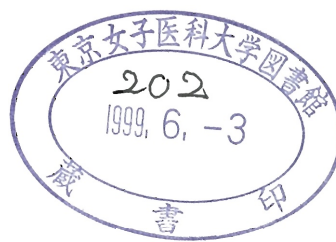


成長ホルモン放出に關与する
新しいG蛋白共役型受容体
の遺伝子発現制御機構

(課題番号 09671076)

平成9-10年度科学研究費補助金(基盤研究C2)
研究成果報告書



平成11年3月

ミキノブヒロ
研究代表者 三木伸泰
(東京女子医科大学医学部内科)

目次

はしがき	p.1
研究組織、研究経費	p.2
研究発表	p.3
研究概要	p.5
著書、論文	p.8

[はしがき]

GHの分泌は、視床下部のGRFとSRIFの2因子により制御されていると考えられてきた。近年GHの放出を促進、増強するGHRPや非ペプチド性のGH secretagogue (GHS)が注目を集め、1996年にその受容体cDNAがヒト、ブタの下垂体と視床下部でクローニングされ、GHの分泌制御に関与する第3の因子GHSの存在が確実となった。我々は、ラットGHS受容体のクローニングを行いその遺伝子発現を検索した。SD系ラットの下垂体由来のmRNAを逆転写した後、ヒト、ブタのGHS受容体の核酸配列のhomologyに基づいて設計したprimerを用いて、約935塩基対をPCRで増幅した。5'と3'の非翻訳領域はRACE法を用いて増幅し、最終的に1759塩基から成る全長のcDNAの核酸配列の決定した。このcDNAは7回膜貫通型の365個のアミノ酸から成る蛋白(1a型受容体)をコードしており、ヒト、ブタと比較して2個少ないアミノ酸から構成されていたが、95-96%の高い類似性を示した。視床下部と下垂体の全RNAを用いたノーザン解析ではmRNAは検出できず、その発現量は極めて少ないと推測された。しかし、高感度のRNase protection assayでは、いずれの組織でも明確なmRNAバンドが検出され、内因性GHSがこれら両部位で作用することを支持する所見である。単位全RNAあたりのmRNA量は、視床下部が下垂体の2-3倍高値であり、GHSの視床下部作用の重要性を物語る所見とも思われる。digoxigenin 標識 cRNA プローブを用いた in situ hybridization では、GHS-R 遺伝子はGRFを産生する弓状核と腹内側核に発現していたが、SRIFを産生する室周囲核には陽性細胞を認めなかった。GHSが弓状核のGRFニューロンに作用しパルス状GH分泌を増幅すること、GHSが摂食行動を促進することを形態学的に支持する所見である。

[研究組織]

研究代表者：	三木 伸泰	東京女子医大内科 2 講師
研究分担者：	小野 昌美	東京女子医大内科 2 助手
研究分担者：	村田 洋二	東京女子医大内科 2 助手

[研究経費]

平成 9 年度	1900 千円
平成 10 年度	1100 千円
計	3000 千円

[研究発表]

1. 三木 伸泰、小野 昌美、村田 洋二、田光 香、出村 博：ラット Growth hormone secretagogue 受容体の cDNA クローニングと遺伝子発現について
日本内分泌学会雑誌 73 : 194、1997.
2. 三木 伸泰、小野 昌美、田光 香、出村 博：ラット成長ホルモン放出因子 (Growth hormone secretagogue) 受容体の cDNA クローニングと遺伝子発現
成長科学協会研究年報 21 : 315、1997.
3. 小野 昌美、三木 伸泰、村田 洋二、田光 香、出村 博：ラット下垂体における GH 分泌制御因子 (GRF, GH secretagogue, SRIF) 受容体遺伝子発現の性差について
日本内分泌学会雑誌 74 : 72、1998.
4. 三木 伸泰、小野 昌美、田光 香、村田 洋二、出村 博、片桐 展子、野田 節子：第3の GH 分泌制御因子 GH secretagogue (GHS) の受容体 mRNA の脳内分布
日本内分泌学会雑誌 77 : 73、1998.
5. N Miki, M Ono, K Tamitsu, Y Murata, H Demura, and M Takahashi: Changes in GRF, GRF receptor, and GH secretagogue receptor gene expression in human GH-transgenic rats.
Abst. of 4th International Congress of Neuroendocrinology & 25th annual meeting of The Japan

Neuroendocrinology

6. 小野 昌美、三木 伸泰、牧野 玲奈、出村 博：
甲状腺ホルモンによる GH secretagogue 受容体の遺伝子発現制御
日本内分泌学会雑誌（印刷中）、1999.
7. 牧野 玲奈、三木 伸泰、小野 昌美、出村 博：
糖質コルチコイドによる下垂体 GRF 受容体と GH secretagogue 受容体の遺伝子発現制御の比較検討
日本内分泌学会雑誌（印刷中）、1999.
8. M Ono, N Miki, R Makino, and H Demura: Thyroid hormone and glucocorticoid regulation of growth hormone secretagogue and growth hormone-releasing hormone receptor gene expression.
Abst. of 81st annual meeting of The Endocrine Society (in press), 1999.
9. 三木 伸泰：視床下部下垂体研究の進歩-受容体と疾患：GHRP/GHS 受容体
内分泌・糖尿病科 第8巻3号（印刷中）、1999.

[研究概要]

平成8年米国の Merck 社は、合成の成長ホルモン (GH) 放出ペプチド (GHRP) を結合する GH secretagogue (GHS) 受容体をヒト、ブタで cloning し、GH の分泌制御には視床下部ホルモンである GH 放出ホルモン (GRH)、GH 放出抑制ホルモンである somatostatin に加えて、本体が不明の内在性 GHS 受容体リガンドが関与することが確実となった。

平成9年度：

GHS 受容体の発現制御機構を明らかにする目的で、文部省科学研究費の援助により、まず我々は平成9年度にラット GHS 受容体の cDNA 断片、即ち翻訳領域の 5'端、中央部、3'端の3種の cDNA 断片を RT-PCR 法で cloning した。そして、RACE 法を用い、5'、3'の非翻訳領域を含む 1759 塩基の全長 cDNA の cloning に成功した。このラット GHS 受容体は7回膜貫通型の典型的な G 蛋白共役型受容体に属し、ヒト、ブタの受容体とは 94-95% の高い相同性を認めた。この受容体の視床下部を中心にした脳内分布を digoxigenin 標識 cRNA probe を用いる in situ hybridization 検討したところ、GHS 受容体の mRNA は視床下部の GRH を産生する弓状核、腹内側核に検出された。GHS リガンドが GH 分泌調節に GRH を介して関与することを支持する所見である。平成10年度には GHS 受容体の mRNA の定量測定系の確立を詳細に検討した。その結果、Northern 法では検出不可能と結論し、ついに極微量の GHS 受容体 mRNA を定量しうる世界初の高感度 RNase protection assay の確立に成功した。興味あることに、ラット GHS 受容体 mRNA は下垂体より視床下部に3倍も優位に発現し、ヒト GH 処置により下垂体では明確な抑制が観察されたが、視床下部では変動しなかった。GHS 受容体の遺伝子発現は GH により feedback 制御

を受けることが示唆されるが、その制御機構は下垂体と視床下部で異なる可能性がある。

平成 10 年度：

文部省科学研究費の援助により、前年度にクローニングし、かつ脳内分布を *in situ hybridization* で明らかにしたラット成長ホルモン放出因子 GHS 受容体の遺伝子発現制御につき基礎的実験を行った。まず、標準的な mRNA 検出法であるノーザンプロット法を用いたがほぼ全長に近い 953 塩基の cRNA プロブを用いてもシグナルは検出できず、遺伝子発現量は極めて少ないことが判明した。そこで、クローニングした翻訳領域の 5'端、中央部、3'端の 3 種の cDNA 断片から cRNA プロブを作成し、感度と特異性に優れるといわれている RNase protection assay を確立した。その結果、5'端のプロブが最も再現性と定量性に優れており、以後これを測定用のプロブとした。視床下部と下垂体で GHS 受容体遺伝子発現量を比較したところ、視床下部に比較して下垂体の mRNA 発現量は 3-4 分の 1 と低く満足のいくシグナル強度が得られなかった。下垂体の GHS 受容体 mRNA レベルは GRH 受容体 mRNA の 10% 以下であり、さらにラット下垂体前葉細胞の初代培養系ではシグナルが検出できないほど低値であった。そこで、検出感度を向上させるためプロブの ^{32}P 放射活性を増し、ハイブリの条件を変更し、また imaging plate への暴露時間を延長して感度を約 10 倍向上させた。この改良により、極めて安定した GHS 受容体 mRNA 測定系の確率に世界で初めて成功した。ラット GHS 受容体 mRNA は 5 日間にわたるヒト GH の処置により下垂体では有意な抑制が観察され、下垂体 GHS 受容体の遺伝子発現は GH により負の feedback 制御を受けることが示唆された。一方、遺伝子発現量の多い視床下部では GHS 受容体 mRNA

レベルはヒト GH 処置で変動しなかった。したがって、GHS 受容体の発現制御機構は下垂体と視床下部で異なる可能性がある。