

ラットインスリン様成長因子I遺伝子の
構造、機能とその発現に関する研究

加藤久典

(1)

ラットインスリン様成長因子 I 遺伝子の
構造、機能とその発現に関する研究

Studies on the Structure, Function
and Expression of Rat Insulin-Like
Growth Factor-I Gene.

加藤久典

| | |
|-----|-----|
| 200 | 200 |
| 201 | 201 |
| 202 | 202 |
| 203 | 203 |
| 204 | 204 |
| 205 | 205 |
| 206 | 206 |
| 207 | 207 |
| 208 | 208 |
| 209 | 209 |
| 210 | 210 |
| 211 | 211 |
| 212 | 212 |
| 213 | 213 |
| 214 | 214 |
| 215 | 215 |
| 216 | 216 |
| 217 | 217 |
| 218 | 218 |
| 219 | 219 |
| 220 | 220 |
| 221 | 221 |
| 222 | 222 |
| 223 | 223 |
| 224 | 224 |
| 225 | 225 |
| 226 | 226 |
| 227 | 227 |
| 228 | 228 |
| 229 | 229 |
| 230 | 230 |
| 231 | 231 |
| 232 | 232 |
| 233 | 233 |
| 234 | 234 |
| 235 | 235 |
| 236 | 236 |
| 237 | 237 |
| 238 | 238 |
| 239 | 239 |
| 240 | 240 |
| 241 | 241 |
| 242 | 242 |
| 243 | 243 |
| 244 | 244 |
| 245 | 245 |
| 246 | 246 |
| 247 | 247 |
| 248 | 248 |
| 249 | 249 |
| 250 | 250 |

目次

| | 頁 |
|-----------------------------|----|
| 序論 | |
| 第1節 動物の成長とホルモンについて | 1 |
| 第2節 本研究の背景 | 3 |
| 第3節 インスリン様成長因子およびその関連分子について | 4 |
| (1) 歴史的背景 | 4 |
| (2) 構造 | 5 |
| (3) 合成とその調節 | 6 |
| (4) レセプター | 8 |
| (5) 結合タンパク質 (BP) | 9 |
| (6) 作用 | 13 |
| 第4節 本論文の構成 | 14 |
| 第1章 ラットIGF-I cDNAのクローニング | |
| 第1節 緒論 | 15 |
| 第2節 ラットIGF-I cDNAの取得と構造解析 | 16 |
| 第3節 ラットIGF-Iの長いmRNAの構造の解析 | 24 |
| 第4節 考察 | 33 |
| 第2章 ラットIGF-I遺伝子の構造の解析 | |
| 第1節 緒論 | 39 |
| 第2節 方法 | 40 |
| 第3節 結果および考察 | 41 |
| (1) コード領域を含むクローン | 41 |
| (2) 5'上流域のクローン | 41 |
| (3) class A cDNAの由来 | 45 |
| (4) ラットIGF-I遺伝子の5'上流域に関する考察 | 50 |

| | |
|---|-----|
| 第3章 5'上流領域の機能の解析 | |
| 第1節 緒論 | 55 |
| 第2節 方法 | 57 |
| 第3節 結果 | 62 |
| (1) class Bおよびclass CのIGF-I mRNAの構造 | 62 |
| (2) 各classのmRNAに対する栄養条件の影響 | 64 |
| (3) 初代培養肝細胞における各classのIGF-I mRNA量に 対するDexamethasoneの影響 | 64 |
| 第4節 考察 | 70 |
| 第4章 大腸菌によるラットIGF-Iの生産 | |
| 第1節 緒論 | 72 |
| 第2節 <i>tac</i> , <i>lac</i> promoterを用いた生産 | 73 |
| (1) cDNAへの位置指定変異の導入 | 73 |
| (2) pIGF <i>tac</i> 1, pIGF <i>lac</i> 2の作成 | 77 |
| (3) pIGF <i>tac</i> 1, pIGF <i>lac</i> 2によるラットIGF-Iの生産 | 81 |
| (4) pIGF <i>lac</i> 3の作成 | 84 |
| (5) pIGF <i>lac</i> 3によるラットIGF-Iの生産 | 86 |
| (6) その他の工夫 | 88 |
| 第3節 <i>phoA</i> ベクターによるラットIGF-Iの分泌生産 | 91 |
| (1) 計画 | 91 |
| (2) 方法 | 94 |
| (3) 結果と考察 | 96 |
| 第4節 4章のまとめと議論 | 98 |
| 第5章 総合討論 | |
| (1) ラットIGF-I遺伝子構造のまとめ | 102 |
| (2) 3'非翻訳領域について | 105 |
| (3) 5'非翻訳領域について | 105 |
| (4) IGF-1分子の多様性 | 107 |

| | |
|--|-----|
| (5) endocrine, auto/paracrineの作用と遺伝子の複雑さ | 107 |
| (6) 他のIGF関連分子との関係 | 108 |
| (7) 総括 | 109 |
| | |
| 要旨 | 110 |
| | |
| 謝辞 | 112 |
| | |
| 参考文献 | 113 |

序論

第1節 動物の成長とホルモンについて

たった一つの授精卵が増殖と分化を続け、誕生という過程を経た後は自らの口から栄養素を補給しながら、各器官が互いに調和を取ってさらに高度の分化機能を獲得しつつ増大して成熟個体となる。哺乳動物において、このような過程の全体、あるいは狭義には出生後の段階を成長と呼ぶ。

成長の過程に影響を及ぼす外的因子には栄養因子、環境因子等が含まれ、一方内的な因子としては遺伝因子あるいはホルモン、レセプターなどの内分泌系が主要な役割を担っている。実際にはこれらの因子が複雑に絡み合って互いに影響を及ぼしながら動物個体の成長を決定している。適切な成長を達成するという過程において、なかでも物質的な基盤となるのが栄養素であり、摂取される各栄養素の量、あるいは質のいずれかが不適切であった場合には健全な成長は望めない。この場合、栄養素という外的因子の情報が内的因子に伝達され、そこで成長の制御が行われているはずである。

種々の栄養素の中で、タンパク質（アミノ酸）は骨や細胞の骨格を形成し、酵素やホルモン、あるいは免疫系の因子その他血中成分の材料を供給するなど動物の成長、さらに維持のために最も重要な栄養素である。実際に食餌中のタンパク質の量が適切でなかったり、その質すなわちアミノ酸バランスが不適当であった場合には動物の成長が著しく阻害されることは良く知られている(1,2)。各アミノ酸が適切に供給されない場合には、生体はその情報を感知し、さらには生体内でその情報を伝達し、各組織あるいは各細胞がその環境を変え、成長という仕事に向けられていた機能を生命の維持に必要なものに切り替えていくことになる。この場合にも、食餌タンパク質の量、あるいは質という情報が、まず何らかの内部の因子、すなわち内分泌系の何かに伝えられるはずである。

それでは内分泌系のどの因子がこのタンパク質栄養という情報の伝達の担い手になっているのか。あるいはどのようにしてその因子に情報が与えられるのか。本論文の研究が行われた東京大学農学部農芸化学科栄養化学研究室（以下、当研究室）では以前よりこれら2点の問題に対して、いくつかのアプローチ

子を試み、本論文の主題となっているインスリン様成長因子 I (IGF-I) に注目し、この物質がタンパク質栄養による成長制御において中心的な役割を担っていることを、数々の実験を基に実証してきた。そのような結論にいたるこれまでの研究の経緯は第 2 節以下で述べる。

IGF-I に関する議論に入る前に、まず動物の成長に関与していると考えられているホルモン因子の代表的なものについて概観してみたい。

成長ホルモン (GH) : 下垂体に存在する成長を促進する物質として、1920 年頃すでに知られていたが、成長におけるその重要性は、下垂体除去の実験、GH 欠損マウスの成長、動物の系統による血中 GH 濃度の違いと成長の早さの関係など多くの現象で確認されており、さらに近年のスーパーマウス作成の成功もこれを裏付けるものであった。GH の作用は直接的な作用と間接的な作用に分類されているが、直接的な作用としてはタンパク質合成の促進、脂肪の動員と分解、血糖値の上昇等が数えられ、一方間接的な作用というのが IGF-I を介した様々な作用であるが、これら直接的作用、間接的作用の区別は現在でもなお明確ではない。特に、後述するように、間接的作用として説明される部分の比重が多くなってきている。

成長ホルモン放出因子 (GRF) とソマトスタチン (SRIF, GIF) : これらは視床下部で合成されるが、その合成も GH や IGF-I によりフィードバック調節を受ける (後述)。

甲状腺ホルモン : 特に骨の成長、成熟に大きな影響を与える。さらに GH の合成を促進することも知られている。

アンドロゲンとエストロゲン : アンドロゲンは強いタンパク質同化作用を持ち、エストロゲンも骨の成長を促進するなど両者とも成長促進作用を持つといわれるが、逆に骨端閉鎖作用を持つなど成長抑制作用も合わせ持ち、その作用は複雑である。

グルココルチコイド : 成長に関してはおもに抑制的に働く。

インスリン : DNA、RNA 合成促進、アミノ酸取り込みやタンパク質合成促進、さらに糖、脂質代謝に対する作用が総合的に成長を促す。

成長と言うのは以上に挙げた因子がすべて関与する複雑な現象である。ここで強調しておきたいのは、IGF-Iによる成長促進という場合にも実際にはこれらの因子の関与を常に念頭におく必要があるということである。本論文中に繰り返し述べられることであるが、IGF-Iはこれらの因子の産生量に影響を及ぼし、またこれらの因子（未知の因子も含む）はIGF-Iの合成やその後の存在状態、作用に影響を与えているのである。IGF-Iを成長制御の主役と捕らえ、徹底的にその性質を追求するという立場と、その他の因子との複雑な関係の中で現象を理解するという立場の両面から研究を進めることによって初めて成長という複雑な生命現象を理解できると考える。

第2節 本研究の背景

適当量の質のよいタンパク質を食べると成長が良く、逆に質や量が不適当であった場合には成長が損なわれる。それはいったいどのような機構によるのであろうか。この単純な疑問が当研究室での一連のIGF-I研究の発端になっている。当然ながらこの疑問の歴史は古く、多くの研究の蓄積がある。しかしながら、この現象を分子レベルで理解できないか、さらに細胞生物学の立場から解明できないかというのが我々の目標である。

古くから個々のアミノ酸あるいはアミノ酸の混合物によるインスリン分泌促進効果が認められており(3,4)、一方インスリンは各アミノ酸の細胞への取り込みやタンパク質合成を促進する(5,6,7)。当研究室宮川はまずインスリンに注目し、ラットをカゼイン食、コーングルテンミール食、グルテン食、これらに制限アミノ酸を補足した食餌、あるいは無タンパク質食で飼育し、動、静脈中のインスリン濃度を測定した(8,9)。血中インスリン濃度は成長速度（体重増加）とある程度の相関がみられたが、日内濃度変化に比べ食餌タンパク質による差は小さく、また成長速度と濃度の順位は必ずしも一致していなかった。

そこで次に新たに栄養との関連が注目されつつあったインスリン様成長因子I（IGF-I）に着目して、その血中レベルを測定したところ、食餌タンパク質の量と質を良く反映し、体重増加と非常に良く相関した。さらに南はこのIGF-

I濃度は各食餌下での全身のタンパク質合成速度と良く相関していることを標識アミノ酸の大量投与法により明らかにし、また尿中酸可溶性ペプチド (ASP) 排泄量とも相関することも確認している(10)。一方、梶川、梅沢らの研究により、血中のIGF-I結合タンパク質 (BP) の量およびIGF-IのBPとの結合状態が、タンパク質栄養により劇的に変化することが明らかとなり、IGF-Iが食餌タンパク質の情報を受け取り、成長を制御する主要な因子であることが判明した(9,11,12)。

次の課題は、血中IGF-I濃度の変化がどのような機構によってもたらされるのかを解明することである。そのためにはラットIGF-Iの合成調節機構を明らかにしなければならず、遺伝子構造の解明、さらにIGF-I mRNA量の変化の測定等が必要になる。本論文第1章のラットIGF-I cDNAの取得は第一にこの目的で行われたものである。得られたcDNAはすでに当研究室三浦による研究で肝臓、および初代培養肝細胞系でのラットIGF-I mRNAの測定、さらには当該遺伝子の転写速度の測定に用いられ、多くの知見を得ている。これらについては次の第3節および第3章で述べる。

第3節 インスリン様成長因子およびその関連分子について

(1) 歴史的背景

インスリン様成長因子の発見の歴史は複数の研究の流れがまとまってきたものである。ここではごく簡単に記述し、その詳細は成書を参照されたい(13, 14)。最も古いものとしては、1957年、硫酸基の軟骨組織への取り込みを促進する物質 (sulfation factor) が、SalmonとDaughadayによってラット血清中に発見されたことに始まる(15)。彼らは、成長ホルモンの作用はこの物質を介して発現されるものとする仮説 (ソマトメジン仮説) を提唱し、この物質をSomatomedinと改名した(16)。また、ヒト血清中に抗インスリン抗体で中和されないインスリン様活性 (non-suppressible insulin-like activity, NSILA) が知られていたが(17)、Froeschらのグループによって精力的な研究が進められた結果NSILAの一部とソマトメジンとは同一の性質を持つことが明らかにされた(18)。

この物質はRinderknechtとHumbelにより一次構造が明らかにされ、2種類の類似した物質がIGF-I, -IIと命名された(19, 20, 21)。牛血清中の細胞増殖因子(Multiplication stimulating activity, MSA) (22)と同様の性質のものがBuffaloラットの肝細胞(BRL-3A)の培養上清中に見いだされ(23)、これを精製したところ、IGF-IIにあたる物質であることが明らかとなっている(24)。このようにIGFに関して多くの名が使われ、混乱した状態にあったが、1987年の呼びかけ以来、IGFという用語に統一する動きが主流となった(25)。しかしソマトメジンという用語もなお一般的に用いられている。ソマトメジンにはSomatomedin A, B, Cの3種が知られていたが、Somatomedin CがIGF-Iと同一の物質である。Somatomedin Aは中性ソマトメジンとして知られていたが、現在ではSomatomedin Cのdeamidated formであることが明らかとなっている(26)。また、Somatomedin Bはトリプシンインヒビターの種類であり、IGFグループには属さないものであるとされている(27)。

(2) 構造

ヒトIGF-IIは70アミノ酸からなる単鎖のペプチドで分子量7649、またIGF-Iは67アミノ酸からなり分子量は7471である。両者の間の相同性は約60%、インスリンとではCペプチド部分を除けば45%である(28)。ラットIGFに関しては1982年RubinらによってGH産生腫瘍であるMtT/WT15を移植したラット血中ソマトメジンを精製し、N末端の一部の配列を報告し、これがラットのIGF-Iであるとしているが(29)、その後ラットIGFを精製したという報告は1989年まで(30)となさず、本論文第1章の研究もラットIGF-Iの構造を明らかにすることを目的の1つとして始められたものである。

ヒトIGF-IのcDNAは1983年Jansenらによってクローニングされ(31)、その後いくつかの報告がなされている。また、ヒトIGF-IIに関してもほぼ時を同じくしてcDNAが得られている(32, 33)。これらの結果からIGFsもインスリンと同じようにプレプロ体として合成され、翻訳後にシグナルペプチドとC末側の部分(E peptide)が切断されて成熟分子になることが示された。その後、Rotweinによって2種のIGF-I cDNAの存在が示され(32)、それらのmRNAからは異なるE peptideをもつIGF-I前駆体が合成されることが明らかとなった。また、これらの

異なるmRNAはヒトIGF-I遺伝子中のexon 4とexon 5がスプライシングの過程でそれぞれ利用されることによって生じることが示され(34)、IGF-I遺伝子の構造の複雑さを示唆するものとなった。現在までにヒトに限らずいくつかの種でIGF-I遺伝子が実に複雑な構造を持っていることが明らかにされてきている。これについては本論文第1章と第2章で論じる。

(3) 合成とその調節

血中IGF-Iのレベルは胎児期、新生児期で低いがその後上昇し、思春期に最高値に達する(35,36)。IGF-IIは胎児期に高く、生後急激に減少する(37,38)。成ラットではIGF-IレベルはIGF-IIの約40倍である。また、IGF-Iの産生量は成長ホルモン(GH)に大きく依存するが、IGF-IIではGHの影響は小さい(39)。これらのことからIGF-IIは胎児期の成長に、IGF-Iは生後の成長におもに寄与していると考えられている。当研究室でIGF-IIではなくIGF-Iに注目したのも以上の理由による。

古くからsulfation factorの大部分が肝臓で生産されていることは示唆されていたが(16)、現在では血中IGF-I(およびIGF-II)の90%以上が肝臓由来であると推定されている。このことは、各臓器中のIGF-Iの定量の結果(40)、肝臓系(41,42)、器官培養(43)、培養肝細胞の実験(44)からも確認されている。しかし肝臓以外の多くの器官でIGF-Iが検出されていること、様々な培養細胞系(後述)で培地にIGF-Iが分泌されていることが明らかになってきたことから、肝臓以外の組織でもIGF-Iは合成されていると認識されてきた。これはその後cDNAのクローニングが行われ、各組織のIGF-I mRNAの定量が可能になったことで確認された。このようなIGF-Iは各組織でautocrineあるいはparacrine的に作用していると推定されている。このことに関する詳細は(6)作用の項で述べる。

多くの組織で合成されてはいるが、IGF-I mRNA量も肝臓中が圧倒的に多く、肝臓が主要生産器官であることは間違いのない。それでは肝臓で特異的に多く産生されるのはどのような機構によるのかという問題が提起されよう。また、肝臓で合成され血中に分泌されるIGF-Iとその他の組織で合成されるIGF-Iとは構造上の違いはあるのか。さらには発達に伴うIGF-IIからIGF-Iへの切り替えはどのようにしてなされるのか。これらの疑問に対する解答は現在まで全くなされて

いない。

IGF-Iの生産がGHに依存していることは、次のような例から明らかになっている。すなわち、下垂体を除去した動物ではIGF-Iレベルが低いこと(45)、これはGH投与によって回復すること、正常なヒトでもGHを注射すると血中IGF-I濃度がさらに上がること(46)、acromegaly患者では血中IGF-Iが高値であること(47)などである。また培養細胞を用いた研究(48)でもこれを裏付ける報告がなされている。IGF-I産生のGH依存性はその後多くの研究者により肝臓、さらにそれ以外の組織においてmRNAレベルでも確認されている(49,50,51,52,53,54,55,56,58,59)。

しかし血中IGF-I濃度はGH以外にも様々な因子によって調節されていることが明らかとなっている。また、様々な疾患は血中IGF-I濃度の変化を伴う(60)。

実験的に作成した糖尿病ラットでは、血中IGF-I濃度は減少しているが、インスリンの投与により回復する(61,62)。これはmRNAレベルの減少としても確認されている(63,64)。さらに肝選流系(41,42,65)や初代培養肝細胞(54,66,67,68)でも同様のインスリン依存性の現象が観察されている。In vivoで、GHの肝臓への結合は糖尿病の影響を受けていないので、post-receptorの段階でGHに応答できなくなっていると説明されている(62)。また三浦は、初代培養肝細胞でのインスリンの効果はIGF-IのmRNAの安定性を増しているためと結論している。

インスリン以外にIGF-Iの合成に影響を与える因子としては、甲状腺ホルモン(42,69)、上皮成長因子(EGF)(67)、糖質コルチコイド(後述)、性ホルモン(70)等が報告されている。さらにlocalに生産されてautocrine/paracrine的に作用するIGF-Iの合成に関しては、その細胞に特異的に作用する因子が促進的に働く例がいくつか報告されている(71,72,73,74)。

糖質コルチコイドに関してはDexamethason (Dex)を用いた多くの報告がある。三浦は初代培養肝細胞において、DexがIGF-Iの分泌量を増加させるが、同時にmRNA量を減少させるという結果を得ている(68)。DexによるmRNAの減少は初代培養肝細胞以外にも、脳の細胞の培養系(75)でも得られ、さらにin vivoでも各組織で観察されている(76)。これについては第3章でさらに論ずる。

栄養状態と血中IGF-I濃度の関係についても多くの報告がある。ここでは主なものを列挙しておくにとどめる。絶食、再給餌やカロリー摂取量との関係(7

7,78,79)、食餌タンパク質の量あるいはアミノ酸の影響(80,81,82,83,84)、これら両者についての検討(85,86,87,88,89)など数多いが、これらは栄養条件がGHに勝るとも劣らないIGF-I生産の主要な因子であることを示している。さらに食餌タンパク質やエネルギーはGHやインスリンとは独立して血中IGF-I量を制御していると考えられている(82)。さらに絶食はIGF-I mRNAを減少させ、さらに再給餌によって速やかに増加することが報告されている(90,91)。食餌タンパク質とIGF-I mRNAの関係については、三浦が検討しており、無タンパク質食やグルテン食でカゼイン食に比べてmRNAが減少し、nuclear run-off assayの結果よりこれらはmRNAの安定性の減少によるものと結論している(68,92)。

(4) レセプター

現在IGFレセプターには、Type I とType IIの2種が知られている。Type I レセプターはIGF-I>IGF-II>insulinの順にaffinityが高い。一方Type II レセプターはIGF-II>IGF-I でinsulinはほとんど結合しない。さらにinsulin レセプターに関してはinsulin>IGF-I>IGF-IIとなっている(93)。このようなことから、Type IレセプターをIGF-Iレセプター、Type IIレセプターをIGF-IIレセプターと呼ぶことも多くなっており、本論文中でもそちらの用語を用いることにする。

IGF-I、IGF-II各々のレセプターについてごく簡単にまとめておく。詳細は以下の成書や総説等を参照されたい(14,94,95)。またこれらのレセプターでのsignal transductionに関しては最近の総説にまとまっている(96,97)。

IGF-Iレセプターの構造はインスリンレセプターと非常に良く似ている。電気泳動を用いた構造の解析でも、cDNAクローニングから導かれた結果でもインスリンレセプターの持つ特徴をすべて備えているといっても過言ではないほどである。すなわち、リガンドと結合する α -サブユニット(130kD)と、チロシンキナーゼ活性を持つ β -サブユニット(92~98kD)(98)の各々2個ずつがジスルフィド結合したものであるとされている(99,100)。 β -サブユニットは細胞膜を貫通している(101)。ヒトIGF-IレセプターのcDNAの構造(102)およびラットIGF-I cDNAの一部が報告されているが、インスリンレセプターの場合(103,104)と同様 α と β のサブユニットが繋がった前駆体タンパク質として合成されることが明らかとなった。

IGF-IIレセプターは分子量250kDのモノマーであるが、cDNAクローニングの結果、このレセプターはcation-independent mannose-6-phosphate receptor (M6P receptor)と同一分子であることが判明した(105,106)。M6Pレセプターはlysosome酵素のlysosomeへのsortingを担っている分子であるが、IGF-IIとlysosome酵素のM6P残基とはこのレセプター分子中の異なる部位を認識しているとされている(107)。この事実がどのような意義を持っているかは全く明らかにされていない。加えて、IGF-IIレセプターが実際にIGF-IIの信号を細胞内に伝える機能を持っているかどうかについても議論が分かれている現状である(96,108)。さらに血液中にIGF-IIレセプターの切断された形のもが存在することも明らかとなっている(109)、これの意味もわかっていない。

以上述べた2種のレセプターの他にType IIIレセプターの様なものも存在も示唆されている(110)。また、IGF-Iレセプターとインスリンレセプターのhybrid型のレセプターの存在も示されてきて(111)、レセプターに関する知見は混沌としてきている。さらにレセプターの機能を論ずる上での最大の問題点は、各レセプターに対するIGF-I、IGF-II、インスリンのcross reactivityであろう。各々の分子が細胞に作用を及ぼすとき、それがどのレセプターを介しているかを十分吟味しなければ誤った結論を導くことになる。

(5) 結合タンパク質 (BP)

古くから血中IGF活性がIGFの分子量よりも大きなところに現れていることは指摘されていた(112)。血漿をゲル濾過した画分のIGF活性の測定や、 ^{125}I -IGFをin vivoあるいはin vitroで血清に添加する実験などによって、血液中のIGFは150kDおよび30-40kDの2種のBPに結合して存在することが明らかにされた(113)。これらのBPはそれぞれLarge BP, Small BPと呼ばれるようになった。当研究室でも宮川(8)、梶川(12)によりこれら各々のBPへのIGF-Iの結合状態がタンパク質栄養により劇的に変化することが明らかとなった。

さらにその後リガンドクロスリンク法、リガンドウエスタンブロットティング法などの手法が導入され、Small BPには数種類の分子種が含まれること、Large, Small以外の分子量に当たるところにもBPが存在することなどが明らかとなり、混乱を極めてきた(114,115,116,117)。

一方で、BPを精製し構造を決定する試みも進められたが、こちらも数多くの材料から多くの種類のBPが得られている。ここでは代表的な少数の例のみ挙げてみる。羊水中にはIGFとそのBPが豊富に存在していることが示されていたが、いくつかのグループによりここからSmall BPに属するBPが精製された(118, 119, 120)。胎盤から(121)、あるいはまた培養肝癌細胞からもこれと同一と考えられるBPが得られている(122)。また、ラットBRL-3A細胞(123)、牛 kidney cell line(114)から得られたBPは羊水のものとは別種であることが示された。以上のBPはこのように血中以外の材料から精製され、その後抗体を用いた検討から血中に存在するものと同一であることが確認されたものである。

Large BPに関してはヒト血中から精製が進められた。Large BP complexは酸安定性のサブユニットと酸に不安定なサブユニットから成ることが指摘されていたが(125)、まず酸安定性サブユニット (ASS or BP-53) が精製され(126)、続いて酸不安定性サブユニット (ALS) も得られている(127)。IGFとはASSが結合し、その複合体にALSが結合することによって150K complexが形成されることが、再構成実験等により明らかとなっている(128)。

以上のように多くの種のBPが報告されたが、用語の統一の動きは1989年に為された(129)。すなわち、羊水BPが属する一連のグループをIGFBP-1、BRL-3A BPなどをIGFBP-2、Large complexのBPをIGFBP-3と呼称するようになった。リガンドクロスリンク法やウエスタンリガンドブロットング法でさらに多くのBPが検出されるのは糖鎖の結合の状態の差異で説明されている(116, 117)。しかしさらに別な種のBPの存在もなお示唆されている(130)。

上記の新しい方法が利用できるようになったことに加えて、精製されたBPからそれぞれに対する抗体が得られたことで各BPの定量が可能になり、各BPの生産調節に関する研究も進められた。要約すると、血中BP-3はIGF-Iと同様に生後上昇を続け、さらにGHに依存する(131, 132)、BP-1は日内変動が大きく(133)、絶食や糖尿病で大きく増加する(134)、BP-2は胎児期に多く、その後減少すること(135)などである。当研究室梅沢はタンパク質栄養と各BP量、あるいは各BPのIGF-Iによる飽和度の関係について詳細な検討を加えた(11)。

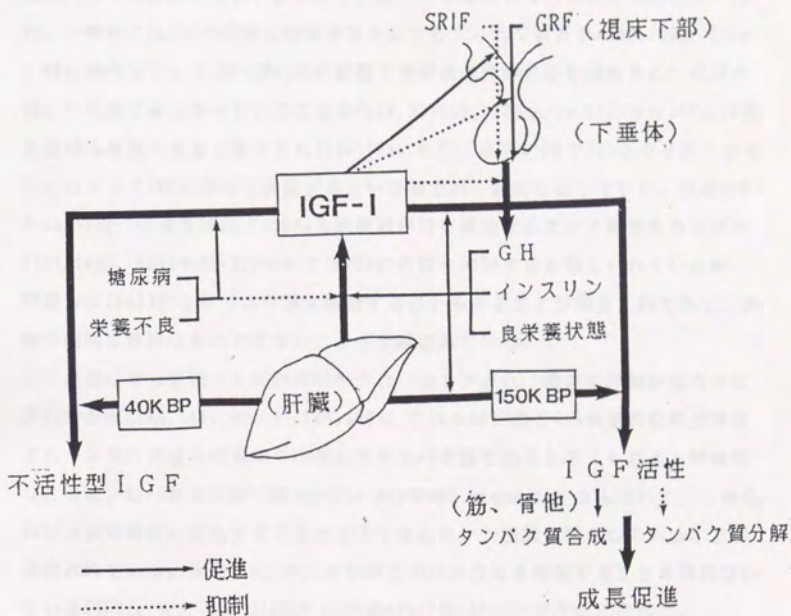


Fig. 0-1 IGF-1の内分泌型の成長促進作用とIGFBP

一方、IGFBPの存在意義または機能に関しては、現在なお不明瞭である。古くから、血中でのIGFの安定性を増して寿命を調節しているという説(136)、IGFの過剰な作用から生体を守るという説(137)などが提唱されてきた。IGF-I血中濃度の日内変動が小さいこともBPとの結合に影響されているのかも知れない(57)。一般的にはIGFの作用を抑制するものと考えられていたが(138,139)、Large BPに結合しているIGF-Iが、GHの影響下や栄養条件の良好な場合など”成長が良い”状態で多くなっていることから(8,12,131,132)Large BPの方はIGFの作用を助ける機能があると考えられ(140)(Fig.0-1)、各BPの間でIGFをやり取りすることによってIGFの作用を調節するという概念が一般的になってきた。実際にBP-53がIGF-Iの培養細胞でのDNA合成促進作用を増強するという報告も為された(141,142)。BP-1やBP-2についてはIGFの作用を抑制すると信じられていたが、精製方法(143)によっては作用を増強することもあることが報告されてきて、実際の機構は単純なものではないことが示唆されている。

最近になって様々なBPのcDNAがクローニングされ、構造の詳細が明らかにされてきた(144,145,146,147,148,149)。これらは17個のCys残基の位置が保存されており、共通の祖先から由来したタンパク質であると考えられる。特徴的なことは、BP-1およびBP-2はArg-Gly-AspのRGD sequenceを含んでいて、これらのBPは細胞表面に結合することによってなんらかの機能を果たしていることが示唆されている。実際にRGDペプチドがこのBPの作用を抑制することも確認されている(150)。また、BP-3にはN-glycosylation siteの存在が示された。

以上挙げてきたIGFBPとの関係は明らかではないが、血中にソマトメジニンヒンビターというタンパク質の存在も示されている(151)。これは絶食、糖尿病などの場合に血中に現れてくる物質で、約3.2kDのものと1kDのものが知られているが、これらはIGFの作用をmodifyするだけでなく単独でも細胞に作用を及ぼす点で、上記のBPとは異なると思われる(152)。

さらに、前述の血中の遊離のIGF-IIレセプターもBPとしての挙動を示すので注意が必要である。

IGFBPについては最近多くの総説や成書がでているので詳細はそちらを参照されたい(11,94,153,154,155)。

(6) 作用

現在までに知られているIGFの作用は実に広範なものになっている(156)。当初考えられていたようなGHの成長促進作用の仲介や、単なるインスリン様作用に留まらない。先に述べたようにIGF-Iは肝臓のみならず、多くの組織、細胞で合成されていることが明らかとなっている。これらのIGF-Iは、autocrine, paracrine的に自己の細胞、あるいは近傍の細胞に作用してそれらの増殖や、分化機能の発現を促進していることが、培養細胞系等を用いた多くの例から明らかとなってきた(71, 73, 74, 157, 158, 159)。さらに各々の組織ではBPも生産されておりこれがIGFの作用をlocalに修飾しているという機構が提唱されている(150)。

ただし血中のIGF-Iが骨や筋肉に作用して成長を惹起するという作用は最も重要なものといって良いだろう。In vivoで実際に成長促進作用をするという証拠は、下垂体除去ラットや糖尿病ラット、あるいはGH欠損マウスに天然型あるいは組み換え型IGF-Iを注射した結果(61, 160, 161, 162, 163)、あるいはヒトIGF-Iを高発現させたtransgenic mouse(164)から得られている。

現在までに知られているIGFの作用を列挙してみる。脂肪組織その他におけるインスリン様作用(165)、筋細胞でのDNA合成やタンパク質合成の促進およびタンパク質分解の抑制(158, 166, 167, 168, 169)、繊維芽細胞の増殖の促進(170)、軟骨への硫酸の取り込みの促進(15)、骨芽細胞の増殖やアルカリフォスファターゼ活性の誘導(171)、甲状腺の増殖およびTSHの作用の増強(172)、卵巣顆粒膜細胞でのプロジェステロン産生やアロマターゼ活性などに関するFSHの作用の増強(173)、精巣ライディヒ細胞でのLHによるアンドロジェン産生の促進(174)、 δ -クリスタリンの合成など目のレンズの細胞の分化促進(175)、神経膠細胞の発達の促進(176)、赤血球系細胞の分化においてCFU-Eの分化を促進(177)、乳腺の発達やカゼイン等の合成促進(178, 179)。これ以外にもさらに多くの作用が見いだされて行くと思われる。

これらの多種多様なIGFの作用は、動物の各々の細胞が正しく機能するためにIGFが重要な"housekeeping role"を担っているということを示唆している。IGFの生体内での意義を知るにはIGF欠損症やモデル動物を利用するのが一つの

方法である。しかし現在までのところIGF-IIの対立遺伝子のうち一つを失わせただけで小型のマウスが生まれるという報告が一つあるのみである(180)。これはIGFを欠損した動物は生存できないという可能性を示唆している。加えて先に述べたIGFのもつ多種多様な作用とを考え合わせるとIGFは諸々の生命現象の根元に関わる重要なホルモンであると言え、このホルモンの構造や遺伝子、さらに合成調節機構を理解することによって動物の複雑な生命を発達させ維持する機構の本質に迫ることができると信じる。

第4節 本論文の構成

第1章では、ラットIGF-Iの構造を明らかにし、さらに遺伝子の構造を知る第一歩として、ラットIGF-I cDNAのクローニングを行った。また、ラットIGF-IのmRNAには異常に長い分子種のも存在することが明らかになったので、これらの構造を知る目的で、cDNAライブラリーやプローブを変えることによって別のタイプのいくつかのcDNAを得た結果を示した。

第2章では、ラットIGF-Iの遺伝子の構造を探るためにゲノムクローンを得た結果を示す。特に5'上流側の構造が複雑であることが判明したので議論を加えた。

同遺伝子の転写は、大きく分けて2つの異なる領域から始まっていることが示されたので、これらの複数の領域の存在がいかなる意義を持っているかを明らかにするため、第3章ではNorthern blotting 解析を行って肝臓や初代培養肝細胞における同遺伝子の発現調節機構を探った。

第4章では、第1章で得られたcDNAを材料としてこれに改変を加え、ラットIGF-Iを大腸菌によって生産することを試みた。細胞質内に蓄積させる方法と、ペリプラズム空間に分泌させる方法について実行してみた。

第1章 ラットIGF-I cDNAの クローニング

第1節 緒論

本研究の始めとしてラットIGF-IのcDNAのクローニングを試みたが、これは以下の目的において行ったものである。

1. ラットIGF-Iの構造は未知であったため、cDNAからそのアミノ酸配列を推定し、ヒトIGF-Iと比較する。現在まで当研究室でラット血中IGF-I濃度の定量には、ヒトIGF-I定量用のラジオイムノアッセイキットを用いてきたが(8,68)この方法の妥当性をアミノ酸配列の相同性より検討する。
2. 得られたcDNAをプローブに用いてラットの各臓器でのIGF-IのmRNAの発現量や、その栄養およびホルモンによる調節を検討する(68)。
3. 得られたcDNAをプローブに用いて、ラットゲノムのライブラリーからラットIGF-I遺伝子をクローニングし、遺伝子発現の調節機構等について解析する(2章)。
4. cDNAを適当な発現ベクターに組み込み、大腸菌で発現させ、ラットIGF-I分子を得る。(4章)。

本研究を開始した当時、ヒトIGF-Iに関しては既にcDNAがクローニングされていたが(31,33,36)、ラットIGF-Iに関しては、ラットソマトメジンCとしてN末端の1部の構造が示されていたに過ぎない(29)。報告されていた分子量、pIともヒトIGF-Iのそれとは大きく異なっており、果して報告されていたラットソマトメジンCをラットのIGF-Iと見なして良いかどうか不明であった。しかしながら、N末端の配列はヒトのものと非常に相同性の高いものであったので、そのなかから特に一致度の大きい部分を選び、その部分に当たるヒトIGF-I cDNAの配列を基にプローブを合成することにした。また、cDNAライブラリーは成ラット肝臓のものを用いた。これは、ラット等を用いた研究により、肝臓がIGF-Iの主な生産器官であると考えられていること(40,45)、ヒトでは肝

臓にIGF-I mRNAが豊富に存在していることが確認されていて(32)、実際に肝臓のライブラリーからcDNAが得られていること(31)、さらに血中IGF-Iは誕生直後ではまだ低レベルであるが、その後年齢と共に上昇すること(35,36)などから選んだものである。

第2節 ラットIGF-IcDNAの取得と構造解析

1-2-1. 方法

基本的な手法およびバッファーの組成等は、実験書(181)に従った。

(1) プロープの選択

Fig.1-1にRubinら(29)によって報告されているラットソマトメジンCのN末端のアミノ酸配列およびJansenら(31)によるヒトIGF-I cDNAから推定したN末端部分の配列を比較した。このなかで10番のLeuと23番のPheの間はよく一致している上、この部分の配列はRotweinがhuman IGF-I cDNAを得る際に利用しているため、同じプロープを用いることによって、hybridizationや洗浄の条件の参考にできるという利点がある。そこでこの部分のhuman IGF-Iのanti-senseの塩基配列をプロープとして利用することにした。すなわち、5' AAA GCC CCT GTC TCC ACA CAC GAA CTG AAG AGC ATC CAC CAG 3'をBeckman System 1 Plus DNA Synthesizerにより合成した。

(2) プロープの精製

合成したDNAの精製は以下のように行った。ガラス器具はシリコナイズしたものをを用いた。

ゲルを真空ポンプにより乾燥後、35% NH₄OH 1.5mlを加え、室温で2時間インキュベーションし、DNAを固定相からはずす。さらにゲルを1.5ml 35% NH₄OHで洗浄した後、洗浄と先の上清を合わせて、これを55°C24時間インキュベーションして脱保護した。エバポレーションによって乾固した後、TE 300μlに溶解

| | | | |
|-----------------|--|---------------------------|----|
| RAT SOMATOMEDIN | 5 | 10 | 15 |
| HUMAN IGF-I | 5 | 10 | 15 |
| PROBE | 5 | 10 | 15 |
| | GLY-PRO-GLU-THR-LEU-CYS-GLY-ALA-GLU-LEU-VAL-ASP-ALA-LEU-GLN- | | |
| | *** *** *** *** *** *** *** *** *** *** *** *** *** *** | | |
| | | 3'GAC CAC CTA CGA GAA GTC | |
| | | | |
| RAT SOMATOMEDIN | 20 | 25 | |
| HUMAN IGF-I | 20 | 25 | |
| PROBE | 20 | 25 | |
| | PHE-VAL (CYS)GLY- X - X -GLY-PHE-TYR-PHE-ASN-LYS- X (THR) | | |
| | *** *** *** *** ASP ARG *** *** *** *** *** *** PRO *** | | |
| | AAG CAC ACA CCT CTG TCC CCG AAA 5' | | |

Fig. 1-1 ラットソマトメジン(29)とヒトIGF-I(31)のN末端部分のアミノ酸配列の比較。

★は両者で一致しているアミノ酸。スクリーニングに使用したプローブの塩基配列も示した。

した。これをさらに16%ポリアクリルアミドゲルを用いた精製を行った。目的とするDNAをゲルごと切り出し、ゲルを粉砕後、DNA抽出用バッファー（0.5M 酢酸アンモニウム、1mM EDTA）で1昼夜室温でDNAを抽出した。グラスウールを用いた濾過によりゲル片を除き、エタノール沈澱を行った後、100 μ lのTEに溶解した。

(3) T4 polynucleotide kinaseによるプローブの5'末端の標識

25pmolの合成DNA、50 unitsのT4 polynucleotide kinase(TAKARA)、9.25M Bqの γ - 32 P-ATP (222TBq/mmol, New England Nuclear) および1/10 volの10 \times kinase用バッファー（0.5M Tris-HCl, 100mM MgCl₂, 100 mMメルカプトエタノール）を37°Cで1時間インキュベートし、その後65°C10分間加熱して反応を止めた。TEで平衡化したSephadex G50 column(superfine, 0.5x15cm)に反応液を移し、TEで溶出して未反応のATPを分離した。

(4) cDNAライブラリー

Adultラット肝臓cDNAライブラリーはClontech社（発売元TOYOBO）より供給されているものを用いた。

購入したライブラリーのProfileは以下の通りである。Source: Normal adult female Sprague-Dawley liver, Vector: λ gt11, Independent clones: 6.8 \times 10⁵, Insert size: 0.34~3.4(average 1.1)kb. 同ライブラリーの調製方法は、Huynhら(182)の記述に従ったものである。

(5) ブラークハイブリダイゼーション

常法(181)およびcDNAライブラリーに添付されていたプロトコールに従った。宿主にはE.coli Y1090を用いた。

150mm ϕ のプレートを用いて、1枚につき1 \times 10⁴程度のブラークを形成させた。ニトロセルロースフィルターはSchleicher & Schuel社(BA85、132mm ϕ)のものを用いた。

Hybridizationは、oligonucleotide probeを用いた場合は、5 \times SSC/50mM Na phosphate, pH6.8/30% deionized formamide/denatured salmon sperm DNA(

50 μ g/ml)/5xDenhart's solutionで、42°Cで1晩行った。その後、0.2×SSC、0.1%SDSで室温で15分間2回洗浄を行った。

cDNAをprobeにした場合は、50% deionized formamide/5xDenhardt's solution/5xSSPE/0.1% SDS/denatured salmon sperm DNA(100 μ g/ml)でprehybridizationを42°C 5hr.行った後、hybridizationを42°C一晩行った(hybridization液はprehybridization液に5分間煮沸したprobeを加えたもの)。その後、2xSSC, 0.1% SDSで室温で5min. 3回洗浄し、さらに1xSSC, 0.1% SDS, 68°C 1hr.で2回洗浄を行った。オートラジオグラフィはFuji X線フィルムHRHで、増感紙を用いて3日間露光した。

(6) ファージDNAの増幅

得られた入ファージのクローンは必要に応じて、Plate Lysate Method(181, p371)あるいはLarge Scale Preparation (181, p77)によって、宿主にはE. coli LE392を用い、NZCYM培地を用いて増幅を行った。CsClによる密度勾配遠心の段階は、Hitachi 13PA tubeを用いて、Hitachi RPS-40Tのローターで22000rpm、2hrで行った。常法に従ってphenol抽出等により、ファージDNAを得た。

(7) 塩基配列の決定

クローニングサイトの酵素であるEcoRIでcDNAインサートを切り出し、これをM13 mp19にクローニングし、M13 sequence kit (Takara)、あるいはSequenaseTM (USB Corp., TOYOBO)を用いて、dideoxy法によって塩基配列を決定した。

1-2-2 結果

(1) pIGFI/1

2×10⁵個のクローンを検索した結果、約670bpのインサートを含むクローンを得、これをpYEJ001にサブクローニングした。Fig.1-2に得られたクローンpIGF-1/1の全塩基配列および推定されたアミノ酸配列を示す。Fig.1-3にはFig.1-2の結果をヒトIGF-Iのものと比較したものを示す。Fig.1-2, 1-3とも実線で囲んだ部分は成熟IGF-I分子をコードする領域である。両末端の5'GAATTCG3'は

GAATTCCGGTGGAAATGTTACTGTTGGTATTTCATTTGAGTGGGAAATGGCCAGTCTGTTG CCTGGTGTGTAAACGACCCGGGACGTTACCAAAAATGAGCGCACCTCCA
 MetSerAlaLeuPro
 ATAAGATACACATATGTCGCTTTCACATCTCTTACCTGGCACTCTGCTTGTCTCACCTTTACCAAGCTGGCCACAGCCGGACCCAGAGACCCCT
 IleLysIleHisIleMetSerSerHisLeuPheTyrLeuAlaLeuCysLeuLeuThrPheThrSerSerAlaThrAlaGlyProGluThrLe
 -22 -20 -10 1
 TTGGGGCTGAGCTGGTGGACGGCTTTCAGTTGCTGTGGACCAAGGGCTTTTACTTCAAGAAGCCACAGGCTATGGCTCCAGCATTGGGA
 uCysGlyAlaGluLeuValAspAlaLeuGlnPheValCysGlyProArgGlyPheTyrPheAsnLysProThrGlyTyrGlySerSerIleArgA
 10 20 30
 GGGCACACAGACGGGCATTGTGGATGAGTGTGCTCCGGAGCTGTGATCTGAGGAGGCTGGAGATGTAAGTGTGCTGGTCCAAAGCCTACAAAG
 rGalaProGlnThrGlyIleValAspGluCysCysPheArgSerCysAspLeuArgArgLeuGluMetTyrCysValArgCysLysProThrLys
 40 50 60
 TCAGCTCTCCATCCGGGCCAGCCGACACTGACATGGCCCAAGACTCAGAAAGGAAGTACACTTTGAAGAACACAAAGTAGAGGAAGTGCAGGAAA
 SerAlaArgSerIleArgAlaGlnArgHisThrAspMetProLysThrGlnLysGluValHisLeuLysAsnThrSerArgGlySerAlaGlyAs
 70 80 90 100
 CAAGACCTACAGAAATGTAGGAGGAGCCTCCCGAGGAAACAGAAAATGCCACGTCACCCGAAGATCCTTTGGCTTGAGCAACCTGCAAAAACATCG
 nLysThrTyrArgMetEnd
 GAACACCTGCCAAAATATCAATAATGATTCATACCAATTCAGAGATGGGCATTTCCCTCAATGAAATGACAAAGTAAACATTCGGAA
 CCGGAATTC

Fig. 1-2 得られたラットIGF-I cDNAクローン (pIGFI/1) の塩基配列と推定されるアミノ酸配列

枠内は成熟IGF-Iをコードする部分。5'端と3'端の影をつけた部分は互いにinverted repeatの構造を成している。

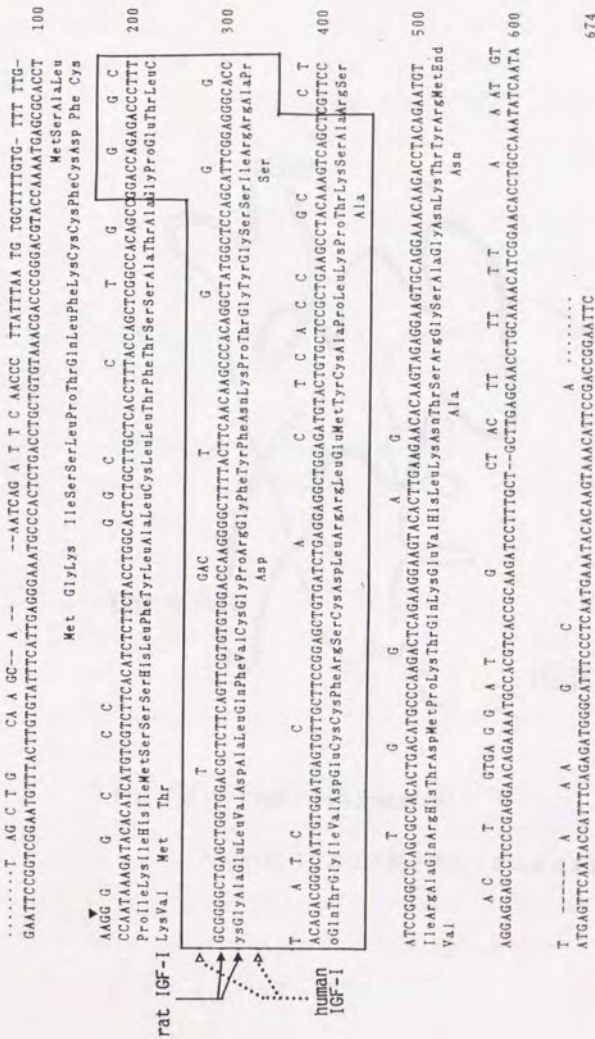


Fig. 1-3 ラット IGF-I cDNA クローン (pIGF/1) の塩基配列とアミノ酸配列のヒト IGF-I のものとの比較

枠内は成熟IGF-Iをコードする部分。ラットとヒトの配列で違っているものを示した。▼はclass A,Bとclass Cの分岐点 (Fig. 1-9参照)。

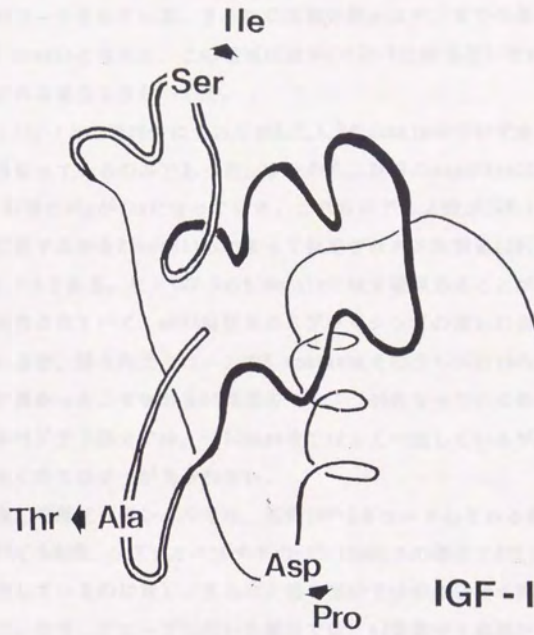


Fig. 1-4 ヒトIGF-Iの3次構造(28)

ラットIGF-Iでアミノ酸が異なっている点を示した。

EcoRIリンカーを示す。N末側には、22アミノ酸残基からなるシグナルペプチド部分を持ち、続いてインスリンではB鎖に当たるB domain (27アミノ酸)、Cペプチドに当たるC domain (12アミノ酸)、A鎖に対応するA domain (21アミノ酸)、さらにインスリンでは翻訳後切断される部分としてD domain (8アミノ酸)がコードされている。さらにC末側の終止コドンまでの部分(35アミノ酸)はE domainと言われ、この領域は血中のIGF-Iには存在しないため、翻訳後に切除される部分とされている。

ヒトIGF-Iとの相同性についてはB,C,A,Dのdomain中でわずかに3個のアミノ酸が異なっているのみであった。すなわち、20番のAspがProに、35番のSerがIleに、67番のAlaがThrになっていた。これらのアミノ酸がIGF-Iの分子構造中どこに位置するかをBlundellらによって推定された3次構造(28)を基に示したのがFig.1-4である。ヒトIGF-IのE domainには2種類あることが、Rotweinにより(32)報告されていて、mRNA前駆体のスプライシングの違いに由来するものとされているが、得られたクローンのE domainはそのうちIGF-IAのほうのものと相同性が高かった。すなわち35残基のうち3つが異なっているのみであった。シグナルペプチド部分では、-27のLysまではよく一致しているが、それより上流では全くホモロジーが見られない。

一方、塩基配列のレベルでは、成熟IGF-Iをコードしている部分では88%、E domainでも90%、シグナルペプチドの-27 Lys以下の部分で87%と非常に高い相同性を有しているのに対し、さらに上流の部分ではやはり全く異なる配列となっていた。なお、プローブに用いた部分では、42塩基中5塩基が異なっていた(88%一致)。

Fig.1-2の網掛けの部分の配列を見てわかるとおり、このクローンにおいて両末端の部分、すなわち5'端から48bpと3'端から49bpの部分はお互いにinverted repeat構造を取っている。これは最初sequenceの際のartifactかと考え、B domainの部分に含まれるSau3AI siteで切断したものをM13に再クローニングして、sequenceの確認を行ったが、同じ結果が得られた。この部分の配列に関しては、後の考察および第2章で論じたい。

(2) pIGFI/2

5'上流部分にみられるヒトのsequenceとの極端な相違や、長いinverted repeat sequenceの由来等の疑問点を解決するべく、同じライブラリーをさらに検索して、約750bpからなるクローンを得、pUC119にサブクローニングした。Fig.1-5に得られたクローンpIGFI-1/2の全配列を示す。シグナルペプチドの途中から以下の部分、すなわち-27 Ileから下流側の部分はpIGFI-1/1の場合と一致していたが、それより上流の部分は全く異なる配列であった。この上流部分をヒトIGFI-1の対応する部分と比較すると90%一致し、こちらのクローンが報告されているヒトIGFI-1 cDNAのラット型であるといえる。

第3節 ラットIGFI-1の長いmRNAの構造の解析

以上2種類のラットIGFI-1 cDNAを得ることができ、これに続き他のいくつかのグループからラットIGFI-1 cDNAの配列が報告された(49,51,183,184,185)。これらとの比較は後ほど行うが、pIGFI/1, pIGFI/2を含め、報告されているcDNAはすべて1 kb以下の長さである。しかしラットIGFI-1のmRNAは約1 kbのもの他に2 kb程度のもの、さらに長い何種類かのもの(最大7.4 kbまで)が存在していることが、Northern blottingを用いた実験により数多く報告されている。当研究室でも、三浦によりpIGFI/1を用いたNorthern blottingで数本のバンドが確認されている(68)(Fig.1-7A 参照)。従ってこれまで報告されているcDNAはmRNAの全長には対応していないので、さらに5'側あるいは3'側に長く延びたcDNAを得ることによってより長いmRNAの構造を推定することを試みた。第2節で用いたライブラリーはoligo dTをプライマーとしてcDNAのfirst strandの合成をしたものであった。ここでは特にrandom hexanucleotideをプローブに用いることにより、性質の異なるcDNAライブラリーを得ることにした。

95 GAATTCGGTGAATGTGACTTTGGCTAAACATCTCCCATCTCTCTGGATTCTTTTGGCTCAATTATTCCTGCCACCAAATTCATTTCCAGACTTTGTACTT
 190 CAGAAGCGATGGGAAATCAGCAGTCTTCCAACTCAATTAATTAAGATCTGCCTGTGACTTCTTCAGATAAAGATACACATCATGTGGTCT
 MetGlyLysIleSerSerLeuProThrGlnLeuPheLysIleCysLeuCysAspPheLeuLysIleLysIleHisIleMetSerSer
 -40 -22 -20
 285 TCACATCTTCTACTGGCACTCGCTTGCACCTTACCAGCTCGGCCACAGCCGACAGACCCCTTTCGGGGGCTGAGCTGGTGGACGC
 SerHisLeuPheTyrLeuAlaLeuCysLeuLeuThrPheThrSerSerAlaThrAlaGlyProGluThrLeuCysGlyAlaGluLeuValAspAl
 -10 10
 380 TCTTCAGTTCGTGTGGACCAAGGGCTTTTACTTCAACAGCCACAGGCTATGGCTCCAGCATTCGGAGGGCACCACAGACGGGCATTGTGG
 aLeuGlnPheValCysGlyProArgGlyPheTyrPheAsnLysProThrGlyTyrGlySerSerIleArgArgAlaProGlnThrGlyIleValA
 20 30 40
 475 ATGAGTGTTCCTCCGGAGCTGTGATCTGAGGAGGCTGGAGATGTACTGTCTCCGCTGAAGCTACAAAGTCAGCTCGTTCCTCCATCCGGGCCAG
 spGluCysCysPheArgSerCysAspLeuArgLeuGluMetTyrCysAlaProLeuLysProThrLysSerAlaArgSerIleArgAlaGln
 50 60 70
 570 CGCCACTGACATGCCAAGACTCAGAAGGAAAGTACACTTGAAGAACACAAGTAGAGGAAGTGCAGGAACAAGACCTACAGAATGTAGGAGGA
 ArgHisThrAspMetProLysThrGlnLysGluValHisLeuLysAsnThrSerArgGlySerAlaGlyAsnLysThrTyrArgMetEnd
 80 90 100
 665 GCCTCCCGGGAACAGAAAATGCCCGCTCACCCGCAAGATCCTTTGCTGTGACAACCTGGCAAAACATCGGAACACCTGCCAAAATATCAATAAT
 738 GAGTTCATACCAATTCAGAGATGGGCATTTCCCTCAATGAAATACACAAGTAAACATCCGACATGTCTTTCGGGAATTC

Fig. 1-5 5'上流部位の異なるラットIGF-I cDNA (pIGFI/2)

矢印から上流の部分がpIGFI/1のものは異なっている。

1-3-1 方法

方法は多くの部分は第2節と共通であるが、特に異なる部分を記述する。

(1) cDNAライブラリーの調製

ラット肝臓からのcDNAライブラリーの調製はAmersham cDNA合成システム・プラスおよびcDNA クローニングシステムλgt10を用いて行った。概要は以下の通り。

材料となるRNAはWistar系成雄ラット(日本S L C)肝臓より調製した。固形飼料(ラボMRブリーダー、日本農産工業)を自由摂取させた約200gのラットを用い、3章に述べる方法で肝臓全RNAを得た。得られたTotal RNAよりpoly(A)⁺の精製を行ったが、結果(1)に示したcDNAライブラリーはoligo-dT セルロースカラム(Collaborative Research Inc., Type 3)を用いて、また結果(3)ではoligo dTラテックスビーズを用いて、それぞれ添付のプロトコールに従い行った。

cDNAの合成反応は、cDNA合成システムのプロトコールに従った。このシステムはGublerとHoffmanの方法(186)をさらに改良したものであり、セカンドストランド合成においてRNase Hと大腸菌DNAポリメラーゼIを利用して、ニックトランスレーションタイプの反応によってmRNA鎖をDNAに置き換えていくものである。5 μgのmRNAよりスタートして、ファーストストランド合成のプライマーにはランダムヘキサヌクレオチドプライマーを用いた。

得られたcDNAのうち1 μgを次のcDNAクローニングシステムの段階に供した。方法は、プロトコールに従った。このシステムでは以下の手順でライブラリーの作成が行われる。平滑末端cDNAへのEcoRIアダプターの連結→カラムによる精製とサイズフラクシヨネーション→5'末端のリン酸化→脱リン酸化Eco RIベクターアームへの連結→in vitroパッケージング反応。なお、Eco RIアダプターの結合したcDNAの精製は附属のカラムで10-17番目のフラクシヨンを選択プールとして分取した。ベクターアームへの連結には、全cDNAの1/10量、および1/100量の2段階の量を供し、最終的にタイトレーションの高かった方のライブラリーを採用するという方法を取った。

(2) フェージDNAの増幅

λ gt10ではsmall scaleのliquid culture(181,p373)で十分量のフェージDNAが得られた。この場合、宿主にはNM514を利用し、0.4%マルトースを含むL培地で培養した。

(3) プローブ

プローブにはニックトランスレーションで標識したpIGFI/2を用いた。

さらに3'下流側に伸びたcDNAクローンを得るためにもう一つのプローブ 5' CAGTTGCTATTGCTTCGAGGAGGCCAAATTCACAA 3'も利用したが、この場合、hybridizationの際のformamideの濃度を40%に上げて行った。また、このプローブはNorthern blottingにも利用した。Northern blottingの方法の詳細は、3章に述べる。

1-3-2 結果

(1) pIGFD1

最初に合成したライブラリーをすべて検索して(4x10⁴)約1kbのクローンを1個得て、これをpUC119にサブクローニングし、pIGFD1とした。Fig.1-6に塩基配列決定の結果を示す。

全長は1052bp、5'上流部分はpIGFI/1の5'末端より68bp下流から始まっているが、翻訳領域の全長は含んでいた。3'末は、pIGFI/2よりもさらに453bp下流まで延びていた。614位から653位までAが並びCが4個入っている領域がある。以下この領域をA clusterと呼ぶ。現在までに報告されているラットIGF-I cDNAは全てこのA cluster部位の上流までしか含んでいない。おそらくcDNA合成のfirst strand合成の際にoligo dTをプライマーとして用いているために、このプライマーがmRNA中のA clusterに結合してそこから合成が始まっているものと考えられる。Shimatsu(187)は、完全なものではないが、ラットIGF-I遺伝子の構造を報告したが、そのなかでexon 5の下流域に当たる部分がこのA clusterを含む部分の配列と一致していた。彼らの報告の時点ではこれらの領域は成熟mRNA分子に含まれているかどうかは定かではなかったが、このcDNAクローン

が取得されたことでこれらの領域が実際にmRNAの一部になっていることが明らかとなった。

(2) Northern blot分析による長いmRNA構造の解析

上記のクローンを得たときに、LundらによってRNase mappingを行った結果から、2 kb以上の長いmRNAの生成には3'側の長いstretchが関与していることが推定された(188)。そこでこれを確認し、さらに詳細な構造の解析を進めるためにoligonucleotideプローブを用いてラット肝臓mRNAのNorthern blot分析を行った。方法の詳細は3章に述べる。結果をFig.1-7に示す。用いたプローブはニックトランスレーションで³²P標識したIGF-I cDNA(pIGFI/2) (Fig.1-7A)、pIGFI/1の5'上流部位の配列にあたる36merの合成DNA (Fig.1-6の実線の下の部分) (Fig.1-7B)、今回得たクローン (pIGFD1)の3'末側の部分に対応する37mer (Fig.1-6の点線の下の部分) (Fig.1-7C)の3種類である。cDNAでは肝臓のtotal RNA40 μ gを用い、oligoprobeではpoly A⁺ RNA 10 μ gを用いて行っている。三浦が報告しているようにcDNAでは、0.8から1.2kbのbroadなバンドと、約2.0、3.6、4.0、7.4kbのバンドを検出できたが、5'側のoligonucleotideプローブでは3.6と4.0kbのバンドは検出できなかったが、他の全てのバンドを検出することができた。さらに6 kb付近にもバンドがみられた。一方、3'側のプローブでは、5'側プローブでのバンドのうち、0.8から1.2kbのバンドが消失していた。すなわち0.8-1.2kbの短いmRNAにはこのプローブの部分は含まれていないことになる。Shimatsuらはゲノムクローンの解析の中で、Solution hybridization protection実験を行い、exon 5の部分の中に約4個のpoly A付加サイトの存在の可能性を示しているが、そのうち2個はpIGFD1クローン内にある (Fig.1-7, poly A₁, poly A₂, poly A signalを太線で示した)。Fig.1-7の結果より、0.1-1.2kbの短いmRNAが生成するときにはpoly A₁の位置のみが利用されると考えられる。また、mRNAの長さの多様性は、5'側の部分の構造の多様性からは0.8-1.2kbの幅、すなわちおよそ400bpの差異しか説明できず、それよりも大きな違いには3'側の方に長く伸びた構造が関与していることが確認された。

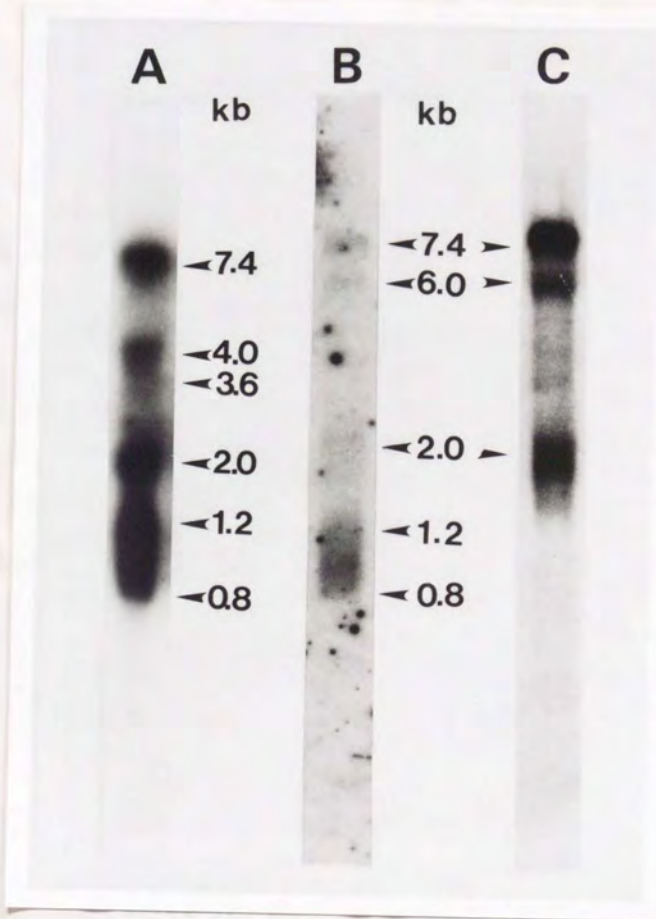


Fig. 1-7 A : ラット肝臓total RNAのIGF-I cDNAを用いたNorthern blot分析
40 μ gの成ラット肝臓RNAを1.5%アガロースゲルを用いて泳動した。

B : ラット肝臓poly (A)+ RNAのIGF-I 5'上流部位特異的のプロープによる
Northern blot分析
5 μ gのpoly (A)+ RNAを用い、Fig. 1-6の実線部のプロープで検出した。

C : ラット肝臓poly (A)+ RNAのIGF-I 3'下流部位特異的のプロープによる
Northern blot分析
Fig. 1-6の点線部のプロープで検出した。

(3) λ IGFD21, λ IGFD23

長いIGF-I mRNA の全構造を明らかにするためには3'側に長く伸びたcDNAを得る必要があることが判明した。しかしながら、mRNAの5'側の構造が未知の場合にはcDNA合成の際にそのmRNAの既知の部分の特異的なプライマーを利用することで比較的簡単に5'側に伸びた構造の特定のcDNAを得ることができるが、3'端が未知の場合はそのような方法は利用できない。特にラットIGF-Iの場合、7.4kbという以上に長いmRNAを扱わねばならず、またこの部分は非翻訳領域であるためアミノ酸の情報等も利用できないので、少しずつ3'側に伸びたcDNAクローンを地道に検索して行く他に手はない。すなわちクロモソームウォーキングのようにcDNAウォーキングを繰り返すことになる。

そこで次にさらに新たにラット肝臓mRNAよりランダムプライマー法によりcDNAライブラリーを作成し、pIGFD1の3'末の部分すなわちFig.1-6の点線部のoligonucleotideプローブを用いて検索を行った。

2×10^5 個のクローンを検索し、6個のpositiveなクローンを得た。このうち比較的長いインサートを含んでいた2個のクローンについてM13 mp18に組み込み、両端の部分の塩基配列を解析した。約1 kbのインサートを持っていた λ IGFD21は3'末端はpIGFD1と全く同じ位置で終わっていたが、5'末端はpIGFD1より21bp上流まで伸びているものであった。おそらくFirst strand 合成の際にpIGFD1のときと同じプライマーが結合することによって合成が開始したものと考えられる。さらにもう1つのクローン λ IGFD23はEcoRIで消化すると、約2 kbの断片と、400bpの断片が得られた。これらをM13にサブクローニングしてまず両末端からの塩基配列を決定した。Fig. 1-8に示したように2 kbの断片が上流側に当たるものであった。

5'末はpIGFI/2と同様の構造を持っていたが、それよりもさらに38bp上流まで伸びていた。さらにシグナルペプチド部分、IGF-I分子のN末端部分に当たるところまで塩基配列が一致していることが確認できた。その下流約1.5kbの部分はまだ塩基配列の決定ができていないが、3'末の部分(約120bp)および間のEcoRI siteの前後(約350bp)の塩基配列はこれまで全く報告されていないものであった。

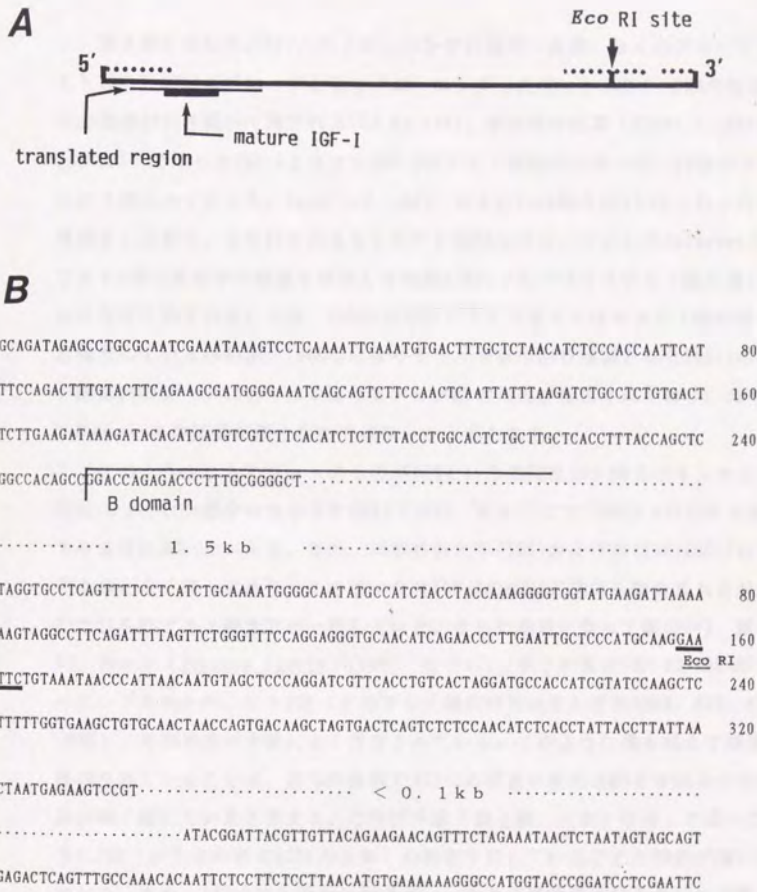


Fig. 1-8 3'側に長い構造を持つクローン入IGFD23の構造 (A)と部分塩基配列 (B)

BにはAの点線の部分の塩基配列を示した。

第4節 考察

第2節に示したpIGFI/1のクローニングに成功した後、多くのグループからヒトIGF-I cDNAをプローブとしてクローニングしたラットIGF-I cDNAの塩基配列の報告が引き続いて為された(49,51,184)。本研究の結果(pIGFI/1,pIGFI/2,pIGFD1)ではヒトIGF-IとラットIGF-Iのアミノ酸配列の違いは、70個のうち僅かに3個のみであった。Casellaら(184)、およびMurphyら(51)はこれと同様の報告をしており、さらに引続きヒトIGF-I cDNAをプローブとしてShimatsuらがラットIGF-I遺伝子の構造を解析した結果(187)でもやはり3アミノ酸の違いのみが報告されている。一方、Robertsらはヒトとラットでは6アミノ酸が異なると報告している(49)が、1989年になってラット血中から精製されたIGF-Iのアミノ酸配列のデータ(30)ではやはり3アミノ酸の相違が報告されており、おそらくRobertsらの結果が誤りなのではないかと思われる。

このようなヒトとラットのものが96%という相同性は、例えばインスリン(92%、C peptide部分も含めると83%)(189)、アルブミン(70%)(190)と比較しても非常に高いといえる。また、精製された牛(191)および羊(192)IGF-Iはヒトのものと同様であり、その後マウスIGF-IのcDNAの構造も報告されたが(192)これも66アミノ酸までが一致していた。さらに最近になって豚(194)、鶏(195)、カエル(*Xenopus laevis*)(196)、鮭(197)と多くの種のIGF-IのcDNAがクローニングされたが、ヒトIGF-Iとのアミノ酸相同性はそれぞれ100%、89%、84%、80%と、その構造は非常によく保存されている。このように種を越えて構造が保存されていることは、進化の過程でIGF-Iの構造の変化を許さないような淘汰圧が強く働いていたと言える。これは序論「第3節 (6)作用」で述べたようにIGF-Iが生命の根元に関わる多くの機能を有していることと関係が深いと思われる。また、IGF-Iは3種のレセプター、および複数種の結合タンパク質(BP)と結合する必要があるが、この結合を維持するために分子内の変化が制限されたとも考えられる。

さらにE domainすなわち合成後に切断される部分も91%とよく保存されていたことは、この部分が単に切断されて分解されるのではなく、何かの機能を有していることが暗示される。実際に血中にE peptideの抗体に結合する活性が認

められていて(198)高分子量IGF-Iとされている。また、ラットIGF-IIではE domainの結合したものが実際に得られている(199)。本研究で得たcDNAのE domain部分の構造は1種類であるが、Robertsら(49)は2種類のE domainの存在を示唆する2種のcDNAを得ている。これらは52bpのmini exonが挿入されたもの(IGF-1b)とこれを含まないもの(IGF-1a)とによって構成されると説明されており、それぞれ41、35アミノ酸残基からなるE domainを形成する。本研究で得たcDNAはすべてIGF-1aにあたる。またマウスcDNAでも同様の報告が為されている(193)。なお、ヒトIGF-Iの場合も同様に2種のE peptideに対応するcDNAが得られているが(32)、これはexon 4とexon 5という2つのexonが排他的に利用されることによって生じるので(34)機構的には異なるが、2種のE domainが存在することには何らかの共通の意義が想像される。BachらはIGF-1aのE domainには2つのN-glycosylation siteが存在するとし、in vitroのtranscription-translationの系を用いて生成したIGF-1aのprepro体がmicrosome画分の添加によって実際にglycosylationを受けることを報告している(200)。Loweらはsolution hybridization/RNase protection assayにより、全IGF-I mRNAのうち肝臓ではIGF-1aが87%を占め、その他の臓器では95%以上がIGF-1aであるとしている(201)。今回得られたcDNAがすべて1a型であったのはこのためであろう。

次にさらに3'下流側の構造について述べてみたい。これまでラットIGF-IのmRNAには1kb程度のものの他に約2kbのものや7.5kbのものなど分子量の大きいいくつかのものが存在していることがNorthern blottingの結果から明らかになっている(49, 187, 202, 203)。また3~4kbの長さのものも存在しているという結果も示されている(50, 68)。LundらはRNase H mappingによりこれらの長いmRNAは長い3'非翻訳領域の存在によって形成されるという結果を得ているが(188)、cDNAの構造などからこれを証明した報告は現在まではない。第3節のpIGFD1およびλIGFD21、λIGFD23は3'側に伸びたcDNAクローンを初めて得た例として重要である。また、Northern blottingにより短い(0.8-1.2kb) mRNAの3'末端を決定できたのも有意義な情報となるであろう。今後λIGFD23の全塩基配列を明らかにすると共に、7.4kbの全長の構造を決定すべくさらに下流域のcDNAを得、またゲノムの側の対応する部分の構造を明らかにすることによってこのような長いmRNAの生じる機構と生理的な意義を解析していく必要がある。

続いて5'上流領域に関してであるが、本章の研究で得られたcDNAは5'上流領域の構造が2種のものに分けられる。pIGFI/1、pIGFD1およびλIGFD21は同一のグループに属する、またpIGFI/2、λIGFD23はもう一つのグループである。Robertsら(183)は、ラットIGF-I cDNAの5'上流領域には3種類のものが存在することを報告し、これらをclass A, class B, class Cと呼んでいる。Fig.1-9にそれら3種類のMet-22から上流部分を比較した図を引用した。class Cはclass AおよびBとFig.1-9のなかの3'末から19bp目より分岐している。class Aとclass Bの間の分岐点はそれよりさらに57bp上流である。pIGFI/1、pIGFI/2、pIGFD1、λIGFD21、λIGFD23の5'末の点を順番に1から5の数字で示した。pIGFI/1の5'末端はRobertsらによるclass Aの5'末よりもさらに8 bp上流である。pIGFD1およびλIGFD21の5'末端はclass Aとclass Bの共通の部分内にある。pIGFI/2およびλIGFD23はclass Cに属する。一方、Shimatsuらによってclass CのcDNAはさらに2種類に分けられることが報告された(185)。これらの一つはFig.1-9のclass Cと同一であるが、もう一つはFig.1-9内に2個の★で示した間の部分がスプライシングにより除かれているものである。かれらはこれをIGF-IB₁、IGF-IB₂と命名しているが、混乱を避けるためここではclass C, class C'と呼ぶことにする。pIGFI/2およびλIGFD23はclass Cの方である。

第2節でも触れたが、pIGFI/1は5'末端の48bpと3'末端の49bpがお互いにinverted repeatの構造になっている。Robertsらも彼らのclass Aにおいて同様に40bpと41bpのinverted repeatの存在に言及している。mRNA中にこのような長いinverted repeatが存在するならば、Fig.1-10に示したようにmRNA中のこれらの部分がお互いに会合し安定な構造を取り、このmRNAの翻訳や安定性に影響を及ぼすことが予想される。このような長いinverted repeat構造はトウモロコシのzeinの遺伝子等で報告されているが(204,205)、この場合はmismatchの部分も多く、このようにほぼ完全なinverted repeatを持つものは知られていない。またこの構造が、cDNAの正確に両端から始まっていることなども不自然である。第2章のラットIGF-Iゲノムクローンのクローニングはこの構造の由来を探ることを目的のひとつにしている。

なお、後に詳しく述べるが、Robertsらのグループではその後各classのmRNAを区別して定量できるsolution hybridization/RNase protection assay の系

- B. AGATAGCCATACAATGGAAATTAGTGGCTTCAACTTGG 38
 C. TGTGTTTTGTAGATAAATGTGAGGATTTTCTCTAAATC
 ★
- B. GGGAAAGGATGGACTCTAACTTCGAGCTGTGCAGTTTCG 76
 C. CCTCTCTGCTTGCTAAATCTCACTGTGCCTGCTAAAT
- B. CCCATTGTTTGAATGGACAAAAGGCAGTTTACCCAGGC 114
 C. TCAGAGCAGATAGAGCCTGCGCAATCGAAATAAAGTCC
- B. TCCTAGCATACCTGCCTGGGTGTCCAAATGTAAC^A 152
 C. TCAAAATGAAATGTGACTTTGCTCTAACATCTCCAT
- B. TGCTTTCACAAACCCACCCACAAAACAACACATGTTTC 190
 C. CTCTCTGGATTTCTTTTTGCCTCATTATTCCTGCCAC
- A. GTTTACTTGTGTATTTTCATTGAGGGAAAT 29
 B. TTAAGTCCTGGGCTTTGTTTTTCACTTCGGCCTCATAAT
 C. CAATTCATTTCCAGACTTGTACTTCAGAAGCGATGG
 ★
- A. GCCCACTCTGACCTGCTGTGTAACGACCCGGGACGTA 67
 B. ACCCACTCTGACCTGCTGTGTAACGACCCGGGACGTA
 C. GAAATCAGCAGTCTTCCAACCAATTATTTAAGATCT
- A. CCAAATGAGCGCACCTCCAATAAAGATACACATCATG 105
 B. CCAAATGAGCGCACCTCCAATAAAGATACACATCATG
 C. GCCTCTGTGACTTCTTGAAGATAAAGATACACATCATG

Sequences of the class A, B, and C 5'-untranslated regions found in rat IGF-I cDNA clones. The ATG specifying the Met at position -22 of the pre-pro-IGF-I coding region as well as the upstream, in-frame ATG's which are not followed by in-frame termination codons are boxed. The base at position 1 in this figure is the most 5' base in the class C clones analyzed to date, whereas some previously described class B clones extend an additional 484 bp in the 5' direction.

Fig. 1-9 5'上流域の異なる3種のラットIGF-I cDNA

原因は文献(183)より引用した。class Cの2つの★の間の部分がないcDNA (class C')も報告されている(185)。なお参考のため本研究の中で使用した合成DNAプローブを、直線または波線を伴った矢印で示した。直線の部分の下の配列、および波線の部分の上の配列に相補的なDNAを合成した。これらは本章および2、3章で利用している。

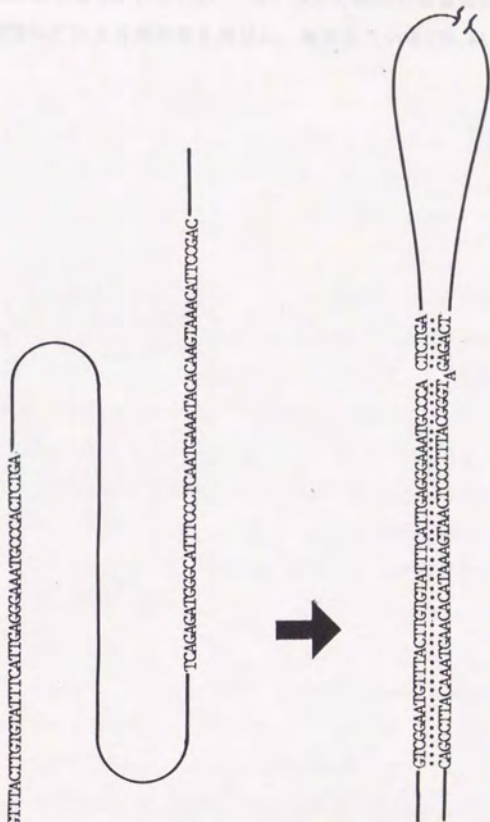


Fig. 1-10 5'端と3'端の長いinverted repeatによって生じると考えられる class A ラット IGF-I mRNAの安定した2次構造

を確立し、肝臓ではA,B,C各クラスのmRNAが27, 2, 71%ずつそれぞれ存在していることを明らかにし(206)、各クラスのmRNAの組織別の分布や、ホルモンや発達段階などによる調節等を検討し、報告している(75,91,207)。

第2章 ラットIGF-I遺伝子の構造の解析

第1節 緒論

第1章ではラットIGF-Iの cDNAのクローニングに成功し、その5'末端の多様性を明らかにした。そこでこの多様性の由来を探り、さらに発現調節機構等に関する情報を得るためにラットIGF-Iのgenomic cloneのクローニングを手掛けた。

この試みを続ける間にラットIGF-I遺伝子の多くの部分の構造が、Shimatsuらにより発表された(187)ので、その後の過程はこの報告を参考にして行った。報告されたラットIGF-I遺伝子は、ヒトIGF-I cDNAをプローブとしてクローニングされたもので、ヒトIGF-Iで使用されている(34)5個のエクソンが含まれている(Fig. 2-1)。そのうちエクソン4とエクソン5はヒトIGF-Iではどちらかが排他的に利用されて、2種のE domainおよび3'非翻訳領域の部分形成されることが明らかになっている。しかし、ラットではエクソン5が常に使われ、ここにエクソン4のはじめの52bpのみが挿入されたものとされないものがあることが、cDNAの解析の結果やエクソン4のプローブによるNorthern blottingなどによって確認されている。また、Shimatsuらによるエクソン1は、1章で述べた各クラスのcDNAのうち、class Cの5'上流領域に対応する配列を含んでいたが、class Aおよびclass Bに関連のある配列は認められなかった。class Cと、class A, Bとの分岐点は、exon-intronの境界になっていた。エクソン2はシグナルペプチド部分のうち後半の9アミノ酸と、B domainのはじめの26アミノ酸をコードする。エクソン3はB domainの残りとC, A, Dの領域の全体とE peptide部分のはじめの16残基までをコードしている。エクソン2と3の間には50kbという長大なイントロンが存在し、このためにラットIGF-I遺伝子はShimatsuらによって報告されている部分だけでも90kbと巨大なものになっている。実際には第1章から明らかなように3'側にさらに何kbかの構造が続いているため、全体としてはさらに長いものであることは間違いない。

第2節 方法

ここに記述した以外の方法は、第1章と同様に行った。

(1) ラット肝臓ゲノムライブラリー

ゲノムライブラリーはClontech社のものを購入して(TOYOBO)使用した。最終的に2種類のライブラリーを使用した。各々の性質を以下に示す。

a) Source:Adult female Sprague-Dawley liver, partial EcoRI cut

Vector:Charon4A, Independent Clones: 2.2×10^6 ,

Average Insert Size:9.7kb

b) Source:Adult female Sprague-Dawley liver, partial HaeIII cut

Vector:Charon4A, Independent Clones: 1.8×10^6

Average Insert Size:8.2kb

(2) 制限酵素マップの作成および塩基配列の決定

各制限酵素処理やdouble digestionなどを行ったほか、 λ マッピングシステム(Takara)を用いて添付のプロトコールに従って制限酵素マップを得た。

塩基配列の決定は、第1章と同様に行ったが、補助的な手段として、キョーエンス用デレーションシステム(Takara)を利用した。塩基配列の解析およびホモロジー解析等はGENETYX(SDC)によって行った。

(3) Dot blot分析およびSouthern blot分析

Dot blotはnitrocellulose filterにDNAサンプル約100ngをspotしてこれを第1章のブランクハイブリダイゼーションと同様の方法で処理した。negative controlにはpBR322 DNAまたは λ DNAを用い、positive controlにはpIGFI/1を用いた。Southern blot分析は常法に従って行った(181)。

第3節 結果及び考察

(1) コード領域を含むクローン

Nick translation によって標識した pIGFI/1 をプローブとして *EcoRI* partial cut のライブラリーを検索したところ、約 20kb の 2 個のクローンが得られた (λ IGFG2、 λ IGFG20)。これらは、Southern blot 分析、制限酵素処理マップ等から、エクソン 3、4 を含むクローンであることがわかった (Fig. 2-1)。既にエクソン 3 の 180bp の部分とその前後の部分 (全部で 1kb) の塩基配列は報告されており、今回得たクローン中それ以外の部分はすべてイントロンに属するので塩基配列の解読は試みないことにした。

(2) 5' 上流域のクローン

第 1 章で得られた pIGFI/1 の 5' 上流域の構造の由来が未知であったため、次にラット IGF-I 遺伝子の 5' 上流域を中心に検索することにした。プローブには Fig. 2-2 に示した pIGFI/1 の構造の内、下線部 B で示した部分のアンチセンスの合成 DNA を用いた。この部分は Fig. 1-9 からわかるように class A と class B の共通の部分に当たり、class C cDNA には含まれない。

(1) で用いたライブラリーを 1.2×10^6 個検索したが、positive なクローンは得られなかった。そこで別のライブラリー (*HaeIII* partial cut) を検索することにした。 4×10^5 個のクローンから、2 個のクローンを得た (λ IGF52、 λ IGF56)。各々 20kb、15kb の長さであったが、 λ IGF52 は λ IGF56 の全長を含むものであった。 λ IGF52 は Shimatsu らにより得られたクローンの内最も 5' 上流まで伸びているものに比べ、さらに 15kb 上流までを含んでいる。Fig. 2-3 に λ IGF52 の制限酵素マップを示す。エクソン 1 およびエクソン 2 の位置は Shimatsu らの報告を基に決定した。次に、 λ IGFI/1 のインサートを *EcoRI* および *HindIII* で切断した断片の dot blot 分析により、プローブとハイブリダイズする部分は、エクソン 1 とエクソン 2 の間の 3.2kb の部分に存在することが明らかとなり、この部分を pUC18 にサブクローニングした (pIGF3.2)。そこでプローブとハイブリダイズする部分の周辺の部分の塩基配列を解読した。pIGF3.2 のインサートを *HaeIII* で切断したところ、1 kb の断片がプローブとハイブリダイズしたので、

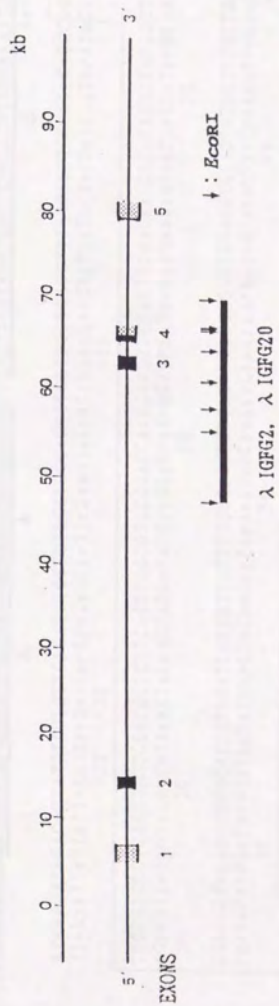


Fig. 2-1 ラットIGF-I遺伝子の構造と、得られたクローン (lambda IGFG2, lambda IGFG20) の位置 (太実線)


```

GAATTCGGTGGAAATGTTTACTTGTGTATTTCATTGAGGGAATGGCCACTCTGGACCTGGTGTGTAACGACCCGGGACGCTACCAAATAATGAGCGCACCTCCA
MetSerAlaProPro
A B
ATAAAGATACACATCATGTGCGTCTTCACATCTCTTCTACCTGGCACTCTGCTTGTCTCACCTTTACCAAGCTCGGCCACAGCCGGACCCAGACCCCT
lLeLyslIleHisllMetSerSerHisLeuPheTyrLeuAlaLeuCysLeuLeuThrPheThrSerSerAlaThrAlaGlyProGluThrLe
-22 -20 -10 1
TTCCGGGCTGAGCTGGTGGACGCTCTTCAAGTTGGTGTGGACCAAGGGGCTTTTACTTCAACAAGCCCAAGGCTATGGCTCCAGCATTCGGA
uCysGlyAlaGluLeuValAspAlaLeuGlnPheValCysGlyProAr&GlyPheTyrPheAsnLysProThrGlyTyrGlySerSerIleAr&A
10 20 30
GGCACCAACAGACCGGSCATTGTGGATGAGTGTTCCTTCCGGAGCTGTGATCTGAGGAGGCTGGAGATGTAAGTCTGCTCGGCTGAAGCTACAAAG
rgAlaProGlnThrGlyIleValAspGluCysCysPheAr&SerCysAspLeuAr&ArgLeuGluMetTyrCysAlaProLeuLysProThrLys
40 50 60
TCAGCTCGTTCCATCCGGGCCAGGCCACACTGACATGCCCAAGACTCAGAAAGGAGTACACTTGAAGAACACAAAGTAGAGGAAGTGCAGGAAA
SerAlaAr&GSerIleAr&AlaGlnArgHisThrAspMetProLysThrGlnLysGluValHisLeuLysAsnThrSerAr&GlySerAla&GlyAs
70 80 90 100
CAAGACCTACAGAATGTAGGAGGAGCCTCCCGAGGAAACAGAAAATGCCACAGTCCACCGCAAGATCCTTTGGCTTGGCAACCTGCAGAAAACATCG
nLysThrIyAr&MetEnd
GAACACCTGCCAAATATCAATATGAGTTCATACCATTCAGAGATGGCCATTTCCCTCAATGAATACACAAGTAACAATCCGACCCGGAATTC

```

Fig. 2-2 本章で使用了した合成アローブ

下線部 A : class A 特異的アローブ

下線部 B : class A, B 共通アローブ

▲はclass Aとclass Bの分岐点、3'側の★のAは5'側の inverted repeat部分に対応する塩基がない。

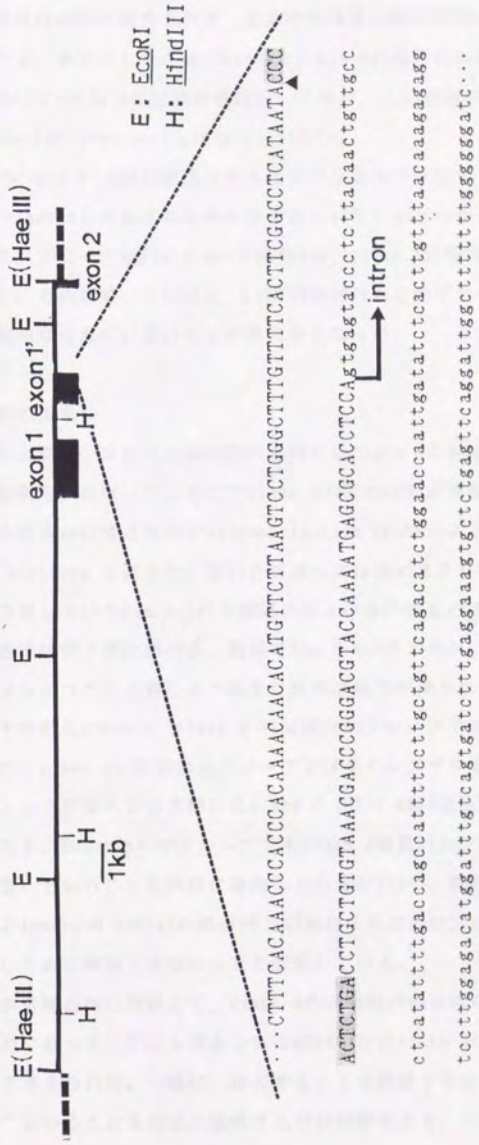


Fig. 2-3 λ IGF52の構造とその部分塩基配列

▲はclass Aとclass Bの分岐点にあたる。

M13 mp18を用いて塩基配列の解読を行った。結果をFig.2-3に示した。Fig.2-3中でintronとした部分はcDNAには含まれず、またその境界の部分でclass Cと分岐している点に当たる。▲で示した点はclass Aとclass Bの境界に当たるが、この点から上流に向けてclass Bの配列が直接続いており、この点はスプライシングのacceptor site (AG sequence)とはなっていない。

なお、以下このclass B cDNAに関連のあるエクソンをエクソン1'と呼ぶ。次にλIGF52の中にclass Aに対応する配列が含まれていないかどうかをDot blot分析により調べた。プローブはFig.2-2の下線部Aの、class Aに特異的な合成プローブを使用した。その結果、λIGF52、λIGF56の何れもこのプローブとハイブリダイズする配列は含んでいないことが明らかとなった。

(3) class A cDNAの由来

以上の結果よりエクソン2から上流20kbの範囲にはclass Aに対応する配列は存在しないことが明らかになった。そこでclass Aの型のmRNAが実際に肝細胞中にあるかどうかを明らかにする目的でoligonucleotide probeによるラット肝臓mRNAのNorthern blottingを試みた。用いたプローブは既にスクリーニングやdot blot分析に使用しているFig.2-2の下線部AおよびBの部分のアンチセンスのものである。方法は第3章に述べる。結果をFig.2-4に示したが、当実験では供したmRNA量が少なかったこと等によりあまり鮮明な結果が得られていないが、Bのプローブすなわちclass A、class B 共通部分のプローブでは複数のバンドが検出できたが、class Aに特異的なプローブでは全くシグナルを検出できなかった。このことから肝臓内には実際にはclass A IGF-I mRNAは存在していないということになる。Robertsらのグループでもclass A特異的なプローブではmRNAを検出できないということを同様に報告しているが(206)、彼らはclass AのmRNAは分子内でinverted repeatの部分同士が会合するためにプローブがこの部分に近づけないために検出できなかったと解釈している。

これらの結果から総合的に判断して、class AのcDNAはcDNA合成の際に人工的に導入されたものであって、ゲノム中あるいはmRNA中にはclass Aに特異的な配列は存在しないと考えられた。一般に、存在することを証明するのは簡単だが、存在しない”ということを完全に証明するのは困難である。この場合に

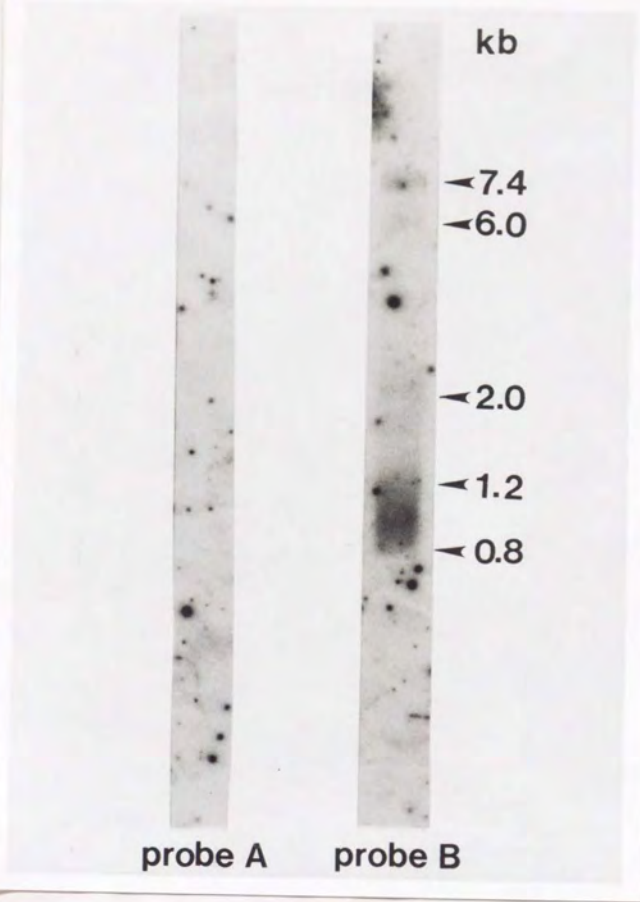


Fig. 2-4 class A特異的アプローブ (A) およびclass A, B 共通アプローブ (B) によるラット肝臓poly (A)⁺ RNAのNorthern blot分析

それぞれ5 μ gのラット肝臓poly (A)⁺ RNAを用いた。BはFig. 1-7Bに同じ。

結論を導いた根拠を以下に列挙してみる。

- (1) Inverted repeat構造がcDNAの5'および3'の両末端から始まっていてinverted repeatを構成する各々の塩基の末端からの距離が揃っていること。
- (2) 5'側の48bpと3'側の49bpのうちinverted repeat構造が完全であってmismatchがほとんどなく不自然であること。ただ1つの合わない塩基は3'側の末端から43番目にAが挿入されていることであるが(Fig.2-2 ★印)、この部分に対応する5'側の部分はclass Aとclass Bに共通の部分である。すなわちclass Aに特異的な部分(38bp)に限ってみると、1塩基の不一致もない完全なinvert repeat構造になっている。
- (3) ゲノムDNA中エクソン2から上流20kbの間にclass Aに対応する配列が存在しないこと。class Bの方がclass Cよりもclass Aに近い構造を持つので、class Aに対応する配列が存在するとclass Bの近くにある可能性が高い。しかし、そのような配列はエクソン1'(class B)の近傍になかったのみならず、エクソン1(class C)よりも15kb上流までの部位にも存在しない。
- (4) class Aとclass Bの分岐点が、intron-exonの境界になっていないこと。
- (5) 肝臓mRNAのclass Aに特異的なoligonucleotide probeによるNorthern blottingで、バンドが検出できなかったこと。

またRotweinらはSouthern blottingの結果よりclass Aの配列はgenome中には存在しないことを認めている(私信)。

これまでにcDNA合成の過程で人工的な配列が導入された例が数多く報告されている。Human interferon(208), mouse immunoglobulin heavy chain(209), chicken β -globin(210)およびfibronectin(211), rat insulin(212), chicken ovalbumin(213), bovine parathyroid hormone(214)等で、それぞれ導入された機構等の仮説が提唱されている。しかしこのclass Aの場合を説明できるような例はなく、このように5'末端に3'末端のinverted repeatが付加される機構を予想してみた。仮説をFig.2-5に示した。最も可能性が高いものとして、ここではreverse transcriptaseによる機構を推定した。Reverse transcriptase(RTase)は代表的なRNA依存DNA polymerase活性の他に、RNase H活性およびDNA依存DNA polymerase活性をも有することが知られている(215)。まずRTaseによつ

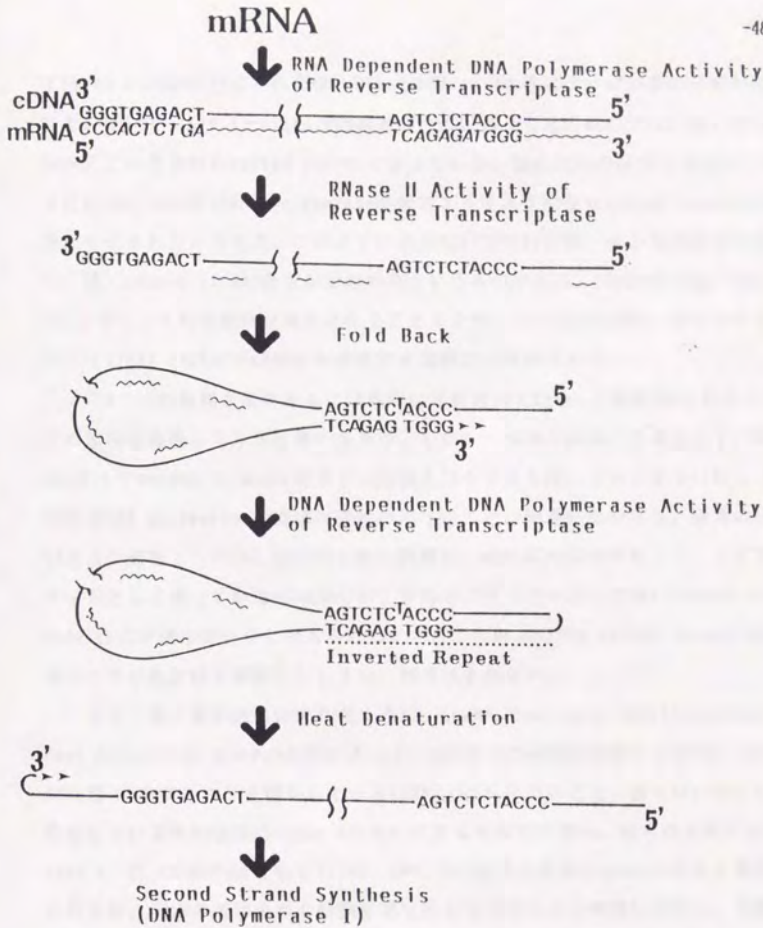


Fig. 2-5 cDNA合成の際にclass Aの5'配列が人工的に導入された機構の仮説

(1) first strand合成の後、reverse transcriptase (RTase)の持つRNase H活性によってmRNA鎖の分解が起こる。(2)5'端の10塩基と3'端の11塩基の互いに相補的な部分が会合する。(3)RTaseの持つDNA依存DNA polymerase活性によって人工的な配列の伸長が起こる。(4)加熱変性後、second strand合成に供せられる。

てFirst strandが合成された後、RTaseのRNase H活性によりmRNA鎖の分解が起こる。続いてclass Aとclass Bの共通部分の3'側(もとのmRNAでは5'側)の10bpが、この部分のinverted repeatになっている5'側の11bpの部分と会合し、さらにRTaseのDNA依存DNA polymerase活性によって人工的なinverted repeatの部分が形成されたと考えた。これまでの部分は41°Cで行われ、その後熱変性を経て、続くsecond strand合成が行われたというものである。Derynckらは、RTaseによって人工的な配列が導入されることを予想しているが(208)、彼らのモデルではfirst strandがmRNAから解離する機構は不明確である。

Fig.2-5の仮説を証明するには実際に試験管内でRTaseと基質RNAとによってこの過程を再現してみる必要がある。しかし、cDNA合成法の変法として、RTaseだけでsecond strand合成までの過程を行う方法も用いられており(181)、DNA依存DNA polymerase活性は有効に作用することは間違いないであろう。通常のcDNA合成の過程でもfirst strand合成と同時に、mRNA鎖の切断が起こり、ハイブリッドとして残っているmRNA部分の3'末端をプライマーとして短いsecond strandの合成が進んでいると考えられる。ただしこれらの短いsecond strand DNAはその後の熱変性で解離してしまい、利用はされない。

さて、第1章の最後に触れたように、Loweらはsolution hybridization/RNase protection assayの方法によって、class AのmRNAが肝臓では全IGF-I mRNAの27%存在することを報告している(206)。これについては、彼らがclass Aと見なしているものは実はclass Bのものである可能性が高い。彼らの方法ではclass A, B, CのmRNAはそれぞれ322, 297, 241塩基の長さにprotectされて検出されるが、AとBの差は小さく結果を見てもどちらのものか判別しがたい。当研究室田中はこの方法を改良し、各223, 198, 145塩基の長さになるようにして行ったところ、class BとCのものが検出され、class Aに当たるところにはバンドはでなかった(未発表)。

class AのmRNAが存在する可能性は全く否定された訳ではない。可能性として考えられるのはclass Aを形成するエクソンはラットIGF-I遺伝子のさらに上流の部位に存在するということである。しかしこれは次の理由から考えにくい。まず、さきに述べたようにclass Cのエクソンを越えて上流にあることは確率的に少ないと言うことである。さらに、class AとBの境界に当たる部分はexon-i

ntronの境界にはなっていないということで、もしclass Aをつくるエクソンがさらに上流にあった場合には次のような構造を考えなければならない。すなわち、class Aのエクソンは、class Aに特異的な配列に続きclass Bと共通部分の57bpの配列を持っていて、これがclass Cとの分岐点になっている部分とスプライシングによって結合されるというものである(Fig.1-9参照)。(または、共通部分が47bpで、class Bの構造中class Cとの分岐点から12bp上流のAGのところにスプライシングされてもよい)何れにしても、47bpあるいは57bpという長い部分にわたって2個のエクソン内に完全に一致する配列が存在するのは可能性が低い。もう一つの可能性としては、ゲノム中にはclass Aの配列は無いが、転写後に何か未知の機構でこの配列をもつmRNAが合成されるというものである。しかしこの可能性も低いであろう。

(4) ラットIGF-I遺伝子の5'上流域の塩基配列に関する考察

続いて、Fig.2-3に示したよりも上流の部分の塩基配列を解析した。先に得られたHindIII-EcoRIの3.2kbの断片をFig.2-3中にあるSmaIで切断し、class B特異的なプローブ(5'TATTATGAGGCCGAAGTGAAAACAAGCCCAGGACTTAA3')とハイブリダイズする約1.3kbの断片の解読を進めることにした。これをHpaIIで切断して、あるいはデレーションキットを用いて各断片の配列を解読した。

最近Bucciらによってこの部分を含むHindIII-EcoRVの塩基配列が報告された(216)。Shimatsuらによるエクソン1の配列(187)と、Bucciらの報告と当研究で得られた結果を合わせたエクソン1'の配列をFig.2-6に示した。解読した方向を図中に矢印で示した。エクソン1'はBucciらの報告と良く一致していたが、460番前後の18bpは読み落としていた。イントロン部分の後半はBucciらの報告には無いので比較できない。

なお、Bucciらもエクソン1'はエクソン1と2の間に位置しているとしているが、Lundらはエクソン1よりも上流にあるという報告をしている(217)。この差異は、多型によるのかもしれないが、詳細は不明である。なおRotweinらもエクソン1と2の間にあるとしている(私信)。

現在までラットIGF-Iの転写開始点に関する報告はない。エクソン1も1'

HpaIII
 AAGCTTTCTTAAACACGGCTTTGGAGCCAGAAATGGGAGTGTCTTGCACCTTGGCCAGAAAGTCAAAAGTAAAGTGAAGTTGATTTGCTTCTGTAAAGCTCTTCGACAGTTGC 120
 TGTCTTTGCATATTCAGAAATTTTAAACAGATCCAGCTGTGCCGGGAAGCAGCAGCGTTCTGGCGGCTGTGCTAACTTTTCACTTTTGAAGGGGACTTTTGTGGTGCCTGAGCTTG 240
 GGGCTTAGATTTCCGGTTTAGGCTCTGCTTTAGACTAGGTGGGGTAAAGTCTCTTLAGGTGAATCTGGCTGGCGGTGCTGCTGCTGGCCACTGTGCTGGCATTTGCTTCTCCTTTCCG 360
 ATCACTGGACCTACTCAAGTTTCCATTCTCAGCAAAATATAATCTCTCCAGCTGTCTTTTTCAAATTTCAAGCACTTCAAGCCGCTGTCAACCGGCTCTTGGAGGCGAGTTGCCGG 480
 AGGGCTTAATTCATAAAGATCCCAAGTCAAGAGTGCAGCGTTTCTGTGCTTTCAATCTCTCGCTAGGACTTTTCTTAGCCAAGGAAGTGGCTTGGGACTTAGGGACGGGAGA 600
 CAACCTTGCAAGCACCTAATTTGBCATCCGTCAGCCAGCCAGCTCCACCTTACAGGAGTGAAGTACGGCTTCAATACGGCTGTGTGGCTGGCAGCTGAGATAGTGTTC 720
 CAAGGGACTGTGGAAATGTTACCTCAGCAGGCATTCAATTTCCGGTTTGGAAATGCTCCAAATGAATTTTTCGGTGTGGTCTGCAGAAATTTCAAGAGGGGAGCTAGCAATC 840
 TGCTTCAACTTTTTTCCCGCGTGTGCAGCAGGAGTGCCTGAAGGGAGCTGCTGCTGGTGTGAACATAGTTCAAGGAATAGAGGTCAACTGCTTAGAGCGGTGCAGGCCAAG 960
 GCACAGCTGGCTTTGTACTCTGAAGTCAAGGTATTTCCCAAGTGCCTGAGCCAGGGGGAAGTGGGGGAGGAGGAGTGGCCTTGGATCGCTATTCTGGTAGCCAAAGACA 1080
 GATGCCATACAAATGGAAATTAGTGGTTCAACTTGGGGAAAGGATGGACTCTAACTTCGAGCTGTGCAGTTCCGCCAATGTTTGAATGGCAAAAGGGCAAGTTTACCCAGGCTCTAGC 1200
 ATACCTGCTGGGTGCCAAATGTAAGTATGCTTTCACAAGCCGCCCAAAACAACATGTTCTTAAGTCTGGGGTTTGTTCATCTGGCGCTATAATAGCCACTGTGACC 1320
 MetLeuSerGlnThrProProThrLysHisLeuMetPheLeuArgProGlyLeuValPheHisPheGlyLeuIleLeuProThrLeuThr
 TGTGTGTAAAGCACCCGGGACGTACCAAAATAGGGCACCTCCAGTgtagtaaccttttaaacctgttccccatatttttaacacagccattttctctgtctcagacatctcgaaaaca 1440
 CysCysValAsnAspProIlyArgThrLysMetSerAlaProPro
 atgatatactcaattttaaacaagagagctcttgakacataagatttctcagktatcttttggkkaaaagctctcgaagattgctcttttttggggagatctctctagagtcga 1560
 cctcgacgcatcgaaccttggcctaaatcattgkcatagctgtctctctgtgaaatgatacgtctcaac..... 1624

Fig. 2-6B エクソン1' (class B) 付近の塩基配列

矢印は塩基配列解読の方向を示す。459-476の配列は文献(216)による。

も典型的なTATA boxとCCAAT boxをもつプロモーター領域は見られない。これには2通りの解釈ができる。ひとつは現在までに塩基配列の解釈ができていない部分に含まれている可能性である。LundらはNorthern blottingによる結果からRobertsらによって報告されたclass BのcDNAの上流側に当たる部分は切断されなかったイントロンの部分を含んでいるという結果を得ており(私信)、これはclass Bの転写開始点(プロモーター)はさらに上流領域に存在していることになる。もう一つの可能性はTATA boxを持たないhouse keeping gene型の転写開始が行われていると場合である(218)。これは、序論 第3節 (6)作用で述べたIGF-Iのhouse keeping roleと関連があるのかも知れない。しかし一般にhouse keeping geneの場合は、GC-rich領域があつてその中にSp1結合部位がいくつ連続している場合が多いが、IGF-Iの場合はGC含量の極端に高い領域は見られない。何か特殊な機構が働いているのかも知れない。ラットIGF-II遺伝子の構造はIGF-Iのそれに比べかなり詳細に明らかになっている(219, 220, 221, 222, 223)。これはIGF-I遺伝子に比べるとIGF-IIのほうが小さいことや、ラットIGF-IIを高発現している細胞系(BRL-3A)があつたことなどによる。ラットIGF-IIは4つのプロモーターが利用されるが、このうちP1と呼ばれるものはTATA boxを持たないうえ、GC boxも短いものが散在しているのみで転写開始点は120bpに渡って広がっている。IGF-Iの転写開始点はこのタイプに近いものなのかもしれない。これは、Northern blottingで最も短いmRNAも0.8-1.2kbの間に幅広く広がるバンドになることとよく一致する(次章Fig.3-4)。また、結果は示さなかったが、肝臓mRNAを用いてprimer extension法によって開始点を決定しようとしたが、いずれも300-500bp程の範囲に広がるスミアなバンドになり、特定の点を定めることはできなかった。このように幅広い開始点域を有するという場合にも、多くの点からランダムに転写が起きているのか、あるいはそこに何らかの制御が働いているのかという問題も解決しなければならないだろう。特にホルモンによって転写開始点に変化する調節機構の例が見いだされ(224)、興味深い問題である。今後、どの様な点が開始点になっているかを確認し、5'上流領域の構造を明確にするため、PCRを利用したFrohmanらによる5'RACE(225)によってクローンを得て、5'末端の塩基配列の解釈をすることなどが有効であろう。なお、TATA boxを持たない転写開始にも関与する新たな配列としてSmaleらによりInrと

呼ばれる17bpの配列 (GCCCTCATTCTGGAGAC)が提唱されたが(226)、これとホモロジーを有する部分も無かった。

IGF-Iが肝臓で特異的に多く発現する機構についてであるが、これまで遺伝子の肝特異的発現を規定するcis-elementとしてはalbuminや α -fetoproteinのAPF1(HNF-1)結合配列や(227,228)、tyrosine aminotransferaseの組織特異的'extinguisher'結合域(229)等がある。念のため、Fig.2-6の領域のなかにAPF1結合配列と相同性の高い部分があるかを検索したが、特に見あたらなかった。

最後にglucocorticoid responsive element(GRE)の存在について検討してみた。次章で詳しく述べるが、三浦は初代培養肝細胞においてDexamethason(Dex)によってIGF-I mRNAが減少することを観察している(68)。またAdamoらは神経細胞で同様の報告をしている(75)。そこで、GREのコンセンサス配列(GGTCANNTGTCT)(230)との比較を行ってみたが、やはり近い配列は検索されなかった。強いて挙げるならば、estrogenの場合にはコンセンサス配列の片配列が連続することによってestrogen応答性を示すことが示されている(231)が、class Cの1785位から1865位の間にGREの片配列(TCTTGT)とよく一致した配列が5個クラスターを成しているのが目を引く程度である。ただし、IGF-Iの場合は、Dexによって転写が抑えられる場合に属する。近年、glucocorticoidによって転写が抑制される例がいくつか報告され(232)、これはGREとは別の部分への因子の結合によるという(233,234,235)。Negative GRE(nGRE)というものの存在が報告されているが(235)、この場合のコンセンサス配列の様なものが決定されれば、さらに検討してみたい。逆にIGF-I遺伝子がnGRE研究の材料となることも考えられる。

第3章 5'上流領域の機能の解析

第1節 緒論

前章までの結果より、ラットIGF-I遺伝子は少なくとも2つのプロモーター領域が利用されることにより、異なる5'非翻訳領域をもつ複数種のmRNAに転写されることが明らかとなった。しかしながら、このような異種の5'上流領域が存在することの意義は不明である。想像できる意義としては、2つに大別することができる。すなわち転写段階での意義と転写後の段階でのそれである。転写の段階では、各々のプロモーターの活性が異なる調節を受けていて、組織特異的な遺伝子発現、発達段階や他のホルモンなどによる影響を受ける際に独自の役割を有していることが考えられる。例えば、一方のmRNAは常にhouse keeping gene的に発現しており、もう一方は他の因子によって転写が誘導されてくるものである場合が考えられる。また、転写後の段階では、mRNAの安定性や翻訳の効率が各mRNAで異なっており、必要に応じて一方のmRNAを誘導することで生産されるタンパク質の量を調節していること等が考えられる。

いずれの場合でも、IGF-Iの生産を誘導、あるいは抑制するような条件にすると、一方のタイプのmRNA量がより顕著な変動を示すことが想像できる。すなわち片方のmRNAがよりinducibleであると仮定できる。そこで、本章では前章で明らかとなった2つのプロモーター領域(エクソン1、1')から生産されるmRNA種(class C、class B)のそれぞれの量が、栄養条件、あるいはホルモンの影響でどの様に变化するかを検討した。

近年、プロモーターの活性を測定する方法として多く用いられているのが、chloramphenicol acetyl transferase(CAT)をはじめとするreporter geneを利用する方法である。この方法は簡便かつ鋭敏であり、多くの場合非常に有効な手段である。例えば、ラットIGF-IIの場合も複数のプロモーターが知られている(219,220)が、各々の活性の測定に実際にCAT assayを用いた報告がある(222)。しかしこのIGF-IIの場合でも、CAT assayの結果がもともとの細胞でのプロモーター活性を反映していないことが報告されており、一般にCAT assayは定量

的な扱いには適さない場合が多い。また当該遺伝子のように転写開始点が一定せず広い幅に渡って分布している場合には、この方法は利用しにくい。本研究では、細胞内に存在するIGF-Iの各mRNA種の量をoligonucleotide probeを用いて定量することで各mRNA種（各プロモーター）の性質を探ろうとした。

同様の試みとして、Loweら(206)はnuclease protection assayによって、各組織や培養細胞での各classのIGF-I mRNA量を区別して定量することに成功している。当研究室でも田中によりこのアッセイ法が用いられるようになった。この方法は簡便で感度も良く非常に有用である。しかし、第1章で明らかになったようにIGF-I mRNAの場合には、5'上流域の多様性の上に、3'側の違いからくるmRNAのサイズの多様性も同時に考慮しなければならない。Protection assayは各classのmRNAの総量を知るには適しているが、もともとのmRNAの長さについての情報は得られないのが欠点になってくる。そこで本章では各classのmRNAの量の変化をそれぞれの長さのものについて知ることができる方法として、oligoDNA probeを用いたNorthern blottingを導入したものである。この方法の最大の弱点は、感度が低いことである。特に、IGF-IのようなmRNAのコピー数が多くないものを検出しようとする場合には、多くの困難が伴う。本章でははじめにNorthern blottingの条件を検討し、さらにこの方法の応用を試みた。

序論中で述べたように、当研究室では食餌タンパク質の量、および質の違いによって血中IGF-I濃度、および肝臓内IGF-I mRNA量が大きく変化することを明らかにした。それでは、実際に栄養条件の影響を強く受けているのはどちらのclassのmRNAであるかということが次なる問題となる。本章第4節ではoligo probeによるNorthern blottingによりこの疑問を解決しようとした。

さらに当研究室三浦らによって、ラット初代培養肝細胞がIGF-Iを培地中に分泌することが確認され、分泌量やmRNA量のホルモンや血清、あるいはアミノ酸による調節機構が研究されてきた。インスリン、成長ホルモンなどを培地に添加すると、IGF-I分泌量、mRNA量が増加することなどが観察されているが、最も劇的な効果を示したのがdexamethasoneであった。すなわち、24時間の培養中、IGF-Iの合成（分泌）量は数倍に増加させたのに対して、mRNA量は逆に減少させることが明らかとなった。このparadoxicalな現象をさらに詳細に検討し、その

機構を解明するため、各classのmRNA量に対するdexamethasoneの効果を検討した。

第2節 方法

(1) RNAの分離

肝臓、または初代培養肝細胞からのtotal RNAの分離はGlisinらの(239) グアニジンチオシアネート法を用いた。肝臓組織、あるいは培養細胞を6M guanidine solution中でホモゲナイズし、全量を7mlにして0.2g/mlのCsClを加えた。Hitachi 13PA tube中のcushion(5.7M CsCl, 0.1M ETA, pH7.5) 3mlの上に重層し、Hitachi RPS-40Tローターで30,000rpm, 4°C、20hr遠心した。沈澱をSDS-Tris(10mM Tris-HCl, 5mM EDTA, 1% SDS)1mlに溶解し、クロロホルム-ブタノールを加えて水層を回収した。SDS-Tris もう1mlでさらに抽出して水層を合わせてエタノール沈澱を行った。

(2) Poly (A)⁺RNAの精製

本章での実験ではoligo dTラテックスビーズ (OligotexTM-dT30, TAKARA) を利用してmRNAの精製を行った。方法は添付のプロトコールに従ったが、オリゴテックスは5~6回再生して利用した(240)。

(3) Northern blotting

プローブには第1章および第2章でも利用したclass B特異的oligo DNA プローブとclass C特異的プローブを用いた。(Fig.3-1)

In vivo肝臓からの場合は10μg、初代培養肝細胞の場合には15μgのpoly (A)⁺RNAを17.5%formamideで変成させ、1.5% Agarose, 2.2M formamideを含むゲルで180Vで約2時間泳動した。トランスファーおよびハイブリダイゼーションは文献(206),(241)に従った。泳動終了後のゲルを1M酢酸アンモニウムに30分間浸す。その後、1M 酢酸アンモニウムをトランスファーバッファーとして、キャピラリー法で常法に従ってGeneScreen (NEN) に、RNAのトランスファーを行

った。真空下80°Cで2時間ベーキングした後、-20°Cで保存した。プレハイブリダイゼーションは5xSSPE/20% formamide/10xDenhardt's solution/1% SDS/salmon sperm DNA(100 μg/ml)で50°Cで2時間行った。ハイブリダイゼーション用液は5xSSPE/20% formamide/1% SDSに 1×10^5 cpmのプローブを加えたものに、未使用のGeneScreenを0.1xSSPEで洗浄したものをいれて、2時間50°Cでインキュベーションし、その後100°Cで10分間煮沸し、さらにこれを孔径0.22 μmのフィルターで濾過したものをを用いた。ハイブリダイゼーションは50°Cで約22時間行った。続いてフィルターの洗浄を2xSSPE, 0.2% SDS, 40°Cで30分間を2回、次に0.5xSSPE, 40°Cで15分間、さらに5分間行った。オートラジオグラフィーは4日間露光した。

(4) 動物

Wistar系雄ラット(150g、日本SLC)を固形飼料で6日間予備飼育し、その後、5頭3区に分け、12% Casein食、12% Gluten食、無タンパク食を8日間(10:00~18:00)与えた。(餌の組成をTable 3-1に示した。)翌日各食餌を1時間摂取させた後、ネブタール麻酔下で、頸動脈から採血すると共に、肝臓を摘出した。肝臓は液体窒素で凍結後、-70°Cに保存した。

血液は予めEDTAを加えた遠心管に採取し、3000xgで10分遠心した後、RIA用バッファーで100倍に希釈し、RIA(ソマトメジンC 栄研、栄研イムノケミカル)に供した。

(5) 初代培養肝細胞

初代培養肝細胞の分離はコラゲナーゼ選流法を用いた。方法は成書に詳しいので省略する(242, 243)。培養は従来から当研究室で行われてきた方法(244, 68)を改良して行った。培養には100mmφのcollagen coated dish(Corning 25020 coll)を用い、1枚当り 5×10^5 cellをWilliams' E medium(以下WE, Flow laboratory)に10%牛血清、 10^{-6} Mインスリン、 10^{-6} Mデキサメタゾン(以下Dex)を含む培地6mlで5% CO₂下2時間培養した。その後、同じ培地に交換し、12時間培養後、0.1%BSAを含むHanks' solution(日水製薬)で3回洗浄し、血清を含まない実験培地(Dexを 10^{-6} M含むあるいは含まない、他のホルモン等を含ま

class B specific : 5'TGCGCTCATTTTGGTACGTCCCGGGTCGTTTACACA3'

class C specific : 5'CTTCAAGAAGTCACAĠAGGCAGATCTTAAATAATTGAGTT3'

Fig. 3-1 第3章で使用した2種の合成DNAプローブ

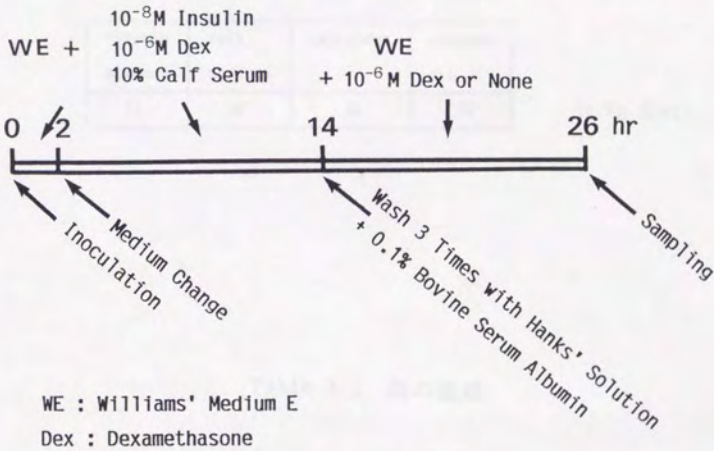


Fig. 3-2 初代培養肝細胞の培養条件

| | β -cornstarch | gluten | casein | glutamic acid | methionine |
|---------|---------------------|--------|--------|---------------|------------|
| PF diet | 850 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Gluten | 720 | 120 | 0 | 10 | 0 |
| Casein | 728 | 0 | 120 | 0 | 2 |

General Composition of Various Diets

| vitamin mixture | salt mixture | cellulose | soybean oil |
|--------------------|-----------------|-----------|----------------|
| 10 | 40 | 50 | 50 |

(g/Kg diet)

Table 3-1 餌の組成

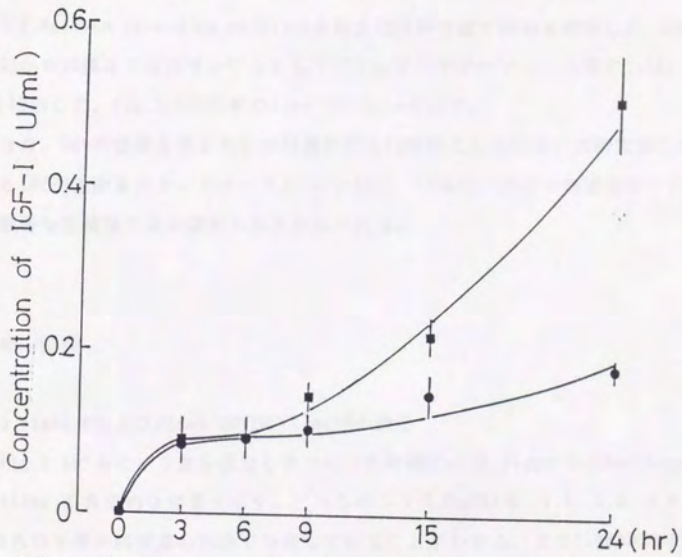


Fig. Time course for effect of Dex on IGF-I secretion

●: Control ■: Dex

Fig. 3-3 ラット初代培養肝細胞におけるIGF-I分泌量に
対するDexamethasone (Dex) の影響 (三浦豊、未発表)

ない培地)に交換し、12時間後、ランダムに選んだ各群3枚のdishから培地各1mlを採取し、さらにすべての培養を氷冷したPBS⁻で1回洗浄した後、各dishあたり0.8mlの6M guanidine solutionを加え20分間室温で細胞を溶解した。Dish7枚から10枚を1点のサンプルとしてグアニジンチオシアネート法でtotal RNAを抽出した。Fig.3-2に培養のtime scheduleを示す。

なお、Dexの効果を見るための培養時間を12時間としたのは、当研究室三浦によるIGF-I生産量のタイムコース(Fig.3-3)で、12時間の時点で無添加区との間に顕著な生産量の差が認められたからである。

第3節 結果

(1) class Bおよびclass CのIGF-I mRNAの構造

Fig.3-4にカゼイン食を摂取したラットの肝臓のmRNA 15 μ gからのNorthern blottingの典型的な結果を示す。どちらのクラスのmRNAも、7.4、2.0、0.8-1.2の各分子種が同程度の比率で分布していることがわかる。また7.4kbの下に薄いバンドが見られる(6.0kb)。7.4kbのバンドの強さを1としたときの2.0、0.8-1.2kbの各バンド相対的な強さは、class Bで3.7、35.3、class Cで3.1、23.2となった。これは三浦によるcDNAをプローブにした結果(Fig.1-7A参照)に比べ長いmRNAの相対量が非常に低くなっている。しかし当研究室での多くの実験から、長いmRNAは実験の条件やRNAの調製法などによって変動が大きいことが経験的に明らかとなっているため、total RNAで行ったcDNAプローブの結果とpoly A RNAで行っている今回の結果とを単純に比較することはできない。この結果から明らかなのは、各々の長さのmRNA群は常に両方のクラスのmRNAを一定の比率で含んでいるということである。換言すれば、5'端の構造は3'端の構造に影響を及ぼさないと考えられる。

さらに、Fig.3-4より0.8-1.2kbの長さのバンドの内部でも、class Bは0.8kbに近い短いものが多く、class Cではそれよりも長い部分を中心になっていることがわかる。5'上流域はclass Cのほうがやや長い構造を持っていることが示唆される。2kbのバンドに関しても同様の傾向がみられるが、このバンドは

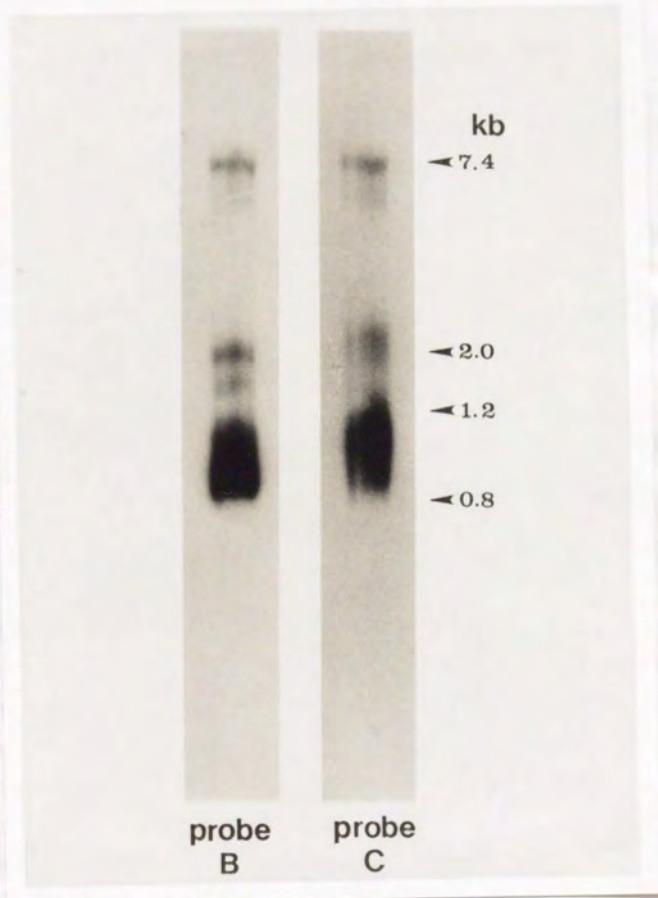


Fig. 3-4 class Bおよびclass C特異的合成プローブによる
ラット肝臓mRNAのNorthern blot分析

class Bのほうでは明確に2本のバンドに分かれていた。これがどの様にして生じるかは現在のところ不明である。

(2) 各クラスのmRNAに対する栄養条件の影響

Table 3-2にカゼイン食、グルテン食、無タンパク食で8日間飼育したラットの体重および血中IGF-I濃度を示す。宮川(8)および三浦(68)による結果と同様の結果が得られた。すなわち、IGF-I血中濃度はグルテン食ではカゼイン食の約1/2に減少し、無タンパク質食ではさらにその1/2になっていた。

Fig. 3-5(class B)およびFig. 3-6 (class C)にNorthern blottingの結果を示す。各レーンはラット2頭のmRNAをあわせて泳動した結果を示す。本実験では0.8-1.2kbのバンド以外は検出できなかった。Table 3-2に各レーンのバンドの強さをデンスitomーター(島津フライングスポットスキャナー、CS-9000)によって測定した結果も示した。class BのIGF-I mRNAもclass Cの場合でもグルテン食によって大きく減少していた。しかし無タンパク質食では血中濃度に反してどちらのclassもmRNAの減少は少なく、グルテン食よりも多くのmRNAが存在していた。

(3) 初代培養肝細胞における各classのIGF-I mRNA量に対するDexamethasoneの影響

Fig. 3-7にDexamethasone(Dex)添加および無添加(Con)のNorthern blottingの結果(class B)を肝臓mRNA(L)のものと共に示した。肝臓の細胞は初代培養にするとIGF-I mRNAが減少して行くことが観察されている(57)(三浦、未発表)。Fig. 3-7の結果でも肝臓に比べ、mRNA量は少なく、特に7.4kbのバンドは観察できなかった。培養条件等にもよるのであろうが、初代培養肝細胞ではこのバンドが検出できない場合がいくつか見られる(68,54)。

培地中のIGF-Iを測定した結果およびclass B, class CのプロープでNorthern blottingを行いデンスitomーターで測定した結果をTable 3-3にまとめた。mRNA収量の関係で、class Bのみ2回実験を繰り返した。Dex添加により培地中のIGF-I量は2.2倍に増加したが、mRNA量は約70%に減少した。これはcDNAを用いた三浦の結果(68)および神経細胞を用いたAdamoらの結果(75)と一致する。こ

| | Casein | Gluten | Protein Free |
|--|------------|------------|--------------|
| Body Weight Gain (g/8days) | 11.2 ± 3.0 | -9.2 ± 2.4 | -20.2 ± 1.0 |
| Plasma Immuno-reactive IGF-I (U/ml) | 10.1 ± 0.5 | 4.6 ± 0.5 | 2.5 ± 0.2 |
| Class B IGF-I mRNA (x10 ⁴) | 10.5 | 4.6 | 7.0 |
| Class C IGF-I mRNA (x10 ⁴) | 8.4 | 3.1 | 7.8 |

Table 3-2 カゼイン食、グルテン食、無タンパク食の各食餌区のラットの体重増加、血中immunoreactive IGF-I濃度、および肝臓中の各classのIGF-I mRNA量

mRNA量はデンシトメーターでの値を平均したものをそのまま表示した。

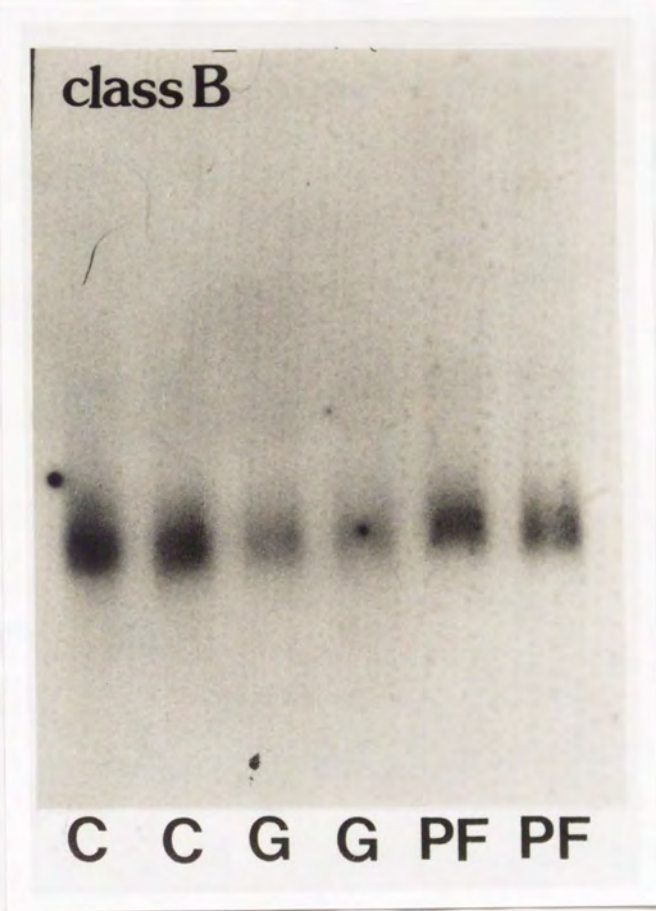


Fig. 3-5 食餌タンパク質のclass B IGF-I mRNA に対する影響

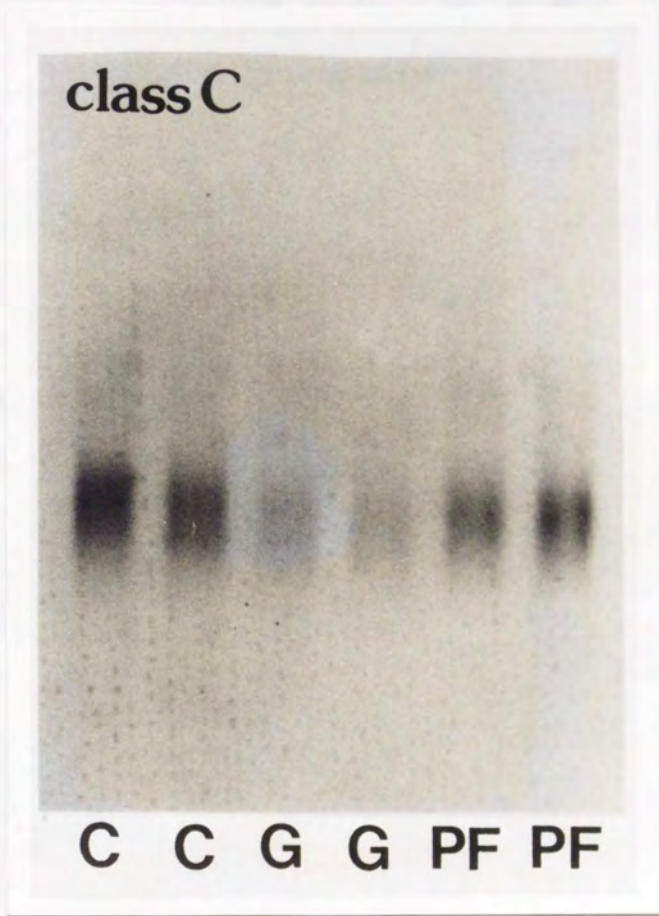


Fig. 3-6 食餌タンパク質のclass C IGF-1 mRNAに対する影響

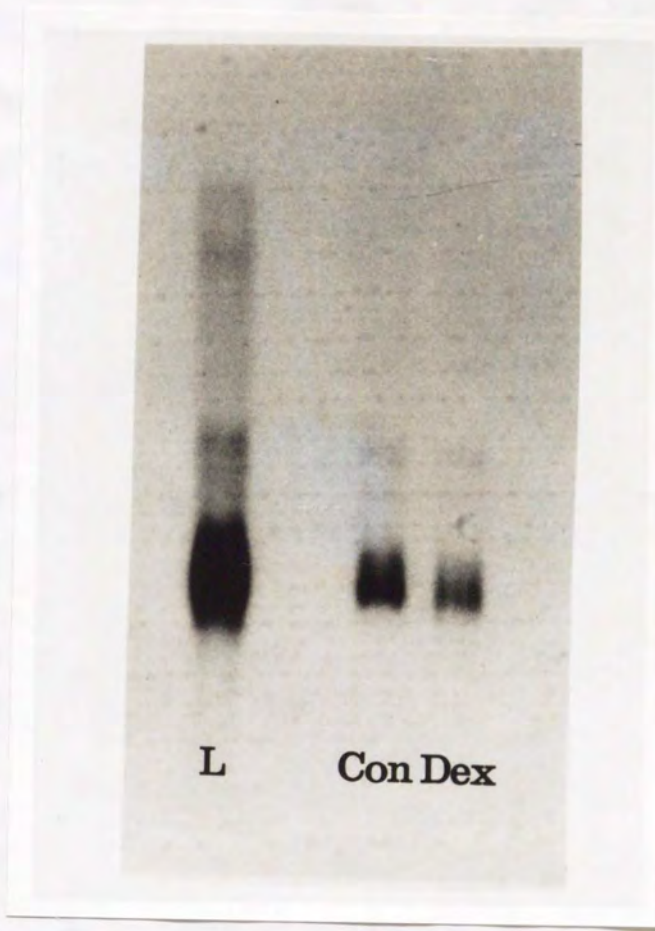


Fig. 3-7 初代培養肝細胞におけるclass B IGF-I mRNA量に対する Dexamethasoneの効果

L : in vivo肝臓 mRNA 10 μ g

Con: 初代培養肝細胞 無添加 mRNA 15 μ g

Dex: 同 10⁻⁶M Dexamethasone添加 15 μ g

Table 3-3 ラット初代培養肝細胞における12時間のIGF-I分泌量および各classのIGF-I mRNA量に対するDexamethasoneの効果

mRNA量は、対照区の値を100とした相対量で示した。

| IGF-I in the Medium (U/ml) | Control | Dexamethasone |
|----------------------------|-------------|---------------|
| | 0.60 ± 0.04 | 1.32 ± 0.14 |
| IGF-I mRNA Class | 100 | 61.0 |
| Relative Density | 100 | 85.2 |
| (% of Control) | 100 | 75.0 |
| class B exp.1 | | |
| exp.2 | | |
| class C | | |

の結果よりDexはclass Bおよびclass CのmRNAの両方を減少させることが明らかとなった。

第4節 考察

Oligonucleotide probeを用いたNorthern blot分析は、多くの貴重な情報が得られるが、感度の点で劣るので多くのサンプルを必要とするので、費やされる労力も大きい。特に肝細胞を初代培養すると細胞内のIGF-I mRNAは約1/20に減少することが報告されており(57)、初代培養肝細胞系ではさらに困難となる。これまでこの方法をラットIGF-IのmRNAの解析に利用しているのはHoytらの報告(245)がある程度である。本章の結果(1)より5'上流領域の多様な構造と、3'側の構造の利用のされ方とは独立したものであることが明らかになった。また、class Bおよびclass CのmRNAのサイズが多少異なることなどが観察された。今後、この方法はIGF-I遺伝子の構造の解明の手段としてさらに有効に活用されよう。

タンパク質栄養とIGF-I mRNAの関係はやや複雑な様相を示した。すなわち、血中IGF-I濃度はグルテン(G)食が無たんぱく質(PF)食よりも高かったが、mRNAレベルは逆になっていた。これはclass B, class C両mRNAに共通の現象であった。この結果は次のように解釈できると思われる。G食ではカゼイン(C)食に比べIGF-I mRNAの転写あるいは安定性が減少することによってmRNA量が減り、これが血中IGF-I減少の直接の原因になっている。一方、PF食ではIGF-I mRNAの翻訳が極端に低下するために血中濃度が減少するものと考えられる。この場合、mRNAがG食より多くなっているのは、血中濃度の大きな減少が転写段階にfeedbackされてmRNA量を高く保つ機構が働いているか、あるいは翻訳されない(使われない)IGF-I mRNAの寿命が長く保たれているかどちらかであろう。三浦によってcDNAを用いたNorthern blottingの結果ではGとPFでmRNAレベルがほぼ同程度であり、今回の結果とやや異なるが、この差異はPFでのmRNA保持機構の働いた強さのばらつきと考えると矛盾は生じないであろう。実際に三浦の結果でも7.4kbの長いバンドはGよりPFのほうが多かった。この7.4kbのバンドは様々な条件による変動が大きく、IGF-I mRNAを減少させるような条件にしたり、初代培

養肝細胞で微妙な条件の変化で検出されなくなってしまう場合が多い。従って逆に栄養条件を非常に鋭敏に反映するバンドである可能性が大きい。今回の実験ではこのバンドを検出することができなかったが、さらに条件を検討するなどして、oligonucleotide probe でも安定してこのバンドを測定することが可能になれば、さらに有用な情報が得られるかも知れない。

以上(2)の結果をまとめると、タンパク質摂取量の減少は翻訳段階に作用し、アミノ酸のアンバランスはそれ以前の段階に作用することでIGF-I合成量を減少させていると考えられる。

既に述べたようにDexは初代培養肝細胞においてIGF-I mRNA量を減少させるにも拘らず、合成量を増加させる。本章のDexの実験はこの現象の矛盾を解決することを目的として計画したものである。肝臓ではclass CのmRNAが70%を占めるが(206)、もしDexがclass CのmRNAを減少させる一方でその他の(class Bの)mRNAの量を増加させるならば、そしてclass BのmRNAのほうが本質的にtranslatabilityが高いならば(肝臓以外の臓器ではclass C mRNAが100%近くを占めることはこの仮定を支持する)、上記の矛盾は解決される。しかし結果はこの作業仮説に反し、class B、class C何れのmRNAもDexにより減少した。三浦は、Dexによるtotal IGF-I mRNAの減少は転写の段階で生じることを確認している。従って、DexはIGF-I遺伝子の転写を抑制する一方で、mRNAの翻訳を増加させるという相矛盾する作用を発揮していることが明確になった。Glucocorticoidによる転写抑制については第2章に述べたように、いくつかの例が報告されており、その機構も研究されているが(232)、翻訳亢進の機構に関しては現在まで見解が得られていない。この機構を解明するのは将来の課題であろう。

第4章 大腸菌による ラットIGF-Iの生産

第1節 緒論

第3章までの内容は、IGF-Iの”生産”の調節機構の解明を目的とするものであった。しかし、生産されたIGF-Iがどの様にして血中を運搬され、また各組織・細胞によってどの様に利用されるかという点を明らかにしなければ、このホルモンが生体において果たしている役割を解明することはできない。当研究室でも、IGF結合タンパク質（以下IGFBP）の血中や培養細胞における動態(8,11)やその遺伝子のクローニングや発現量の解析、またIGF-Iの培養細胞における作用機作、レセプター遺伝子のクローニングなど精力的な研究が続けられている。このようなレセプター、あるいはBPに関する研究において必要不可欠であり、また最も有効な道具となるのが、IGF-I分子自身であろう。特にラットを用いる実験系においては、ラットIGF-Iが利用できるのが望ましいといえる。しかしながら現在までのところヒト以外のIGF-Iは入手することができない。1章に記した通り、ラットIGF-IとヒトIGF-Iは構造的に非常に近いので、次善の策としてはヒトIGF-Iで代用することも可能ではあるだろう。しかしこのヒトIGF-Iも非常に高価であり、このことは多くの研究の進展を阻んでいる。そこで本章では、ラットIGF-I cDNAを材料として、組み換えDNA法を利用し、大腸菌によるラットIGF-Iの生産を試みた。

ラットIGF-Iが豊富に得られるようになると、以下のような目的への利用が期待される。

- ・抗IGF-I抗体の取得：抗体を得ることによって、RIAへの利用、血中や培養細胞培地中のIGF-I作用のblockerとしての利用(246)、アフィニティーカラムを作成して天然型のIGF-Iの取得等の用途に用いる。
- ・BP研究への利用：既に行われているように(11,114)ウエスタンリガンドブロッティング法やリガンドクロスリンク法によるBP定量のプロープとして用いる他、様々な条件での各BPのIGF-Iへの結合の強さ等も調べることができる。IGF

-IAフィニティーカラムによるBPの精製に利用し、得られたBPの構造の解析や、IGF-Iとの結合状態の解析に用いる。さらに抗BP抗体も得ることができる。

・IGF-Iの作用機構解明への応用：培養細胞、あるいは細胞膜のレセプターとの結合実験、あるいは結合後の作用発現機構の解析に用いる。

・実際に動物にIGF-Iを注射する：現在までにラット(61,161,163)に組み換えヒトIGF-Iを注射してその効果を調べた報告があるが、一般には十分量のIGF-Iの取得は不可能であり、そのような実験の例は少ない。大量培養によって得たラットIGF-Iをラットに注射してヒト型のものとの活性の違いや、ラットのBPとの結合の差異を検討する。さらに豚、牛等の家畜に注射してみることにより畜産業への応用も期待できる。

本章では、まず *tac* promoter、*lac* promoter を利用して大腸菌細胞質内に IGF-I を蓄積させることを試み、さらに *phoA* ベクターを用いてペリプラズム空間に分泌させる方法も導入した。

第2節 *tac*、*lac* promoterを用いた生産

(1) cDNAへの位置指定変異の導入

a) 計画および原理

prepro IGF-IはシグナルペプチドおよびC末端のEペプチドという、成熟分子には含まれない部分を含む。これらの部分を除き、B,C,A,Dの領域のみを発現ベクターにクローニングする目的で、始めにcDNAに位置指定変異(site directed mutagenesis)を導入した。また、B領域の先頭から正しく翻訳を起こさせるために開始コドン(B領域の直前に導入し、さらにリボゾーム結合領域としてプリンを多く含む配列(UAAGGAGGU)の一部が必要とされるが、このいわゆるS-D配列(247)を置くことを計画した。また、D領域の直後に終止コドン(TAA)を入れた。このような計画のもとで、必要なoligonucleotide2本を合成した(Fig. 4-1)。また、これらのoligonucleotideは、変異の確認、およびベクターへの

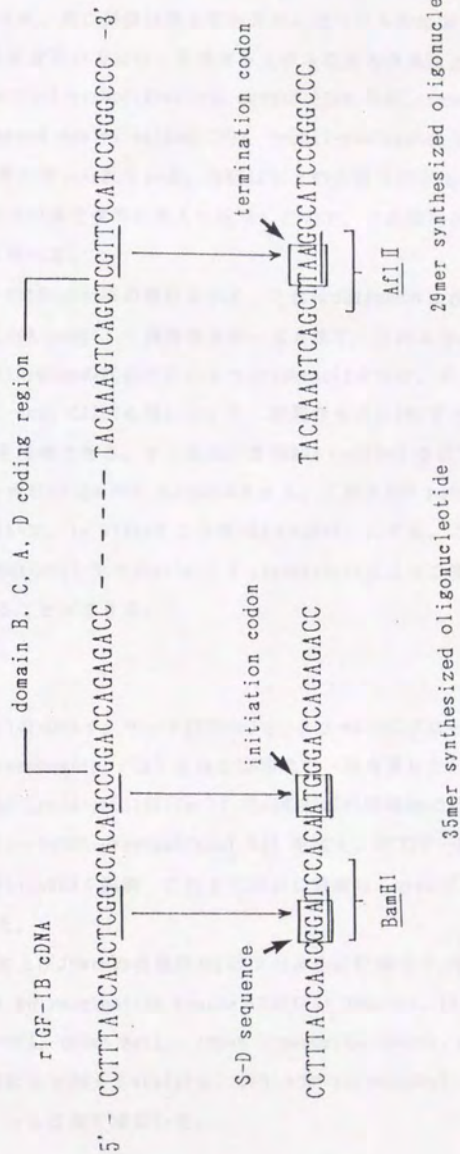


Fig. 4-1 Site Directed Mutagenesisに用いた合成DNA

導入を容易にするため各々新たな制限酵素切断部位を設計してある。oligonucleotideの合成、及び精製は第1章の方法に述べたものに準じた。

位置指定変異の方法は、変異率を上げるための改良法として、Phosphorothioate-modified method(Eckstein method)(248,249)、amber変異M13ファージを用いるGapped duplex method(250)、Uracil-containing method(Kunkel method)(251)等が用いられている。今回は以上の3通りの方法をすべて試みたが、最終的にKunkel法で変異の導入に成功したので、この原理と具体的な方法について以下に述べる。

Fig.4-2にKunkel法の概略を示す。これはdUTPaseおよびuracil glycosylaseの欠損 (dut^- , ung^-) 大腸菌株を用いる方法で、このような菌株内で増殖したファージはthymineの代わりにいくつかのuracilを含む。まずこのような菌株(ここではE. coli CJ236を用いた)で、変異させたいDNAをクローニングしたM13ファージを増殖させる。そこから一本鎖DNA(ssDNA)を調製し、これに変異させる配列を含むoligo DNAをannealさせる。これをDNA polymerase klenow fragmentを用いて、in vitroで二本鎖DNA(dsDNA)にする。これをwild typeのE. coliにtransfectしてそのuracil N-glycosylaseによって変異した側の鎖由来のDNAを得ることができる。

b) 方法

pIGFI/1のcDNAインサート(674bp)を、M13 mp18にクローニングした。30 μ g/mlのChloramphenicol(Cm)を含むLB培地で一晚培養したE. coli CJ236 (dut^- , ung^- , thi^- , $relA^-$; pCJ105(Cm^r)) 10 μ lを20mlの同培地に移し、6時間培養した。ここに $1 \sim 3 \times 10^6$ のrecombinant M13を加え、37°Cで一晩培養した。上清から常法に従いssDNAを調製、これをTE50 μ lに溶解し、uracil containing ss M13溶液を得た。

29merおよび35merの合成DNAは以下のように5'端のリン酸化を行った。10 μ gのDNAにT4 polynucleotide kinase (TAKARA) 20units, 10 \times kinase buffer (500mM Tris-HCl, 100mM MgCl₂, 100mM 2-mercaptoethanol, pH7.6) 4 μ l, 10mg/ml ATP 4 μ lに水を加えて40 μ lにし、37°C 1 hr incubationした後、70°C 15min加熱、エタノール沈澱で濃縮した。

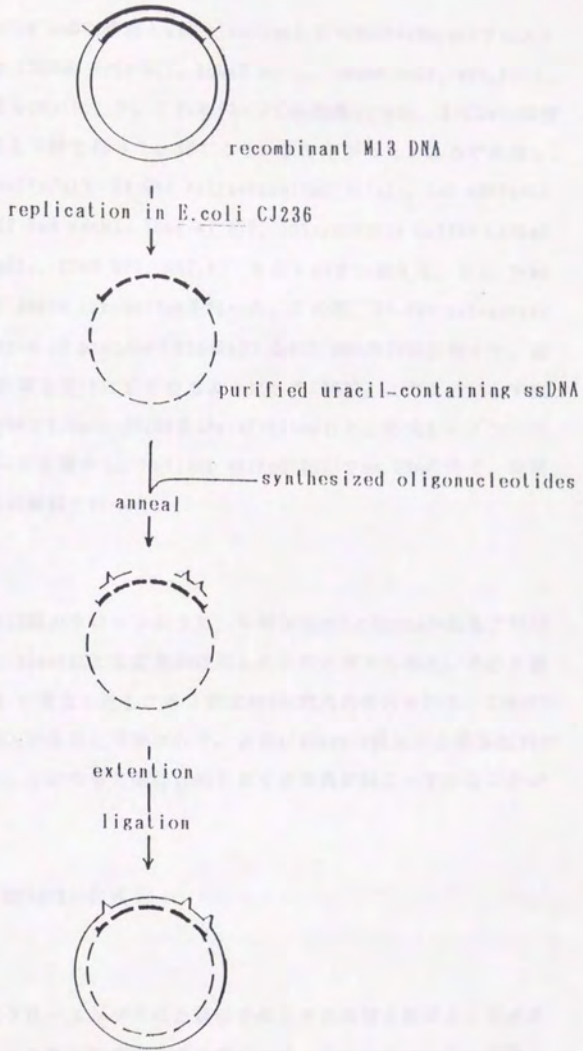


Fig. 4-2 Kunkel法によるsite directed mitagenesis の概略

Uracil-containing ssDNA溶液 1 μ lにkinationした合成DNA200 μ molずつと10Xannealing buffer (200mM Tris-HCl, 100mM MgCl₂, 500mM NaCl, pH7.4) 1 μ lを加え、水で液量を10 μ lにした。これを92~3°Cの熱湯につけ、1°C/min程度の割合で徐々に温度を下げて行った。30°Cくらいまで下がったところで氷冷し、T4 DNA ligase(350units/ μ l)、T4 DNA polymerase(4units/ μ l)、5mM dNTP(dATP, dCTP, dGTP, dTTP 5mM each)、10mg/ml ATP、10Xsynthesis buffer (100mM Tris-HCl, 50mM MgCl₂, 20mM DTT, pH7.4) を各1 μ lずつ加えて、0°C 5min、25°C 5min、37°C 90min incubationを行った。この際、T4 DNA polymeraseを加える直前にT4 gene 32 protein (Bio-Rad) をM13 DNAの10倍量加えて、鋳型DNAの2次構造の影響を受けにくくなるようにした(252)。このようにして出来たheteroduplex DNAでE.coli JM109をtransfectionした。形成したブラークから2ml培養でファージを増やし、boiling method(181)でds DNAを得て、制限酵素処理により変異の確認を行った。

c) 結果

無作為に選んだ12個のクローンのうち、6個はBamHIとEcoRIの処理で約500bpの断片が得られ、35merによる変異が成功したものと考えられた。その6個についてSmaIとAflIIで消化したところ5個は400bp程度の断片を持ち、29merでの変異をも同時に導入できたと予測された。さらにdideoxy法による塩基配列の確認を行ったところ、このうち3個に目的どおりの変異が起こっていることがわかった。

(2) pIGFtacl, pIGFlac2の作成

a) 計画

発現ベクターにクローニングされた遺伝子からその産物を効率よく生産させるためには次のような因子を考慮する必要がある。すなわちpromoterの強さ、翻訳開始配列およびそのpromoterとの距離、mRNAの二次構造、転写終結、コードンの使用頻度、さらにplasmidのコピー数や安定性、宿主細胞の生理状態等である。多くのpromoterがこの目的で用いられ、強力な合成promoterなども作成さ

れ利用されている。しかしmRNAの二次構造などは予測が困難であり、どの promoterを用いればよいかなど個々の例についての最適の条件を予め決定するのは不可能である。ここでは強力な雑種 promoterである lac promoter(253)と lac operonの lac promoter(254)を用いてみた。

b) 方法

・ pIGFtacl

lac promoterは plasmid pDR540 (Pharmacia)のものを利用した。Fig.4-3にpIGFtacl作成の概略を示す。変異させたpIGF1/1を持つM13 phageの2本鎖(ds)DNA、pDR540、pBR322(Takara)の各約1 μ gをそれぞれEcoRI+BamHI、 BamHI + PstI、 PstI+EcoRIで消化し、Agarose ゲル電気泳動(以下AGE)を行って必要とする断片(各0.4kb、1.1kb、3.6kb)を切り出し、Chenらの方法(255)によってゲルから抽出した。各DNA断片を混合し、T4 DNA ligase(350units/ μ l,Takara) 2 μ l, 10xligase buffer(660mM Tris-HCl, 50mM MgCl₂, pH7.6) 4 μ l, 10mM ATP 4 μ l, 50 mM DTT 4 μ lを加え、水で40 μ lにして4°C一晩静置してligationを行った。これを用いて常法により調製したJM105 competent cellをtransformし、アンピシリンで選択した。形成されたコロニーからランダムにクローンを選び液体培養を行い、boiling methodでplasmid DNAを得た。EcoRI, EcoRI+BamHI, BamHI, HindIIIの4通りの制限酵素処理を行って、plasmidの構造の確認をした。

・ pIGFlac2

lac promoter 制御下にある lac Z 中にBamHIとEcoRIのsiteを持つplasmid pUC119に変異型IGF-I cDNAをクローニングし、これをまずpIGFlaclとした(Fig.4-4)。pIGFtaclの場合と同様に行ったが、今回はアンピシリンに加えてX-gal(5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- β -D-galactoside)とIPTG(isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside)を添加して、lac Zの挿入失活によって選択した。

このクローンを用いて誘導をかけた場合、翻訳は lac Zの翻訳開始点を利用することになり、本来のIGF-IのN末側に β -galactosidaseのN末のいくつかのアミノ酸が結合した形で合成される。この場合、生成した融合タンパク質を臭

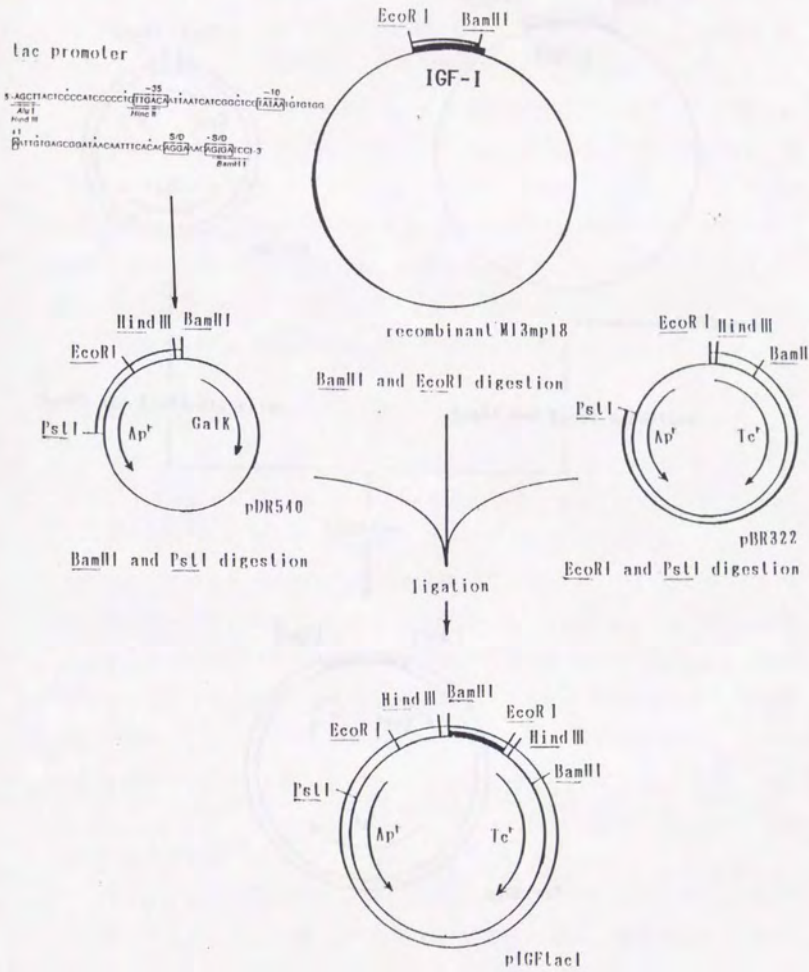


Fig. 4-3 pIGFtac1の構築

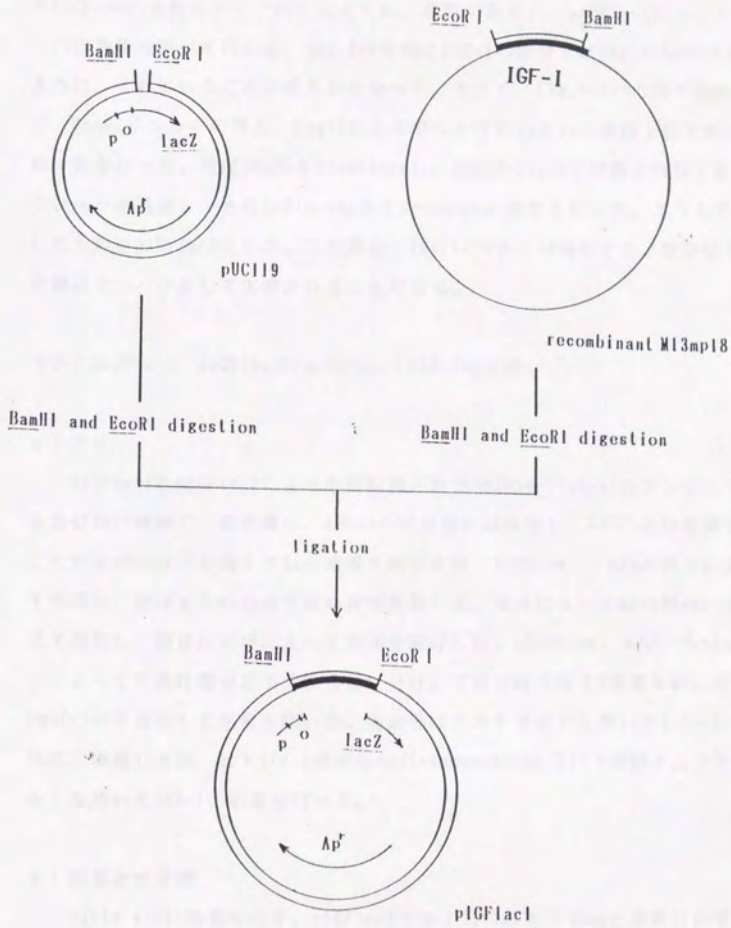


Fig. 4-4 pIGFlacIの構築

化シアンで切断することによりこの部分は除くことができる(実際にはIGF-I内の59位のMetを他のアミノ酸に変えておく必要がある)。pIGFlac1についてコードンの読み枠を調べて行くと、lac ZのものとIGF-Iの部分ではFig.4-5bに示したように、ずれていることが明らかとなった。そこで、Fig.4-5の方法でHincII消化、BamHIリンカーの挿入、BamHIによる消化と再結合という過程を経て読み枠の一致を行った。再度JM105をtransformし、XbaIやHincIIで切断されなくなったクローンを選択し、さらにdideoxy法でsequenceの確認を行った。こうして完成したものをpIGFlac2とした。この場合、IGF-IのN末に16個のアミノ酸が結合した融合タンパクとして生産されることになる。

(3) pIGFtac1、pIGFlac2によるラットIGF-Iの生産

a) 方法

pIGFtac1とpIGFlac2により形質転換されたJM105を50 μ g/ μ lのアンピシリンを含む2xYT培地で一晚培養し、100mlの同培地に1%接種し、37°C 4hr培養した。ここで2mMのIPTGを加えて24hr培養を続けた後、5000rpm, 5minの遠心によって集菌し、菌体を5mlの水で洗い再び集菌して、菌体に3~4mlのPBS(-)を加えて攪拌し、超音波処理によって菌体を破碎した。10000rpm, 4°C, 5minの遠心によって可溶性画分と不溶性画分に分け、不溶性画分は8M尿素5mlに溶解し、PBS(-)中で透析して尿素を除いた。各画分はアクアサイドを用いて1.5~2.5ml程度に濃縮した後、ヒトIGF-I測定用radioimmunoassay kit(栄研イムノケミカル)を用いてIGF-Iの定量を行った。

b) 結果及び考察

Table 4-1に結果を示す。pIGFtac1では1litter当り10ngと非常にわずしか検出できなかった。pIGFlac2では可溶性の画分に200ng/l程度のIGF-Iが検出された。顕微鏡で観察した限りでも封入体(inclusion body)を形成している様子は見られなかったため細胞質内に可溶性の状態で存在しているものと考えられた。何れの場合でも生産量は非常に少なく、この原因としては多くの可能性が考えられる。

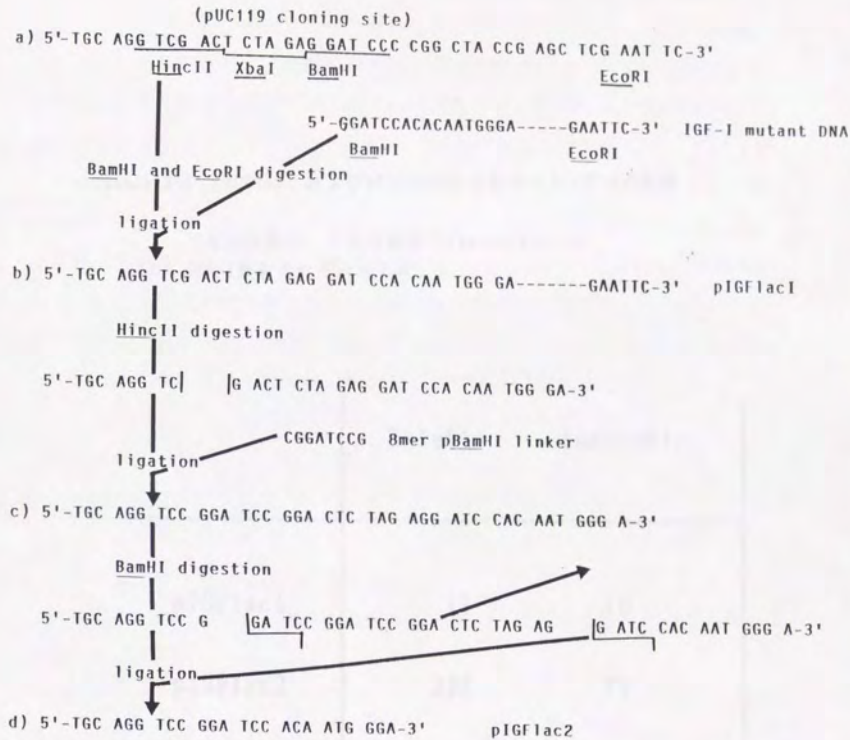


Fig. 4-5 pIGFlac2の構築

pIGFlac1を作成するところから、さらに読み枠を合わせて pIGFlac2を完成するところまでを示した。

Table 4-1 pIGFtac1 およびpIGFlac2によるラットIGF-1の生産

可溶性画分、不溶性画分のimmunoreactive IGF-1量をそれぞれ示した。

| | Soluble | Insoluble |
|----------|---------|-----------|
| pIGFtac1 | 11 | 10 |
| pIGFlac2 | 227 | 75 |
| JM105 | 6 | 8 |

(ng/l)

一般に大腸菌の菌体内で異種タンパク質を発現させると菌体内プロテアーゼによって速やかに分解を受けることが認められている(256)。この量を超えてさらに多くの外部タンパク質が合成されるような場合にはinclusion bodyと呼ばれる不溶性の多分子凝集体が細胞内に蓄積する。これは生成されたタンパク質がランダムなジスルフィド結合を結んで形成するとされているが(257)、合成したタンパク質の精製を困難にし活性のあるタンパク質を得るために様々な工夫が必要となるが、異種産物を分解から保護するという点では有用である。合成される異種タンパク質の分子量が小さい場合(10000以下)はこのような封入体は形成しにくく分解されてしまいやすいことが経験的に知られている。今回の例では予想される生産物の分子量はpIGFtac1では約7500、pIGFlac2でも約9000と比較的小さい。どちらの場合でも以上述べたように細胞質内で次々に分解されてしまったということは予想できる。やや分子量の大きいpIGFlac2の方が幾分成績が良かったこともこれを支持するといえよう。

pIGFtac1の場合にはさらに翻訳開始点やSD配列等も人工的に導入したものを利用している。これらの部分やその付近の構造が適切でないため翻訳が十分に行われなかったという可能性も大きい。

この他にもいくつかの理由が考えられるが、本章の最後にまとめて議論してみたい。

(4) pIGFlac3の作成

以上の2つの例では分子量が小さいために、合成されたタンパク質が分解されてしまったという予想のもと、非常に大きな融合タンパク質として合成してみることを計画した。融合タンパク質として β -galactosidaseのほぼ全長を利用してみることにした。

方法をFig.4-6に示した。 β -galactosidaseの遺伝子としてはplasmid pMC1871のものを利用し、BamHIとEcoRI処理により約1000個のアミノ酸をコードする部分を切り出し、pUC119のlac Z部分に挿入し、lac-UV5プロモーターのもとでほぼ β -galactosidase全長を発現できるベクターを作成した。これをEcoRIで切断し、bacterial alkaline phosphatase(BAP)処理をして自己閉環を防いだ

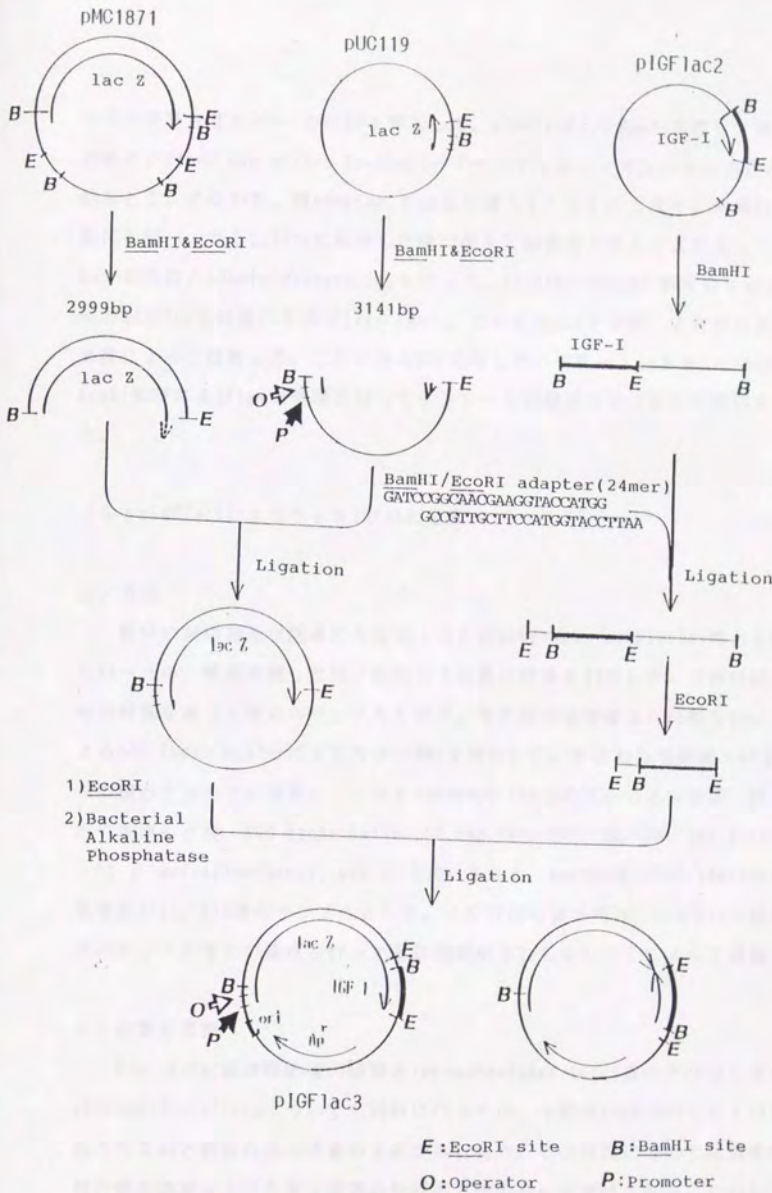


Fig. 4-6 pIGFlac3の構築

ものに変異させたIGF-1のcDNAを挿入した。pIGFlac2よりBamHI処理して得られた断片に24mer Bam HI/Eco RI adaptor (ベーリンガー・マンハイム山之内)を結合した。すなわち、同adaptor 1 µgを2節(1) b)の方法で5'末端のリン酸化を行い、さらに70°Cに加熱した後に徐々に温度を下げることによって、kinaseの失活とadaptorのannealingを行った。pIGFlac2のBamHI断片約1 µgと200 ngのadaptorを前述の方法でligationし、これをEcoRIで切断しアガロース電気泳動によって精製した。これと先のBAP処理したベクター1 µgとをligationした。EcoRI処理およびBamHI処理を行ってインサートの確認および向きを確認を行った。

(5) pIGFlac3によるラットIGF-1の生産

a) 方法

菌体の前培養及び誘導の方法は(3)のpIGFtac1、pIGFlac2の場合と同様に行ったが一晩前培養した後に前回の4倍量の菌体を利用した。今回は誘導開始後時間を追って数点のサンプルを得た。その後の処理はより簡略なBuellらによるSDS lysis bufferによる方法(258)を採用した。すなわち培養液1 mlをマイクロ遠心チューブに採取し、これを10000rpm 10minの遠心により集菌、菌体を水で洗浄した後、SDS lysis buffer(62.5mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, pH6.8) 500 µlを加え、vortex後100°C 10minの煮沸処理を行い、RIA用のサンプルとした。この方法の妥当性は、RIA kitの検量線用のサンプルをこの処理を行っても計測値が変わらないことによって確認した。

b) 結果と考察

Fig. 4-7に誘導開始後の時間とimmunoreactive IGF-1量のグラフを示す。pIGFtac1やpIGFlac2についても同時に行ったが、今回はpIGFlac2でも1 litterあたり2 µgと前回の約10倍量の生産がみられた。この原因については誘導開始時の菌の濃度を上げた事と菌体の処理の方法の違いが挙げられる。しかし今回の結果は誘導開始後の時間が短い2時間のあたりがピークになっていることがわかる(9.5 µg)。このことは生産されたIGF-1が細胞内で分解されているとい

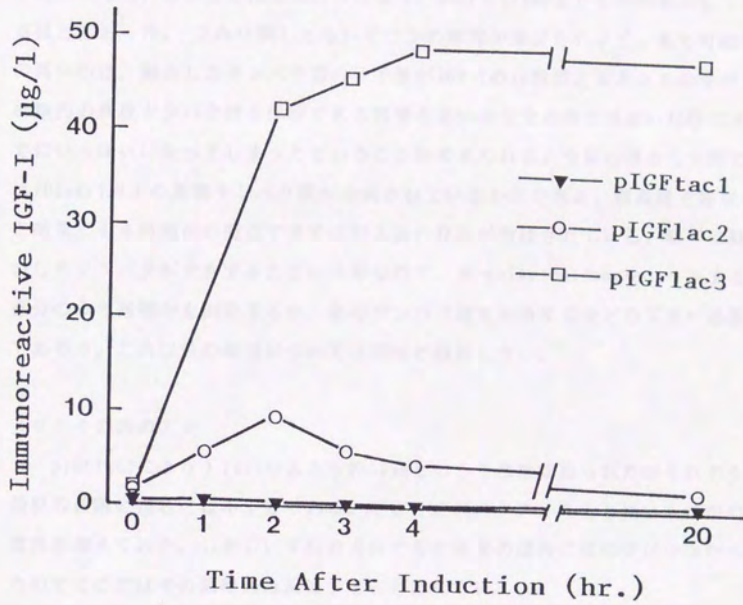


Fig. 4-7 pIGFtac1, pIGFlac2, pIGFlac3によるラットIGF-Iの生産

う先の仮定と合致する。pIGFtac1ではほとんど検量線の範囲の端のほうになってしまい、信頼のおける値ではないが、やはり非常に少なかった。

pIGFlac3では最大49 μ gと生産量はかなり増加した。しかし、始めの1~2時間に急速に蓄積した後は頭打ちになり、20hrでは4hrよりもやや減少しているほどであった。これに関してもいくつかの原因が挙げられよう。最も可能性の高いのは、融合したタンパク質の分子量がIGF-Iの10数倍と大きなものなので、細胞内の異種タンパク質を保持できる容量あるいは生産の能力が速い段階ですでにいっぱいになってしまったということが考えられる。今回の場合も実際には700 μ g/l以上の異種タンパク質が合成されているわけである。顕微鏡で観察した結果でも4時間目の時点ですでに封入体の存在が確認されている。結局は融合したタンパクが大きすぎたという事なので、 β -galactosidaseをコードする部分のうち何割かを削除するか、他のタンパク質を利用するなどの工夫が必要であろう。これ以外の原因については後ほど議論したい。

(6) その他の工夫

pIGFlac3により1 literあたり約50 μ gという生産量は得られたがそれでも精製の段階に進むには不十分である。そこでこのベクターをもとにいくつかの改良を加えてみた。しかしいずれの方法でも生産量の増加には結び付かなかったのでここではその概略のみ記述するにとどめたい。

a) terminatorの導入

pIGFlac3は転写のterminatorを持たないので不必要に長いmRNAができて、エネルギーや転写のための装置を無駄に使用していることが考えられた。そこで trpAのterminator (味の素中央研究所 柴井博四郎博士より供与、Fig.4-8、259)をFig.4-8のような方法でIGF-I部分の下流に挿入した。pIGFlac5とpIGFlac6はterminator部分を切り出してきたときの制限酵素が異なるのみである。これらのベクターを用いても生産量の増加は達成できず逆にわずかに減少気味であった。参考までにこれらのベクターを用いた誘導2時間後の菌体をSDS lysis bufferで溶解したサンプル20 μ lを7.5%SDS ポリアクリルアミド電気泳動(SDS PAGE)に供した結果をFig.4-9に示した。

b) 他のhostの利用

Terminator

---GGCGCC---(104bp)---AGCCCCCTAATGAGCGGGCTTTTTTTCAGCTG---

BbeI site PvuII site

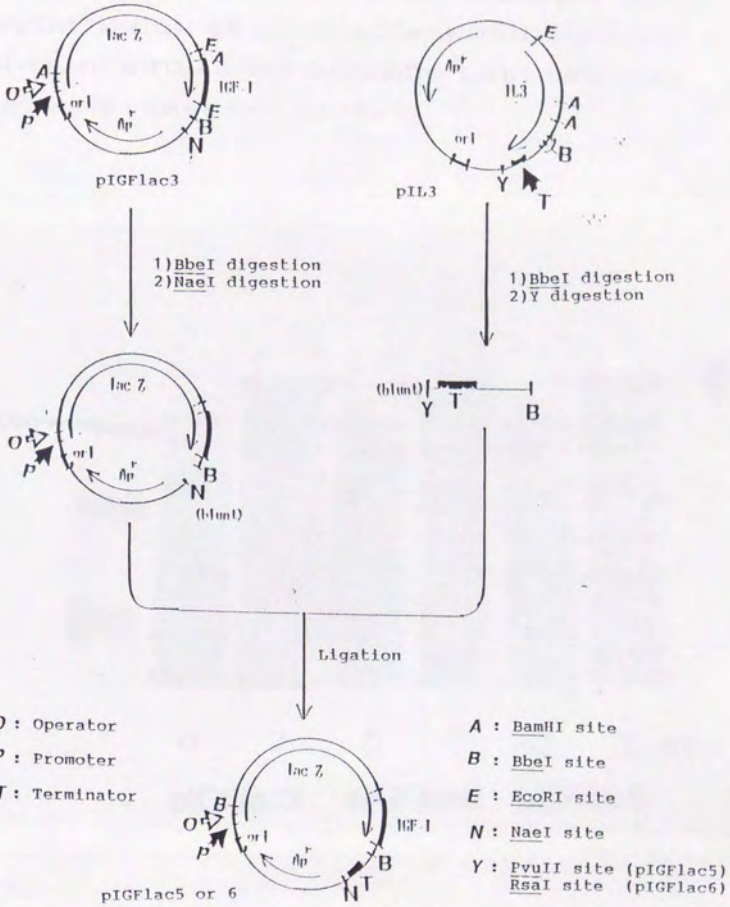


Fig. 4-8 pIL3中のTrpAターミネーターの構造と pIGlac5とpIGlac6の構築法

以上の結果はE.coli JM105 (pIGFtac1, pIGFlac2) あるいはJM109 (pIGFlac3, pIGFlac5, pIGFlac6) を用いている。pIGFlac3, pIGFlac5, pIGFlac6の3種についてE.coli HB101およびC600にtransformation しておいて同様に誘導をかけたが、JM109以上の結果は得られなかった。

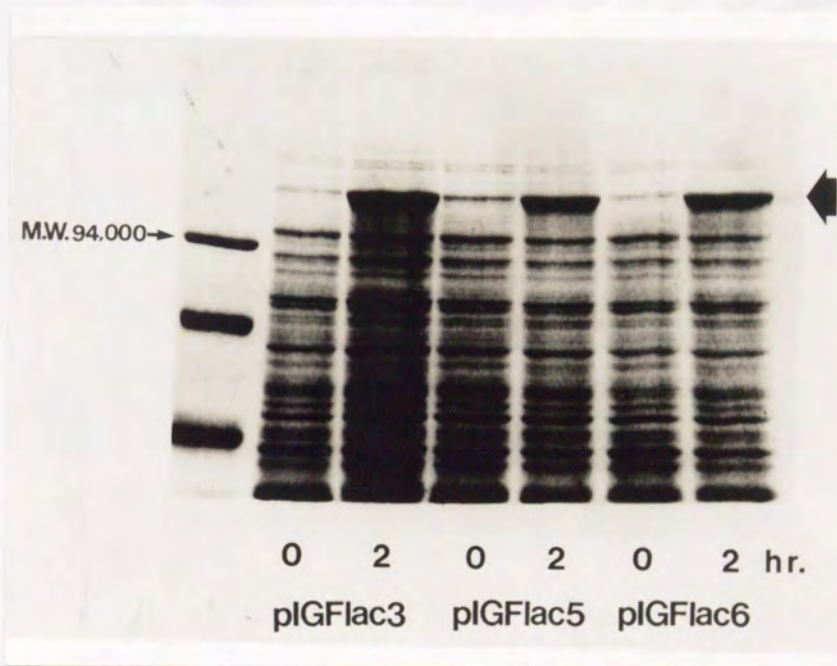


Fig. 4-9 pIGFlac3, pIGFlac5, pIGFlac6によって菌体内に蓄積された融合タンパク質

誘導開始時と開始後2時間の菌体タンパク質をSDS PAGEに供した。

第3節 phoAベクターによるラットIGF-Iの分泌生産

(1) 計画

前節では発現したIGF-Iを菌体内プロテアーゼによる分解から保護する目的で、大きなタンパク質との融合タンパク質として合成させ封入体の形成を促すという手段を取った。同じ目的を達成するさらに有効な手段としては、生産物の細胞内の局在性を変えるか細胞の外側に出してしまえば、細胞内の分解系にさらされる危険性はなくなり、さらに細胞の代謝系を乱すこともなくなる。

大腸菌はグラム陰性菌であり、細胞は内膜と外膜の2重膜構造を持ち、内膜を通過した分泌タンパクは2つの膜構造にはさまれたペリプラズム空間に蓄積される。この空間にある物質は、浸透圧ショック法(260)によって菌体から抽出できる。この場合細胞質内から生産物を精製するのに比べ、はるかに容易に精製できるという利点を持つ。

実際の方法として行われているのは外膜タンパクであるompA,C,E, lamBや、アルカリ性ホスファターゼのphoA、β-ラクタマーゼのblaなどのペリプラズム酵素のシグナルペプチドをタンパク質のN末に融合して発現させ、ペリプラズム空間に分泌させる方法である。このような方法の成功例として、phoAを利用した上皮成長因子の生産(261)や、成長ホルモン自身のシグナルペプチドによる成長ホルモンの分泌生産(262)、ペニシリナーゼのシグナルペプチドを用いてさらにkil geneを同時に発現させて外膜の透過性を増大させ、成長ホルモンを培地中に排出(excretion)しやすくした例もある(263)。しかし、分泌生産においても、分泌させるタンパクの長さ、疎水性、シグナルペプチドとの関係等が影響し、ペリプラズム空間への分泌が起こりにくかったり、プロセッシングがうまく行われなかったり、膜を通過する際にタンパクの構造が変わるなどの課題が多い(264,265)。

培地中に無機リン酸が不足するとリン酸レギュロンと呼ばれる一連の遺伝子が発現し、培地中のリン酸を効率よく利用する。無機リン酸欠乏によって発現が誘導される(Psi;phosphate starvation inducible)遺伝子は20個以上あるといわれる。このなかで、phoA(アルカリ性ホスファターゼ)、phoE(ポリリン酸タン

Psi Iso-Vectors

| | | | | | | | | | | | |
|--------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--|------------|
| | <i>Lys</i> | <i>Ala</i> | <i>Arg</i> | <i>Asn</i> | <i>Ser</i> | <i>Arg</i> | <i>Gly</i> | <i>Ser</i> | <i>Arg</i> | | |
| pYK268 | AAA | GCC | CGG | AAAT | TCC | CGG | GGA | TCC | CGT | | $\psi(-1)$ |
| | TTT | CGG | GCC | TTA | AGG | GCC | CCT | AGG | GCA | | |
| | | | | | | EcoRI | SmaI | | BamHI | | |
| | <i>Lys</i> | <i>Ala</i> | <i>Arg</i> | <i>Glu</i> | <i>Phe</i> | <i>Pro</i> | <i>Gly</i> | <i>Ile</i> | <i>Pro</i> | | |
| pYK267 | AAA | GCC | CGG | CAA | TTC | CCG | GCG | ATC | CCG | | $\psi(0)$ |
| | TTT | CGG | GCC | CTT | ATT | GCC | CCC | TAG | GGC | | |
| | | | | | | SmaI | EcoRI | SmaI | BamHI | | |
| | <i>Lys</i> | <i>Ala</i> | <i>Arg</i> | <i>Gly</i> | <i>Ile</i> | <i>Pro</i> | <i>Gly</i> | <i>Asp</i> | <i>Pro</i> | | |
| pYK269 | AAA | GCC | CGG | GCA | ATT | CCC | GGG | GAT | CCC | | $\psi(+1)$ |
| | TTT | CGG | GCC | CCT | TAA | GGG | CCC | CTA | GGG | | |
| | | | | | | SmaI | EcoRI | SmaI | BamHI | | |

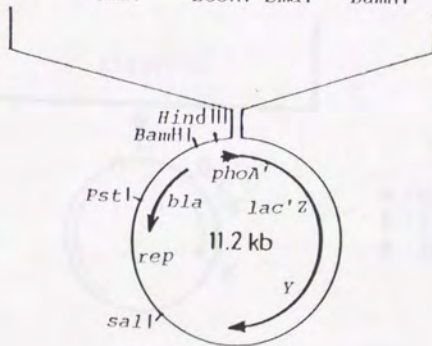


Fig. 4-10 pYK269とその関連ベクターの構造

これらは文献(271, 272)の一連のベクターをさらに改変したもの(私信)。本図は依田幸可博士のご好意により使用させていただいた。

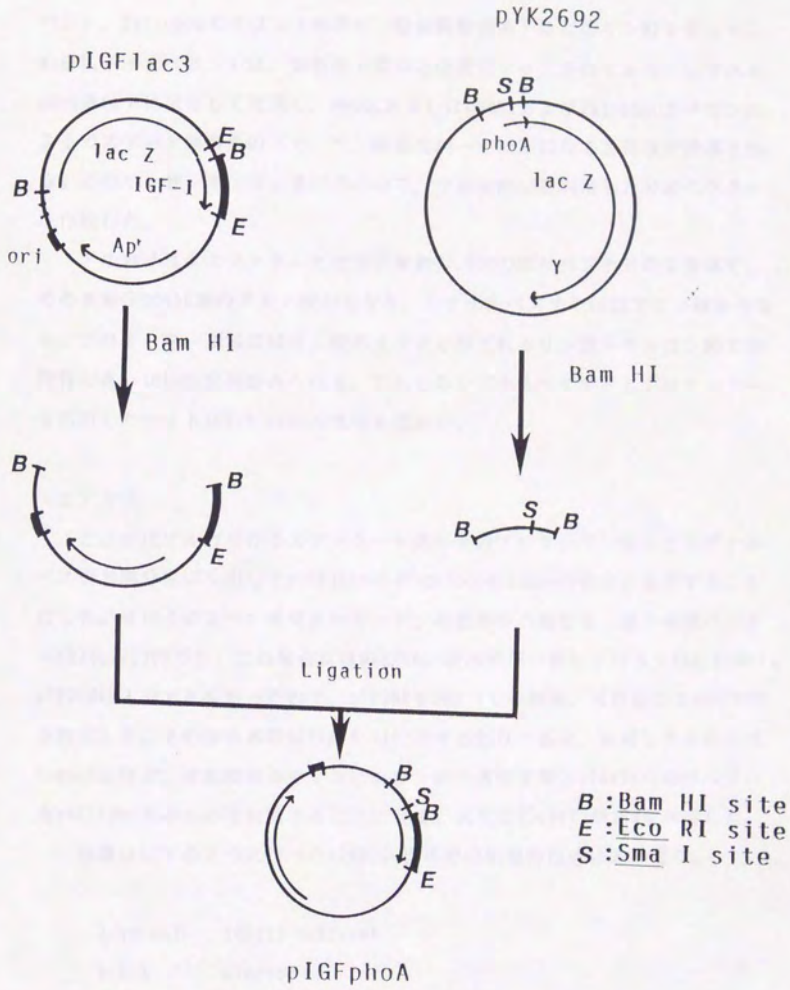


Fig. 4-11 pIGFphoAの構築

バク)、Pst-phoUオペロン(無機リン酸能動輸送系)などのリン酸レギュロンの遺伝子(オペロン)は、染色体上離れた位置にマップされており、いずれもphoB遺伝子に依存して発現し、phoR(あるいはphoM)およびPst-phoUオペロンによるカスケード制御系の下で、リン酸濃度が一定以下になると発現が誘導される。このリン酸レギュロン遺伝子の中で、今回はphoAを利用した分泌ベクターを作成した。

アルカリ性ホスファターゼは分子量約47,000のポリペプチドの2量体で、その単量体は450個のアミノ酸からなり、シグナルペプチドは21アミノ酸からなる。プロモーター領域にはリン酸ボックスと呼ばれるリン酸レギュロン間で相同性の高い18bpの配列がみられる。これらのシグナルペプチドとプロモーターを利用したラットIGF-I cDNAの発現を試みた。

(2) 方法

ここではアルカリ性ホスファターゼ遺伝子のプロモーター部分とシグナルペプチド部分を切り出してpIGFlac3の β -galactosidaseの部分と置換することにした。依田らによって開発されたコドンの読み枠の異なる一連の発現ベクター(271,272)のうち、この場合にはpYK268が読み枠が一致している(fig.4-10)。pYK268は入手できなかったので、pYK269をSma Iで切断後、再結合してpYK2692を作成した。その後の過程はFig.4-11に示すとおりであり、完成したものをpIGFphoAと呼ぶ。複製開始点やアンピシリン耐性遺伝子等はpIGFlac3の持っていたpUC119由来のものを利用することになる。宿主はE.coli JM109を利用した。

誘導は以下のように行った(266)。誘導用の培地の組成は次の通り。

| | | |
|----------|-----------------|-------------------------|
| 1/10 vol | 10x121 buffer** | |
| 0.4 % | Glucose | |
| 0.2 % | Casamino acid | |
| 60 mg/l | Adenine | |
| 60 mg/l | Uracil | |
| 10 mg/l | Thiamine* | |
| 100 mg/l | Ampicillin* | *:Added after autoclave |

** 10x121 buffer (per litter)

46.8 g NaCl

15.0 g KCl

10.8 g NH₄Cl

3.5 g Na₂SO₄

2.0 g MgCl₂

0.29 g CaCl₂

5 mg FeCl₃

2.7 mg ZnCl₂

in 1M Tris-HCl pH7.5

上記の誘導用培地に0.1% 1M K₂HPO₄を加えた培地100mlで一晩前培養し、これを集菌して洗浄した後、同量の誘導用培地を加え経時的に10mlずつサンプリングした。7000rpm 7minの遠心で集菌し、培地中のimmunoreactive IGF-I量上清を適宜希釈したものを直接RIAで測定した。また、全菌体内のIGF-I量として培養液の1mlを別に採取したものを前述のSDS lysis法で処理してRIAに供した。

集菌した菌体を速やかにcold osmotic shock法(260)でペリプラズム画分と細胞質画分に分離した。各画分のimmunoreactive IGF-I量を測定すると共にアルカリ性ホスファターゼ活性を測定し、浸透圧ショック法が正しく行われたかどうかを確認した。

浸透圧ショック法は以下のように行った。

培養液10ml分の菌体を50mM Tris-HCl(pH7.5)で洗浄した後もう一度菌体を集め、2mlの(20% sucrose, 0.1mM EDTA, 30mM Tris-HCl, pH7.5)に懸濁する。30°Cで8min静置し10000rpmで8min遠心、沈澱に氷冷した0.5mM MgCl₂ 1mlを加えてvortexし、0°C10min静置した後に8000rpm 10min遠心して上清をペリプラズム標品とした。

アルカリ性ホスファターゼ活性の測定は以下の手順に依った(267,268)。サ

ンプル100 μ lに0.05M Tris-HCl(pH8.3)と 4×10^{-4} M p-nitrophenyl phosphateを加えて全量を2mlにし、37°Cで20min incubateした後、410nmの吸光度を測定した。

生産物のゲル濾過による分離：サンプルを凍結乾燥したものをゲル濾過用buffer(0.1M Tris-HCl, 5mM EDTA, 1% bovine serum albumin, pH7.4)2mlに溶解し、Sephacryl-S200(Pharmacia)を用いてゲル濾過を行った。アクリル製のカラムを用いて(1.5x84cm)、0.3ml/minの流速で1.4mlずつ分取した。

(3) 結果と考察

Fig. 4-12に培地およびペリプラズムのIGF量を示す。ペリプラズムでは5時間目までは増加していたが、8時間になると減少し24時間になるとさらに少なくなっていた。5時間目では200 μ g/lとpIGFlac3の4倍程度の値が得られた。一方、培地中に8時間目において520 μ g/lという大量のIGF-Iが検出できた。これは合成されたタンパク質はペリプラズムに蓄積するという当初の予想と食い違っていたためこれがどのような機構で生じるかを探ることにした。次のような可能性が考えられる。すなわち、合成されたIGF-Iが外膜を通過しやすい構造を有していて、特異的に外膜の外へ分泌されるという場合(269)、あるいはこのようなリン酸欠乏の条件で培養したことによって外膜の構造が変化するかまたは壊れることによってペリプラズムの内容物が非特異的に外に漏出してしまう場合である。そこでペリプラズムのマーカー酵素として、無機リン酸欠乏によって誘導されてくる大腸菌の固有のアルカリ性ホスファターゼの活性を測定した(Fig.4-13)。

アルカリ性ホスファターゼも培地中に放出されていることが明らかとなった。これによってペリプラズムの内容物が非特異的に外膜を通過していると考えられる。原因としてはリン酸欠乏によって外膜の組成が変わり内部のタンパク質が通過しやすくなってしまったか、あるいは菌が死んで内容物が放出されてしまったかもしれない。しかし、IGF-Iの培地中への出現に比べてアルカリ性ホスファターゼのほうは遅れて出てくる(8時間ではまだ少ない)ので、IGF-Iの放出が優先的(選択的)に起こり、アルカリ性ホスファターゼの放出はその2次的な効果で生じる可能性もある。phoAベクターを用いた分泌生産系では誘

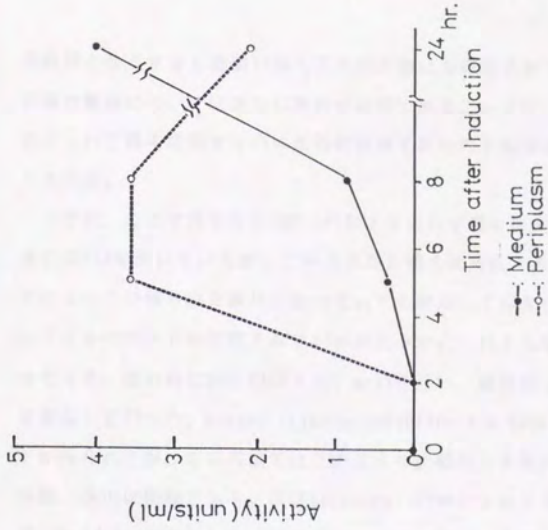


Fig. 4-13 誘導開始後の培地中およびペリアラスムのアルカリ性フォスファターゼ活性

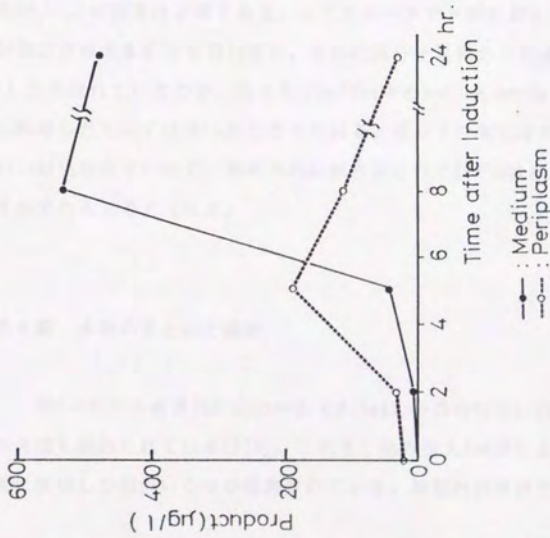


Fig. 4-12 pIGFphoto誘導開始後の培地中およびペリアラスムのIGF-I量の変化

導時間を長くすると培地に出てくる例が他にも報告されており(261, 273, 274)、詳細な機構についてはさらに検討が必要である。いずれにしても培地から目的のタンパク質を精製するのは比較的容易であるので有効な系であるのではないだろうか。

次に、ここで得られたIGF-Iのおよその分子量を推定してみた。IGF-Iの定量にはRIAを用いているが、この方法だと例えば合成されたIGF-Iがプロテアーゼによって分解された断片になっていても検出してしまふ可能性がある。また、シグナルペプチドが切断されているかどうかについても見当をつけておくことを考えた。はじめにSDS PAGE (20% gel)を行い、銀染色(銀染色第一、第一化学薬品)を行った。Bovine trypsin inhibitor(M.W.6500)とほぼ同位置にバンドがみられたが、この方法ではこのような比較的分子量の小さいタンパク質の分離、検出は困難である。次にSephacryl-S200によるゲル濾過を行い、各画分のIGF-IをRIAで測定した。結果をFig. 4-14に示す。実線はクロロミンT法で標識した ^{125}I -human IGF-I(270)にカラムに供し、カウントを測定した結果である。主ピークは ^{125}I -IGF-Iよりわずかに高分子量のところに検出された。これは予想される生産物が、IGF-IのN末側に5個のアミノ酸(Arg-Gly-Ser-Thr-Met)が付加された形であることと一致する。さらに高分子量側にピークが現れたが、この由来は不明である。シグナルペプチドが切断されていない形のものが出されたものかも知れない。さらに高分子量側の小さなピークは ^{125}I -IGF-Iでも現れているので、おそらくbuffer中のbovine serum albuminに非特異的に吸着したものではないかと考えられる。低分子の側にはIGF-I immunoreactivityは見られないので、培地中には断片化されたIGF-Iはあったとしてもごくわずかであると考えられた。

第4節 4章のまとめと議論

IGF-Iはヒト血清100 litterから0.7mgしか得られない(275)ので、固相法での合成も試みられている(276)。これまで組み換えDNA法によってヒトIGF-Iの生産に成功した例がいくつか報告されている。細胞内に単体で直接発現させる方

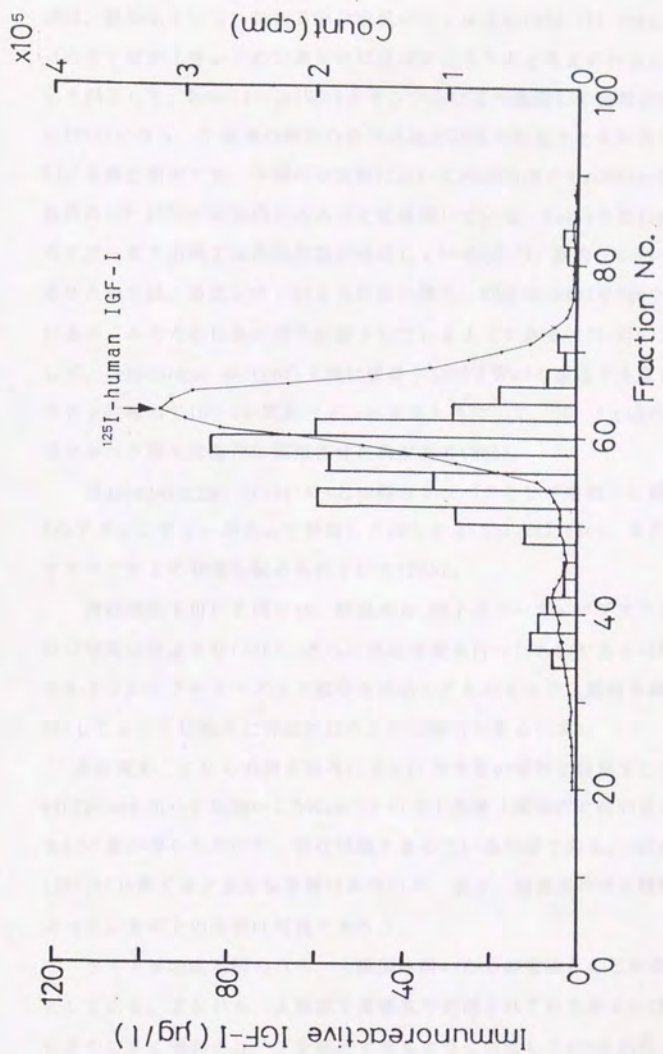


Fig. 4-14 pIGFphoAによって培養に分泌されたimmunoreactive IGF-Iの
Sephacryl-S200によるゲル濾過溶出パターン

¹²⁵I-IGF-Iを同様に処理したときのカウンタも示した。
IGF-I量の測定は2つずつのアクションを1つにまとめてRIA
キットを用いて行った。なお50番までのフラクションとそれ以降
のフラクションとはキットのロットが異なる。

法は、成功していないかあるいは収量がごく少ない(256, 277, 278)。これはIGF-1の分子量が小さいために速やかに分解されるためと考えられる。これを証明した例として、SchulzらはIGF-Iをタンデムに2つ連結して発現させると生産量は200倍になり、生産物の細胞内の半減期が30倍になることを報告している(258)。本節の研究でも、予備的な実験においてpIGFlac2でもpIGFlac3に匹敵する程度のIGF mRNAが細胞内にあることを確認している。Buellらはlon⁻、htp⁻のプロテアーゼ欠損株では直接発現に成功している(277)。融合タンパクとして発現させた例では、臭化シアンによる切断に備え、59番目のMetをThrやValに変えているが、そのために多少活性が低下しているようである(278, 279, 280)。変法として、tryptophan operonの下流に構造タンパク質LHの遺伝子を置き、この終止コドンに重ねてIGF-Iの開始コドンか来るようにして、IGF-IとLHのヘテロ2量体タンパク質を細胞内に蓄積させた例がある(281)。

Staphylococcal protein Aとの融合タンパクとして培地中に排出させた後、IgGアフィニティーカラムで精製した例もある(282, 283, 284)。またLambのシグナルペプチドの利用も試みられている(285)。

真核細胞を用いた例では、酵母の α -因子のリーダーペプチドを利用して酵母に培地に分泌させ(286)、さらに連続培養を行ったものがある(287)。牛成長ホルモンのシグナルペプチド部分を結合したものをマウス繊維芽細胞にtransfectしたところ培地中に分泌されたという報告もある(288)。

本研究も、これらの例を参考にさらに合成量の増加を目指すことになるが、pIGFphoAを用いて培地中に500 μ g/lという生産量(菌体内と合わせると800 μ g/l)という量が得られたので、現在精製を進めている段階である。EGFの例(2mg/l)(261)に比較するとまだ生産量は少ないが、宿主、培養条件等を検討することによっていま以上の改善は可能であろう。

さて上述の成功例のうち、大腸菌を用いたものはほとんどが合成DNAを材料としている。すなわち、大腸菌で高頻度で利用されているあるいは高発現の遺伝子中に多く現れるコドンを使用できるように合成したDNAを利用しているわけである。本研究では敢えてcDNAを位置指定変異で改変したものを用いた。この方法はより大きなタンパク質を合成したい場合など、合成遺伝子を用いるには労力及びコストの点で困難である場合などにより有用であろう。しかし、真核

生物の遺伝子を原核生物で発現させることになるので、コドンの使用頻度が問題になって来る。すなわち、大腸菌で使用頻度の低いコドンが含まれている場合には翻訳が効率よく行われない可能性がある。本研究で使用したラットIGF-I cDNAについて調べてみると、AGG(Arg)という大腸菌ではほとんど使われていないコドンが4回使われていること、その他 CGG(Arg),CTT(Leu),TCA(Ser),GG A and GGG(Gly),CCC and CCT(Pro),ACA(Pro),TGT and TGC(Cys)といった使用頻度の低いコドン(289)が現れている。さらに生産量を上げるためにはこれらのうちのいくつかを他のコドンに変異させることも考慮する必要があるだろう。

第5章 総合討論

(1) ラットIGF-I遺伝子構造のまとめ

本論文第1章から第3章までの結果より、ラットIGF-Iの遺伝子は一つの遺伝子から転写開始位置の選択、可変スプライシング (alternative splicing)、poly adenylation siteの選択などが様々に組み合わされて多様なmRNAを生み出していることが明らかになった。これらのmRNAが生じる機構をFig.5-1に模式的に表してみた。多くの種類のmRNAが存在するにも関わらず、翻訳されさらに細胞内プロセッシングをうけて完成されるIGF-Iはたった1種類に過ぎない。(ただし複数種のIGF-Iの存在も報告されている(後述))。1種類の分子に対して多くの種類のmRNAが作られ、しかも必要以上に長いmRNAが作られることの意義はいったい何なのであろうか。

IGF-I以外にも複数種のmRNAが一つの遺伝子から生じる例が多く報告されている。数十種の例が総説(290,291)にまとめられている。その機構はFig.5-2に示したものに分類される(290より引用)。ラットIGF-Iの場合はFig.5-2中でA, E, F, Gの機構が利用されている(ヒトIGF-IではAのかわりにB)。このような多くの選択機構がmRNA前駆体の段階で機能している例は他にみられない。

IGFに対して、インスリンの遺伝子はより単純である。ラットの場合にはインスリン1と2という2つの遺伝子があるが、何れにしてもmRNAは短いものが1種類で、可変スプライシングの機構は有していない(212)。一方IGF-IIではヒトの場合(292,293,294,295)も、ラットの場合(219,220,221,222)でも1つの遺伝子から複数のmRNAが生成する。IGF-Iでは遺伝子の構造がさらに複雑で、これまで述べてきたようにヒトの場合もラットの場合も遺伝子の全体像はまだ明らかになっていない。他の動物の場合にもmRNAが複数種存在することが報告されている(193,218,220)。このようなインスリンにはみられずIGFsにおいて普遍的である性質は、インスリンとIGFsの生体での役割、生産調節、作用機構などの違いを解明する鍵となり得ると思われる。

ラットIGF-I mRNAの構造についてまとめてみると(Fig.5-1)、(a)3'側の非翻訳領域の利用のされ方の違いによるmRNAの長さの多様性、(b)プロモーターの選択による5'非翻訳領域の多様性、(c)ミニエクソンの挿入によるE peptide部分

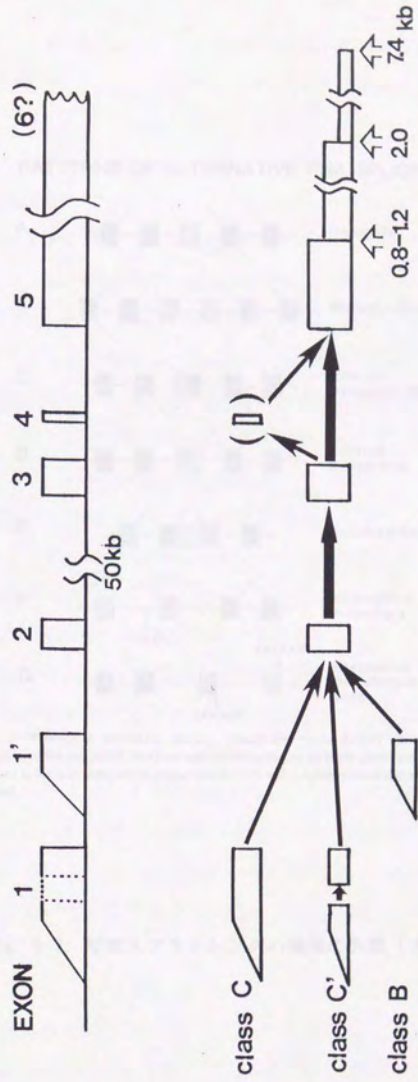


Fig. 5-1 ラット IGF-I 遺伝子の構造 (上段) と多種の mRNA が生成する機構の模式図 (下段)

PATTERNS OF ALTERNATIVE RNA SPLICING

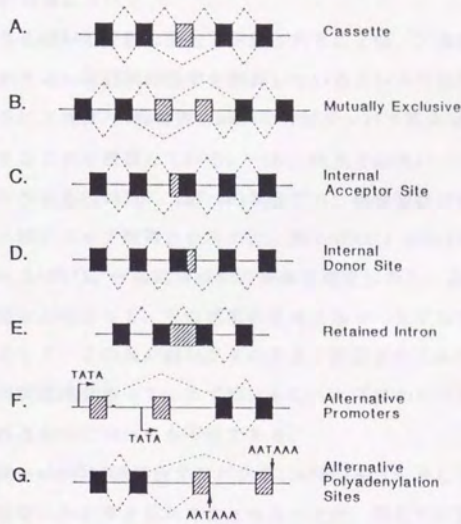


Figure 1 Patterns of alternative splicing. Constitutive exons (black), alternative sequences (striped), and introns (solid lines) are spliced according to different pathways (dotted lines), as described in the text. Alternative promoters (TATA) and polyadenylation signals (AATAAA) are indicated.

Fig. 5-2 可変スプライシングの機構の分類 (文献290より)

の多様性の3つの機構によって実に様々なmRNAが生産される。さらに(b)の5'上流域に関しては、エクソンの内部イントロンが除去されることによる多様性も関与している。

(2) 3'非翻訳領域について

長さの異なるmRNAの意義に関して予想されることは、3'非翻訳領域部分がmRNAの安定性かあるいは翻訳の効率を制御しているという可能性である。3章で議論したように三浦は7.4kbの長いmRNAの方がタンパク質の栄養条件に鋭敏に応答して増減することを観察している。一方、絶食では各バンドが同等に減少するという報告がある(296)が、IGF-IIの場合でも、培養細胞のIGF-II mRNA量が培地中のアミノ酸によって制御されるのは、長いmRNA(3.6kb)に関して効果が顕著に現れるという(297)。今後は各mRNAの寿命を測定したり、あるいは各mRNAの翻訳速度の測定などによって、その意義の解明を急ぐべきであろう。また、解決すべき問題として、この長いmRNAがそのまま翻訳されるものなのか、あるいは短いmRNAの前駆体であって、まず短いものへとプロセッシングを受けてから初めて翻訳されるのかについても不明である。

かつては長いmRNAはIGF結合タンパク質(IGFBP)をコードしている部分を含んでいるのではないかと考えられたこともあったが、現在ではほぼ否定されている。しかし、未知のBPやあるいは全く別なタンパク質がmRNAの3'非翻訳領域内にコードされている可能性は残されている。IGF-IIの場合には3'非翻訳領域内にプロモーターがあって、その部分から3'非翻訳領域だけからなるmRNAが産生されることが報告されている(222)。IGF-Iの場合も3'非翻訳領域の全塩基配列の解明が急がれるところであり、現在さらに下流域のcDNAの獲得の努力が続けている。

(3) 5'非翻訳領域

ラットIGF-Iの場合は2つのプロモーター部位の存在が示唆されたが、本研究ではこれらの構造を明確に決定することはできなかった。しかしclass Bおよびclass Cの2種(class C'も考慮すると3種)の5'非翻訳領域がmRNA中に含まれていることは、この部分の多様性にも何らかの意義を予想させる。Loweらは

solution hybridization/RNase protection assayによって、肝臓class B（彼らはclass Aとしているが、第2章で述べたようにこれはclass Bのものを取り違えているという判断の基、以下class Bと称する）のmRNAは、下垂体除去ラットにGHを注射することによって6倍に増加するが、class Cのものは2倍にしかならないことを報告している(206)。さらにclass BのmRNAのclass Cのものに対する比率は、他の臓器と比較すると肝臓でのみ多くなっている。これは各々のclassのmRNA量は異なる制御を受けていることを示す。しかし、本研究第3章ではタンパク質栄養は両方のmRNAに等しく作用するという結果を得た。Loweらも絶食によってはどちらのclassのmRNAも同程度に減少することを報告している(91)。これらの結果は、IGF-I mRNA発現の調節機構において、GHおよび肝特異的発現調節因子（実体は不明）は、class Bおよびclass Cの遺伝子の転写（あるいはmRNAの安定性）に対して異なる強さで作用するが、絶食やタンパク質栄養は両者に同程度の作用を及ぼすことを示す。もしこれらの制御が、何らかの正に作用する因子がエンハンサー部位に結合してなされるならば、GHの作用や肝特異的発現に関与する因子はclass Bのほうのエンハンサーに選択的に結合するが、栄養的因子は両者に等しく結合するものなのであろう。

Dexamethasoneの効果も両classのmRNAに同様に作用した。これはglucocorticoidレセプターが各エンハンサー領域に結合し、同程度の作用を及ぼしたと考えるか、あるいはDexによって何か別の因子の合成が増し、この因子がIGF-I mRNA合成の共通の機構を抑えたことによるのであろう(232)。三浦はDexの作用には別なタンパク質の合成が関与していることを示唆する結果を得ており（未発表）、現在までIGF-I遺伝子5'上流域にglucocorticoid responsive elementが見いだされていないこと（第2章）と考え合わせると興味深い。

以上class Bとclass CのmRNAがプロモーター領域の使われ方の違いによって生じることを前提として議論してきた。しかしIGF-Iの転写開始点はまだ決定されていないので、両者がさらに上流の共通のプロモーターから転写されてスプライシングの違いによって生じたという可能性も残っている。もしそうであれば、以上の議論は「各々の因子のスプライシングの装置に対する作用」と置き換えて解釈すればよい。ただしスプライシングの機構やその調節に関してはあまり明らかになっていない。しかし、IGF-I mRNAの5'非翻訳領域はそれほど

長くないことや、IGF-IIでは実際に多くのプロモーターが働いていることからclass B, Cそれぞれが別のプロモーターから生産されるものであるとの仮説の方を支持したい。

第3章の結果で、無タンパク質食では各classともmRNA量が比較的多かったのに対して血中濃度が激減していたこと、Dexによって両classのmRNAともに減少していたにも拘らず合成量は増加することなどから、IGF-I合成の過程には翻訳レベルの強力な制御機構が働いていることが示唆される。mRNAの構造中の何がこの制御を規定しているかを将来説明して行く必要があるだろう。

(4) IGF-I分子の多様性

以上議論したmRNAの多様性はIGF-Iの分子の構造には影響を及ぼさない。ラットIGF-I mRNAの多様性を増すもう一つの機構として、E peptide部分の52bpのミニントロンの挿入というのがあった(49,200)。E peptide部分は成熟IGF-I分子には含まれないので、血中IGF-I分子は1種類であると考えられる。しかし、血中にE peptideの抗体に結合する活性が認められ(198)、E peptideと結合した高分子量IGF-Iの存在が示唆されている。実際に2種のE peptideを持つIGF-Iが分泌されているならば、可変スプライシングによって異なるIGF-I分子が生産されていることになる。これらのE peptideを有するIGF-Iがどのような機能をもっているか等の問題は、第4章の方法を発展させE peptideを含むIGF-Iを合成して利用することが望まれる。但し、E peptideに糖鎖がついているならば真核細胞の系を利用しなければならない。なお牛の初乳などからIGF-IのN末端から3アミノ酸が除かれた分子が得られており(des-1,3-IGF-I)(298)、BPとの結合がIGF-Iとは異なっていることなどが明らかになっていることも付け加えて置きたい。

(5) endocrine, auto/paracrineの作用と遺伝子の複雑さ

序論13頁で述べたように、IGF-Iの作用は肝臓から血中に分泌されてendocrine的に働くものと、その他の組織で合成されてauto/paracrine的に働くものの両者が重要である。上記(2)、(3)、(4)で述べてきたmRNAの多様性はこれらIGF-Iの2つの機能と何らかの関係はあるのだろうか。以下は単なる推

定に過ぎないが、例えばE peptide部分がendocrineか、auto/paracrineかを決定するということはないだろうか。一方のE peptideに結合する(と予想される)糖鎖がこれに関与している可能性はないだろうか。あるいはclass B、class Cのどちらかはendocrine用のmRNAであるということはないだろうか。とくにclass BのmRNAは肝臓だけに多く、さらにGHでの誘導も大きいのでendocrine用である可能性が考えられる。そうだとすれば、栄養条件、Dex等はendocrine、auto/paracrine両経路のIGF-I生産を制御していることになる。

この問題は両経路のIGF-Iの作用機作の解析と絡めて今後解明して行かねばならないだろう。

(6) 他のIGF関連分子との関係

第3章で、IGF-Iの血中濃度とmRNA量が一致しないのは、翻訳の効率の差によると結論した。しかし、IGF-Iの血中での寿命が変化するという機構も併せて考慮すべきであろう。血中でのIGF-Iの安定性はBPとの結合の状態によって影響を受けるであろう。また、レセプターによるinternalizationの速度の変化も関与しているかも知れない。このように、生体内でのIGF-Iの動態や作用を論じる場合には他のIGF関連分子に関する検討も不可欠である。

近年ラットに関しても各BP(299,300,301)やレセプター(302,303)のcDNAや遺伝子のクローニングがおこなわれ、各組織や様々な条件下でのmRNAの測定や、プロモーター領域の解析等が開始されている。たとえば序論中10頁で述べた各BPの変動や調節は、ほぼmRNA量の変化によって起こることが示されている。また構造面でも、BP-1の血中濃度の日内変動が大きいことが3'非翻訳領域のmRNAの分解を促進する配列の存在で説明できることや(304)、IGF-Iレセプター遺伝子はTATAやCCAATの構造を持たず、GC-rich領域にSp1結合配列を持つ構造になっている(303)など興味深い性質が明らかになってきた。IGF-Iの生産調節機構とこれらの分子の生産調節とは、どのような連関があるのだろうか。栄養条件や他のホルモンによってこれらの遺伝子発現が制御される場合に、なにか共通の因子が仲介するなどして、全体が調和の取れた調節下にあったりするのだろうか。総合的な視野に立脚した研究が望まれる。

(7) 総括

IGF-Iの生産調節機構、その血中での存在状態、レセプターとの結合、作用発現機構、autocrine/paracrineでの作用の機構などIGF-Iに関する多くの問題を解明して行くことにより、動物の成長制御機構、栄養という情報が細胞内に伝えられて分子レベルで引き起こす変化、動物の生命を維持する巧妙な調節系といったテーマについての理解を深めて行けるだろう。

上記の問題の中で、本研究はIGF-Iの生産調節機構の解明を第1の目的として行ったものである。

第1章ではラット肝臓cDNAライブラリーより複数種のラットIGF-I cDNAを得、ラットIGF-I分子及びその前駆体の構造について議論を加えた。ここで5'非翻訳領域の構造が多様であることが明らかとなったが、第2章でのゲノムクローニングの構造解析やNorthern blottingの結果より5'上流域の構造のあるものはcDNA合成の過程で人工的に導入されたものであることを証明し、その機構を提唱した(305)。さらに第1章で、cDNAの合成法を変えることで、IGF-IのmRNA中異常に長い構造のものに関連するcDNAを得、3'非翻訳領域の長さによる調節を証明した(306)。

第3章では5'末端の多様な構造が、タンパク質栄養やホルモンによる遺伝子発現調節機構とどの様な関連があるかを、合成プローブによるNorthern blottingによって解析した。これらの調節因子は、2つのプロモーター領域に等しく作用することや、翻訳段階での調節が重要な役割を担っていることなどが明らかになった。

冒頭の多くの問題点を解決するには、IGF-I分子を大量に利用できるようなことが必要である。第4章では第1章で得たcDNAをもとにして、大腸菌によってラットIGF-Iの生産を試みた。分泌ベクターによって生産量は確保できたので、今後は精製を進め活性のある分子を豊富に得るために、簡便かつ鋭敏なIGF-Iの生物活性測定系を開発し、利用して行きたい。よい系が得られれば、IGF-Iの作用機作やBPの作用等の研究にも利用できる。IGF-Iという一つの分子を中心に据えて総合的な研究を行うメリットはこのようなところに現れる。

たった一つの分子だが、解明すべき問題は多くかつ大きい。今後、より多くの努力と協力を集中し、研究の飛躍的な発展に寄与したいと考える。

栄養状態の変化は、インスリン様成長因子 I (IGF-I) の血中での濃度や存在状態を顕的に変動させ、このホルモンの働きを介して動物の成長を統制している。IGF-I はその内分泌性の成長促進作用のみならず、体内の多くの組織・細胞で、自己分泌あるいは傍分泌性に働き、細胞の増殖や様々な分化機能の発現を促していることが明らかになり、生命活動の根柢に関わる重要な因子と考えられる。本研究は、IGF-I の生産などの様な機構を制御されているかを明らかにする目的で、ラット IGF-I 遺伝子の cDNA およびゲノムクローンを得て構造を解析し、その発現調節機構について検討を加えたものである。また、大量の IGF-I を取得する目的で、cDNA を材料として大規模によるラット IGF-I を生産を試みた。

(1) ラット IGF-I cDNA のクローニングとその構造解析

報告されていたヒト IGF-I の cDNA 塩基配列を参考に合成 DNA プロローブを作成し、ラット肝臓 cDNA ライブラリーを探索した。最終的に 5' 上流配列の異なる 2 種類の IGF-I cDNA クローンを得た。このうち一方は 5' 末端と 3' 末端との間で 50bp 間の長い inverted repeat 配列をもつ特徴的な構造を有していた (この 5' 上流領域を以下 class A と呼び、もう一方を class B とする)。cDNA から導かれるラット IGF-I のアミノ酸配列はヒト IGF-I と 70 アミノ酸中 3 残基のみが異なっており、その構造は構造的によく保存されていると結論される。さらにジグナルペプチド部分や、翻訳後に C 末端から除去されるといわれる E2 ペプチドの部分も相関性が高く、E2 ペプチド部分も何らかの機能を有していることが示唆された。

さらに random primer 法によりラット肝臓 mRNA から、新たに cDNA ライブラリーを作成し、さらに得られた cDNA をアプローブとして複製を繰り返したところ、500bp 程度の長い 3' 非翻訳領域を持つ cDNA クローンを得られた。ラット IGF-I mRNA には、1 kb 前後のものから、7.4 kb という長いものまで多くのサイズのものが存在していることが、Northern blot 分析からわかっている。ここで得られた cDNA の 3' 端の部分をアプローブとして肝臓 mRNA の Northern blot 分析を行ったところ、2.0, 6.0, 7.4 kb の長いバンドのみ検出され、1 kb 前後のものは検出されず、長い

mRNA は 3' 非翻訳領域が長く延びた構造を取っていることが明らかとなった。また、短い mRNA は 0.8-1.2 kb と長さに幅があるが、この mRNA の poly adenylation site はたまた 1ヶ所が利用されているので、この類は 5' 末端の長さも多少異なることよって生じていることが示唆された。続けてこの cDNA の 3' 末端の配列をアプローブに用いて、さらに別のライブラリーを探索し、最大 2.3 kb のクローンを得た。このクローンは 1.8 kb の 3' 非翻訳領域を含み、これによって 2.0 kb の mRNA の全長を含むクローンを捉えたと結論した。

(2) ラット IGF-I 遺伝子構造の解析

2 種のラットゲノムライブラリーを探索し、翻訳領域を含むクローン、および 5' 上流領域を含むクローンを得た。5' 上流領域の中で既に報告されていたエクソン 1 (class C mRNA を生じる) とエクソン 2 の間の部分に新たなエクソン部分を見だし、これをエクソン 1' とした。エクソン 1' は class A の構造に関連するものであったが、その部分の塩基配列の解析の結果と、特異的な合成 DNA プロローブを用いた mRNA の解析などから、inverted repeat の 5' 末端側の構造のうち、38bp は cDNA 合成の際に人工的に導入されたものであることが明らかとなった。これは reverse transcriptase の作用で生じたものと考えられる。エクソン 1' から発現に生じる mRNA を、以下 class B と称する。

5' 上流領域の塩基配列に関する検討を行ったが、エクソン 1、1' 共に、これまで知られていないプロモーターに特徴的な配列は見あたらなかった。未知の転写開始の機構が機能しているか、あるいはさらに上流部分に短いエクソンが存在している可能性が示唆された。ただし短い mRNA 種の幅を考慮すると、どちらの class も転写開始点は 1 点ではなく、多くの点が利用される house keeping gene 型のものに近いと推察された。なお、glucocorticoid responsive element その他のコンセンサス配列も確認できなかった。

(3) 5' 上流領域の機能の解析

次に class B および class C の mRNA に特異的な合成アプローブを用いて、ラット肝臓、およびラット初代培養肝細胞の mRNA について Northern blot 分析を行った。どの長さの mRNA も class B および class C の 5' 上流領域が含まれていた。すなわら

1と1'のどちらのエクソンが利用されるかは、3'非翻訳領域の構造の選択に影響を及ぼさないことが明らかとなった。さらに、各バンドの長さを比較すると、class Bで検出されたバンドの方がclass Cのものよりやや短い位置に検出され、class BのmRNAのほうが多少短い5'非翻訳領域を持つと考えられる。

肝臓のIGF-I mRNAは、食餌タンパク質の量的あるいは質的な悪化により減少する。また初代培養肝細胞ではdexamethasone (Dex) の添加により、培地へのIGF-I分泌量が増加するが、mRNA量は減少することが知られている。そこで、食餌タンパク質あるいはDexへの応答がmRNAのclassでも全く同じパターンを示す、各条件下で特異的プロンプを用いて検討した。

12%カゼイン食 (C)、12%グルテン食 (G)、無タンパク食 (PF) で8日間飼育したラットの肝臓よりpoly A⁺ RNAを抽出し、各classのIGF-I mRNAを測定した。血中IGF-I濃度はC>G>PFの順になっていたが、mRNAレベルはC>PF>Gの順になっており、これはどちらのclassでも全く同じパターンを示した。PFでは翻訳の段階、Gではそれ以前の段階で強い抑制が働いていると結論された。

初代培養肝細胞を 10^{-8} MのDex存在下で12日間培養したところ、培地中へ分泌されたIGF-Iは無添加の場合の2.2倍に増加したが、mRNAはclass B、class Cのもの共に約70%に減少していた。これによってDexが翻訳を促進させるといった機構が推察された。

以上の結果をまとめると、タンパク質栄養 (特に食餌タンパク質のアミノ酸バランス) やDexは、class BのIGF-I mRNA量とclass Cのそれとの共通の制御機構に作用し、両方を同等に変化させる。換言すれば、これら5'上流域が2層あることの意味は、両者の栄養によるinducibilityが違うことではないと言える。

(4) 大調節によるラットIGF-Iの生産

IGF-Iおよびその関連分子の研究に不可欠なIGF-I分子を大量に得る目的で、cDNAを材料として大調節によってラットIGF-Iを生産することを試みた。

初めに位置指定変異によって、cDNAに終始コドンを導入してE-ペプチド部分を除き、またシグナルペプチドの後に開始Metを、さらにS-D配列や適当な制限酵素部位を導入して後の操作に供した。

まず大調節体内に蓄積させる方法を試みた。IGFプロモーターを利用した直接発現では産量しか検出されなかった。次にpUC119のマルチクロニングサイトを利用して、IGF Zの先頭16アミノ酸との融合タンパク質としてIGFプロモーターによって発現させたが、生産量は200ng/1と低値であった。これらの結果はIGF-Iの分子量が小さいために、生産物の固体内アロテラアゼによる分解が速やかに起こってしまったためと考えられた。そこで次にβ-ガラクトシダーゼのほぼ全長をN末端に融合させた形で発現させたところ、封入体の形成が顕著され、50μg/1 (融合タンパク質として700μg/1) と生産量が上昇した。

続いてアルカリ性フォスファターゼ遺伝子 (phoA) のプロモーターとシグナル配列の直後に変異させたIGF-I遺伝子を接続し、ペリプラズム空間に分泌させることを試みた。無菌リン酸欠乏培地で誘導を開始した後、初期にはペリプラズム分画にIGF-Iが蓄積した。8時間後にはペリプラズム内の量が減少し、一方培地中に520μg/1のimmunoreactive IGF-Iが分泌されていた。宿主大腸菌由来のアルカリ性フォスファターゼ活性を測定したところ、8時間目ではまだペリプラズムにあったが、24時間後ではやはり培地中に活性が移っていた。これは組み換え型IGF-Iの培地への放出の2次元的効果で細胞壁を通過したのではないかと考えられたが、IGF-Iおよびアルカリ性フォスファターゼが細胞壁の外へ放出される機構は不明である。放出されたIGF-Iの分子量はほぼ予想されたものに一致していた。

(5) まとめ

ラットIGF-Iはアミノ酸70個に過ぎない小さいペプチドホルモンであるが、その遺伝子は100kbにも及ぶ巨大なもので、その全体像はいまだに明らかになっていない。本研究により、その巨大な遺伝子から、複雑な機構により多種多様なmRNAが生産することが明らかとなった。この小さな分子に用意された、遺伝子レベルでの精巧な調節機構は、IGF特異的な結合タンパク質による制御機構と相まって、この分子の生理的な重要性的な裏付けと考えられ、その構造と発現機構の更なる解明が必要とされる。

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、研究の遂行にあたり、当研究室、野口忠教授に終始御指導、御鞭撻を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。

また、栄養化学研究室の現室員および卒業生の皆様には多くの御協力をいただき、感謝致します。特に多くの適切な助言、御協力をいただきました三浦豊助手、実験全般に渡って数多くの御助力をいただきました竹中麻子氏、卒論学生としてそれぞれ1年間苦勞していただいた西山千春氏、喜田聡氏、平岡宏敏氏に深謝致します。

遺伝子に関する技術を初歩から懇切に指導して下さり、多くの助言をいただいた西山真助手、そのような機会を与えていただきました別府輝彦教授をはじめ、同農芸化学科醗酵学研究室の皆様にも深く感謝致します。

大腸菌分泌ベクターを御恵与いただきました同農芸化学科微生物学研究室山崎真狩教授および依田幸司助手、ターミネーターを御分与いただきました味の素中央研究所柴井博四郎博士に御礼申し上げます。

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、ならびに東京農工大学高橋伸一郎助手に御礼申し上げます。

最後に、いつも研究生活を支えてくれた妻紀子に感謝します。

1990年 8月 24日

加藤久典

参考文献

- 1) Yoshida, A., Naito, H., Niyama, Y. and Suzuki, T.(eds.) "Nutrition: Proteins and Amino Acids." Japan Scientific Societies Press.
- 2) Allison, J.B. (1964) Nutritive value of dietary proteins. In "Mammalian Protein Metabolism. vol. 2", pp.41-86. Munro, H.N. and Allison, J.B.(eds.) Academic Press, New York and London.
- 3) Floyd, J.C., Jr., Fajans, S.S., Conn, J.W., Knopf, P.F. and Rull, J. (1966) Insulin secretion in response to protein ingestion. *J.Clin. Invest.* 45, 1479-1486.
- 4) Merimee T.J., Lillicrap, D.A. and Rabinowitz, D. (1965) Effect of arginine on serum-levels of human growth hormone. *Lancet* ii 668-670.
- 5) Akedo, H. and Christensen, H.N. (1962) Nature of insulin action on amino acid uptake by isolated diaphragm. *J. Biol. Chem.* 237, 116-122.
- 6) Korner, A. (1960) The effect of the administration of insulin to the hypophysectomized rat on the incorporation of amino acids into liver proteins in vivo and in a cell-free system. *Biochem. J.* 74, 471-478.
- 7) Nissen, S. and Haymond, M.W. (1986) Changes in leucine kinetics during meal absorption: effects of dietary leucine availability. *Am. J. Physiol.* 250, E695-E701.
- 8) 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 -
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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 (IGF-BP) に及ぼす影響について
- 12) 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
- 13) Spencer, E.M.(ed.) (1983) "Insulin-like growth factors/Somatomedins. Basic chemistry, biology, clinical importance." Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- 14) LeRoith, D. and Raizada, M.K.(eds.) (1989) "Molecular and cellular biology of insulin-like growth factors and their receptors." Plenum, New York.
- 15) 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.
- 16) Daughaday, W.H., Hall, K., Raben, M.S., Salmon, W.D.Jr., Van den Brande, J.L. and Van Wyk J.J. (1972) Somatomedin: a proposed designation for the sulfation factor. Nature 235, 107.
 - 17) Froesch, E.R., Burgi, H., Ramseier, E.B., Bally, P. and Labhart, A. (1963) Antibody-suppressible and nonsuppressible 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
 - 18) Morell, B. and Froesch, E.R. (1973) Fibroblasts as an experimental tool in metabolic and hormone studies. I. Growth and glucose metabolism of fibroblasts in culture. Eur. J. Clin. Invest. 3, 119-123.
 - 19) Rinderknecht, E. and Humbel, R.E. (1976) Amino-terminal sequences of two polypeptides from human serum with nonsuppressible insulin-like and cell-growth-promoting activities.: Evidence for structural homology with insulin B chain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73, 4379-4381.
 - 20) Rinderknecht, E. and Humbel, R.E. (1978) The amino acid sequence of human insulin-like growth factor-I and its homology with proinsulin. J. Biol. Chem. 253, 2769-2776.
 - 21) Rinderknecht, E. and Humbel, R.E. (1978) Primary structure of insulin-like growth factor II. FEBS Lett. 89, 283-286.
 - 22) Temin, H.M. (1971) Stimulation of multiplication of stationary chicken cells. J. Cell. Physiol. 78, 161-170.
 - 23) Duiak, N.C. and Temin, H.M. (1973) Multiplication-stimulating activity for chicken fibroblasts from rat liver cell conditioned medium: A family of small polypeptides. J. Cell. Physiol. 81, 161-170.
 - 24) Marquardt, H., Todaro, G.J., Henderson, L.E. and Oroszlan, S. (1981) Purification and primary structure of a polypeptide with multiplication-stimulating activity from rat liver cell cultures. Homology with human insulin-like growth factor II. J. Biol. Chem. 256, 6859-6865.
 - 25) 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.
 - 26) Enberg, G., Carlquist, M., Jornvall, H. and Hall, K. (1984) The characterization of somatomedin A, isolated by microcomputer-controlled chromatography, reveals an apparent identity to insulin-like growth factor I. Eur. J. Biochem. 143, 117-123.
 - 27) Fryklund, L. and Sievertsson, H. (1978) Primary structure of somatomedin B: A growth hormone-dependent serum factor with protease inhibiting activity. FEBS Lett. 87, 55-69.
 - 28) Blundell, T.L., Bedarkar, S., Rinderknecht, E. and Humbel, R.E. (1978) Insulin-like growth factor: A model for tertiary structure accounting for immunoreactivity and receptor binding. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.

- 75, 180-184.
- 29) Rubin, J.S., Mariz, I., Jacobs, J.W., Daughaday, W.H. and Bradshaw, R.A. (1982) Isolation and partial sequence analysis of rat basic somatomedin. Endocrinology 110, 734-740.
 - 30) Tamura, K., Kabayashi, M., Ishii, Y., Tamura, T., Hashimoto, K., Nakamura, S., Niwa, M. and Zapf, J. (1989) Primary structure of rat insulin-like growth factor-I and its biological activities. J. Biol. Chem. 264, 5616-5621.
 - 31) 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 der Brande, J.L., (1983) Sequence of cDNA encoding human insulin-like growth factor I precursor. Nature 306, 609-611.
 - 32) Rotwein, P. (1986) Two insulin-like growth factor I messenger RNAs are expressed in human liver. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 77-81.
 - 33) Ullrich, A., Berman, C.H., Dull, T.J., Gray, A. and Lee, J.M. (1984) Isolation of the human insulin-like growth factor I gene using a single synthetic DNA probe. EMBO J. 3, 361-364.
 - 34) Rotwein, P., Pollock, K.M., Didier, D.K. and Krivi, G.G. (1986) Organization and sequence of the human insulin-like growth factor I gene: Alternative RNA processing produces two insulin-like growth factor I precursor peptides. J. Biol. Chem. 261, 4828-4832.
 - 35) Sara, V.R., Hall, K., Lins, P.E. and Fryklund, L. (1980) Serum levels of immunoreactive somatomedin-A in the rat: some developmental aspects. Endocrinology 107, 622-625.
 - 36) Handelsman, D.J., Spaliviero, J.A., Scott, C.D. and Baxter, R.C. (1987) Hormonal regulation of the peripubertal surge of insulin-like growth factor-I in the rat. Endocrinology 120, 491-496.
 - 37) Moses, A.C., Nissley, S.P., Short, P.A., Rechler, M.M., White, R.M., Knight, A.B. and Haga, O. (1980) Increased levels of multiplication-stimulating activity, and insulin-like growth factor, in fetal rat serum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3649-3653.
 - 38) Daughaday, W.H., Parker, K.A., Borowsky, S., Trivedi, B. and Kapadia, M. (1982) Measurement of somatomedin-related peptides in fetal, neonatal, and maternal rat serum by insulin-like growth factor (IGF) I radioimmunoassay, IGF-II radioreceptor assay (RRA), and multiplication-stimulating activity RRA after acid-ethanol extraction. Endocrinology 110, 575-581.
 - 39) Froesch, E.R. and Zapf, J. (1985) Insulin-like growth factors and insulin: comparative aspects. Diabetologia 28, 485-493.
 - 40) 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 mechanism of action. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 935-939.

- 41) Daughaday, W.H., Phillips, L.S. and Muller, M.C. (1976) The effects of insulin and growth hormone on the release of somatomedin by isolated rat liver. Endocrinology 98, 1214-1219.
- 42) Schalch, D.S., Heinrich, U.E., Draznin, B., Johnson, C.J. and Miller, L.L. (1979) Role of the liver in regulating somatomedin activity: hormonal effects on the synthesis and release of insulin-like growth factor and its carrier protein by the isolated perfused rat liver. Endocrinology 104, 1143-1151.
- 43) 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.
- 44) Kogawa, M., Takano, K., Asakawa, K., Hizuka, N., Tsushima, T. and Shizume, K. (1983) Insulin stimulation of somatomedin A production in monolayer cultures of rat hepatocytes. Acta Endocrinol. 103, 385-390.
- 45) Uthne, K. and Uthne, T. (1972) Influence of liver resection and regeneration on somatomedin(sulphation factor) activity in sera from normal and hypophysectomized rats. Acta Endocrinol. 71, 255-264.
- 46) 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.
- 47) Clemmons, D.R., Van Wyk, J.J., Ridgway, E.C., Kliman, B., Kjellberg, R.N. and Underwood, L.E. (1979) Evaluation of acromegaly by radioimmunoassay of somatomedin-C. N. Engl. J. Med. 301, 1138-1142.
- 48) Scott, C.D., Martin, J.L. and Baxter, R.C. (1985) Rat hepatocyte insulin-like growth factor I and its binding protein: Effect on growth hormone and insulin-treated rats. Endocrinology 119, 2346-2351.
- 49) Roberts C.T.Jr., Lasky, S.R., Lowe, W.L.Jr., Seaman, W.T. and LeRoith, D. (1987) Molecular cloning of rat insulin-like growth factor I complementary ribonucleic acids: Differential messenger ribonucleic acid processing and regulation by growth hormone in extrahepatic tissues. Mol. Endocrinol. 1, 243-238.
- 50) Hynes, M.A., VanWyk, 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.
- 51) 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.
- 52) Roberts, C.T., Jr., Brown, A.L., Graham, D.E., Seelig, S., Berry, S., Gabbay, K.H. and Rechler, M.M. (1986) Growth hormone regulates the

- abundance of insulin-like growth factor I RNA in adult rat liver. J. Biol. Chem. 261, 10025-10028.
- 53) 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.
 - 54) 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.
 - 55) Swenne, I., Hill, D.J., Strain, A.J. and Milner, R.D.G. (1987) Growth hormone regulation of somatomedin C/insulin-like growth factor I production and DNA replication in fetal rat islets in tissue culture. Diabetes 36, 288-294.
 - 56) Doglio, A., Dani, C., Fredrikson, G., Grimaldi, P. and Ailhaud, G. (1987) Acute regulation of insulin-like growth factor-I gene expression by growth hormone during adipose cell differentiation. EMBO J. 6, 4011-4016.
 - 57) 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.
 - 58) Ginot, F., Decaux, J.-F., Cognat, M., Berbar, T., Levrat, F., Kahn, A. and Weber, A. (1989) Transfection of hepatic genes into adult rat hepatocytes in primary culture and their tissue-specific expression. Eur. J. Biochem. 180, 289-294.
 - 59) Murphy, L.J. and Friesen, H.G. (1988) Differential effects of estrogen and growth hormone on uterine and hepatic insulin-like growth factor I gene expression in the ovariectomized hypophysectomized rat. Endocrinology 122, 325-332.
 - 60) Zapf, J., Morell, B., Walter, H., Laron, Z. and Froesch, E.R. (1980) Serum levels of insulin-like growth factor (IGF) and its carrier protein in various metabolic disorders. Acta Endocrinol. 95, 505-517.
 - 61) 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.
 - 62) 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.
 - 63) Yang, H., Emler, C. and Schalch, D. (1987) Diabetes mellitus influences growth by regulating hepatic insulin-like growth factors I and II (IGF-I and IGF-II) gene expression. Diabetes(suppl. 1) 36, 95A.
 - 64) 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.

- 85) Miller, L.L., Schalch, D.S. and Draznin, B. (1981) Role of the liver in regulating somatomedin activity: Effects of streptozotocin diabetes and starvation on the synthesis and release of insulin-like growth factor and its carrier protein by the isolated perfused rat liver. Endocrinology 108, 1265-1271.
- 86) Scott, C.D. and Baxter, R.C. (1986) Production of insulin-like growth factor I and its binding protein in rat hepatocytes cultured from diabetic and insulin-treated diabetic rats. Endocrinology 119, 2346-2352.
- 87) Richman, R.A., Benedict, M.R., Florini, J.R. and Toly, B.A. (1985) Hormonal regulation of somatomedin secretion by fetal rat hepatocytes in primary culture. Endocrinology 116, 180-188.
- 88) 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
- 89) Ikeda, T., Fujiyama, K., Takeuchi, T., Honda, M., Mokuda, O., Tominaga, O. and Mashiba, H. (1989) Effect of thyroid hormone on somatomedin-C release from perfused rat liver. Experientia 45, 170-171.
- 70) Rosenfeld, R.L. and Furlanetto, R. (1985) Physiologic testosterone and estradiol induction of puberty increases plasma somatomedin C. J. Pediatr. 107, 415-417.
- 71) Murphy, L.J., Murphy, L.C. and Friesen, H.G. (1987) Estrogen induces insulin-like growth factor-I expression in the rat uterus. Mol. Endocrinol. 1, 445-450.
- 72) Williams, D.W., Williams, E.D. and Wynford-Thomas, D. (1988) Loss of dependence on IGF-I for proliferation of human thyroid adenoma cells. Brit. J. Cancer 57, 535-539.
- 73) Holly, J.M.P. and Wass, J.A.H. (1989) Insulin-like growth factors; autocrine, paracrine or endocrine? New perspectives of the somatomedin hypothesis in the light of recent developments. J. Endocrinol. 122, 611-618.
- 74) Smith, E.P., Svoboda, M.E., Van Wyk, J.J., Kierszenbaum, A.L. and Tres, L.L. (1987) Partial characterization of a somatomedin-like peptide from the medium of cultured rat Sertoli cells. Endocrinology 120, 186-193.
- 75) 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.
- 76) 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.
- 77) Merimee, T.J. and Froesch, E.R. (1982) Insulin-like growth factors in the fed and fasted status. J. Clin. Endocrinol. Metab. 55, 999-1002.
- 78) Clemmons, D.R., Klibanski, A., Underwood, L.E., McArthur, J.W., Ridgeway, E.C., Beitins, I.Z. and Van Wyk, J.J. (1981) Reduction of plasma

- immunoreactive somatomedin C during fasting in humans. J. Clin. Endocrinol. Metab. 53, 1247-1250.
- 79) Schalch, D.S. and Cree, T.C. (1987) The effects of protein and calorie malnutrition on growth, insulin-like growth factors and other growth-promoting hormones in the rat. Excerpta Medica-Int. Congr. Ser. 700, 293-298.
- 80) Phillips, L.S., Drawski, A.T. and Belowski, D.C. (1978) Somatomedin and nutrition. IV. Regulation of somatomedin activity and growth cartilage activity by quality and composition of diet in rats. Endocrinology 103, 121-127.
- 81) Bolze, M.S., Reeves, R.D., Lindbeck, 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.
- 82) Maiter, D., Fliesen, T., Underwood, L.E., Maes, M., Gerald, 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.
- 83) 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.
- 84) Maiter, D., Maes, M., Underwood, L.E., Fliesen, T., Gerald, G. and Ketelslegers, J.-M. (1988) Early changes in serum concentration of somatomedin-C induced by dietary protein deprivation in rats: Contributions of growth hormone receptor and post-receptor defects. J. Endocrinol. 118, 113-120.
- 85) Prewitt, T.E., D'Ercole, A.J., Switzer, B.R. and Van Wyk, J.J. (1982) Relationship of serum immunoreactive somatomedin-C to dietary protein and energy in growing rats. J. Nutr. 112, 144-150.
- 86) Clemmons, D.R., Seek, M.M. and Underwood, L.E. (1985) Supplemental essential amino acids augment the somatomedin-C/insulin-like growth factor I response to refeeding after fasting. Metabolism 34, 391-395.
- 87) Schalch, D.S. and Cree, T.C. (1985) Protein utilization in growth: Effect of calorie deficiency on serum growth hormone, somatomedins, total thyroxine (T_4) and triiodothyronine, free T_4 , index, and total corticosterone. Endocrinology 117, 2307-2312.
- 88) Soliman, A.T., Hassen, A.I., Aref, M.K., Hintz, R.L., Rosenfeld, R.G. and Rogol, A.D. (1986) Serum insulin-like growth factors I and II concentrations and growth hormone and insulin response to arginine infusion in children with protein-energy malnutrition before and after nutritional rehabilitation. Pediatr. Res. 20, 1122-1130.
- 89) Hintz, R.L., Suskind, R., Amatayakul, K., Thanangkul, O. and Olson, R., (1978) Plasma somatomedin and growth hormone values in children with protein calorie malnutrition. J. Pediatr. 92, 153-156.

- 90) Elmer, 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.
- 91) Lowe, W.L., Jr., Adamo, M., Werner, H., Roberts, C.T., Jr. and LeRoith, D. (1989) Regulation by fasting of rat insulin-like growth factor-I and its receptor. J. Clin. Invest. 84, 619-626.
- 92) Kato, H., Miura, Y., Okoshi, A., Umezawa, T. Takahashi, S.-I. and Noguchi, T. (1989) Dietary and hormonal regulation factors affecting the mRNA level of IGF-I in rat liver and in primary cultures of rat hepatocytes. in "Molecular and Cellular Biology of Insulin-like Growth Factors and Their Receptors." ed. by LeRoith, D., and Raizada, M.K., pp125-128. Plenum
- 93) Rechler, M.M., Zapf, J., Nissley, S.P., Froesch, E.R., Moses, A.C., Podskalny, J.M., Schilling, E.E. and Humbel, R.E. (1980) Interactions of insulin-like growth factors I and II and multiplication-stimulating activity with receptors and serum carrier proteins. Endocrinology 107, 1451-1458.
- 94) 大越麻子 (1990) 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およびタイプIレセプター遺伝子のクローニング
- 95) Rechler, M.M. and Nissley, S.P. (1984) Insulin-like growth factor(IGF)/somatomedin receptor subtypes: Structure, function, and relationships to insulin receptor and IGF carrier proteins. Hormone Res. 24, 152-159.
- 96) Czech, M.P. (1989) Signal transmission by the insulin-like growth factors. Cell 59, 235-238.
- 97) Ullrich, A. and Schlessinger, J. (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. Cell 61, 203-212.
- 98) Jacobs, S., Kull, F.C., Earp, H.S., Svoboda, M. and Van Wyk, J.J. (1983) Somatomedin-C stimulates the phosphorylation of the β -subunit of its own receptor. J. Biol. Chem. 258, 9581-9584.
- 99) Jacobs, S., Kull, F.C. and Cuatrecasas, P. (1983) Monensin blocks the maturation of receptors for insulin and somatomedin C: identification of receptor precursors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1228-1231.
- 100) Kull, F.C., Jacobs, S., Su, Y.-F., Svoboda, M., Van Wyk, J.J. and Cuatrecasas, P. (1983) Monoclonal antibodies to receptors for insulin and somatomedin C. J. Biol. Chem. 258, 6561-6566.

- 101) Czech, M.P. (1982) Structure and functional homologies in the receptors for insulin and the insulin-like growth factors. Cell 31, 8-10.
- 102) Ullrich, A, Gray, A., Tam, A.W., Yang-Feng, T., Tsubokawa, M., Collins, C., Henzel, W., LeBon, Y., Kathuria, S., Chen, E., Jacobs, S., Francke, U., Ramachandran, J. and Fujita-Yamaguchi, Y. (1986) Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. EMBO J. 5, 2503-2512.
- 103) Ullrich, A., Bell, J.R., Chen, E.Y., Herrera, R., Ptruzezzelli, L.M., Dull, Y Y.J., Gray, A., Soussens, L., Iio, Y.-C., Tsubokawa, M., Mason, A., Seeburg, P.H., Grunfeld, C., Rosen, A.A. and Ramachandran, J. (1985) Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. Nature 313, 756-761.
- 104) Ebina, Y., Ellis, L., Jarnagin, K., Edery, M., Graf, L., Clauser, E., Ou, J.-H., Masiarz, F., Kan, Y.W., Goldfine, I.D., Roth, A.A., Rutter, W.J. (1985) The human insulin receptor cDNA: The structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. Cell 40, 747-758.
- 105) Morgan, O.D., Edman, J.C., Standring, D.N., Fried, V.A., Smith, M.C., Roth, R.A. and Rutter, W.J. (1987) Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein. Nature 329, 301-307.
- 106) Oshima, A., Nolan, C.M., Kyle, J.W., Grubb, J.H. and Sly, W.S. (1988) The human cation-independent mannose 6-phosphate receptor. Cloning and sequence of the full-length cDNA and expression of functional receptor in cos cells. J. Biol. Chem. 263, 2553-2562.
- 107) MacDonald, R.G., Pfeffer, S.R., Coussens, L., Tepper, M.A., Brocklebank, C.M., Mole, J.E., Anderson, J.K., Chen, E., Czech, M.P. and Ullrich, A. (1988) A single receptor binds both insulin-like growth factor II and mannose 6-phosphate. Science 239, 1134-1137.
- 108) Nishimoto, I., Hata, Y., Ogata, E. and Kojima, I. (1987) Insulin-like growth factor II stimulates calcium influx in competent BALB/c3T3 primed with epidermal growth factor. J. Biol. Chem. 262, 12120-12126.
- 109) Kiess, W., Greenstein, L.A., White, R.M., Lee, L., Rechler, M.M., Nissley, P. (1987) Type II insulin-like growth factor receptor is present in rat serum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7720-7724.
- 110) Morgan, O.D. and Roth, R.A. (1986) Identification of a monoclonal antibody which can distinguish between two distinct species of the type I receptor for insulin-like growth factor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 138, 1341-1347.
- 111) Maxham, C.P., Duronio, V. and Jacobs, S. (1989) Insulin-like growth factor I receptor β -subunit heterogeneity. Evidence for hybrid tetramers composed of insulin-like growth factor I and insulin receptor heterodimers. J. Biol. Chem. 264, 13238-13244.
- 112) Hints, R.L. and Liu, F. (1977) Demonstration of specific plasma protein binding sites for somatomedin. J. Clin. Endoc. Metab. 45, 988-995.

- 113) Zapf, J., Waldvogel, M. and Froesch, E.R. (1975) Binding of nonsuppressible insulin-like activity to human serum: Evidence of a carrier protein. Arch. Biochem. Biophys. 168, 638-645.
- 114) Hardouin, S., Hossenlopp, P., Segovia, B., Seurin, D., Portolan, G., Lassarre, C. and Binoux, M. (1987) Heterogeneity of insulin-like growth factor binding proteins and relationship between structure and affinity. 1. Circulating forms in man. Eur. J. Biochem. 170, 121-132.
- 115) Hossenlopp, P., Seurin, D., Segovia, B., Portolan, G. and Binoux, M. (1987) Heterogeneity of insulin-like growth factor binding proteins between structure and affinity. 2. Forms released by human and rat liver culture. Eur. J. Biochem. 170, 133-142.
- 116) Yang, Y.W.H., Wang, J.F., Orłowski, C.C., Nissley, S.P. and Rechler, M.M. (1989) Structure, specificity, and regulation of the insulin-like growth factor-binding proteins in adult serum. Endocrinology 125, 1540-1555.
- 117) Hardouin, S., Gourmelen, M., Noguez, P., Seurin, D., Roghani, M., Le Bouc, Y., Pova, G., Merimee, T.J., Hossenlopp, P. and Binoux, M. (1989) Molecular forms of serum insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins in man: Relationships with growth hormone and IGFs and physiological significance. J. Clin. Endoc. Metab. 69, 1291-1290.
- 118) Drop, S.L.S., Kortleve, D.J. and Guyda, H.J. (1984) Isolation of a somatomedin-binding protein from preterm amniotic fluid. Development of a radioimmunoassay. J. Clin. Endocrinol. Metab. 59, 899-907.
- 119) Busby, W.H., Jr., Klapper, D.G. and Clemmons, D.R. (1988) Purification of a 31,000-dalton insulin-like growth factor binding protein from human amniotic fluid. Isolation of two forms with different biologic actions. J. Biol. Chem. 263, 14203-14210.
- 120) Pova, G., Enberg, G., Jornvall, H. and Hall, K. (1984) Isolation and characterization of a somatomedin-binding protein from mid-term human amniotic fluid. Eur. J. Biochem. 144, 199-204.
- 121) Koistinen, R., Kalkkinen, N., Huhtala, M.-L., Seppala, M., Bohn, H., and Rutanen, E.M. (1986) Placental protein 12 is a decidual protein that binds somatomedin and has an identical N-terminal amino acid sequence with somatomedin-binding protein from human amniotic fluid. Endocrinology 118, 1375-1378.
- 122) Morris, D.H., Schalch, D.S. and Monty-Miles, B. (1981) Identification of a somatomedin-binding protein produced by a rat hepatoma cell line. FEBS Lett. 127, 221-224.
- 123) Mottola, C., MacDonald, R.G., Brackett, J.L., Mole, J.E., Anderson, J.K. and Czech, M.P. (1986) Purification and amino-terminal sequence of an insulin-like growth factor-binding protein secreted by rat liver BRL-3A cells. J. Biol. Chem. 261, 11180-11188.
- 124) Szabo, L., Mottershead, D.G., Ballard, F.J. and Wallace, J.C. (1988) The bovine insulin-like growth factor (IGF) binding protein purified from

- conditioned medium requires the N-terminal tripeptide in IGF-I for binding. Biochem. Biophys. Res. Commun. 151, 207-214.
- 125) Furlanetto, R.W. (1980) The somatomedin C binding protein: Evidence for a heterologous subunit structure. J. Clin. Endocrinol. Metab. 51, 12-19.
- 126) 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.
- 127) 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.
- 128) Baxter, R.C. and Martin, J.L. (1989) Structure of the Mr 140,000 growth hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein complex: Determination by reconstitution and affinity-labeling. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6898-6902.
- 129) Ballard, F.J., Baxter, R.C., Binoux, M., Clemmons, D.R., Drop, S., Hall, K., Hinz, R., Rechler, M.M., Rutain, E. and Schwander, J. (1989) On the nomenclature of the IGF binding proteins. Acta Endocrinol. 121, 751-752.
- 130) Ooi, G.T. (1990) Insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs): more than just 1,2,3. Mol. Cell. Endocrinol. 71, C39-C43.
- 131) 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.
- 132) 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.
- 133) 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. Endoc. Metab. 65, 432-440.
- 134) 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. Endoc. Metab. 67, 1225-1230.
- 135) Romaus, J.A., Terrell, J.E., Yang, Y.W., Nissley, S.P. and Rechler, M.M. (1988) Insulin-like growth factor carrier proteins in neonatal and adult rat serum are immunologically different: Demonstration using a new radioimmunoassay for the carrier protein from BRL-3A rat liver cells. Endocrinology 118, 1743-1758.
- 136) Zapf, J., Hauli, C., Waldvogel, M. and Froesch, E.R. (1986) Acute metabolic effects and half-lives of intravenously administered insulin-like growth factors I and II in normal and hypophysectomized rats. J. Clin. Invest. 77, 1768-1775.
- 137) Meuli, C., Zapf, J. and Froesch, E.R., (1978) NSILA-carrier protein

- abolishes the action of nonsuppressible insulin-like activity(NSILA-s) on perfused fat heart. Diabetologia 14, 255-259.
- 138) Knauer, D.J. and Smith, G.L. (1980) Inhibition of biological activity of multiplication-stimulating activity by binding to its carrier protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 7252-7256.
- 139) Ritvos, O., Ranta, T., Jalkanen, J., Suikkari, A.M., Voutilainen, R., Bohn, H. and Rutanen, E.M. (1988) Insulin-like growth factor (IGF) binding protein from human decidua inhibits the binding and biological action of IGF-I in cultured choriocarcinoma cells. Endocrinology 122, 2150-2157.
- 140) 加藤久典、(1987) インスリン様成長因子とタンパク質代謝 日本農芸化学会誌、61, 1305-1308.
- 141) Blum, W.F., Jenne, E.W., Reppin, F., Kietzmann, K., Ranke, M.B. and Bierich, J.R. (1989) Insulin-like growth factor I(IGF-I)-binding protein complex is a better mitogen than free IGF-I. Endocrinology 125, 766-772.
- 142) DeMellow, J.S.M. and Baxter, R.C. (1988) Growth hormone dependent insulin-like growth factor binding protein both inhibits and potentiates IGF-I stimulated DNA synthesis in skin fibroblasts. Biochem. Biophys. Res. Commun. 156, 199-204.
- 143) Elgin, R.G., Busby, W.H., Jr. and Clemmons, D.R. (1987) An insulin-like growth factor (IGF) binding protein enhances the biologic response to IGF-I. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 3254-3258.
- 144) Julkunen, 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.
- 145) Brewer, M.T., Stetler, G.L., Squires, C.H., Thompson, R.C., Busby, W.H. and Clemmons, D.R. (1988) Cloning, characterization, and expression of a human insulin-like growth factor binding protein. Biochem. Biophys. Res. Commun. 152, 1289-1297.
- 146) Brown, A.L., Chiariotti, L., Orłowski, C.C., Mehlman, T., Burgess, W.H., Ackermann, E.J., Bruni, C.B. and Rechler, M.M. (1989) Nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding a fetal rat binding protein for insulin-like growth factors. J. Biol. Chem. 264, 5148-5154.
- 147) 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 or its messenger RNA. Mol. Endocrinol. 3, 1053-1060.
- 148) Wood, W.I., Cachianes, G., Henzel, W.J., Winslow, G.A., Spencer, S.A., Hellmiss, R., Martin, J.L. and Baxter, R.C. (1988) Cloning and expression of the growth hormone-dependent insulin-like growth factor-binding protein. Mol. Endocrinol. 2, 1176-1185.
- 149) 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.

- 150) Clemmons, D.R. (1989) The role of insulin-like growth factor binding proteins in controlling the expression of IGF actions. in "Molecular and Cellular biology of insulin-like growth factors and their receptors." ed. by LeRoith, D. and Raizada, K. Plenum, New York, pp381-394.
- 151) Phillips, L.S. and Unterman, T.G. (1984) Somatomedin activity in disorders of nutrition and metabolism. Clinics Endocrinol. Metab. 13, 145-188.
- 152) Phillips, L.S., Belosky, D.C. and Reichard, L.A. (1979) Nutrition and somatomedin. V. Action and measurement of somatomedin inhibitor(s) in serum from diabetic rats. Endocrinology 104, 1513-1518.
- 153) Drop, S.L.S. and Hintz, R.L.(eds.) (1990) "Insulin-like growth factor binding proteins. Excerpta Medica Int. Congr. Ser. 881", Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford.
- 154) Baxter, R.C. and Martin, J.L. (1989) Binding proteins for the insulin-like growth factors:Structure, regulation and function. in "Progress in growth factor research" vol.1, pp49-68.
- 155) Ooi, G.T. and Herington, A.C. (1988) The biological and structural characterization of specific serum binding proteins for the insulin-like growth factors. J. Endocrinol. 118, 7-18.
- 156) Froesch, E.R., Schmid, C., Schwander, J. and Zapf, J. (1985) Actions of insulin-like growth factors. Ann. Rev. Physiol. 47, 443-467.
- 157) Fagin, J.A., Brown, A. and Melmed, S. (1988) Regulation of pituitary insulin-like growth factor-I messenger ribonucleic acid levels in rats harboring somatomammotropic tumors: Implications for growth hormone autoregulation. Endocrinology 122, 2204-2210.
- 158) 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.
- 159) Fagin, J.A. and Melmed, S. (1987) Relative increase in insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid levels in compensatory renal hypertrophy. Endocrinology 120, 718-724.
- 160) Schoenle, E., Zapf, J., Humbel, R.E. and Froesch, E.R. (1982) Insulin-like growth factor I stimulates growth in hypophysectomized rats. Nature 296, 252-253.
- 161) Skottner, A. Clark, R.G., Robinson, I.C.A.F. and Fryklund, L. (1986) Recombinant human insulin-like growth factor:testing the somatomedin hypothesis in hypophysectomized rats. J. Endocrinol. 112, 123-132.
- 162) Van Buul-Offers, S., Ueda, I. and Van den Brande, J.L. (1986) Biosynthetic somatomedin C (SM-C/IGF-I) increases the length and weight of snell dwarf mice. Pediat. Res. 20, 825-827.
- 163) Guler, H.-P., Zapf, J., Scheiwiller, E. and Froesch, E.R. (1988) Recombinant human insulin-like growth factor I stimulates growth and has distinct effects on organ size in hypophysectomized rats. Proc. Natl.

- Acad. Sci. USA 85, 4889-4893.
- 164) Mathews, L., Hammer, R.E., Behringer, R.R., D'Ercole, A.J., Bell, G.I., Brinster, R.L. and Palmiter, R.D. (1988) Growth enhancement of transgenic mice expressing human insulin-like growth factor I. Endocrinology 123, 2827-2833.
 - 165) Zapf, J., Schoenle, E. and Froesch, E.R. (1978) Insulin-like growth factors I and II : Some biological actions and receptor binding characteristics of two purified constituents of nonsuppressible insulin-like activity of human serum. Eur. J. Biochem. 87, 285-296.
 - 166) Ong, J., Yamashita, S. and Melmed, S. (1987) Insulin-like growth factor I induces c-fos messenger ribonucleic acid in L6 rat skeletal muscle cells. Endocrinology 120, 353-357.
 - 167) Janeczko, R.A. and Etlinger, J.D. (1984) Inhibition of intracellular proteolysis in muscle cultures by multiplication-stimulating activity. J. Biol. Chem. 259, 6292-6297.
 - 168) 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.
 - 169) Ballard, F.J., Read, L.C., Francis, G.L., Bagley, C.J. and Wallace, J.C. (1986) Binding properties and biological potencies of insulin-like growth factors in L6 myoblasts. Biochem. J. 233, 223-230.
 - 170) 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.
 - 171) 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.
 - 172) Brenner-Gati, L., Berg, K.A. and Gershengorn, M.C. (1988) Thyroid-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I synergize to elevate 1,2-diacylglycerol in rat thyroid cells. J. Clin. Invest. 82, 1144-1148.
 - 173) 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.
 - 174) 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.
 - 175) Alemany, J., Borrás, T. and de Pablo, F. (1990) Transcriptional stimulation of the $\delta 1$ -crystallin gene by insulin-like growth factor I and insulin requires DNA cis elements in chicken. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3353-3357.

- 176) McMorris, F.A., Smith, T.M., DeSalvo, S. and Furlanetto, R.W. (1986) Insulin-like growth factor I/somatomedin C : A potent inducer of oligodendrocyte development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 822-826.
- 177) Kurts, A., Zapf, J., Eckardt, K.U., Clemons, G., Froesch, E.R. and Bauer, C. (1988) Insulin-like growth factor I stimulates erythropoiesis in hypophysectomized rats. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 7825-7829.
- 178) Prosser, C.G., Sankaran, L., Hennighausen, L. and Topper, Y.J. (1987) Comparison of the roles of insulin and insulin-like growth factor I in casein gene expression and in the development of α -lactalbumin and glucose transport activities in the mouse mammary epithelial cell. Endocrinology 120, 1411-1416.
- 179) Shamay, A., Cohen, N., Niwa, M. and Gertler, A. (1988) Effect of insulin-like growth factor I on deoxyribonucleic acid synthesis and galactopoiesis in bovine undifferentiated and lactating mammary tissue in vitro. Endocrinology 123, 804-809.
- 180) 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.
- 181) Maniatis, T., Fritsh, E.F., and Sambrook, J. (eds.) (1982) Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory.
- 182) Huynh, T.V., Young, R.A. and Davis, R.W., (1985) in DNA Cloning Techniques, A Practical Approach. Vol. II. Glover, D.M.(ed.) pp. 49-78. JRL Press Oxford.
- 183) Roberts, C.T.Jr., Lasky, S.R., Lowe, W.L.Jr. and LeRoith, D.(1987) Rat IGF-I cDNA's contain multiple 5' untranslated regions. Biochem. Biophys. Res. Commun. 146, 1154-1159.
- 184) Casella, S.J., Smith, E.P., Van Wyk, J.J., Joseph, D.R., Hynes, M.A., Hoyt, E.C. and Lund, P.K. (1987) Isolation of rat testis cDNAs encoding an insulin-like growth factor I precursor. DNA 6, 325-330.
- 185) Shimatsu, A. and Rotwein, P.(1987) Sequence of rat two insulin-like growth factor I mRNAs differing within the 5' untranslated region. Nucl. Acids. Res. 15, 7196
- 186) Gubler, U. and Hoffman, B.J. (1983) A simple and efficient method for generating cDNA libraries. Gene 25, 263-269.
- 187) Shimatsu, A. and Rotwein, P.(1987) Mosaic evolution of the insulin-like growth factors: Organization, sequence and expression of the rat insulin-like growth factor I gene. J. Biol. Chem. 262, 7894-7900
- 188) Lund, P.K., Hoyt, E.C. and VanWyk, 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. 2, 2054-2061.
- 189) Dayhoff, M.O. (1972) "Atlas of of protein sequence and structure." vol. 5, National Biomedical Foundation.
- 190) Isemura, S and Ikenaka, T. (1978) Amino acid sequence of fragments I and II

- by cyanogen bromide cleavage of rat serum albumin. *J. Biochem.* 83, 35-48.
- 191) Honegger, A. and Humbel, R.E. (1986) Insulin-like growth factor I and II in fetal and adult bovine serum. Purification, primary structure, and immunological cross-reactivities. *J. Biol. Chem.* 261, 569-575.
- 192) Fransis, G.L., McNeil, K.A., Wallace, J.C. Ballard, F.J. and Owens, P.C. (1989) Sheep insulin-like growth factors I and II: sequences, activities and assays. *Endocrinology* 124, 1173-1183.
- 193) 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.
- 194) 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.
- 195) Kajimoto, Y. and Rotwein, P. (1989) Structure and expression of a chicken insulin-like growth factor I precursor. *Mol. Endocrinol.* 3, 1907-1913.
- 196) 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.
- 197) 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.
- 198) Powell, D.R., Lee, P.D.K., Chang, D. Liu, F. and Hints, R.L. (1987) Antiserum developed for the E peptide region of insulin-like growth factor IA prohormone recognizes a serum protein by both immunoblot and radioimmunoassay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 65, 868-875.
- 199) Gowan, L.K., Hampton, B., Hill, D.J., Schlueter, R.J. and Perdue, J.F. (1987) Purification and characterization of a unique high molecular weight form of insulin-like growth factor II. *Endocrinology* 121, 449-458.
- 200) Bach, M.A., Roberts, C.T., Jr., Smith, E.P. and LeRoith, D. (1990) Alternative splicing produces messenger RNAs encoding insulin-like growth factor-I prohormones that are differentially glycosylated *in vitro*. *Mol. Endocrinol.* 4, 899-904.

- 201) 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.
- 202) 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.
- 203) Lund, P.K., Moats-Staats, B.M., Hynes, M.A., Simmons, J.G., Jansen, M., D'Ercole, A.J. and Van Wyk, J.J. (1986) Somatomedin-C/insulin-like growth factor-I and insulin like growth factor-II mRNAs in rat fetal and adult tissues. J. Biol. Chem. 261, 14539-14544.
- 204) Spena, A., Krause, E. and Dobberstein, B. (1985) Translation efficiency of zein mRNA is reduced by hybrid formation between the 5' and 3'-untranslated region. EMBO J. 4, 2153-2158
- 205) Anderson, O., Gautier, M. and Green, F. (1984) Nucleic acid sequence and chromosome assignment of a wheat storage protein gene. Nucl. Acids Res. 12, 8129-8144.
- 206) 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.
- 207) Adamo, M., Lowe, W.L. Jr., LeRoith, D. and Roberts, C.T. Jr. (1989) Insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acids with alternative 5'-untranslated region are differentially expressed during development of the rat. Endocrinology 124, 2737-2744.
- 208) Derynck, R., Content, J., DeClercq, E., Volckaert, G., Tavernier, J., Devos, R. and Fries, W. (1980) Isolation and structure of a human fibroblast interferon gene. Nature 285, 542-549.
- 209) Adams, J.M., Gough, N.M., Webb, E.A., Tyler, B.M., Jackson, J. and Cory, S. (1980) Molecular cloning of mouse immunoglobulin heavy chain messenger ribonucleic acids coding for μ , α , $\gamma 1$, $\gamma 2a$ and $\gamma 3$ chains. Biochemistry 19, 2711-2719.
- 210) Richards, R.I., Shine, J., Ullrich, A., Wells, R.E. and Goodman, H.M. (1979) Molecular cloning and sequence analysis of adult chicken β globin cDNA. Nucl. Acids Res. 7, 1137-1146.
- 211) Fagan, J.B., Pastan, I. and de Crombrughe, B. (1980) Sequence rearrangement and duplication of double strand fibronectin cDNA probably occurring during cDNA synthesis by AMV reverse transcriptase and Escherichia coli DNA polymerase. Nucl. Acids Res. 8, 3055-3064.
- 212) Chan, S.J., Noyes, B.E., Agarwal, K.L. and Steiner, D.F. (1979) Construction and selection of recombinant plasmids containing full-length complementary DNAs corresponding to rat insulin I and II. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5036-5040.
- 213) O'Hare, K., Breathnach, R., Benoist, C. and Chambon, P. (1979) No more

- than seven interruption in the ovalbumin gene: comparison of genomic and double stranded cDNA sequence. Nucl. Acids Res. 7, 321-334.
- 214) Weaver, C.A., Gordon, D.F. and Kemper, B. (1981) Introduction by molecular cloning of artifactual inverted sequences at the 5' terminus of the sense strand of bovine parathyroid hormone cDNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 4073-4077.
- 215) Verma, I.M., (1981) in The Enzymes. Vol. 14. Boyer, P.D.(ed.) pp.87-103. Academic Press.
- 216) Bucci, C., Mallucci, P., Roberts, C.T.Jr., Frunzio, R. and Bruni, C.B., (1989) Nucleotide sequence of a genomic fragment of the rat IGF-I gene spanning an alternate 5' non coding exon. Nucl. Acids Res. 17, 3596.
- 217) Simmons, J.G., Rountree, D.B. and Lund, P.K. (1989) Characterization of exons for two IGF-I. Program and Abstracts of 71st Annual Meeting of the Endocrine Society. pp355.
- 218) Dynan, W.S. (1986) Promoters for housekeeping genes. Trends Genet. 2, 196-197.
- 219) Soares, M.B., Turken, A., Ishii, D., Mills, L., Episkopou, V., Cotter, S., Zeitlin, S. and Efstratiadis, A. (1986) Rat insulin-like growth factor II gene : A single gene with two promoters expressing a multitranscript family. J. Mol. Biol. 192, 737-752.
- 220) Chiariotti, L., Brown, A.L., Frunzio, R., Clemmons, D.R., Rechler, M.M. and Bruni, B.B. (1988) Structure of the rat insulin-like growth factor II transcriptional unit : Heterogeneous transcripts are generated from two promoters by use of multiple polyadenylation sites and differential ribonucleic acid splicing. Mol. Endocrinol. 2, 1115-1126.
- 221) Ueno, T., Takahashi, K., Matsuguchi, T., Endo, H. and Yamamoto, M. (1987) A new leader exon identified in the rat insulin-like growth factor ii gene. Biochem. Biophys. Res. Commun. 148, 344-349.
- 222) Matsuguchi, T., Takahashi, K., Ikejiri, K., Ueno, T., Endo, H. and Yamamoto, M. (1990) Functional analysis of multiple promoters of the rat insulin-like growth factor II gene. Biochim. Biophys. Acta 1048, 165-170.
- 223) Irminger, J.-C., Rosen, K.M., Humbel, R.E. and Villa-Komaroff, L. (1987) Tissue-specific expression of insulin-like growth factor II mRNAs with distinct 5' untranslated regions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84, 6330-6334.
- 224) Pave-Preux, M., Aggerbeck, M., Veyssier, C., Bousquet-Lemercier, B., Hanoune, J. and Barouki, R. (1990) Hormonal discrimination among transcription start sites of aspartate aminotransferase. J. Biol. Chem. 265, 4444-4448.
- 225) Frohman, M.A., Dush, M.K. and Martin, G.R. (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8998-9002
- 226) Smale, S.T. and Baltimore, D. (1989) The "initiator" as a transcriptional control element. Cell 57, 103-113.

- 227) Sawadaishi, K., Morinaga, T. and Tamaoki, T. (1988) Interaction of a hepatoma-specific nuclear factor with transcription-regulatory sequences of the human α -fetoprotein and albumin genes. Mol. Cell. Biol. 12, 5179-5187.
- 228) Baumhueter, S., Mendal, D.B., Conley, P.B., Kuo, C.J., Turk, C., Graves, M.K., Edwards, C.A., Courtois, G. and Crabtree, G.R. (1990) HNF-1 shares three sequence motifs with the POU domain proteins and is identical to LF-B1 and APF. Genes Develop. 4, 372-379.
- 229) Boshart, M., Weih, F., Schmidt, A., Fournier, R.E.K. and Schutz, G. (1990) A cyclic AMP response element mediates repression of tyrosine aminotransferase gene transcription by the tissue specific extinguisher locus Tse-1. Cell 61, 905-916.
- 230) Klock, G., Strahle, U. and Schutz, G. (1987) Oestrogen and glucocorticoid responsive elements are closely related but distinct. Nature 329, 734-736.
- 231) 加藤茂明、山内淳、長谷川忠男、舛重正一、P.Chambon (1990) オバルブミン遺伝子 5'上流領域に存在するステロイドホルモン応答性配列の解析。日本農芸化学会誌 64, 341.
- 232) Levine, M. and Manley, J.L. (1989) Transcriptional repression of eucaryotic promoters. Cell 59, 405-408.
- 233) Akerblom, I.E., Slater, E.P., Beato, M., Baxter, J.D. and Mellon, P.L. (1988) Negative regulation by glucocorticoids through interference with a cAMP responsive enhancer. Science 241, 350-353.
- 234) Adler, S., Waterman, M.L., He, X. and Rosenfeld, M.G. (1988) Steroid receptor-mediated inhibition of rat prolactin gene expression does not require the receptor DNA-binding domain. Cell 52, 685-695.
- 235) Sakai, D.D., Helms, S., Carlstedt-Duke, J., Gustafsson, J.-A., Rottman, F.M. and Yamamoto, K.R. (1988) Hormone-mediated repression: a negative glucocorticoid response element from the bovine prolactin gene. Genes Develop. 2, 1144-1154.
- 236) Minuto, F., Underwood, L.E., Grimaldi, P., Furlanetto, R.W., Van Wyk, J.J. and Giordano, G. (1981) Decreased serum somatomedin C concentrations during sleep: Temporal relationship to the nocturnal surges of growth hormone and prolactin. J. Clin. Endocrinol. Metab. 52, 399-403.
- 237) Bornfeldt, K.E., Arnqvist, H.J., Enberg, B., Mathews, L.S. and Norstedt, G. (1989) Regulation of insulin-like growth factor-I and growth hormone receptor gene regulation by diabetes and nutritional state in rat tissues. J. Endocrinol. 122, 651-656.
- 238) Fagin, J.A., Roberts, C.T., Jr., LeRoith, D. and Brown, A.T. (1989) Coordinate decrease of tissue insulin-like growth factor I posttranscriptional alternative mRNA transcripts in diabetes mellitus. Diabetes 38, 428-434.
- 239) Glisin, V., Crkvenjakov, R. and Byus, C. (1974) Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. Biochemistry 13, 2633-2637.

- 240) 垣塚彰 (1989) oligo(dT)-Latex粒子を用いたポリ(A)⁺ RNAの精製方法。
実験医学, 7, 2065-2068.
- 241) Lowe, W.L., Jr, Schaffner, A.E., Roberts, C.T., Jr. and LeRoith, D. (1987)
Developmental regulation of somatostatin gene expression in the brain is
region specific. Mol. Endocrinol. 1, 181-187.
- 242) 中村敏一 (1987) "初代培養肝細胞実験法" 学会出版センター
- 243) Guillouzo, A and Guguen-Guillouzo, C.(eds.) (1986) "Isolated and cultured
hepatocytes." John Libby, London.
- 244) 加藤久典 (1986) 東京大学修士論文:ラット初代培養肝細胞を用いた
タンパク質生分解機構の解析
- 245) Hoyt, E.C., VanWyk, J.J. and Lund, P.K. (1988) Tissue and development
specific regulation of a complex family of insulin-like growth factor I
messenger ribonucleic acids. Mol. Endocrinol. 2, 1077-1086.
- 246) Russel, W.E., Van Wyk, J.J. and Pledger, W.J. (1984) Inhibition of the
mitogenic effects of plasma by monoclonal antibody to somatomedin-C.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 2389-2392.
- 247) Shine, J. and Dalgarno, L. (1975) Determinant of cistron specificity in
bacterial ribosomes. Nature 254, 34-38.
- 248) Taylor, J.W., Schmidt, W., Cosstick, R., Okruszek, A. and Eckstein, F.
(1985) The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme
reactions to prepare nicked DNA. Nucl. Acids Res. 13, 8749-8764.
- 249) Taylor, J.W., Otto, J. and Eckstein, F. (1985) The rapid generation of
oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-
modified DNA. Nucl. Acids Res. 13, 8764-8785.
- 250) Kramer, W., Drusta, V., Jansen, H.-W., Kramer, B., Pflugfelder, M. and
Frits, H.-J. (1984) The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-
directed mutation construction. Nucl. Acids Res. 12, 9441-9456.
- 251) Kunkel, T.A. (1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without
phenotypic selection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 488-492.
- 252) Piperno, J.R. and Alberts, B.M. (1978) An ATP stimulation of T4 DNA
polymerase mediated via T4 gene 44/62 and 45 proteins. J. Biol. Chem.
253, 5174-5179.
- 253) de Boer, H.A., Comstock, L.J. and Vasser, M. (1983) The tac promoter:
A functional hybrid derived from the trp and lac promoters. Proc. Natl.
Acad. Sci. USA 80, 21-25.
- 254) Hawley, D.K. and McClure, W.R. (1983) Complication and analysis of
Escherichia coli promoter DNA sequences. Nucl. Acids Res. 11, 2237-2255.
- 255) Chen, C.W. and Thomas, C.A., Jr., (1980) Recovery of DNA segments from
agarose gels. Anal. Biochem. 101, 339-341.
- 256) Goff, S. and Goldberg, A.L. (1985) Production of abnormal proteins in
E. coli stimulates transcription of *lon* and other heat shock genes. Cell
41, 587-595.
- 257) Shoemaker, J.M., Brasnett, A.H. and Marston, F.A.O. (1985) Examination of

- calf prochymosin accumulation in *E. coli*: disulfide linkages are a structural component of prochymosin-containing inclusion bodies. EMBO. J. 4, 775-780.
- 258) Schulz, M.-F., Buel, G., Schmid, E., Movva, R. and Selzer, G. (1987) Increased expression in *Escherichia coli* of a synthetic gene encoding human somatomedin C after gene duplication and fusion. J. Bacteriol. 169, 5385-5392.
- 259) Tonouchi, N., Oouchi, N., Kashima, N., Kawai, M., Nagase, K., Okano, A., Matsui, H., Yamada, K., Hirano, T. and Kishimoto, T. (1988) High-level expression of human BSF-2/IL6 cDNA in *Escherichia coli* using a new type of expression-preparation system. J. Biochem. 104, 30-34.
- 260) Neu, H.C. and Heppel, L.A. (1965) The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. J. Biol. Chem. 240, 3685-3692.
- 261) Oka, T., Sakamoto, S., Miyoshi, K.-I., Fuwa, T., Yoda, K., Yamasaki, M., Tamura, G. and Miyake, T. (1985) Synthesis and secretion of human epidermal growth factor by *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7212-7216.
- 262) Gray, G.L., Baldrige, J.S., MacKeown, K.S., Heyneker, H.L. and Chang, C.N. (1985) Periplasmic production of correctly processed human growth hormone in *Escherichia coli*: natural and bacterial signal sequences are interchangeable. Gene 39, 247-254.
- 263) Murakami, Y., Tanaka, T., Baba, H., Oishi, T., Otsuka, E., Ikehara, M., Yanagida, T., Kato, H., Moriyama, S. and Horikoshi, K. (1987) Construction of an excretion vector and extracellular production of human growth hormone from *Escherichia coli*. Gene 54, 197-292.
- 264) Charbit, A., Molla, A., Saurinand, W. and Hofnung, M. (1988) Versatility of a vector for expressing foreign polypeptides at the surface of Gram-negative bacteria. Gene 70, 181-189.
- 265) Stahl, S.J. and Christiansen, L. (1988) Selection for signal sequence mutations that enhance production of secreted human proinsulin by *Escherichia coli*. Gene 71, 147-156.
- 266) Kreuzer, K., Pratt, C. and Torriani, A. (1975) Genetic analysis of regulatory mutants of alkaline phosphatase of *E. coli*. Genetics 81, 459-468.
- 267) Heppel, L.A., Harkness, D.R. and Hilmo, R.J. (1962) A study of the substrate specificity and other properties of the alkaline phosphatase of *E. coli*. J. Biol. Chem. 237, 841-846.
- 268) Garen, A. and Levinthal, C. (1960) A fine-structure genetic and chemical study of the enzyme alkaline phosphatase of *E. coli*. Biochim. Biophys. Acta 38, 470-483.
- 269) Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K. and Meyer, T.F. (1987) Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. Nature 325, 458-462.

- 270) Greenwood, F.C., Hunter, W.M. and Glover, J.S. (1963) The preparation of ^{125}I -labelled human growth hormone of high specific radioactivity. Biochem. J. **89**, 114-123.
- 271) Yoda, K., Tachibana, K.-I., Watanabe, S., Yamane, K., Yamasaki, M. and Tamura, G. (1987) Secretion to periplasm of foreign proteins in Escherichia coli by aid of the phoA-derived secretion vector Psi. in "Phosphate Metabolism and Cellular Regulation in Microorganisms" ed. by Torriani-Gorini, A., Rothman, F.G., Silver, S., Wright, A. and Yagil, E. American Society for Microbiology. pp99-104.
- 272) 依田幸司 (1988) 大腸菌遺伝子を用いた蛋白の分泌生産 日本農芸化学会誌 **62**, 1743-1748.
- 273) 依田幸司、山崎眞狩 (1990) グラム陰性細菌による蛋白質生産 日本農芸化学会誌 **64**, 1039-1042.
- 274) Better, M., Chang, C.P., Robinson, R.R and Horwitz, A.H. (1988) Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment. Science **240**, 1041-1043.
- 275) Svoboda, M.E., Van Wyk, J.J., Klapper, D.G., Fellows, R.E., Grisson, F.E. and Schuleuter, R.J. (1980) Purification of somatomedin-C from human plasma :Chemical and biological properties, partial sequence analysis, and relationship to other somatomedins. Biochemistry **19**, 790-797.
- 276) Li, C.H., Yamashiro, D., Gospodarowicz, D., Kaplan, S. and Van Vliet, G. (1983) Total synthesis of insulin-like growth factor I(somatomedin C). Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**, 2216-2220.
- 277) Buell, G., Schulz, M.-F., Selzer, G., Chollet, A., Mowa, R., Semon, D., Escanez, S. and Kawashima, E. (1985) Optimising the expression in E. coli of a synthetic gene encoding somatomedin-C(IGF-I). Nucl. Acids Res. **13**, 1923-1938.
- 278) Saito, Y., Yamada, H., Niwa, M. and Ueda, I. (1987) Production and isolation of recombinant somatomedin C. J. Biochem. **101**, 123-134.
- 279) Niwa, M., Sato, S., Saito, Y., Uchiyama, F., Ono, H., Yamashita, M., Kitaguchi, T., Shiga, Y., Notani, J., Yamada, H., Ishii, Y., Ueda, Y. and Takagi, Y. (1986) Chemical synthesis, cloning, and expression of genes for human somatomedin C(insulin-like growth factor I) and ^{59}Val -somatomedin C. Ann. N. Y. Acad. Sci. **469**, 31-52.
- 280) Peters, M.A., Lau, P., Snitman, D.L., Van Wyk, J.J., Underwood, J.E., Russell, W.E. and Svoboda, M.E. (1985) Expression of a biologically active analogue of somatomedin-C/insulin-like growth factor I. Gene **35**, 83-89.
- 281) Saito, Y., Ishii, Y., Niwa, M. and Ueda, I. (1987) Direct expression of a synthetic somatomedin C gene in Escherichia coli by use of a two-cistron system. J. Biochem. **101**, 1281-1288.
- 282) Abrahmsen, L., Moks, T., Nilsson, B. and Uhlen, M. (1986) Secretion of heterologous gene products to the culture medium of Escherichia coli. Nucl. Acids Res. **14**, 7487-7500.

- 283) Moks, T., Abrahmsen, L., Osterlof, B., Josephson, S., Ostling, M., Enfors, S.-O., Persson, I., Nilsson, B. and Uhlen, M. (1987) Large-scale affinity purification of human insulin-like growth factor I from culture medium of *Escherichia coli*. Bio/Technology 5, 379-382.
- 284) Nilsson, B., Holmgren, E., Josephson, S., Gatenbech, S., Philipson, L. and Uhlen, M. (1985) Efficient secretion and purification of human insulin-like growth factor I with a gene fusion vector in *Staphylococci*. Nucl. Acids Res. 13, 1151-1162.
- 285) Wong, E.Y., Seetharan, R., Kotts, C.E., Heeren, R.A., Klein, B.K., Braford, S.R., Mathis, K.J., Bishop, B.F., Siegel, N.R., Smith, C.E. and Tacon, W.C. (1988) Expression of secreted insulin-like growth factor-I in *Escherichia coli*. Gene 68, 193-203.
- 286) Bayne, M.L., Applebaum, J., Chicchi, G.G., Hayes, N.S., Green, B.G. and Cascieri, M.A. (1988) Expression, purification and characterization of recombinant human insulin-like growth factor I in yeast. Gene 66, 235-244.
- 287) Sode, K., Brodelius, P., Meussdoerffer, F., Mosbach, K. and Ernst, F. (1988) Continuous production of somatomedin-C with immobilized transformed yeast cells. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28, 215-221.
- 288) Bayne, M.L., Cascieri, M.A., Kelder, B., Applebaum, J., Chicchi, G., Shapiro, J.A., Pasleu, F. and Kopchick, J.J. (1987) Expression of a synthetic gene encoding human insulin-like growth factor I in cultured mouse fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 2638-2642.
- 289) Varenne, S., Buc, J., Lloubes, R. and Lazdunski, C. (1984) Translation is a non-uniform process: effect of tRNA availability on the rate of elongation of nascent polypeptide chains. J. Mol. Biol. 180, 549-576.
- 290) Breitbart, R.E., Andreadis, A. and Nadal-Ginard, B. (1987) Alternative splicing: A ubiquitous mechanism for the generation of multiple protein isoforms from single genes. Ann. Rev. Biochem. 56, 467-495.
- 291) Leff, S.E. and Rosenfeld, M.G. (1986) Complex transcriptional units: Diversity in gene expression by alternative RNA processing. Ann. Rev. Biochem. 55, 1091-1117.
- 292) Bell, G.I., Merryweather, J.P., Sanchez-Pescador, R., Stempien, M.M., Priestley, L., Scott, J. and Rall, L.B. (1984) Sequence of a cDNA clone encoding human preproinsulin-like growth factor II. Nature 310, 775-777.
- 293) Dull, T.J., Gray, A., Hayflick, J.S. and Ullich, A. (1984) Insulin-like growth factor II precursor gene organization in relation to insulin gene family. Nature 310, 777-781.
- 294) Brissenden, J.E., Ullich, A. and Francke, U. (1984) Human chromosomal mapping of genes for insulin-like growth factors I and II and epidermal growth factor. Nature 310, 781-784.
- 295) Tricoli, J.V., Rall, L.B., Scott, J., Bell, G.I. and Shows, T.B. (1984) Localization of insulin-like growth factor genes to human chromosomes 11 and 12. Nature 310, 784-786.
- 296) 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.
- 297) Straus, D.S. and Takemoto, C.D. (1988) Amino acid limitation negatively regulates insulin-like growth factor-II mRNA levels and E-domain peptide secretion at a post-transcriptional step in BRL-3A rat liver cells. J. Biol. Chem. 263, 18404-18410.
- 298) Francis, G.L., Upton, F.M., Ballard, F.J., McNeil, K.A. and Wallace, J.C. (1988) Insulin-like growth factors 1 and 2 in bovine colostrum : Sequence and biological activities compared with those of a potent truncated form. Biochem. J. 251, 95-103.
- 299) Murphy, L.J., Seneviratne, C., Ballejo, G., Croze, F. and Kennedy, T.G. (1990) Identification and characterization of a rat decidua insulin-like growth factor-binding protein complementary DNA. Mol. Endocrinol. 4, 329-336.
- 300) Ooi, G.T., Orłowski, 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.
- 301) Albiston, A.L. and Herington, 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.
- 302) Werner, H., Woloschak, M., Adamo, M., Shen-Orr, Z., Roberts, C.T., Jr. and LeRoith, D. (1989) Developmental regulation of the rat insulin-like growth factor I receptor gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 7451-7455.
- 303) Werner, H., Stannard, B., Bach, M.A., LeRoith, D. and Roberts, C.T., Jr. (1990) Cloning and characterization of the proximal promoter region of the rat insulin-like growth factor I(IGF-I) receptor gene. Biochem. Biophys. Res. Commun. in press.
- 304) Shaw, G. and Kamen, R.P. (1986) A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediating selective mRNA degradation. Cell 46, 659-667.
- 305) Kato, H., Okoshi, A., Miura, Y. and Noguchi, T., (1990) A new cDNA clone relating to larger molecular species of rat insulin-like growth factor-I mRNA. Agric. Biol. Chem. 54, 1599-1601.
- 306) Kato, H., Takenaka, A., Miura, Y., Nishiyama, M. and Noguchi, T., (1990) Evidence of introduction by molecular cloning of artificial inverted sequence at the 5' terminus of the sense strand of rat insulin-like growth factor-I cDNA. Agric. Biol. Chem. 54, in press.

