におけるATP感受性カリウムチャ
ネル・サブユニットKir6.2の発現調節)

審査委員 主査 教授 堀 江 稔

副査 教授 松 浦 博

副査 教授 小 森 優

論文内容要旨

※整理番号	500	(ふりがな) 氏 名	はしもと てつ や 橋 本 哲 也
学位論文題目	Regulation of ATP-Sensitive Potassium-Channel Subunit Kir6.2 Expression in Rat Intestinal Insulin-Producing Progenitor Cells. (ラット・インスリン産生小腸幹細胞における ATP 感受性カリウムチャンネル・サブユニット Kir6.2 の発現調節)		
<p>【背景と目的】 内向き整流性カリウムチャンネル (Kir6.2) は 2 回膜貫通型の蛋白質であり、β 細胞においてスルフォニルウレア受容体とともにヘテロ 8 量体として ATP 感受性カリウムチャンネルを構成する。このチャンネルは細胞の代謝状態から膜電位を変化させ、インスリン分泌を誘導することやその異常により糖尿病の発症に関与するなど、その機能について詳細な検討がなされているが、その発現調節に関しては不明であった。そこで、Pdx-1, Isl-1 を発現させたインスリン産生小腸幹細胞株とラット膵 β 細胞株 RIN-5F を用いて、小腸幹細胞の β 細胞への分化過程における Kir6.2 の発現調節機構の検討を行なった。</p> <p>【方法】 1) 小腸幹細胞株 (IEC-6) に Pdx-1 単独もしくは Pdx-1, Isl-1 を恒常的発現させ、インスリンの糖応答性分泌に関与する Glut2, Glucokinase, Kir6.2, SUR1 の mRNA 発現を RT-PCR 法で、また Kir6.2 蛋白量をウエスタンブロット (WB) 法にて測定した。2) Adenovirus ベクターを用いた Isl-1 の一過性発現や、RNA 干渉を用いた内因性 Isl-1 の発現抑制による Kir6.2 への影響を WB 法にて検討した。3) Kir6.2 遺伝子の発現制御機構を調べるため、マウス Kir6.2 プロモーターの -1677 から -45bp の領域を Luciferase 遺伝子上流に挿入した pGL3-Kir6.2 ベクターを作成するとともに、その上流部位を欠損させたベクターも作成し、これらの細胞における Kir6.2 転写活性を測定した。4) Kir6.2 転写活性調節領域への転写因子の結合を検討するために、electrophoretic mobility shift assay (EMSA) と抗 Sp1, Sp3, Foxa2 抗体を用いた super shift の検討を行った。5) Sp1, Sp3, Foxa2 の発現ベクターと pGL3-Kir6.2 ベクターやその結合部位を変異させたベクターを用いて、これら転写因子の Kir6.2 転写活性への影響を検討した。6) 最後に Isl-1 の Foxa2 への影響を検討するために、Isl-1 の恒常的発現時と Adenovirus ベクターを用いた一過性発現時の Foxa2 蛋白量の変化を WB 法にて測定した。</p> <p>【結果】 1) Pdx-1, Isl-1 の恒常的発現により Kir6.2 蛋白の発現を認めたが、Pdx-1 単独では認めなかった。また、Pdx-1, Isl-1 の恒常的発現により Glucokinase を除く</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

Glut2, Kir6.2, SUR1 の mRNA の誘導が確認された。2) Adenovirus ベクターを用いて Isl-1 を一過性発現させると Kir6.2 蛋白は新たに誘導され、iRNA を用いて内因性 Isl-1 をノックダウンさせると Kir6.2 の蛋白量は低下した。3) Pdx-1 単独と Pdx-1, Isl-1 の恒常的発現細胞はともに-1035 から-939bp の領域にて転写活性の上昇を認めたが、Pdx-1 単独の恒常的発現細胞では-1364 から-1210bp の領域にて転写活性の低下も認めた。RIN-5F 細胞では転写活性の上昇部位のみを認めた。4) 転写活性上昇部位 (-1035/-939) を 5 つの領域に分割し RIN-5F 細胞の核蛋白を用いて EMSA を行ったところ、GC-box (-985/-956) へ Sp1 と Sp3 の結合を認め、また同様に転写活性低下部位 (-1364/-1210) を 5 つの領域に分割し Pdx-1 単独の恒常的発現細胞の核蛋白を用いたところ、(-1337/-1267) の領域に Foxa2 の結合を認めた。5) Sp1 は用量依存性に pGL3-Kir6.2 ベクターの Luciferase 活性を上昇させたが、Sp3 では有意な変化を認めなかった。GC-Box の Mutation によりその活性は基底状態まで低下した。一方、Foxa2 は用量依存性に pGL3-Kir6.2 ベクターの Luciferase 活性を抑制した。6) Isl-1 は、恒常的発現時及び Adenovirus ベクターを用いた一過性発現時ともに Foxa2 蛋白量を減少させた。

【**考案**】 Kir6.2 の発現の有無に関わらず検討したすべての細胞で GC-box 領域 (-985/-956) に転写活性の上昇が認められたこと、Sp1 が容量依存的に Kir6.2 転写活性を上昇させたことから、TATA box を持たないマウス Kir6.2 プロモーターは Sp1 が GC box に結合することによりその基本転写活性を有していると考えられた。ラット・インスリン産生小腸幹細胞において、Isl-1 が Kir6.2 を誘導する機構としては、Kir6.2 の転写に抑制的に働いている Foxa2 蛋白を Isl-1 が減少させることによると考えられた。

【**結語**】インスリン産生小腸幹細胞において、Isl-1 は Foxa2 発現を負に制御することにより Kir6.2 の発現を誘導し、インスリン分泌能の獲得において重要な遺伝子であることが示唆された。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	500	氏名	橋本 哲也
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>Pdx-1 と Isl-1 の共発現により小腸幹細胞株 (IEC-6) がインスリンを産生することを報告してきているが、本研究は、糖応答性のインスリン分泌のキーコンポーネントの一つ Kir6.2 に注目し、その発現機構の解明を目的に実験をすすめた。IEC-6 及び膵β細胞株(RIN-5F)を用いて、Isl-1 の過剰発現や発現抑制が、Kir6.2 等の発現及び Kir6.2 promoter 活性へ与える影響について検討した。</p> <p>その結果、Foxa2 が結合し転写を抑制する部位 (-1364~-1210bp) と Sp1/Sp3 が結合し基本転写活性を上昇する部位 (-1035~-939bp) が Kir6.2 promoter に存在することや、Isl-1 発現が Foxa2 蛋白を減少させ IEC-6 に Kir6.2 を誘導することが示唆された。</p> <p>このように本論文は、インスリン分泌能を獲得する過程における Isl-1 の重要性を解明し、再生医療の基礎研究として有用であるため、博士 (医学) の学位論文に値するものであると認める。</p>			
(平成17年2月9日)			