

インスリン情報伝達経路に対する  
タンパク質栄養状態の影響

東京大学大学院農学生命科学研究科  
応用生命化学専攻  
平成 11 年度博士課程入学  
氏 名 豊島 由香  
指導教官名 加藤 久典

# 目次

	ページ
序章	1
第一章 タンパク質栄養状態の悪化がインスリン情報伝達経路に及ぼす影響	
緒言	15
第一節 下行大静脈からのインスリン注入によるラット肝臓および骨格筋におけるインスリン情報伝達因子のリン酸化の時間的变化	
1-1-1 方法	16
1-1-2 結果	18
第二節 吸収期における肝臓および骨格筋のインスリン情報伝達因子の量およびリン酸化に対する食餌タンパク質の影響	
1-2-1 方法	28
1-2-2 結果	30
第三節 タンパク質栄養状態が絶食後の肝臓および骨格筋のインスリン情報伝達因子の量およびリン酸化状態に及ぼす影響	
1-3-1 方法	50
1-3-2 結果	50
第四節 考察	60
第二章 タンパク質栄養状態の悪化により起こるインスリン情報伝達経路初期因子の量およびリン酸化状態の変化の機構についての検討	
緒言	65
第一節 <b>Pair-feeding</b> ラットを用いたインスリン情報伝達経路初期因子の量およびリン酸化状態に対する食餌タンパク質の影響の解析	
2-1-1 方法	66
2-1-2 結果	67
第二節 <b>STZ</b> 投与ラットにおけるインスリン情報伝達経路初期因子の量およびリン酸化状態に対する食餌タンパク質の影響の解析	
2-2-1 方法	77
2-2-2 結果	78
第三節 肝臓および骨格筋における <b>IRS</b> の遺伝子発現に対する食餌タンパク質の影響	
2-3-1 方法	93
2-3-2 結果	96
第四節 食餌タンパク質による骨格筋 <b>IRS-1</b> セリンリン酸化状態の変動に寄与する因子の検策	
2-4-1 方法	104
2-4-2 結果	104
第五節 考察	108

第三章	タンパク質栄養状態がインスリンの生理作用発現に及ぼす影響	
緒言		113
第一節	肝臓における糖新生や脂肪酸合成の律速酵素の遺伝子発現に及ぼす食餌タンパク質の影響	
3-1-1	方法	114
3-1-2	結果	114
第二節	骨格筋におけるインスリンの糖の取り込み促進効果に及ぼす食餌タンパク質の影響	
3-2-1	方法	118
3-2-2	結果	119
第三節	考察	121
第四章	培養細胞系において培地中のアミノ酸がインスリン情報伝達経路に及ぼす影響	
緒言		124
第一節	L6 myotube 細胞におけるインスリン依存性 IRS-1 チロシンリン酸化の時間的变化	
4-1-1	方法	124
4-1-2	結果	125
第二節	L6 myotube 細胞において培地中アミノ酸が IRS-1 に及ぼす影響	
4-2-1	方法	127
4-2-2	結果	128
第三節	考察	132
総合討論		134
謝辞		142
論文の内容の要旨		143
参考文献		147

## 序章

動物は、内部環境や外部環境の変化に応じて巧妙に体内の代謝回転を変化させてホメオスタシスを保持している。生命活動において重要な食餌条件も外的環境因子の一つであり、例えばエネルギー摂取量が激減する絶食状態においてはエネルギー消費量を減少させるといったように代謝を変動させている。このような動物の代謝調節には、シグナル因子としてのホルモンの作用が重要な役割を果たしているということは周知の通りである。特にインスリンは、細胞内への糖の取り込みや利用、グリコーゲン、脂肪、タンパク質合成の促進など動物において同化作用を持ち、動物の代謝制御に重要なホルモンの一つである。近年、インスリンの作用発現機構として細胞内情報伝達経路の解析が盛んに行われており、徐々にその全貌が姿を現しつつある。一方、栄養素もインスリンなどのホルモンと同様に、食餌条件の重要なシグナル因子であり、それ自体が細胞内情報伝達経路に作用して代謝調節することが知られている。したがって、食餌条件に応答した動物の代謝制御機構を分子レベルで理解する上で、インスリンなどのホルモンと栄養素の細胞内情報伝達経路における相互作用を解析することは極めて重要である。

本研究ではタンパク質栄養に注目し、インスリンとアミノ酸の相互作用機構とインスリン作用発現におけるタンパク質栄養状態の影響を明らかにすることを目的とした。

最初に、これまでに明らかになっているインスリンについてその生理作用、作用発現における情報伝達経路およびその伝達系の機能不全により起こるインスリン抵抗性、アミノ酸が関与する細胞内情報伝達経路に関して概説する。

## 1: インスリンとその生理作用

インスリンは、膵臓摘出犬が重篤な糖尿病を発症するという現象を発端に発見された、分子量 5,800 程度のペプチドホルモンであり、21 個のアミノ酸から成る A 鎖と 30 個のアミノ酸から成る B 鎖がジスルフィド結合によって結合した構造を持っている(Hadley, M. E., 2000)。その合成は膵臓の Langerhans 島のβ細胞において、32 個のアミノ酸から成る C-ペプチドが結合したプロインスリンを経て産生され、摂食等によって生体に取り込まれた糖やアミノ酸に応答して血中へ分泌される。分泌されたインスリンは、endocrine 様式で標的組織に作用するが、血中では遊離型で存在し、その半減期はヒトで約 5 分と非常に短い。

インスリンの生理作用として主要なものは、糖代謝の制御である。すなわち、骨格筋や脂肪組織といった末梢組織でのグルコースの取り込みを増加させると共に肝臓におけるグ

ルコース産生を抑制することで、血糖値の恒常性を保つ。このような糖代謝の制御に加え、アミノ酸・K<sup>+</sup>の取り込み促進、インスリンにより活性化される酵素やトランスポーターをコードしている遺伝子の転写促進および抑制、グリコーゲン・脂質・タンパク質の合成促進または分解抑制と多岐に渡っている。各標的組織における主なインスリンの生理作用を見ると次のようである。肝臓では、glycogen synthase や glucokinase の活性化および phosphoenolpyruvate carboxykinase(PEPCK)の抑制がおこり、主としてグリコーゲン合成促進および分解抑制や解糖系の活性化および糖新生の抑制がなされ、グルコース産生を抑制する。骨格筋では、糖やアミノ酸の取り込みが促進してタンパク質合成が促進する。また、解糖および TCA 回路が活性化し、生命活動に必要なエネルギー産生を増す。脂肪組織では、糖の取り込みが促進し、acetyl-CoA carboxylase、fatty acid synthase(FAS)および glycerol-3-phosphate dehydrogenase などが活性化されることにより脂質の合成促進および分解抑制がなされる。

では次に、これらの生理作用の各々がどのような細胞内情報伝達経路を介して発現するのか、現時点までに明らかになっている知見を述べる。

## 2：インスリンの作用機構

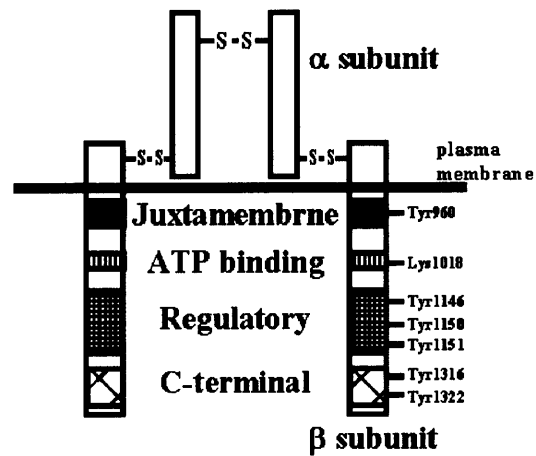
インスリン作用発現に至るまでの分子メカニズムの解明は近年目覚ましい進展を遂げているが、未知の部分が多い。これまでに確立されているインスリンの細胞内情報伝達経路の大筋を Fig. 0-1 に示す。すなわち、インスリンが細胞膜上のレセプターと結合することによりチロシンキナーゼ活性が上昇し、その細胞内基質である insulin receptor substrate (IRS)ファミリーや Shc などがチロシンリン酸化され、その細胞内基質に様々な Src homology 2(SH2)ドメインを持つタンパク質が結合し、その下流のセリン/スレオニンリン酸化・脱リン酸化カスケードの活性化が次々と起こり、最終的にインスリンの生理作用を担う酵素の遺伝子発現および活性の調節に至り、代謝調節や細胞増殖といったインスリン特有の生理作用が発現する。このように、インスリン情報伝達は他の増殖因子の情報伝達と同様にそのレセプターチロシンキナーゼの活性化を端緒とするが、SH2ドメインを持つタンパク質の他に、インスリンレセプター特異的な細胞内基質の結合が重要な役割を果たしている。

ここでは、本研究で取り上げたインスリン情報伝達因子として、インスリンレセプター(IR)、その主な基質である IRS ファミリータンパク質、その下流の PI3 キナーゼ

/PKB/p70S6 キナーゼカスケードのうち Akt/PKB、MAP キナーゼカスケードのうち ERK1/2 に関して簡単に述べることにする。

### ① IR の構造とその機能

IR は細胞膜に存在する糖タンパク質であり、その構造は右図のような構造をとっている(Kahn, C. R., 1994)。インスリンが $\alpha$ サブユニットに結合するとレセプターのコンフォメーションの変化が起き、 $\beta$ サブユニットのチロシンキナーゼ活性領域が刺激される。これにより ATP からチロシン残基へのリン酸の転移による自己リン酸化が起こり、レセプターチロシンキナーゼ



活性調節やレセプター基質との結合調節が行われる。 $\beta$ サブユニットのチロシン残基のリン酸化は、インスリンがヘテロ四量体の一方に結合すると、インスリンの結合していない trans 側の  $\beta$ サブユニットのチロシン残基がリン酸化されるという trans-autophosphorylation 方式をとっている。

以上のような IR の自己リン酸化によるレセプターチロシンキナーゼの活性調節の他に、 $\beta$ サブユニットのセリン/スレオニンのリン酸化による活性調節機構の存在も知られている。 $\beta$ サブユニットのセリン/スレオニン残基のリン酸化が増加するとレセプターチロシンキナーゼ活性が低下し、そのセリン/スレオニンリン酸化には PKC の活性化が関与しているという報告は数多くあり(Bollag, G. E. *et al*, 1986, Takayama, S. *et al*, 1988, Karasik, A. *et al*, 1990, Anderson, C. M. *et al*, 1991, Chin, J. E. *et al*, 1993, Berti, L. *et al*, 1994)、その関与は明らかであるが、数種類もある中のどの PKC isoform が重要であるか、 $\beta$ サブユニットのどのセリン/スレオニン残基がレセプターチロシンキナーゼ活性制御に関わっているか等、未解決な部分は多い。

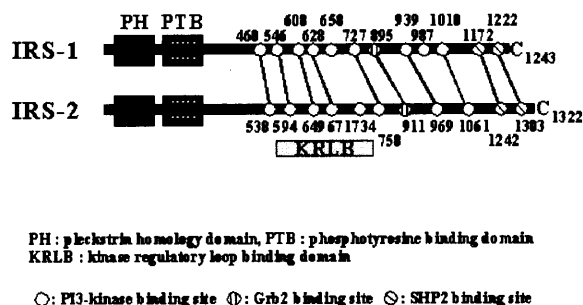
### ② IRS ファミリータンパク質の構造とその機能

IRS ファミリータンパク質は、IR チロシンキナーゼの最も主要な基質である。これまでに哺乳類の IRS タンパク質は、少なくとも IRS-1、IRS-2、IRS-3(pp60)および IRS-4 の 4

つの isoform が知られている(White, M. F., 1998, Lavan, B. E. *et al*, 1997 a, Lavan, B. E. *et al*, 1997 b, Fantin, V. R. *et al*, 1999, Bruks, D. J. *et al*, 2001)。IRS-1 と IRS-2 は、例えば IRS-2 は骨格筋や脂肪組織で少ないといったように発現の比率に差はあるものの、多くの組織に分布している。一方、IRS-3 は脂肪組織特異的に、IRS-4 は骨格筋、肝臓、心臓、精巣および脳での発現が確認されているが、その存在量は低い。このような組織分布から、主として IRS-1, -2 がイン

スリン作用に重要であるとされているので、ここでは IRS-1 と IRS-2 を中心に述べる。

IRS-1, -2 は相同性が高く、右図のような似通った構造をとっており、情報伝達系における docking protein として働いている(戸部 一之, 門脇 孝 1997)。IRS-1 は、肝



細胞でインスリン刺激により素早くチロシンリン酸化される分子質量約 185 kDa のタンパク質(pp185)として発見され、IR 基質として最初にクローニングされた(White, M. F. *et al*, 1985, Sun, X. J. *et al*, 1991)。22 箇所のチロシンリン酸化可能部位を持ち、そのうちの数箇所は YMXM 配列や YXXM 配列内に存在し、その配列内のチロシン残基がリン酸化されると、SH2 ドメイン含有タンパク質である PI3 キナーゼや Grb2 などと結合して IR からのシグナルを下流へ伝える。cDNA から期待される IRS-1 の分子質量は約 131 kDa であるのに対し、SDS-PAGE では 160-180 kDa に検出されることから、IRS-1 の分子内にはチロシンリン酸化部位の他に多数のセリン/スレオニンリン酸化部位を持つことが示され、それらは PKA、PKC、casein kinase II、cdc2 kinase および MAP キナーゼ等のセリン/スレオニンキナーゼの作用部位であることが明らかになっている。IRS-1 のセリン/スレオニンリン酸化の増加を引き起こす因子として、tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )などのサイトカイン、ホルボールエステル、オカダ酸、PDGF、hyperglycemia および hyperinsulinemia が挙げられる(Zick, Y. *et al*, 2001, Sykiotis, G. P. *et al*, 2001)。このセリン/スレオニン残基のリン酸化の増加およびそれに伴い起こる IRS-1 の分解がインスリン抵抗性に関与すると考えられている。IRS-1 の分解には、ユビキチン-プロテアソーム系が関与していると考えられており、PI3 キナーゼ/Akt/mTOR 経路の関与が考えられている(Sun, X. J. *et al*, 1999, Haruta, T. *et al*, 2000, Pederson, T. M. *et al*, 2001, Takano, A. *et al*, 2001)。さらに、インスリンにより発せられたチロシンキナーゼシグナルによって活



性化したセリン/スレオニンキナーゼによる相反する制御機構も明らかになりつつあり、現在、IRS-1のセリン/スレオニンリン酸化を引き起こすメカニズムの解析は、インスリン抵抗性を中心とした糖尿病研究において注目度が高い。後述のインスリン抵抗性のセクションでさらに詳しく述べることにする。

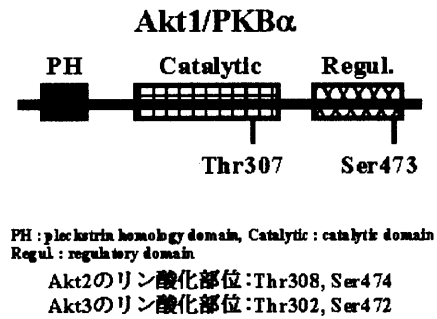
IRS-2は、もともと interleukin 4 (IL-4)によりチロシンリン酸化されるタンパク質である IL-4 receptor phosphotyrosine substrate (4PS)と呼ばれ、IL-4と同様にインスリンや IGF-1でもチロシンリン酸化が起こるが IRS-1とは異なる基質としてその存在は明らかになっていた(Wang, L.-M. *et al*, 1993, Araki, E. *et al*, 1994)。続いて作成された IRS-1 ノックアウトマウスの解析により、IRS-1を代償するチロシンリン酸化タンパク質として IRS-2と称されるようになった(Sun, X. J. *et al*, 1995)。IRS-2も IRS-1と同様に多数のセリン/スレオニンのリン酸化により機能が調節されていると考えられているが、その分解は IRS-1より迅速には行われぬ。また、IRS-2の分解はユビキチン-プロテアソーム系によって分解されるかどうか不明であり(Sun, X. J. *et al*, 1999, Pederson, T. M. *et al*, 2001, Takano, A. *et al*, 2001, Rui, L. *et al*, 2001 a)、IRS-2量の調節には mRNA レベルの制御も関与しているとの報告(Zhang, J. *et al*, 2001)からも、IRS-2の制御は IRS-1とは異なると考えられている。また、ノックアウトマウスを用いた解析からも、IRS-1と IRS-2の機能の差が明らかになってきている。IRS-1は骨格筋では最も重要な isoform であるのに対し、IRS-2は、肝臓、骨格筋および脂肪組織の全てに影響を及ぼしていると考えられている。特に、IRS-2 ノックアウトマウスでは、肝臓でのインスリン抵抗性や膵β細胞の増殖不全およびそのインスリン分泌の低下が起こり、II型糖尿病を呈することから、IRS-2の糖代謝における重要性が認識されている。IRS-1, -2の各ノックアウトマウスの表現型を Table. 0-1 にまとめた(Tamemoto, H. *et al*, 1994, Withers, D. J. *et al*, 1998, Bruks, D. J. *et al*, 2001)。

さらに、IRS-1, -2は成長ホルモン(GH)、interleukin-4, -9, -13 および interferon- $\gamma$ 等の情報伝達系にもリンクする基質であることも報告されている(Argestsinger, L. S. *et al*, 1995, 1996)。GHは、GHの欠乏した状態ではインスリン様作用を示すが、それはGHレセプターを介した JAK2の活性化により誘導された IRS-1のチロシンリン酸化によるということが示された(Thirone, A. C. P. *et al*, 1998)。逆にGHの過剰はインスリン抵抗性の発症に関与すると考えられており、GHのトランスジェニックマウスにおいては、IR、IRS-1およびPI3キナーゼのインスリンによる活性化が抑制されることが明らかになって

いる(Dominici, F. P. *et al*, 1999)。このように、GH などのホルモンやサイトカインとインスリンが IRS-1, -2 を介して相互作用していると考えられる。

### ③ Akt/PKB

Akt/PKB は Akt1/PKB $\alpha$ 、Akt2/PKB $\beta$  および Akt3/PKB $\gamma$  と 3 つの isoform を有し、インスリン情報伝達経路において PI3 キナーゼの下流に位置するセリン/スレオニンキナーゼである(Kandel, E. S. *et al*, 1999)。次頁の図中の PH ドメインが、PI3 キナーゼ産物の phophatidylinositol



3,4,5-triphosphate [PI(3,4,5)P<sub>3</sub>]に結合することにより細胞膜へ移行する。この際同様に、PI(3,4,5)P<sub>3</sub> で細胞膜への移行と活性化が起こる 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK)によって Akt/PKB の Thr308 と Ser473 がリン酸化されることにより活性化される。これら 3 つの isoform の発現様式は、哺乳類においては普遍的であるが、Akt2/PKB $\beta$ は中でも骨格筋、心臓および肝臓といったインスリンの標的組織で高発現している。インスリン作用発現における Akt/PKB の主な役割としては、下記のようなものが挙げられる。

#### ・遺伝子の転写制御

FKHR、FKHRL1、AFX といった転写因子を直接リン酸化することにより転写活性化能を抑制し、インスリンにより抑制される IGFBP-1 遺伝子などの転写制御に関与していることが明らかになっている(Cichy, S. B. *et al*, 1998、Guo, S. *et al*, 1999、Rena, G. *et al*, 1999、Nakae, J. *et al*, 1999、Brunet, A. *et al*, 1999、Kops, G. J. P. L. *et al*, 1999、Tang, E. D., 1999)。

#### ・タンパク質合成の促進

翻訳制御因子である 4E-BP1 や p70S6 キナーゼの活性化に重要である。これらの活性化には mTOR の関与も示されており、インスリンにより活性化された Akt/PKB が mTOR を活性化して 4E-BP1 や p70S6 キナーゼのリン酸化および活性化が起こるとい報告があるが、インスリンによるこの 2 つの因子のリン酸化および活性化に mTOR が必須であるかどうかはまだ明確になっていない(Scott, P. H. *et al*, 1998、Shah, O. J. *et al*, 2000、

Raught, B., *et al*, 2001)。

・糖代謝

GSK3 を直接リン酸化することによりその活性を抑制し、glycogen synthase の活性化することが明らかになっている(Cross, D. A., 1995)。また、糖の取り込みへの関与も示されているが、その関与の程度は明らかになっていない(Kohn, A. D. *et al*, 1996、Cong, L. N. *et al*, 1997、Tanti, J. F. *et al*, 1997、Kitamura, T. *et al*, 1998、Hill, M. M. *et al*, 1999)。

#### ④ ERK1/2

ERK1/2 はインスリンやその他の増殖因子によって活性化されるが、インスリンに関しては、レセプターチロシンキナーゼによりリン酸化された Shc または IRS が Grb2 と結合し、その Grb2 に結合している GDP-GTP 交換反応促進因子である Sos が Ras を活性化し、引き続いて Raf (MAPKKK)、MEK (MAPKK)、ERK1/2 (MAPK) の順で活性化される。活性化された ERK1/2 は細胞質から核内へ移行し、様々な転写因子をリン酸化することにより遺伝子の転写を制御しており、インスリン作用のうち細胞増殖に重要な役割をしている (Avruch, J., 1998)。上記古典的 MAP キナーゼカスケードに加え、UV や高浸透圧等の細胞ストレスに応答して活性化される JNK/SAPK や p38 といった新規 MAP キナーゼカスケードも同定されている。このうち、JNK/SAPK が IRS-1 の Ser307 のリン酸化をし、インスリン抵抗性を促進することが最近報告された (Aguirre, V. *et al*, 2000)。

### 3 : インスリン抵抗性

糖尿病はインスリンが正常に機能しないことによる代謝機能障害により発症する病気であり、その患者数は、現在我が国において約 700 万人、その予備軍も入れると 1300 万人以上と推定され、その数は増加の一途をたどっている。糖尿病には I 型と II 型があるが、糖尿病の 90% 以上を II 型が占めている。インスリン抵抗性は、インスリン作用の伝達障害によって起こるインスリン感受性の低下であり、II 型糖尿病の原因である。

このようなインスリン情報伝達系の機能不全は、血中で循環しているグルコース、インスリン、遊離脂肪酸および様々なサイトカインの濃度の上昇といった代謝異常と共に遺伝的素因によっても引き起こされることが知られている。また、それは伝達系の様々な段階で起こり、IR キナーゼ活性、IRS-1、-2 の量およびインスリン依存性チロシンリン酸化、PI3 キナーゼ活性、GLUT4 の translocation、各代謝調節酵素の活性等の減少が知られて

いるが、その分子メカニズムはまだ明らかになっていない(Saltiel, A. R. *et al*, 2001)。

IRS-1の機能調節としてチロシンリン酸化以外に、ユビキチン-プロテアソーム系による分解、ホスホチロシンホスファターゼによる脱リン酸化、セリン/スレオニンリン酸化が挙げられる。その中でもIRS-1には約30個以上のセリン/スレオニンリン酸化可能部位があるので、何段階にも渡った調節が可能である。先述したが、IRS-1は定常状態でもセリン/スレオニンリン酸化しているが、さらにリン酸化されるとインスリン情報伝達を阻害することが示されている。逆に、Akt/PKBによるIRS-1のPTBドメイン近傍のセリン残基のリン酸化は、IRS-1分子のチロシン脱リン酸化を防いで活性化状態の維持に寄与するという報告もある(Paz, K. *et al*, 1999)。IRS-1のセリンリン酸化の増加はインスリン抵抗性で見られる特徴的な現象であるが、通常のインスリン情報伝達系のnegative feedback制御機構の一つでもある。以上のIRS-1のセリンリン酸化により制御されるインスリン情報伝達に関して、Fig. 0-2にまとめた。Negative feedback制御に関与する因子として現在報告されているのは、PI3キナーゼ/PDK1/Akt/mTOR (Delahaye, L. *et al*, 1998、Li, J. *et al*, 1999、Haruta, T. *et al*, 2000、Takano, A. *et al*, 2001)、PI3キナーゼ/PDK1/PKC $\zeta$ /I $\kappa$ Bキナーゼ $\beta$  (IKK $\beta$ ) (Lallena, N. -J. *et al*, 1999、Ravichandran, L. V. *et al*, 2001、Liu, Y. M. *et al*, 2001)である。Akt/PKBは、positive feedback制御とnegative feedback制御の分岐点であり、重要なスイッチであると考えられる。それに対し、インスリン抵抗性を誘発するIRS-1のセリンリン酸化の増加は、TNF $\alpha$ や遊離脂肪酸等の増加により起こる。

サイトカインであるTNF $\alpha$ は、免疫系細胞だけでなく脂肪細胞からも分泌される。その発現レベルは、インスリン抵抗性状態を示す肥満の程度に応じて増加する。また、TNF $\alpha$ は様々なセリン/スレオニンキナーゼのactivatorであり、mTOR、JNKおよび古典的MAPキナーゼ等を介してIRS-1のセリンリン酸化を誘導する。JNKはIRS-1 Ser307をリン酸化することで、TNF $\alpha$ のIRS-1に対する機能阻害効果の一部分を伝えるとの報告があったのに対し(Aguirre, V. *et al*, 2000)、最近になってTNF $\alpha$ によるそのSer307のリン酸化には他のMAPキナーゼが重要であり、JNKを介さないという報告がなされた(Rui, L. *et al*, 2001 b)。一方、TNF $\alpha$ によるIRS-1のセリンリン酸化は、PI3キナーゼ/Akt/mTOR経路が関与し、その際、Ser307以外のセリン残基が重要であるとの報告もある(Ozes, O. N. *et al*, 2001)。これらの研究から、TNF $\alpha$ は、インスリン情報伝達系でにおいてそれぞれ異なる作用発現を担っているPI3K経路とMAPキナーゼ経路の両方を活性化し、それぞれがIRS-1の異なるセリン残基をリン酸化して、インスリン情報伝達を阻害すると考えられる。

インスリン抵抗性においては、本来インスリンによって転写レベルで制御されている糖新生や脂肪酸合成等の様々な酵素群の遺伝子発現も異常となる。最近、これらの酵素群の転写制御に、SREBP-1c の関与が示された。インスリンにより SREBP-1c が活性化されると、fatty acid synthase (FAS) 遺伝子の転写が亢進する(Shimano, H. *et al*, 1999、Shimomura, I. *et al*, 1999、Foretz, M. *et al*, 1999)。このように、SREBP-1c を介した代謝調節酵素の転写調節がインスリン抵抗性に関与することが示唆されたが、その活性化はインスリンのみならず糖によっても誘導され、その機構はまだ明らかになっていない。

さらに、最近、TNF $\alpha$ 以外に脂肪細胞から分泌されてアディポカインと称される生理活性物質のインスリン作用への影響が注目されている。代表的なものとしては、レプチン、アディポネクチン、レジスチン等があるが、その中でもごく最近に発見されたレジスチンはインスリン抵抗性を引き起こす因子の一つとして注目されている(Steppan, C. M. *et al*, 2001)。3T3-L1 細胞をレジスチン中和抗体で処理すると、インスリン誘導性のグルコース取り込みが上昇するのに対し、レジスチンで刺激するとそれが低下する。このことから、レジスチンの IRS-1 セリンリン酸化への関与も考えられるが、レジスチンレセプターの同定、その作用に重要な標的組織はどこか等々未知な部分が多く、今後の研究が待たれる。

#### 4 : アミノ酸情報伝達経路のインスリン情報伝達経路への関与

冒頭にも述べたが、栄養素はシグナル因子として細胞内情報伝達因子に作用する。中でもアミノ酸は、タンパク質合成の基質としてだけでなく、筋肉のタンパク質合成の増加や肝臓における autophagy の抑制等の細胞応答を制御することが示されている。4E-BP1 や p70S6 キナーゼなどの翻訳制御因子は、前述のようにインスリン情報伝達経路上にあるが、これらはアミノ酸によっても制御されていることが *in vitro* および *in vivo* の研究で明らかになった(Wang, X. *et al*, 1998、Yoshizawa, F. *et al*, 1998、Hara, K. *et al*, 1998、Patti, M. ·E. *et al*, 1998、Iiboshi, Y. *et al*, 1999、Shigemitsu, K. *et al*, 1999、Long, W. *et al*, 2000)。そして、mTOR 活性を阻害する rapamycin を用いた研究で、mTOR がアミノ酸を感知するセンサーとして働くであろうこと、アミノ酸欠乏培地で培養した細胞における 4E-BP1 や p70S6 キナーゼのリン酸化の低下とアミノ酸添加による回復が rapamycin 依存的であること、さらに rapamycin 非感受性である mTOR 変異体を用いた解析の結果などから、アミノ酸による 4E-BP1 や p70S6 キナーゼの制御は mTOR を介するということが示された。そして、mTOR/p70S6 キナーゼ・4E-BP1 経路の最大活性化にはアミノ酸とインスリ

ンの両方のシグナルが必要であるということが明らかになった。

これらに対して、mTOR より上流のインスリン情報伝達経路に対するアミノ酸の制御に関する研究報告は数少ない。これまでに培養細胞系においては、培地中のアミノ酸が IRS 等の活性を抑制するという報告がなされているが、これと一致しない結果も報告されている。すなわち、培養細胞系において、アミノ酸による p70S6 キナーゼと 4E-BP1 のリン酸化はインスリンにより増強するが、インスリンに応答した IR と IRS-1 のチロシンリン酸化および PI3-キナーゼや Akt/PKB の活性化はアミノ酸による影響を受けないという報告 (Hara, K. *et al*, 1998)がある一方、IR および IRS-1 のインスリン依存性チロシンリン酸化、IRS-1 と PI3-キナーゼの会合および PI3-キナーゼの活性化がアミノ酸により抑制されるという報告もある (Patti, M. -E. *et al*, 1998)。また生体における研究はさらに限られているが、Reis らの報告によると、長期間低タンパク質食を給餌したラットでは IRS 等の活性が亢進し、グルコース感受性インスリン分泌は低下しているのにも関わらず、血中からのグルコース消去能が上昇していた (Reis, M. A. B. *et al*, 1997)。さらに、ヒトにおいて、アミノ酸が体全体もしくは骨格筋のグルコース消費に関するインスリン作用を阻害するとの報告もある (Tessari, P. *et al*. 1985, Flakoll, P. J. *et al*. 1992)。このことから、タンパク質およびアミノ酸により糖代謝制御に関するインスリンの機能が阻害されるということが推察できるが、まだ現時点ではタンパク質およびアミノ酸によってインスリン情報伝達系にどのような影響があるかは未知の問題となっている。

## 5 : 本研究の目的

上記のような背景から、本研究は、タンパク質栄養状態がインスリン情報伝達経路にどのような影響を与えるかを検討することにした。すなわち、タンパク質を含まない食餌を給餌することによりタンパク質栄養条件の悪化を誘導し、インスリン標的組織である肝臓や骨格筋において、情報伝達因子のインスリン依存性リン酸化を指標として、情報伝達経路にどのような変化が生じるかを解析した。その結果、伝達系の上流のいくつかの因子の状態が大きく変化していたので、その制御機構について検討を加えると共に、それらの現象が生体においてどのような意味を持つかに関しても解析を行った。

第一章では、タンパク質を含まない食餌として無タンパク質食(PF)を、タンパク質を十分に含む食餌として 12%カゼイン食(12C)を摂取させたラットの肝臓と骨格筋におけるインスリン依存性の IR、IRS-1,-2、Akt/PKB および ERK1/2 のリン酸化を比較して、これ

らの因子が食餌タンパク質の影響を受けるかどうか検討した。

第二章では主として、第一章で観察されたタンパク質栄養状態の違いによる情報伝達因子の量的変化およびインスリン依存性リン酸化に対して、PF 摂取により低下した摂食量と血中インスリン濃度の影響が関与しているかどうかを、pair-feeding および STZ 投与して I 型糖尿病を発症させたラットを用いて検討した。また、情報伝達因子の量的変化が mRNA の変化を伴うかどうかを検討した。

第三章では、食餌タンパク質の影響が観察された情報伝達因子のインスリン応答の変化が、インスリンのどのような生理作用発現に影響を及ぼしているのかを肝臓および骨格筋において検討した。

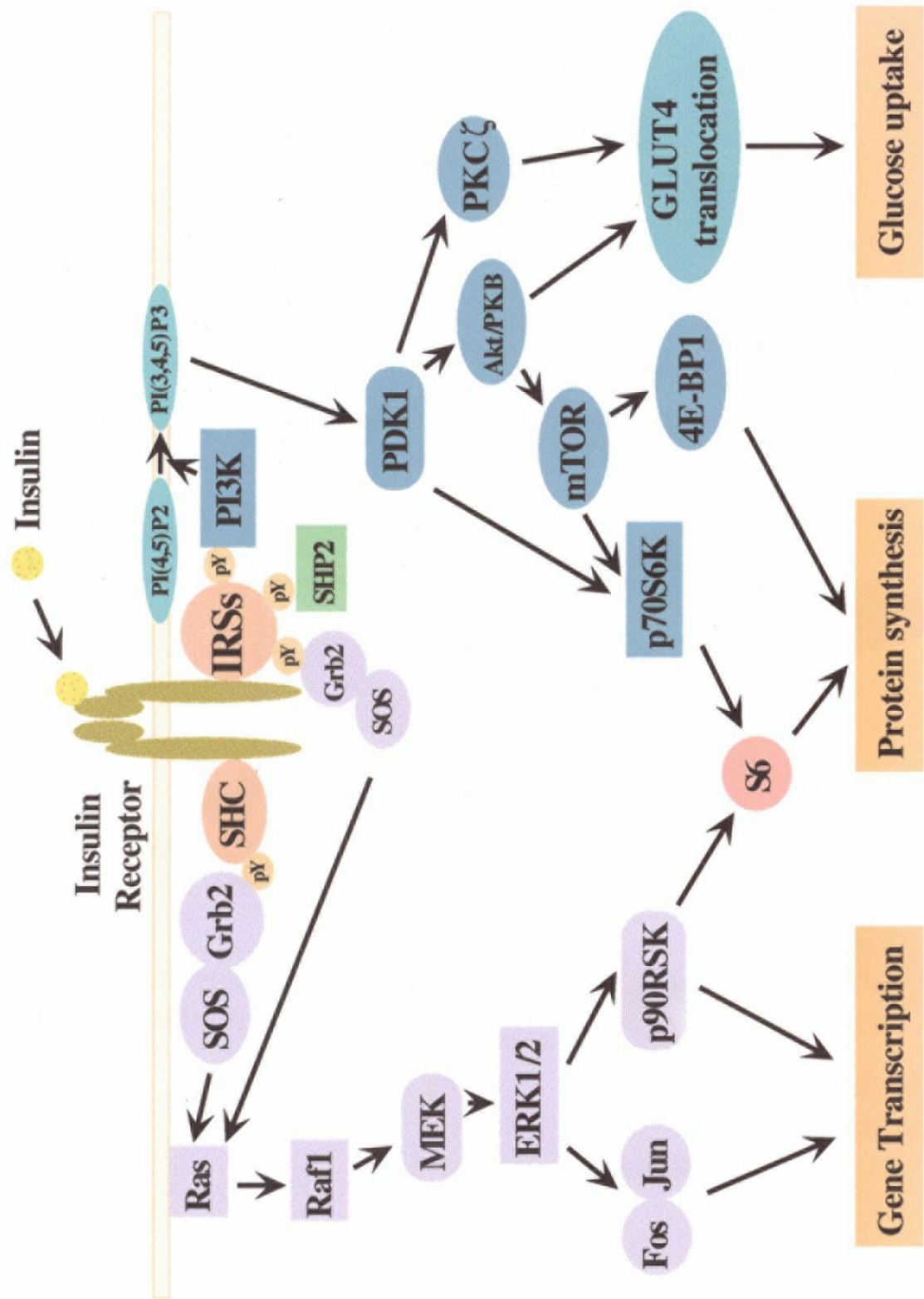
第四章では、上記までに明らかになった現象を再現したモデル系の確立のために、*in vitro* での再現を L6 筋管細胞を用いて試みた。

これらにより、インスリン情報伝達経路の上流段階におけるアミノ酸とインスリンシグナルの相互作用を *in vivo* 系で明らかにすることと、その一連の変化がインスリン作用に及ぼす影響を明確にすることを意図として研究を行った。

**Table. 0-1 Comparison of the phenotype of IRS-1 and IRS-2 knockout mice.**

<b>Genotype</b>	<b>Body weight</b>	<b>Glucose tolerance</b>	<b><math>\beta</math>-cell mass</b>	<b>Insulin levels</b>	<b>Insulin resistance</b>	<b>Symptoms</b>
<b>IRS-1 <math>-/-</math></b>	<b>50%</b>	<b>Normal</b>	<b>200%</b>	<b>Hyper-insulinemia</b>	Mainly in the muscle. Normal in the liver.	<b>Syndrome X</b>
<b>IRS-2 <math>-/-</math></b>	<b>90%</b>	<b>Impaired</b>	<b>50-60%</b>	Attenuation of insulin release with the development of diabetes.	<b>Mainly in the liver.</b>	<b>Type II diabetes</b>

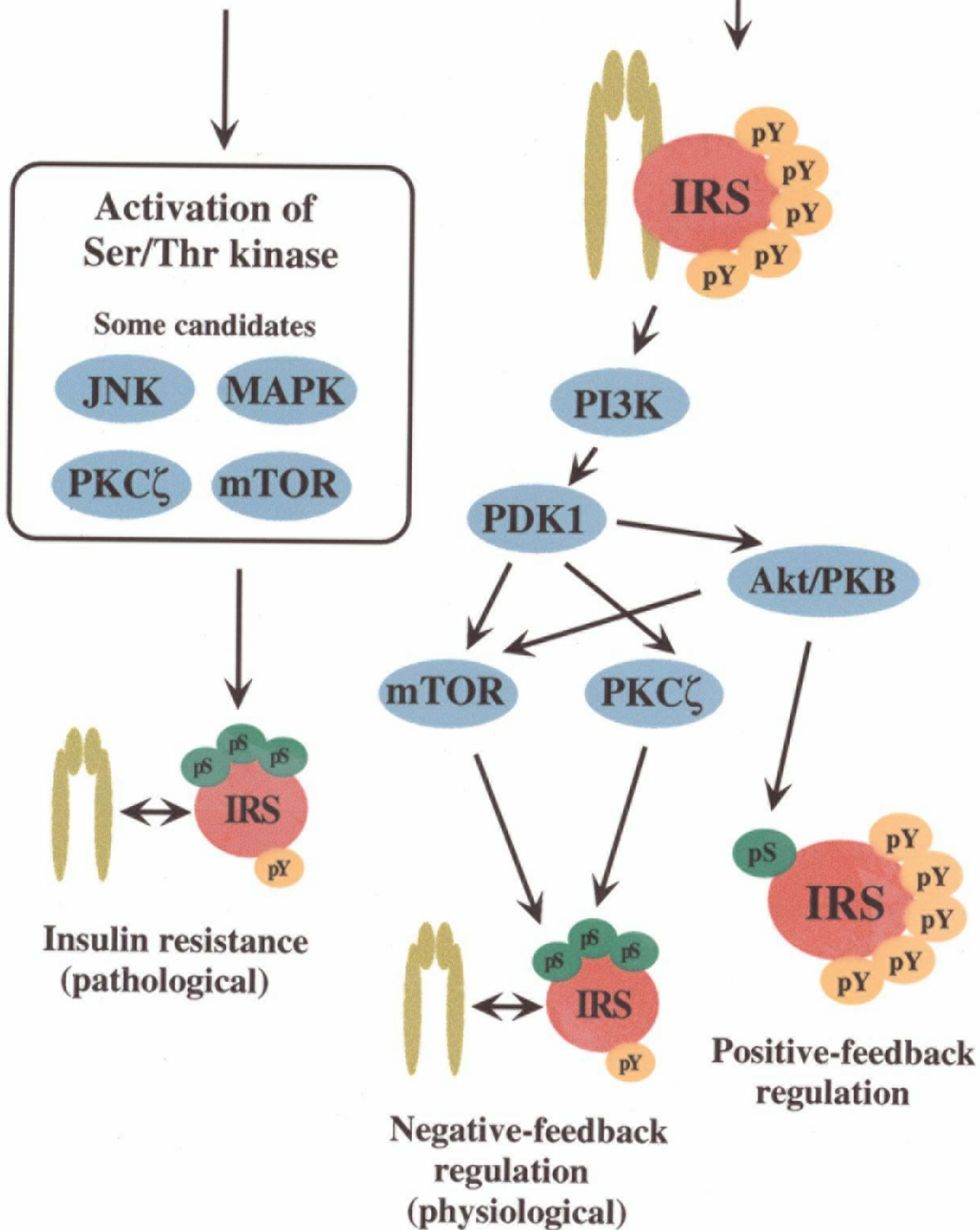




**Fig. 0-1** Insulin signal transduction pathway.

TNF $\alpha$ , Phorbol ester,  
Free fatty acids, PDGF,  
Okadaic acid etc.

Insulin



**Fig. 0-2**  
Proposed mechanisms of IRS-1 serine phosphorylation.

## 第一章

タンパク質栄養状態の悪化が

インスリン情報伝達経路に及ぼす影響

## 緒言

序章でも述べたが、栄養素としてのアミノ酸とインスリンのシグナルのクロストークに関する研究は、培養細胞系において近年盛んに行われている。特に、タンパク質合成において、翻訳制御因子である p70S6 キナーゼと 4E-BP1 のインスリンやアミノ酸による mTOR を介した制御機構が確立されてきている。一方、mTOR より上流のインスリン情報伝達経路に対するアミノ酸シグナルのクロストークに関する報告は数少ない上に、一致を見ない。インスリンに応答した IR と IRS-1 のチロシンリン酸化および PI3 キナーゼや Akt/PKB の活性化のアミノ酸による影響があるかどうか、培養細胞系においてさえ明らかになっていない。その上、生体系を用いた研究報告は数限られており、アミノ酸とインスリンのシグナルのクロストークは未知な部分が多い。

そこで本章では、*in vivo*系を用いて、まず下行大静脈から注入したインスリンに応答して誘導される各インスリン情報伝達因子のリン酸化の時間的変化を検討し、最大リン酸化時間の決定をした。

次に、タンパク質栄養状態による血中アミノ酸濃度の変動がインスリン情報伝達経路に与える影響を明らかにすることを目的として、12C もしくは PF を 1 週間給餌したラットに下行大静脈よりインスリンを注入し、先に決定した時間インスリン刺激を加えた後、肝臓と骨格筋におけるインスリン情報伝達因子の量およびインスリン依存性リン酸化の変化について検討した。

さらに、解剖当日 1.5 時間摂食させて摂食によるインスリン分泌が最大になっている状態と、16 時間絶食させた状態において、インスリン無刺激状態における上記因子のリン酸化状態を比較し、生理的濃度のインスリンに対する情報伝達因子の応答に対するタンパク質栄養の影響も解析した。

# 第一節 下行大静脈からのインスリン注入によるラット肝臓および骨格筋におけるインスリン情報伝達因子のリン酸化の時間的变化

## 1-1-1 方法

### 動物の飼育

6 週齢前後の Wistar 系雄ラット(体重 160~180 g、SPF、日本チャールスリバー)に食餌としてペレット(ラボブリーダーMR、日本農産工)を与え、3 日間自由摂食させた。飼育期間中、水は自由摂取できるようにした。なお、飼育室は明期(8:00~20:00)、暗期(20:00~8:00)の 12 時間サイクルで管理した。

*In vivo* における肝臓および骨格筋のインスリン刺激は、Ito らの方法(Ito, Y *et al*, 1997 a)をもとに行った。16 時間絶食後のラットの腹腔に pentobarbital sodium(ネンブタール注射液 50 mg/ml、大日本製薬)を 100  $\mu$ l/100 g body weight の割合で注射し麻酔した。麻酔の効果を確認後、開腹して下行大静脈を露出させ、26G シリンジ(テルモ)を用いて 1.4 U のインスリン溶液 [bovine insulin (Sigma)] 1 ml を下行大静脈に速やかに注入した。インスリン注入後 1、2、5、10、15、30 分に肝臓および腓腹筋を同時に摘出し、直ちに液体窒素中で凍結した。また、対照(インスリン注入後 0 分)としては、インスリン溶液の代わりに生理食塩水のみを注入したラットの組織を用いた。凍結した組織は、後の分析に供するまで -80 °C で保存した。すべての動物実験は、東京大学動物実験施設規則に従って行った。

### 組織からの protein extract の調製

各組織からの protein extract の調製は、Ito らの方法(Ito, Y *et al*, 1997 a)をもとに行った。すなわち、乳鉢で凍結した組織を液体窒素中で小片に破碎後、肝臓では組織重量(g)の 10 倍容(ml)、骨格筋では組織重量(g)の 7 倍容(ml)の氷冷 Homogenizing Buffer [50 mM HEPES-NaOH (pH 7.6), 2 mM EDTA, 10 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 10 mM  $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$ , 100 mM NaF, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 100 kallikrein-inactivating units (KIU)/ml aprotinin, 2% Triton X-100] を加え、ポリトロン型ホモゲナイザーを用いて可溶化した。その後、homogenate を超遠心分離(100,000 $\times$ g, 60 min, 2 °C)して不溶画分を除き、その上清を protein extract とし、後の分析に供するまで -80 °C で保存した。

## 免疫沈降法

Protein extract のタンパク質濃度を Protein Assay Kit (Bio-Rad)を用いて Bradford 法 (Bradford, M. M., 1976)により測定し、タンパク質量 5 mg の protein extract に対して 4  $\mu$ g の anti-IR $\beta$  subunit antibody、anti-IRS-1 antibody、anti-ERK-2 antibody を加え、4  $^{\circ}$ C で一晩インキュベートした。protein extract の希釈には、Homogenizing Buffer を用いた。一晩インキュベート後、30  $\mu$ l の Protein G-Sepharose [50 % (v/v)] を加え、4  $^{\circ}$ C で 3 時間インキュベートした後、遠心分離(3,000 $\times$ g, 3 min, 4  $^{\circ}$ C)し、沈殿を Homogenizing Buffer で 3 回洗浄し、Laemmli's Sample Buffer を 15  $\mu$ l 加え、5 分間煮沸し、SDS-PAGE に供するサンプルとした。

## イムノブロットイング

上記で anti-IR $\beta$  subunit antibody、anti-IRS-1 antibody で免疫沈降したサンプルに関しては、8 % SDS-PAGE を行い、anti-ERK-2 antibody で免疫沈降したサンプルあるいはタンパク質量 80  $\mu$ g の protein extract に 3 $\times$ Laemmli's sample buffer [30 mM Tris-HCl (pH 7.8), 9 % SDS, 15 % glycerol, 6 % 2-mercaptoethanol, 0.05 % bromophenol blue]を加えて 5 分間煮沸して調製したサンプルに関しては、10 % SDS-PAGE を行った。いずれも泳動槽は、Mini-PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad)を用いた。泳動終了後、ゲルを Blotting Buffer [25 mM Tris, 192 mM glycine, 20 % (v/v) methanol, 0.075 % SDS]に 15 分間浸した後、ニトロセルロースメンブレン(BA-85; Schleicher & Schuell あるいは Hybond ECL; Amersham Pharmacia Biotech)へのブロットイングを、Trans-Blot SD Cell (Bio Rad)を用いたセミドライ方式で行った(定電圧 15 V, 20~25 min)。ブロットイング終了後、ニトロセルロースメンブレンを Rinsing Buffer [RB; 10 mM Tris-HCl (pH 7.2), 50 mM NaCl, 1 mM EDTA]で洗った後、Blocking Buffer [RB + 3 % bovine serum albumin(BSA)]に浸し、4  $^{\circ}$ Cで一晩ブロッキングした。

各種抗体による検出は、次のように行った。すなわち、1 次抗体として、anti-phosphotyrosine antibody、anti-phosphoAkt1/PKB $\alpha$  (Ser473) antibody、および anti-phospho ERK1/2 (Tyr204) antibody は 1:1000 に、また、anti-IR $\beta$  antibody、anti-IRS-1 antibody、anti-Akt1 antibody、anti-ERK2 antibody は 1:200 に Blocking Buffer で希釈して用い、2 時間室温でインキュベートした。続いて、TBS-T [20 mM Tris-HCl pH7.6, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% Tween 20]で 5 回洗浄後、二次抗体として

horseradish peroxidase (HRP)標識抗体(Amersham Pharmacia Biotech)を TBS-T で 1:2500 に希釈して用い、1 時間室温でインキュベートした。最後に TBS-T で 5 回洗浄後、ECL system (Amersham Pharmacia Biotech)で発色を行い、LAS-1000 plus (富士写真フイルム)を用いて検出、定量を行った。

用いた抗体は、下記のとおりである。

**anti-IR $\beta$  antibody (Santa Cruz, C-19) : rabbit polyclonal**

**anti- IRS-1 antibody (Santa Cruz, C-20) : rabbit polyclonal**

**anti- phosphotyrosine antibody (Upstate Biotechnology) : mouse monoclonal IgG<sub>2b</sub>**

**anti-phospho Akt1/PKB $\alpha$  (Ser473) antibody**

**(Upstate Biotechnology) : sheep polyclonal**

**anti-phospho ERK1/2 (Tyr204) antibody (Santa Cruz, E-4) : mouse monoclonal IgG<sub>2a</sub>**

**anti-Akt1 antibody (Santa Cruz, N-19) : goat polyclonal**

**anti-ERK2 antibody (Santa Cruz, C-14) : rabbit polyclonal**

## 1-1-2 結果

### 1. 肝臓におけるインスリン刺激後のインスリン情報伝達因子のリン酸化の経時的変化

下行大静脈からのインスリン注入により誘導される IR $\beta$ 、IRS-1、ERK2 のチロシンリン酸化の時間的変化は、各々のタンパク質特異的抗体で免疫沈降後、anti-phosphotyrosine antibody もしくは anti-phospho ERK1/2 (Tyr204) antibody で検出した。Akt1/PKB $\alpha$ の Ser473 のリン酸化については、免疫沈降せずに anti-phospho Akt1/PKB $\alpha$  (Ser473) antibody で検出した。

肝臓での IR $\beta$ の自己リン酸化レベルは、インスリン刺激後 1 分までに最大に達した後徐々に減少したが、インスリン刺激後 30 分までチロシンリン酸化が高レベルに保たれていた(Fig. 1-1-1)。IRS-1 のチロシンリン酸化レベルも IR $\beta$ と同様にインスリン刺激後 1 分で最大に達し、インスリン刺激後 30 分までチロシンリン酸化が高レベルに保たれていた(Fig. 1-1-2)。Akt1/PKB $\alpha$ の Ser473 のリン酸化に関しては、無刺激時(インスリン刺激後 0 分)でのリン酸化レベルが高く、検討した他の 3 つの因子に比べてインスリンに応答したリン酸化レベルの上昇は小さかったが、インスリン刺激後 2 分程度でリン酸化レベルが最大に達した(Fig. 1-1-3)。ERK2 のチロシンリン酸化レベルは、インスリン刺激後 2 分で最大に達し、10 分までに無刺激時と同程度にまで減少した(Fig. 1-1-4)。タンパク質量に関し

ては、どの因子もインスリン刺激後 30 分までには変動がみられなかった。

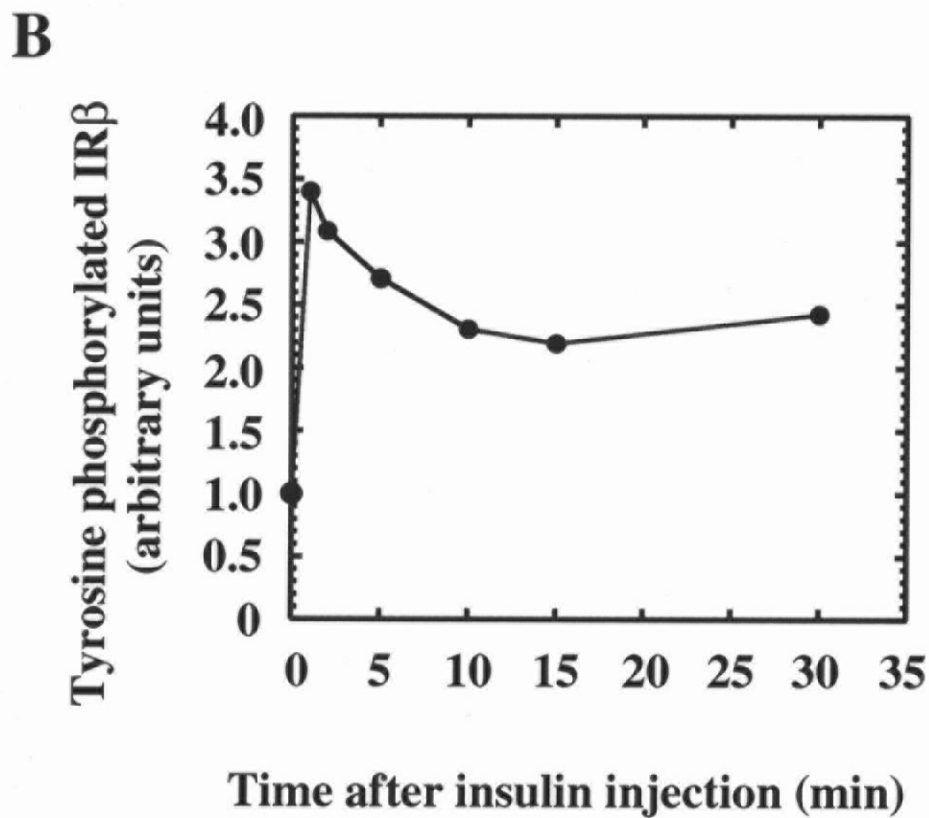
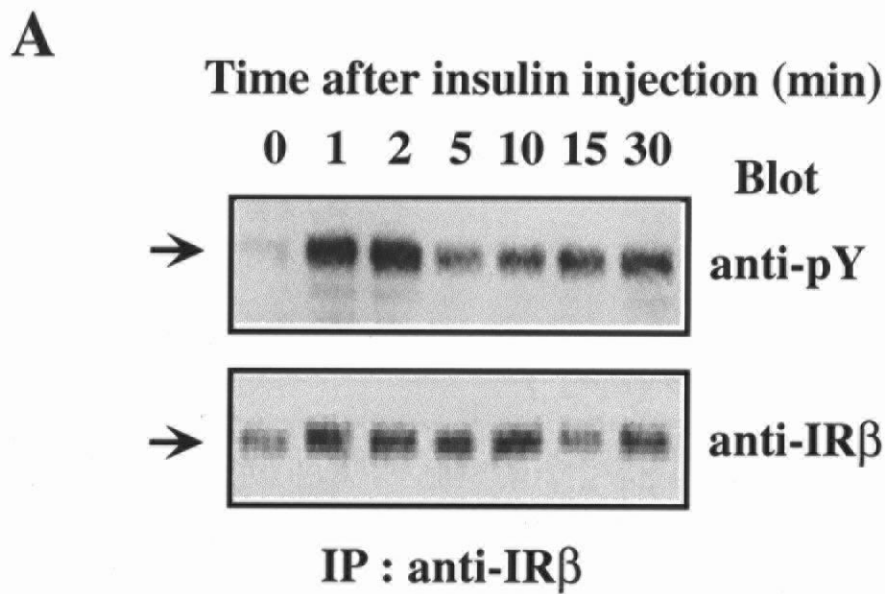
## 2. 骨格筋でのインスリン刺激後のインスリン情報伝達因子のリン酸化の経時的変化

骨格筋についても肝臓と同様に 4 つシグナル伝達因子について検討した。

IR $\beta$ の自己リン酸化レベルは、肝臓の場合と同様に、インスリン刺激後 1 分で最大に達し、インスリン刺激後 30 分までチロシンリン酸化が高レベルに保たれていた(Fig. 1-1-5)。IRS-1 のチロシンリン酸化レベルは、インスリン刺激後 2 分で最大に達した後、インスリン刺激後 15 分には無刺激時と同程度まで減少していた(Fig. 1-1-6)。さらに興味深いことに、IRS-1 のバンドの泳動度がインスリン刺激時間依存的に減少する、すなわち見かけの分子量が高分子側にシフトするという現象を観察した。この現象は、培養細胞系で観察されているインスリン長時間刺激が IRS-1 のセリン/スレオニンリン酸化を増加させるという現象に一致しており、*in vivo*においても同様な現象が起こるということが明らかとなった。しかも、この現象は肝臓では観察されなかった(Fig. 1-1-2 A)ため、インスリンに対する IRS-1 の応答に組織特異的があることを示す。さらに培養細胞系において、IRS-1 のセリン/スレオニンリン酸化が増加するに伴い IRS-1 の分解が起こるという報告が多くなされているが、今回は IRS-1 量の減少は観察できなかった。Akt1/PKB $\alpha$ の Ser473 のリン酸化レベルは、骨格筋(Fig. 1-1-7)では肝臓(Fig. 1-1-3)よりもインスリンに鋭敏に応答してははっきりとしたインスリン依存的なリン酸化が観察できた。インスリン刺激後 2~5 分間でリン酸化が最大に達した後、徐々に減少するが、インスリン刺激後 30 分でも高いレベルを保っていた。逆に、ERK2 のチロシンリン酸化については(Fig. 1-1-8)、肝臓(Fig. 1-1-4)と比較するとインスリン依存的なチロシンリン酸化がはっきり観察できなかったが、5 分でチロシンリン酸化は最大に達した。タンパク質量に関しては、肝臓と同様にどの因子もインスリン刺激後 30 分までには変動がみられなかった。

以上の結果から、次節以降の実験において、肝臓に関しては、インスリン注入 1 分後に摘出したものを IR $\beta$ および IRS-1 のチロシンリン酸化の観察に供し、インスリン注入 2 分後に摘出したものを Akt1/PKB $\alpha$ の Ser473 のリン酸化および ERK2 チロシンリン酸化の観察に用いた。骨格筋に関しては、インスリン注入 2 分後に摘出したものを IR $\beta$ および IRS-1 のチロシンリン酸化を観察に供し、インスリン注入 5 分後に摘出したものを Akt1/PKB $\alpha$ の Ser473 のリン酸化および ERK2 チロシンリン酸化の観察に用いた。



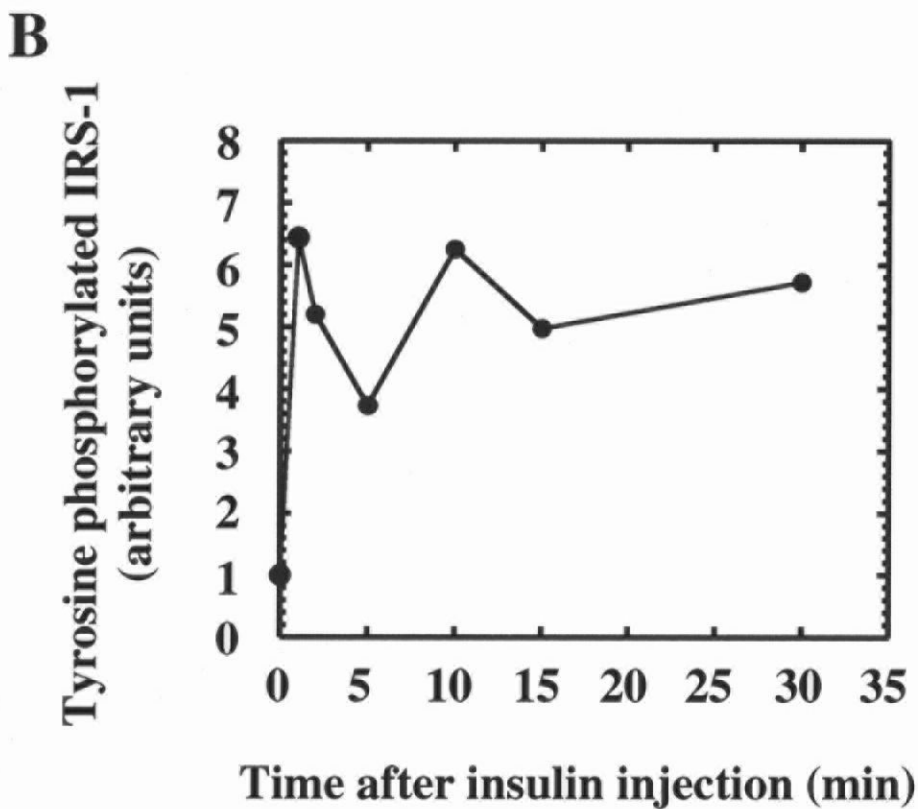
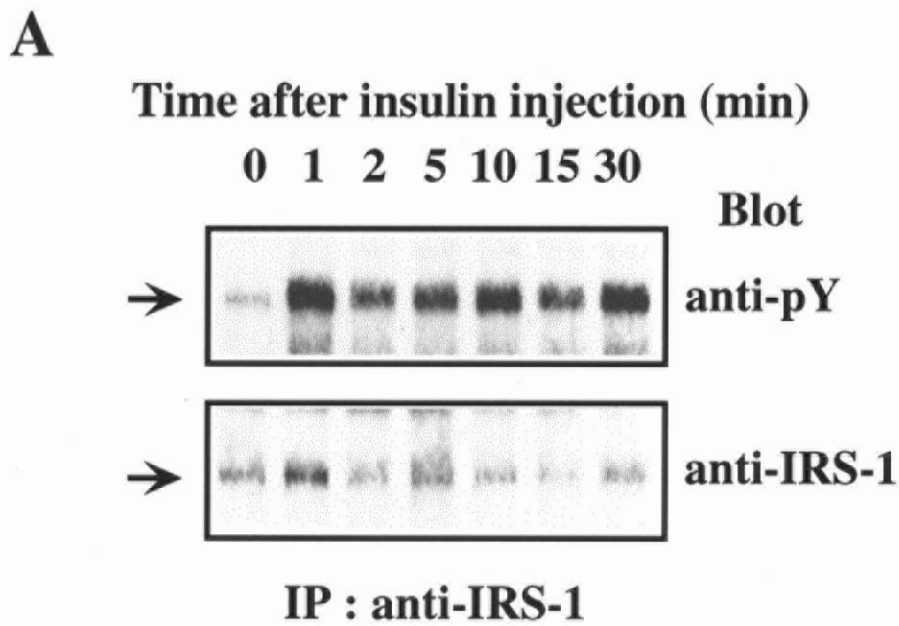


**Fig 1-1-1**

**Time course of tyrosine phosphorylation of insulin receptor  $\beta$  subunit in rat liver.**

**A :** Representative blots of immunoblotting analyses.

**B :** Quantitative analysis of bands obtained in panel A (n = 3).

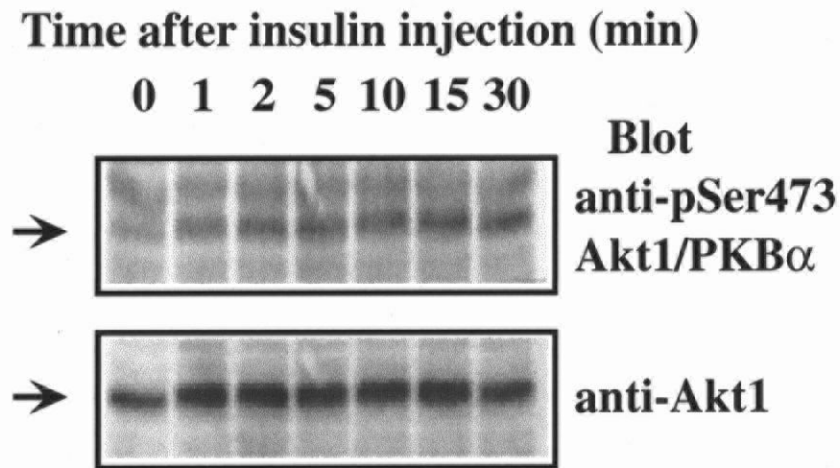
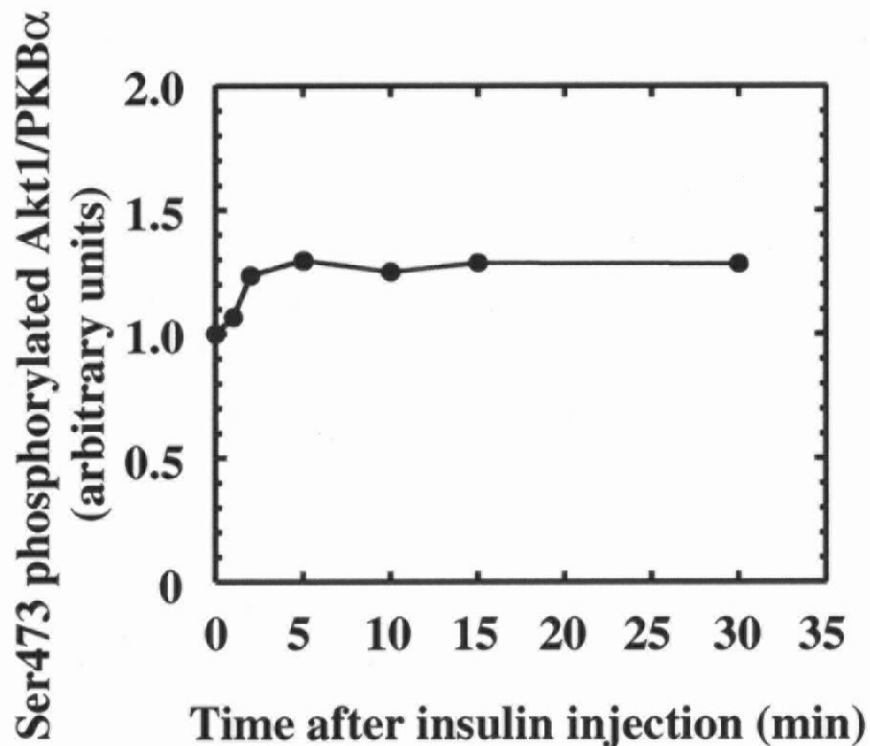


**Fig 1-1-2**

**Time course of tyrosine phosphorylation of IRS-1 in rat liver.**

**A :** Representative blots of immunoblotting analyses.

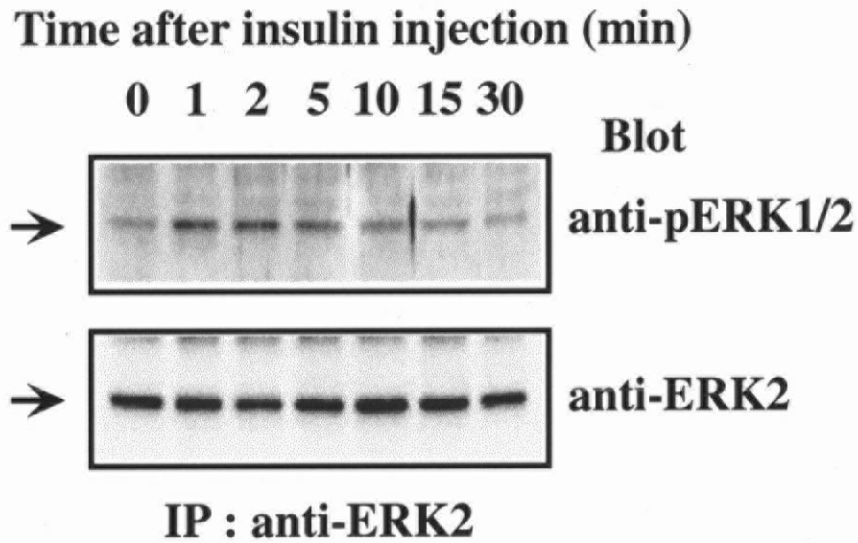
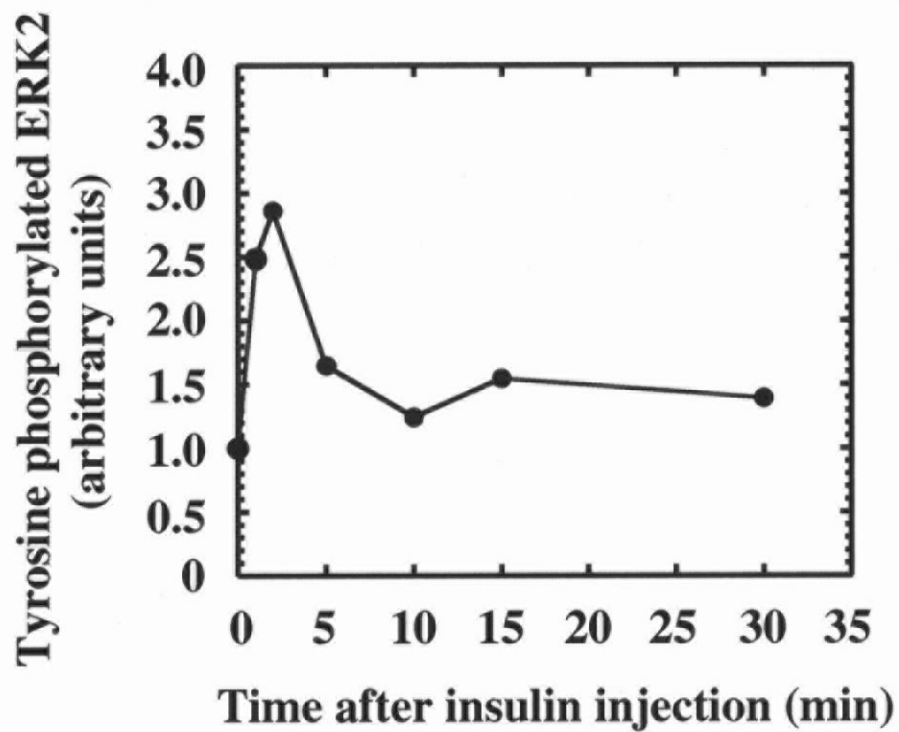
**B :** Quantitative analysis of bands obtained in panel A (n = 2).

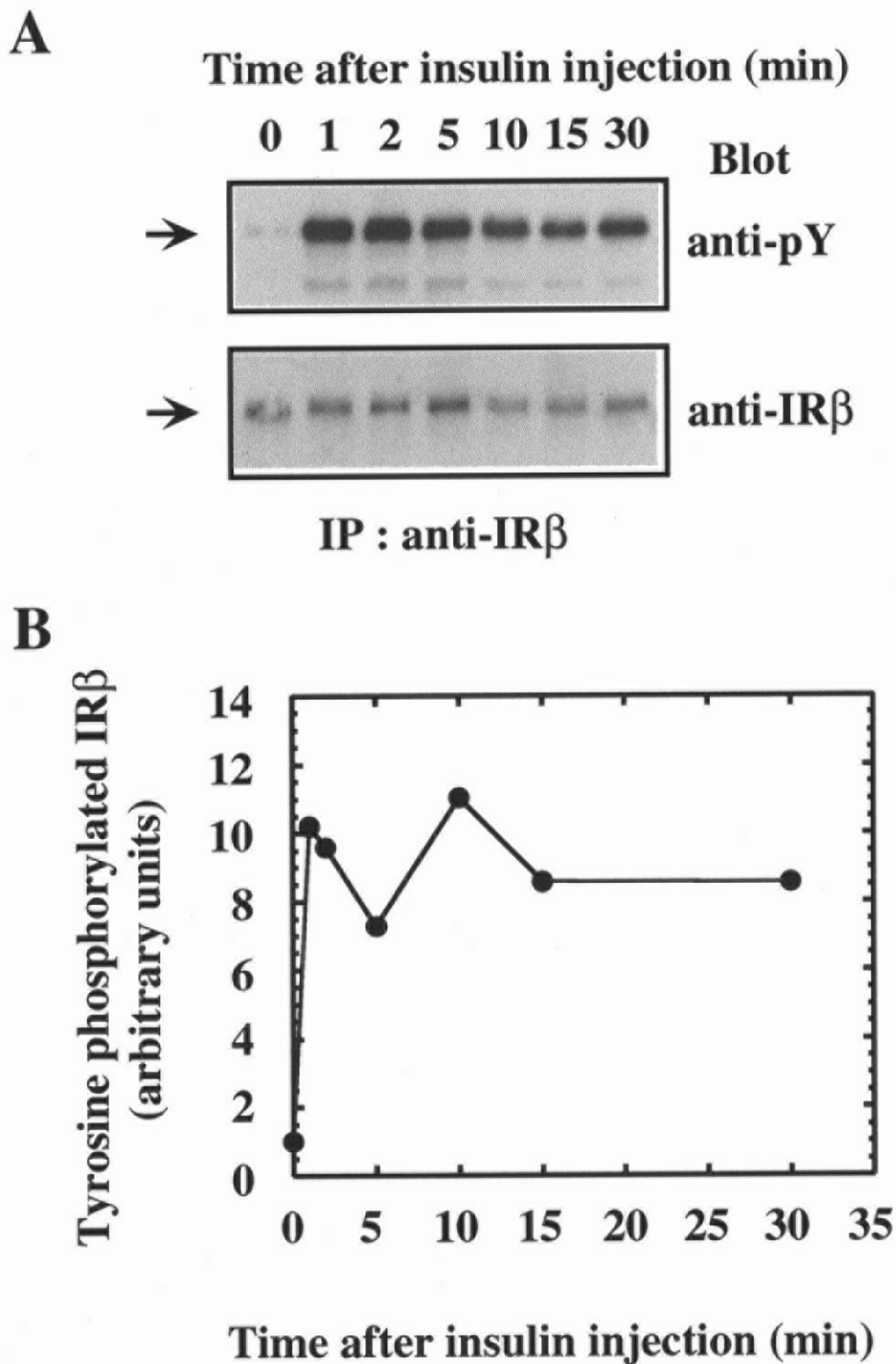
**A****B****Fig 1-1-3**

**Time course of Ser473 phosphorylation of Akt1/PKB $\alpha$  in rat liver.**

**A :** Representative blots of immunoblotting analyses.

**B :** Quantitative analysis of bands obtained in panel A (n = 2).

**A****B****Fig 1-1-4****Time course of tyrosine phosphorylation of ERK2 in rat liver.****A : Representative blots of immunoblotting analyses.****B : Quantitative analysis of bands obtained in panel A. (n = 3)**

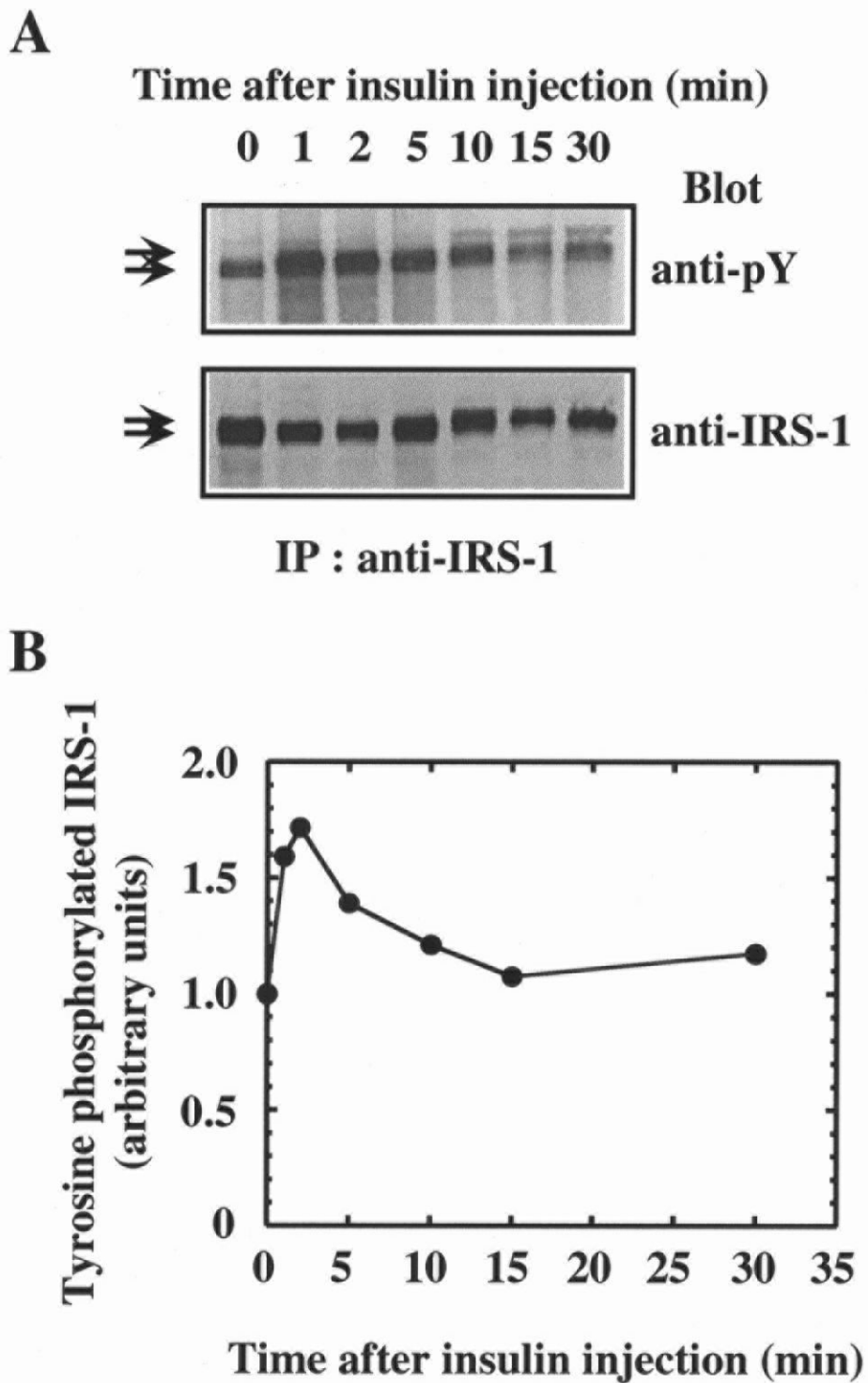


**Fig 1-1-5**

**Time course of tyrosine phosphorylation of insulin receptor  $\beta$  subunit in rat skeletal muscle.**

**A :** Representative blots of immunoblotting analyses.

**B :** Quantitative analysis of bands obtained in panel A (n = 2).



**Fig 1-1-6**

**Time course of tyrosine phosphorylation of IRS-1 in rat skeletal muscle.**

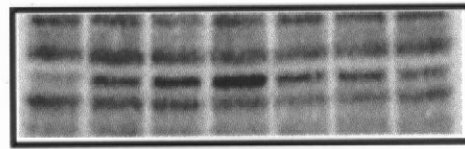
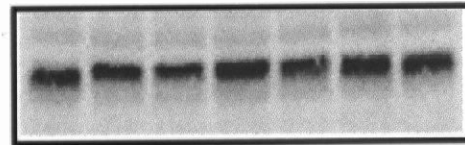
**A :** Representative blots of immunoblotting analyses.

**B :** Quantitative analysis of bands obtained in panel A (n = 2).

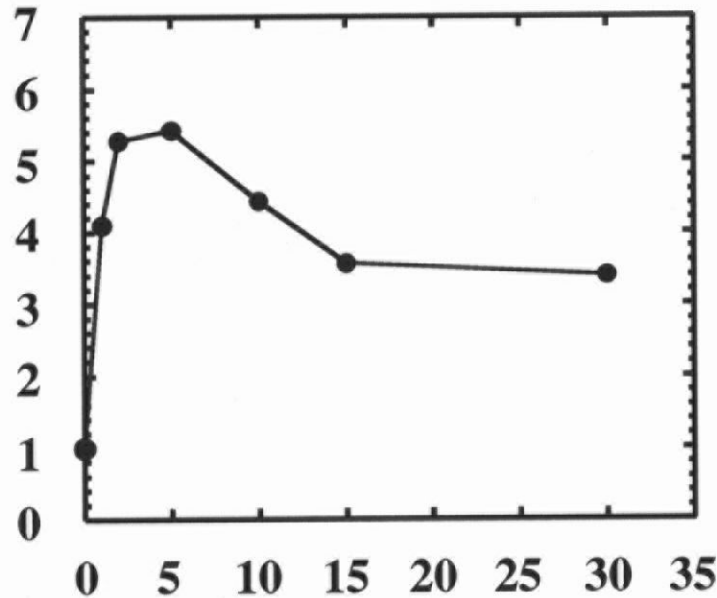
**A**

Time after insulin injection (min)

0 1 2 5 10 15 30

Blot  
anti-pSer473  
Akt1/PKB $\alpha$ 

anti-Akt1

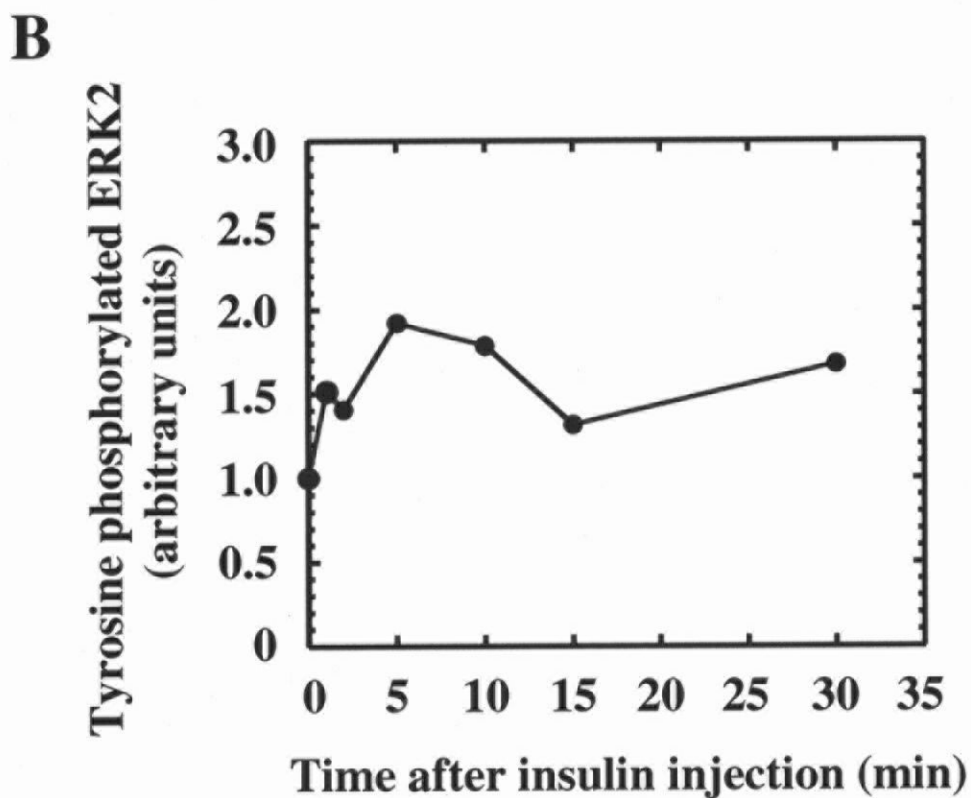
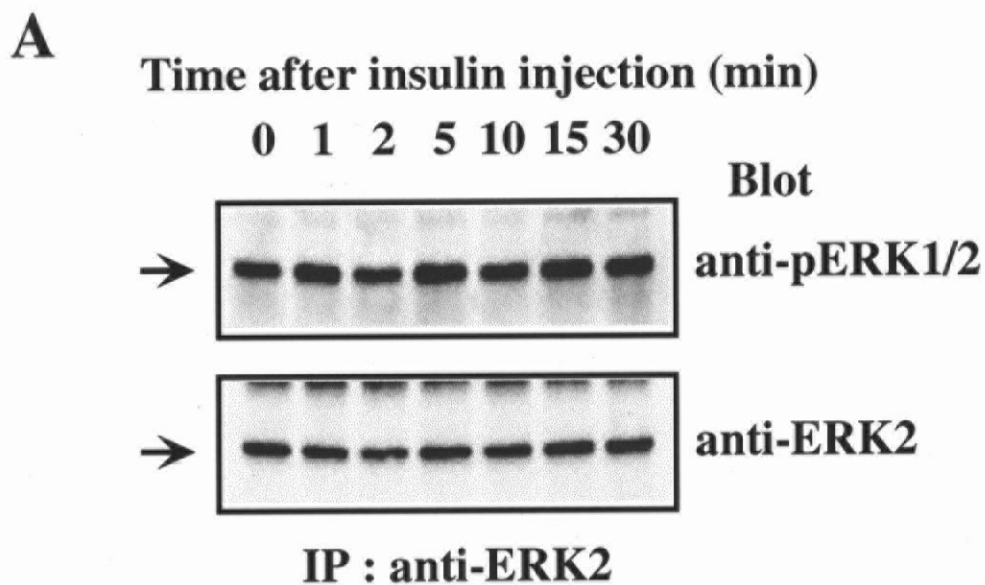
**B**Ser473 phosphorylated Akt1/PKB $\alpha$   
(arbitrary units)

Time after insulin injection (min)

**Fig 1-1-7****Time course of Ser473 phosphorylation of Akt1/PKB $\alpha$  in rat skeletal muscle.**

A : Representative blots of immunoblotting analyses.

B : Quantitative analysis of bands obtained in panel A (n = 2).



**Fig 1-1-8**

**Time course of tyrosine phosphorylation of ERK2 in rat skeletal muscle.**

**A :** Representative blots of immunoblotting analyses.

**B :** Quantitative analysis of bands obtained in panel A (n = 3).



## 第二節 吸収期における肝臓および骨格筋のインスリン情報伝達因子の量およびリン酸化に対する食餌タンパク質の影響

### 1-2-1 方法

#### 動物の飼育

5週齢の Wistar 系雄ラット(130~150 g)を最初の7日間予備飼育した。すなわち、食餌としてペレットを3日間自由摂食させた後、食餌を12%カゼイン食(12C)に替えて4日間10時から18時まで給餌した。予備飼育後、ラットを12C群、無タンパク質食(PF)群の2群に分けて実験を開始した。各食餌組成は、Table.1に示した。実験期間中も各食餌を10時から18時まで給餌した。実験8日目に10時から1.5時間給餌した後、各食餌群をさらにインスリン非注入(12C<sup>-</sup>、PF<sup>-</sup>)群とインスリン注入(12C<sup>+</sup>、PF<sup>+</sup>)群に分け、インスリン非注入群は生理食塩水を、インスリン注入群はインスリン(1.4 U/1ml)を「1-1-1 方法」で示したように下行大静脈より注入し、本章第一節で決定した適時に肝臓と腓腹筋を摘出し、直ちに液体窒素中で凍結し、後の分析に供するまで-80℃で保存した。各群は、インスリン注入と非注入の5頭ずつ計10頭とした。また、インスリン非注入群からは、門脈および頸動脈より採血した。ヘパリン血漿は氷冷後、遠心分離(3,000×g, 10 min, 4℃)し、上清を分取した。得られた血漿は後の分析に供するまで-20℃で保存した。

#### 血中インスリン濃度の測定

門脈および頸動脈より得た血漿中のインスリン濃度は、グラザイム Insulin-EIA TEST (和光純薬工業、三洋化成工業)を用いて、添付のプロトコールに従って測定した。

#### 組織からの protein extract の調製

「1-1-1 方法」で示したのと同様に行った。

#### 免疫沈降法

「1-1-1 方法」で示したのと同様に行った。

また、さらに本節では、IRS-2 に関しても行った。タンパク質量 10 mg の protein extract に対して 20 μl の anti-IRS-2 antiserum (東京大学農学生命科学研究科 高橋伸一郎助教授より御供与頂いた)を加えた後、「1-1-1 方法」で示したのと同様に行った。

## イムノプロットイング

「1-1-1 方法」で示したのと同様に行った。抗体による検出の際、1次抗体として anti-IRS-1(pS616) phosphospecific antibody および anti-IRS-2 antibody を用いる場合には、Blocking Buffer で 1:1000 に希釈して用いた。anti-IRS-1(pS616) phosphospecific antibody および anti-IRS-2 antibody は、下記のものを用いた。

**anti-IRS-1(pS616) phosphospecific antibody (Biosource) : rabbit polyclonal**

**anti-IRS-2 antibody (Upstate Biotechnology) : rabbit polyclonal**

## Wheat germ agglutinin (WGA) -agarose を用いた膜画分の調製

ラット肝臓からの膜画分の調製は、Havrankov ら、Hedo らの方法に従って行った (Havrankov, J. *et al*, 1978、Hedo, J. A. *et al*, 1981)。肝臓は、インスリン注入を行っていないものを使用した。乳鉢を用いて小片まで破碎した肝臓 2 g を氷冷 1 mM NaHCO<sub>3</sub> 溶液 10 ml に加え、ポリトロン型ホモゲナイザーでホモゲナイズした後、遠心分離(600×g, 30 min, 4 °C)し、上清と沈殿に分けた。得られた沈殿を氷冷 1 mM NaHCO<sub>3</sub> 溶液 4 ml に懸濁し、再度遠心分離(600×g, 30 min, 4 °C)し、ここで回収した上清を先に得られた上清と併せて遠心分離(20,000×g, 30 min, 4 °C)した。得られた沈殿を氷冷 1 mM NaHCO<sub>3</sub> 溶液 5 ml に懸濁し、再度遠心分離(20,000×g, 30 min, 4 °C)して洗浄した。次に、沈殿に 3 ml の HEPES Buffer [50 mM HEPES-NaOH (pH 7.6), 1% Triton X-100, 2 mM PMSF, 100 KIU/ml aprotinin]を加え、4 °Cで 30 分間混和して可溶化した。可溶化後、超遠心分離(100,000×g, 30 min, 4 °C)して不溶画分を除き、上清を粗膜画分とした。

得られた粗膜画分を WGA-agarose カラム (bed volume 1 ml, 和光純薬工業) にアプライし、flow through 画分を回収し、再び同じカラムにアプライした。この操作を合計 3 回繰り返した。その後、カラムを bed volume の 5 倍容の Washing Buffer [50 mM HEPES-NaOH (pH 7.6), 0.1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 100 KIU/ml aprotinin] で洗浄し、Elution Buffer [50 mM HEPES-NaOH (pH 7.6), 0.1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 0.3 M N-acetylglucosamine, 100 KIU/ml aprotinin] で溶出し、最初の溶出画分 1.5 ml を部分精製膜画分とし、後の分析に供するまで -80°C で保存した。

## 部分精製膜画分へのインスリン結合量の測定 ~Receptor Binding Assay~

インスリン結合量の測定は、Balage らの方法 (Balage, M. *et al*, 1990) に従って行った。

部分精製膜画分 6  $\mu\text{g}$  に 250 pM  $^{125}\text{I}$ -インスリン(2000 Ci/mmol : Amersham Pharmacia Biotech)、0、0.0025、0.01、0.025、0.1、0.25、0.5、1、2.5、5、7.5、10、25、50、100、1,000 nM の非標識インスリンを加え、反応液が全量で 200  $\mu\text{l}$  になるように Elution Buffer で調製し、4  $^{\circ}\text{C}$  で一晩インキュベートした。次に、0.3 %  $\gamma$ -globlin 溶液[0.3 %  $\gamma$ -globlin, 50 mM HEPES-NaOH (pH 7.6), 0.1% Triton X-100] 100  $\mu\text{l}$  と 25 % PEG6000 溶液[25 % PEG6000, 50 mM HEPES-NaOH (pH 7.6), 0.1% Triton X-100] 300  $\mu\text{l}$  を加えて 4  $^{\circ}\text{C}$  で 10 分間インキュベート後、遠心分離(10,000 $\times$ g, 15 min, 4  $^{\circ}\text{C}$ )した。得られた沈殿に 12.5 % PEG6000 溶液 300  $\mu\text{l}$  を加え、vortex でよく混和し、再度遠心分離(10,000 $\times$ g, 15 min, 4  $^{\circ}\text{C}$ )して上清を除き、沈殿の放射能(cpm)を $\gamma$ -カウンター(ALOKA)で測定した。非特異的な結合は、1,000 nM の非標識インスリンを添加した群から求めた。

### 統計処理

測定値は平均 $\pm$ 標準誤差(S. E.)で表した。各群間の有意差検定は t-検定もしくは Duncan's multiple test を用いて行った。

## 1-2-2 結果

### 1. 体重および摂食量変化

実験期間中、12C 群は徐々に体重増加していくのに対し、PF 群は実験食に切り替えた翌日から体重減少がみられ、その後緩やかに減少した(Fig. 1-2-1 A)。また、摂食量は、実験食に切り替えて 1 日目ですでに 12C 群と比べて PF 群で有意に減少した。実験期間中、12C 群の摂食量は緩やかに増加したが、PF 群はほとんど増減がなかった(Fig. 1-2-1 B)。

### 2. 1.5 時間摂食時における血中インスリン濃度

7 日間実験食を給餌して 8 日目に各実験食を 1.5 時間給餌したラットの門脈および頸動脈血中のインスリン濃度は、共に 12C 群に比べ PF 群で低く(門脈血: 12C  $98.7 \pm 9.4 \mu\text{U/ml}$ , PF  $54.6 \pm 14.7 \mu\text{U/ml}$ 、頸動脈血: 12C  $58.0 \pm 9.5 \mu\text{U/ml}$ , PF  $35.1 \pm 8.2 \mu\text{U/ml}$ )、特に門脈血に関しては有意に低かった(Fig. 1-2-2)。PF 群では 8 日目 1.5 時間の摂食量が 12C 群の 56%程度であるので、摂食量の低下により血中インスリン濃度が低くなったと考えられる。しかし、低タンパク食をラットに長期間給餌するとインスリン分泌能が低下するという報告もあるので(Reis, M. A. B. *et al*, 1997、Holness M. J., 1999)、食餌組成のせいで PF 群

では血中インスリン濃度が低下したという可能性も考えられる。

### 3. 摂食後における肝臓の IR の量および自己リン酸化に対する食餌タンパク質の影響

#### ① インスリン刺激前の IR $\beta$ 自己リン酸化

12C 群と PF 群のインスリン無刺激群(12C<sup>-</sup>、PF<sup>-</sup>)の IR $\beta$ 自己リン酸化量を比較すると、PF<sup>-</sup>群で顕著に IR $\beta$ 自己リン酸化量が増加していた(Fig. 1-2-3 A 上段)。IR $\beta$ 量も PF 群で 12C 群の約 2.3 倍に増加しており(Fig.1-2-3 A 下段, Fig. 1-2-3 B)、IR $\beta$ 量あたりの自己リン酸化量は、12C<sup>-</sup>群と PF<sup>-</sup>群で同程度であった(Fig. 1-2-3 C)。

#### ② インスリン刺激時の IR $\beta$ 自己リン酸化

12C 群と PF 群のインスリン刺激群(12C<sup>+</sup>、PF<sup>+</sup>)の IR $\beta$ 自己リン酸化量を比較すると、PF<sup>+</sup>群で 12C<sup>+</sup>群に比べて約 1.4 倍に増加していた (Fig. 1-2-3 A upper panel)。しかし、先にも述べたが、IR $\beta$ 量が PF 群で増加しているの(Fig.1-2-3 A lower panel, Fig. 1-2-3 B)、IR $\beta$ 量あたりの自己リン酸化量に関しては、PF<sup>+</sup>群は 12C<sup>+</sup>群に対し有意に約 60%まで低下していた(Fig. 1-2-3 C)。イムノプロットの結果から考えると、PF 群の肝臓ではインスリンに応答した自己リン酸化能が低下していると考えられ、そのキナーゼ活性も落ちているという可能性も示唆された。しかし、実際にインスリンの刺激を受け取ると考えられる細胞膜上に存在する IR の数について考慮する必要があると考え、次の実験を行った。

#### ③ Receptor Binding Assay における Scatchard plot 解析

イムノプロットの結果より、12C 群に対し PF 群で IR $\beta$ 量が有意に増加しているということがわかったので、次に細胞膜画分に対して Receptor Binding Assay を行い、細胞表面の IR の数と親和性を Scatchard plot 解析により求めた(Fig. 1-2-4)。その結果、12C 群では高親和性と低親和性結合の二相性を示したのに対し、PF 群では高親和性結合のみであった。そこで、高親和性結合について親和性を比較すると、12C 群で約  $1.38 \times 10^{-5}$ 、PF 群で約  $1.37 \times 10^{-5}$  と同程度であった。また、タンパク質量あたりのインスリン結合量は、12C 群で約  $3.55 \times 10^4$  fmol/ $\mu$ g、PF 群で約  $4.00 \times 10^4$  fmol/ $\mu$ g とほぼ同量であった。このように Receptor Binding Assay における Scatchard plot 解析により、インスリン結合可能なレセプター量は、12C 群と PF 群でほぼ同量であることが明らかになった。

以上の結果より、PF 群で肝臓の総 IR 量が増加していたことは、インスリンの情報伝達に重要と考えられる細胞膜上の IR には反映されず、細胞内にプールされている IR のみが増加していると考えられた。したがって、インスリン無刺激時および刺激時のいずれにおいても PF 群では IR の感受性が高まっているとも考えられる。

#### 4. 摂食後における肝臓の IRS-1 の量およびチロシンリン酸化に対する食餌タンパク質の影響

##### ① インスリン刺激前の IRS-1 のチロシンリン酸化

12C-群と PF-群の IRS-1 のチロシンリン酸化量を比較すると、PF-群で 12C-群の約 6 倍と、顕著に増加していた(Fig. 1-2-5 A 上段)。また、IR $\beta$ 量と同様に IRS-1 量も PF 群で 12C 群の約 2.8 倍増加していた(Fig. 1-2-5 A 下段, Fig. 1-2-5 B)。したがって、IRS-1 量あたりのチロシンリン酸化量を求めると、PF-群で 12C-群の約 2 倍程度の増加となり、有意ではないが増加傾向が認められた(Fig. 1-2-5 C)。

##### ② インスリン刺激時の IRS-1 のチロシンリン酸化

12C+群と PF+群で IRS-1 のチロシンリン酸化量は、PF 群で 12C 群の約 4.5 倍と、劇的な増加がみられた(Fig. 1-2-5 A 上段)。しかし、先述のとおり IRS-1 量が PF 群で増加しているため(Fig. 1-2-5 A 下段, Fig. 1-2-5 B)、IRS-1 量あたりのチロシンリン酸化量に関しては、PF+群で 12C+群の約 1.5 倍程度の増加であり、有意な差はなかった(Fig. 1-2-5 C)。

以上の結果より、肝臓の IRS-1 は食餌タンパク質の影響を受けて量が変動し、顕著ではないがインスリンに応答したチロシンリン酸化能も変化することが明らかになった。

#### 5. 摂食後における骨格筋の IR の量およびチロシンリン酸化に対する食餌タンパク質の影響

##### ① インスリン刺激前の IR $\beta$ の自己リン酸化

12C-群と PF-群の IR $\beta$ 自己リン酸化量を比較すると、PF-群で 12C-群の約 80%まで低下していた(Fig. 1-2-6 A 上段)。さらに、IR $\beta$ 量は PF 群で 12C 群の約 1.3 倍と程度は小さいものの、有意な増加が観察された(Fig. 1-2-6 A 下段, Fig. 1-2-6 B)。IR $\beta$ 量あたりの自己リン酸化量は、PF-群で 12C-群の約 60%まで低下していたが、有意な差ではなかった(Fig. 1-2-6 C)。

## ② インスリン刺激時の IR $\beta$ の自己リン酸化

12C+群と PF+群の IR $\beta$ 自己リン酸化量を比較すると、PF+群でやや増加傾向だが、両群間でほぼ同程度であり(Fig. 1-2-6 A 上段)、IR $\beta$ 量あたりの自己リン酸化量に関しても同様であった(Fig. 1-2-6 C)。

以上の結果より、骨格筋の IR のインスリン依存性チロシンリン酸化に関しては食餌タンパク質の影響はほとんど受けないということが明らかになった。

## 6. 摂食後における骨格筋の IRS-1 の量およびチロシンリン酸化に対する食餌タンパク質の影響

### ① インスリン刺激前の IRS-1 のチロシンリン酸化

12C-群と PF-群の IRS-1 のチロシンリン酸化量を比較すると、12C-群に対し PF-群で約 60%まで低下していた(Fig. 1-2-7 A 上段)。同時に、IRS-1 量が 12C 群に比べ PF 群で約 50%まで有意に減少していたので(Fig.1-2-7 A 下段, Fig. 1-2-7 B)、IRS-1 量あたりのチロシンリン酸化量は両群間で同程度であった(Fig. 1-2-7 C)。PF 群における総量としての IRS-1 チロシンリン酸化量の減少(Fig. 1-2-7 A 上段)は、IR $\beta$ の自己リン酸化量の減少とほぼ一致しており、これが原因となっている可能性が考えられる。また、興味深い事に IRS-1 は、PF 群の方が 12C 群より速く泳動されているというバンドのシフトが観察された(Fig.1-2-7 A 下段)。すなわち、12C 群と PF 群では IRS-1 分子の状態がことなっていると考えられた。

### ② インスリン刺激時の IRS-1 のチロシンリン酸化

12C+群と PF+群の IRS-1 のチロシンリン酸化量を比較すると、12C+群に対して PF+群で約 1.5 倍に増加していた(Fig. 1-2-7 A 上段)。先にも述べたが、PF 群で IRS-1 量が減少していたので(Fig.1-2-7 A 下段, Fig. 1-2-7 B)、IRS-1 量あたりのチロシンリン酸化量は、12C 群+に比べ PF+群で約 3 倍に増加していた(Fig. 1-2-7 C)。

以上の結果より、骨格筋の IRS-1 は食餌タンパク質の影響を受けて量の変化が起こり、IRS-1 のインスリン感受性も変化することが明らかになった。また食餌タンパク質の影響により IRS-1 自体に何らかの修飾が起こるということが明らかになった。

## 7. 食餌タンパク質による骨格筋中 IRS-1 の修飾反応への影響

### ① 骨格筋中 IRS-1 の修飾反応の特定

Fig.1-2-7 A 下段と Fig. 1-2-8 A に示した結果より、PF 群に対して 12C 群の IRS-1 の泳動度減少が起こっており、12C 群の IRS-1 に何らかの修飾が起きていることが考えられた。序論でも述べたが、IRS-1 はチロシンリン酸化部位以上のセリンリン酸化部位を有しており、定常状態でもセリン残基のリン酸化によって、SDS-PAGE において cDNA から期待される分子質量よりはるかに大きい分子質量の位置にバンドが観察されることが知られている。さらに、インスリンの長時間刺激により IRS-1 のセリンリン酸化量が増加し、SDS-PAGE において泳動度減少が起こるということが報告されている。そこで、12C 群の IRS-1 の泳動度減少は IRS-1 のセリンリン酸化量の増加によると考え、Ser612 (ヒトでは 616 位) のリン酸化を特異的に認識する抗体 [anti-IRS-1(pS616) phosphospecific antibody] を用いてイムノブロット法による解析を行った。このセリン残基は、IRS-1 のセリンリン酸化部位の一つであり、PI3-kinase と会合する SH2 domain の一つの近傍に存在し、リン酸化されると PI3-kinase との会合が阻害されると報告されている (Mothe, I. et al, 1996)。その結果、12C 群では Ser612 のリン酸化が明らかに観察されたが、PF 群ではされなかった (Fig. 1-2-8 B)。したがって、骨格筋中 IRS-1 は、PF のようにタンパク質を含まない食餌を摂取することにより Ser612 を含むセリン残基のリン酸化量が減少することが初めて明らかになった。

### ② 食餌タンパク質による骨格筋中 IRS-1 の量とセリンリン酸化量の時間変化

PF 摂取により骨格筋の IRS-1 のセリンリン酸化が減少することを明らかにしたが、では、何日間 PF を摂取するとこの現象が起こるのかを、実験食給餌開始後 1、2、4、8 日目のラットより腓腹筋を摘出し、イムノブロットで解析を行った。同様に PF 摂取により骨格筋中 IRS-1 量が減少するかどうか検討した。

実験食給餌 2 日目より、12C 群と PF 群の IRS-1 でバンドシフトがわずかながら観察できるようになり、4 日目以降で顕著であった (Fig. 1-2-9 A 上段)。同時に anti-IRS-1(pS616) phosphospecific antibody で検出を行ったところ、実験食給餌 4 日目から、PF 群で pSer612 IRS-1 のバンドが検出されなくなった (Fig. 1-2-9 A 下段)。以上の結果より、PF 摂取による骨格筋中 IRS-1 のセリンリン酸化量の減少は、摂食開始 2 日目より徐々に起こり、4 日目には顕著になることが明らかになった。また、同時に骨格筋中 IRS-1 量の時間変化も検

討したが、PF 摂食による IRS-1 量の減少は、実験食給餌 4 日目までは減少は観察できず、8 日目で 12C 群に比べ顕著に減少した(Fig. 1-2-9 A 上段, Fig. 1-2-9 B)。IRS-1 量の変化は、セリンリン酸化量の変化よりも食餌タンパク質に対する応答が遅いということが明らかになった。

### ③ 食餌タンパク質による IRS-1 セリンリン酸化量変化の組織特異性

骨格筋において観察された PF 群での IRS-1 セリンリン酸化量の減少が、肝臓でも観察できるかどうか検討を行ったところ、肝臓では 12C 群と PF 群の間で IRS-1 のバンドシフトは観察できず、骨格筋のみバンドシフトが観察された(Fig. 1-2-10 上段)。また、anti-IRS-1(pS616) phosphospecific antibody で検出を行ったところ、骨格筋の 12C 群のみでリン酸化 Ser612 のバンドが観察された(Fig. 1-2-10 下段)。脂肪組織もインスリンの標的組織として重要であると共に IRS-1 のセリンリン酸化を増加させる因子として挙げられている TNF $\alpha$  産生組織でもあるので、骨格筋 IRS-1 と同様な現象が観察されると考えられた。しかし、そのバンドの検出が困難である場合が多いので検討することを断念した。

## 8. 摂食後における肝臓および骨格筋の IRS-2 の量およびチロシンリン酸化に対する食餌タンパク質の影響

肝臓の IRS-2 に関して、そのチロシンリン酸化は PF 群においてのみ観察でき、インスリン刺激によるチロシンリン酸化の増加も観察された(Fig. 1-2-11 A 上段)。さらに、IRS-2 量も 12C 群に比べて PF 群で顕著に増加しており(Fig. 1-2-11 A 下段)、PF 群における IRS-2 のチロシンリン酸化量の増加は、IRS-2 量の増加に起因しているものと考えられる。

骨格筋の IRS-2 に関して、肝臓と同様にそのチロシンリン酸化は PF 群においてのみ観察でき、インスリン依存的に増強した(Fig. 1-2-11 B)。IRS-2 量に関して検討したが、IRS-2 の発現量が骨格筋では肝臓に比べて少ないこと、もしくは抗体価による問題などの理由から、イムノプロットでは検出できなかった。しかし、チロシンリン酸化量の変化に関して肝臓と同様な傾向を示していたことから、骨格筋においても IRS-2 量は PF 群で増加しているものと考えられた。



## 9. 摂食後における骨格筋の Akt1/PKB $\alpha$ の量および Ser473 リン酸化に対する食餌タンパク質の影響

### ① インスリン刺激前の Akt1/PKB $\alpha$ の Ser473 リン酸化

12C群と PF群の Akt1/PKB $\alpha$ の Ser473 リン酸化は、同程度であった(Fig. 1-2-12 A 上段)。また、Akt1/PKB $\alpha$ 量も両群間で同程度であり(Fig.1-2-12 A 下段, Fig. 1-2-12 B)、結果として Akt1/PKB $\alpha$ 量あたりの Ser473 リン酸化量も両群間で同程度であった(Fig. 1-2-12 C)。

### ② インスリン刺激時の Akt1/PKB $\alpha$ の Ser473 リン酸化

12C+群と PF+群の Akt1/PKB $\alpha$ の Ser473 リン酸化を比較すると、PF 群で 12C 群の約 1.7 倍の増加がみられ(Fig. 1-2-12 A upper panel)、Akt1/PKB $\alpha$ 量あたりのチロシンリン酸化量に関しても、PF+群で 12C+群の約 1.7 倍まで有意に増加していた(Fig. 1-2-12 C)。

以上の結果より、骨格筋において IRS-1 や IRS-2 の下流に存在する Akt1/PKB $\alpha$ の Ser473 リン酸化も食餌タンパク質の影響を受けることが明らかになった。

最後に肝臓および骨格筋において検討した全結果を、下記の表にまとめた。

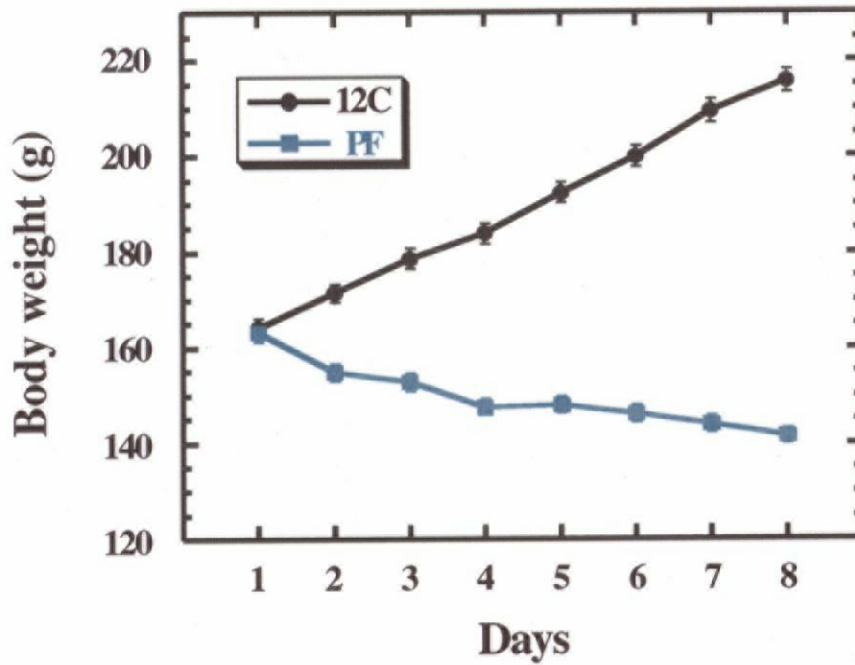
		PF	
<b>Body weight</b>		↓	
<b>Food intake</b>		↓	
<b>Serum insulin</b>		↓	
		PF Muscle	PF Liver
<b>IRS-1</b>	<b>Amount</b>	↓	↑
	<b>pY/Protein</b>	↑	↑?
	<b>pSer612</b>	↓↓	?
	<b>Mobility shift</b>	+	-
<b>IRS-2</b>	<b>Amount</b>	?	↑
	<b>pY</b>	↑	↑

**Table 1**  
**Components of experimental diets.**

	<b>12% Casein Diet</b>	<b>Protein-free Diet</b>
<b>Casein</b>	<b>14</b>	<b>-</b>
<b>β-Corn starch</b>	<b>65.6</b>	<b>79.8</b>
<b>Soybean oil</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
<b>Cellulose</b>	<b>5</b>	<b>5</b>
<b>Mineral mixture</b>	<b>4</b>	<b>4</b>
<b>Vitamin mixture</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Choline chloride</b>	<b>0.2</b>	<b>0.2</b>
<b>Methionine</b>	<b>0.2</b>	<b>-</b>

**(g/100 g diet)**

## A Body weight



## B Food intake

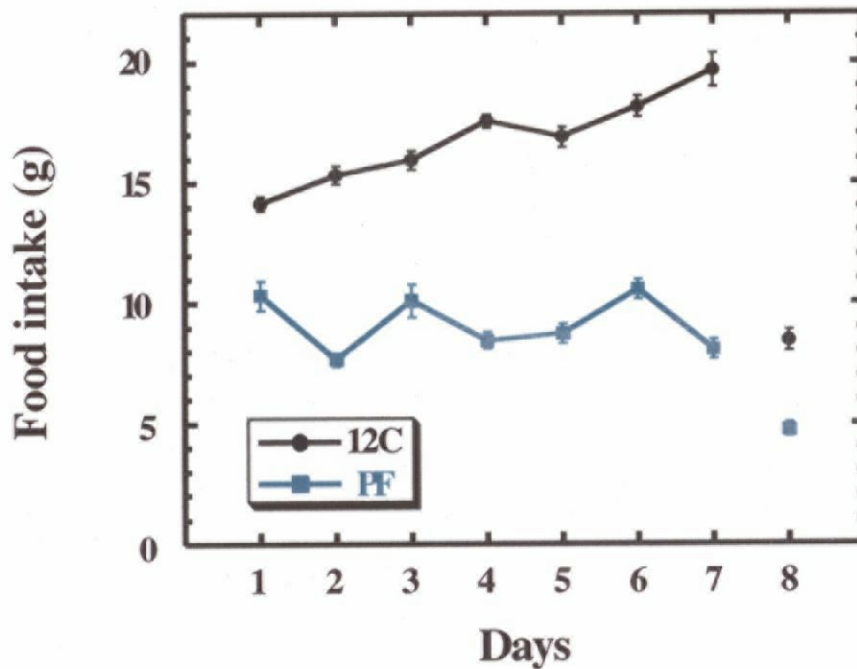
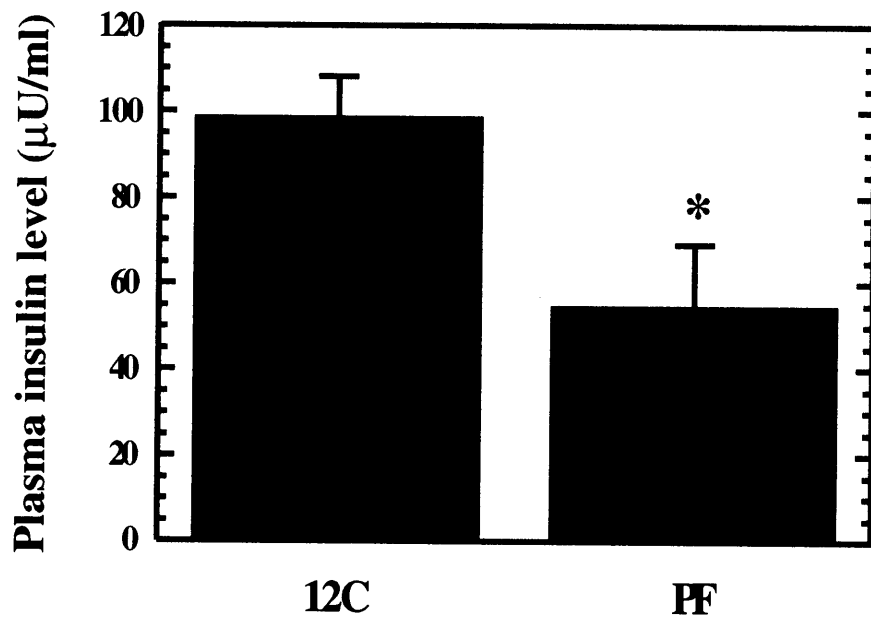


Fig. 1-2-1

Change of body weight and food intake. Rats were fed on 12C or PF diet for 7 days (8 h a day ad libitum) and for 1.5 h on the 8th day.

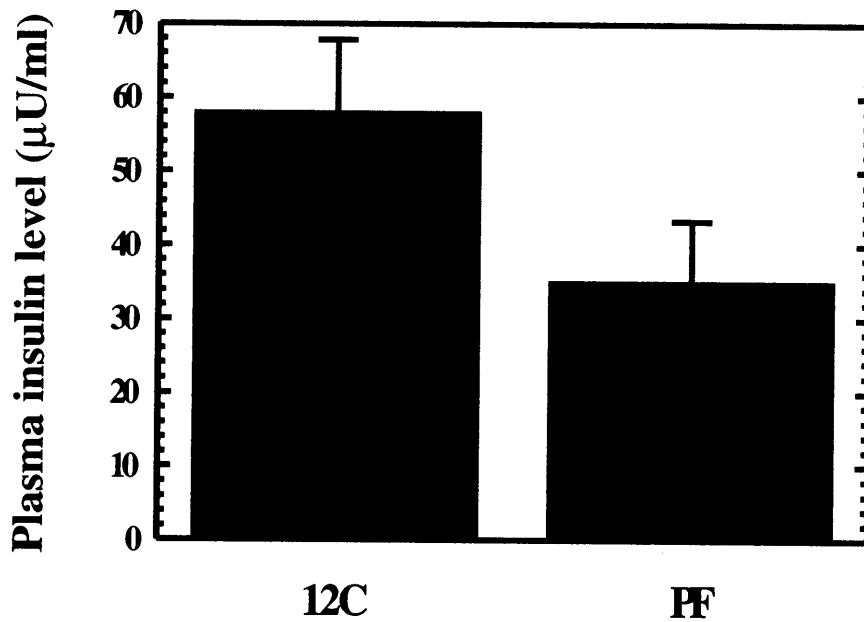
Data represent the mean  $\pm$  S. E. for ten rats.

## A Portal Vein



\*,  $P < 0.05$  vs. 12C

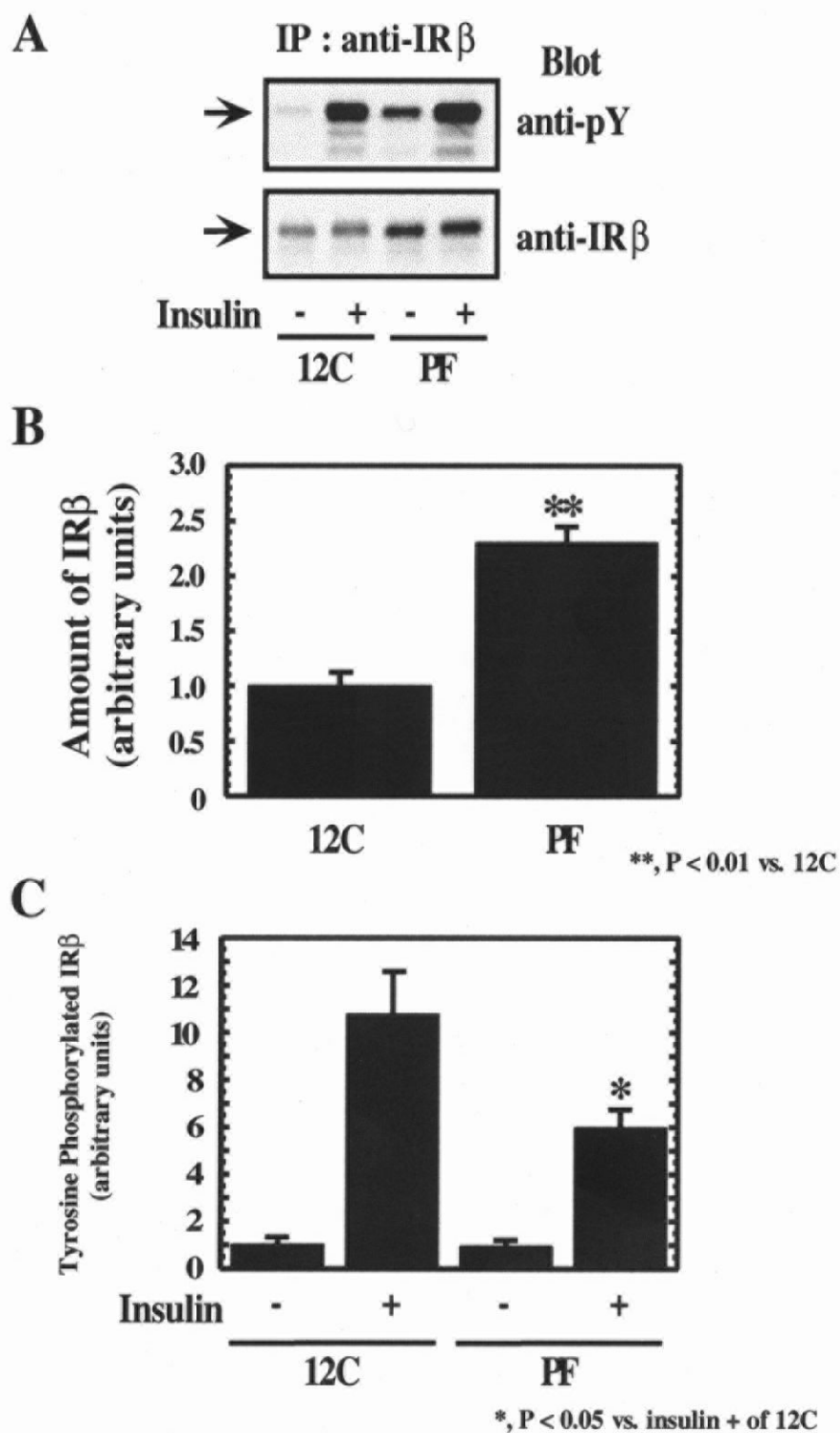
## B Carotid Artery



**Fig. 1-2-2**

**Plasma insulin level. Rats were fed on 12C or PF diet for 7 days (8 h a day ad libitum) and for 1.5 h on the 8th day.**

Data represent the mean  $\pm$  S. E. of five rats.



**Fig. 1-2-3**

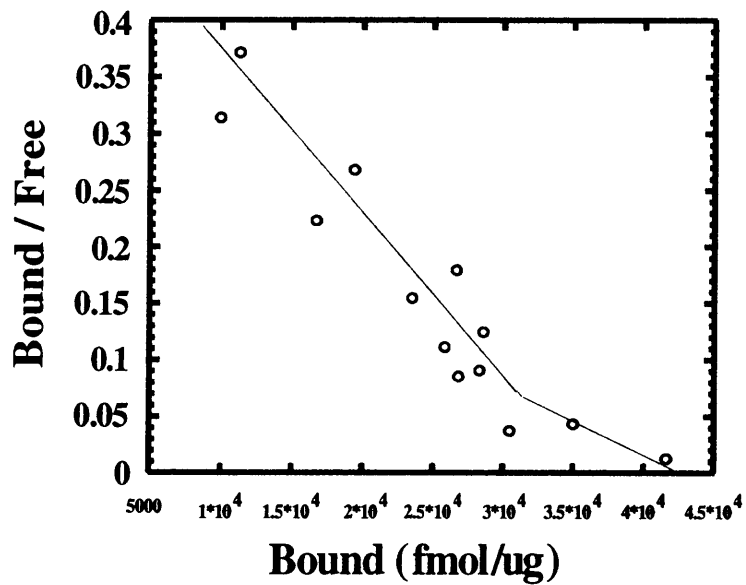
Effect of dietary protein on the amount and the insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of insulin receptor  $\beta$  subunit in the liver. Rats were fed on 12C or PF diet for 7 days and injected with vehicle or insulin after being fed on respective diets for 1.5 h on the 8th day.

A : Representative blots of immunoblot analyses.

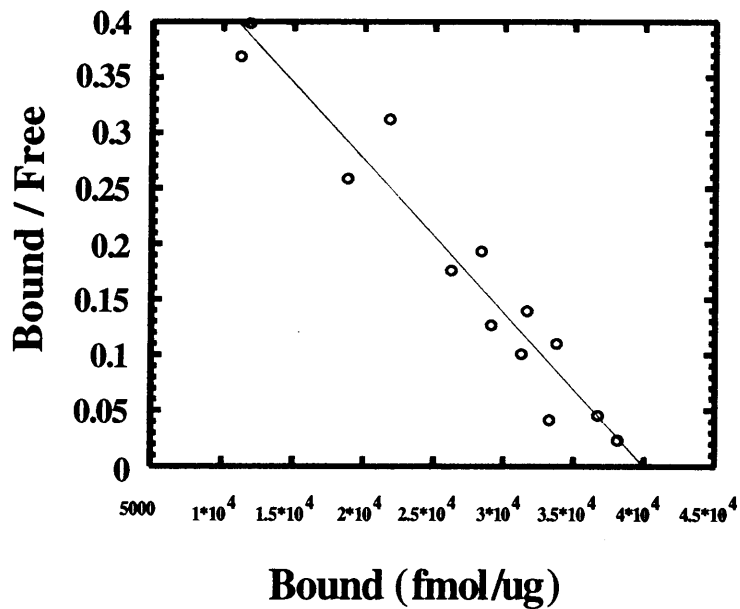
B : Quantitative analysis for the amount of IR $\beta$  (n = 10).

C : Quantitative analysis for the tyrosine phosphorylated IR $\beta$  (n = 5).

## A 12C



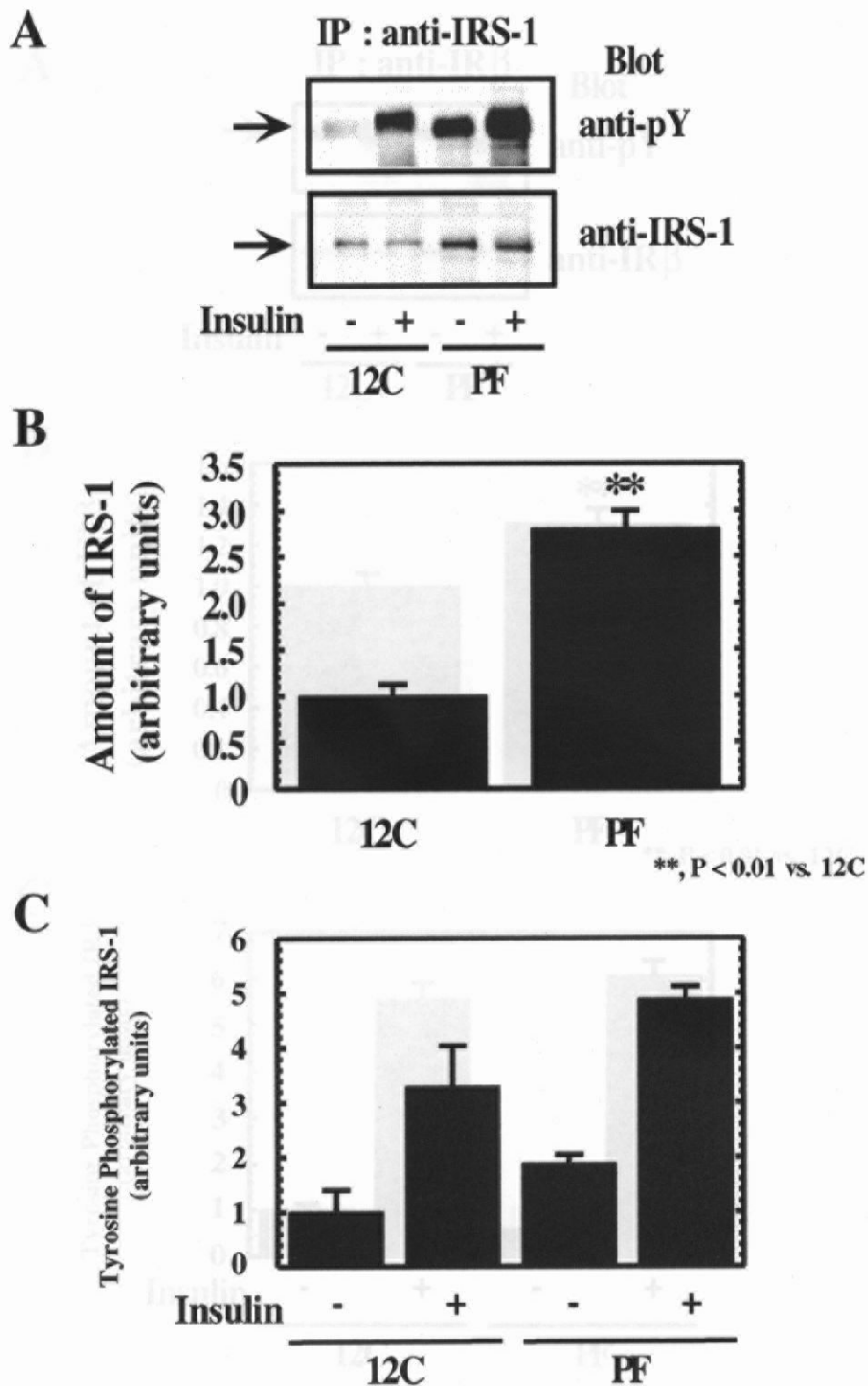
## B PF



### Fig. 1-2-4

#### Scatchard plot analysis.

Effect of dietary protein on insulin binding to membrane fraction from the liver. Rats were fed on 12C or PF diet for 7 days and injected with vehicle or insulin after being fed on respective diets for 1.5 h on the 8th day.



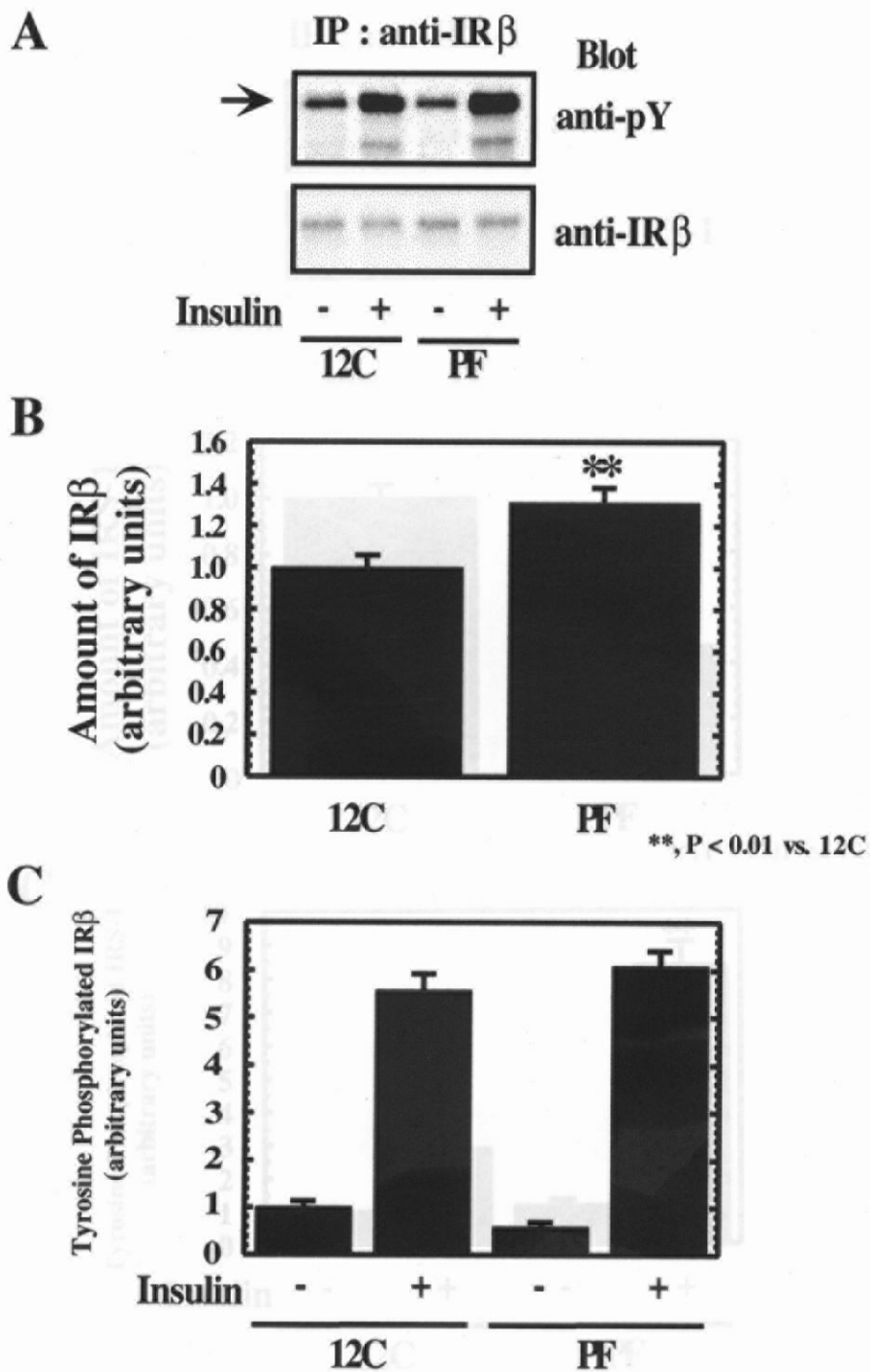
**Fig. 1-2-5**

Effect of dietary protein on the amount and the insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1 in the liver. Rats were fed on 12C or PF diet for 7 days and injected with vehicle or insulin after being fed on respective diets for 1.5 h on the 8th day.

A : Representative blots of immunoblot analyses.

B : Quantitative analysis for the amount of IRS-1 (n = 10).

C : Quantitative analysis for the tyrosine phosphorylated IRS-1 (n = 5).



**Fig. 1-2-6**

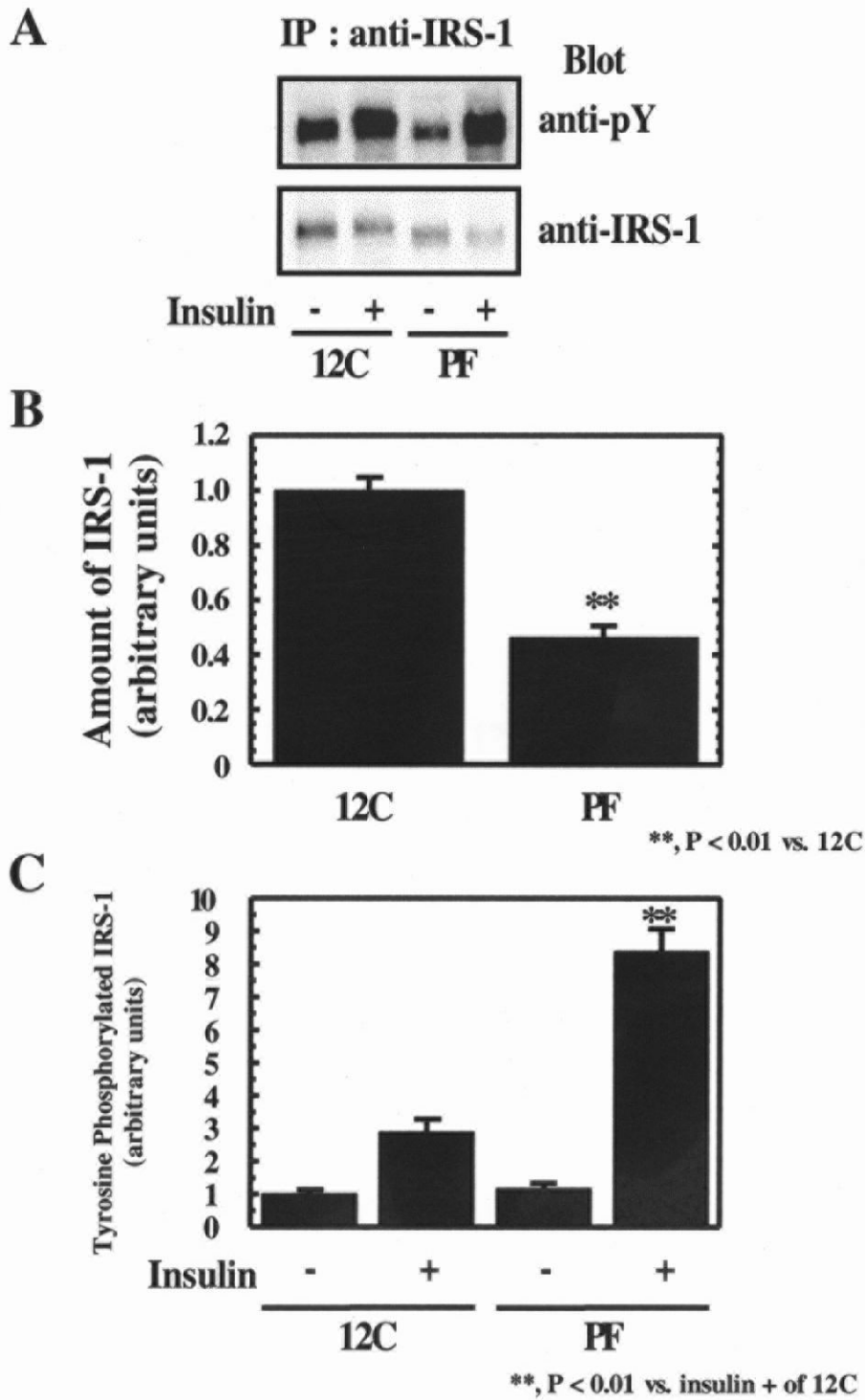
Effect of dietary protein on the amount and the insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of insulin receptor  $\beta$  subunit in the skeletal muscle. Rats were fed on 12C or PF diet for 7 days and injected with vehicle or insulin after being fed on respective diets for 1.5 h on the 8th day.

A : Representative blots of immunoblot analyses.

B : Quantitative analysis for the amount of IR $\beta$  (n = 10).

C : Quantitative analysis for the tyrosine phosphorylated IR $\beta$  (n = 5).





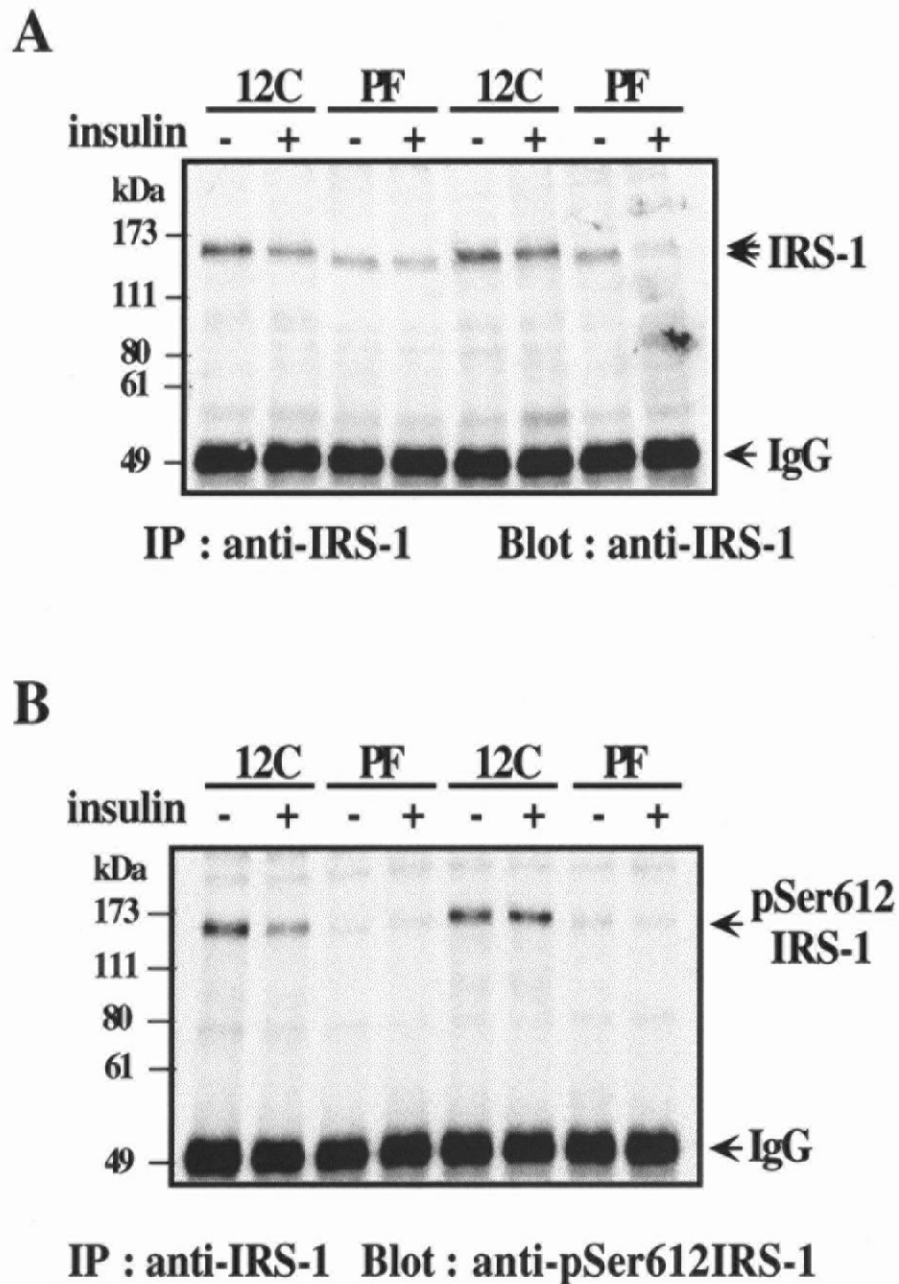
**Fig. 1-2-7**

Effect of dietary protein on the amount and the insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1 in the skeletal muscle. Rats were fed on 12C or PF diet for 7 days and injected with vehicle or insulin after being fed on respective diets for 1.5 h on the 8th day.

**A :** Representative blots of immunoblot analyses.

**B :** Quantitative analysis for the amount of IRS-1 (n = 10).

**C :** Quantitative analysis for the tyrosine phosphorylated IRS-1 (n = 5).



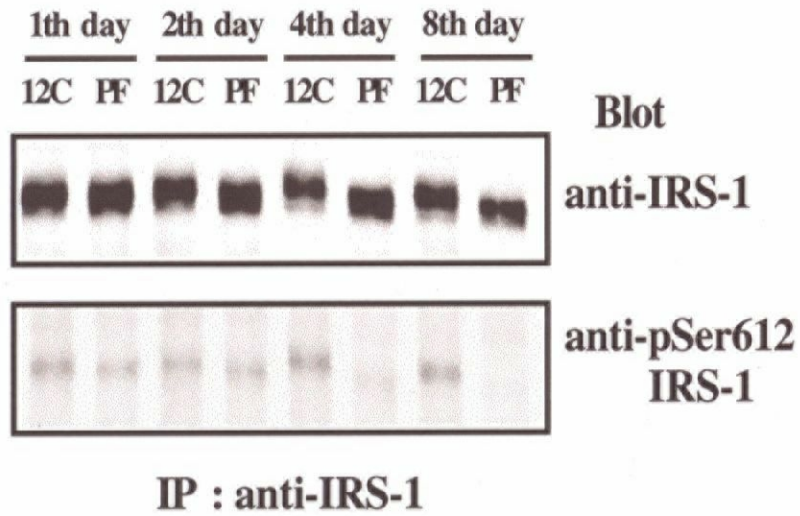
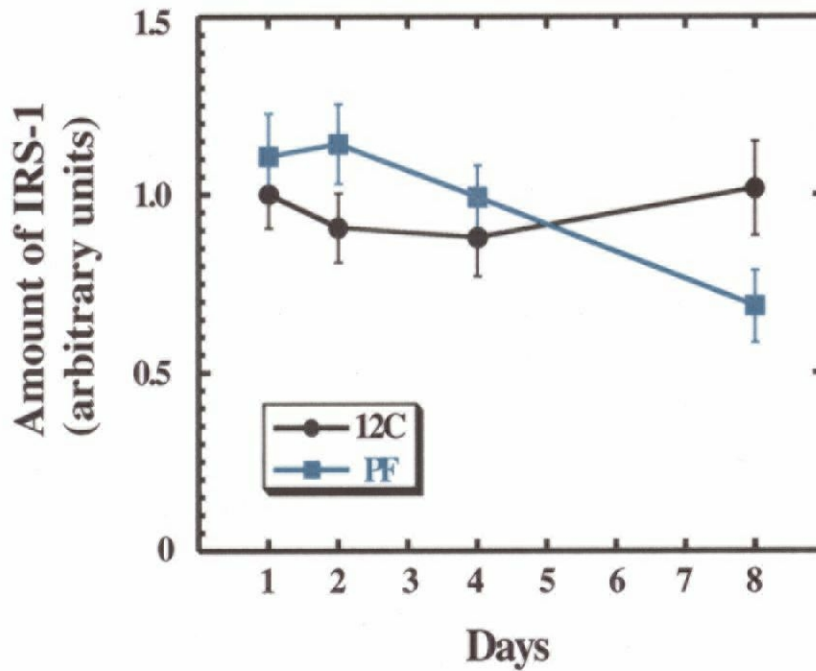
**Fig. 1-2-8**

**Effect of dietary protein on the modification of IRS-1.**

Dierary protein deprivation reduces serine phosphorylation of IRS-1 in the skeletel muscle of rats.

A : A representative blot of immunoblot analysis using an anti-IRS-1 antibody.

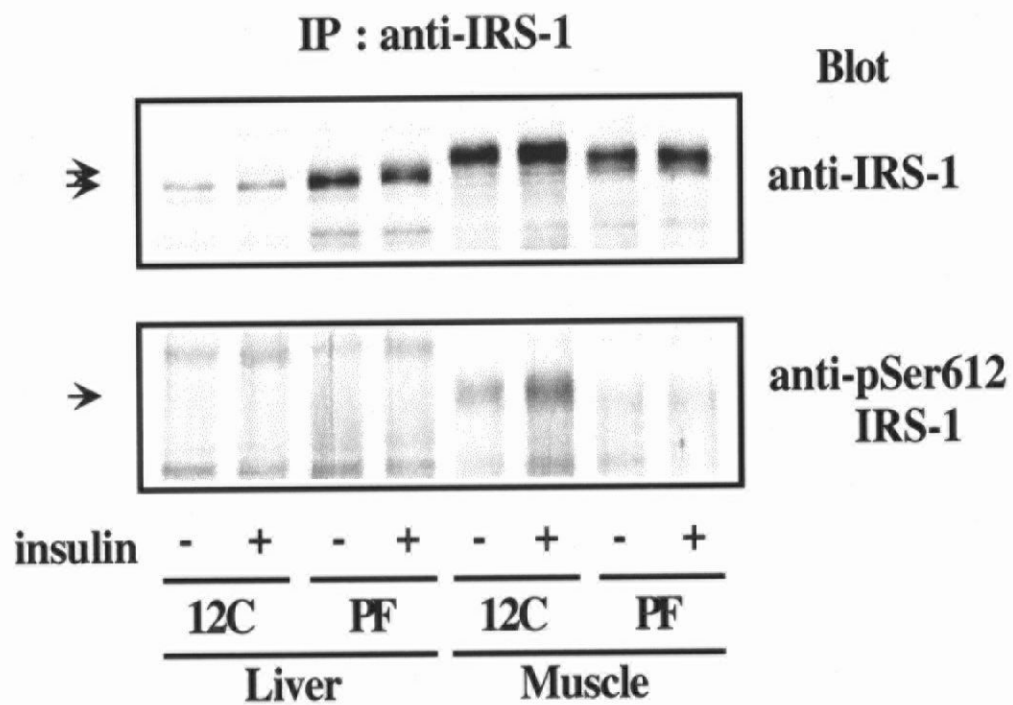
B : A representative blot of immunoblot analysis using an anti-pSer612 IRS-1 antibody.

**A****B****Fig. 1-2-9**

**Time course of the amount and the serine phosphorylation of IRS-1 in the skeletal muscle.**

**A :** Representative blots of immunoblot analyses using an anti-IRS-1 antibody and anti-pSer612 IRS-1 antibody.

**B :** Quantitative analysis for the amount of IRS-1 (n = 5).

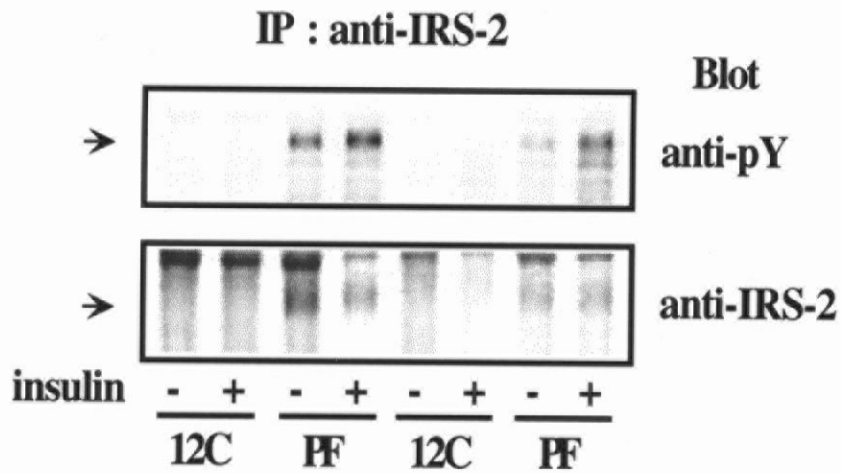


**Fig. 1-2-10**

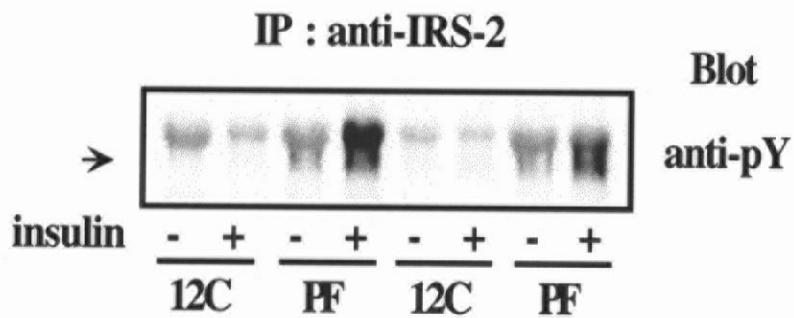
**Tissue specific serine phosphorylation of IRS-1.**

Representative blots of immunoblotting analyses using an anti-IRS-1 antibody and an anti-pSer612 IRS-1 antibody are shown.

## A Liver

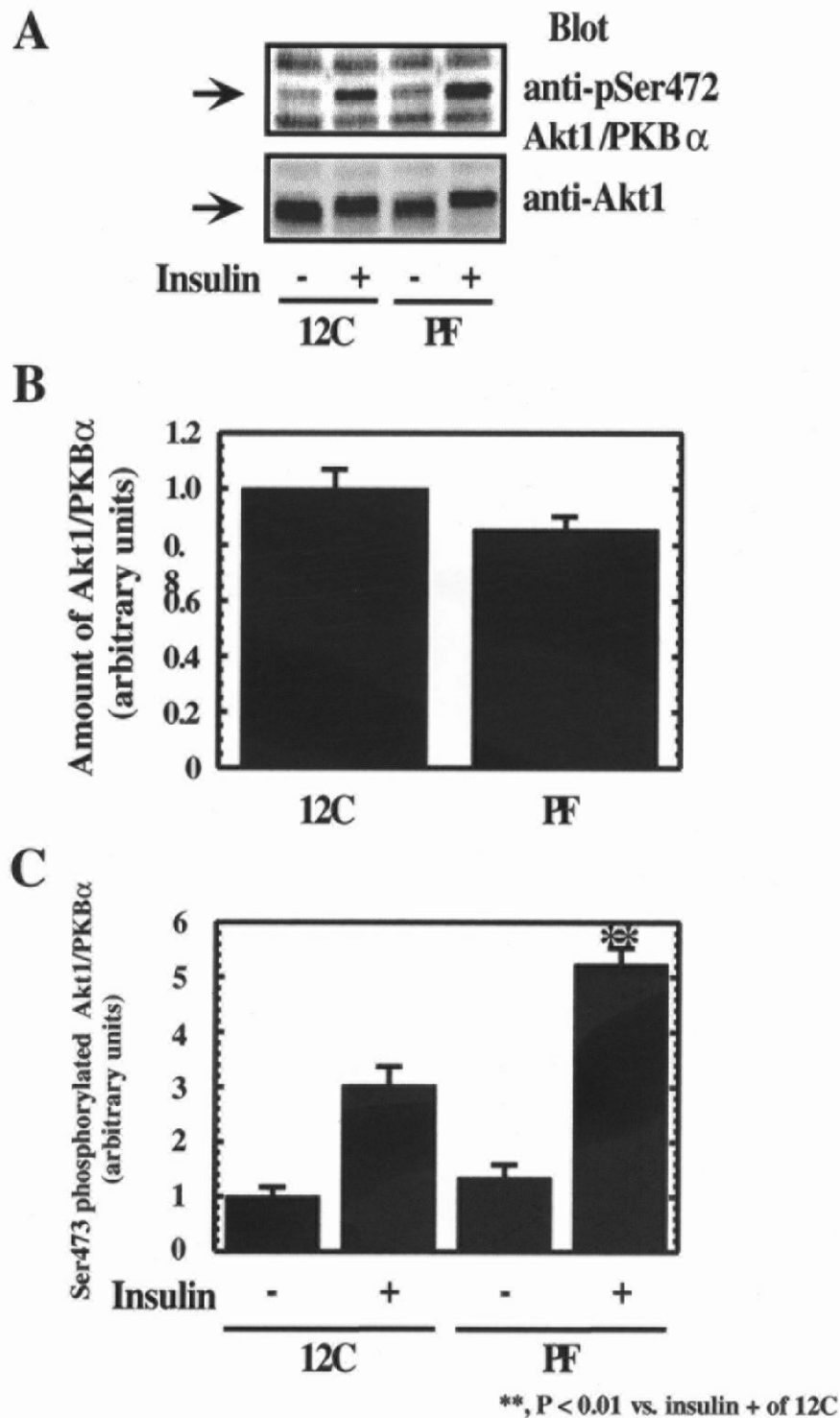


## B Muscle



**Fig. 1-2-11**

Effect of dietary protein on the amount and the insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-2 in the liver and the skeletal muscle. Rats were fed on 12C or PF diet for 7 days and injected with vehicle or insulin after being fed on respective diets for 1.5 h on the 8th day.



**Fig. 1-2-12**

**Effect of dietary protein on the amount and the insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of Akt1/PKB $\alpha$  in the skeletal muscle. Rats were fed on 12C or PF diet for 7 days (8 h a day ad libitum) and for 1.5 h on the 8th day.**

**A :** Representative blots of immunoblot analyses.

**B :** Quantitative analysis for the amount of Akt1/PKB $\alpha$  (n = 10).

**C :** Quantitative analysis for the Ser473 phosphorylated Akt1/PKB $\alpha$  (n = 5).