

ラット肝臓におけるインスリン様
成長因子 I 及びその結合タンパク質
遺伝子の発現調節機構の解析

— Studies on regulatory mechanisms of gene
expression of insulin-like growth factor-I
and its binding proteins in rat liver —

1995

三 浦 豊

①

ラット肝臓におけるインスリン様 成長因子 I 及びその結合タンパク質 遺伝子の発現調節機構の解析

(Studies on regulatory mechanisms of gene
expression of insulin-like growth factor-I
and its binding proteins in rat liver)

三浦 豊

目次

頁

緒言

第一節 外界からの情報因子としての食餌タンパク質	1
第二節 本研究の背景	2
第三節 インスリン様成長因子I及び結合タンパク質に関して	
1) IGF-Iについて	
a) IGF-Iの遺伝子構造	3
b) IGF-Iの発現調節	5
c) IGF-Iの生理作用	6
2) IGFBPについて	8
第四節 本研究の目的と本論文の構成	10

第一章 食餌タンパク質によるラット肝臓での IGF-I 遺伝子発現調節

序論	12
第一節 食餌タンパク質の質と量の変化による 肝臓IGF-I 遺伝子発現調節	12
第二節 大豆タンパク質摂取時の血中IGF-I 濃度、 肝臓IGF-I mRNA量の変化	20
第三節 タンパク質の質と量の異なる食餌摂取時のIGF-I 及びIGFBP-1 遺伝子の転写速度の定量	27
第四節 討論	33

第二章 初代培養肝細胞系におけるIGF-I 及びIGFBPの 遺伝子発現の基礎的解析

序論	36
第一節 初代培養肝細胞におけるIGF-I 及びIGFBP-1 の 発現量の培養条件による変化	37
第二節 討論	48

第三章 初代培養肝細胞におけるIGF-I, IGFBP-1, -4 遺伝子発現のホルモンによる調節	
序論	50
1. 初代培養肝細胞におけるIGF-I遺伝子発現調節について	
第一節 各種ホルモンによるIGF-I 遺伝子発現調節	52
第二節 Acid gel chromatography を用いたIGF-I 分泌量の定量	55
2. 初代培養肝細胞におけるIGFBP-1, -4遺伝子発現調節	
第三節 IGFBP-1 mRNA量に対する各種ホルモンの影響	58
第四節 初代培養肝細胞におけるIGFBP-4 遺伝子発現調節	60
第五節 討論	66
第四章 初代培養肝細胞におけるIGF-I, IGFBP-1, -4 遺伝子発現のアミノ酸による調節	
序論	74
第一節 IGF-I 遺伝子発現のアミノ酸による調節	74
第二節 IGFBP-1 遺伝子発現のアミノ酸による調節	75
第三節 IGFBP-4遺伝子発現に対するアミノ酸の効果	79
第四節 討論	83
総合討論	86
要旨	91
謝辞	95
参考文献	96

緒言

第一節 外界からの情報因子としての食餌タンパク質

生命体は、自らの生命を維持するために外界から栄養素を取り入れ、それらを代謝し、生体構成成分を作り上げる性質を有している。すなわち外界からの栄養素の取り込みは生命維持のための必須条件とすることができる。しかし、外界の栄養素の存在状況が常に一定であることは稀であり、生体はその時の状況に応じて、もっとも適切な応答をするように自らの代謝を制御する必要がある。このことは、ヒトを代表とする高等動物に限ったことではなく、例えば原核生物である大腸菌では利用することのできる炭素源がグルコースからラクトースへ変化するのに応答して、その遺伝子発現を変化させて糖段は利用することのできないラクトースを分解し利用できるように変化する(1)。また枯草菌では、培地中の栄養素が欠乏した際には栄養成長を停止し、孢子形成を開始し、その栄養素欠乏シグナルは細胞内のkinase cascadeを介して伝達されていくといった例が知られており(2)、さらに真核細胞である酵母においても培地中のアミノ酸が欠乏するのに応答して、欠乏したアミノ酸の合成酵素の遺伝子発現を誘導するといった例が知られている(3)。つまり生体には元来、外界からの栄養素の供給状況をモニターし、適切な応答を行う機構が備えられているということである。言い換えれば、外界からの栄養素の供給状況を生体はある種の情報として認識しているということである。一般に生体は外界からの情報を受けると、それを内的な情報に変換してから応答するが、人を始めとする高等動物ではその詳細な分子機構はほとんど明らかにされていない。筆者が本研究を行った東京大学農学部農芸化学科栄養化学研究室では、かねてより動物が摂取している栄養素、特に食餌タンパク質が動物の成長をどのような機構で制御しているのか、すなわち摂取した食餌タンパク質という外界からの情報がまずどのような内的情報に変換され、成長という結果が導かれるのかについて研究しており、その結果、インスリン様成長因子I (IGF-I) と呼ばれる物質に注目し、研究を行うこととなった。本研究はその一環であり、特に食餌タンパク質によるIGF-I及びIGF結合タンパク質の遺伝子発現の調節機構を解析したものである。次節では、本研究の背景について概説する。

第二節 本研究の背景

動物の成長が、摂取する食餌タンパク質の質と量の違いによって変化する現象は古くより知られており、多くの栄養学者がこの問題を研究し、数多くの知見が蓄積されている。しかしながらこの現象を分子レベルで完全に説明することはまだ成功しておらず、生命現象の奥深さがうかがわれる。筆者が本研究を行った東京大学農学部農芸化学科栄養化学研究室においてもかねてより、食餌タンパク質の質と量により動物の成長が変化する機構を栄養学的だけでなく分子レベルで理解することを目的として研究が行われてきた。

まず、宮川による研究では、質の異なる食餌タンパク質を含む食餌をラットに与え血中のインスリン、IGF-I濃度を測定し、同時に飼育した無タンパク質食を与えたラットの血中インスリン、IGF-I濃度を対照として比較検討した所、血中インスリン濃度は動物の成長とある程度の相関関係が見られたが、食餌タンパク質の質や量の違いによる変化は小さく、一方血中IGF-I濃度は動物の成長と非常によく相関していることが明らかにされた(4, 5)。

更に、南は各食餌条件下での全身及び各組織でのタンパク質合成速度と、その時の血中IGF-I濃度が良く相関すること、体タンパク質分解量の指標と考えられる尿中酸可溶性ペプチド排泄量とも良い相関を示すことを明らかにした(6)。その結果よりIGF-Iは、栄養条件を変化させた際のタンパク質合成だけでなく、分解も調節していることが明らかとなった。つまり、IGF-Iが食餌タンパク質の質と量の変化を受け、体タンパク質代謝を調節する中心的役割を果たしていることが明らかになった。また、IGF-Iが血中ではその分子量よりも大きいところに検出されることが、その研究の初期より知られており、血中にIGF-Iに特異的な結合タンパク質が存在していると考えられていた。そこで、梶川、梅澤らにより、血中IGF-IのIGF結合タンパク質への結合状態と結合タンパク質(BP)の量が種々の食餌タンパク質摂取下でどのように変化するかが研究された結果、摂取しているタンパク質の質と量が結合タンパク質の量と結合状態に大きく影響することが明らかにされた(5, 7~9)。

これらの研究を受け食餌タンパク質の違いによる動物の成長制御の分子機構を明らかにすることを目的として、本研究を開始した。

次節では、本論文を進めるうえで必要と思われるIGF-I及びIGFBPsについて概説するが、IGF-I及びIGFBPsの研究は非常に膨大なものであるのでここでは必要な点のみを述べることにする。

第三節 インスリン様成長因子I及び結合タンパク質に関して

1) IGF-Iについて

(a) IGF-Iの遺伝子構造

IGF-Iは、プロインスリンと類似の構造を持つ70ヶのアミノ酸からなるペプチドホルモンであり、成長ホルモンのmediatorとして(10)、血中のインスリン抗体で中和されないインスリン様活性物質として(11)、細胞増殖に必要な増殖因子として(12)、の3つの別々の研究により発見された経緯がある。その後、それぞれの研究が整理・統合され、IGF-I、IGF-IIの2つに集約されており、1978年にRinderknechtとHumbelにより、その一次構造が明らかにされている(13)。その後も、発見の経緯をもとにいくつかの用語が用いられ混乱した状態にあったが、1987年の呼びかけによりIGFという用語に統一することが決定され、現在に至っている(14)。

IGF-I cDNAは1983年Jansenらによってヒトのものがクローニングされたが(15)、現在では多くの種でIGF-I cDNAの構造が明らかとなっている(16~21)。それらの構造解析の結果、IGF-Iの一次構造は進化の過程で非常によく保存されていることが明らかとなっている。

ラットIGF-Iは、1987年にいくつかのグループからcDNAの分離が相次いで報告された(16, 22)。同時期に筆者の共同研究者であった加藤もcDNAのクローニングに成功している(23)。それらによると、ラットIGF-Iは70アミノ酸からなっており、ヒトIGF-Iと比較したところ20番目のAspがProに、35番目のSerがIleに67番目のAlaがThrに変わっていたが、全体として非常に高い相同性を示している。

IGF-I cDNAのクローニングが進む内に、5'非翻訳領域(5' UTR)と3' UTRに異なる構造を持ったcDNAが存在していることが明らかになり(24~26)、多くの研究が行われた結果Fig. 1に示したようなIGF-I genome構造が明らかにされた。まず5'UTRに関しては、Exon 1から始まるmRNAがclass 1(更にExon 1の内186bpがsplicingにより除かれたものも存在する。Fig. 1参照)、Exon 2から始まるものがclass 2とされている(Fig. 1)。また、IGF-I遺伝子の正確な転写開始点ははっきり確定したものではなく、いくつかの場所から、無作為に読み始められることが明らかにされている(27)(Fig. 1)。これら5'UTRの生理的意義に関して、Loweらは成長ホルモンによる調節を受けているのがclass 2であり、class 1はhousekeeping的に発現しているとの考えを示しているが(28)、詳細は不明である。

一方、3'UTRに関して、約6.0kbに及ぶ長いExon 6が存在しており、Exon 6中のいくつかのpoly A付加シグナルが選択的に使用されていることが明ら

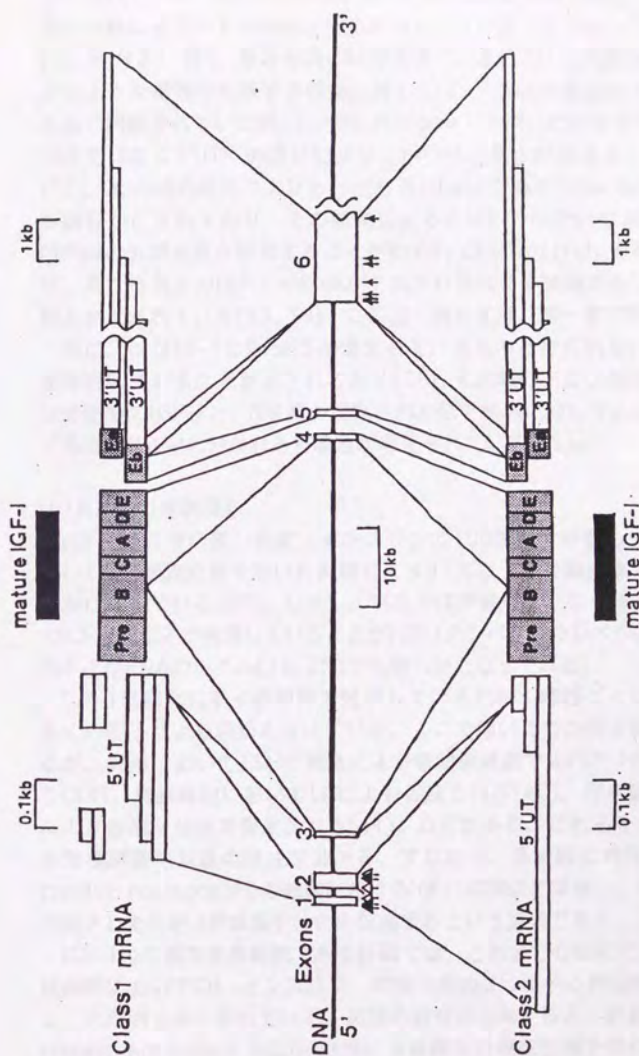


Fig. 1 ラットIGF-Iの遺伝子構造 (文献217より)
 Exon 1及びExon 2の下に示した小さな矢印は転写開始点を示す。Exon 1をleader exonとして生成したmRNAをclass 1と、exon 2をleader exonとするmRNAをclass 2と呼んでいる。Exon 5をスプライシングするか否かにより、EaまたはEbの異なる3'下流領域を持つmRNAが生成する。Exon 6の下的小矢印はpolyadenylation siteを示す。どの転写産物も翻訳され、Pre-B-C-A-D-Eからなるprepro IGF-Iを生成し、最終的に黒いバーで示したようにB-C-A-Dからなるmature IGF-Iが生成する。

かにされている。IGF-I cDNAを用いてnorthern blot分析を行うと、複数の長さの異なるIGF-I mRNAが検出されることが多くのグループにより報告されており(29, 30)、筆者も同じ結果を得ている(31)。この複数種のmRNAがどのような機構で生成するのかに関しては、cDNAの解析から得られた結果を基に討論されていたが、LundらがRNase Hを用いた実験を行った結果、5' UTRではなく3'UTRの違いにより、mRNAの長さが異なることを証明した(32)。その後の研究によりもっとも長いExonであるExon 6のシーケンスが明らかにされており、その結果によるとIGF-I mRNAの長い3' UTRにはmRNAの分解速度を調節することが知られているAU rich 配列が存在しており、異なる長さのIGF-I mRNAがそれぞれ異なる半減期を有していることが明らかにされている(33, 34)。この点に関しては、第一章で詳述する。

更に、proIGF-IにExon 5が含まれているものと含まれないものの2種類が存在していることが示されており(26)、C末端のアミノ酸構造の変化により分泌型のIGF-Iと、N末端が切断された形で細胞に対してautocrineに作用する型のIGF-Iに分かれる可能性が考えられている(35)。

(b) IGF-Iの発現調節

IGF-Iは血中に高い濃度（インスリンの100倍）で存在しているが、血中IGF-Iは、灌流肝臓を用いた実験により95%以上が肝臓由来であることが明らかになっている(36)。しかし、現在では肝臓だけでなく非常に多くの臓器でIGF-I遺伝子が発現していることがIGF-Iタンパク質のレベル(37, 38)でも、IGF-I mRNAのレベル(16, 29)でも明らかとなっている。

IGF-Iは非常に多くの組織で発現しているため、臓器ごとに種類の異なる多くの因子により調節を受けている。ここではいくつか例を挙げるにとどめるが、卵巣においてFSHの刺激により顆粒膜細胞でのIGF-I合成が促進される(39)、精巣細胞においてLHにより促進される(40)、甲状腺においてTSHにより合成・分泌が促進される(41)、などがある。これらを見れば、IGF-Iの発現調節に共通の図式が分かる。すなわち、各組織に特異的に作用するtrophic hormoneがその組織におけるIGF-Iの発現を促進し、そうして合成・分泌されたIGF-Iが成長や分化を促進するという図式である。

IGF-Iの主要な生産臓器である肝臓では、これまでの研究でIGF-I遺伝子発現調節においてGH、インスリン、栄養状態の3つが中心的役割を果たしていることが明らかにされている。前述の図式から考えると、肝臓については、trophic hormoneであるGH以外にも重要な発現調節因子が存在していると考えられる。

GHがIGF-Iの発現を調節していることは、以下のような報告から明らかで

ある。つまり、下垂体除去動物では血中IGF-I濃度が低い(42)、これはGH投与により回復する、正常状態でもGH投与により血中IGF-I濃度の上昇が観察されること(43)などである。このIGF-I産生のGHへの依存性は肝臓以外の組織でも観察されており、GHの刺激によりIGF-I mRNA量が増加することが確認されている(30)。

インスリンに関する報告としては、実験的糖尿病ラットでは血中IGF-I濃度の減少がみられ、これはインスリンの投与により回復する(44)。この際、肝臓中のIGF-I mRNA量が減少しており、インスリン投与により増加することが確認されている(45, 46)などがある。糖尿病時に見られる現象で注目しているのが、糖尿病ラットにGHを投与しても血中IGF-I濃度の上昇が観察されない、すなわちGH resistanceが見られることである(47)。

糖尿病時と同様、GH resistanceが観察されるのが、低栄養状態時である。例えば、低タンパク質食摂取時には血中IGF-I濃度が減少しているが、これはGH投与によっても回復せず、更にこのとき肝臓のGH receptorの数、親和性には変化がないことが確認されている(48~52)。

栄養状態とIGF-I産生調節に関しても、これまでに多くの研究が行われているが、そのいくつかを紹介すると、Isleyらは5日間絶食させたヒトに摂取カロリーと摂取タンパク質量を変化させた食事をとらせ、血中IGF-I濃度の変化を解析したところ、タンパク質が欠乏しているもののカロリーは充分に含んでいる食事では正常値には達しないものの血中IGF-I濃度の上昇が観察され、両者が欠乏した食事では絶食時よりも更に血中IGF-I濃度が減少することを報告し、血中IGF-I濃度の維持にはタンパク質量よりもカロリーレベルの方が重要なファクターであると結論している(53)。Phillipsらは3日間の絶食により血中IGF-I濃度が減少し、その回復には充分量のカロリーとタンパク質を含んだ食餌が必要であることを報告している(54)。また、Merimeeらは、血中GH濃度が低い患者では、絶食時にGHを投与しても血中IGF-I濃度は、通常時の5分の1の上昇しか示さないこと、すなわち先に述べたGH resistanceが観察されることを報告している(55)。これら以外にも多くの報告がなされているが、そのほとんどは、絶食、再給餌、摂取タンパク質レベル、摂取カロリーレベルと血中IGF-I濃度の関係を観察したものであり、タンパク質栄養の視点から解析は行われておらず、わずかにBolzeらがアミノ酸欠乏による血中IGF-I活性の減少を報告しているのみである(56)。

(c) IGF-Iの生理作用

先にも述べたようにIGF-Iは多くの臓器で発現していることが確認されているため、その生理作用は非常に多岐にわたるものとなっている。

IGF-Iの作用様式については、当初肝臓から分泌されたIGF-Iが各種組織に運ばれて作用を示すendocrine様式が考えられていたが、現在ではそれぞれの組織で発現したIGF-Iがそこで作用を示すautocrine / paracrine様式が主であると考えられている。

現在までに知られているIGF-Iの生理作用を一部示すと、筋細胞の増殖の促進およびタンパク質合成の促進、分解の抑制(57, 58)、繊維芽細胞の増殖促進(59)とコラーゲン合成の促進(60)、骨芽細胞の増殖促進(61)、卵巣顆粒膜細胞におけるFSHによるプロジェステロン合成促進の協調作用(62)、精巣ライディヒ細胞でのLHによるアンドロジェン合成促進の増強(63)、甲状腺由来細胞FRTL-5でのTSHの作用増強(64, 65)などがある。さらに最近では初代培養された脳下垂体前葉細胞に作用し、endothelin-3の分泌を促進するとの報告もある(66)。先に(b)発現調節の項で述べたように、これら作用が見られる臓器、標的細胞ではそのほとんどでIGF-Iが産生されており、また、そのIGF-Iの産生はそこに作用するtrophic hormone (GHを含む)により調節されている。すなわち、local tissueにおけるIGF-Iの作用は、その組織が増殖・分化のシグナルを受け取った時に合成・分泌され、autocrine / paracrineに作用し、シグナルを増強し、増殖・分化をより顕著に進行させることであると考えられる。

以上のような細胞を用いた実験結果だけでなく、近年では*in vivo*での直接的な作用を解析した知見も得られている。例えば、下垂体除去動物やGH欠損マウスにIGF-Iを注射する実験より、動物の成長を促進させる作用が確認されている。BallardらやUnderwoodらのグループは、種々の生理的条件下においた動物に組み替え型IGF-IやN末端を切断しIGFBPへの結合能を変化させたIGF-Iを注射し、その成長促進作用、タンパク質代謝改善作用を報告している(67~71)。このように、IGF-Iが生体の成長や体タンパク質代謝を調節する重要な因子であることが、徐々に証明されつつあるが、完全な証明にはIGF-I欠損動物が必要である。最近IGF-I geneとIGF-I receptor geneのknockout mouseの作成が報告され(72)、IGF-I geneの欠損動物は、先に報告されていたIGF-II geneの欠損動物(73)と同様、誕生時にすでに身体が小さく、その後の成長が悪いことが確認され、一方IGF-I receptorの欠損動物は、誕生時にすべて呼吸不全により死亡することが確認された。更にIGF-I receptor欠損動物では筋肉だけでなく神経系の発達が悪いことも明らかにした。このことはIGF-Iが、正常な成長だけでなく発生にも関与している可能性を示唆しており、IGF-Iが生命にとり重要な分子であることが更に確信される。

2) IGFBPについて

これまでの研究により血中に存在しているIGF-Iの99%がIGFBPと結合した状態で存在していることが明らかとなっており、IGF-Iの生理作用の調節因子としてIGFBPは非常に重要なものであると考えられている。

現在までに知られているIGFBPは6種類である。1989年と1992年に行われたIGFBPの用語を統一しようという呼びかけに準じ、IGFBP-1からIGFBP-6と命名されている(74, 75)。それらをまとめたものを表1に示した。

IGFBP-1は、当初羊水から精製されたBPとそれと同一の免疫学的性質を示す一連のBPである(76, 77)。Adultラットでは、肝臓と腎臓で発現していることが確認されており、その血中で約30kDaのところに検出される複数種のBPのひとつがBP-1である。また、IGFBP-1はその血中濃度に食餌摂取に伴う日周変動があること(78)、絶食時や糖尿病時に血中濃度が高いこと(79)、内皮表面から細胞へのIGF-Iの運搬を促進する作用を有していること(80)などが知られている。

IGFBP-2(81~83)は、胎盤、胎児の血中や培養肝癌細胞BRL3Aの培地などから精製されたものを指し、分子量約30kDaである。BP-2は当初fetal BPと考えられていたが、抗体が利用可能となり、種々の生物材料中での存否が検討された結果、現在ではadultでもわずかに存在していることが明らかとなっている。

BP-1とBP-2にはRGD配列が存在していることが知られており、細胞膜上のインテグリン受容体を介して細胞表面に結合する可能性が考えられている。

IGFBP-3は、分子量約50kDaのBPである(84~86)。血中では糖鎖の修飾により複数の分子量を持ったものとして検出される。更に血中ではBP-3とIGF-Iが結合した2量体に、酸に不安定なサブユニット(acid labile subunit: ALS)(87)が結合し、分子量約150kDaの3量体として存在している(88)。また、妊娠時には血中にIGFBP-3を特異的に分解するprotease活性が検出されることが知られているが、その生理的意義は明らかではない(89~92)。さらにIGFBP-3にはRGD配列はないものの、トリ胎児線維芽細胞においてその細胞表面上に結合部位が存在することが報告されている(93)。IGFBP-3は、IGF-Iと同様の調節を受けており、GH依存的に血中濃度が変化すること(94, 95)が知られている。また脳下垂体除去ラットや無タンパク質食摂取ラットにIGF-Iを注射すると、血中IGFBP-3濃度が上昇すること(96)、線維芽細胞にIGF-Iを添加するとIGFBP-3 mRNA量、IGFBP-3分泌量が増加すること(97)が報告されており、IGF-I自身がIGFBP-3の遺伝子発現を調節していることが明らかとなっている。

IGFBP-4は、TE89 Human osteosarcoma細胞が分泌する、IGF-I作用

表 1 IGF-BPsの諸性質 (文献217より改変)

分子重 (α 鎖の大きさ) (β 鎖の位置)	生体組織 (α 鎖にあるいは タンパク質の存在)	それ以外の IGFに対する 親和性	その他の性質	α 鎖と カルモン	生体・栄養状態
IGF-BP-1 30k (1.4kb) [§ 7]	肝臓、腎臓、 羊水	IGF-1 > IGF-2	・ RGD配列あり ・ リン酸化されることが多い ・ IGFへの親和性が上昇 ・ IGF活性を促進あるいは 抑制の両方あり	・ インスリンにより α 鎖量、タンパク量 が増加 ・ タンパク質の合成は 細胞内での生成過程 により α 鎖量、 タンパク量が増加	・ 胎児期に α 鎖量が多く ・ 生後低下 ・ 日間変動あり ・ 低タンパク質食あるいは 地食で肝臓・腎臓の α 鎖量 および血中濃度が上昇
IGF-BP-2 32k (1.7-1.8kb) [§ 2]	肝臓、腎臓、小腸、 胎など広範	IGF-1 > IGF-2	・ RGD配列あり ・ IGF活性を抑制	・ インスリンにより α 鎖量、タンパク量 が増加	・ 胎児期に α 鎖量が多く ・ 生後低下 ・ 低タンパク質食あるいは 地食で肝臓の α 鎖量および 血中濃度が上昇
IGF-BP-3 45/48/50k (2.4kb) [§ 7]	肝臓 (ホウライ細胞) 腎臓、筋肉、心臓、 その他広範	IGF-1 > IGF-2	・ 親和性あり ・ 血中ではIGFと他の タンパク質 (ILS) と分子重 18kの複合体を形成 ・ IGFに親和性あり ・ 特異的プロテアーゼが存在 ・ IGF活性を促進あるいは 抑制の両方あり	・ IGF-1により α 鎖量、タンパク量 が増加 ・ 成長ホルモン分泌により 血中濃度が上昇	・ 低タンパク質食で α 鎖量は変化しないが 血中濃度が減少
IGF-BP-4 24/28k (2.4kb) [§ 17]	主に肝臓、 その他腎臓、脾臓、 肺臓、心臓、脾、腎 臓など広範	IGF-1 > IGF-2	・ 親和性あり (180k) ・ 特異的プロテアーゼが存在 ・ IGF活性を抑制	・ 低タンパク質食で α 鎖量は変化しないが 血中濃度が減少	
IGF-BP-5 30k (0.9kb) [§ 5]	主に腎臓、 その他脾、腎、小腸 心臓、肝臓など広範	IGF-1 > IGF-2	・ 親和性あり ・ IGFに親和性あり ・ 特異的プロテアーゼが存在 ・ IGF活性を促進あるいは 抑制の両方あり	・ IGF-1により α 鎖量、 タンパク量が増加	
IGF-BP-6 32k (1.3kb) [§ 12]	腎臓・脾・腎・小腸 心臓・肝臓など広範	IGF-1 > IGF-2	・ 親和性あり		

を阻害するinhibitory BPとして精製され、その後抗体を用いた解析により、血中に存在していることが明らかとなった、分子量約24kDaのBPである(98~101)。最近neuroblastoma中にBP-4 mRNAが2種類存在すること、BP-4タンパク質に糖鎖の修飾を受けた28kDaのものが存在すること(102)が明らかにされた。また皮膚のfibroblastにおいて、IGF-IがIGFBP-4を特異的に分解するmetallo serine proteaseを誘導することにより、IGFBP-4濃度が減少するという報告(103)もあり、IGFBP-4にはIGFBP-3と同様、分解段階での調節機構が存在しているようである。

IGFBP-5(104~107)、IGFBP-6(108)は、卵胞液中に存在するBPとして発見され、生体内では局所で発現されており、血中にはほとんど存在していないと考えられているが、その発見がまだ新しいため詳細は不明である。

BPの存在が知られるとともに、もっとも興味が持たれたのは、BPはIGF-Iの作用を修飾するのか、もしするならばどのように修飾するのか、という疑問である。しかし現在もおこの点は明らかになっていない。なぜならば、この疑問に答えるための実験がほとんど培養細胞系を用いて行われており、ある細胞では、IGFBP-1がIGF-Iの作用を阻害し(109, 110)、別の細胞では促進する(111, 112)といったように、用いる細胞系、用いるBP、またBPとIGF-Iをどの時点で添加するかなど条件の違いにより、異なった結果が得られ、統一した結論が得られない状態だからである。しかし、散えて総合するとIGFBP-1はどちらかということinhibitoryに作用し、IGFBP-3はstimulatoryに作用すると考えて良いのではないかと筆者は考えている。そのひとつの理由が栄養条件の良い時に、IGFBP-3に結合したIGF-Iが増加し、悪い時にIGFBP-1に結合したIGF-Iが増えるという知見である(8)。しかし、現実IGF-Iのtarget organ上では、ある種のBPは細胞表面に結合して存在し、別のBPはinterstitial spaceに存在し、それらがIGF-I receptorとIGF-Iの取り扱いを行っていると思われ、単純な機構では説明できないのではないかと考えられる。この点は、今後の解析の進展に期待したい。

第4節 本研究の目的と本論文の構成

前節で述べたようにIGF-Iは生命の根源にかかわる分子である。事実IGF-Iは血中に豊富に存在し、またlocal tissueで合成・分泌され、その機能を果たしている。しかし、先に述べたような機能をlocal tissueで果たしているとするれば、血中に存在しているIGF-Iは何のために存在しているのだろうか。血中のIGF-I濃度はインスリンのその100倍以上であり、BPと結合することにより血糖低下作用が発現しないように維持されているものと考えら

れる。IGF-Iを注射する実験から、いくつかの可能性が示唆されているが、いまだ明確な答は得られていない。筆者らは、このendocrine IGF-Iの機能が体タンパク質代謝の調節にあると考え、一連の実験を行っている。本論文では、体タンパク質代謝を調節していると考えられる栄養状態の変化により、このendocrine IGF-I、すなわち肝臓でのIGF-I遺伝子の発現がどのような機構で調節されているかを解析し、さらに種々の生理的条件下で肝臓のIGF-I遺伝子発現がどのように変化するかを解析し、その結果よりendocrine IGF-Iのもつ生理的意義を考察することを目的としている。

そのため、まず最初に食餌タンパク質の質と量を変化させた際に観察される血中IGF-I濃度の変化が、IGF-I遺伝子発現の変化に起因しているのかを明らかにするため、IGF-Iの主要生産臓器である肝臓におけるIGF-Iの遺伝子発現の変化を解析した。更に遺伝子発現の変化がどの段階で起きているのかを明らかにするため、肝臓中でのIGF-I遺伝子転写速度を測定した。その際同様に食餌タンパク質の質と量によりmRNA量が変化することが報告されているIGFBP-1に関しても、その遺伝子転写速度を測定した。本論文の第一章ではこの点を詳述する。

次に、肝臓中でのIGF-I遺伝子発現調節機構を詳細に解析するため、初代培養肝細胞系を用い、IGF-I遺伝子発現が各種ホルモンによりどのように調節されているかを明らかにした。同時に初代培養肝細胞で発現しているIGFBPであるIGFBP-1とIGFBP-4に関しても、その遺伝子発現調節機構を解析した。本論文の第二章、第三章がこれに当たる。

更に、内分泌系だけでは食餌タンパク質によるIGF-I、IGFBPsの遺伝子発現の変化を説明できないことが明らかとなったため、血中のアミノ酸濃度が調節因子として作用しているのではないかと考え、アミノ酸のIGF-I、IGFBP-1、-4遺伝子発現に対する作用に関しても検討を加えた。この点は、第四章で詳述する。

第一章 食餌タンパク質によるラット肝臓でのIGF-I遺伝子発現調節

序論

緒言でも述べたように肝臓でのIGF-I遺伝子発現調節はGH、インスリン、栄養状態によって行われていることが明らかにされている。

Emlerらは絶食時にIGF-Iの主要生産臓器である肝臓中のIGF-I mRNA量が顕著に減少することを明らかにし(113)、栄養条件の変化によるIGF-I濃度の変化が遺伝子レベルでの変化によるものであることを初めて明らかにした。StrausとTakemotoらは、これらの研究を更に進め絶食時に観察される肝臓中のIGF-I mRNA量の減少はIGF-I遺伝子の転写速度の減少によるものではなく、IGF-I mRNAの安定性などの転写後段階の変化によるものであることを明らかにした(114, 115)。しかし、その多くの研究は栄養条件を変化させたといっても絶食の影響を解析したもの、摂取するタンパク質の量を変化させたもの、摂取エネルギー量を変化させたものがほとんどであり、タンパク質栄養の観点から解析を加えたものは皆無である。そこで本章では食餌タンパク質の質と量の違いによる血中IGF-I濃度の変化が、肝臓でのIGF-I遺伝子発現の変化の結果であることを明らかにすることを目的とした。

第一節 食餌タンパク質の質と量の変化による肝臓IGF-I遺伝子発現調節

1-1-1 序

既述のように動物の栄養条件の変化と血中IGF-I濃度の変化、肝臓中IGF-I遺伝子発現の変化の関係に関しては、現在非常に多くの研究が行われており、膨大な知見が蓄積されつつある。しかし食餌タンパク質の質と量に注目して行われた研究はほとんどない。そこで本節では質の良い食餌タンパク質の例としてカゼインを、そのままでは質の良くないタンパク質として小麦グルテンを取り上げ、更に食餌タンパク質の量を変化させる群として無タンパク質食群を設定し、これらをラットに摂取させた際の肝臓におけるIGF-I mRNA量の変化をNorthern Blot分析により解析することを目的とした。また、既に述べたようにIGF-I mRNAには3'非翻訳領域(3' UTR)の違いにより長さの異なるいくつかのmRNAが存在することが明らかにされており(32)、それぞれが持つ3' UTRの違いによりmRNAの安定性、翻訳効率など転写後の段階で、

異なる調節を受けている可能性が示唆されている。そこで、栄養条件を変化させた際に、肝臓中のIGF-I mRNA量の変化を解析すると同時に、長さの異なるIGF-I mRNAがそれぞれどのように異なる調節を受けているのかに関しても解析を行った。

1-1-2 方法

体重150g前後のWistar系雄ラットを1群5頭とし、2日間固型飼料により予備飼育を行った後、Table 1-1にその組成を示した合成粉末飼料(12%カゼイン食(12C区)、12%グルテン食(12G区)、無タンパク質食(PF区))を用いて、7日間、1日8時間のmeal feedingを行った。その間、水は自由摂取させ毎日の飼料摂取量、体重を測定した。meal feeding訓練開始直後に、飼料摂取量がわずかに減少するものの、3日目からは摂取量が増加し、しかもその摂取量のほとんどを摂食開始後2時間以内に摂取するようになる。8日目に同じ食餌を1時間30分摂取させた後、すぐに頸動脈よりEDTAを入れておいたチューブに採血し、5000Xg, 10min遠心してEDTA血漿を調製する。採血と同時に肝臓を摘出し、ただちに液体窒素中で凍結させ、その後のRNA調製用のサンプルとした。

調製した血漿は、血中IGF-I濃度の定量に用いたが、IGF-I濃度の定量は以下の2通りの方法で行った。すなわち、得られた血漿をそのままサンプルとして用いて、ヒトソマトメジン-C定量用RIAキット(栄研化学)により定量する方法(以下この方法により定量したIGF-Iを血中immunoreactive IGF-I(IR-IGF-I)とする)と血漿を酸エタノール処理し、IGF-Iを結合しているIGF binding proteinより遊離させた後に(Fig.1-1)、同じRIAキットを用いて定量するもの(以下これをtotal IGF-Iとする)である。すなわちここではIGF-I濃度をヒトIGF-I当量として値を示した。また、緒言にも述べたようにIGF-Iは血中ではほとんどすべてIGFBPsと結合して存在している。従って、上記のIR-IGF-IはIGFBPsと結合した状態で抗体と反応するIGF-Iを定量していることになる。一方酸エタノール処理することによりIGF-IがIGFBPsから解離することが、ヒト血漿に関してすでに明らかにされていることから酸エタノール処理した後に定量しているIGF-Iは血中の総IGF-Iであると考えられる(116)。

肝臓中のIGF-I mRNA量の定量は以下のように行った。得られた肝臓よりtotal RNAをAGPC法(117)により調製し、常法(118)に従って変性ホルムアルデヒドゲルで電気泳動し、ニトロセルロース膜(BAS-85, Schleicher & Schuell)にトランスファーした。ハイブリダイゼーションは、40% formamide, 20mM リン酸緩衝液, 4XSSC (1X=0.15M NaCl, 0.015M

Table 1-1 Composition of Experimental Diets (g / kg)

Diets	Protein-free (PF)	Gluten (12G)	Soy-bean protein (SPI)	Soy-bean protein+ methionine (SPIM)	Caseln (12C)
Caseln	—	—	—	—	120
Gluten	—	120	—	—	—
Soy protein Isolated (SPI)	—	—	121	121	—
L-methionine	—	—	—	3.2	2.0
L-threonine	—	—	1.5	1.5	—
L-lysine monohydrochloride	—	—	1.0	1.0	—
L-glutamic acid	—	1.0	3.1	—	—
β-Corn starch	850	720	723.4	723.3	728
Soy-bean oil	50	50	50	50	50
Cellulose	50	50	50	50	50
Mineral mixture	40	40	40	40	40
Vitamin mixture	10	10	10	10	10

The mineral and vitamin mixtures from Oriental Yeast Co.

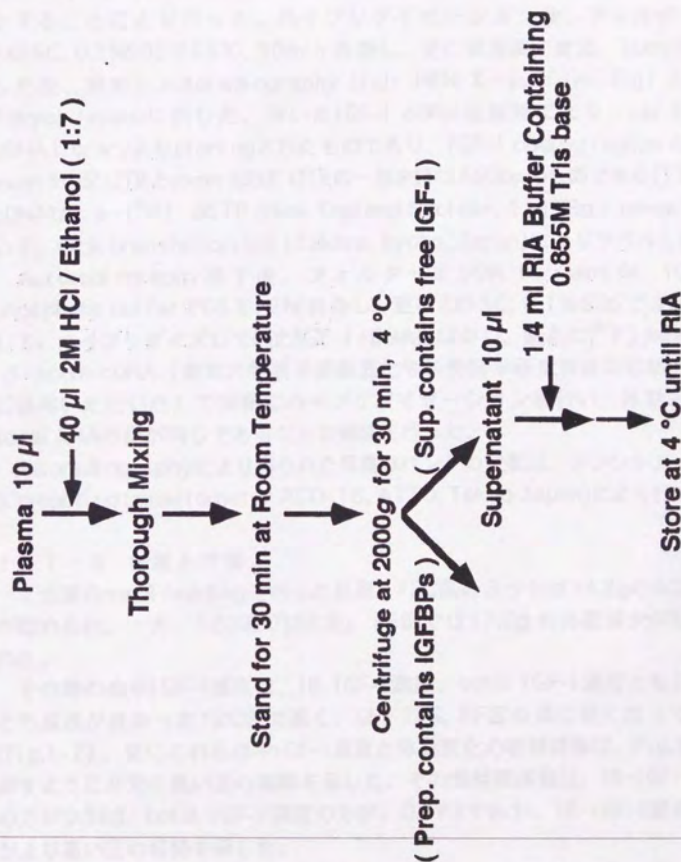


Fig. 1-1 Procedure of Acid-Ethanol Treatment of Rat Plasma

sodium citrate), 5XDenhardt's solution (1X=0.02% BSA, ficoll and polyvinylpyrrolidone), 0.1mg/ml denatured salmon testis DNA (Sigma, Boston, USA)の溶液で、42℃, 12hrのprehybridizationを行った後、同じ溶液に10% dextran sulfate(Sigma, Boston, USA)と 3×10^8 cpm の ^{32}P -labelled rat IGF-I cDNAを添加し、更に24hrインキュベートすることにより行った。ハイブリダイゼーション後、フィルターを2XSSC, 0.1%SDSで65℃, 30min洗浄し、更に同溶液で室温、30min洗浄した後、風乾しautoradiography (Fuji HRH X-ray film, Fuji Film, Tokyo, Japan)に供した。用いたIGF-I cDNAは加藤により、rat liver cDNA libraryよりcloningされたものであり、IGF-I coding regionの他、exon 1の5' UTRとexon 6の3' UTRの一部を持つ750bpのものである(119)。cDNAは、 α - ^{32}P dCTP (New England Nuclear, 111TBq / mmol)を用いて、nick translation kit (Takara, Kyoto, Japan)によりラベルした。

Autoradiography終了後、フィルターを50% formamide, 10mM phosphate bufferで65℃, 2hr洗浄し、更に2XSSC, 0.1%SDSで3回洗浄して、ハイブリダイズしていたIGF-I cDNAをはがし、新たに ^{32}P -labelled β -actin cDNA (東京大学農学部農芸化学科発酵学研究室吉田稔助手よりご供与いただいた)で同様にハイブリダイゼーションを行い、泳動されたtotal RNAの量が同じであることの確認を行った。

autoradiographyにより得られた写真のバンドの定量は、デンストメーター (Computing Densitometer ACD-18, ATTO, Tokyo Japan)により行った。

1-1-3 結果と考察

7日間のmeal feedingを行った結果、12C区のラットは14.2gの体重増加が認められ、一方、12G区では2.8g、PF区では17.7gの体重減少が観察された。

その時の血中IGF-I濃度は、IR-IGF-I濃度、total IGF-I濃度ともにもっとも成長が良かった12C区で高く、以下12G、PF区の順に低くなっていた (Fig.1-2)。更にこれら血中IGF-I濃度と体重変化の相関関係は、Fig.1-3に示すように非常に良い正の相関を示した。その際相関係数は、IR-IGF-I濃度の方が0.989、total IGF-I濃度の方が、0.973であり、IR-IGF-I濃度の方がより高い正の相関を示した。

このように血中IGF-I濃度が動物の成長とよく相関している際に、IGF-Iの主要生産臓器である肝臓中のIGF-I mRNA量をnorthern blot分析により定量した結果をFig.1-4に示す。ラット肝臓中には、0.8-1.2kbの比較的broadなmRNAと、2.0kb, 3.6kb, 4.0kb, 7.4kbの少なくとも5種類の長さの異な

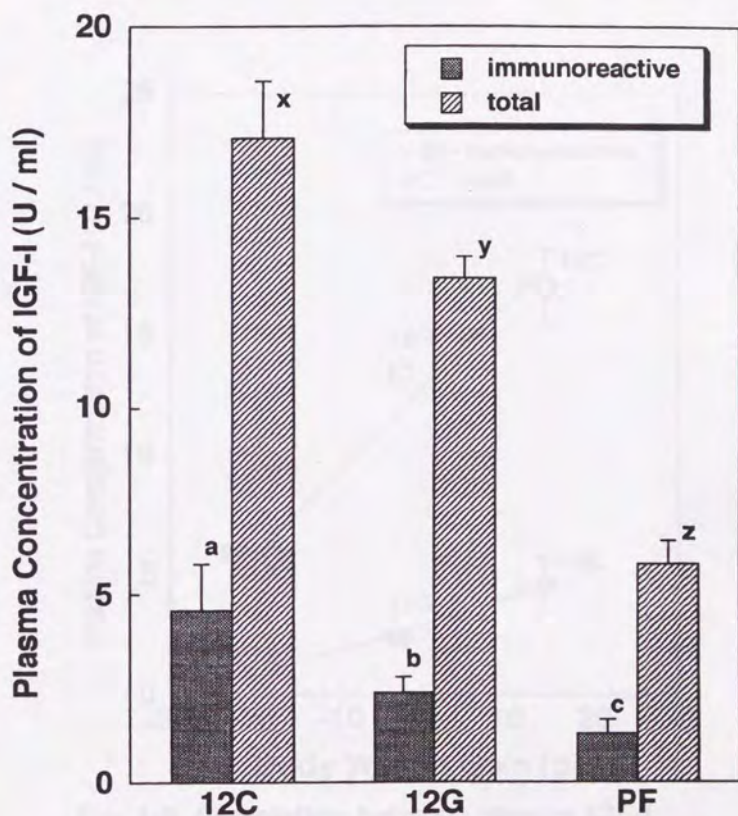


Fig. 1-2 Effect of dietary proteins on the concentration of immunoreactive and total IGF-I in rats

Values not sharing a common letter are significantly different at $P < 0.05$ by Tukey's Q test

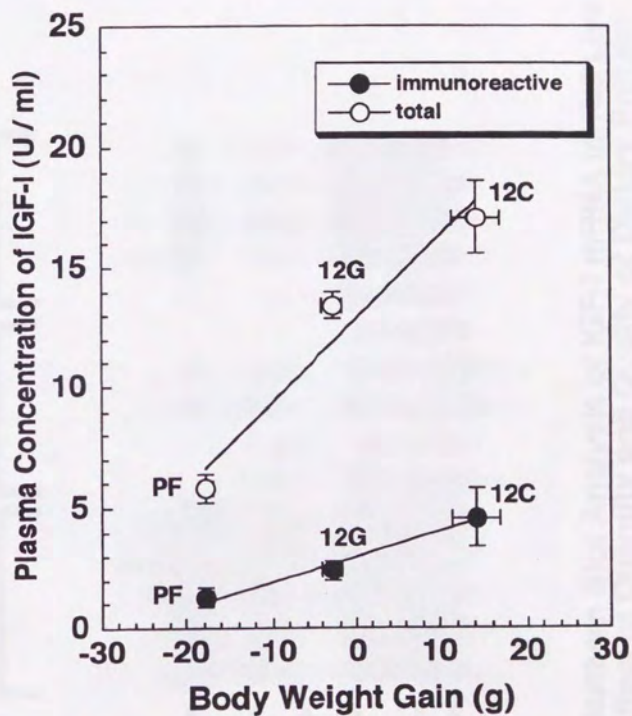


Fig. 1-3 Correlation between plasma IGF-I concentrations and body weight gain in rats

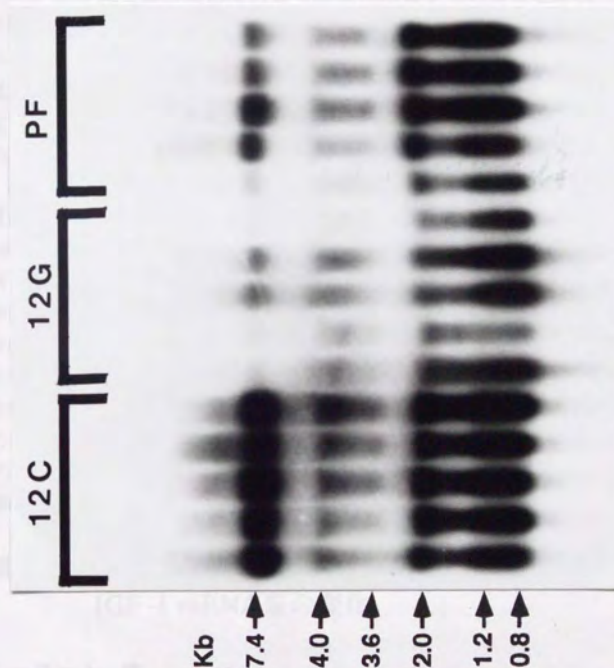


Fig. 1-4 Northern Blot Analysis of IGF-I mRNA in Rat Liver :
Effect of Quantity and Quality of Dietary Protein
 Each lane shows the mRNA of one rat.

るmRNAが存在していた。どのラットの肝臓においても0.8-1.2kbのものがもっとも多く存在している。これらは、先の緒言でも述べたように、主として3' UTRの違いによるものであり、5' UTRの違いは長さの違いには関与していないことがすでに明らかになっている。

これら5種のIGF-I mRNAの総量は、Fig.1-5に示すように、12Cを100としたすると、12G, PFともに約40となり、12G, PFでは明確な差は観察されなかった。一方、長さの異なるIGF-I mRNAそれぞれの変化を見ると、0.8-1.2kbと2.0kbのものに比べて、3.6+4.0kbと7.4kbのものがより食餌タンパク質の質と量の変化に対して顕著に応答していることが明らかになった(Fig.1-6)。これら長いIGF-I mRNAは、短いものに比べてその半減期が短いことがすでに明らかになっており(120)、この結果は、食餌タンパク質の質と量の変化に反応してIGF-I mRNA量が変化するのは、IGF-I mRNAの安定性の違いによるものである可能性を示唆しているが、この点に関してはこの章の第三節で詳述する。

このように、肝臓中のIGF-I mRNA量は、食餌タンパク質の量だけでなく、質の違いによっても変化することが明らかとなり、更にその変化はIGF-I mRNAの長さにより異なることが明らかとなった。動物が摂取する食餌タンパク質の量の違いにより、血中IGF-I濃度が変化すること、またその際肝臓中のIGF-I mRNA量が変化することはすでにいくつか報告があるが、グルテンのようにある種のアミノ酸が欠乏している食餌タンパク質の摂取によっても血中IGF-I濃度と肝臓中のIGF-I mRNA量が変化すること、しかもその減少は無タンパク質食を摂取している状態と同程度であることを明らかにしたのは、これが初めてである。次に、この結果を更に確認するため、必須アミノ酸の欠乏状態がより顕著に観察される大豆タンパク質を用いて、同様の実験を行うこととした。

第二節 大豆タンパク質摂取時の血中IGF-I濃度、肝臓IGF-I mRNA量の変化

1-2-1 序

第一節では、食餌タンパク質の質と量を変化させるために、カゼイン食、グルテン食、無タンパク質食の3者を摂取させ、実験を行った。その結果肝臓中のIGF-I mRNA量が食餌タンパク質の量だけでなく、質に対しても応答することが明らかとなった。周知のとおりグルテンはAINの推奨アミノ酸パターン(121)と比較すると、リジンとスレオニンが欠乏している。グルテン食摂取時の肝臓中の全IGF-I mRNA量は、無タンパク質食と同程度まで減少

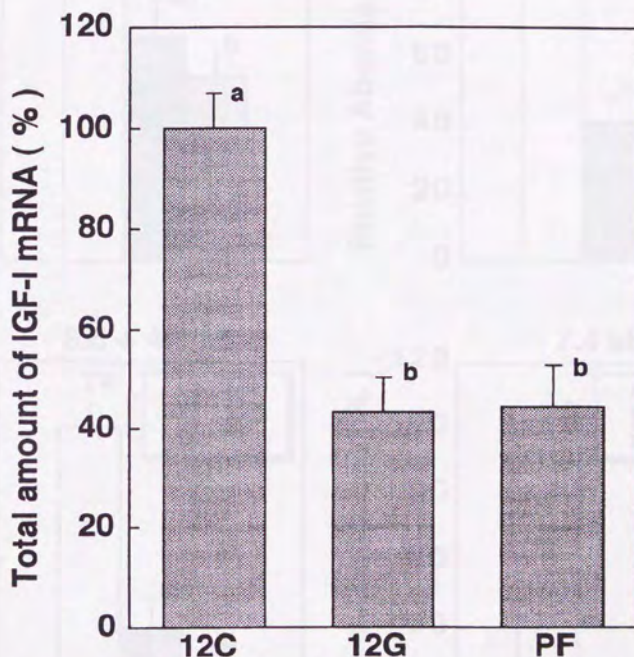


Fig. 1-5 Total amount of hepatic IGF-I mRNA of rats fed various diets

Values not sharing a common letter are significantly different at $P < 0.05$ by Tukey's Q test

Values are means of for five rats and represented as per cent of values of rats fed a 12C diet.

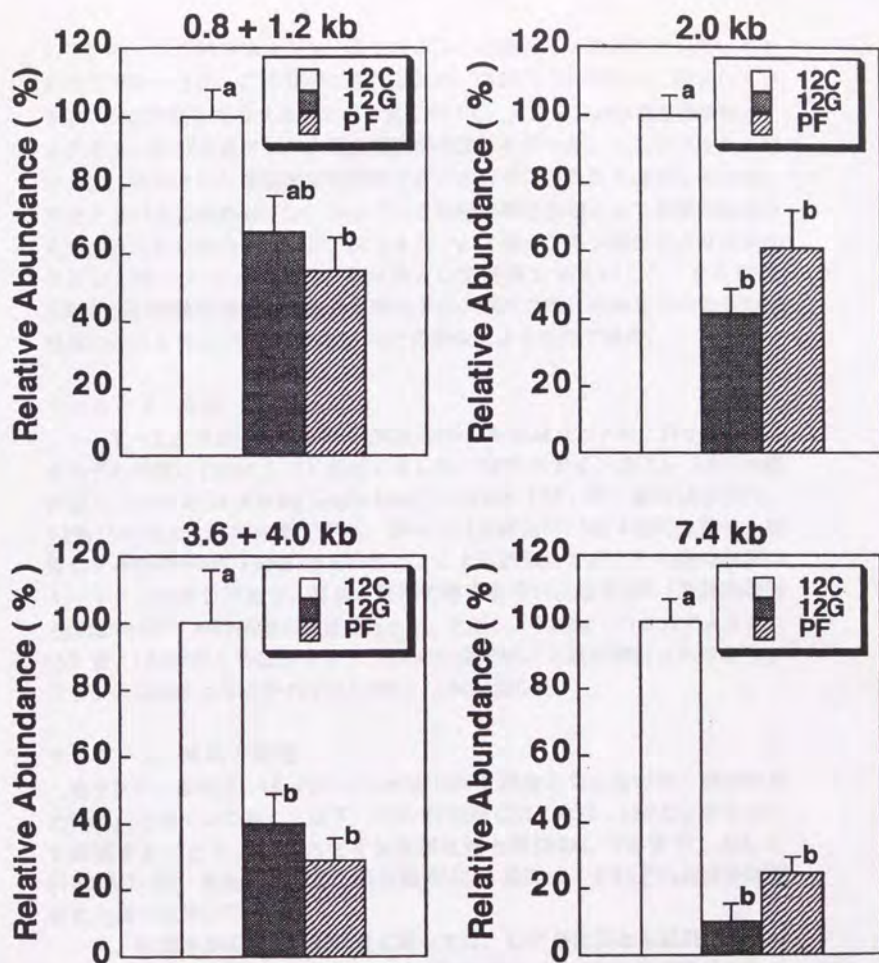


Fig. 1-6 Effect of dietary proteins on the relative amount of IGF-I mRNA species in rat liver

Values are means for five rats and represented as per cent of values of rats fed on a 12C diet.

Values not sharing a common letter are significantly different at $P < 0.05$ by Tukey's Q test

していた。この減少はリジン、スレオニンの必須アミノ酸が欠乏しているためなのであろうか。この疑問に答えるため、本節では必須アミノ酸としてメチオニンが欠乏している大豆タンパク質を用いて、大豆タンパク質食摂取時と、メチオニン添加大豆タンパク質食摂取時の比較を行った。ここでグルテンにリジン、スレオニンを添加する代わりに、大豆タンパク質を使用したのは、大豆タンパク質がカゼイン、グルテンと同様実際の食糧として重要であることもさることながら、リジン、スレオニンの2種のアミノ酸欠乏よりもメチオニン1種のアミノ酸欠乏の方が系として評価しやすいこと、また肝臓IGF-I mRNA量の減少がこれら2種のアミノ酸欠乏時のみ見られるものではないことを明らかにするため、などの理由によるものである。

1-2-2 方法

1-1-2と同様に、体重150g前後のWistar系雄ラットを1群5頭とし、それぞれの群にTable 1-1に組成を示した、12%カゼイン食(C)、12%分離大豆タンパク質(Isolated Soya-bean Protein :ISP, 不二製油)食(ISP)、12%ISP+3.2% L-Met食(ISPM)、無タンパク質食(PF)の4種の食餌を、同様に1週間のmeal feedingを行うことにより摂取させた。その後の処理は1-1-2と同じであり、採血と肝臓の摘出を行い、血中IGF-I濃度の定量と肝臓中IGF-I mRNA量の定量を行った。ただし、Table 1-1に示すように、ISP食、ISPM食ともにメチオニン添加の効果がより顕著観察されるよう、リジンとスレオニンをそれぞれ1.0%と1.5%添加した。

1-2-3 結果と考察

血中IGF-I濃度は、IR-IGF-I、total IGF-I濃度ともに先の第一節の結果と同様、カゼインで高く、以下、ISP、PFの順に低くなり、ISPにメチオニンを添加することにより、カゼイン食摂取時と同様のレベルまで上昇した(Table 1-2)。また、同じくこれら血中IGF-I濃度は、それぞれの群の体重変化と良く相関していた。

一方、肝臓中のIGF-I mRNA量に関しては、わずかに異なる結果が得られた(Fig. 1-7)。すなわち、グルテン食摂取時には、カゼイン食摂取時に比べて、肝臓中に約40%のIGF-I mRNA量しか存在せず、無タンパク質食摂取時と差がなかったが、ISP食摂取ラットの肝臓中にはカゼイン食摂取ラットの約80%のIGF-I mRNA量が存在し、カゼイン食摂取時と差が認められなかった。しかし、この約80%にまで減少しているIGF-I mRNA量はメチオニンの添加によってカゼイン食摂取時と同レベルまで増加した(Fig. 1-8)。

また、長さの異なるIGF-I mRNAの分子種に注目して解析を行うと、やは

Table 1-2 Food Intake, Body Weight Gain and Plasma Concentration of Immunoreactive and Total IGF-I of Rats Fed on Various Diets

	12C	SPIM	SPI	PF
Food Intake (g / 8 days)	114.0 ± 5.0 ^{ab}	101.0 ± 1.0 ^{bc}	121.0 ± 5.0 ^a	85.0 ± 4.0 ^c
Body Weight Gain (g / 8 days)	47.5 ± 1.7 ^a	41.6 ± 2.2 ^a	30.7 ± 2.8 ^b	- 4.5 ± 0.6 ^c
Immunoreactive IGF-I (U / ml)	6.60 ± 0.19 ^a	5.73 ± 0.16 ^a	2.58 ± 0.35 ^b	1.20 ± 0.10 ^c
Total IGF-I (U / ml)	24.49 ± 2.90 ^a	18.91 ± 0.66 ^{ab}	12.89 ± 1.41 ^{bc}	7.00 ± 0.53 ^c

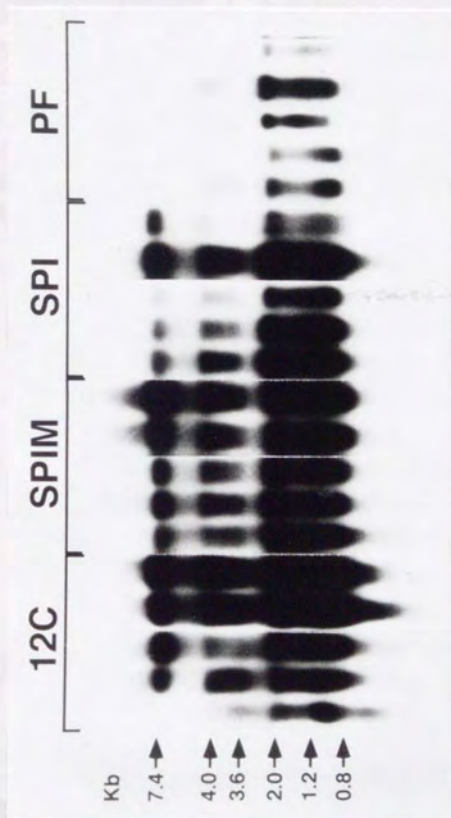


Fig. 1-7 Northern Blot Analysis of IGF-I mRNA in Rat Liver : Soy Bean Protein
Each lane shows the mRNA of one rat.

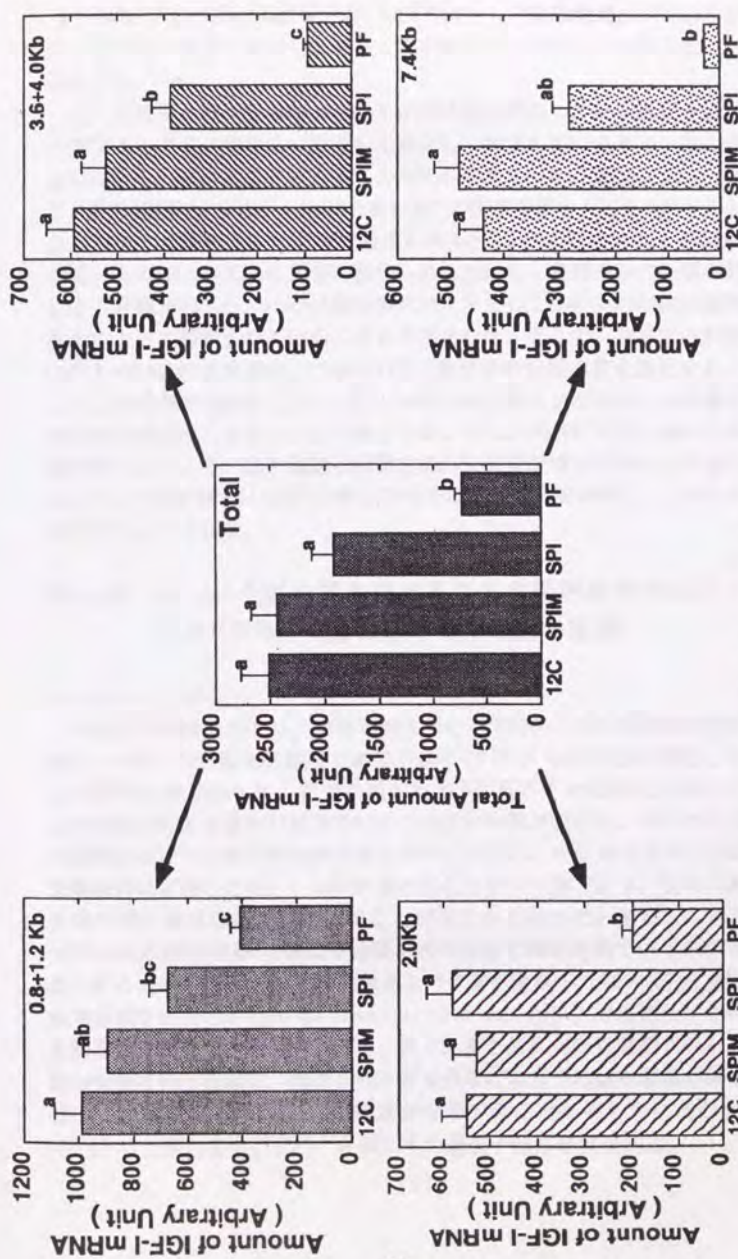


Fig. 1-8 Changes of Total and Relative Amounts of Hepatic IGF-I mRNA In Rats Fed Various Diets

Values are means for five rats and represented as arbitrary units of the bands shown in Fig. 1-7. Values not sharing a common letter are significantly different at $P < 0.05$ by Tukey's Q test.

り7.4kbと3.6+4.0kbの比較的長い分子種が、ISP食摂取時、すなわちメチオニン欠乏時に顕著に減少しており、この減少はメチオニンの添加により回復した(Fig. 1-8)。

以上の結果より、肝臓中のIGF-I mRNA量は摂取している食餌タンパク質の質であるアミノ酸組成にตอบสนองして変化し、欠乏しているアミノ酸の添加によりIGF-I mRNA量が回復することが明らかとなった。更に欠乏しているアミノ酸の種類によりIGF-I mRNA量の減少の程度が異なることも明らかとなった。また、比較的長い分子種である7.4kbと3.6+4.0kbのIGF-I mRNAの量が短いものに比べてより顕著に変化したことから、食餌タンパク質の質と量による肝臓中のIGF-I mRNA量の変化は、主としてIGF-I mRNAの安定性の変化によって調節されていることが予想された。そこで、次節では肝臓でのIGF-I mRNAの合成速度、つまりIGF-I遺伝子の転写速度を測定することにより、栄養条件の変化によるIGF-I mRNA量の変化がどのような機構によるものかを明らかにすることを目的とした。また、同時にすでに無タンパク質食摂取により、その血中濃度と肝臓中のmRNA量が増加することが明らかにされているIGFBP-1(122)に関してもその転写速度を測定し、IGF-Iと比較検討することとした。

第三節 タンパク質の質と量の異なる食餌摂取時のIGF-I 及びIGFBP-1遺伝子の転写速度の定量

1-3-1 序

前節までの結果により、栄養状態に対応してIGF-Iの血中濃度に変化する際に、IGF-Iの主要生産臓器である肝臓中のIGF-I mRNA量が変化していることが明らかとなった。すでに述べたようにIGF-I mRNAには主として3' UTRの違いにより長さの異なるいくつかの分子種が存在し、それぞれが異なる調節を受けている可能性が示唆されている(32)。今回筆者が明らかにした栄養条件にตอบสนองしたIGF-I mRNA量の変化もその一例であり、比較的長い分子種が特に敏感にตอบสนองしていることが明らかとなった。そこでこのIGF-I mRNA量の変化がIGF-I遺伝子発現のどの段階で調節されているのかを明らかにするため、本節では各種食餌タンパク質を摂取した際のIGF-I遺伝子の転写速度をnuclear run-on transcription assayにより測定し、その機構を明らかにすることを目的とした。また、すでに共同研究者の竹中により同様の実験を行った際に、無タンパク質食摂取によりその血中濃度が顕著に増加し、肝臓中のIGFBP-1 mRNA量が増加することが明らかにされているIGFBP-1に関しても(122)、同時にその遺伝子転写速度を測定し、IGF-Iと

比較検討した。既述のようにIGFBP-1はadult ratでは肝臓と腎臓でのみ発現しており、肝臓が血中IGFBP-1の主要な生産臓器であることが明らかにされている。

これまでに絶食したラットの肝臓においてIGF-I mRNA量は減少するものの、IGF-I遺伝子の転写速度はわずかに減少するものの大きくは変化しないこと(114)、食餌タンパク質のレベルを変化させていった際の肝臓中のIGF-I mRNA量の変化にはIGF-I mRNAの安定性が関与していることが報告されている(115)。しかし、今回筆者が行っているmarginal amino acid deficiencyのような条件下での解析は報告されていない。絶食のような極端な条件ではなく、通常の食生活上で充分起こりうる状況下での変化を解析することは、非常に重要であると考ええる。

1-3-2 方法

単離核の調製およびnuclear run-on transcription assayはMarzluffらの方法(123)を元にしたNawaらの方法(124)にしたがって行った。以下にその詳細を記す。

1) 単離核の調製

1-1-1と同じく、12% カゼイン食、12% グルテン食、無タンパク質食の3種の食餌を用いて、同様の飼育を行ったラットの肝臓より単離核の調製を行った。すなわち、ネンブタール麻酔を行ったラットを開腹後、門脈にカニューレションし、肝臓に氷冷した10mM Tris-HCl (pH8.0), 0.14M NaClを100ml灌流し、完全に脱血させる。脱血した肝臓の約1.0gを採取し、10倍量のBuffer I (0.32M Sucrose, 10mM Tris-HCl pH8.0, 3mM CaCl_2 , 2mM $\text{Mg}(\text{OCOCH}_3)_2$, 0.1mM EDTA, 0.1% Nonidet P-40, 1mM Dethiothreitol (DTT), 0.1mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF))中で、ホモジェナイズする。その際、ホモジェナイザー (Dounce型, Wheaton) はloose-fitting のものを使用する。得られたホモジェネートを150meshのナイロン膜で濾過し、500Xg, 5min, 2℃で遠心する。沈殿を3mlのBuffer Iに懸濁し、7.5mlのBuffer II(2M Sucrose, 10mM Tris-HCl pH8.0, 3mM $\text{Mg}(\text{OCOCH}_3)_2$, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 0.1mM PMSF)とよく混合する。この混合液を、あらかじめ3.5mlのBuffer IIをクッションとして入れておいた超遠心用チューブ内で重層し、50,000Xg, 1hr, 2℃で超遠心する。遠心終了後、沈殿として得られる精製単離核を0.1mlのBuffer III(25% Glycerol, 50mM Tris-HCl pH8.0, 5mM $\text{Mg}(\text{OCOCH}_3)_2$, 0.1mM EDTA, 5mM DTT, 0.1mM PMSF)に懸濁し、血球計算盤で核数を測定後、*in vitro* 転写反応に使用するまで液体窒素中で保存する。

2) *In vitro* 転写反応

反応液は、以下のようである。すなわち、40 μ l の 2mM ATP, CTP, GTP(pH7.0), 50 μ l の 0.6M KCl, 12.5mM Mg(OCOCH₃)₂, Buffer III を用いて希釈し、10⁸ nuclei/ml の濃度に調整した単離核溶液 100 μ l, 10 μ l (100 μ Ci) の α -[³²P]-UTP (New England Nuclear, 760 μ Ci/mmol) の計 200 μ l の混合液である。この液を 25 $^{\circ}$ C, 40min ととききゆっくりと攪拌しながら反応させる。反応終了後、RNase free DNase I (Boeringer Mannheim) を 15 μ g/ml の濃度で反応液に加え、更に 25 $^{\circ}$ C で 20 分間インキュベートし反応を停止させる。続いて 1.8ml の 1% SDS, 10mM EDTA (pH7.0) を添加し、核を可溶化する。

核の可溶化後、0.2ml の 3M CH₃COONa (pH 4.8) と 2ml の phenol-chloroform (1:1) を加え、55 $^{\circ}$ C, 10min 激しく振盪し、[³²P]-labelled RNA を抽出する。次いで、5min 氷中で保存した後、12,000Xg, 10min, 2 $^{\circ}$ C で遠心し、水層を分離する。得られた水層に 2.5 vol のエタノールを加え、-20 $^{\circ}$ C で少なくとも 1hr 放置し、RNA を沈殿させる。生成したエタノール沈殿を 27,000Xg, 20min, 0 $^{\circ}$ C で遠心して回収し、軽く風乾させた後 100 μ l の Buffer IV (10mM Tris-HCl pH7.6, 0.1M NaCl, 0.1% SDS, 1mM EDTA) に溶解し、更に Sephadex G-50 (medium) を用いた Spin-column 法によりゲル濾過を行い、RNA に取り込まれていない [³²P]-UTP を取り除く。

3) *In vitro* 転写生成物の定量

in vitro 転写反応により生成した IGF-I mRNA, IGFBP-1 mRNA 量の定量は、2) で得られた [³²P]-RNA をあらかじめフィルターに固定しておいたそれぞれの cDNA とハイブリダイズさせることにより行った。すなわち、pUC119 にサブクローニングされた IGF-I cDNA, IGFBP-1 cDNA を制限酵素処理により linearize し、エタノール沈殿、回収、乾燥後、2M NaCl, 0.2M NH₄Cl に 100 μ g cDNA/ml の濃度に溶解し、3min 煮沸後直ちに急冷して DNA を変性させる。蒸留水、20XSSC の順にあらかじめ浸しておいたニトロセルロース膜に dot-blot 装置を用いて、上記 DNA 溶液を 50 μ l ずつスポットする。各 dot を 0.1ml の 20XSSC で 2 回洗浄し、フィルターを室温で風乾後、80 $^{\circ}$ C, 2hr 真空下で Baking する。今回用いた cDNA は、筆者が本研究を行った東京大学農学部栄養化学研究室において、それぞれ加藤(119)、竹中(122)によりクローニングされたものであり、ともに pUC119 にサブクローニングされている。また、非特異的結合量を測定するため、cDNA を含んでいない pUC119 も同様に処理し、コントロールとした。

作成したフィルターは、50% formamide, 5XSSPE(1X = 0.12M NaCl, 1mM EDTA, 0.01M NaH_2PO_4 , pH7.4), 5XDenhardt's solution, 0.1% SDS, 0.1mg/ml denatured salmon testis DNA の溶液中で42℃, 12hrプレハイブリダイゼーションする。プレハイブリダイゼーション終了後、 1.0×10^6 cpm/0.5ml プレハイブリダイゼーション溶液の濃度になるよう2) で調製した ^{32}P -RNAを添加した溶液中で、フィルターを42℃, 72hrハイブリダイズする。ハイブリダイゼーション終了後、フィルターを5XSSPE, 0.1% SDSで洗浄し、風乾後オートラジオグラフィーに供する。得られた結果の解析、定量はFUJIX BAS2000イメージアナライザー(Fuji Film Co., Tokyo, Japan)により行った。

1-3-3 結果と考察

食餌タンパク質の質と量を変化させた食餌を摂取させたラットの肝臓において、IGF-I遺伝子の転写速度は、Fig. 1-9に示したように、カゼイン食摂取時を100とすると、グルテン食摂取時には76、無タンパク質食摂取時には77となり、グルテン食、無タンパク質食ともに約25%の減少を示したものの、3者に統計的に有意な差はなかった。この結果より食餌タンパク質の質と量を変化させた際、ラット肝臓中のIGF-I遺伝子の転写速度は変化していないことが明らかになった。すなわち肝臓でのIGF-I遺伝子の転写速度は、摂取する食餌タンパク質の質と量によっては調節されていないと考えられる。先に示したIGF-I mRNA量の変化は、主として長いmRNAに顕著に見られたが、これら長い3' UTRを持つIGF-I mRNAは、その3' UTR中にmRNAの分解を促進することが報告されている配列を有していることが明らかになっており(33, 34)、短いIGF-I mRNAに比べてその半減期が短いことが知られている(120)。今回、食餌タンパク質の質と量を変化させても肝臓中のIGF-I遺伝子の転写速度には変化がなかったことは、肝臓中でのIGF-I mRNA量の調節は主として転写後の段階で起こっていることを示唆しており、長いmRNAの方がより顕著に減少傾向を示した結果をよく説明することができる。

一方、Fig. 1-10に示したように、IGFBP-1遺伝子の転写速度は、カゼイン食摂取時を100とすると、グルテン食摂取時は151でありわずかに上昇する傾向を示しているものの統計的に有意な差は見られないが、無タンパク質食摂取時には420と統計的に有意な増加を示した。すでに竹中らは同様の条件下で肝臓中のIGFBP-1 mRNA量が、カゼイン食摂取ラットと比べて無タンパク質食摂取ラットでのみ顕著に増加し、グルテン食摂取ラットではほとんど変化しないことを報告しているが(122)、今回得られたIGFBP-1遺伝子の転写速度の結果はIGFBP-1 mRNA量の変化とよく相関しており、

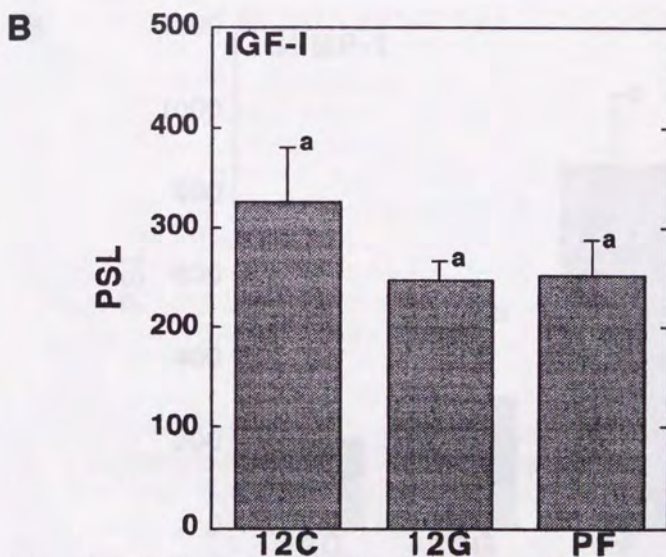
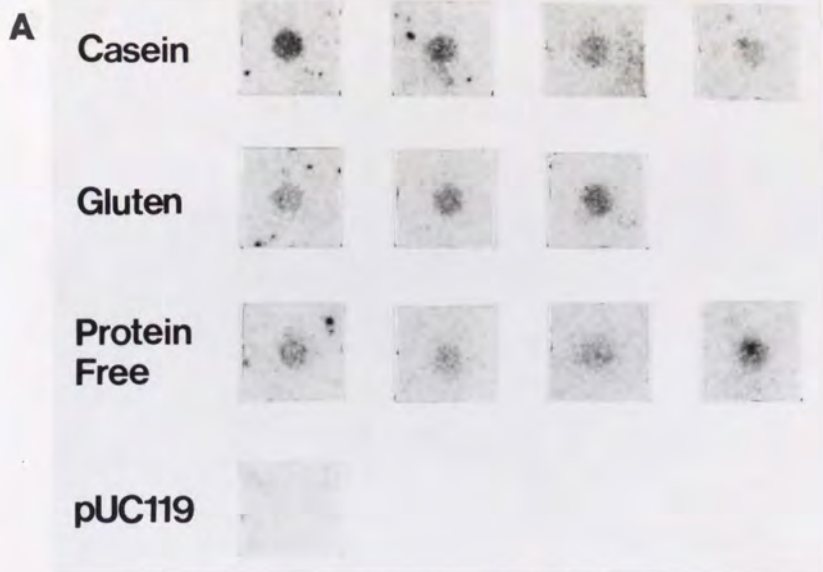


Fig. 1-9 Effect of Nutritional Quantity and Quality of Dietary Protein on The Transcriptional Rate of IGF-I Gene in Rat Liver

A : Results of run-on assay

B : Quantitative analysis of hybridized signals in A

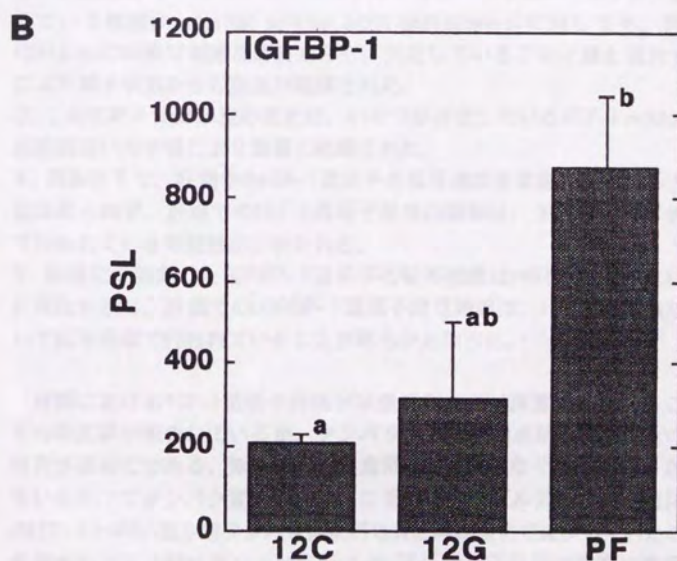
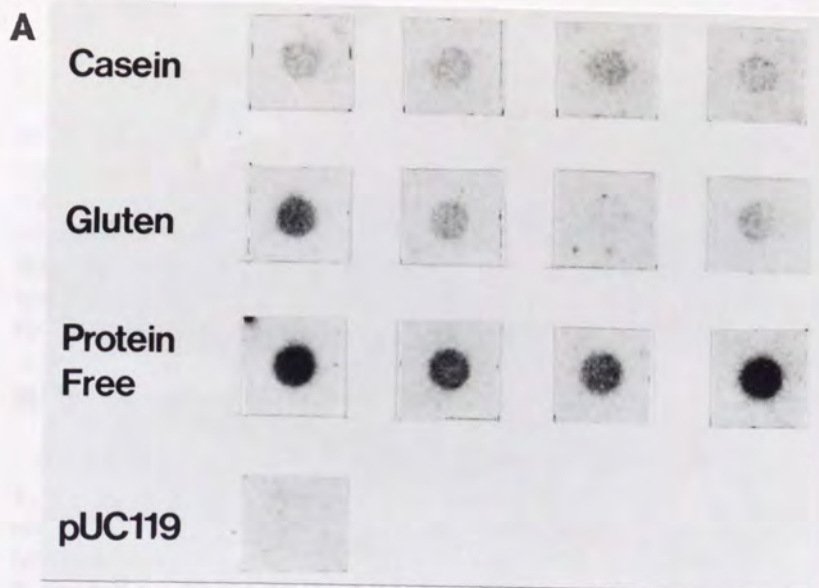


Fig. 1-10 Effect of Nutritional Quantity and Quality of Dietary Protein on The Transcriptional Rate of IGFBP-I Gene in Rat Liver

A : Results of run-on assay

B : Quantitative analysis of hybridized signals in A

IGFBP-1遺伝子の食餌タンパク質による調節は主として遺伝子の転写段階で行われていることが予想される。IGFBP-1遺伝子の発現調節に関してはすでに多くの報告があり、そのpromotor領域とそこに結合する転写因子も明らかにされている(125~129)。その点に関しては第三章で詳述するが、最近無タンパク質食摂取時に、肝臓特異的転写因子であるHNF-1の結合様式がカゼイン食摂取時とは異なることが示され、タンパク質代謝の変化に伴うIGFBP-1遺伝子発現の調節機構の一端が明らかにされつつある。

第四節 討論

本章で明らかになったことをまとめると以下になる。

1. 食餌タンパク質の質と量を変化させた食餌をラットに摂取させると、血中IGF-I濃度が変化するとともに、その主要生産臓器である肝臓中のIGF-I mRNA量が変化する。
2. 特に食餌タンパク質の質を変化させた場合、ある種の必須アミノ酸が欠乏している状態(marginal amino acid deficiency)に対しても、肝臓中のIGF-I mRNA量は敏感な応答を示し、欠乏しているアミノ酸を補充することにより減少状態からの回復が観察された。
3. このIGF-I mRNA量の変化は、いくつか存在しているIGF-I mRNAの内、比較的長い分子種により顕著に観察された。
4. 同条件下で、肝臓中のIGF-I遺伝子の転写速度を定量したところ大きな変化は見られず、肝臓でのIGF-I遺伝子発現の調節は、主として転写後の段階で行われている可能性が示唆された。
5. 同時に、測定したIGFBP-1遺伝子の転写速度はmRNA量の変化に対応した変化を示し、肝臓でのIGFBP-1遺伝子発現調節は、IGF-Iとは異なり主として転写段階で行われていることが明らかとなった。

肝臓におけるIGF-I遺伝子発現が栄養状態により調節されていることは多くの研究者が報告しているが、タンパク質栄養の観点から解析したのは、本研究が初めてである。無タンパク質食摂取時だけでなく、Lys, Thrが欠乏しているだけでタンパク質の量は十分に含んでいるグルテン食摂取時に肝臓中のIGF-I mRNA量が無タンパク質食摂取時と同程度まで減少していたことは、食餌中のアミノ酸バランスが肝臓でのIGF-I遺伝子発現の調節に重要な役割を果たしていることを示しており、新しい発見である。また、同様に栄養状態の変化により遺伝子発現が変化することが知られていたIGFBP-1が、IGF-Iとは異なり遺伝子の転写段階で調節されていることを明らかとしたこ

とも今回得られた新知見である。

それでは、どのような機構で肝臓中のIGF-IおよびIGFBP-1遺伝子の発現が変化するのであろうか。

IGF-Iに関して、まず最初に考えられるのは内分泌系の関与である。IGF-I遺伝子の発現調節において中心的役割を果たしていることが知られているのは既述のように成長ホルモン(GH)である。最近、栄養状態の変化に伴って、血中GH濃度が変化することが報告された(130)。しかし、多くの*in vitro*, *in vivo*系を用いた解析よりGHはIGF-I遺伝子の安定性の促進よりは転写を促進に働いていることが明らかにされており(131~133)、血中GH濃度の変化が今回観察された減少の原因である可能性は低い。また、種々の生理的条件下(絶食時を含む)で肝臓のGH receptor数が変化するという報告があるが(134)、Maesらは食餌中のタンパク質含量を少なくした際に、GHを投与しても血中IGF-I濃度が上昇しない、すなわちGH-resistanceが見られる状況下の肝臓中のGH receptor数を測定しているが、GH receptor数は変化せず、GH resistanceはGH receptor以降の細胞内での障害が原因であると報告している(48~52)。今回観察されたIGF-I mRNAの安定性の変化は、この細胞内で起きた障害を観察したものと思われる。

他のホルモンの中では、インスリンが種々の遺伝子に対してその転写調節とmRNAの安定化の作用を示すことが知られている(135)。しかし、すでに宮川により報告されているように、今回用いた飼育条件下ではインスリンの血中濃度は、動物の成長速度と相関していない(4)。IGF-I遺伝子発現は成長速度と相関しているわけであるから、血中のインスリン濃度が、肝臓のIGF-I遺伝子の発現調節において大きな役割を果たしているとは考えにくい。

mRNAの安定性の調節機構は、転写機構と比べるとほとんど解明されていないといえて良く、ここで詳細に討論することはできない。しかし、今回顕著な変化を示した比較的に長いIGF-I mRNAは、その3' UTRにmRNAを不安定化させると考えられているAU rich配列(AREs)を持っており(33, 34)、その配列にARE binding proteinが結合し、mRNAの分解を調節していると考えられる(136, 137)。しかし、ARE binding proteinの正体はまだ完全には判明しておらず、生理的条件下の変化による動きに関する研究もなされていない。今回のIGF-I mRNA量の変化は、ARE binding proteinの変化が関与している可能性があるが、それは今後の検討課題といえるであろう。また、mRNAの5' UTRも安定性の調節に重要な役割を果たしている可能性があるが、IGF-I mRNAに関してはすでに加藤により、栄養条件に応答したIGF-I mRNA量の変化が起きる際に、5' UTRのtypeの違いによる差はないことが報告されており(23)、その可能性は低いものと思われる。また、グルテン食摂

取時と無タンパク質食摂取時に肝 IGF-I mRNA量には差がないにもかかわらず、血中IGF-I濃度には有意な差があることは翻訳段階で何らかの調節が行われている可能性、例えば栄養状態の変化により肝臓中の遊離アミノ酸濃度が増加し、aminoacyl-tRNAのchargingが増加し、そのためIGF-I mRNAに結合しているリボソームに変化が起きる、翻訳段階の開始因子及び伸長因子が栄養状態の変化により量的、質的に変化しているなどが考えられるが、各種生理的条件下でのIGF-I mRNAの翻訳速度を測定することは非常に難しく、今後の検討課題である。

一方、IGFBP-1に関しては栄養状態の悪化に伴い肝臓での遺伝子転写速度が顕著に上昇し、mRNA量、血中濃度の変化とよく一致した動きを示した。IGFBP-1遺伝子の構造は、そのクローニングはIGF-Iよりも遅かったにもかかわらず、IGF-Iよりも詳しく解析されている。現在IGFBP-1遺伝子の転写速度を上昇させることが明らかになっているものとしてグルココルチコイドが(138)、一方低下させるものとしてインスリン(139)、成長ホルモン(140)が知られている。今回観察された低栄養状態でのIGFBP-1遺伝子転写速度の上昇にこれらのホルモンの血中濃度の変化がどの程度寄与しているかは不明であるが、先にも述べたように栄養状態の変化によりインスリン、成長ホルモンの濃度が増加することが明らかとなっているので、これらのホルモンが複合的に作用し、IGFBP-1遺伝子発現を増加させている可能性が考えられる。しかし、最近培養肝細胞を用いた実験により、培地中の特定のアミノ酸を除いた時に、IGF-I及びIGFBP-1遺伝子の発現が増加するという報告がなされている(141~143)。筆者も同様の実験を行い、培地中のアミノ酸濃度がIGFBP-1遺伝子発現に対して影響するという結果を得ている。この点に関しては第四章で詳述するが、低栄養状態で惹起される肝臓中の遊離アミノ酸濃度の変化がIGFBP-1遺伝子発現の変化の原因になっている可能性が考えられる。

次章からは、*in vivo*で観察されたここまでの結果を踏まえ、これらの現象をより詳細に解析するため*in vitro*系である初代培養肝細胞を用いて、IGF-I及びIGFBP-1の遺伝子発現調節機構を解析した結果を示す。

第二章 初代培養肝細胞系におけるIGF-I及びIGFBPの遺伝子発現の基礎的解析

序論

前章では、ラットが摂取している食餌タンパク質の質と量により、肝臓中のIGF-I遺伝子発現が厳密に調節されていること、更にその調節がIGF-I mRNAの安定性の段階で行われていることを明らかにした。また、同時に測定したIGFBP-1の遺伝子発現も食餌タンパク質の質と量により調節を受けており、それはIGF-Iとは異なり転写段階で行われていることを明らかにした。以上の結果は、whole animalを使用した*in vivo*での実験により得られたものであるが、これらの結果がどのような機構で引き起こされたかを明らかにするためには*in vitro*系での解析が必要である。現在ラット肝臓由来の細胞株は数種類存在し、それぞれの性質が詳細に解析されている。しかし、それら株化細胞のいずれも*in vivo*での肝機能を完全には維持していないことが明らかにされており(144~146)、肝機能を完全に維持している培養株化肝細胞は現在までに知られていない。そこで、本論文の以下の章では、現在知られている中でもっとも肝機能を良く維持していることが明らかになっている初代培養肝細胞を用いて解析を行うこととした。

初代培養肝細胞は、1969年にBerryとFriendにより分離法が開発され(147)、1976年にSeglenにより改良を加えられて完成し(148)、以降多くの研究に使用されてきた。これまでの解析では*in vivo*の肝臓の機能のほとんどを再現することが可能であるとされており、株化細胞では行うことができない実験や*in vivo*を反映した条件下での実験に良く使用されている。筆者が本研究を行った栄養化学研究室においてもかねてより初代培養肝細胞を使用して、肝臓中のタンパク質分解機構の解析を行ってきた(149)。初代培養肝細胞は、実験のたびに細胞を分離しなければならず、また通常の培養条件では長くても2週間しか培養できないという欠点があるものの、より*in vivo*に近い培養細胞が得られる利点は、この欠点を補ってあまりあるものと考えられる。

このような性質をもつ初代培養肝細胞は、IGF-I研究の初期より使用されており多くの知見が得られている。現在までに得られている主な結果を述べると、培地にGHを添加することにより、IGF-I mRNA量、IGF-I分泌量が増加する(131, 132)、インスリンも同様の効果を有し(150, 151)、更にIGF-I geneの転写を促進する(152)、などである。この点については第三章で詳述する。

本章では、各種ホルモンや培地中のアミノ酸などによるIGF-I、IGFBP-1遺伝子発現調節機構を解析するために、まず初代培養肝細胞がIGF-I及びIGFBP-1遺伝子発現の調節機構を解析するための系として適しているかを確かめることとした。すなわち、初代培養肝細胞においてIGF-I遺伝子がどの程度発現しているのか、IGFBPsのうちどのBPを発現しているのか、またその発現は培養条件によりどの程度変化するのかを解析することを目的とした。このような解析は、IGF-Iのみに関して、またIGFBP-1のみに関しては行われているが、同一の系で統一的行った報告はなく、また報告しているグループによりIGF-IやIGFBP-1の発現量が異なっている場合があることから、今後の解析を行う上でも重要であると思われる。同時にこのような解析を行うことにより、解析に最適の培養条件が明らかになることも期待できる。

第一節 初代培養肝細胞におけるIGF-I及びIGFBP-1の発現量の培養条件による変化

2-1-1 方法

(a) 初代培養肝細胞の分離・培養法

初代培養肝細胞の分離は、Seglenらの方法(148)を改良した中村らの*in situ* コラゲナーゼ灌流法(153)により行った。すなわちWistar系雄ラットをネブタール麻酔下で開腹し、門脈にカニキュレーションを行う。前灌流溶液(組成はTable 2-1に示した)を約30ml/minの流速で5分間流し、肝臓を脱血するとともに細胞間に存在する2価カチオンを除き、細胞間の接着を緩くしておく。その間に右心房に同様にカニキュレーションを行い、溶液を循環させる。前灌流溶液を流した後、コラゲナーゼ溶液を灌流し肝臓表面にコラゲナーゼ溶液が浸出して来るまで、灌流を続ける。溶け出した肝臓を、ピーカーにとり軽くはさみで細切しガーゼで濾過後、50Xg、1minの遠心を繰り返すことにより精製する。精製した肝細胞は、生存率を測定した後 2×10^6 cells/60mm ϕ dish(ここでは通常のcell culture用のdishを使用している。Corning)の密度で、播種する。播種後24時間まではWilliam's E(WE)培地に10% Calf Serum(CS)(UBC)を添加した培地を使用し、その後は血清無添加のWEもしくは実験に使用するホルモンを含んだWEを使用した。播種後2時間で一度培地交換し、以後24時間ごとに培地交換を行った。

(b) IGF-I 及びIGFBPs mRNA量の測定

各種mRNA量の測定の際には、培養終了後細胞の培地を吸引し、autoclaveしたPBS(-)で2回洗浄した後、1-1-2で記したAGPC法で使用する

Table 2-1
Composition of Buffers Used on Preparation
of Hepatocytes from Rat Liver

Ingredients	Pre-circulation Buffer (g / L)	Collagenase Buffer (g / L)
NaCl	8	8
KCl	0.4	0.4
CaCl ₂	—	0.56
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	0.078	0.078
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0.151	0.151
Hepes	2.38	2.38
Phenol Red	0.006	0.006
Collagenase	—	0.1
Trypsin Inhibitor (SB)	—	0.04
Trypsin Inhibitor (EW)	—	0.06
EGTA	0.19	—
NaHCO ₃	0.35	0.35
Glucose	0.9	—

Trypsin Inhibitor (SB) : Soy Bean Trypsin Inhibitor
 Trypsin Inhibitor (EW) : Egg White Trypsin Inhibitor
 Collagenase : collagenase S-I (新田ゼラチン)

るSolution D(4M guanidinium thiocyanate, 25mM sodium citrate, pH7.0; 0.5% sarcosyl, 0.1M 2-mercaptoethanol)を添加し、細胞を溶解させた。以降の操作は、AGPC法にしたがって行いtotal RNAを調製した。mRNAの測定は、1-1-2と同様に各種プローブを用いたNorthern blot分析により行った。

(c) IGF-I分泌量の測定

培地中のIGF-I量の測定は、培地を酸エタノール処理しIGFBPを除去した後に1-1-2と同様にRIAキットを用いて測定を行った。

(d) IGFBPs量の測定

培地中に分泌されたIGFBPs量の測定は、Western ligand blot法(154)により行った。すなわち得られた培地30 μ lを等量のnon-reduced SDS PAGE buffer(20% glycerol, 5% SDS, 20mM Tris, 2mM EDTA, BPB適量, pH6.8)と混合し、60 $^{\circ}$ Cで15min incubateした後、厚さ2mm、12.5%のゲルで電気泳動する。泳動終了後、常法(8)にしたがってニトロセルロース膜(Schleicher & Schuell; BAS 85)にトランスファーする。プロット終了後、膜を取り出し、3% Nonidet P-40を含むsaline (salineの組成は0.15M NaCl, 0.01M Tris-HCl, 0.05% sodium azide)中で4 $^{\circ}$ C、30min incubateし、次に1% BSAを含む同saline中で4 $^{\circ}$ C、overnight incubateする。この操作により 125 I-IGF-Iのnonspecificな吸着を防ぐことが可能になる。incubation終了後、0.1% Tween20を含むsaline中で4 $^{\circ}$ C、10min洗浄し、 125 I-IGF-I(4 $\times 10^6$ cpm)と1% BSA, 0.1% Tween 20を含むsaline中で更に、overnight incubateする。incubation終了後、フィルターを0.1% Tween 20を含むsalineで4 $^{\circ}$ C、15min、次にsalineで同様に洗浄し、軽く風乾させた後、Fujix BAS2000イメージアナライザーを用いてオートラジオグラフィーを行い、得られたスポットの定量を行った。

なお、上記で用いた 125 I-IGF-Iは以下のように調製した。0.1M acetic acidに溶解したIGF-I(Boehringer mannheim) 1 μ g /10 μ l、Na 125 I (Amersham, 100mCi/ml) 5 μ l、0.6M phosphate buffer(pH7.4) 5 μ l、chloramine T 溶液(50 μ g/ml - 0.04M phosphate buffer (pH7.4)) 10 μ lを室温で混合し、90秒反応させた後、ピロ亜硫酸ナトリウム溶液(100 μ g/ml-0.04M phosphate buffer pH7.4) 10 μ lと4% BSA/0.1M 酢酸アンモニウム溶液(BSA-Buffer) 100 μ lを添加し、反応を停止させる。反応液をあらかじめBSA-Bufferで平衡化しておいたSephadex G-25にapplyし、ゲル濾過を行った。濾液は10滴ずつ30本採取し、それぞれ1 μ lを γ

-counterで放射能測定し、得られる2つのピークの内、前のものを ^{125}I -IGF-Iとして、使用時まで -20°C で保存した。しかし、こうして作成した ^{125}I -IGF-I溶液中には、 ^{125}I -IGF-I以外にfreeの ^{125}I と ^{125}I -BSAが含まれることが、その後の解析により判明し、そのままWestern ligand blottingに使用すると、非特異的吸着が非常に高くなることが明らかになったため、更に精製を行うことにした。すなわち上記の操作により得られた ^{125}I -IGF-I画分を、0.15M NaCl, 0.01M Tris-HCl, 4% BSA, 0.5g/l sodium azide; pH 7.4のBufferを用いてSephacryl S-200によるゲル濾過に供した。得られた画分の放射能を測定し、得られる3つのピークのうち真ん中のピークを精製 ^{125}I -IGF-Iとして、上記のWestern ligand blottingに使用した。

(e) 分泌されたIGFBPsの糖鎖修飾の確認

IGFBPの内そのいくつかは糖鎖により修飾を受けていることが知られているが、Western ligand blot分析により初代培養肝細胞の培地中に検出されたIGFBPがどのIGFBPであるかを明らかにすることを目的として、分泌されたIGFBPsが糖鎖による修飾を受けているかを確認した。初代培養肝細胞のconditioned mediumをN-glycanase処理後、無処理のものと同時にWestern ligand blot分析に供した。N-glycanase処理は以下のように行った、すなわちconditioned medium 10 μl に0.55M リン酸buffer (pH8.6), 100mM 1,10-phenanthroline hydrate (in methanol), 7.5% Nori det P-40, N-glycanase (Genzyme) をそれぞれ終濃度 0.2M, 10mM, 1.25%, 10 units/ml となるように添加し、 37°C , 20hr incubateした。対照群としてN-glycanaseの代わりに50% glycerol, 2.5mM EDTA (N-glycanaseの溶解液)を同量加えたものを用意した。incubation終了後、Western ligand blot分析を行った。

2-1-2 結果と考察

1. 初代培養肝細胞におけるIGF-I及びIGFBP-1の発現の確認

肝細胞を分離し、24時間10% CSを含んだWE培地で培養を行い、更に24時間血清を含まないWE培地で培養した後、培地を採取すると同時に、細胞よりtotal RNAを調製し、Northern blot分析、Western ligand blot分析、RIAに供した。その結果、Fig. 2-1に示したように初代培養肝細胞中にIGF-I mRNA、IGFBP-1 mRNAが存在していること、培地中にIGF-Iが存在していること(data not shown)、数種類の分子量の異なるIGFBPが分泌されていることが確認された(Fig.2-2)。

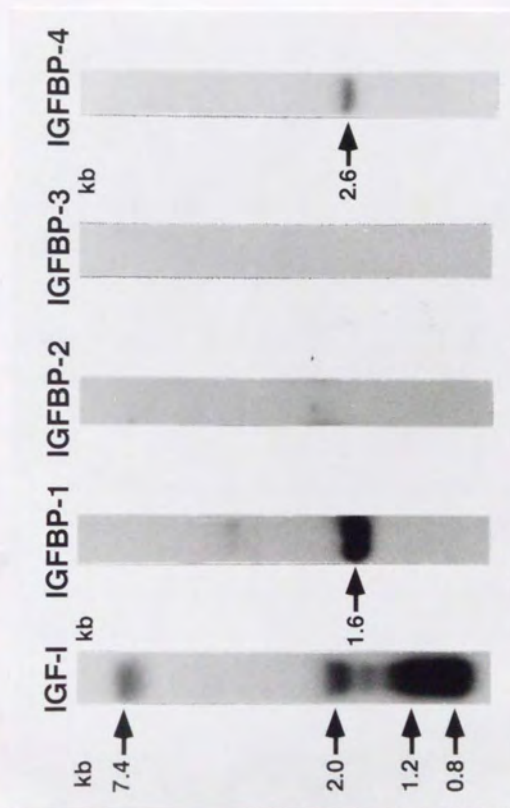


Fig. 2-1 Northern Blot Analysis of IGF-I, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3 and IGFBP-4 mRNA in Primary Cultured Rat Hepatocytes

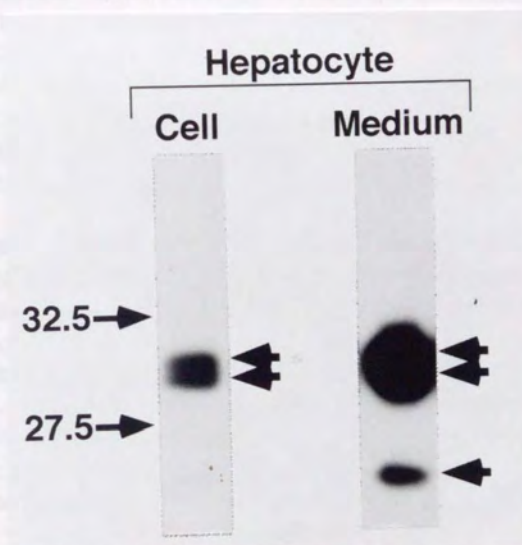


Fig. 2-2 Ligand Blot Analysis of IGFBPs in Cell Lysate and Conditioned Medium of Primary Cultured Rat Hepatocytes

初代培養肝細胞中に存在しているIGF-I mRNAは、第一章で示した*in vivo*の肝臓と同様長さの異なる数種のものが確認されたが、肝臓中とは異なり7.4kbの長さを持つmRNAの量が相対的に少なく、0.8-1.2kbのものと2.0kbのものが比較的多く存在していた。一方IGFBP-1 mRNAに関しては、肝臓中と同様1.6kbの単一のmRNAが存在していることが確認された。更に、IGFBP-4 mRNAの存在も確認されたが、IGFBP-2、-3 mRNAは検出されなかった(Fig. 2-1)。

また、培地のWestern ligand blot分析の結果、30kDa付近に2本、24kDa付近に1本のIGFBPと考えられるバンドが検出されており、少なくとも30kDaのものどちらかがIGFBP-1に相当するものと考えられた(Fig. 2-2)。この点に関しては、後述する。

2. 培養に使用するdishの違いによるIGF-I mRNA、IGFBP-1 mRNAの発現量の違い

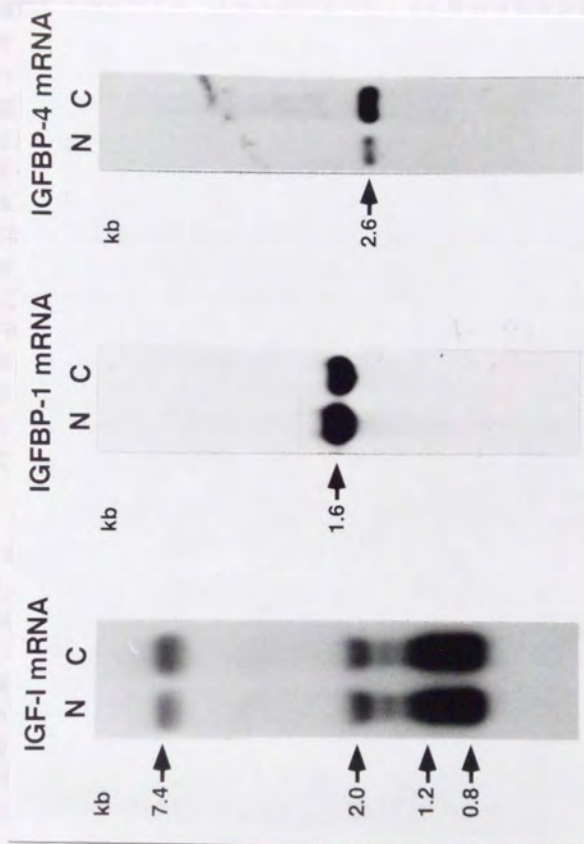
通常初代培養肝細胞を培養する際には、何の処理もしていないculture dishとcollagenでコートしたcollagen-coated dishの両者が使用されている。筆者も両者を使用して培養を行っていたが、最近collagen-coated dishを使用したほうが、より生体に近い肝機能を維持した肝細胞を培養できるとの報告がなされ(154, 155)、用いるdishの違いにより肝細胞の機能が変化することが明らかにされた。そこでここでは、通常のculture dishとcollagen-coated dishで細胞を培養し、その時のIGF-I、IGFBP-1の発現量を比較し、今後の解析をどちらのdishで行うかを決定することとした。その際の培養条件は1.と同じとした。

その結果、IGF-I mRNA量はcollagen-coated dishで培養した際に、通常のculture dishで培養したもの比べて、増加する傾向が見られ、更に7.4kbのIGF-I mRNAの量が多くなっていた。一方IGFBP-1 mRNA量はcollagen-coated dishで培養すると、通常のculture dishでの培養時に比べて減少する傾向が見られた。通常良い生理的条件下では肝臓中のIGF-I mRNA量が多く、IGFBP-1 mRNA量は少ないことが知られている。従ってこの結果は、collagen-coated dishでの培養がより生体に近いものであることを示唆しているものと考えられる(Fig. 2-3)。

以上の結果より、今後の解析にはcollagen-coated dishを用いることとした。

3. 培養期間中のIGF-I mRNA、IGFBP-1 mRNA量の変化

ここまでのFig. 2-1~2-3までをみると、初代培養肝細胞では肝臓中に比



N : Normal Dish

C : Collagen-coated Dish

Fig. 2-3 Effect of Collagen-coating on IGF-I, IGFBP-1 and IGFBP-4 Gene Expression in Primary Cultured Rat Hepatocytes

べてIGF-I mRNA量が非常に少なくなっていることが明らかである。一方IGFBP-1 mRNA量は、*in vivo*の肝臓（栄養条件の良い時）と比べて量的にはほとんど変化していないか、もしくは増加しているとも考えられる。以上のことは肝細胞を分離し、培養している間にIGF-I、IGFBP-1の遺伝子発現が変化していることを示唆している。従って、分離から培養期間中の発現量を確認しておくことは、今後の解析を行う上でも重要であると考えた。

そこで、肝細胞を分離・培養する際に、分離直後、一回目の培地交換時(2hr後)、分離24hr後、48hr後とそれぞれ経時的に細胞よりtotal RNAを調製し、Northern blot分析を行い、IGF-I mRNAとIGFBP-1 mRNA 量の変化を解析した。

その結果、IGF-I mRNA量は分離直後から顕著に減少し始め、約24hr後には長いIGF-I mRNAが消失し、48hr後では更に減少していた。一方IGFBP-1 mRNA量は分離直後よりわずかに増加し、24hr後にはほぼ4倍に増加している。48hr後には更に増加する傾向を示していた(Fig.2-4)。

以上のことは、第一章で得られた栄養条件の変化に対するIGF-I、IGFBP-1遺伝子発現の変化の結果と良く一致している。すなわち肝細胞にとって周囲の環境が悪化するとIGF-I遺伝子の発現は減少し、IGFBP-1遺伝子の発現は逆に増加するものと考えられる。細胞の分離操作は、細胞に対する大きなストレスになり、その結果遺伝子の発現が変化するものと考えられる。また、この違いが細胞培養系の限界を表しているものと考えられる。

4. 初代培養肝細胞が分泌しているIGFBPsの糖鎖修飾の確認

1.で述べたようにWestern ligand blot分析を行った結果、初代培養肝細胞は3種類のIGFBPを分泌していることが明らかになった。これらのIGFBPsが糖鎖の修飾を受けているかを確認したところ、初代培養肝細胞が分泌しているIGFBPはいずれも糖鎖の修飾のないものであることが明らかとなった(Fig. 2-5)。なお同様に処理したラット血清を同時に泳動することによりN-glycanaseの作用を確認したが、確かに50kDaに検出される3本のIGFBP-3の分子量が減少し42kDaの分子量を持つ単一のバンドになっていることが確認された。

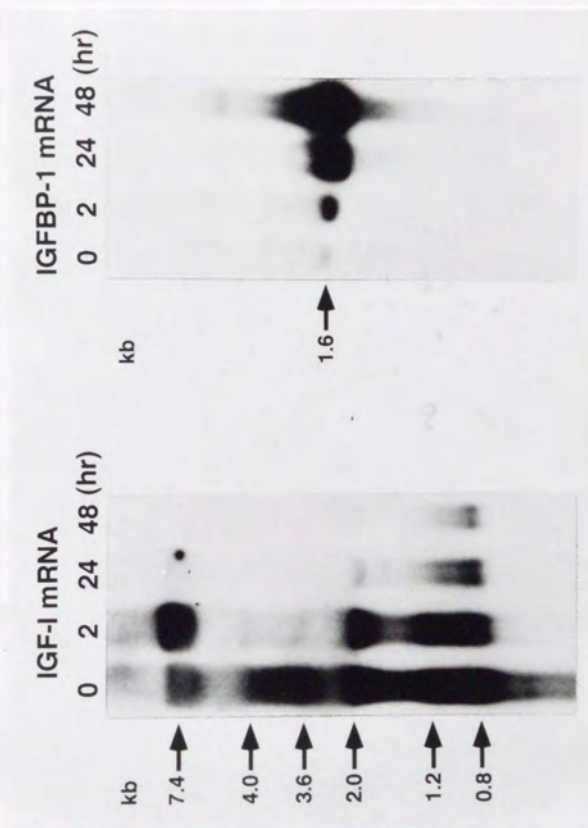


Fig. 2-4 Time-dependent Change of IGF-I and IGFBP-1 mRNA Content in Primary Cultured Rat Hepatocytes

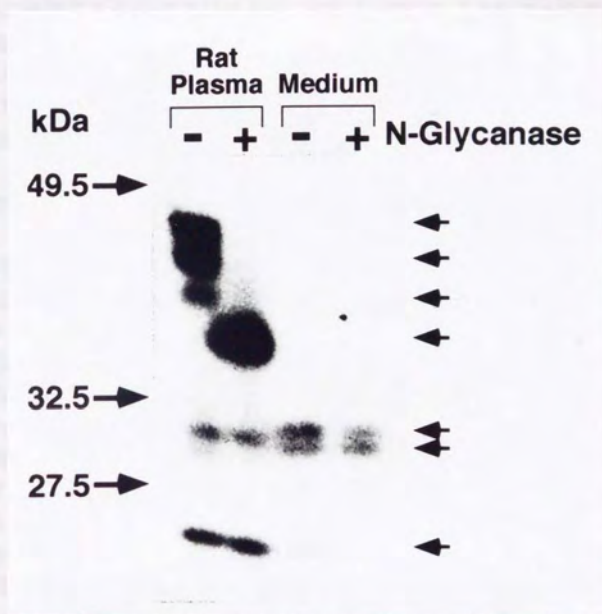


Fig. 2-5 N-Glycanase Treatment of IGFBPs in Rat Plasma and Conditioned Medium of Primary Cultured Rat Hepatocytes

第二節 討論

以上、本章で得られた結果をまとめると以下のようになる。

1. 初代培養肝細胞中に、IGF-I, IGFBP-1, IGFBP-4 mRNAの存在が確認されたが、その発現量は生体内の肝臓とは異なったものであった。
2. 培養に使用するdishの違いにより、IGF-I, IGFBP-1遺伝子の発現量は異なり、通常のculture dishを用いるよりもcollagen-coated dishを用いた方がより高い発現を示した。
3. 初代培養肝細胞が分泌しているIGFBPは約30kDaのBPと24kDaのBPであり、糖鎖の修飾はないことが明らかになった。

序論でも述べたように、現在用いられている各種肝細胞の中で初代培養肝細胞は、生体の肝臓にもっとも近いと考えられている。しかし、今回の結果ではその初代培養肝細胞も厳密に解析すると、IGF-I, IGFBPの遺伝子発現に関しては肝臓とはかなり異なっていることが明らかになった。通常のculture dishよりもcollagen-coated dishを用いた方がより良い肝細胞が得られるとの報告は、数多くされており、現在ではcollagen coated dishを用い無血清で肝細胞を培養することが主流になっている(156)。今回の結果もそれを裏づけるものと考えられる。一方、最近生体により近い状態の培養肝細胞を作成する試みが盛んに行われており、初代培養肝細胞を3次元的に培養することでより生体に近い状態を作り出すことが可能であるとの報告が数多くなされている(157~159)。筆者もそのひとつであるspheroid培養法を試みIGF-I遺伝子の発現を通常の単層培養時と比較検討したが、IGF-I遺伝子に関しては、長期培養で発現量の維持が認められたものの、今回用いている2日間程度の培養条件下では大きな差は認められなかった。したがって、厳密に生体内を反映したものとは考えられないが、初代培養肝細胞は、現在利用できる肝臓の*in vitro* 解析系としては最善のものであると考えることが可能である。

今回Western Ligand Blot分析により検出された30kDaのIGFBPはIGFBP-1かIGFBP-2であり、24kDaのものはIGFBP-4であると考えられる。生体内の肝臓中にはIGFBP-1, -3, -4のmRNAが存在していることが確認されているが、初代培養肝細胞の培地中にはIGFBP-3に相当するものは検出されない。この点に関しては、IGFBP-3を合成・分泌している細胞は肝非実質細胞であることが、共同研究者の竹中により明らかにされ、詳細に報告されている(160)。したがって残るIGFBP-1, -4が初代培養肝細胞で発現しているものと考えられるが、Boni-Schnetzlerらは初代培養肝細胞を用い

IGFBP-2の発現を解析し、IGFBP-2 mRNAが存在していること、その発現がインスリンにより抑制されることを報告している(161)。そこで今回用いている肝細胞においてもIGFBP-2 cDNAを用いたNorthern Blot分析を行ったが、IGFBP-2 mRNAは検出されなかった。したがって、今回用いている細胞ではIGFBP-2遺伝子が発現していないか、もしくは発現していても非常に弱いことが明らかとなった。従って30kDaの2本のIGFBPは両者ともIGFBP-1であると考えられる。IGFBP-1の一次構造にheterogeneityが認められるとの報告がないことから、この2本のバンドはIGFBP-1が翻訳後に何らかの修飾を受けている可能性を示唆していると考えられる。糖鎖修飾の可能性は、N-glycanaseを用いたdeglycosylation実験より否定されるので、リン酸化を受けているというのがひとつの候補である。実際、native PAGEを用いることによりIGFBP-1が3ヶ所でリン酸化を受けていることをJonesらとFrostらの2つのグループが明らかにしている(162, 163)。しかし、今回用いているのはSDS-PAGEであるため、2本のIGFBP-1がリン酸化による違いであると結論することはできず、この点は今後の検討課題であると思われる。

以上のことから、今後の解析では30kDaの2本のBPをIGFBP-1として、24kDaのBPをIGFBP-4として議論を進めることとする。

次章では、本章の結果を元にIGF-I, IGFBP-1, IGFBP-4遺伝子発現の各種ホルモンによる調節機構を明らかにすることを目的として、初代培養肝細胞を用いて解析を行うこととした。

第三章 初代培養肝細胞におけるIGF-I, IGFBP-1, -4遺伝子発現のホルモンによる調節

序論

第二章ではIGF-I, IGFBP-1遺伝子発現の調節機構を解析するための系として初代培養肝細胞系が適しているかを検討した。その結果、解析を行うことが可能であることが明らかになったため、本章では初代培養肝細胞で発現していることが確認されたIGF-I, IGFBP-1, -4遺伝子の発現がどのようなホルモンにより調節されているかを明らかにすることを目的とした。

IGF-I遺伝子発現に対する各種ホルモンの作用を解析した報告は、*in vivo*, *in vitro* で数多くあるが、本研究は肝臓での調節を問題にしているので、肝臓に関しての報告のみその内容を概説したい。

IGF-I遺伝子発現のホルモンによる調節を考える際に、中心となるのはやはり成長ホルモン(GH)である。GHに関する報告は非常に多く、早くも1976年にはDaughadayらにより脳下垂体除去(hypox)ラットのliver perfusion系でGHがsomatomedin (IGF-I)の分泌を促進することが報告されている(164)。その後もliver perfusion系や初代培養系を用いて、GHがIGF-Iの分泌を促進し、その際IGF-I mRNA量が増加すること(131, 132)、hypoxラットから調製した培養肝細胞ではIGF-Iの合成量が10%以下に減少していることなど(165)が報告されている。

GH以外にもいくつかのホルモンが肝臓のIGF-I遺伝子発現を調節していることが明らかになっている。すなわち糖尿病時に血中IGF-I濃度が低下し(44, 45)、肝臓中のIGF-I mRNA量が減少していること(46, 47)が報告されており、更に初代培養肝細胞において培地にインスリンを添加することによりIGF-I mRNA量が増加し、その作用は恐らくIGF-I mRNA合成促進、すなわちIGF-I遺伝子の転写速度の増加とIGF-I mRNAの安定性を増加させることによるものであることが明らかになっている(150~152)。またcortisolを培地に添加することによりIGF-I合成量が減少したという報告もある(166)。

一方、IGFBP-1遺伝子のホルモンによる調節に関しては、最近非常に多くの報告がなされており、糖尿病ラットで血中濃度が顕著に増加し、その時の肝臓中のIGFBP-1 mRNA量も著しく増加していることが明らかになっている(167~17)。また、hypoxラットで肝臓中のIGFBP-1 mRNA量が増加し、同時にIGFBP-1遺伝子の転写速度が増加していることも報告されている(140)。*In vitro* 系での結果でも、ラット肝癌細胞H4IIEを用いてDexamethasoneがIGFBP-1遺伝子の転写を促進することにより、その

mRNA量・分泌量を増加させること(138, 171, 172)、一方同じ系でインスリンはIGFBP-1 mRNA量・分泌量を減少させること(171, 172)が報告されている。このうちDexamethasoneの作用については*in vivo*系でも確認されており(173)、インスリンについても初代培養肝細胞系(174)、*in vivo*系(170)でも同様の結果が得られている。また、第四章で詳細に述べるが、ラット胎児肝臓器官培養系において培地中のグルコース濃度を変化させるとIGFBP-1遺伝子の発現が変化するという報告もあり(175)、IGFBP-1遺伝子の発現調節は非常に複雑であることが予想される。これらのIGFBP-1遺伝子発現のホルモンによる調節機構に関しては、株化肝細胞を用いて行われているので、『IGFBP-1 遺伝子発現はインスリンで抑制され、グルココルチコイドで促進される』と結論づけるには、より生体に近い状態の細胞でこれらの作用を確認する必要があるものと考えられた。

IGFBP-4遺伝子発現調節機構に関しては、その発見が比較的新しいのでまだ詳細が明らかになっていない。筆者の共同研究者である内島は初代培養肝細胞系においてインスリン、 Bt_2cAMP 、 T_3 処理によりIGFBP-4 mRNA量・分泌量が増加することを確認している(176)が、肝臓を用いた報告はほとんどなく、本章での結果により新たな知見が得られることが期待される。

以上のことを背景に、本章では初代培養肝細胞におけるIGF-I, IGFBP-1遺伝子の発現が成長ホルモン、インスリン、グルココルチコイドによりどのように調節されているかを解析し、株化細胞で得られた結果を確認するとともに、これらのホルモンによる調節に対して生理的裏付けを付与することを目的とした。更に、グルココルチコイドのIGF-I遺伝子に対する作用を解析する過程で、培地中のtotal IGF-I量をRIAにより測定する際の前処理に関して、これまでは血清と同じく培地を酸エタノール処理後に測定していたが、酸エタノール処理ではIGFBPを完全に除くことができないことが明らかになったのでその点に関しても検討を加えた。

1. 初代培養肝細胞におけるIGF-I遺伝子発現調節について

第一節 各種ホルモンによるIGF-I遺伝子発現調節

3-1-1 方法

初代培養肝細胞の分離・培養は2-1-2と同様に行った。ただし、最初の24時間を10%CSを含んだWE培地で培養した後、血清を含まず各種ホルモンのみを含んだWEに交換する際に血清の影響を除くため、0.1% BSAを含んだHanks' balanced salt solutionで2回細胞を洗浄した。ホルモン含有培地で24時間培養後は、2-1-2と同様にして培地を採取し、細胞からはtotal RNAを調製した。

IGF-I mRNA量の定量は、1-1-2と同様に行った。培地中のIGF-I濃度の定量は、培地を酸エタノール処理し、IGFBPを除去した後、血清と同様RIAにより行った。また、IGF-Iが合成された後、培地へと分泌されず細胞内に残っている可能性を確認するため、培地を採取した後、細胞を0.1% SDSで可溶化し、酸エタノール処理し、RIAに供することで細胞中のIGF-I濃度も定量した。

3-1-2 結果と考察

Fig. 3-1に示したように、GH、Ins添加によりIGF-I mRNA量が増加し、他のホルモンではほとんど変化しなかった。一方、その際の培地へのIGF-I分泌量はDexで顕著に増加した(Fig.3-2)。また、結果は示さないが、細胞中のIGF-I濃度は培地中の約10%であり、どのホルモンによってもほとんど変化していなかった。

以上の結果では、細胞中IGF-I mRNA量と培地へのIGF-I分泌量がまったく一致していない。この不一致の原因としては、次のことが考えられる。すなわち培地をRIAに供する前に酸エタノール処理し、IGFBPを除いているが、酸エタノール処理によってIGFBPが十分に除去されておらず、残存しているIGFBPがRIAに影響しているのではないかと考えた。事実、最近いくつかの報告で酸エタノール処理によってはIGFBPを完全には除けないことが証明されている(177~179)。更にその中で完全にIGFBPを除くために、acid gel chromatographyや酸存在下でのHPLCが適していることが述べられている。そこで、培地中のIGFBPがIGF-IのRIAにどの程度影響しているかを調べるため、mRNA量と分泌量が特に一致していないDex添加時の培地を用い、対照群の培地とともに酸エタノール処理を行った後、既知の量(3.1ngずつ12.4ngまで)のIGF-Iを添加した上でRIAを行い、添加した量のIGF-Iが検出

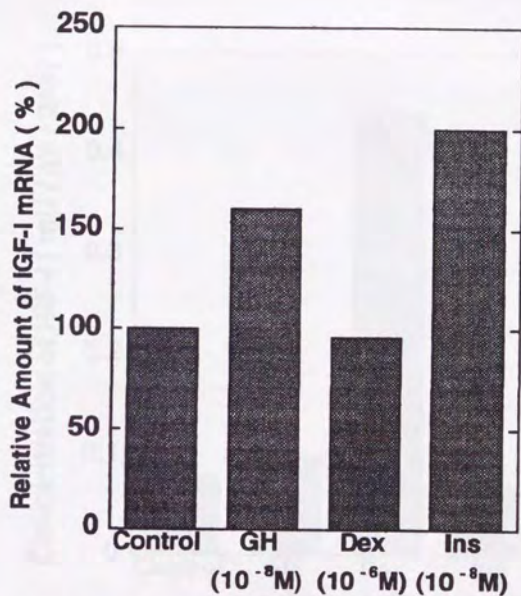


Fig. 3-1 Effect of Growth Hormone (GH), Dexamethasone (Dex) and Insulin (Ins) on Relative Amount of IGF-I mRNA in Primary Cultured Rat Hepatocytes

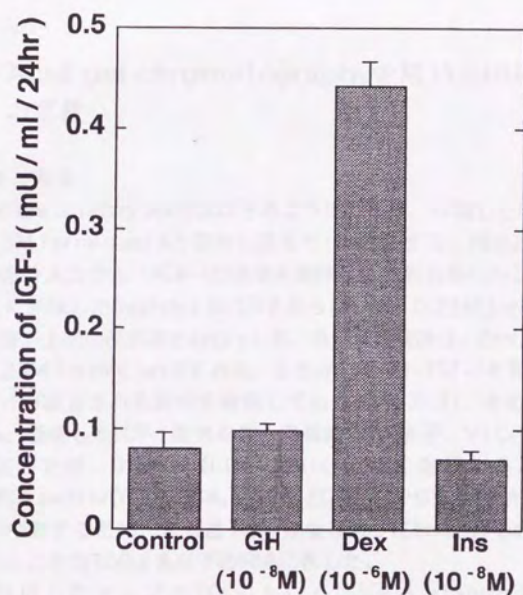


Fig. 3-2 Effect of Growth Hormone (GH), Dexamethasone (Dex) and Insulin (Ins) on IGF-I Secretion in Primary Cultured Rat Hepatocytes : Acid Ethanol Treatment

できるかを解析した。その結果、Table 3-1に示すように添加した exogenous IGF-Iは、対照群でもDex添加群でも全く検出されなかった。従って、酸エタノール処理した培地にはIGF-I RIAを阻害する物質、恐らくIGFBPが残存しており、正確なRIAが行われていないことが明らかとなった。そこで次節では、acid gel chromatographyを用いIGFBPを完全に除去した後、RIAにより培地中のIGF-I濃度を定量することとした。

第二節 Acid gel chromatographyを用いたIGF-I分泌量の定量

3-2-1 方法

Acid gel chromatographyは以下のように行った。採取した培地0.25mlを等量の0.5M formic acidと混合し室温で1hr放置する。内径25mm、長さ900mmのガラスカラム (IGF-Iの吸着を避けるためあらかじめシリコナイズしてある) に充填したSephadex G-50をあらかじめ、0.25M formic acidで平衡化した後、上記の反応液をapplyした。カラムの流速は、2ml/minとし、移動相は0.25M formic acidである。あらかじめ 125 I-IGF-Iを同じカラムに供し、IGF-Iが溶出される画分を確認しておき (Fig. 3-3)、その画分をすべて回収する。回収したIGF-I画分を遠心濃縮機 (岩城硝子、VEC-260) を用いて、減圧乾固させ、0.2mlの0.1M acetic acidに溶解する。溶解液に0.05mlのRIA buffer (0.5% BSA, 25mM EDTA in PBS pH 7.4) を混合し、更に酢酸を中和するため、終濃度10% になるようにtrizma baseを添加し溶解させた。この内100 μ lを以下のRIAに供した。

上記で作成したサンプル100 μ lもしくはIGF-I standard 100 μ lと 125 I-IGF-I (100 μ l, 10,000cpm)、更に抗ヒトIGF-Iウサギポリクローナル抗体 (藤沢薬品工業株式会社丹羽峰雄博士より御恵与いただいたもの (180) をRIA bufferにより50,000倍希釈したもの) 500 μ lを混合し、4 $^{\circ}$ C, 24hr インキュベートする。その後、抗ウサギ γ グロブリンヤギ血清100 μ l, 正常ウサギ血清100 μ l (以上は『第二抗体セット：第一』 (第一化学薬品株式会社) に含まれている) を添加し、同条件下で更に3hr インキュベートする。3000Xg, 30min の遠心後、上清を吸引除去し、沈殿の放射能を γ counter (Aloka Auto Well Gamma System ARC-500) を用いて測定し、得られる標準曲線からIGF-I濃度を求めた。

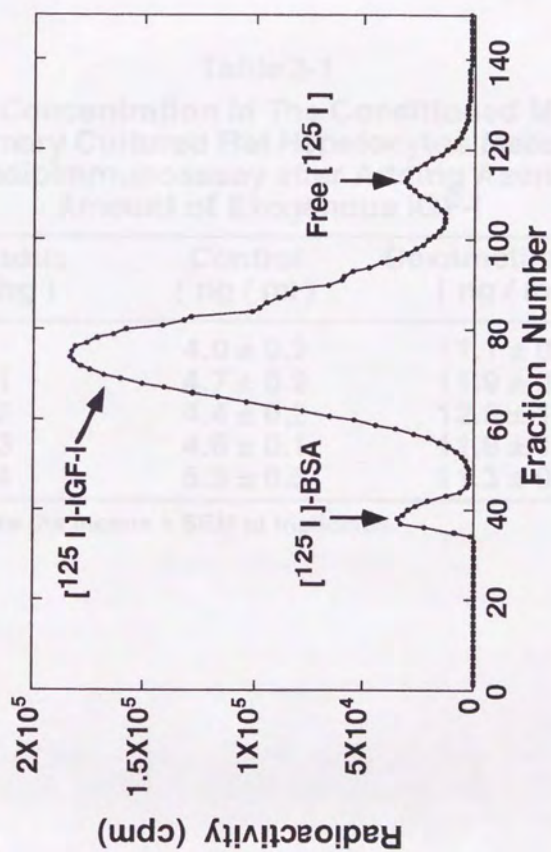


Fig. 3-3 Gel Filtration Profile of $[^{125}\text{I}]\text{-IGF-I}$ by Acid-gel Chromatography

Table 3-1
IGF-I Concentration in The Conditioned Media
of Primary Cultured Rat Hepatocytes Measured
by Radioimmunoassay after Adding Asending
Amount of Exogenous IGF-I

Exogenous IGF-I (ng)	Control (ng / ml)	Dexamethasone (ng / ml)
0	4.0 ± 0.2	11.1 ± 0.8
3.1	4.7 ± 0.2	11.9 ± 0.5
6.2	4.4 ± 0.2	12.0 ± 1.1
9.3	4.6 ± 0.1	11.8 ± 1.0
12.4	5.3 ± 0.5	11.3 ± 0.3

Values are the means ± SEM of triplicates.

3-2-2 結果と考察

各種ホルモン添加時の培地をacid gel chromatographyに供した後、RIAを行いIGF-I濃度を求めたところ、Table 3-2に示したように、GH、Ins添加により培地へのIGF-I分泌量が増加したが、他のホルモン添加によっては変化しなかった。この結果は、3-1-3で得られた各種ホルモン添加時のIGF-I mRNA量の変化と良く一致しており、初代培養肝細胞におけるIGF-I遺伝子発現の各種ホルモンによる調節は、主としてmRNAレベルで行われている可能性が示された。

2. 初代培養肝細胞におけるIGFBP-1, -4遺伝子発現調節

第三節 IGFBP-1 mRNA量に対する各種ホルモンの影響

3-3-1 序

第二章の結果で初代培養肝細胞がIGFBP-1を合成・分泌していることが明らかになった。IGFBP-1は、現在のところIGF-Iの作用を阻害するBPであると考えられている。したがって、IGF-Iの主要生産器官である肝臓中でIGFBP-1遺伝子発現がどのように調節されているかを明らかにすることは、*in vivo*でのIGF-Iの作用を明らかにする上で重要であると思われる。

先に述べたように、IGFBP-1遺伝子発現調節に関しては、株化肝細胞を用いてグルコルチコイドが促進(138, 171, 172)、インスリンが抑制(171, 172)することが明らかにされている。また、*in vivo*では成長ホルモンがその発現を抑制しているとの報告(140)もされている。

しかし、インスリンとグルコルチコイドによる調節を完全に明らかにするためには、より生体に近い実験系である初代培養肝細胞で解析することが必要であると思われる。そこで本節では、各種ホルモンを添加した際のIGFBP-1 mRNA量とIGFBP-1分泌量の定量を行った。

3-3-2 方法

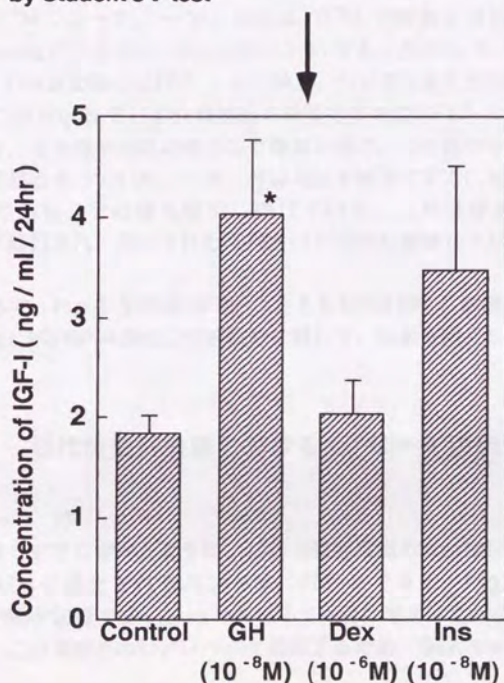
肝細胞の分離・培養は、3-1-2と同様に行い、細胞からtotal RNAを調製し、IGFBP-1 cDNAを用いたNorthern blot分析を行った。一方採取した培地は、2-1-2と同様にWestern ligand blot分析に供し、IGFBP-1の定量を行った。

Table 3-2
Effects of Growth Hormone, Dexamethasone and
Insulin on IGF-I Secretion in Primary Cultured Rat
Hepatocytes

Hormones	Concentration of IGF-I (ng / ml)
Control	1.85 ± 0.18
Growth Hormone (10 ⁻⁸ M)	4.04 ± 0.73*
Dexamethasone (10 ⁻⁶ M)	2.04 ± 0.33
Insulin (10 ⁻⁸ M)	3.47 ± 1.03

Values are the means ± SEM of triplicates.

* : Significantly different from the control value at $p < 0.05$ by Student's t test



3-3-3 結果と考察

Fig. 3-4に示したように、IGFBP-1分泌量はDex添加で顕著に増加し、Ins添加で減少したが、GH添加ではほとんど変化しなかった。また、Fig. 3-5に示したように、その際のIGFBP-1 mRNA量の変化はDexで増加、Insで減少となっており、分泌量の変化とmRNA量の変化が良く一致していた。

次に、IGFBP-1の発現に対してInsとDexのどちらの効果が大きいのかを解析するため、両者を同時に添加したところ、Fig. 3-4, 3-5に示したように、DexによるIGFBP-1 mRNA量、IGFBP-1分泌量の増加を、Insは強く抑制し、対照群のレベルまで減少させていた。すなわち、IGFBP-1遺伝子発現の調節において、Insの抑制作用はDexの促進作用よりも強い作用であると考えられた。

IGFBP-1遺伝子発現に対するIns, Dexの作用をより詳細に解析するため、両者の濃度依存性をIGFBP-1 mRNA量と分泌量の両方で解析したところ、Fig. 3-6に示すように、Insは、mRNA量においても、分泌量においても 10^{-10} Mですでに抑制作用を示し、 10^{-8} M以上で完全に抑制した。Insの EC_{50} は 8×10^{-10} Mであった。一方、Dexは 10^{-8} Mで増加させ始め、 10^{-6} Mでmaximumな作用を示し、 EC_{50} は 3×10^{-8} Mであった(Fig. 3-7)。

また、Dex添加後のIGFBP-1 mRNA量、分泌量の変化を時間を追って解析したところ(Fig. 3-8)、Dex添加後6時間ですでにIGFBP-1 mRNA量が増加しており、その後9時間の時点まで増加を続け、その後やや減少したもののほぼ一定値を保っていた。一方、分泌量は6時間ですすでに対照群にくらべて増加しており、その後も増加し続けている。これは増加したIGFBP-1 mRNAが翻訳され、分泌されたIGFBP-1が培地に蓄積していったものと考えられる。

ところで、Fig. 3-5ではIGFBP-1とともにIGFBP-4が検出されている。そこで次にIGFBP-4遺伝子発現調節に関して、検討を加えた。

第四節 初代培養肝細胞におけるIGFBP-4 遺伝子発現調節

3-4-1 序

第二章ですでに述べたように、初代培養肝細胞のWestern ligand blot分析で24kDaに検出されるバンドはIGFBP-4である。Fig. 3-5を見るとIGFBP-4の分泌量がDexとInsの共存下で顕著に増加していることが分かる。そこで、この現象をmRNAレベルで確認するため、Dex, Ins単独もしくは共

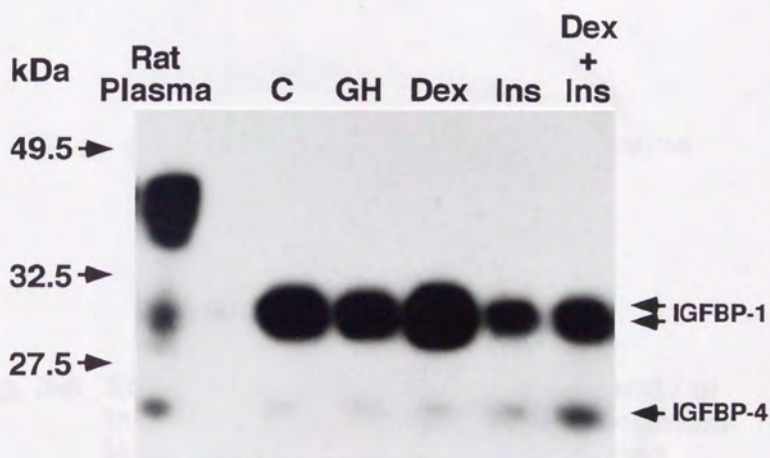


Fig. 3-4 Effect of Various Hormones on the Secretion of IGFBPs in Primary Cultured Rat Hepatocytes

Rat plasma : 10 μ l, C : without hormone
 GH : 10⁻⁸ M, Dex : 10⁻⁶ M, Ins : 10⁻⁸ M

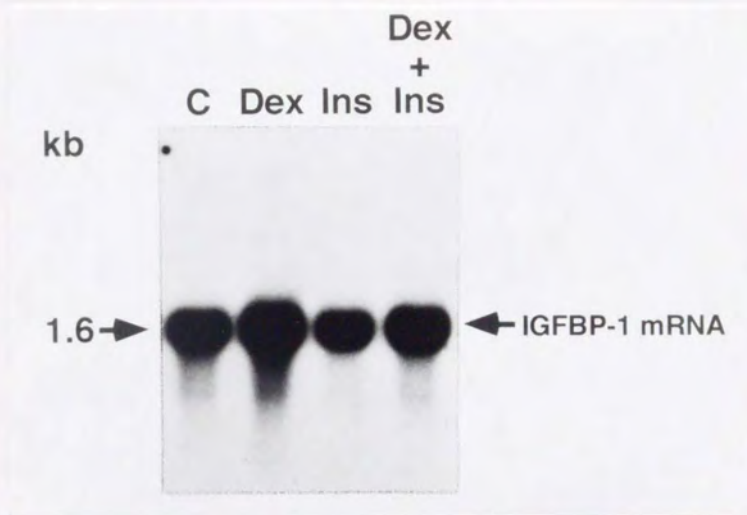
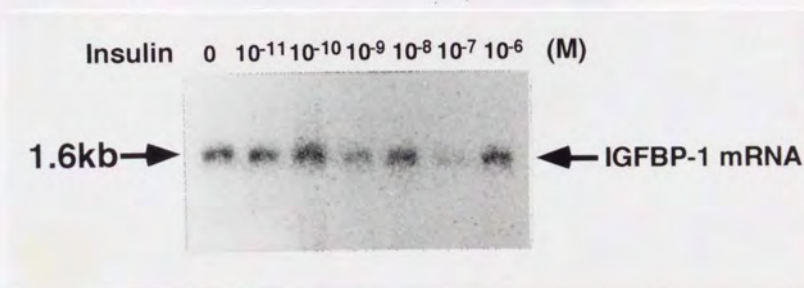


Fig. 3-5 Effect of Dexamethasone(10^{-6} M) and / or Insulin(10^{-8} M) on IGFBP-1 mRNA content in Primary Cultured Rat Hepatocytes
C : without hormone

A. IGFBP-1 mRNA



B. IGFBP-1 in the Medium

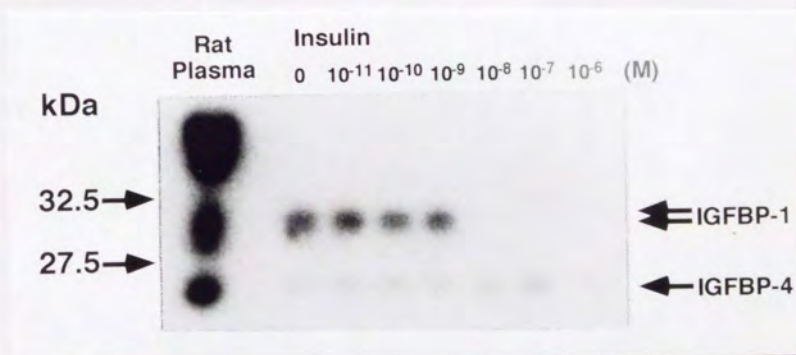
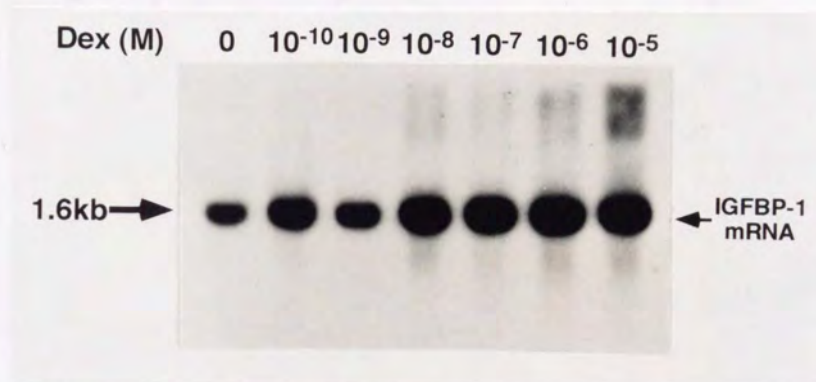


Fig. 3-6 Dose-dependent Effect of Insulin on IGFBP-1 mRNA (A) and IGFBP-1 Secretion (B) in Primary Cultured Rat Hepatocytes

A. IGFBP-1 mRNA



B. IGFBP-1 in the Medium

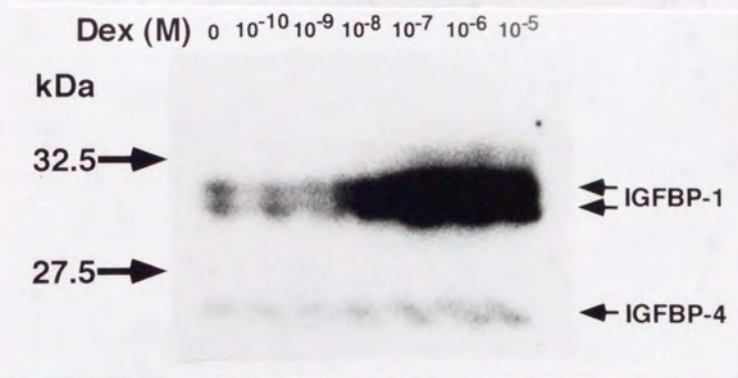
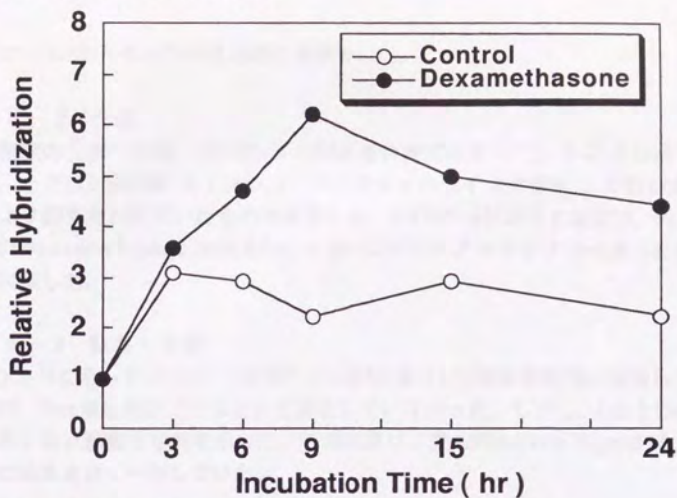


Fig. 3-7 Dose-dependent Effect of Dexamethasone on IGFBP-1 mRNA (A) and IGFBP-1 Secretion (B) in Primary Cultured Rat Hepatocytes

A. IGFBP-1 mRNA



B. IGFBP-1 in the Medium

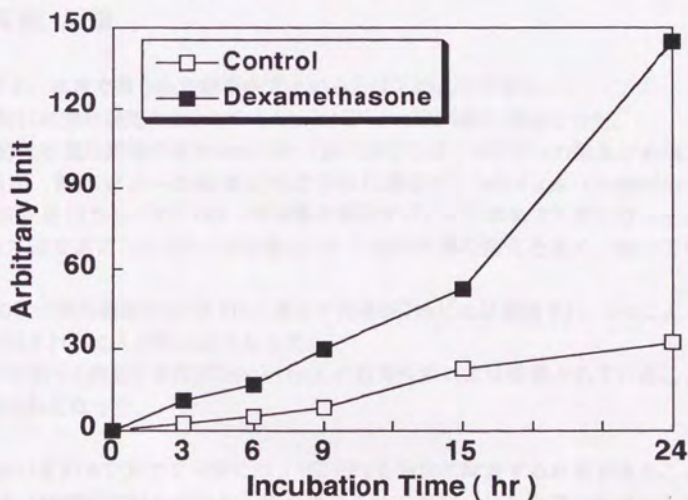


Fig. 3-8 Effect of Dexamethasone (10^{-6} M) on IGFBP-1 mRNA (A) and IGFBP-1 Secretion (B) in Primary Cultured Rat Hepatocytes : Time Dependence

存下でのIGFBP-4 mRNA量の変化を解析した。

3-4-2 方法

肝細胞の分離・培養、IGFBP-4 mRNA量の測定はすべて3-3-2と同様である。ただし、IGFBP-4 cDNAは、ノースキャロライナ大学A. J. D'Ercole博士より御恵与いただいたものを使用した。IGFBP-4分泌量の測定は、Fig. 3-5のWestern ligand blotをFujix BAS2000イメージアナライザーを用いて定量した。

3-4-3 結果と考察

Fig. 3-9に示したように、IGFBP-4 mRNA量はIns単独添加時に増加していたが、Dex単独添加ではほとんど変化していなかった。しかし、InsとDexが共存すると顕著な増加を示した。この結果は、先のWestern ligand blot分析の結果と良く一致していた。

第五節 討論

以上、本章で得られた結果をまとめると以下のようになる。

1. 初代培養肝細胞においてGH, InsはIGF-I mRNA量を増加させた。
2. 初代培養肝細胞の培地中のIGF-I量の測定には、IGFBPsの除去が必須であるが、酸エタノール処理はその目的に適さず、acid gel chromatographyを行うことで、IGF-I分泌量を測定することが初めて可能となった。この方法で測定したIGF-I分泌量はIGF-I mRNA量の変化と良く一致していた。
3. 初代培養肝細胞でのIGFBP-1遺伝子発現がDexにより促進され、Insによって抑制されることが明らかとなった。
4. IGFBP-4遺伝子発現がDexとInsとの協同作用により促進されていることが明らかになった。

IGF-IをRIAで測定する際には、IGFBPsを完全に除去する必要があることはIGF-I研究の初期の段階から明らかにされており、ヒト血清の処理のために酸エタノール処理(116)が考案され、その後他の動物の血清にも適用されていた。しかし、今回初代培養肝細胞の培地中のIGF-I濃度を定量する際には酸エタノール処理ではIGFBPsを除去し切れないことが初めて明らかになった。これが原因となり当初Dex添加群においてIGF-I mRNA量が変化してい

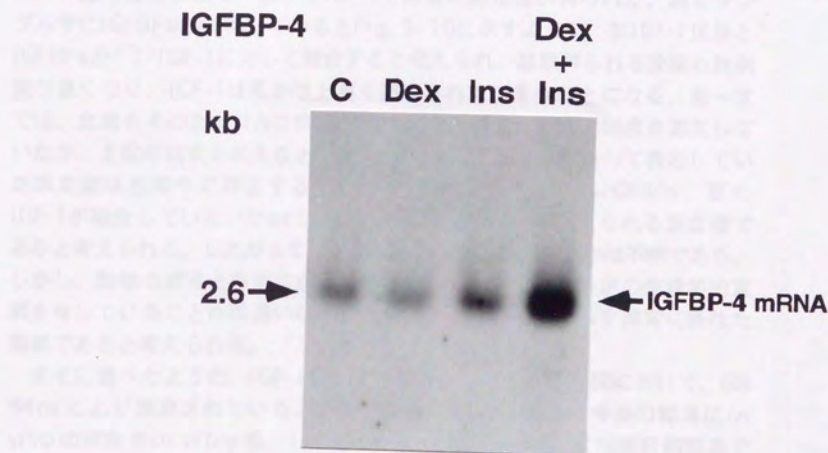


Fig. 3-9 Effects of Dexamethasone (10^{-6} M) and / or Insulin (10^{-8} M) on IGFBP-4 mRNA Content in Primary Cultured Rat Hepatocytes
C : without hormone

ないにもかかわらず、IGF-I分泌量が顕著に増大するという結果が得られたのである。Dex添加によりIGFBP-1の分泌量が顕著に増加していたことも、この点を助長したのと考えられる。近年ヒト以外の動物の血清に関しては酸エタノール処理だけではIGFBPsを除けないとの報告がいくつか出され(177~179)、現在では酸性条件下でのゲル濾過法やHPLCによる分離法が主流になりつつある。ヒトの血清でのみ酸エタノール処理が使用できるということは、ヒトのIGFBPsの組成が他の動物と異なっていること(事実IGFBP-3が断然多いことが知られている)を示唆しており、非常に興味深い。今回もformic acidを用いたacid gel chromatographyを行うことにより、IGF-I mRNA量の変化と良く一致したIGF-I分泌量の測定値が得られた。測定サンプル中にIGFBPsが共存しているとFig. 3-10に示すように、抗IGF-I抗体とIGFBPsが ^{125}I -IGF-Iに対して競合すると考えられ、結果得られる沈殿の放射能が低くなり、IGF-Iは見かけ上高く測定されてしまうことになる。第一章では、血清をそのままRIAに供し、immunoreactive IGF-I濃度を測定していたが、上記の結果を考えると、immunoreactive IGF-Iとして表わしていた測定値は血清中に存在するIGF-Iとそれが結合しているIGFBPs、更にIGF-Iが結合していないfree IGFBPsの相互作用により与えられる測定値であると考えられる。したがって、この値が何を示しているのかは不明である。しかし、動物の成長と非常に良い相関を示すことから、何らかの生理学的意義を有していることは間違いなく、また動物の栄養状態を示す非常に優れた指標であると考えられる。

すでに述べたように、IGF-I遺伝子の発現は*in vivo*の肝臓において、GHやInsにより調節されていることが明らかになっている。今回の結果は*in vivo*の現象を*in vitro*系、しかももっとも生体に近い初代培養肝細胞系で確認したものであり、GHとInsが直接IGF-I遺伝子に作用していることが生理的な条件下で初めて明らかとなった。GHとIns添加によるIGF-I mRNA量の増加は、Boni-Schnetzlerらも報告しており(151)、今回の結果と良く一致している。同じ結果は、Norstedtらによっても報告されている(132)。また、JohnsonらはGHとInsで処理した初代培養肝細胞においてActinomycin Dを添加することによりIGF-I mRNA量が一過性に増加することを報告しているが(181)、このことはGHとInsによるIGF-I mRNA量の増加効果が、転写段階だけでなくmRNAの安定性の段階にも及んでいる可能性を示唆しているものと思われる。

一方、DexによるIGF-I遺伝子発現調節に関しては、今回の結果ではDexはIGF-I mRNA量、IGF-I分泌量のどちらも変化させていなかったが、共同研究者の渡瀬は、副腎除去ラットでは肝臓中のIGF-I mRNA量が減少すること

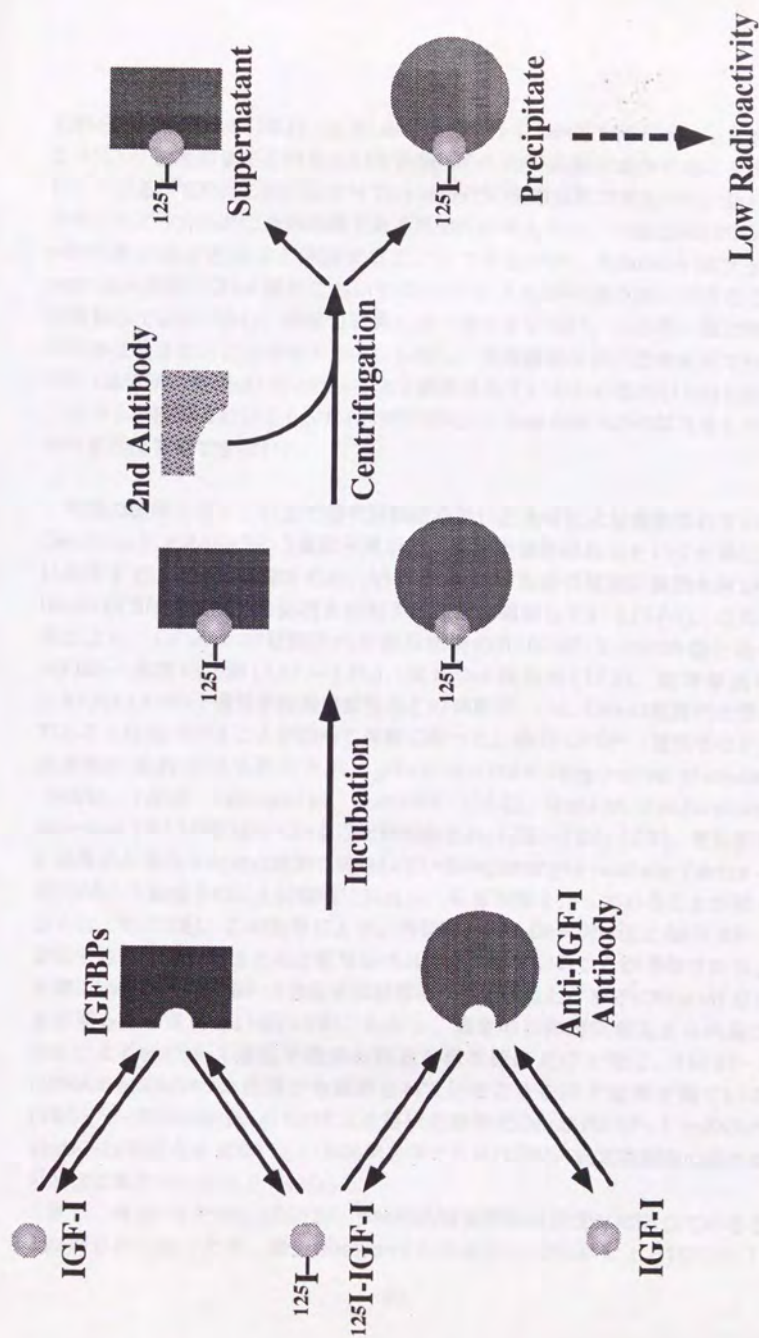


Fig. 3-10 Inhibition of IGF-I Radioimmunoassay by IGF-BPs in the Conditioned Medium

を明らかにしている(182)。またLuoらはラットにDex注射を行ったところ、血中IGF-I濃度の低下を伴わないで肝臓IGF-I mRNA量が減少することを報告している(183)。これらはすべてin vivoでの実験結果であるので、他のホルモンなどを介した二次的効果である可能性が考えられ、一概にDexがIGF-I mRNA量を減少させると結論することはできないが、Adamoらはラット neuronal細胞とGlial細胞においてDexがIGF-I mRNA量を減少させることを報告しており(184)、今回の結果とは一致していない。この不一致の原因が何かは現在のところ不明である。しかし、卵巣細胞を用いた実験系では、IGF-I遺伝子の発現はInsとDexにより調節されているとの報告(185)もあることから、肝臓においてもGH、Insだけでなく、Dexも何らかの関与をしている可能性は否定できない。

今回の結果によりこれまで株化肝細胞を用いた実験により報告されていたDexとInsによるIGFBP-1遺伝子発現が、初代培養肝細胞系という生体に近い条件下で、初めて確認された。Villafuerteらも初代培養肝細胞を用いてInsがIGFBP-1遺伝子の発現を抑制することを報告している(174)。この結果により、in vivoで観察された糖尿病時の肝IGFBP-1 mRNA量と血中IGFBP-1濃度の上昇(167~170)、更にDex投与時(173)、副腎除去時(182)のIGFBP-1遺伝子発現の変化などの現象が、Ins、Dexの直接的な作用であると結論づけることが初めて可能になった。最近IGFBP-1遺伝子の5'上流領域の配列が明らかにされ、glucocorticoid responsive element (GRE), cAMP responsive element (CRE), insulin responsive element (IRE)が存在していることが報告され(125~127, 129)、更に肝臓に特異的な遺伝子発現の調節に関与しているhepatocyte nuclear factor-IがIGFBP-1遺伝子の5'上流領域に結合し、転写制御を行っていることが明らかとなった(128)。この結果により、今回得られたDex、InsによるIGFBP-1遺伝子発現調節は、ほとんど転写レベルで行われていることが予想される。実際にInsがヒトIGFBP-1遺伝子の転写を抑制することがすでにPowellらにより明らかにされている(139)。しかし、筆者の共同研究者である内島はDexによるIGFBP-1遺伝子発現の促進が転写段階だけでなく、IGFBP-1 mRNAのstabilityの段階でも調節されていることを示す結果を得ている(186)。一方OrlowskiらはH4IIEを用いた実験でDexがIGFBP-1 mRNAのstabilityを変化させないという結果を得ており(138)、転写後制御の関与の可能性はまだはっきりしていない。

更に、今回InsがDexのIGFBP-1 mRNA増加作用を完全に抑制していることが明らかとなったが、最近GoswamiらによりInsがDexによるIGFBP-1

遺伝子転写速度の増加を完全に抑制すること、Dexによる転写速度増加にはIGFBP-1 mRNAのcap site上流90bpに存在するGREが重要な役割を果たしていること、更にDexによる増加をInsが抑制する作用には、それに隣接する22bpの領域が必要であることが報告された(187)。彼らの結果により、今回の結果が分子レベルで説明される。

また、*in vivo*ではHypoxラット肝臓でIGFBP-1遺伝子の転写速度が増大していることがSeneviratneらにより報告されているが(140)、今回GHを培地に添加してもIGFBP-1 mRNA量の変化は観察されなかった。この不一致の理由は不明である。

IGFBP-1遺伝子の5'上流領域にCREが存在していることから、グルカゴンなどのcAMPをsecond messengerとするホルモンの添加により、IGFBP-1遺伝子発現の促進が観察されることが予想されるが、今回は行っていない。この点に関しても先の内島によりグルカゴン添加がIGFBP-1 mRNA量、IGFBP-1分泌量とともに顕著に増大させることが明らかにされている(186)。

以上、IGFBP-1遺伝子発現調節に関してまとめると、グルココルチコイド、グルカゴンで促進、インスリンで抑制というようになる。では、これはどのような生理的意義を有しているのでしょうか。既に述べたように、IGFBP-1遺伝子発現はホルモンだけでなく、培地中のグルコース濃度の変化によっても調節されていることが明らかになっている(175)。このことからBaxterらはIGFBP-1の生理作用をglucose counter regulationにおける役割を中心にして捉えている(188, 189)。すなわちインスリンは血糖値を低下させる作用を有しているが、それとは逆に血糖値を上昇させる作用を有するグルカゴン、エピネフリン、成長ホルモン、コルチゾールなどの一連のホルモン群が存在しており、IGFBP-1もその一員であると考えられている。既に述べたように、血中IGF-I濃度はインスリンのその100倍に達するものである。この大量に存在しているIGF-Iのinsulin-like activityはIGFBPsと結合することによりmaskされているが、血中IGF-IのすべてがIGFBPsに結合しているわけではなく、その約1%は遊離の状態で存在している。つまりIGF-Iは血中においてインスリン濃度と同濃度のものが遊離状態で存在していることになる。そのため低血糖時には、遊離のIGF-Iにより更に低血糖が誘発される可能性があり、それを防ぐためIGF-Iの作用を抑制するIGFBP-1が誘導され、遊離状態のIGF-Iをすばやくmaskすると推定しているのである。このような生理的役割があるが故に、一連のglucose counter regulatory hormoneによりIGFBP-1の発現が増加するものと考えられている。このように考えると、細胞内のグルコース濃度がIGFBP-1遺伝子発現を調節していることの生理的意義も明確になる。逆にインスリンは生体内で血糖低下作用がより有効

に発現するようにIGFBP-1遺伝子発現を抑制すると考えられる。実際精製したIGFBP-1を静脈注射することにより血糖値が一過性に減少することが確認されている(190)。以上の推測からIGFBP-1遺伝子発現の中心的調節因子は、グルコースとインスリンであると考えられる。他のホルモンはグルコースの作用を補助するために存在しているとも考えることも可能である。このように血中グルコース濃度の恒常性を維持することがIGFBP-1の生理的意義であると考えることにより、今回観察された各種ホルモンによるIGFBP-1遺伝子発現の調節が整理され、IGFBP-1の血中濃度変化が糖新生のkey enzymeの一つであるphosphoenolpyruvate carboxy-kinaseの活性変化・遺伝子発現機構と類似している現象(191)との関連がつくものと思われる。

しかし、以上の議論は糖代謝のみを考慮したものであるが、生体は糖だけでなく他の構成要素に関しても恒常性を維持している。更にIGF-Iの生理作用は糖代謝にとどまらず、非常に多岐に渡っている。例えばIGFBPsとの関連は不明であるが、血中IGF-I濃度がカリウムの恒常性の維持に関与しているとの報告もあり(192)、上記の論理が他の恒常性の維持機構、例えばアミノ酸代謝の恒常性維持機構においてIGFBP-1がIGF-I活性をmaskし、食餌タンパク質の質と量の変化に対してもcounter regulatorとして働いている可能性が考えられる。このことは次章以降で詳しく議論したい。

最後にIGFBP-4に関してであるが、IGFBP-4はその発見が比較的最近であるため、肝臓に関しては遺伝子発現調節機構はあまり明らかになっていない。他の臓器での報告として、血管内皮細胞においてcAMP誘導性の薬剤がIGFBP-4 mRNA量の増加とそれによるIGFBP-4分泌量の増加を誘導することが知られている(193)。また既述のように内島は、Ins, Bt_2cAMP , T_3 処理により初代培養肝細胞においてIGFBP-4遺伝子発現が促進されることを報告している。今回はIns, Dexの共存下でIGFBP-4の遺伝子発現が顕著に増加することが新たに明らかとなった。内島も同様の実験を行っているが、Ins, Dexの共同作用はないと報告している。この不一致の原因は現在のところ不明である。しかし、今回の結果はIGFBP-4がIGFBP-1とはまったく異なる調節を肝臓で受けていることを示しており、IGFBP-4が肝臓で合成・分泌されていることの意義の解明を含め、今後の更なる解析が必要である。

以上、初代培養肝細胞における各種ホルモンによるIGF-I, IGFBP-1, -4遺伝子発現調節機構に関しての解析結果を示したが、初代培養肝細胞ではALSが合成・分泌されていることが明らかになっている(194)。一方先にも述べたようにALSとIGF-Iが複合体を形成するために必要なIGFBP-3は、肝臓で

は非実質細胞でのみ合成されており、今回培養に使用している実質細胞では合成されていないことがすでに竹中らにより明らかにされている(160)。非実質細胞でのIGF-I及びIGFBPsの遺伝子発現調節機構に関しては、森(195)、内島(186)が詳細な解析を加えているのでここでは触れないが、wholeの肝臓として考える場合には、実質細胞と非実質細胞の相互作用も含めた解析を行って始めて、肝臓でのIGF-I及びその関連分子の生理的調節機構の全貌が明らかになるものと思われ、今後そのような解析が*in vitro*, *in situ* 系を用いて行われることを期待する。

第四章 初代培養肝細胞におけるIGF-I, IGFBP-1, -4遺伝子発現のアミノ酸による調節

序論

本論文の第一章で述べた結果、つまり肝臓中のIGF-I, IGFBP-1遺伝子発現が栄養条件の変化に対応して敏感に変化することの裏にどのような機構があるのかを明らかにするため、第三章では主として内分泌系の因子に注目し、解析を行った。しかし、内分泌系の因子の変化だけではIGF-I, IGFBP-1遺伝子発現の変化を説明することは困難である。すでにIGFBP-1に関しては培地中のグルコース濃度を変化させることによりその遺伝子発現が変化することが明らかにされている(175)。また共同研究者の原田は培地より必須アミノ酸をひとつずつ除いていき、その時のIGF-I mRNA量の変化を解析し、Lys, Trp, MetなどがIGF-I遺伝子発現において重要な役割を果たしている可能性を示唆する結果を得ている(196)。

以上のようなことより、栄養条件の変化に対する肝臓中のIGF-I, IGFBP-1遺伝子発現の変化は内分泌系の影響ではなく、むしろアミノ酸が直接遺伝子発現を変化させている可能性が考えられる。

そこで本章では初代培養肝細胞を用いて、培地中のアミノ酸濃度を変化させた際にIGF-I, IGFBP-1遺伝子発現がどのように変化するかを解析した。培地中のアミノ酸濃度の変化は、個々のアミノ酸濃度を変化させることは行わず、必須アミノ酸を含むか含まないかの両者の比較により行った。また同時にIGFBP-4遺伝子発現の変化も解析した。

第一節 IGF-I遺伝子発現のアミノ酸による調節

4-1-1 方法

初代培養肝細胞の分離・培養はこれまでと同様に行った。用いた培地は、MEM Earle's salt solution(Flow lab.)に100 X MEM vitamin mixture (Flow lab.)を添加したものをアミノ酸(-)とし、それに50 X MEM Amino acid mixture (Flow lab.)を添加したものをアミノ酸(+)とした。これらの培地で肝細胞を培養し、24時間後に細胞からtotal RNAを調製し、IGF-I cDNAをプローブとするNorthern blot分析を行った。

4-1-2 結果と考察

Fig. 4-1Aに示したようにアミノ酸(-)の培地で24時間培養することにより、total IGF-I mRNA量はアミノ酸(+)に比べて40%にまで減少した。長さの異なるIGF-I mRNAごとに検討すると、他のmRNAに比べて7.4kbのIGF-I mRNAが20%以下まで特に顕著な減少を示した(Fig. 4-1B)。この結果は、第一章で観察されたグルテン食及び無タンパク質食摂取時の肝臓中のIGF-I mRNA量の変化とわずかに異なり、長いmRNAだけでなく短いmRNAの量も大きく減少している(Fig. 1-6, 1-8, 4-1を比較参照のこと)。今回はIGF-I遺伝子転写速度を測定していないので、IGF-I mRNA量の減少がどのような機構によるのかを考察することはできないが、IGF-I mRNAの安定性などの転写後段階での調節だけでなく、転写段階での調節も関与しているかも知れない。この点は第四節でもう一度議論する。しかし、アミノ酸(-)時にもっとも長いmRNAである7.4kbのIGF-I mRNAが顕著に減少していたことから、アミノ酸によるIGF-I mRNA量の調節には、IGF-I mRNAの安定性が関与していることは確実である。

第二節 IGFBP-1遺伝子発現のアミノ酸による調節

4-2-1 方法

初代培養肝細胞の分離・培養はこれまでと同様に行った。用いた培地は、4-1-1と同じである。これらの培地で肝細胞を培養し、経時的に培地を採取し、細胞からtotal RNAを調製した。

また、第三章で観察されたIns, Dexの作用がアミノ酸の有無でどのように変化するかを解析するためアミノ酸を含むもしくは含まない培地にIns(10^{-8} M), Dex(10^{-6} M)を単独もしくは同時に添加し、IGFBP-1遺伝子発現がどのように変化するかを解析した。

Northern blot分析、Western ligand blot分析は2-1-2と同様に行った。

4-2-2 結果と考察

Fig. 4-2に示したようにアミノ酸(-)の培地で培養すると、IGFBP-1 mRNA量は6hr目まではアミノ酸(+)より少ないが、それ以降増加し始め、9hrでほぼ同じ量に達し、それ以降はアミノ酸(-)の方が多くなり、24hr目ではアミノ酸(+)の2倍以上のIGFBP-1 mRNAが存在していた。

このとき培地中のIGFBP-1分泌量は、アミノ酸(-)と(+)で差がなかった(Fig. 4-3)。この結果は培地にアミノ酸が含まれていないアミノ酸(-)の方で

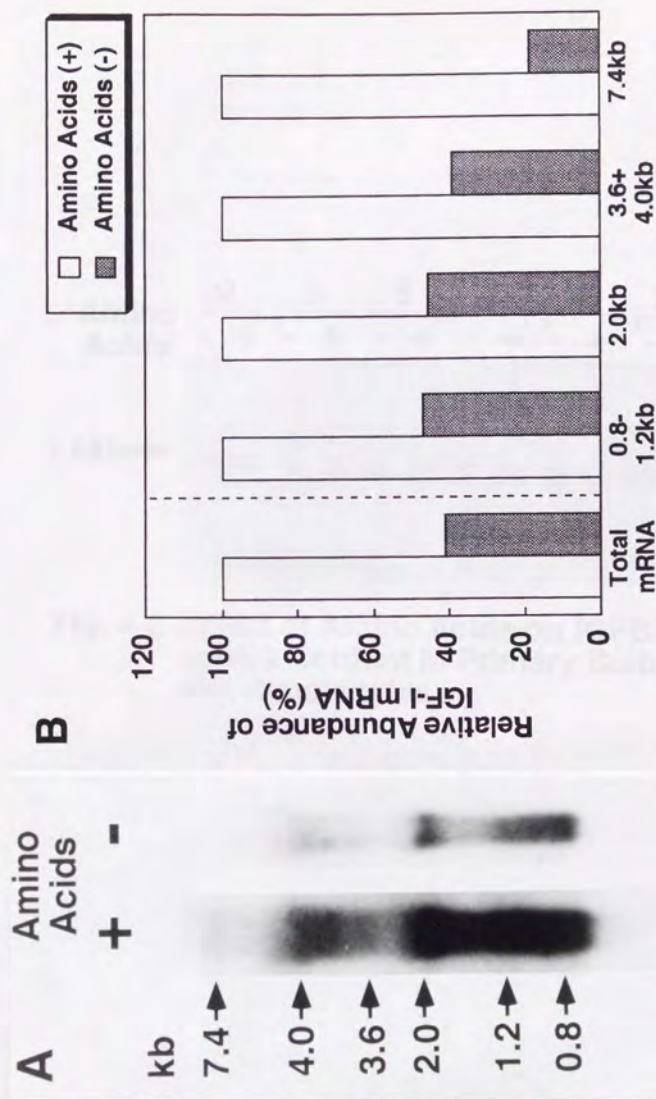


Fig. 4-1 Effect of Amino Acids on IGF-I mRNA Content in Primary Cultured Rat Hepatocytes

A : Northern Blot B : Relative Abundance of IGF-I mRNA
Data are represented as per cent of values of amino acids(+) for total and each species of IGF-I mRNA

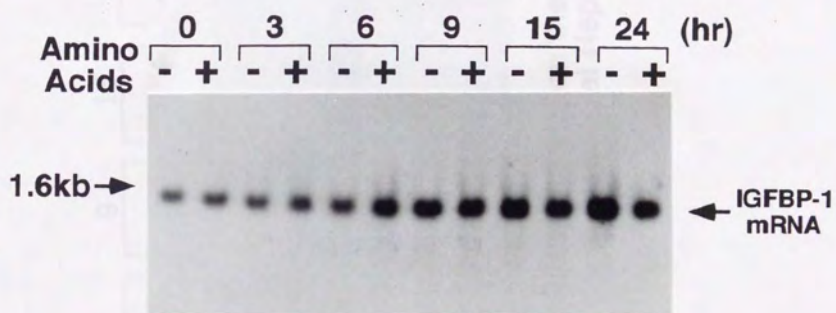


Fig. 4-2 Effect of Amino Acids on IGFBP-1 mRNA Content in Primary Cultured Rat Hepatocytes

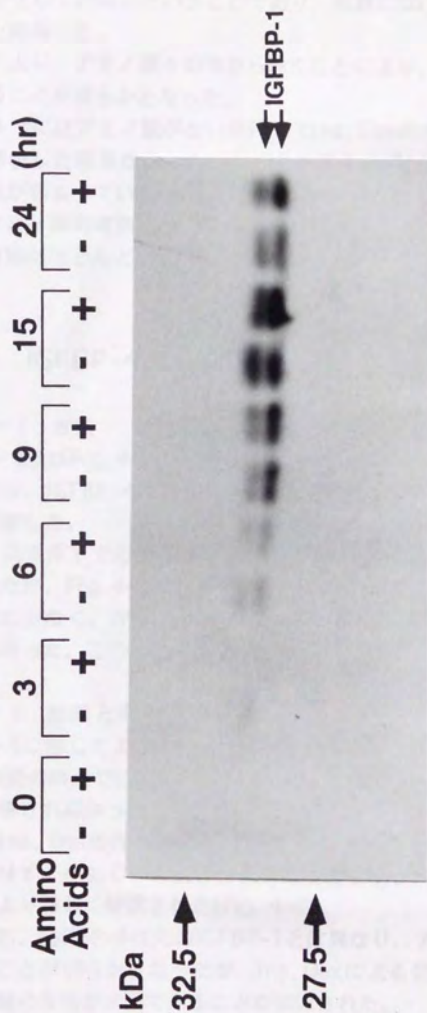


Fig. 4-3 Effect of Amino Acids Starvation on the Secretion of IGFBP-1 in Primary Cultured Rat Hepatocytes

は、他のタンパク質合成は低下していると予想されるのに対してIGFBP-1合成量に変化していないということであり、実際にはIGFBP-1合成量は増大していると結論した。

以上により、アミノ酸を培地から除くことにより、IGFBP-1遺伝子発現は増加することが明らかとなった。

Fig. 4-4にはアミノ酸がない条件下でIns, Dexの作用がどのように変化するかを解析した結果を示した。わずかにアミノ酸が存在しない場合にInsの抑制作用が弱まっている傾向が見られるものの、Insの抑制作用もDexの促進作用もアミノ酸の有無にかかわらず観察されており、それぞれの作用にアミノ酸の有無はほとんど影響していない。

第三節 IGFBP-4遺伝子発現に対するアミノ酸の効果

4-3-1 方法

Fig. 4-2及びFig. 4-4のblotをIGFBP-4 cDNAを用いてrehybridizeすることにより、IGFBP-4遺伝子発現に対するアミノ酸、アミノ酸とホルモンの作用を解析した。

また、同条件下でのIGFBP-4分泌量をWestern ligand blot分析により解析を試みたが、Fig. 4-3に示すように、この培養条件下ではIGFBP-4の分泌量が非常に少なく、Western ligand blot分析では検出できなかったため解析できなかった。この原因は不明である。

4-3-2 結果と考察

Fig. 4-5に示したように、IGFBP-4 mRNA量は時間とともに減少していき、24時間の時点ではわずかに存在しているのみであり、アミノ酸の有無の影響は観察されなかった。

一方、Ins, Dexの作用は、先の3-4-3と同様Ins添加で増加し、Dex添加では変化せず、Ins, Dexの共存で顕著な増加を示し、この傾向はアミノ酸の存在下でより顕著に観察された(Fig. 4-6)。

すなわち、IGFBP-4は先のIGFBP-1とは異なり、アミノ酸で直接調節されていないことが明らかとなったが、Ins, Dexによる発現調節が行われるためにアミノ酸の存在が必要であることが確認された。

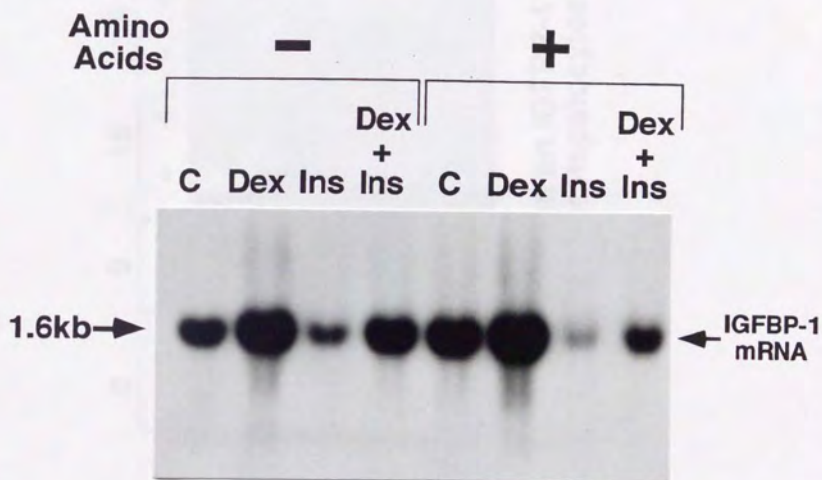


Fig. 4-4 Effects of Amino Acids Starvation and Hormones on IGFBP-1 mRNA Content in Primary Cultured Rat Hepatocytes

C : without hormone, Dex : 10^{-6} M, Ins : 10^{-8} M

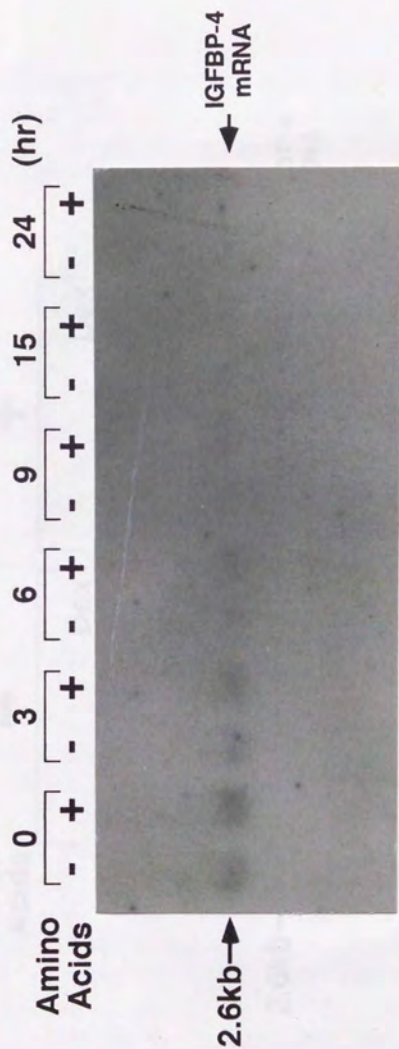


Fig. 4-5 Effect of Amino Acids Starvation on IGFBP-4 mRNA Content in Primary Cultured Rat Hepatocytes

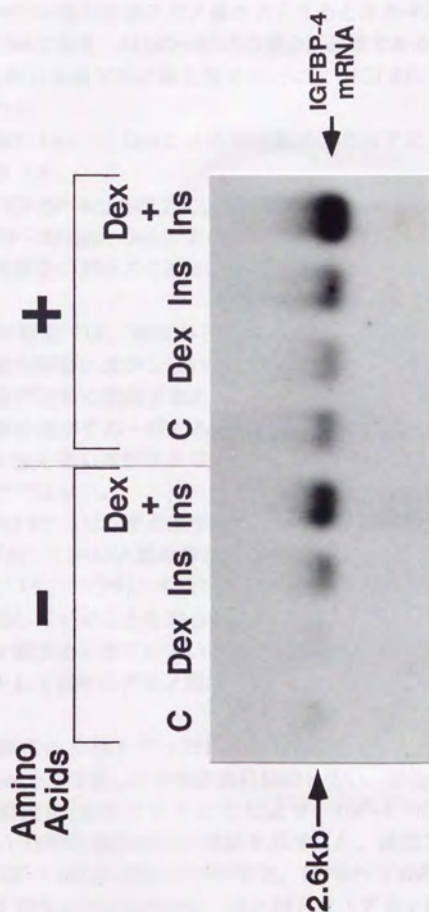


Fig. 4-6 Effects of Amino Acids Starvation and Hormones on IGFBP-4 mRNA Content in Primary Cultured Rat Hepatocytes
 C : without hormone, Dex : 10^{-6} M, Ins : 10^{-8} M

第四節 討論

本章では以下のことが明らかとなった。

1. 初代培養肝細胞系において、培地から必須アミノ酸を除くことにより、IGF-I mRNA量が必須アミノ酸が存在するときの40%に減少すること、特に長いmRNAである7.4kbのmRNAの減少が顕著であることが明らかになった。
2. 培地から必須アミノ酸を除くことによりIGFBP-1遺伝子の発現が顕著に促進された。
3. IGFBP-1のIns, Dexによる発現調節は必須アミノ酸の有無によっては変化しなかった。
4. 一方IGFBP-4は必須アミノ酸を除いても発現量は変化しなかった。
5. IGFBP-4のIns, Dexによる発現調節は必須アミノ酸がない条件下ではその変化の度合いが小さくなった。

今回の結果では、培地から必須アミノ酸を完全に除くことによりIGF-I mRNA量が顕著に減少している。この結果から第一章のグルテン食、無タンパク質食摂取時に観察された*in vivo*でのIGF-I mRNA量の減少は、アミノ酸の直接作用がその一因であると考えられる。もっとも*in vivo*では必須アミノ酸が全く無い状態はありえないので、アミノ酸の作用ですべてが説明できるわけではない。

一方IGFBP-1は、その血中濃度が絶食時、無タンパク質食摂取時に、肝臓中のIGFBP-1 mRNA量の増加を伴って、顕著に増加することが知られている(122, 197~199)。今回の結果は、アミノ酸が直接IGFBP-1の遺伝子発現を調節していることを明らかにした初めてのものであり、上記のような血中アミノ酸濃度が低下している際に、観察されるIGFBP-1遺伝子発現の増加の一因として血中のアミノ酸が作用している可能性を示している。

最近同様の実験を行った結果がいくつか報告されたが、Thissenらはmatrigel上で培養した初代培養肝細胞を用い、培地中のアミノ酸濃度を通常の血漿濃度の20%にすることにより、IGF-I mRNA量が56%減少し、IGFBP-1 mRNA量は69%の増加を示すこと、逆にアミノ酸濃度を5倍にすると、IGF-I mRNA量が70%の増加、IGFBP-1 mRNA量が75%の減少を示すことを報告している(143)。更に彼らは、アミノ酸による各mRNA量の変化は、GHIによる調節に影響をしないことも明らかにしている。この結果は今回の結果と良く一致しており、IGF-I, IGFBP-1遺伝子発現調節においてアミノ酸が重要な調節因子であることを示している。一方Paoらは、同じく初

代培養肝細胞系を用い、培地中のアミノ酸濃度を変化させることにより、IGF-I遺伝子の転写速度が60-70%減少するものの、IGFBP-1遺伝子の転写速度は変化しないことを報告している(142)。今回の実験ではIGF-I、IGFBP-1遺伝子の転写速度を測定していないが、彼らの結果が正しいとすると、アミノ酸除去時のIGF-I mRNA量の減少は転写段階で、IGFBP-1 mRNA量の増加は主として転写後の段階において調節を受けた結果であることが予想される。しかし、StrausらはH4IIE hepatomaを用いて、培地からPhe, Met, Leu, Trpの4種のアミノ酸をひとつずつ除いた際に、IGFBP-1 mRNA量が4-5倍増加し、その増加はIGFBP-1遺伝子の転写段階と転写後段階の両方で調節を受けた結果であると報告している(141)。今回の我々の結果でもIGF-I mRNA量の減少はIGF-I遺伝子の転写後段階だけでは説明することが不可能である。また第一章の結果では無タンパク質食摂取時のIGFBP-1遺伝子発現の促進は種として転写段階での作用によることが明らかとなっている。以上のように、アミノ酸によるIGF-I、IGFBP-1遺伝子発現調節が遺伝子発現のどの段階で行われているかを結論するには材料が足りず、今後の検討課題の一つであると思われる。また、*in vivo*で観察された食餌タンパク質によるIGF-I、IGFBP-1遺伝子発現の調節には、アミノ酸だけでなく、GH、インスリン、グルココルチコイドなどの内分泌系が互いに複合的に作用しているものと考えられ、その機構の全貌を明らかにするためには、更なる解析が必要と思われる。

今回は、アミノ酸だけの影響ではなく、アミノ酸とIns, Dexの相互作用についても検討した。その結果、アミノ酸の有無にかかわらず、Ins, Dexの作用が観察された。この結果は、これらホルモンの情報伝達経路とアミノ酸による経路は、IGFBP-1に関しては異なっていることを示しているものである。同様な実験を行った報告はこれまでになく、重要な知見である。

一方、まだ詳細が明らかにされていない肝臓におけるIGFBP-4の遺伝子発現調節機構においては、アミノ酸からの情報伝達経路が、ホルモンによる経路と何らかの相互作用があるものと予想されるが、今回の結果からはそれ以上のことを考察することはできない。

アミノ酸が直接遺伝子発現を調節するという考えは古くよりあり、その機構に関してもいくつか報告がなされている。例えば緒言で述べたように酵母でアミノ酸合成酵素の遺伝子発現が培地中のアミノ酸濃度により調節されていることが知られており(3)、その誘導には核内転写因子であるGCN4が関与していることが明らかになっている(200)。しかし、細胞がどのようにしてアミノ酸欠乏のシグナルを細胞内に伝えるのかに関しては不明であり、わず

かにaminoacyl-tRNAのchargeが減少することやタンパク質合成の減少がその引き金になるのではないかと示唆する報告があるのみである(201, 202)。

一方、哺乳類の細胞でもいくつか検討が行われており、その中でもKilbergらのグループが積極的に研究を行っている。彼らは肝癌細胞、初代培養肝細胞、線維芽細胞などを用い、培地よりアミノ酸を除いた際に細胞膜上のSystem Aのアミノ酸輸送体が増加し、その増加はアミノ酸輸送体の遺伝子発現の増加を伴っていることを明らかにしている(203~205)。更に彼らは、アミノ酸欠乏のシグナルを伝える分子を検索するため、アミノ酸欠乏後短時間で誘導される遺伝子のクローニングを試み、amino acid starvation-induced gene(ASI)のクローニングに成功している(206)が、現在のところその機能は不明である。

また、初代培養肝細胞に関しては、JeffersonらのグループによりLeu, Ile, Trpなどのアミノ酸を培地から除くことによりアルブミン分泌量が減少すること(207)、アミノ酸除去培地で培養することにより細胞内のeIF-2 α のリン酸化が促進されることなどが報告されている(208)。

このようにアミノ酸を単なる生体を構成するbuilding blockとしてではなく、生理的調節機能を有した情報因子として捉えることが多くの研究者により行われているが、その詳細な機構はいまだ不明の点が多く残されている。しかし、特に肝臓は小腸より吸収されたアミノ酸が門脈を介して最初に出会う臓器であり、肝臓に食餌由来のアミノ酸の濃度をモニタリングする機能がある可能性があり、今後の更なる検討において重要な対象となるものと思われる。今回観察されたIGFBP-1遺伝子発現のアミノ酸による調節は、その変化が非常に顕著であり、今後アミノ酸の生理作用を解明するための格好の実験系として使用することが可能である。

総合討論

本論文は、動物の成長が摂取している食餌により変化する現象において中心的な役割を果たしていると考えられているIGF-I及びIGFBPsの遺伝子発現が、その主要生産臓器である肝臓においてどのような機構で調節されているのかを解明し、それにより生体内におけるIGF-I及びIGFBPsの役割に関して新たな知見を得ることを目的とした。この目的のもと前章までの解析を行い、以下のようなことが明らかになった。

1. IGF-Iの主要生産臓器である肝臓において、IGF-I遺伝子発現は動物が摂取している食餌中のタンパク質の量だけでなく質の変化、すなわち食餌タンパク質のアミノ酸バランスの変化に対しても応答する(209)。
2. この変化は、IGF-I遺伝子の転写段階ではなく、IGF-I mRNAの安定性の段階で起きているものである。一方、IGF-Iと逆に無タンパク質食摂取により肝臓中でmRNA量が増加することが知られているIGFBP-1遺伝子は、無タンパク質食摂取によりその遺伝子転写速度が増加したことから、食餌タンパク質により転写段階で調節されていることが明らかになった(210)。
3. 初代培養肝細胞系での解析により、肝臓のIGF-I遺伝子発現を促進する因子としてGHとInsが、IGFBP-1遺伝子発現を促進する因子としてグルココルチコイドが、抑制する因子としてInsが明らかになり、更にまだ肝臓での発現調節機構が明らかにされていないIGFBP-4に関してInsとDexが協調して、遺伝子発現を促進していることが明らかとなった(211)。
4. 肝臓中のIGF-I、IGFBP-1遺伝子発現が培地中のアミノ酸により調節されることが明らかとなった。

今回観察された食餌タンパク質の質と量によるIGF-I及びIGFBP-1遺伝子発現の変化には、外界の環境因子の変化を内的な情報に変換する機構（高等動物では内分泌系や神経系がこれにあたる）が関与していることが予想される。しかし、少なくとも今回の解析からは内分泌系が関与しているという直接的な証拠は得られなかった。神経系の関与に関しては検討を行うことができなかったが、Berelowitzらのグループはラットを絶食させた際や無タンパク質食を摂取させた際に視床下部のGrowth-Hormone-Releasing Factor (GRF) mRNAが減少することを報告しており(212, 213)、更にその減少は内分泌系が関与したfeed back regulationによるものではなく、neuropeptideやneurotransmitter系などの神経系が食餌タンパク質により影響された結果ではないかと予想している。栄養条件による肝臓中の

IGF-I遺伝子発現の変化に神経系が関与しているかどうかは今後の検討課題である。

IGF-Iの遺伝子発現が栄養条件により調節されている機構は、主として転写後段階で行われているものであるという結果が今回得られたが、IGF-I mRNAに限らずmRNAの安定性を調節する機構に関しては、現在のところ明らかにされておらず、今後の検討課題であると思われる。今後の解析の方法としては、7.4kbのIGF-I mRNAに存在することが明らかにされているAU rich element(ARE)に結合するARE binding protein(AREBP)(137)の変動を解析する、AREBPの発現を調節する諸因子を検索するなどが考えられるが、AREBPそのものが判然としていない現在では、非常に困難であると思われる。ところで最近になり、かつて筆者らと同様、IGF-Iの栄養条件による発現調節は主として転写後段階で行われているとの結果を報告していたStrausらのグループが、IGF-I geneのintron 3とexon 4をプローブとして用いることにより、核内のprepro IGF-I mRNAを定量し、絶食時に見られるIGF-I mRNA量の変化は主として転写段階での作用によるものであるとの結果を報告した(214)。第四章でも述べたようにアミノ酸によるIGF-I遺伝子発現調節には転写段階での調節機構も存在している可能性が初代培養肝細胞での結果から考えられる。したがってIGF-I遺伝子の栄養条件による発現調節機構に関してここで結論づけることはまだできない。実際には栄養条件の変化によりGH、Insの濃度が変化し、アミノ酸、GH、Insなどが複合的に作用しIGF-I遺伝子発現を調節している可能性が高く、今後の更なる解析が必要である。

今回得られた結果でもっとも注目に値するのは、肝臓でのIGF-I、IGFBP-1遺伝子発現をアミノ酸が直接調節する可能性が示されたことである。すでに述べたように大腸菌や酵母では外界の基質が直接遺伝子発現を変化させることが知られている。これまで、ハムスターのfibroblastでグルコース欠乏によりglucose-regulated proteinsが誘導される例(215)は知られているものの、そのような現象は数少なく、ラットのような哺乳類でもこのような機構が残されていることは驚きである。アミノ酸がどのようにして細胞内へと情報を伝達するのかに関しては現在のところ不明であるが、酵母などよりも複雑な経路を有していることは間違いないと思われる。また今回は肝臓に関してのみ解析を行ったので、他の臓器でもアミノ酸がIGF-I、IGFBP-1遺伝子発現を調節しているのかに関しては不明であるが、船引らは食餌摂取直後に見られる一過性のタンパク質合成亢進において、肝臓はアミノ酸の影響をより顕著に受け、一方筋肉はインスリンの影響を受けることを確認している(216)。したがって非常に乱暴な言い方になるが、肝臓という臓

器は他の臓器に比べ、食餌など外界からの情報に小腸での吸収過程を介して直接、接しているという特徴から考えて、より原始的な臓器、すなわち進化の過程で他の臓器が捨てていった性質をいまだ保持している臓器と考えることができるかもしれない。

第三章、第四章ではIGFBP-1遺伝子発現の調節因子として、Ins, Dex, アミノ酸が作用していることを明らかにし、IGFBP-1のグルコースカウンターレギュレーターとしての役割に関して議論した。その中では血中IGF-Iの生理作用を血糖値調節を行うinsulin-like作用に限定して議論していたが、すでに述べているようにIGF-Iの生理作用は非常に多岐にわたるものであり、糖代謝に限られているわけではない。すでに血中IGF-I濃度が体タンパク質代謝に深く関与している証拠が数多く得られている。したがって先のグルコース代謝においてIGFBP-1が血中のFree IGF-Iの作用を抑制するために作用しているという考えは、血中アミノ酸代謝にも当てはめることができるかもしれない。すなわち、絶食時や無タンパク質食摂取時にはIGF-I自身の濃度も下がるが、その状態下でもfreeのIGF-Iは残っており、そのfreeのIGF-Iが無差別にアミノ酸取り込みを促進することがないように、つまり血中に存在しているアミノ酸をより有効に臓器間で利用することができるよう、IGFBP-1濃度が上昇するのではないだろうか。このように考えると、種々の生理状態でのIGFBP-1遺伝子発現の変化、血中濃度の変化に説明がつくように思われる。つまり、IGFBP-1は短期の生理状態の変化に迅速に対応し、血中IGF-Iの作用を修飾する役割を有していると考えられる。

一方、本論文では取り上げていないが、IGFBP-3はタンパク質栄養の変化に対してIGF-Iと同様の変化を示すことが知られており、種々のホルモンなどの調節因子に対する応答もIGF-Iと類似している(218)。したがって、IGFBP-3は血中でIGF-Iの貯蔵庫として作用すると同時にIGF-Iの変化に応じて、その発現が変化し、最適の時に最適の場所でIGF-Iが作用するように働いているのではないだろうか。すなわち、IGFBP-3はIGFBP-1とは対照的に長期の変化に対応する役割を有しているのではないだろうか。

以上の議論をまとめて考えると、血中に存在しているIGF-Iは栄養条件などの生理状態の変化に応答して、自らの濃度を変化させるとともに、IGFBP-1とIGFBP-3を介して、短期及び長期にわたる生体の応答を総合的に調節しているのではないかと考えられる。つまり、IGF-IはIGFBPsなどの関連分子と共同で作用することにより、生体の恒常性の維持の根幹に関わっているものと考えられる。Fig.5-1に現在蓄積しつつあるIGF関連の知見を含めて、この考えをまとめた概念図を示した。しかし、この中には緒言で触れた

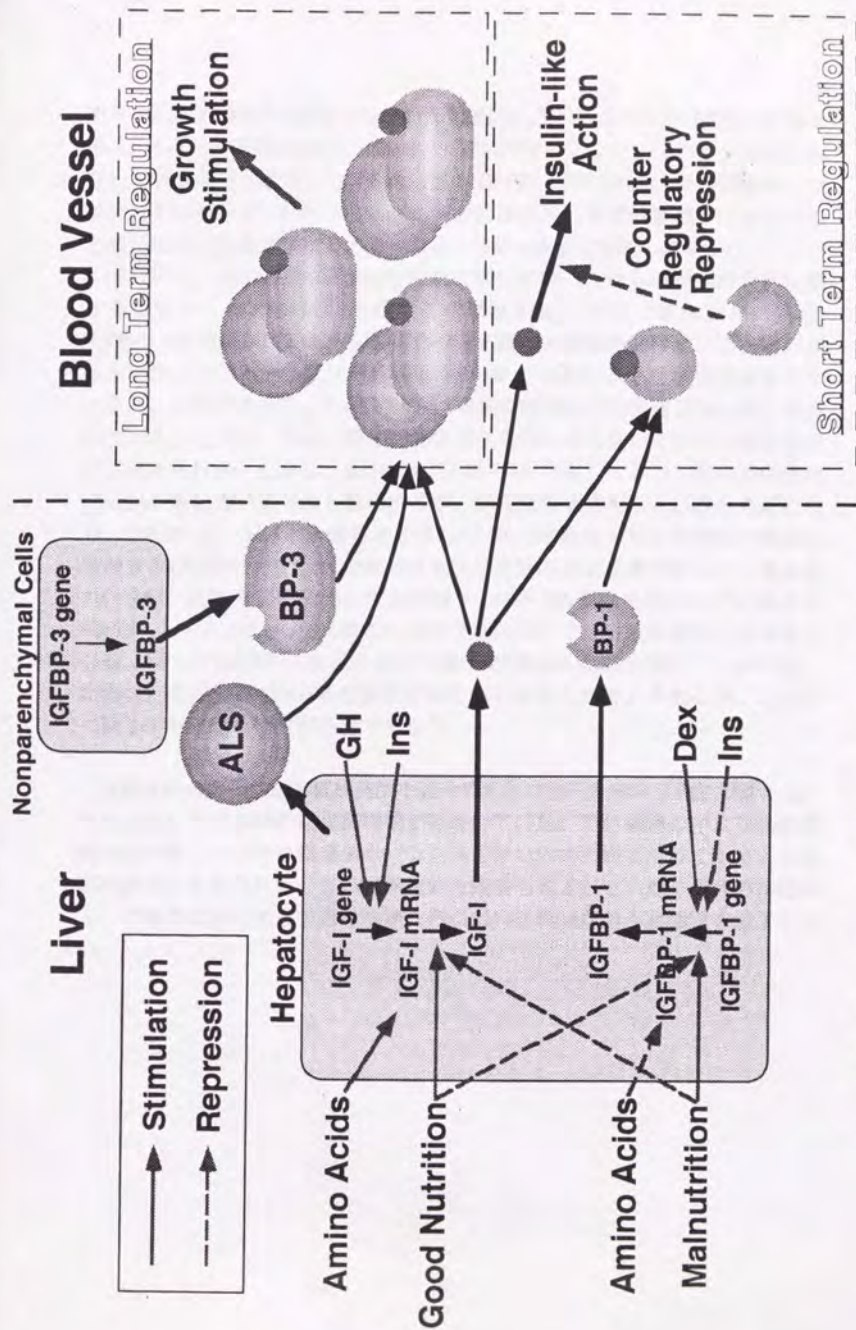


Fig. 5-1 Regulatory Mechanism of Hepatic IGF-I and IGFBPs Gene Expression and Their Physiological Role

IGF-I自身がIGFBPを誘導するという現象(96, 97)や血中IGF-I濃度が肝臓でのIGF-I遺伝子発現を調節している、つまりIGF-Iにフィードバック機構が存在しているという点(219)、更には他のIGFBP、IGF receptorの動態などは含まれてはおらず、IGF-Iならびにその関連物質の生理的意義づけがされるためにはまだ時間がかかると思われる。今後の解析に期待したい。

IGFBP-1, -3以外のIGFBPsの役割に関しては、これらのタンパク質に関する情報が、まだ少ないためここで議論することはできないが、今回IGFBP-4遺伝子がIGF-IともIGFBP-1とも異なる調節を受けていることが明らかになったことから、IGFBP-4は他のBPとは異なる生理的役割を有していることが予想される。IGFBP-4が、卵巣や精巣などの生殖器官に強く発現していることから、生殖・発生に関する生理的役割を有している可能性が大いに考えられる。しかし、血中にもIGFBP-4が存在しており、何らかの生理的役割を果たしているものと思われるが、詳細は不明である。しかし最近になり、IGFBP-3、ALSと3量体を形成したIGF-Iは血液中での半減期が顕著に増加する(220)一方で、その大分子量故に血管内皮を通過できないと考えられ(194)、血管内皮を通過しての組織へのIGF-Iの運搬を担当しているのがIGFBP-1, -2, -4, -5, -6などの低分子量IGFBPであるとの仮説が出されている。従ってIGFBP-1などの低分子量BPが異なる調節を受けているのは、臓器ごとのIGF-Iの利用率を調節するためであるとも考えられるが、この点に関しても更なる検討が必要であろう。

栄養条件の変化により成長速度も変化するという一見単純な現象の裏には、生体が有している精緻な調節機構が存在していた。その機構の中には高等動物のみが有している多臓器間のバランスを保つための機構だけでなく、大腸菌や酵母にも見られる、言わば原始的な機構も含まれていた。生体の精緻さと、生物界に存在する普遍性の雄大さに思いを馳せながら本論文を終了したい。

要旨

食餌タンパク質の質と量を変化させると成長速度が変化することは周知の事実であるが、インスリン様成長因子I (IGF-I)は食餌タンパク質の変化にตอบสนองして血中濃度が変化し、食餌タンパク質による成長制御において中心的役割を果たしていることがすでに明らかにされている。また、IGF-IIは特異的な数種類の結合タンパク質(IGFBPs)と結合した状態で血中に存在しており、IGFBPsの血中濃度、IGF-Iとの結合状態も食餌タンパク質により変化することが知られている。本研究は、IGF-Iの主要生産臓器である肝臓におけるIGF-IとIGFBPsの遺伝子発現調節機構を明らかにし、食餌タンパク質による成長制御におけるIGF-IとIGFBPsの生理的役割を考察することを目的とした。

(1) 食餌タンパク質によるラット肝臓でのIGF-I遺伝子発現調節

ラットに質の良い食餌として12% カゼイン食(12C)を、質の良くない食餌としてLys, Thrが欠乏している12% グルテン食(12G)を、更にタンパク質を全く含まない無タンパク質食(PF)を1週間摂取させ、肝臓中のIGF-I mRNA量をNorthern blot 分析法により測定した。その結果、12G, PFを摂取したラットの肝臓中では12C摂取ラット肝臓と比べてIGF-I mRNA量が約40%まで減少しており、血中IGF-I濃度の変化は肝臓中のIGF-I mRNA量の変化が原因であることが明らかになった。また、IGF-I mRNAには3' 非翻訳領域の違いにより長さの異なる複数のmRNAが存在していることが知られているが、各群のmRNA量の変化を長さの異なるmRNAごとに解析したところ比較的長いmRNAである7.4kbのmRNAと4.0-3.6kbのmRNA量がより顕著に12G群、PF群で減少していることが明らかとなった。これら長いmRNAは短いmRNAに比べて、半減期が短いことが知られているので、12G, PF群で観察されたIGF-I mRNA量の減少はmRNAの安定性の段階で調節された結果であることが考えられた。次に他の食餌タンパク質の例としてMetが欠乏している大豆タンパク質を用いて同様の実験を行ったところ、大豆タンパク質を摂取した群でIGF-I mRNA量の減少が観察され、その減少はMetを添加することによりカゼイン食群と同レベルまで回復した。また、長さの違いに着目して解析したところ7.4kbと3.6-4.0kbのIGF-I mRNAが顕著に減少していた。以上の結果から食餌タンパク質の質と量の違いによる血中IGF-I濃度の減少は肝臓中のIGF-I mRNA量の減少が原因であること、IGF-I mRNA量は主としてIGF-I mRNAの安定性の段階で調節されていることが明らかになった。

これを更に確認するため12C, 12G, PFを摂取したラット肝臓より単離核を調製し、nuclear run-on transcription assayを行い、IGF-I 遺伝子転写速度を

定量した所、12G, PF群でIGF-I遺伝子転写速度が約20%減少していたものの、有意な差はなく、食餌蛋白質の質と量の違いによるIGF-I mRNA量の調節は、主としてmRNAの安定性などの転写後段階で行われているものと結論した。

同時に、すでにPF食を摂取することにより肝臓中のmRNA量が顕著に増加することが明らかにされているIGFBP-1に関しても、遺伝子転写速度を測定したところIGF-Iとは異なり、IGFBP-1遺伝子転写速度はPF群で12C群の約4倍に増加していた。従って、IGFBP-1遺伝子発現は食餌タンパク質により主として転写段階で調節されていることが明らかになった。

(2) 初代培養肝細胞系におけるIGF-I, IGFBP-1, -4遺伝子発現調節機構の解析

1) ホルモンによる調節

肝臓でのIGF-I, IGFBP-1遺伝子発現調節機構をより詳細に解析し、*in vivo*で観察された食餌タンパク質によるIGF-I, IGFBP-1遺伝子発現の調節機構を明らかにするため、初代培養肝細胞系を用いた解析を行った。初代培養肝細胞系は現存の*in vitro*系のなかでもっとも良く*in vivo*の肝機能を維持していることが知られている細胞系である。まず初代培養肝細胞でIGF-I遺伝子がどの程度発現しているのか、またどのIGFBPsが発現しているかを確認したところ、*in vivo*よりは低レベルながらIGF-I遺伝子が発現しており、IGFBP-1およびIGFBP-4を合成・分泌していることが明らかとなった。次にホルモンによる調節機構を明らかにするため、培地に成長ホルモン(GH)、インスリン(Ins)、デキサメタゾン(Dex)を添加し、IGF-I遺伝子発現の変化を解析したところIGF-I mRNA量、IGF-I分泌量ともにGH, Ins添加時に増加することが明らかとなった。DexはIGF-I遺伝子発現に影響しなかった。また、解析の過程で初代培養肝細胞の培地中のIGF-I濃度を定量する際、培地中のIGF-IをIGFBPsから遊離させるために行われていた酸エタノール処理法では、完全にIGFBPsを除去できないことが明らかとなり、初代培養肝細胞系でIGF-I分泌量を測定する際には、培地をacid gel chromatographyに供した後にRIAを行う必要があることが示された。

IGFBP-1遺伝子発現に関しては、GHはほとんど影響しなかったが、Dex添加によりIGFBP-1 mRNA量、分泌量ともに増加し、その EC_{50} は 3×10^{-8} Mであった。Dex添加時のIGFBP-1 mRNA量、IGFBP-1分泌量は良く相関していたことからDexによるIGFBP-1遺伝子発現の促進は、転写レベルでの作用であると考えられた。一方、Ins添加によりIGFBP-1 mRNA量、分泌量ともに減少し、その EC_{50} は 8×10^{-10} Mであった。Ins添加によるIGFBP-1 mRNA量の減少と分泌量の減少も相関していたため、InsによるIGFBP-1遺伝子発現の抑制も転写

レベルでの作用であることが考えられた。以上の結果より肝臓でのIGFBP-1遺伝子発現はDexにより正に、Insにより負に調節されていることが明らかとなった。また、DexとInsの両者を共存させた際には、DexによるIGFBP-1 mRNA量とIGFBP-1分泌量の増加作用が完全に打ち消され、IGFBP-1遺伝子発現に対する作用はInsの方がDexよりも強いことが示された。

一方、IGFBP-4遺伝子発現調節機構に関して、Dex、Insは単独では何の効果も示さなかったが、両者が共存したときにIGFBP-4 mRNA量、分泌量ともに顕著に増加することが明らかになり、IGFBP-4遺伝子発現はIGFBP-1とは異なる調節を受けていることが考えられた。

2) アミノ酸による調節

in vivo 観察された食餌タンパク質の質と量によるIGF-I、IGFBP-1遺伝子発現調節機構を明らかにするためホルモンによるIGF-I、IGFBP-1遺伝子発現調節機構を解析したが、その結果だけでは*in vivo*の現象を説明することができないため、次にアミノ酸自身が肝臓におけるIGF-I、IGFBP-1の遺伝子発現調節に関与しているのではないかと考え、解析を行った。培地中から必須アミノ酸のみを除去した培地を作製し、初代培養肝細胞を培養しIGF-I mRNA量、IGFBP-1 mRNA量の変化を必須アミノ酸を含んだ培地を対照として測定した。その結果、培地から必須アミノ酸を除去することによりIGF-I mRNA量は対照群の40%にまで減少し、その減少は*in vivo*で観察されたのと同様に長いmRNAの方が顕著であった。一方、IGFBP-1 mRNA量は必須アミノ酸を除去することにより顕著に増加していた。IGFBP-4 mRNA量も同時に測定したが、アミノ酸の有無により変化しなかった。以上の結果より、肝臓でのIGF-I、IGFBP-1遺伝子発現の調節因子としてアミノ酸が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

(3) まとめ

食餌タンパク質の質と量の違いと相関して血中IGF-I濃度が変化することが知られていたが、その機構として肝臓中のIGF-I mRNA量が食餌タンパク質の質と量にตอบสนองして変化していることが明らかとなった。またその際IGF-I遺伝子転写速度は変化しておらず、IGF-I mRNA量の変化は主としてIGF-I mRNAの安定性などの転写後段階で調節されていることが明らかとなった。一方、IGFBP-1については食餌タンパク質の質と量の変化にตอบสนองしてその遺伝子転写速度が変化しており、IGF-Iとは異なる調節を受けていることが示された。また初代培養肝細胞系を用いることによりIGF-I遺伝子発現がGH、Insにより正に調節されていること、IGFBP-1遺伝子発現がDexにより正に、Insにより負に

調節されていることが明らかとなった。初代培養肝細胞ではIGFBP-4遺伝子発現していたが、DexとInsの共存下でそのmRNA量が顕著に増加することが明らかとなった。更に肝臓でのIGF-I, IGFBP-1遺伝子発現調節においてアミノ酸が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

以上のことより食餌タンパク質の質と量を変化させた際には、GH, Ins, Dexなどのホルモンと血中のアミノ酸濃度の変化が複合的に作用し、IGF-I, IGFBP-1遺伝子発現を調節し、動物の成長制御を行っているものと考えられた。

謝辞

本研究は東京大学農学部農芸化学科栄養化学研究室で行われたものであり、研究を行うにあたり、当研究室、野口忠教授に終始ご指導、ご鞭撻を賜りました。ここに厚くお礼申し上げます。

また、栄養化学研究室の室員、卒業生の皆様には多くのご助力をいただき感謝致します。特に適切な助言、御協力をいただきました加藤久典助手（現宇都宮大学助教授）、竹中麻子助手、学生として御協力していただいた田中弥生氏、渡瀬裕子氏、森正道氏、東祐輔氏、久米努氏、内島泰信氏に深く感謝いたします。

抗ヒトIGF-Iポリクローナル抗体を御恵与くださいました藤沢薬品工業株式会社丹羽峰雄博士、 β -actin cDNAを御恵与くださいました東京大学農学部農芸化学科発酵学研究室吉田稔助手（現助教授）、IGFBP-4 cDNAを御恵与くださいましたノースカロライナ大学A. J. D'Ercole博士に感謝いたします。

多くの御助言、御激励を賜りました東京大学名誉教授・現共立女子大学教授内藤博先生、東京大学農学部助教授高橋伸一郎先生、日本大学農獣医学部関泰一郎先生にお礼申し上げます。

本論文執筆期間中、東京農工大学農学部応用生物科学科栄養生理化学研究室の皆様、特に松引龍平教授、矢ヶ崎一三助教授には大変御迷惑をおかけしました。ここに深謝いたします。

最後に、これまで研究生生活を支えてくれた家族に感謝します。

1995年11月17日

三浦 豊

参考文献

1. Jacob, F. and Monod, J. (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* **3**, 318-356
2. 小林泰夫 (1995) 枯草菌の胞子形成—胞子形成開始におけるシグナル伝達— 蛋白質・核酸・酵素 **40**, 976-985
3. Hinnebusch, A. G. (1988) Mechanisms of gene regulation in the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **52**, 248-273
4. 宮川幸子 (1987) 東京大学修士論文: 食餌タンパク質の「質」及び「量」に対する代謝応答 — インスリン様成長因子I (IGF-I) の応答を中心に—
5. Takahashi, S., Kajikawa, M., Umezawa, T., Takahashi, S.-I., Kato, H., Miura, Y., Nam, T. J., Noguchi, T. and Naito, H. (1990) Effect of dietary proteins on the plasma immunoreactive insulin-like growth factor-I / somatomedin C concentration in the rat. *Brit. J. Nutr.* **63**, 521-534
6. Nam, T. J., Noguchi, T., Funabiki, R., Kato, H., Miura, Y. and Naito, H. (1990) Correlation between the urinary excretion of acid-soluble peptides, fractional synthesis rate of whole body proteins, and plasma immunoreactive insulin-like growth factor-I / somatomedin C concentration in the rat. *Brit. J. Nutr.* **63**, 515-520
7. 梶川幹夫 (1988) 東京大学修士論文: 食餌タンパク質の違いに対するタンパク質・アミノ酸代謝応答の血中遊離アミノ酸動静脈差法による解析
8. 梅沢努 (1990) 東京大学修士論文: タンパク質栄養がインスリン様成長因子I血中結合タンパク質(IGFBP-I)に及ぼす影響について
9. Umezawa, T., Ohsawa, A., Miura, Y., Kato, H. and Noguchi, T. (1991) Effect of protein deprivation on insulin-like growth factor-binding proteins in rats. *Brit. J. Nutr.* **66**, 105-116
10. Salmon, W. D. and Daughaday, W. H. (1957) A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage *in vitro*. *J. Lab. & Clin. Med.* **49**, 825-836
11. Froesch, E. R., Burgi, H., Ramseier, E. B., Bally, P. and Labhart, A. (1963) Antibody-suppressible and non-suppressible insulin-like activities in human serum and their physiologic significance. An insulin assay with adipose tissue of increased precision and specificity. *J. Clin. Invest.* **42**, 1816-1834

12. Temin, H. M. (1971) Stimulation of multiplication of stationary chicken cells. *J. Cell. Physiol.* **78**, 161-170
13. Rinderknecht, E. and Humbel, R. E. (1978) The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J. Biol. Chem.* **253**, 2769-2776
14. Daughaday, W. H., Hall, K., Salmon, W. D. Jr., Van den Brande, J. L. and Van Wyk, J. J. (1987) On the nomenclature of the somatomedin and insulin-like growth factors. *J. Clin. Endoc. Metab.* **65**, 1075-1076
15. Jansen, M., van Schaik, F. M. A., Ricker, A. T., Bullock, B., Woods, D. E., Gabbay, K.H., Nussbaum, A. L., Sussenbach, J. S. and Van den Brande, J. L. (1983) Sequence of cDNA encoding human insulin-like growth factor I precursor. *Nature* **306**, 609-611
16. Murphy, L. J., Bell, G. I., Duckworth, M. L. and Friesen, H. G. (1987) Identification, characterization and regulation of a rat complementary deoxyribonucleic acid which encodes insulin-like growth factor-I. *Endocrinology* **121**, 684-691
17. Bell, G. I., Stempien, M. M., Fong, N. M. and Rall, L. B. (1986) Sequences of liver cDNAs encoding two different mouse insulin-like growth factor I precursors. *Nucl. Acids Res.* **14**, 7872-7881
18. Tavakkol, A., Simmen, F. A. and Simmen, R. C. M. (1988) Porcine insulin-like growth factor-I (pIGF-I): Complementary deoxyribonucleic acid cloning and uterine expression of messenger ribonucleic acid encoding evolutionarily conserved IGF-I peptides. *Mol. Endocrinol.* **2**, 674-681
19. Kajimoto, Y. and Rotwein, P. (1989) Structure and expression of a chicken insulin-like growth factor I precursor. *Mol. Endocrinol.* **3**, 1907-1913
20. Kajimoto, Y. and Rotwein, P. (1990) Evolution of insulin-like growth factor I (IGF-I): Structure and expression of and IGF-I precursor from *Xenopus laevis*. *Mol. Endocrinol.* **4**, 217-226
21. Cao, Q.-P., Duguay, S. J., Plisetskaya, E., Steiner, D. F. and Chan, S. J. (1989) Nucleotide sequence and growth hormone-regulated expression of salmon insulin-like growth factor I mRNA. *Mol. Endocrinol.* **3**, 2005-2010
22. Roberts, C. T. Jr., Lasky, S. R., Lowe, W. L. Jr. Seamen, W. T. and LeRoith, D. (1987) Molecular cloning of rat insulin-like growth factor I

- complementary deoxyribonucleic acids ; Differential messenger ribonucleic acid processing and regulation by growth hormone in extrahepatic tissues. *Mol. Endocrinol.* **1**, 243-248
23. 加藤久典 (1990) 東京大学博士論文 : ラットインスリン様成長因子 1 遺伝子の構造、機能とその発現に関する研究
24. Rotwein, P. (1986) Two insulin-like growth factor I messenger RNAs are expressed in human liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 77-81
25. Shimatsu, A. and Rotwein, P. (1987) Sequence of two rat insulin-like growth factor I mRNAs differing within the 5' untranslated region. *Nucl. Acids Res.* **15**, 7196
26. Lowe, W. L. Jr. Lasky, S. R. LeRoith, D. and Roberts, C. T. Jr. (1988) Distribution and regulation of rat insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acids encoding alternative carboxyterminal E-peptides : Evidence for differential processing and regulation in liver. *Mol Endocrinol.* **2**, 528-535
27. Adamo, M. L., Ben-Hur, H., LeRoith, D. and Roberts, C. T. Jr. (1991) Transcription initiation in the two leader exons of the rat IGF-I gene occurs from disperse versus localized sites. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **176**, 887-893
28. Lowe, W. L. Jr., Roberts, C. T. Jr. Lasky, S. R. and LeRoith, D. (1987) Differential expression of alternative 5' untranslated regions in mRNAs encoding rat insulin-like growth factor I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 8946-8950
29. Murphy, L. J., Bell, G. I. and Friesen, H. G. (1987) Tissue distribution of insulin-like growth factor I and II messenger ribonucleic acid in the adult rat. *Endocrinology* **120**, 1279-1282
30. Hynes, M. A., Van Wyk, J. J., Brooks, P. J., D'Ercole, A. J., Jansen, M. and Lund, P. K. (1987) Growth hormone dependence of somatomedin-C / insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-II messenger ribonucleic acids. *Mol. Endocrinol.* **1**, 233-242
31. 三浦豊(1989) 東京大学修士論文 : ラットインスリン様成長因子Iの発現調節機構の解析
32. Lund, P. K., Hoyt, E. C. and Van Wyk, J. J. (1989) The size heterogeneity of rat insulin like growth factor-I mRNAs is due primarily to difference in the length of 3'-untranslated sequence. *Mol. Endocrinol.* **3**, 2054-2061

33. Hoyt, E. C., Hepler, J. E., Van Wyk, J. J. and Lund, P. K. (1991) Structural characterization of exon 6 of the rat IGF-I gene. *DNA Cell Biol.* **11**, 433-441
34. Steenbergh, P. H., Koonen-Reemst, A. M. C. B., Cleutjens, C. B. J. M. and Sussenbach, J. S. (1991) Complete nucleotide sequence of the high molecular weight human IGF-I mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **175**, 507-514
35. Sara, V. R. and Hall, K. (1990) Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Physiological Reviews* **70**, 591-614
36. Schwander, J. C., Hauri, C., Zapf, J. and Froesch, E. R. (1983) Synthesis and secretion of insulin-like growth factor and its binding protein by the perfused rat liver : Dependence on growth hormone status. *Endocrinology* **113**, 297-305
37. D'Ercole, A. J., Applewhite, G. T. and Underwood, L. E. (1980) Evidence that somatomedin is synthesized by multiple tissues in the fetus. *Dev. Biol.* **75**, 315-328
38. D'Ercole, A. J., Stiles, A. D. and Underwood, L. E. (1984) Tissue concentration of somatomedin C : Further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 935-939
39. Mondschein, J. S. and Hammond, J. M. (1988) Growth factor regulate immunoreactive insulin-like growth factor-I produced by cultured porcine granulosa cells. *Endocrinology* **123**, 463-468
40. Cailleau, J., Vermeire, S. and Verhoeven, G. (1990) Independent Control of the production of insulin-like growth factor I and its binding protein by cultured testicular cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **69**, 79-89
41. Tode, B., Seiro, M., Rotella, C. M., Franceschelli, G. G. F., Tanini, A. and Toccafondi, R. (1989) Insulin-like growth factor-I : Autocrine secretion by human thyroid follicular cells in primary culture. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **69**, 639-647
42. Uthne, K. and Uthne, T. (1972) Influence of liver resection and regeneration on somatomedin (sulfation factor) activity in sera from normal and hypophysectomized rats. *Acta Endocrinol.* **71**, 255-264
43. Copeland, K. C., Underwood, L. E. and Van Wyk, J. J. (1980) Induction of immunoreactive somatomedin C in human serum by growth hormone : Dose-response relationships and effect on chromatographic

- profiles. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **50**, 690-697
44. Scheiwiller, E., Guler, H. -P., Merryweather, J., Scandella, C., Maerki, W., Zapf, J. and Froesch, E. R. (1986) Growth restoration of insulin-deficient diabetic rats by recombinant human insulin-like growth factor I. *Nature* **323**, 169-171
 45. Yang, H., Emler, C. and Schalch, D. (1987) Diabetes mellitus influences growth by regulating hepatic insulin-like growth factor I and II (IGF-I and IGF-II) gene expression. *Diabetes* (suppl. 1) **36**, 95A
 46. Goldstein, S., Sertich, G. J., Levan, K. R. and Phillips, L. S. (1988) Nutrition and Somatomedin. XIX. Molecular regulation of insulin-like growth factor-I in streptozotocin-diabetic rats. *Mol. Endocrinol.* **2**, 1093-1100
 47. Maes, M., Underwood, L. E. and Ketelslegers, J. -M. (1986) Low serum somatomedin-C in insulin-dependent diabetes : Evidence for a postreceptor mechanism. *Endocrinology* **118**, 377-382
 48. Maiter, D., Fliesen, T., Underwood, L. E., Maes, M., Gerard, G., Davenport, M. L. and Ketelslegers, J. -M. (1989) Dietary protein restriction decreases insulin-like growth factor I independent of insulin and liver growth hormone binding. *Endocrinology* **124**, 2604-2611
 49. Thissen, J. P., Triest, S., Maes, M., Underwood, L. E. and Ketelslegers, J. M. (1990) The decreased plasma concentration of insulin-like growth factor-I in protein-restricted rats is not due to decreased numbers of growth hormone receptors on isolated hepatocytes. *J. Endocrinol.* **124**, 159-165
 50. Thissen, J. P., Triest, S., Moats-Staats, B. M., Underwood, L. E., Mauerhoff, T., Maiter, D. and Ketelslegers, J. -M. (1991) Evidence that pretranslational and translational defects decrease serum insulin-like growth factor-I concentrations during dietary protein restriction. *Endocrinology* **129**, 429-435
 51. Maes, M., Amand, Y., Underwood, L. E., Maiter, D. and Ketelslegers, J. M. (1988) Decreased serum insulin-like growth factor I response to growth hormone in hypophysectomized rats fed a low protein diet : evidence for a postreceptor defect. *Acta Endocrinol.* **117**, 320-326
 52. Thissen, J. P., Triest, S., Underwood, L. E., Maes, M. and Ketelslegers, J. M. (1990) Divergent responses of serum insulin-like growth factor-I and liver growth hormone (GH) receptors to exogenous GH in protein-

- restricted rats. *Endocrinology* **126**, 908-913
53. Isley, W. L., Underwood, L. E. and Clemmons, D. R. (1983) Dietary components that regulate serum somatomedin-C concentrations in human. *J. Clin. Invest.* **71**, 175-182
 54. Phillips, L. S., Orawski, A. T. and Belosky, D. C. (1978) Somatomedin and nutrition. IV. Regulation of somatomedin activity and growth cartilage activity by quantity and composition of diet in rats. *Endocrinology* **103**, 121-127
 55. Merimee, T. J. and Froesch, E. R. (1982) Insulin-like growth factors in the fed and fasted states. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **55**, 999-1002
 56. Bolze, M. S., Reeves, R. D., Linbeck, F. E. and Elders, M. J. (1985) Influence of selected amino acid deficiencies on somatomedin, growth and glycosaminoglycan metabolism in weanling rats. *J. Nutr.* **115**, 782-787
 57. Clemmons, D. R. and Van Wyk, J. J. (1985) Evidence for a functional role of endogenously produced somatomedin-like peptides in the regulation of DNA synthesis in cultured human fibroblasts and porcine smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* **75**, 1914-1918
 58. Harpar, J. M. M., Soar, J. B. and Buttery, P. J. (1987) Changes in protein metabolism of ovine muscle cultures on treatment with growth hormone, insulin, insulin-like growth factor I or epidermal growth factor. *J. Endocrinol.* **112**, 87-96
 59. Rechler, M. M., Flyklund, L., Nissley, S. P., Hall, K., Podskalny, J. M., Skottner, A. and Moses, A. C. (1978) Purified human somatomedin A and rat multiplication stimulating activity. *Eur. J. Biochem.* **82**, 5-12
 60. Goldstein, R. H., Poliks, C. F., Pilch, P. F., Smith, B. D. and Fine, A. (1989) Stimulation of collagen formation by insulin and insulin-like growth factor I in cultures of human lung fibroblasts. *Endocrinology* **124**, 964-970
 61. Stracke, H., Schultz, A., Moeller, D., Rossol, S. and Schatz, H. (1984) Effect of growth hormone on osteoblasts and demonstration of somatomedin-C / IGF-I in bone organ culture. *Acta Endocrinol.* **107**, 16-24
 62. Adashi, E. Y., Resnick, C. E., Hernandez, E. R., May, J. V., Knecht, M., Svoboda, M. E. and Van Wyk, J. J. (1988) Insulin-like growth factor-I as an amplifier of follicle-stimulating hormone action : Studies on

mechanism(s) and site(s) of action in cultured rat granulosa cells.

Endocrinology **122**, 1583-1591

63. Benahmed, M., Moreta, A. M., Chauvin, M. C. and de Peretti, E. (1987) Somatomedin C / insulin-like growth factor I as a possible intracellular regulator of leydig cell activity. *Mol. Cell. Endocrinol.* **50**, 69-77
64. Takahashi, S. -I., Conti, M. and Van Wyk, J. J. (1990) Thyrotropin potentiation of insulin-like growth factor-I dependent deoxyribonucleic acid synthesis in FRTL-5 cells : Mediation by an autocrine amplification factor(s). *Endocrinology* **126**, 736-745
65. Takahashi, S. -I., Conti, M., Prokop, C., Van Wyk, J. J. and Earp III, S. H. (1991) Thyrotropin and insulin-like growth factor I regulation of tyrosine phosphorylation in FRTL-5 cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 7834-7841
66. Matsumoto, H., Suzuki, N., Shiota, K., Inoue, K., Tsuda, M. and Fujino, M. (1990) Insulin-like growth factor-I stimulates endothelin-3 secretion from rat anterior pituitary cells in primary culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **172**, 661-668
67. Thissen, J. P., Underwood, L. E., Maiter, D., Maes, M., Clemmons, D. R. and Ketelslegers, J. -M. (1991) Failure of insulin-like growth factor-I (IGF-I) infusion to promote growth in protein-restricted rats despite normalization of serum IGF-I concentrations. *Endocrinology* **128**, 885-890
68. Francis, G. L., McNamara, P. J., Filsell, O. H. and Ballard, F. J. (1988) Plasma half-lives of native and modified insulin-like growth factor-I in lambs. *J. Endocrinol.* **117**, 183-189
69. Francis, G. L., McMurtry, J. P., Johnson, R. J. and Ballard, F. J. (1989) Plasma clearance of chicken and human insulin-like growth factor-I and their association with circulating binding proteins in chickens. *J. Endocrinol.* **124**, 361-370
70. Tomas, F. M., Knowles, S. E., Owens, P. C., Read, L. C., Chandler, C. S., Gargosky, S. E. and Ballard, F. J. (1990) Effect of full-length and truncated insulin-like growth factor-I on nitrogen balance and muscle protein metabolism in nitrogen-restricted rats. *J. Endocrinol.* **128**, 97-105
71. Tomas, F. M., Knowles, S. E., Owens, P. C., Read, L. C., Chandler, C. S., Gargosky, S. E. and Ballard, F. J. (1991) Increased weight gain,

nitrogen retention and muscle protein synthesis following treatment of diabetic rats with insulin-like growth factor (IGF)-I and des(1-3)IGF-I.

Biochem. J. **276**, 547-554

72. Liu, J. -P., Baker, J., Perkins, A. S., Robertson, E. J. and Efstratiadis, A. (1993) Mice carrying null mutations of the gene encoding insulin-like growth factor I (igf-1) and type 1 IGF receptor (igf1r). *Cell* **75**, 59-72
73. DeChlara, T. M., Efstratiadis, A. and Robertson, E. J. (1990) A growth deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* **345**, 78-80
74. Ballard, J., Baxter, R., Binoux, M., Clemmons, D. R., Drop, S., Hall, K., Hintz, R., Rechler, M., Rutanen, E. and Schwander, J. (1989) On the nomenclature of IGF binding proteins. *Acta Endocrinol.* **121**, 751-752
75. Drop, S. L. S. (1992) Report on the nomenclature of the IGF binding proteins. *Endocrinology* **130**, 1736-1737
76. Brinkman, A., Groffen, C., Kortleve, D. J., Geurts, A., van Kessel and Drop, S. L. S. (1988) Isolation and characterization of a cDNA encoding the low molecular weight insulin-like growth factor binding protein (IBP-1). *EMBO J.* **7**, 2417-2423
77. Julkman, M., Koistinen, R., Aalto-Setälä, K., Seppälä, M., Janne, O. A. and Kontula, K. (1988) Primary structure of human insulin-like growth factor-binding protein / placental protein 12 and tissue-specific expression of its mRNA. *FEBS Lett.* **236**, 295-302
78. Baxter, R. C. and Cowell, C. T. (1987) Diurnal rhythm of growth hormone-independent binding protein for insulin-like growth factors in human plasma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **65**, 432-440
79. Busby, W. H., Snyder, D. K. and Clemmons, D. R. (1988) Radioimmunoassay of a 26,000-dalton plasma insulin-like growth factor-binding protein : Control by nutritional variables. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **67**, 1225-1230
80. Bar, R. S., Clemmons, D. R., Boaes, M., Busby, W. H. and Booth, B. A. (1990) Transcapillary permeability and subendothelial distribution of endothelial and amniotic fluid IGF-binding proteins in rat heart. *Endocrinology* **127**, 1078-1086
81. Brown, A. L., Chiarotti, L. and Orloski, C. C. (1989) Nucleotide sequence and expression of a cDNA clone encoding a fetal rat binding protein for insulin-like growth factors. *J. Biol. Chem.* **264**, 5148-5154

82. Binkert, C., Landwehr, J., Mary, J. -L., Schwander, J. and Heinrich, G. (1989) Cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding a novel insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-2). *EMBO J.* **8**, 2497-2502
83. Margot, J. B., Binkert, C., Mary, J. -L., Landwehr, J., Heinrich, G. and Schwander, J. (1989) A low molecular weight insulin-like growth factor binding protein from rat : cDNA cloning and tissue distribution of its messenger RNA. *Mol. Endocrinol.* **3**, 1053-1060
84. Martin, J. L. and Baxter, R. C. (1986) Insulin-like growth factor-binding protein from human plasma. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.* **261**, 8754-8760
85. Baxter, R. C., Martin, J. L. and Beniac, V. A. (1989) High molecular weight insulin-like growth factor binding protein complex. Purification and properties of the acid-labile subunit from human serum. *J. Biol. Chem.* **264**, 11843-11848
86. Albiston, A. L. and Herrington, A. C. (1990) Cloning and characterization of the growth hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-3) in the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **166**, 892-897
87. Baxter, R. C. and Dai, J. (1994) Purification and characterization of the acid-labile subunit of rat serum insulin-like growth factor binding protein complex. *Endocrinology* **134**, 848-852
88. Baxter, R. C. and Martin, J. L. (1989) Binding proteins for insulin-like growth factors : Structure, regulation and function. *Prog. Growth Factor Res.* **1**, 49-68
89. Davenport, M. L., Clemmons, D. R., Miles, M. V., Camacho-Hubner, C., D'Ercole, A. J. and Underwood, L. E. (1990) Regulation of serum insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF binding proteins during rat pregnancy. *Endocrinology* **127**, 1278-1286
90. Giudice, L.C., Farrell, E. M., Pham, H., Lamson, G. and Rosenfeld, R. G. (1990) Insulin-like growth factor binding proteins in maternal serum throughout gestation and in the puerperium : Effect of a pregnancy-associated serum protease activity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **71**, 806-816
91. Hossenlopp, P., Segovia, B., Lassarre, C., Roghani, M., Bredon, M. and Binoux, M. (1990) Evidence of enzymatic degradation of insulin-like

- growth factor-binding proteins in the 150K complex during pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **71**, 797-805
92. Fielder, P. J., Thordarson, G., Talamantes, F. and Rosenfeld, R. G. (1990) Characterization of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) during gestation in mice : Effects of hypophysectomy and an IGFBP-specific serum protease activity. *Endocrinology* **127**, 2270-2280
 93. Delbe, J., Blat, C., Desauty, G. and Harel, L. (1991) Presence of ID45 (mIGFBP-3) binding sites on chick embryo fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**, 495-501
 94. Moses, A. C., Nissley, S. P. and Cohen, K. L. (1976) Specific binding of a somatomedin-like polypeptide in rat serum depends on growth hormone. *Nature* **263**, 137-140
 95. Grant, M. B., Schmets, I., Russell, B., Harwood, H. J., Silverstein, J. Jr. and Merimee, T. J. (1986) Changes in insulin-like growth factors I and II and their binding protein after a single intramuscular injection of growth hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **63**, 981-984
 96. Clemmons, D. R., Thissen, J. P., Maes, M., Ketelslegers, J. M. and Underwood, L. E. (1989) Insulin-like growth factor-I (IGF-I) infusion into hypophysectomized or protein-deprived rats induces specific IGF-binding proteins in serum.. *Endocrinology* **125**, 2967-2972
 97. Bale, L. K. and Conover, C. A. (1992) Regulation of insulin-like growth factor binding protein-3 messenger ribonucleic acid expression by insulin-like growth factor I. *Endocrinology* **131**, 608-614
 98. Mohan, S., Bautista, C. M., Wergedal, J. and Baylink, D. J. (1989) Isolation of an inhibitory insulin-like growth factor (IGF) binding protein from bone cell-conditioned medium : A potential local regulator of IGF action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 8338-8342
 99. Shimasaki, S., Uchiyama, F., Shimonaka, M. and Ling, N. (1990) Molecular cloning of the cDNAs encoding a novel insulin-like growth factor-binding protein from rat and human. *Mol. Endocrinol.* **4**, 1451-1458
 100. LaTour, D., Mohan, S., Linkhart, T. A., Baylink, D. J. and Strong, D. D. (1990) Inhibitory insulin-like growth factor-binding protein : Cloning, complete sequence, and physiological regulation. *Mol. Endocrinol.* **4**, 1806-1814

101. Gao, L., Ling, N. and Shimasaki, S. (1993) Structure of the rat insulin-like growth factor binding protein-4 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **190**, 1053-1059
102. Ceda, P. G., Fielder, P. J., Henzel, W. J., Louie, A., Donovan, S. M., Hoffman, A. R. and Rosenfeld, R. G. (1991) Differential effects of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-II on the expression of IGF binding proteins (IGFBPs) in a rat neuroblastoma cell line : Isolation and characterization of two forms of IGFBP-4. *Endocrinology* **128**, 2815-2824
103. Fowlkes, J. and Freemark, M. (1992) Evidence for a novel insulin-like growth factor (IGF)-dependent protease regulating IGF-binding protein-4 in dermal fibroblasts. *Endocrinology* **131**, 2071-2076
104. Kiefer, M. C., Masiarz, F. R., Bauer, D. M. and Zapf, J. (1991) Identification and molecular cloning of two new 30-kDa insulin-like growth factor binding proteins isolated from adult human serum. *J. Biol. Chem.* **266**, 9043-9049
105. Shimasaki, S., Shimonaka, M., Zhang, H. -P. and Ling, N. (1991) Identification of five different insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) from adult rat serum and molecular cloning of a novel IGFBP-5 in rat and human. *J. Biol. Chem.* **266**, 10646-10653
106. Zhu, X., Ling, N. and Shimasaki, S. (1993) Cloning of the rat insulin-like growth factor binding protein-5 gene and DNA sequence analysis of its promoter region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **190**, 1045-1052
107. Kiefer, M. C., Ion, R. S., Bauer, D. M. and Zapf, J. (1991) Molecular cloning of a new human insulin-like growth factor binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **176**, 219-225
108. Shimasaki, S., Gao, L., Shimonaka, M. and Ling, N. (1991) Isolation and molecular cloning of insulin-like growth factor-binding protein-6. *Mol Endocrinol.* **5**, 938-948
109. Liu, L., Brinkman, A., Blat, C. and Harel, L. (1991) IGFBP-1, an insulin-like growth factor binding protein, is a cell growth inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **174**, 673-679
110. De Mellow, J. S. M. and Baxter, R. C. (1988) Growth hormone-dependent insulin-like growth factor (IGF) binding protein both inhibits and potentiates IGF-I-stimulated DNA synthesis in human skin

- fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **156**, 199-204
111. Koistinen, R., Itonen, O., Selenius, P. and Seppala, M. (1990) Insulin-like growth factor-binding protein-1 inhibits binding of IGF-I on fetal skin fibroblasts but stimulates their DNA synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**, 408-415
 112. Clemmons, D. R. and Gardner, L. I. (1990) A factor contained in plasma is required for IGF binding protein-1 to potentiate the effect of IGF-I on smooth muscle cell DNA synthesis. *J. Cell. Physiol.* **145**, 129-135
 113. Emiler, C. A. and Schalch, D. S. (1987) Nutritionally-induced changes in hepatic insulin-like growth factor I (IGF-I) gene expression in rats. *Endocrinology* **120**, 832-834
 114. Straus, D. S. and Takemoto, C. D. (1990) Effect of fasting on insulin-like growth factor-I (IGF-I) and growth hormone receptor mRNA levels and IGF-I gene transcription in rat liver. *Mol. Endocrinol.* **4**, 91-100
 115. Straus, D.S. and Takemoto, C. D. (1990) Effect of dietary protein deprivation on insulin-like growth factor (IGF)-I and -II, IGF binding protein-2, and serum albumin gene expression in rat. *Endocrinology* **127**, 1849-1860
 116. Daughaday, W. H., Mariz, I. K. and Blethen, S. L. (1980) Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites : A comparison of radioreceptor and radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol-extracted serum. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **51**, 781-788
 117. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159
 118. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) "*Molecular Cloning : A laboratory manual*, second edition" 7.37-7.57
 119. Kato, H., Takenaka, A., Miura, Y., Nishiyama, M. and Noguchi, T. (1990) Evidence of introduction by molecular cloning of artificial inverted sequence at 5' terminus of the sense strand of rat insulin-like growth factor-I cDNA. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 2225-2230
 120. Hepler, J. E., Van Wyk, J. J. and Lund, P. K. (1990) Different half-lives of insulin-like growth factor I mRNAs that differ in length of 3' untranslated sequence. *Endocrinology* **127**, 1550-1552

121. American Institute of Nutrition (1977) Report of the AIN Ad Hoc Committee on standards for nutritional Studies. *J. Nutr.* **107**, 1340-1348
122. Takenaka, A., Hirosawa, M., Mori, M., Yamada, S., Miura, Y., Kato, H., Takahashi, S. -I. and Noguchi, T. (1993) Effect of protein nutrition on the mRNA content of insulin-like growth factor-binding protein-1 in liver and kidney of rats. *Brit. J. Nutr.* **69**, 73-82
123. Marzluff, W. F. and Huang, R. C. C. (1984) Transcription of RNA in isolated nuclei. in "*Transcription and Translation*" (eds. Hames, B. D. and Higgins, S. J.) IRL Press, Oxford & Washington, pp89-129
124. Nawa, K., Nakamura, T., Kumatori, A., Noda, C. and Ichihara, A. (1986) Glucocorticoid-dependent expression of the albumin gene in adult rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **261**, 16883-16888
125. Suwanichkul, A., Depaolis, L. A., Lee, P. D. K. and Powell, D. R. (1993) Identification of a promoter element which participates in cAMP-stimulated expression of human insulin-like growth factor-binding protein-1. *J. Biol. Chem.* **268**, 9730-9736
126. Suwanichkul, A., Morris, S. L. and Powell, D. R. (1993) Identification of an insulin-responsive element in the promoter of the human gene for insulin-like growth factor binding protein-1. *J. Biol. Chem.* **268**, 17063-17068
127. Babajko, S., Binoux, M. and Groyer, A. (1993) Characterization of cis-acting element and trans-acting factors involved in the tissue-specific and developmental regulation of IGFBP-1 gene expression. *Growth Regulation* **3**, 17-20
128. Powell, D. R. and Suwanichkul, A. (1993) HNF-1 activates transcription of the human gene for insulin-like growth factor binding protein-1. *DNA Cell Biol.* **12**, 283-289
129. Goswami, R., Lacson, R., Yang, E., Sam, R. and Unterman, T. (1994) Functional analysis of glucocorticoid and insulin response sequences in rat insulin-like growth factor binding protein-1 promoter. *Endocrinology* **134**, 736-743
130. Harel, Z. and Tannenbaum, G. S. (1993) Dietary protein restriction impairs both spontaneous and growth hormone-releasing factor-stimulated growth hormone release in the rat. *Endocrinology* **133**, 1035-1043

131. Kachra, Z., Barash, I., Yannopoulos, C., Khan, M. N., Guyda, H. J. and Posner, B. I. (1991) The differential regulation by glucagon and growth hormone of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding proteins in cultured rat hepatocytes. *Endocrinology* **128**, 1723-1730
132. Norstedt, G. and Moller, C. (1987) Growth hormone induction of insulin-like growth factor I messenger RNA in primary cultures of rat liver cells. *J. Endocrinol.* **115**, 135-139
133. Mathews, L. S., Norstedt, G. and Palmiter, R. D. (1986) Regulation of insulin-like growth factor I gene expression by growth hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 9343-9347
134. Maes, M., Underwood, L. E. and Ketelslegers, J. -M. (1983) Plasma somatomedin-C in fasted and refed rats : close relationship with changes in liver somatogenic but not lactogenic binding sites. *J. Endocrinol.* **97**, 243-251
135. Granner, D. K. and O'Brien (1991) Regulation of transcription by insulin. in " *Molecular Aspects of Cellular Regulation, volume 6, The hormonal control of gene transcription.* " (Cohen, P. and Foulkes, J. G. eds) Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 309-332
136. Jackson, R. J. and Standart, N. (1990) Do the poly(A) tail and 3' untranslated region control mRNA translation? *Cell* **62**, 15-24
137. Christ, B., Heise, T. and Jungermann, K. (1991) Binding of cytosolic protein from cultured rat hepatocytes to the 3'-end of phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA - significance for protein-mediated mRNA stabilization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **177**, 1273-1282
138. Orlowski, C. C., Ooi, G. T. and Rechler, M. M. (1990) Dexamethasone stimulates transcription of the insulin-like growth factor-binding protein-1 gene in H4-II-E rat hepatoma cells. *Mol. Endocrinol.* **4**, 1592-1599
139. Powell, D. R., Suwanichkul, A., Cabbage, M. L., DePaolis, L. A., Snuggs, M. B. and Lee, P. D. K. (1991) Insulin inhibits transcription of the human gene for insulin-like growth factor-binding protein-1. *J. Biol. Chem.* **266**, 18868-18876
140. Seneviratne, C., Luo, J. and Murphy, L. J. (1990) Transcriptional regulation of rat insulin-like growth factor-binding protein-1 expression by growth hormone. *Mol. Endocrinol.* **4**, 1199-1204
141. Straus, D. S., Burke, E. J. and Marten, N. W. (1993) Induction of

- insulin-like growth factor binding protein-1 gene expression in liver of protein restricted rats and rat hepatoma cells limited for a single amino acid. *Endocrinology* **132**, 1090-1100
142. Pao, C. -I., Farmer, P. K., Begovic, S., Villafuerte, B. C., Wu, G. -J., Robertson, D. G. and Phillips, L. S. (1993) Regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding protein 1 gene transcription by hormones and provision of amino acids in rat hepatocytes. *Mol. Endocrinol.* **7**, 1561-1568
 143. Thissen, J. P., Pucilowska, J. B. and Underwood, L. E. (1994) Differential regulation of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein-1 messenger ribonucleic acids by amino acid availability and growth hormone in rat hepatocyte primary culture. *Endocrinology* **134**, 1570-1576
 144. Darlington, G. J. (1987) Liver cell lines. *Methods Enzymol.* **151**, 19-38
 145. Katz, N., Immenschuh, S., Gebracht, U., Eigenbrodt, E., Follmann, W. and Petzinger, E. (1992) Hormone-sensitive carbohydrate metabolism in rat hepatocyte-hepatoma hybrid cells. *Eur. J. Cell Biol.* **57**, 117-123
 146. Guillouzo, A. and Guguen-Guillouzo, C. (1986) "Isolated and cultured hepatocytes" John Libbey Eurotext Ltd. / INSERM, London and Paris
 147. Berry, M. N. and Friend, D. S. (1969) High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. A biochemical and fine structural study. *J. Cell Biol.* **43**, 506-520
 148. Seglen, P. O. (1976) Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol.* (Prescott, D. M. ed.) **13**, 29-83
 149. Kato, H., Takahashi, S. -I., Takenaka, A., Funabiki, R., Noguchi, T. and Naito, H. (1989) Degradation of endogenous proteins and internalized asialofetuin in primary cultured hepatocytes of rats. *Int. J. Biochem.* **21**, 483-495
 150. Phillips, L. S., Goldstein, S. and Pao, C. -I. (1991) Nutrition and somatomedin XXVI: Molecular regulation of IGF-I by insulin in cultured rat hepatocytes. *Diabetes* **40**, 1525-1530
 151. Boni-Schnetzler, M., Schmid, C., Meier, P. J. and Froesch, E. R. (1991) Insulin regulates insulin-like growth factor I mRNA in rat hepatocytes. *Am. J. Physiol.* **260**, E846-E851
 152. Johnson, T. R., Blossey, B. K., Denko, C. W. and Ilan, J. (1989)

- Expression of insulin-like growth factor I in cultured rat hepatocytes : Effects of insulin and growth hormone. *Mol. Endocrinol.* **3**, 580-587
153. 中村敏一 (1987) 初代培養肝細胞実験法 (学会出版センター)
 154. Hossenlopp, P., Seurin, D., Segovia-Quinson, B., Hardouin, S. and Binoux, M. (1986) Analysis of serum insulin-like growth factor binding proteins using western blotting : Use of the method for titration of the binding proteins and competitive binding studies. *Anal. Biochem.* **154**, 138-143
 - 154'. Sawada, N., Tomomura, A., Sattler, C. A., Sattler, G. L., Kleinman, H. K. and Pitot, H. C. (1986) Extracellular matrix components influence DNA synthesis of rat hepatocytes in primary culture. *Exp. Cell Res.* **167**, 458-470
 155. Dipersio, C. M., Jackson, D. A. and Zaret, K. S. (1991) The extracellular matrix coordinately modulates liver transcription factors and hepatocyte morphology. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 4405-4414
 156. Enat, R., Jefferson, D. M., Ruiz-Opazo, N., Gatmaitan, Z., Leinwand, L. A. and Reid, L. M. (1984) Hepatocyte proliferation *in vitro* : Its dependence on the use of serum-free hormonally defined medium and substrata of extracellular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1411-1415
 157. Koide, N., Shinji, T., Tanabe, T., Asano, K., Kawaguchi, M., Sakaguchi, K., Koide, Y., Mori, M. and Tsuji, T. (1989) Continued high albumin production by multicellular spheroids of adult rat hepatocytes formed in the presence of liver-derived proteoglycans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **161**, 385-391
 158. Asano, K., Koide, N. and Tsuji, T. (1989) Ultrastructure of multicellular spheroids formed in the primary culture of adult rat hepatocytes. *J. Clin. Electron Microsc.* **22**, 243-252
 159. Koide, N., Sakaguchi, K., Koide, Y., Asano, K., Kawaguchi, M., Matsushima, H., Takenami, T., Shinji, T., Mori, M. and Tsuji, T. (1990) Formation of multicellular spheroids composed of adult rat hepatocytes in dishes with positively charged surfaces and under other nonadherent environments. *Exp. Cell Res.* **186**, 227-235
 160. Takenaka, A., Miura, Y., Mori, M., Hirose, M., Kato, H. and Noguchi, T. (1991) Distribution of messenger RNAs of insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins-1 and -3 between parenchymal and non-

- parenchymal cells in rat liver. *Agric. Biol. Chem.* **55**, 1191-1193
161. Boni-Schnetzler, M., Schmid, C., Mary, J. -L., Zimmerli, B., Meier, P. J., Zapf, J., Schwander, J. and Froesch, E. R. (1990) Insulin regulates the expression of the insulin-like growth factor binding protein 2 mRNA in rat hepatocytes. *Mol. Endocrinol.* **4**, 1320-1326
162. Jones, J. I., D'Ercole, A. J., Camacho-Hubner, C. and Clemmons, D. R. (1991) Phosphorylation of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein 1 in cell culture and *in vivo*: Effects on affinity for IGF-I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7481-7485
163. Frost, R. A. and Tseng, L. (1991) Insulin-like growth factor-binding protein-1 is phosphorylated by cultured human endometrial stromal cells and multiple protein kinases *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **266**, 18082-18088
164. Daughaday, W. H., Phillips, L. S. and Mueller, M. C. (1976) The effects of insulin and growth hormone on the release of somatomedin by the isolated rat liver. *Endocrinology* **98**, 1214-1219
165. Scott, C. D., Martin, J. L. and Baxter, R. C. (1985) Rat hepatocyte insulin-like growth factor I and binding protein: Effect of growth hormone *in vitro* and *in vivo*. *Endocrinology* **116**, 1102-1107
166. Binoux, M., Lassarre, C. and Hardouin, N. (1982) Somatomedin production by rat liver in organ culture III. Studies on the release of insulin-like growth factor and its carrier protein measured by radioligand assays. Effects of growth hormone, insulin and cortisol. *Acta Endocrinol.* **99**, 422-430
167. Ooi, G. T., Orlowski, C. C., Brown, A. L., Becker, R. E., Unterman, T. G. and Rechler, M. M. (1990) Different tissue distribution and hormonal regulation of messenger RNAs encoding rat insulin-like growth factor-binding proteins-1 and -2. *Mol. Endocrinol.* **4**, 321-328
168. Unterman, T. G., Oehler, D. T. and Becker, R. E. (1989) Identification of a type 1 insulin-like growth factor binding protein (IGF BP) in serum from rats with diabetes mellitus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **163**, 882-887
169. Unterman, T. G., Patel, K., Mahathre, V. K., Rajamohan, G., Oehler, D. T. and Becker, R. E. (1990) Regulation of low molecular weight insulin-like growth factor binding proteins in experimental diabetes mellitus. *Endocrinology* **126**, 2614-2624

170. Boni-Schnetzler, M., Binz, K., Mary, J. -L., Schmid, C., Schwander, J. and Froesch, E. R. (1989) Regulation of hepatic expression of IGF I and fetal IGF binding protein mRNA in streptozotocin-diabetic rats. *FEBS Lett.* **251**, 253-256
171. Orlowski, C. C., Ooi, G. T., Brown, D. R., Yang, Y. W. -H., Tseng, L. Y. -H. and Rechler, M. M. (1991) Insulin rapidly inhibits insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression in H4-II-E rat hepatoma cells. *Mol. Endocrinol.* **5**, 1180-1187
172. Unterman, T. G., Oehler, D. T., Murphy, L. J. and Lacson, R. G. (1991) Multihormonal regulation of insulin-like growth factor-binding protein-1 in rat H4IIE hepatoma cells : The dominant role of insulin. *Endocrinology* **128**, 2693-2701
173. Luo, J., Reid, R. E. and Murphy, L. J. (1990) Dexamethasone increases hepatic insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) mRNA and serum IGFBP-1 concentrations in the rat. *Endocrinology* **127**, 1456-1462
174. Villafuerte, B. C., Goldstein, S., Murphy, L. J. and Phillips, L. S. (1991) Nutrition and somatomedin XXV. Regulation of insulin-like growth factor binding protein 1 in primary cultures of normal rat hepatocytes. *Diabetes* **40**, 837-841
175. Lewitt, M. S. and Baxter, R. C. (1989) Regulation of growth hormone-independent insulin-like growth factor-binding protein (BP-28) in cultured human fetal liver explants. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **69**, 246-252
176. Uchijima, Y., Takenaka, A., Takahashi, S. -I. and Noguchi, T. (1995) Production of insulin-like growth factors and their binding proteins in primary cultures of rat liver parenchymal and nonparenchymal cells. *Agric. Biol. Chem.* **59**, 1503-1515
177. Breier, B. H., Gallaher, B. W. and Gluckman, P. D. (1991) Radioimmunoassay for insulin-like growth factor-I : solutions to some potential problems and pitfalls. *J. Endocrinol.* **128**, 347-357
178. Bang, P., Eriksson, U., Sara, V., Wivall, I. -L. and Hall, K. (1991) Comparison of acid ethanol extraction and acid gel filtration prior to IGF-I and IGF-II radioimmunoassays : Improvement of determinations in acid ethanol extracts by the use of truncated IGF-I as radioligand. *Acta Endocrinol.* **124**, 620-629

179. Holland, M. D., Hossner, K. L., Niswender, G. D., Elsasser, T. H. and Odde, K. G. (1988) Validation of a heterologous radioimmunoassay for insulin-like growth factor-I in bovine serum. *J. Endocrinol.* **119**, 281-285
180. 鈴木真吾、橋本香織、浅田孝、中西茂雄、堀合東雄、丹羽峰雄 (1987) Radioimmunoassay (RIA)法による血中IGF-I / somatomedin-Cの測定 *ホルモンと臨床* **35**, 853-858
181. Johnson, T. R., Trojan, J., Rudin, S. D., Blossey, B. K., Ilan, J. and Ilan, J. (1991) Effects of actinomycin D and cycloheximide on transcript levels of IGF-I, actin, and albumin in hepatocyte primary cultures treated with growth hormone and insulin. *Mol. Reprod. Dev.* **30**, 95-99
182. 渡瀬裕子 (1992) 東京大学修士論文：諸条件下におけるインスリン様成長因子1及びインスリン様成長因子結合タンパク質遺伝子発現の解析
183. Luo, J. and Murphy, L. J. (1989) Dexamethasone inhibits growth hormone induction of insulin-like growth factor-I (IGF-I) messenger ribonucleic acid (mRNA) in hypophysectomized rats and reduces IGF-I mRNA abundance in the intact rat. *Endocrinology* **125**, 165-171
184. Adamo, M., Werner, H., Farnsworth, W., Roberts, C. T. Jr., Raizada, M. and LeRoith, D. (1988) Dexamethasone reduces steady state insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid levels in rat neuronal and glial cells in primary culture. *Endocrinology* **123**, 2565-2570
185. Botero, L. F., Roberts, C. T. Jr., LeRoith, D., Adashi, E. Y. and Hernandez, E. R. (1993) Insulin-like growth factor I gene expression by primary cultures of ovarian cells: Insulin and dexamethasone dependence. *Endocrinology* **132**, 2703-2708
186. 内島泰信 (1994) 東京大学修士論文：ラット肝臓細胞におけるインスリン様成長因子(IGF)関連タンパク質の合成・分泌の制御に関する研究
187. Goswami, R., Lacson, R., Yang, E., Sam, R. and Unterman, T. (1994) Functional analysis of glucocorticoid and insulin response sequences in the rat insulin-like growth factor-binding protein-1 promoter. *Endocrinology* **134**, 736-743
188. Lewitt, M. S., Saunders, H. and Baxter, R. C. (1992) Regulation of rat Insulin-like growth factor-binding protein-1: The effect of insulin-induced hypoglycemia. *Endocrinology* **131**, 2357-2364
189. Lewitt, M. S. and Baxter, R. C. (1991) Insulin-like growth factor-binding protein-1: A role in glucose counterregulation? *Mol. Cell. Endocrinol.*

190. Lewitt, M. S., Denyer, G. S., Cooney, G. J. and Baxter, R. C. (1991) Insulin-like growth factor-binding protein-1 modulates blood glucose levels. *Endocrinology* **129**, 2254-2256
191. Petersen, D. D., Magnuson, M. A. and Granner, D. K. (1988) Location and characterization of two widely separated glucocorticoid response elements in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 96-104
192. Flyvbjerg, A., Dørup, I., Everts, M. E. and Ørskov, H. (1991) Evidence that potassium deficiency induces growth retardation through reduced circulating levels of growth hormone and insulin-like growth factor I. *Metabolism* **40**, 769-775
193. Yang, Y. W. -H., Pioli, P., Fiorelli, G., Brandi, M. L. and Rechler, M. M. (1993) Cyclic adenosine monophosphate stimulates insulin-like growth factor binding protein-4 and its messenger ribonucleic acid in a clonal endothelial cell line. *Endocrinology* **133**, 343-351
194. Scott, C. D. and Baxter, R. C. (1991) Synthesis of the acid-labile subunit of the growth-hormone-dependent insulin-like-growth-factor-binding protein complex by rat hepatocytes in culture. *Biochem. J.* **275**, 441-446
195. 森正道 (1992) 東京大学修士論文：ラットインスリン様成長因子結合タンパク質-3 合成・分泌調節機構の解析
196. 原田秀幸 (1991) 東京大学修士論文：ラット初代培養肝細胞系における IGF-I 遺伝子発現のアミノ酸による制御
197. McCusker, R. H., Campion, D. R., Jones, K. W. and Clemmons, D. R. (1985) The insulin-like growth factor-binding proteins of porcine serum: Endocrine and nutritional regulation. *Endocrinology* **125**, 501-509
198. Clemmons, D. R. and Underwood, L. E. (1991) Nutritional regulation of IGF-I and IGF binding proteins. *Ann. Rev. Nutr.* **11**, 393-412
199. Murphy, L. J., Seneviratne, C., Moreira, P. and Reid, R. E. (1991) Enhanced expression of insulin-like growth factor-binding protein-1 in the fasted rat: the effects of insulin and growth hormone administration. *Endocrinology* **128**, 689-696
200. Hope, I. A. and Struhl, K. (1986) Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast. *Cell* **46**, 885-894
201. Messenger, I. and Delforge, J. (1976) Role of transfer ribonucleic

- acids in the regulation of several biosyntheses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **67**, 335-339
202. Niederberger, P., Aebi, M. and Huetter, R. (1983) Influence of the general control of amino acid biosynthesis on cell growth and cell viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 2571-2583
 203. Gazzola, G. C., Dall'Asta, V. and Guidotti, G. G. (1981) Adaptive regulation of amino acid transport in cultured human fibroblast. Sites and mechanism of action. *J. Biol. Chem.* **256**, 3191-3198
 204. Kilberg, M. S., Han, H. -P., Barber, E. F. and Chiles, T. C. (1985) Adaptive regulation of neutral amino acid transport system A in rat H4 hepatoma cells. *J. Cell. Physiol.* **122**, 290-298
 205. Bracy, D. S., Handlogten, M. E., Barber, E. F., Han, H. -P. and Kilberg, M. S. (1986) cis-Inhibition, trans-inhibition, and repression of hepatic amino acid transport mediated by system A. Substrate specificity and other properties. *J. Biol. Chem.* **261**, 1514-1520
 206. Shay, N. F., Nick, H. S. and Kilberg, M. S. (1990) Molecular cloning of an amino acid-regulated mRNA (amino acid starvation-induced) in rat hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* **265**, 17844-17848
 207. Hutson, S. M., Stinson-Fisher, C., Shiman, R. and Jefferson, L. S. (1987) Regulation of albumin synthesis by hormones and amino acids in primary cultures of rat hepatocytes. *Am. J. Physiol.* **252**, E291-E298
 208. Everson, W. V., Flaim, K. E., Susco, D. M., Kimball, S. R. and Jefferson, L. S. (1989) Effect of amino acid deprivation on initiation of protein synthesis in rat hepatocytes. *Am. J. Physiol.* **256**, C18-C27
 209. Miura, Y., Kato, H. and Noguchi, T. (1992) Effect of dietary proteins on insulin-like growth factor-I (IGF-I) messenger ribonucleic acid content in rat liver. *Brit. J. Nutr.* **67**, 257-265
 210. Miura, Y., Uchijima, Y., Takahashi, S. -I. and Noguchi, T. (1993) Effect of quantity and nutritional quality of dietary proteins on the transcriptional activity of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-1 genes. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**, 358-359
 211. Miura, Y., Higashi, Y., Kato, H., Takahashi, S. -I. and Noguchi, T. (1992) Effects of dexamethasone on the production of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding proteins in primary

- cultures of rat hepatocytes. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**, 1396-1400
212. Bruno, J. F., Olchovsky, D., White, J. D., Leidy, J. W., Song, J. and Berelowitz, M. (1990) Influence of food deprivation in the rat on hypothalamic expression of growth hormone-releasing factor and somatostatin. *Endocrinology* **127**, 2111-2116
 213. Bruno, J. F., Song, J. and Berelowitz, M. (1991) Regulation of rat hypothalamic preprogrowth hormone-releasing factor messenger ribonucleic acid by dietary protein. *Endocrinology* **129**, 1226-1232
 214. Hayden, J. M., Marten, N. W., Burke, E. J. and Straus, D. S. (1994) The effect of fasting on insulin-like growth factor-I nuclear transcript abundance in rat liver. *Endocrinology* **134**, 760-768
 215. Lin, A. Y. and Lee, A. S. (1984) Induction of two genes by glucose starvation in hamster fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 988-992
 216. Yoshizawa, F., Endo, M., Ide, H., Yagasaki, K. and Funabiki, R. (1995) Translational regulation of protein synthesis in the liver and skeletal muscle of mice in response to refeeding. *J. Nutr. Biochem.* **6**, 130-136
 217. 野口忠、竹中麻子、高橋伸一郎 (1994) "動物のタンパク質栄養におけるインスリン様成長因子 I とその結合タンパク質の役割" *日畜会報* **65**, 152-164
 218. Baxter, R. C. (1991) Insulin-like growth factor (IGF) binding proteins : the role of serum IGFBPs in regulating IGF availability. *Acta Paediatr. Scand. (Suppl.)* **372**, 107-114
 219. Schalch, D. S., Yang, H., Ney, D. M. and DiMarchi, R. D. (1989) Infusion of human insulin-like growth factor I (IGF-I) into malnourished rats reduces hepatic IGF-I mRNA abundance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **160**, 795-800
 220. Guler, H. -P., Zapf, J., Schmid, C. and Froesch, E. R. (1989) Insulin-like growth factors I and II in healthy man. *Acta Endocrinol.* **121**, 753-758



