

### 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

##### 動物の飼育

「1-2-1 方法」で示したのと同様に飼育し、実験食7日目の18時より16時間絶食後、10時より摂食させずにそのまま麻酔を開始し、「1-1-1 方法」で示したようにインスリンもしくは生理食塩水を下行大静脈より注入し、適時に肝臓および腓腹筋を摘出した。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。

##### 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

「1-2-1 方法」で示したのと同様に行った。

##### イムノブロットイング

「1-2-1 方法」で示したのと同様に行った。

##### 統計処理

「1-2-1 方法」で示したのと同様に行った。

#### 1-3-2 結果

1. 一晚絶食状態における肝臓の 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 $\beta$ 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、Fig. 1-2-3 と異なり、PF-群で 12C-群の約 60%まで低下していたが(Fig. 1-3-1 A 上段)、IR $\beta$ 量は Fig. 1-2-3 と同様に約 2.1 倍に有意に増加していたので(Fig. 1-3-1 A 下段, Fig.1-3-1 B)、IR $\beta$ 量あたりの自己リン酸化

量はさらに低下し、PF・群で12C・群の約70%まで低下していた(Fig.1-3-1 C)。摂食時に分泌されるインスリン存在下では血中インスリン濃度は12C群に比べてPF群で低下していたのにもかかわらずIR $\beta$ 量あたりの自己リン酸化量は両群間で同程度だったのに対し、一晚絶食時ではPF・群で低下していたことから、一晚絶食状態での血中インスリン濃度がPF群では12C群に比べて低い可能性や生理的濃度のインスリンに対する応答が12C群に比べてPF群の方が良いという可能性が考えられた。

## 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、Fig. 1-2-3と同様にPF+群で12C+群の約1.6倍に増加していた(Fig. 1-3-1 A 上段)。さらに、PF群でIR $\beta$ 量が増加している(Fig. 1-3-1 A 下段, Fig.1-3-1 B)、IR $\beta$ 量あたりの自己リン酸化量は、PF+群で12C+群の約75%まで低下していた(Fig.1-3-1 C)。

以上の結果のように、摂食時に分泌されるインスリン存在下と一晚絶食状態の肝臓では、IRの量とインスリンに応答した自己リン酸化に対する食餌タンパク質の影響は同様であった。さらに一晚絶食時の血中インスリン濃度も考慮しなくてはならないが、生理的濃度のインスリンに応答した自己リン酸化は食餌タンパク質の影響を受けて、PFのようなタンパク質を含まない食餌を摂食することにより生理的濃度のインスリンに対する応答能が上昇するという可能性が考えられる。

## 2. 一晚絶食状態における肝臓の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は、ほぼ同程度であった(Fig. 1-3-2 A 上段)。また、IRS-1量はFig. 1-2-5の結果と同様に、PF群で12C群の約1.8倍と有意に増加していた(Fig. 1-3-2 A 下段, Fig. 1-3-2 B)、IRS-1量あたりのチロシンリン酸化量はPF・群で12C・群の約70%まで有意に低下していた(Fig. 1-3-2 C)。この結果は、IRの結果と同様であった。

## ② インスリン刺激時の IRS-1 のチロシンリン酸化

Fig. 1-2-5 と同様に、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 3 倍に増加していたが(Fig. 1-3-2 A 上段)、IRS-1 量が PF 群で増加しているため(Fig. 1-3-2 A 下段, Fig. 1-3-2 B)、IRS-1 量あたりのチロシンリン酸化量は、PF 群+で 12C+群の約 1.4 倍の増加にとどまったが、その差は有意であった(Fig. 1-3-2 C)。

以上の結果より、摂食時に分泌されるインスリン存在下と一晩絶食状態の肝臓を比較すると、IRS-1 量とインスリンに応答したチロシンリン酸化量に対する食餌タンパク質の影響はほぼ同じ動向を示した。一晩絶食状態でインスリン無刺激時の IRS-1 量あたりのチロシンリン酸化量が減少しているのは、同条件で IR の自己リン酸化量も減少していたためと考えられる。

## 3. 一晩絶食状態における骨格筋の 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 $\beta$ の自己リン酸化

Fig. 1-2-6 と同様に、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. 1-3-3 A 上段)。このとき、IR $\beta$ 量は両群間で同程度であったため(Fig. 1-3-3 A 下段, Fig. 1-3-3 B)、IR $\beta$ 量あたりの自己リン酸化量は、PF-群で 12C-群の約 65%まで低下していたが、その差は有意でなかった(Fig. 1-3-3 C)。

### ② インスリン刺激時の IR $\beta$ の自己リン酸化

Fig. 1-2-6 と同様に、12C+群に比べて PF+群で若干自己リン酸化が増加しているもののほぼ同程度であり(Fig. 1-3-3 A 上段)、IR $\beta$ 量あたりの自己リン酸化量も同様であった(Fig. 1-3-3 C)。

以上の結果より、摂食時に分泌されるインスリン存在下と一晩絶食状態の骨格筋を比較すると、IR に関しては量および自己リン酸化に対する食餌タンパク質の影響は同じ動向を示した。肝臓の場合と異なり、インスリン無刺激時の自己リン酸化量は摂食時に分泌されるインスリン存在下もしくは非存在下でも PF-群で低下しており、生理的濃度のインスリンに応答しているかどうかわからなかった。

#### 4. 一晩絶食状態における骨格筋の 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

Fig. 1-2-7 と同様に、PF群で 12C群の約 50%までチロシンリン酸化量が低下し(Fig. 1-3-4 A 上段)、IRS-1 量も PF 群で 12C 群の約 60%まで低下していたので(Fig. 1-3-4 A 下段, Fig. 1-3-4 B)、IRS-1 量あたりのチロシンリン酸化量は同程度であった(Fig. 1-3-4 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らず、PF群で血中インスリン濃度に対する IRS-1 応答能が上昇している可能性が考えられる。さらに、12C 群と PF 群での IRS-1 のバンドシフトも Fig. 1-2-7 と同様に観察された。

##### ② インスリン刺激時の IRS-1 のチロシンリン酸化

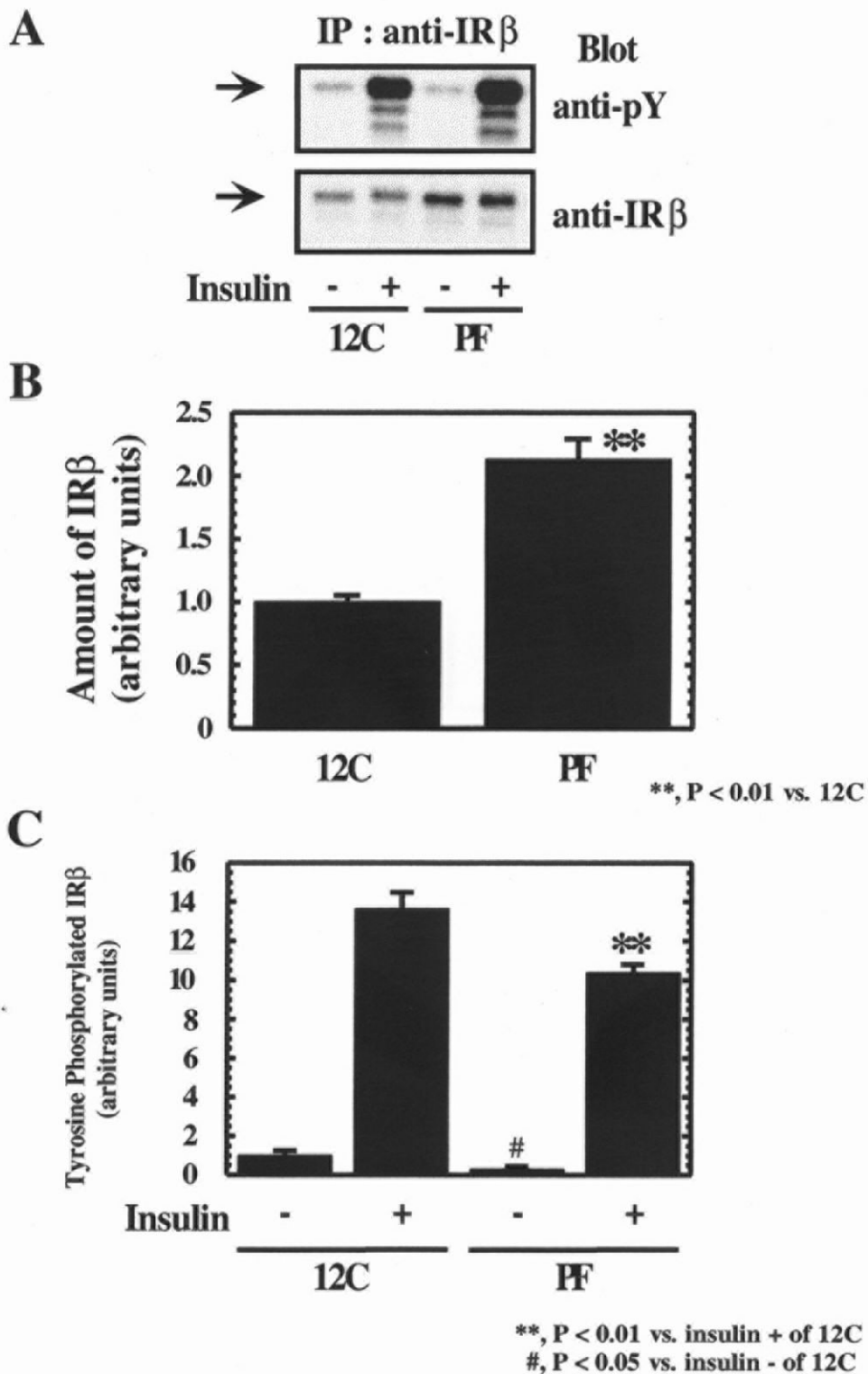
Fig. 1-2-7 と同様に、PF+群で 12C+群の約 1.4 倍まで増加しており(Fig. 1-3-4 A 上段)、IRS-1 量あたりのチロシンリン酸化量は PF+群で 12C+群の約 2.3 倍まで増加していた(Fig. 1-3-4 C)。

##### ③ 摂食時に分泌されるインスリン存在下と一晩絶食状態における IRS-1 セリンリン酸化状態の比較

12C 群と PF 群における IRS-1 のバンドシフトは、1.5 時間摂食時と一晩絶食時の両ラットの骨格筋で観察された(Fig. 1-3-5 上段)。しかし、PF 群の IRS-1 のバンドは 1.5 時間摂食時と一晩絶食時で同じ泳動度であったが、12C 群の IRS-1 のバンドは一晩絶食時に比べて 1.5 時間摂食時で少し泳動度が減少していた。また、pSer612 IRS-1 のバンドは 1.5 時間摂食時と一晩絶食時の 12C 群で観察できたが、1.5 時間摂食時の 12C 群のほうがややバンド強度は高かった(Fig. 1-3-5 下段)。このように、1.5 時間という短時間の摂食で分泌されるインスリンもしくは増加する血中アミノ濃度によって、IRS-1 のセリンリン酸化状態が変化する可能性が示唆された。

以上の結果より、摂食時に分泌されるインスリン存在下と一晩絶食状態の骨格筋 IRS-1 は、その量、インスリンに応答したチロシンリン酸化およびセリンリン酸化に対する食餌タンパク質の影響は同じ動向を示した。さらに、IRS-1 のセリンリン酸化状態は、短時間

の摂食により変動する血中インスリン濃度や血中アミノ酸濃度の影響を受けるということが考えられた。



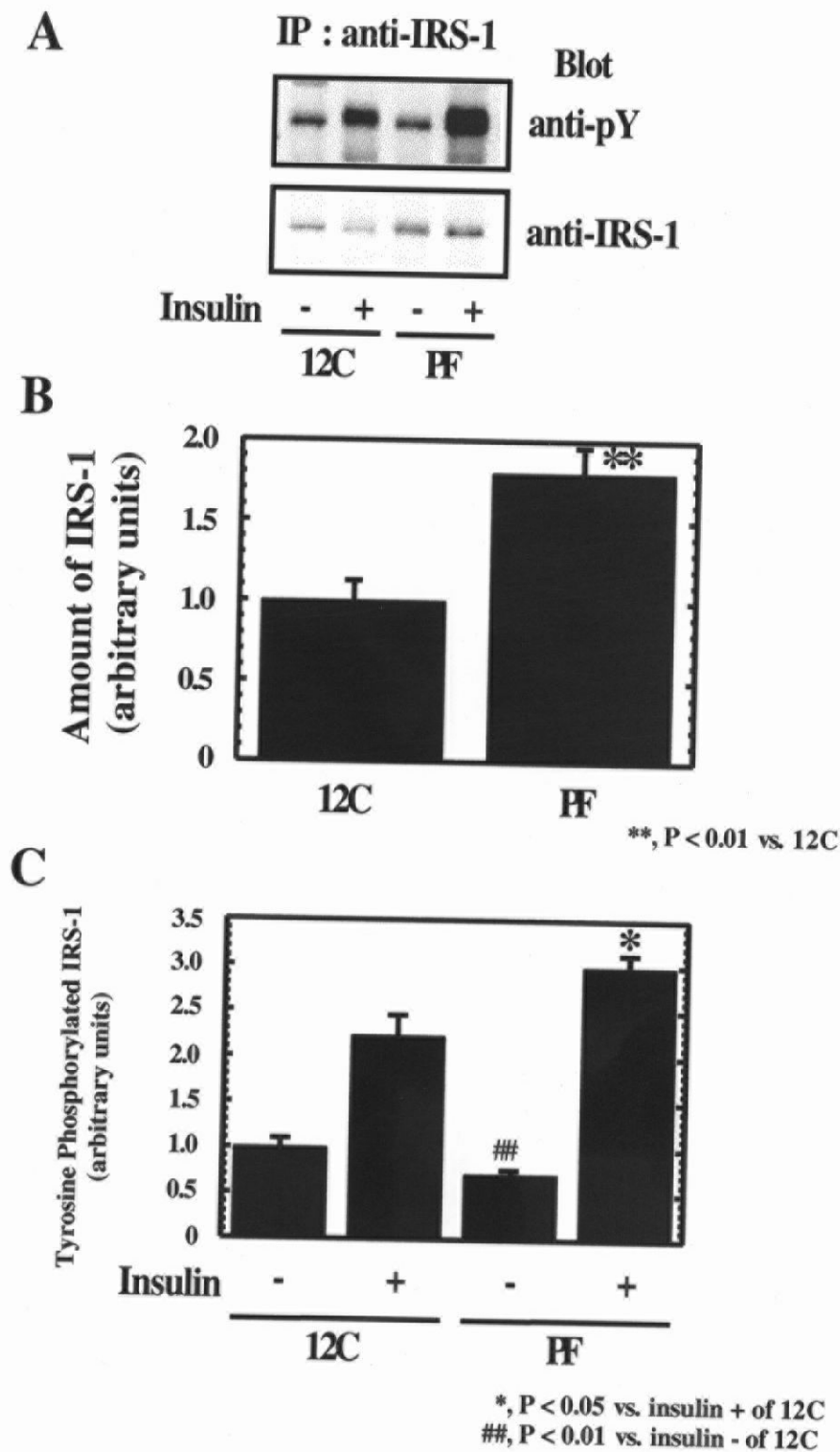
**Fig. 1-3-1**

**Effect of dietary protein on the amount and the insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of insulin receptor  $\beta$  subunit in the liver. Rats were fasted overnight after being fed 12C or PF diet for 7 days.**

**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).



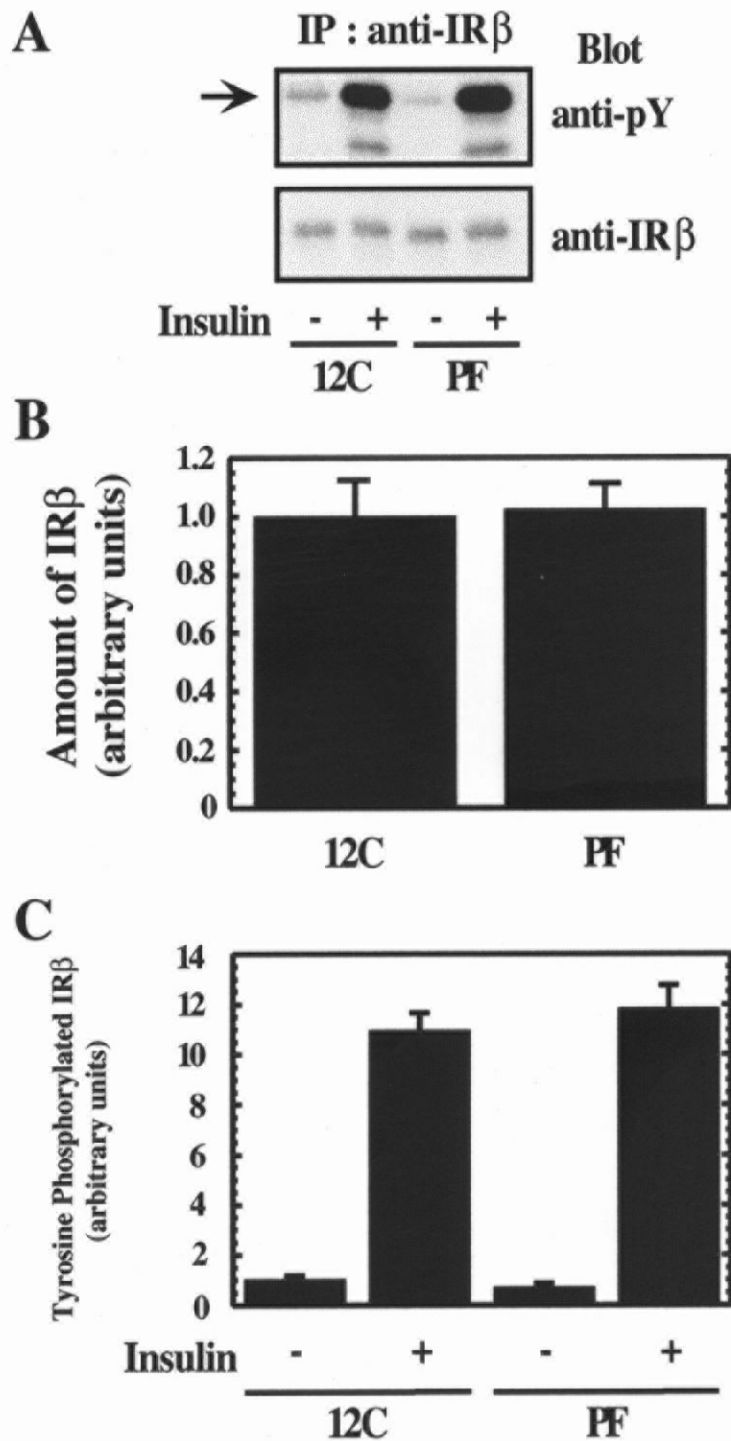
**Fig. 1-3-2**

Effect of dietary protein on the amount and the insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1 in the liver. Rats were fasted overnight after being fed on 12C or PF diet for 7 days.

**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. 1-3-3**

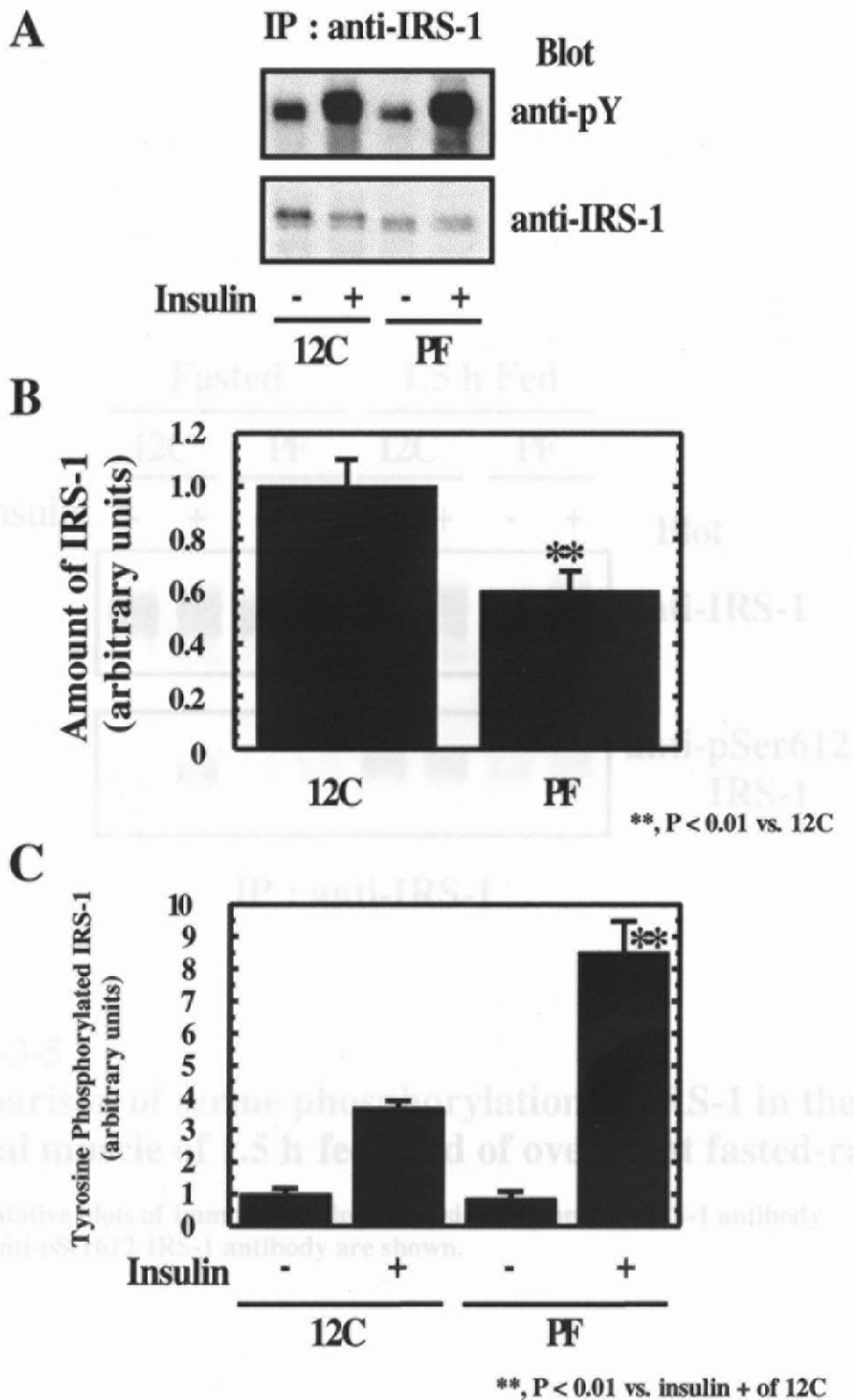
Effect of dietary protein on the amount and the insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of insulin receptor  $\beta$  subunit in the skeletal muscle. Rats were fasted overnight after being fed on 12C or PF diet for 7 days.

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).





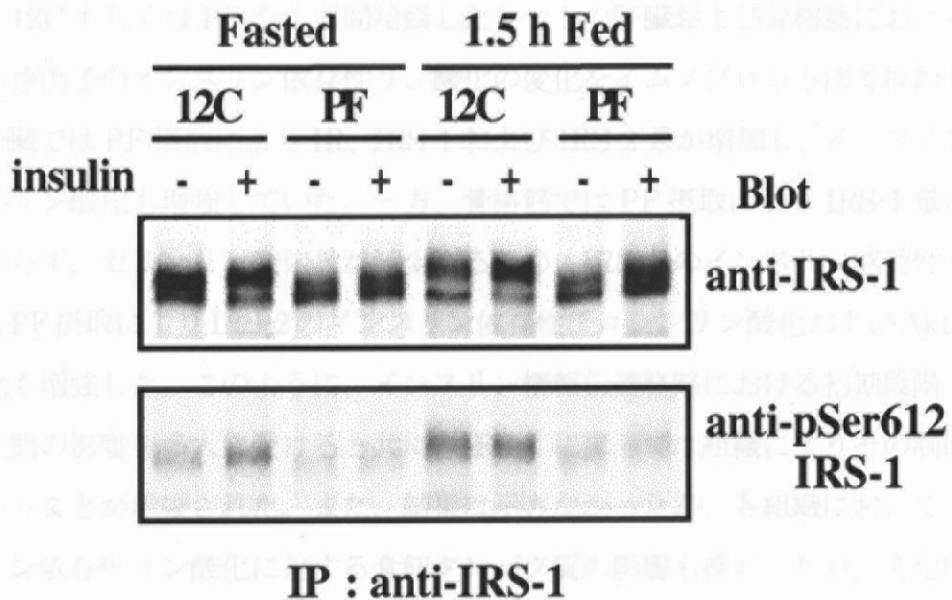
**Fig. 1-3-4**

Effect of dietary protein on the amount and the insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1 in the skeletal muscle. Rats were fasted overnight after being fed on 12C or PF diet for 7 days.

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. 1-3-5**  
**Comparison of serine phosphorylation of IRS-1 in the skeletal muscle of 1.5 h fed- and of overnight fasted-rats.**

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

## 第四節 考察

本章では、タンパク質栄養状態によるインスリン情報伝達因子のインスリンに対する応答の変化を明らかにする目的で実験を行った。第一節では、肝臓および骨格筋におけるインスリン情報伝達因子の **saturation dose** であるインスリンに応答したリン酸化の時間的変化を検討し、各因子の最大リン酸化時間を決定した。その結果をもとに第二節および第三節では、12C もしくは PF を 1 週間給餌したラットの肝臓および骨格筋におけるインスリン情報伝達因子のインスリン依存性リン酸化の変化をイムノブロット法で検討した。その結果、肝臓では PF 摂取により **IR**、**IRS-1** および **IRS-2** 量が増加し、インスリン応答したチロシンリン酸化も増強していた。一方、骨格筋では PF 摂取により **IRS-1** 量が減少するにも関わらず、セリンリン酸化量が減少するため、**IRS-1** のインスリン感受性が上昇した。さらに、PF 摂取により **IRS-2** のインスリン依存性チロシンリン酸化および **Akt1/PKB $\alpha$**  のリン酸化も増強した。このように、インスリン情報伝達経路における初期段階でタンパク質栄養状態の影響を多大に受けると共に、**IRS-1** に関しては組織によりその制御機構が異なるということが示唆された。また、結果は示さなかったが、各組織において **ERK1/2** のインスリン依存性リン酸化に対する食餌タンパク質の影響も検討したが、変化は観察できなかった。

以下、本章で観察された、タンパク質栄養の影響を大きく受けたインスリン情報伝達因子の変化に関して詳細に考察する。

### 1. タンパク質栄養状態の悪化による肝臓 **IR** 量の増加

本章では 12C もしくは PF を 1 週間給餌したラットの肝臓 **IR** の量をイムノブロット法および **Receptor Binding Assay** における **Scatchard plot** 解析によって検討した。その結果、イムノブロット法では PF 摂取により **IR** 量が顕著に増加していたのに対し、インスリンの **IR** 結合量は両群で同程度であった。イムノブロット法では **anti-IR $\beta$  antibody** で免疫沈降したサンプルを同抗体で検出した結果を示したが、免疫沈降しないでブロットした場合にも PF 摂取による **IR** 量の増加(12C 群の約 1.5 倍)が同様に観察された。このように 2 つの異なるアッセイ系で生じた差異の原因としては、イムノブロット法では細胞質全タンパク質についての検討であるのに対して、**Receptor Binding Assay** では細胞膜タンパク質についての検討であるという点が考えられる。このことから、PF 摂取により細胞膜上の

IR 量は変動せず、細胞内にプールされている IR 量が増加しているということが示唆された。肝臓におけるインスリン結合量の変動に関しては、これまでに、絶食や STZ 投与による I 型糖尿病で増加し、hyperinsulinemia を呈した *ob/ob* マウスで減少するという報告がある(Balage, M. et al, 1990、Saad, M. J. A., et al, 1992)。これらの現象は血中インスリン濃度変動に応答した制御機構であると考えられている。しかし、PF 摂取によっても血中インスリン濃度は低下したが、インスリン結合量は変化しなかったため、この場合は他の制御機構の存在が考えられる。それに対して、様々な生理条件下での細胞内にプールされている IR 量の変動に関する知見はほとんどない。

以上のことから、PF 摂取により摂食時のインスリン無刺激時および刺激時で IR の自己リン酸化量の増加は、PF 摂取による IR のインスリン感受性の上昇である可能性が考えられた。また、Reis らは主に骨格筋に注目して研究を行っていたが肝臓についても検討しており、4 週齢の Wistar 系雄ラットに 6%カゼイン食もしくは 17%カゼイン食を 8 週間給餌した場合には、IR 量は変動せず、インスリン依存性自己リン酸化が 6%カゼイン食群で増強していた(Reis, M. A. B. et al, 1997)。この結果からも、タンパク質栄養の悪条件による IR のインスリン応答性の亢進が推察された。しかし本章において観察された、肝臓 IR の PF 摂取による up-regulation が、IR 量の増加によるものでなくインスリン感受性の上昇によると確定するには、*in vitro* でチロシンキナーゼ活性を測定しないと正確なことは言えないと考える。

## 2. タンパク質栄養状態の悪化における肝臓 IRS-1, -2 量の増加

PF 摂取により肝臓 IRS-1 および IRS-2 量の増加が観察され、それに伴い IRS-1, -2 のチロシンリン酸化も増強していた。特に IRS-2 に関しては、12C 群でイムノブロット解析によるバンドが検出不可能であり、PF 摂取による効果が IRS-1 の場合よりも顕著であった。IRS-1 ノックアウトマウスでは、骨格筋でインスリン抵抗性を示すがこれは IRS-2 の発現量が少ないために IRS-1 の代償が十分にできないためと考えられている。それに対して IRS-2 の発現量が豊富な肝臓では、IRS-2 によるインスリン作用の代償が十分可能なのでインスリン抵抗性を示さないことが報告されている(Yamauchi, T. et al, 1996)。このことから、肝臓のインスリン作用における IRS-2 の重要性が示唆されたが、本章においてもタンパク質栄養状態によって敏感にその量を変動させてインスリン情報伝達系を制御する因子として、肝臓では IRS-2 が非常に重要であることが示唆された。肝臓における IRS-1 量

の増加は、絶食や STZ 投与による I 型糖尿病の場合に観察されており、血中インスリン濃度の低下により引き起こされる可能性が示唆されている(Saad, M. J. *et al*, 1992)。したがって、PF 摂取による血中インスリン濃度の低下が肝臓 IRS-1 量の増加に関与している可能性は十分考えられる。よって、タンパク質栄養状態により変動する血中アミノ酸が IRS-1 量の変動に重要であると判断するためには、更なる検討を要する。さらに、先に示した Reis らによると、8 週間という長期間の低タンパク質食給餌で IRS-1 量は変動せず、インスリン依存性チロシンリン酸化が増強していた(Reis, M. A. B., *et al*, 1997)ことから、IRS-1 のインスリン感受性の上昇が推察される。しかし、本章では PF 摂取による IRS-1 のチロシンリン酸化量の増加は、IRS-1 量の増加を伴っており、IRS-1 のインスリン応答性は 12C 群に比べて弱い上昇傾向を示したにすぎなかった。このことは、低タンパク質栄養状態の継続期間による IRS-1 の応答性の違いによるものかもしれない。

### 3. タンパク質栄養状態の悪化が骨格筋 IRS-1 の量、セリンリン酸化およびインスリン感受性に与える影響

骨格筋では肝臓とは異なり PF 摂取により IRS-1 量が減少した。それにも関わらず骨格筋全体でのインスリン依存性チロシンリン酸化は増強傾向を示した。よって骨格筋 IRS-1 は PF 摂取によってインスリン感受性が亢進することが明らかになった。Reis らの報告では肝臓と同様に、長期間の低タンパク質食給餌で IRS-1 量は変動せず、インスリン依存性チロシンリン酸化が増強していた(Reis, M. A. B. *et al*, 1997)。長期間の低タンパク質栄養状態ではいずれの組織においても IR や IRS-1 量の変動が観察されなかったことから、1 週間程度でいったん IR や IRS-1 量が増加するものの、徐々に体が低タンパク質栄養状態に適応してきて、8 週間くらい経過するともとの量にまで回復してしまうのかもしれない。あるいは、無タンパク質食と低タンパク質食への応答は根本的に異なっている可能性もある。

本章ではさらに、骨格筋での PF 摂取による IRS-1 のインスリン感受性の上昇には、IRS-1 のセリンリン酸化量の減少が関与していることも明らかにした。この結果は、アミノ酸が IRS-1 のインスリンにより誘導されるセリンリン酸化を助長するという培養細胞系での知見と一致する(Takano, A. *et al*, 2001、Tremblay, F. *et al*, 2001)。

IRS-1 には多くのセリンリン酸化部位が存在し、どの部位がタンパク質栄養状態によってリン酸化されたり脱リン酸化されたりするのか特定するのは難しいが、少なくとも

Ser612 が食餌タンパク質の影響を受けることも明らかにした。Ser612 は、PI3 キナーゼのSH2ドメインと結合するサイトの近傍に位置しており、Ser612 がリン酸化されるとPI3 キナーゼとの結合が阻害され、PI3 キナーゼの活性化が抑制されることが明らかになっている(Mothe, I. *et al*, 1996)。本章においても同様に、PI3 キナーゼの下流に位置するAkt1/PKB $\alpha$ のリン酸化も12C群に比べてPF群で増強していたことから、PF摂取によりIRS-1のSer612を含むセリン残基のリン酸化が減少することによって、PI3 キナーゼの活性化が促進して、さらにAKT/PKBの活性化も亢進したと考えられる。また、ホルボールエステルによるPKCの活性化によりIRS-1のインスリン依存性チロシンリン酸化が抑制されることが明らかになっていたが(Chin, J. E., *et al*, 1994)、Ser612をAlaに替えた変異体を発現させた293細胞を用いた研究で、PKCの活性化によりIRS-1のSer612がリン酸化されて、それが起因してIRS-1のインスリン感受性の低下が起こるということが明らかになった(De Fea, K., *et al*, 1997 a)。しかし、このセリン残基を含んだ配列はPKCが認識するコンセンサス配列ではないので、直接PKCがSer612をリン酸化するとは考えにくい。それに対してSer612を含んだPro-X-Ser-Pro配列はMAPキナーゼファミリーが認識するコンセンサス配列なので(Kennelly, P. J. *et al*, 1991)、MAPキナーゼによるSer612のリン酸化が予想された。そして同じDe Feaらの研究により、PKC  $\rightarrow$  ERK2  $\rightarrow$  Ser612のリン酸化が示され、ERK2がIRS-1のSer612をリン酸化するキナーゼの候補に挙げられた(De Fea, K. *et al*, 1997 b)。本章において、骨格筋のERK1/2がタンパク質栄養状態により変動するかどうか検討したが、食餌タンパク質の影響は観察できなかった。したがって、12C摂取によりリン酸化されるSer612にはERK1/2以外のキナーゼの関与が考えられる。タンパク質栄養状態によって変化するIRS-1のセリンリン酸化がどのような因子を介して制御されているかは全く未知であり、更なる検討が必要である。

さらに、PF摂取による骨格筋IRS-1量の減少が観察された。IRS-1量の減少に関しては、絶食やSTZによるI型糖尿病で同様に観察され、肝臓におけるIRS-1量の増加と同様、血中インスリン濃度の低下の寄与が示唆されていた(Saad, M. J. A. *et al*, 1992)。よって、この現象もPF摂取による血中インスリン濃度の低下の関与が考えられる。しかし、hyperinsulinemiaや肥満等から誘導されるインスリン抵抗性においてもIRS-1量の減少が確認されている(Saad, M. J. A. *et al*, 1992、Kerouz, N. K. *et al*, 1997)。また、IRS-1はセリンリン酸化の増加により分解が誘導され、それはユビキチン-プロテアソーム系を介することが報告されている(Sun, X. J. *et al*, 1999、Haruta, T. *et al*, 2000、Pederson, T. M.

*et al*, 2001)。しかし、PF 摂取では IRS-1 のセリンリン酸化が減少しており、この現象と矛盾する。したがって、PF 摂取による IRS-1 量の減少は、セリンリン酸化以外の因子により制御されていることが考えられる。

#### 4. インスリン刺激時間に依存した骨格筋 IRS-1 のセリンリン酸化の増加

現時点までの IRS-1 のセリンリン酸化に関する研究は、主に培養細胞系で行われており、生体系での知見はほとんどない。IRS-1 のセリンリン酸化は、インスリンによる長時間刺激によっても増加することが知られている(Paz, K. *et al*, 1999、Haruta, T. *et al*, 2000、Liu, Y. F. *et al*, 2001)。この現象は、他の組織由来の細胞においても同様に観察されていた。本章第一節において肝臓と骨格筋での IRS-1 のインスリン刺激による時間的变化を検討したところ、骨格筋ではインスリンの刺激時間が長くなるほど SDS-PAGE における IRS-1 の泳動度が減少していき、セリンリン酸化の増加が観察された。一方、肝臓ではそのような現象が観察されなかった。このことから、肝臓と骨格筋では IRS-1 の制御機構が異なるであろうことが示唆された。

#### 5. まとめ

以上のように本章では、タンパク質栄養の悪条件に応答して、肝臓および骨格筋では主に IRS を介した異なる制御機構が存在することが示唆された。すなわち、PF 摂取によって肝臓では量の増加、骨格筋ではセリンリン酸化の減少によりインスリン情報伝達系の活性化が誘導された。しかし、これらの現象が、タンパク質栄養状態の悪化に伴う摂食量の減少や血中インスリン濃度の低下により引き起こされている可能性が考えられる。したがって、血中アミノ酸濃度の変動により特異的に起こる現象であるかどうか、さらに検討していく必要がある。