

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

第一章でも示したように、PF 摂取によって食欲の減退による摂食量の低下や血中インスリン濃度の減少が起こる。これらの因子がインスリン情報伝達経路に影響を与えるであろうことは十分に考えられ、これまでに観察されたタンパク質栄養状態の違いによる IR および IRS-1,2 の量的変化およびインスリン依存性チロシンリン酸化の変化に関与している可能性が考えられる。その理由としては、絶食させて hypoinsulinemia 状態にあるラットにインスリンを注入すると、摂食させたラットに比べて肝臓や骨格筋における IR および IRS-1,2 のインスリン依存性チロシンリン酸化、IRS-1,2 と PI3K の会合が増強することが知られている(Saad, M. J. *et al*, 1992, Ito, Y. *et al*, 1997 b, Rojas, F. A. *et al*, 2001)。さらに培養細胞系において、インスリンにより IRS-1 のセリンリン酸化が刺激時間依存的に増加し、引き続き IRS-1 の分解が起こることが示されている(Sun, X. J. *et al*, 1999, Haruta, T. *et al*, 2000, Pederson, T. M. *et al*, 2001, Takano, A. *et al*, 2001)。したがって、これまでに観察された上記の現象に対して、タンパク質栄養状態により変動する血中アミノ酸濃度が直接影響を及ぼしているかどうか、第一章での実験からは判断できない。そこで本章では、まず 12C 群の摂食量を PF 群の摂食量に合わせて飼育した pair-feeding ラットと、streptozotocin (STZ)を投与してインスリン分泌を抑制して I 型糖尿病を発症させたラットを用いて第一章と同様な解析を行い、摂食量および血中インスリン濃度の上記現象への関与の有無を検討した。また、PF 摂取による肝臓での IRS-1,2 量の増加および骨格筋での IRS-1 量の減少が、mRNA レベルの変動を伴うどうか RNase Protection Assay を用いて検討した。また、第一章のイムノブロット法による解析で、その量は検出できなかったがインスリン依存性チロシンリン酸化は PF 摂取により増加した骨格筋の IRS-2 に関しても同様に、mRNA に関して検討した。

さらに、PF 摂取による IRS-1 セリンリン酸化量が減少することを発見したが、どのような因子がこのような変化を仲介しているのかは全く未知である。これまでに、IRS-1 のセリンリン酸化に protein kinase C (PKC)や tumor necrosis factor α (TNF α)の関与が考えられている。そこで、骨格筋での PKC 活性と脂肪組織における TNF α 遺伝子発現について検討した。TNF α に関しては、ELISA 法により血中 TNF α 量の測定を試みたが検出不可能であったため、末梢組織におけるインスリン抵抗性の原因であろうと考えられている脂肪組織の TNF α についての mRNA 量の定量を行うこととした。

第一節 Pair-feeding 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

動物の飼育

「1-2-1 方法」と同様に、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。予備飼育後、ラットを 12C 群、PF 食群の2群に分け、PF 群が10時から18時まで摂食した量と同量の食餌を 12C 群に与える実験を8日間行った。実験期間中、各食餌を10時から18時まで給餌した。実験9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⁻、PF⁻)群とインスリン注入(12C⁺、PF⁺)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、1分後に肝臓を2分後に腓腹筋を摘出し、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の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

「1-2-1 方法」で示したのと同様に行った。

組織からの protein extract の調整

「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。

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。

2-1-2 結果

1. 体重および摂食量変化

Pair-feeding により 12C 群は摂食量が自由摂食させた場合と比べて制限されるので、体重増加も緩やかであった(Fig. 2-1-1 A)。12C 群の9日目の体重が減少してしまっているが、摂食量には問題がなかったことから、前日に PF 群の解剖を行った際に何らかのストレスがかかってしまったためと思われる。PF 群の体重変化は、「1-2-2 結果」と同様に減少した。また、このときの PF 群の摂食量は Fig. 2-1-1 B に示した。

2. Pair-feeding 条件下の 1.5 時間摂食時における血中インスリン濃度

Pair-feeding 条件下で約 1 週間実験食を給餌したラットの 1.5 時間摂食時における門脈および頸動脈血中のインスリン濃度は、共に両群間で同程度であり、その値は、門脈血；12C $37.0 \pm 7.6 \mu\text{U/ml}$, PF $45.9 \pm 9.1 \mu\text{U/ml}$ 、頸動脈血；12C $22.5 \pm 5.8 \mu\text{U/ml}$, PF $24.7 \pm 4.4 \mu\text{U/ml}$ であった(Fig. 2-1-2)。したがって、低タンパク質摂食で報告されているインスリン分泌能の低下は、摂食量の低下に伴うエネルギー不足による障害であると考えられるが、1 週間という短期間では起こらず、長期間摂食し続けることで起こる障害であるとも考えられる。

3. Pair-feeding 条件下での肝臓 IR β の量および自己リン酸化量の変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 β 自己リン酸化

12C 群と PF 群の自己リン酸化量を比較すると、PF 群で 12C 群の約 1.5 倍に増加していたが(Fig. 2-1-3 A 上段)、IR β 量が PF 群で 12C 群の約 1.4 倍に増加していたので(Fig. 2-1-3 A 下段, Fig. 2-1-3 B)、IR β 量あたりの自己リン酸化量は両群間で同程度であった(Fig. 2-1-3 C)。

② インスリン刺激時の IR β 自己リン酸化

12C+群と PF+群の自己リン酸化量は、両群間でほぼ同程度であったが(Fig. 2-1-3 A 上

段)、先にも述べたように PF 群で IR β 量が増加していたため、IR β 量あたりの自己リン酸化量は、PF+群で 12C+群の約 83%まで低下していた(Fig. 2-1-3 C)。

以上の結果から、pair-feeding では 12C 群に自由に食餌を与えていた場合(Fig. 1-2-3) と比べると差が小さくなったが、肝臓での IR β 量の変動に対しては、12C 群と PF 群の摂食量の違いだけでは説明がつかないことが明らかになった。

4. Pair-feeding 条件下での肝臓 IRS-1 の量およびチロシンリン酸化量の変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-群で 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. 2-1-4 A 上段)、IRS-1 量が PF 群で 12C 群の約 1.7 倍に増加していたので(Fig. 2-1-4 A 下段, Fig. 2-1-4 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 倍に増加となっており、その差は顕著でなかった(Fig. 2-1-4 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 1.6 倍に増加していたが(Fig. 2-1-4 A 上段)、IRS-1 量も PF 群で増加していたので、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. 2-1-4 C)。

以上の結果、肝臓における IRS-1 量の変動に関しても肝臓の IR β 量の変動と同様に、pair-feeding では 12C 群と PF 群の差が小さくなったが、PF 摂取により IRS-1 量が増加するという現象は、摂食量の効果よりむしろ食餌タンパク質の効果であると考えられた。

5. Pair-feeding 条件下での骨格筋 IR β の量および自己リン酸化量の変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 β 自己リン酸化

インスリン無刺激時の骨格筋 IR β 自己リン酸化量(Fig. 2-1-5 A 上段)、IR β 量(Fig. 2-1-5 A 下段, Fig. 2-1-5 B)のいずれも PF 群で 12C 群の約 1.2 倍程度の増加であり、IR β 量あたりの自己リン酸化量は、両群間で差がないという結果になった(Fig. 2-1-5 C)。12C 群を自由

摂食させていた場合にはPF群のIR β 量あたりのチロシンリン酸化量は12C群に比べて低下していたのに対し、pair-feedingでは両群間で同程度であった。このことから12C群に自由摂食させた場合においては、PF群で低下していた摂食量に反映して、PF群でのIR β 量あたりのチロシンリン酸化量が低下したと推察された。

② インスリン刺激時のIR β 自己リン酸化

①のインスリン無刺激時と同様に、12C+群とPF+群のIR β 自己リン酸化量を比較すると、PF+群で12C+群の約1.2倍の微増であったので(Fig. 2-1-5 A 上段)、インスリン刺激後におけるIR β 量あたりの自己リン酸化量も両群間で差はなかった(Fig. 2-1-5 C)。

以上の結果より、12C群に食餌を自由に与えた場合にも骨格筋のIR β 量およびインスリン依存性の自己リン酸化に対する食餌タンパク質の影響は小さかったが(Fig. 1-2-6)、pair-feedingの結果も同様であり、骨格筋IRは食餌タンパク質の影響を受けにくいと考えられた。

6. Pair-feeding条件下での骨格筋IRS-1の量およびチロシンリン酸化量の変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

骨格筋のIRS-1のチロシンリン酸化量(Fig. 2-1-6 A 中段)、IRS-1量(Fig. 2-1-6 A 上段, Fig. 2-1-6 B)ともPF群で12C群の約80%であり、IRS-1量あたりのチロシンリン酸化量には差がなかった(Fig. 2-1-6 C)。

② インスリン刺激時のIRS-1のチロシンリン酸化

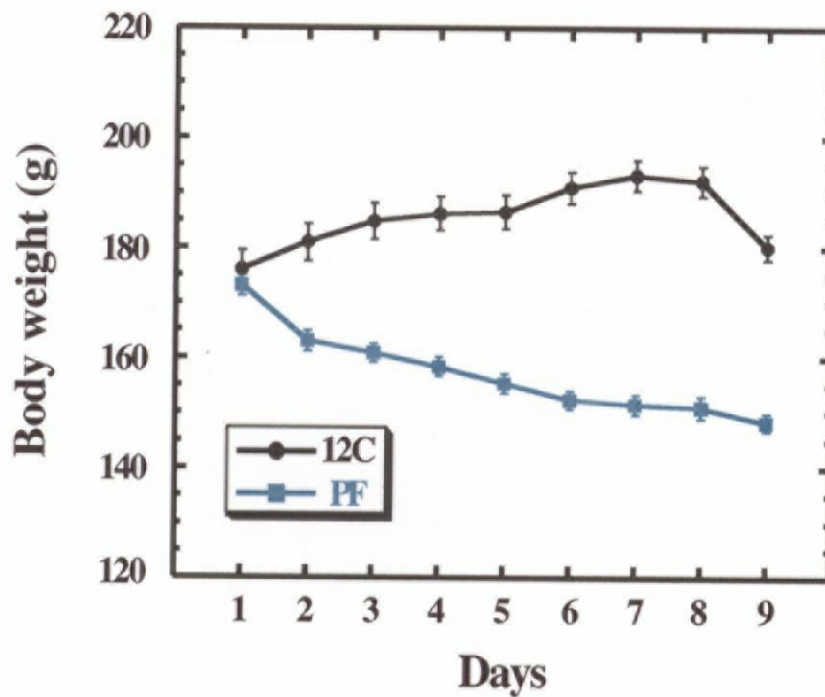
12C+群とPF+群のIRS-1のチロシンリン酸化量は、両群間で同程度であったが(Fig. 2-1-6 A 中段)、PF群でIRS-1量の低下が観察されたので、IRS-1量あたりのチロシンリン酸化量は、PF+群で12C+群の約1.3倍になっていた(Fig. 2-1-6 C)。よって、差は小さいながらも、PF摂取により骨格筋IRS-1のインスリン感受性が上がっていると考えられた。

③ IRS-1 のセリンリン酸化状態

12C 群に自由摂食させていた第一章の結果と比較すると差は小さくなったが、IRS-1 のバンドシフト、すなわち PF 群に比べて 12C 群で IRS-1 の泳動度の減少が観察され(Fig. 2-1-6 A 上段)、さらに Ser612 のリン酸化も 12C 群でのみ観察された(Fig. 2-1-6 A 下段)。

以上の結果より、骨格筋 IRS-1 に関しては、pair-feeding 条件下では 12C 群に自由摂食させていた場合の結果と比べて全体的に差が小さかったものの、自由摂食の場合と同様な傾向が観察された。IRS-1 量、セリンリン酸化状態およびインスリン依存性チロシンリン酸化量の変動は、摂食量の差では説明がつかず、食餌タンパク質の直接的な関与が示唆された。

A Body weight



B Food intake of PF group

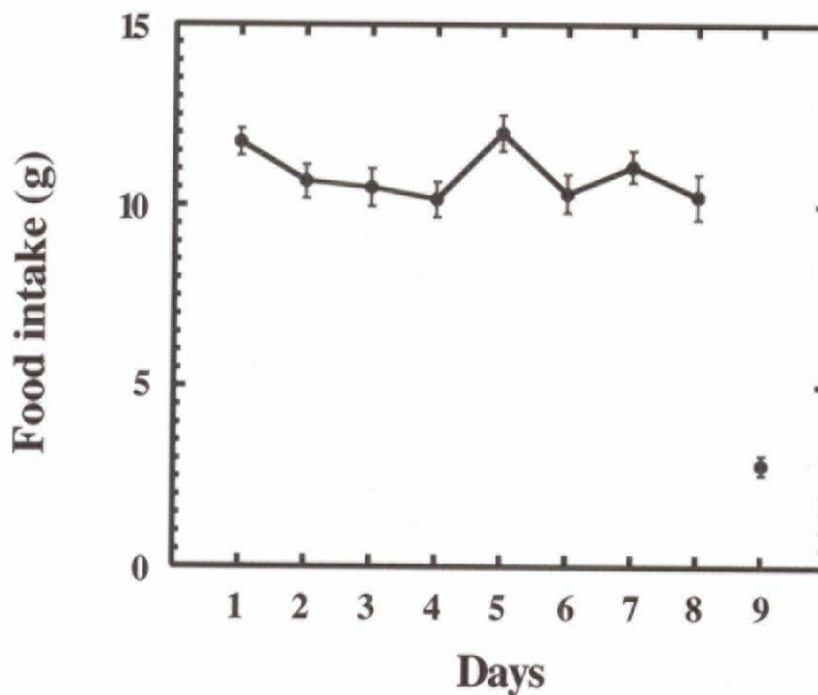
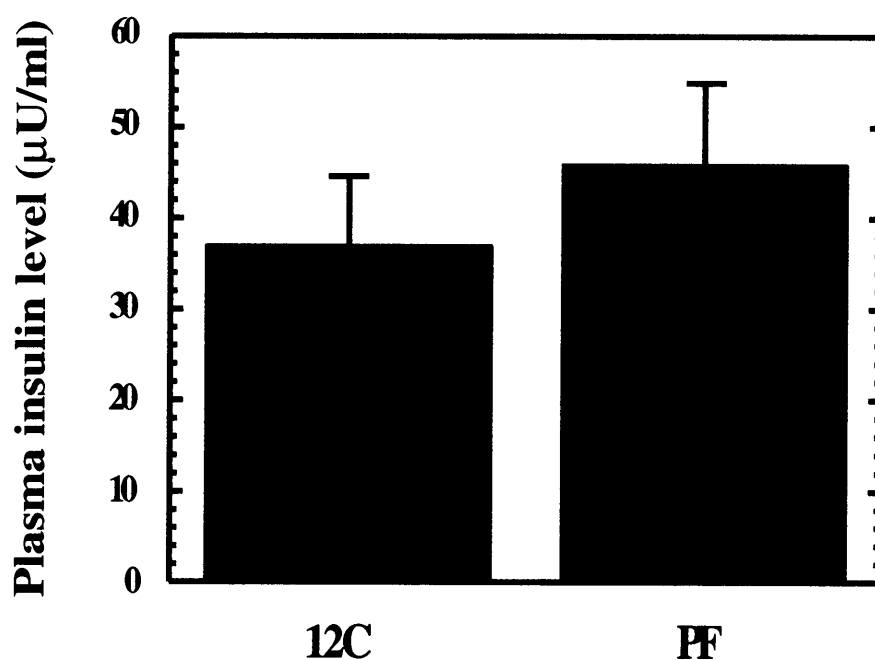


Fig. 2-1-1

Change of body weight and food intake in pair-fed rats.

Data represent the mean \pm S. E. for five rats.

A Portal Vein



B Carotid Artery

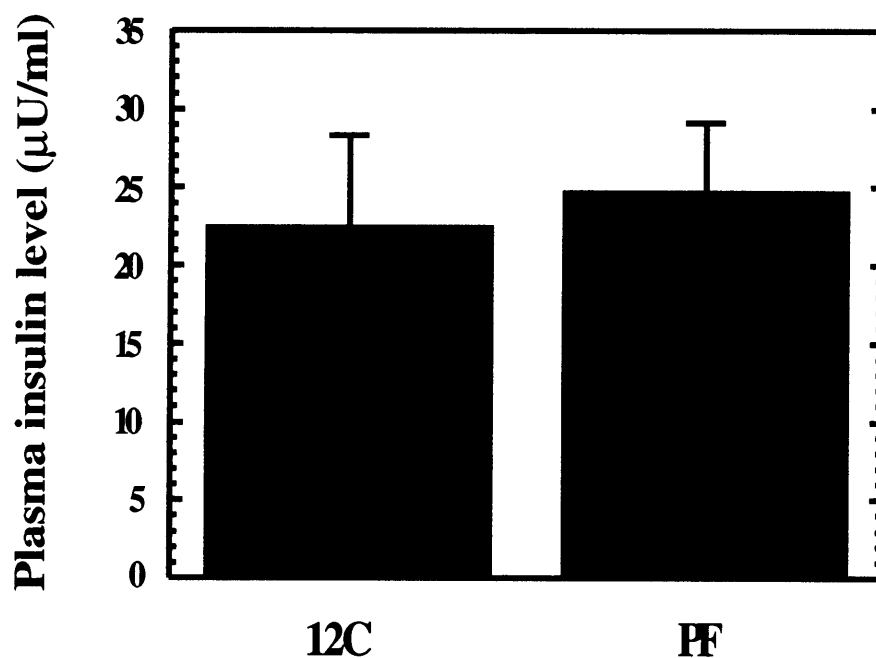


Fig. 2-1-2

Plasma insulin level after feeding for 1.5 h in pair-fed rats.

Data represent the mean \pm S. E. for five rats.

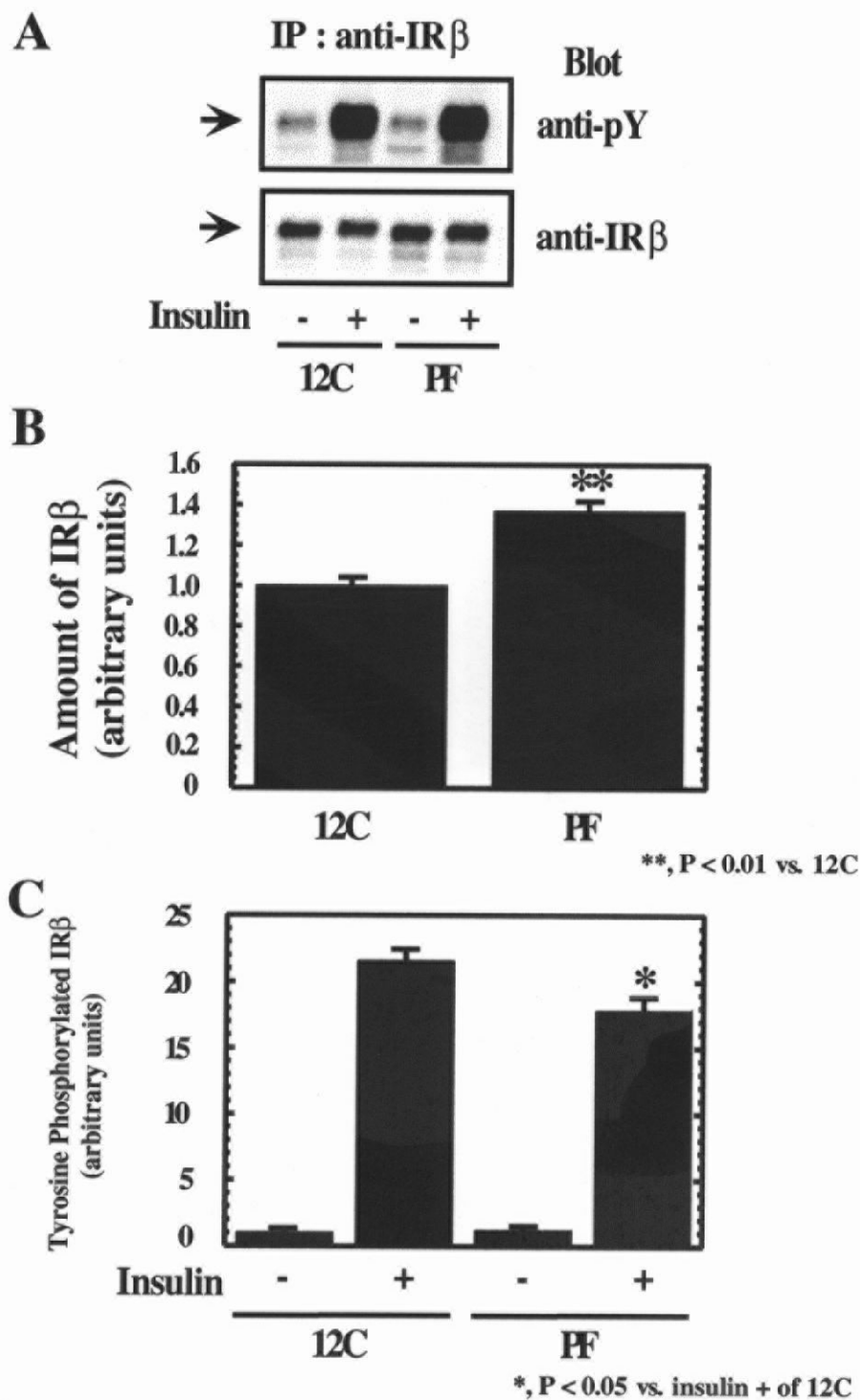


Fig. 2-1-3

Effect of dietary protein on the amount and the insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of insulin receptor β subunit in the liver of pair-fed rats. Rats were fed on 12C or PF for 7 days and injected with vehicle or insulin after being fed on respective diets for 1.5 h. The amount of diet supplied to the 12C-rats that consumed by the PF-rats on previous day.

A : Representative blots of immunoblot analyses.

B : Quantitative analysis for the amount of IR β (n = 10).

C : Quantitative analysis for the tyrosine phosphorylated IR β (n = 5).

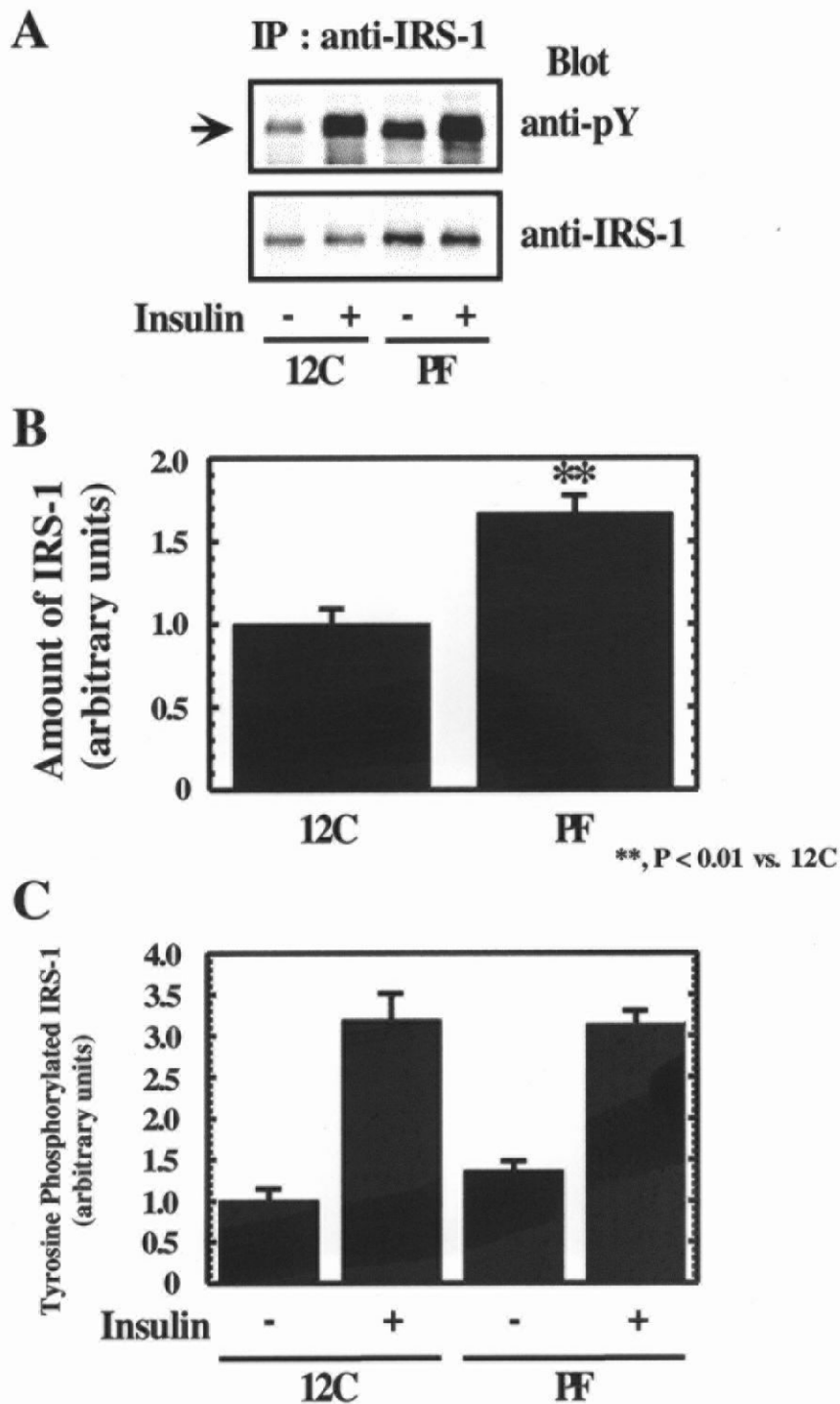


Fig. 2-1-4

Effect of dietary protein on the amount and the insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1 in the liver of pair-fed rats.

Rats were fed on 12C or PF for 7 days and injected with vehicle or insulin after being fed on respective diets for 1.5 h. The amount of diet supplied to the 12C-rats that consumed by the PF-rats on previous 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).

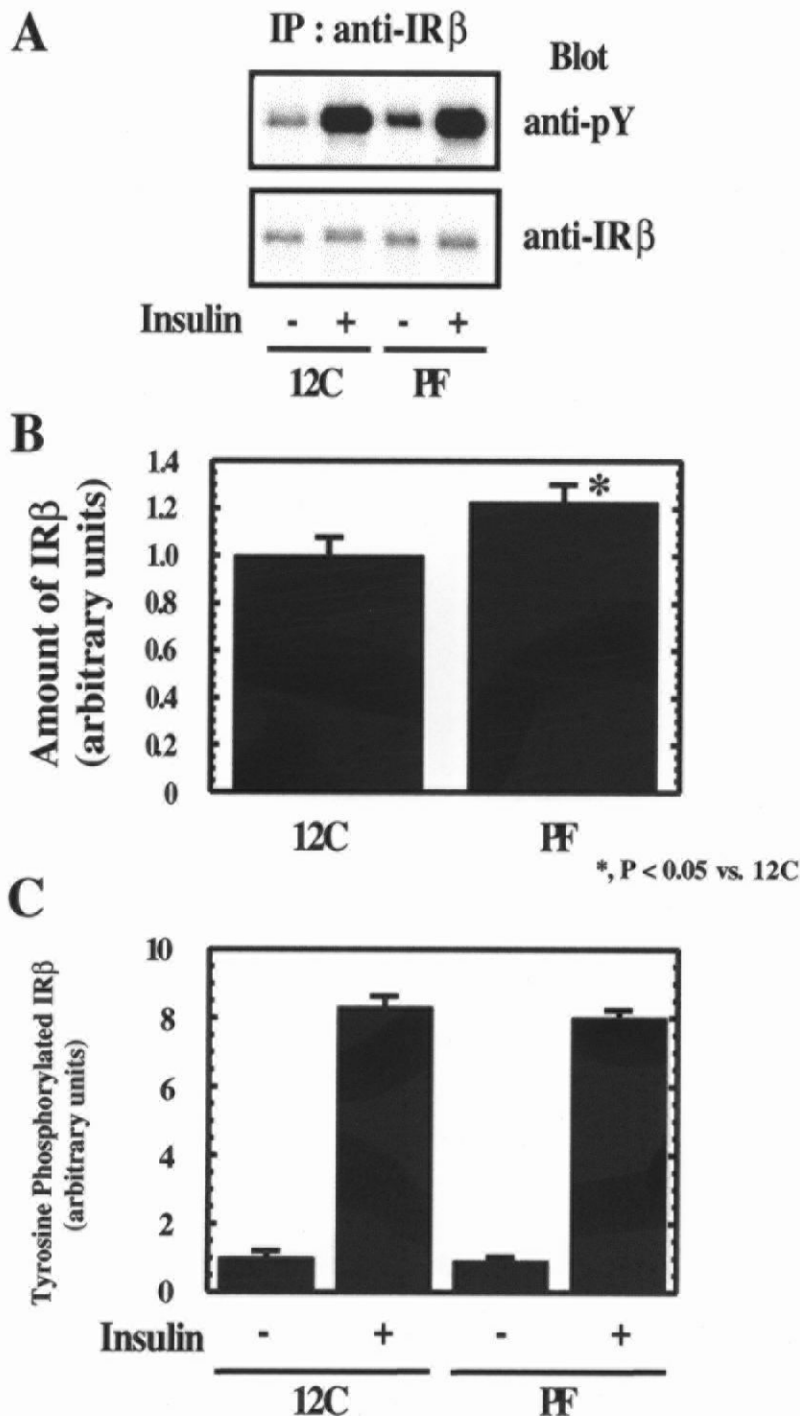


Fig. 2-1-5

Effect of dietary protein on the amount and the insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of insulin receptor β subunit in the skeletal muscle of pair-fed rats. Rats were fed on 12C or PF for 7 days and injected with vehicle or insulin after being fed on respective diets for 1.5 h. The amount of diet supplied to the 12C-rats that consumed by the PF-rats on previous day.

A : Representative blots of immunoblot analyses.

B : Quantitative analysis for the amount of IR β (n = 10).

C : Quantitative analysis for the tyrosine phosphorylated IR β (n = 5).

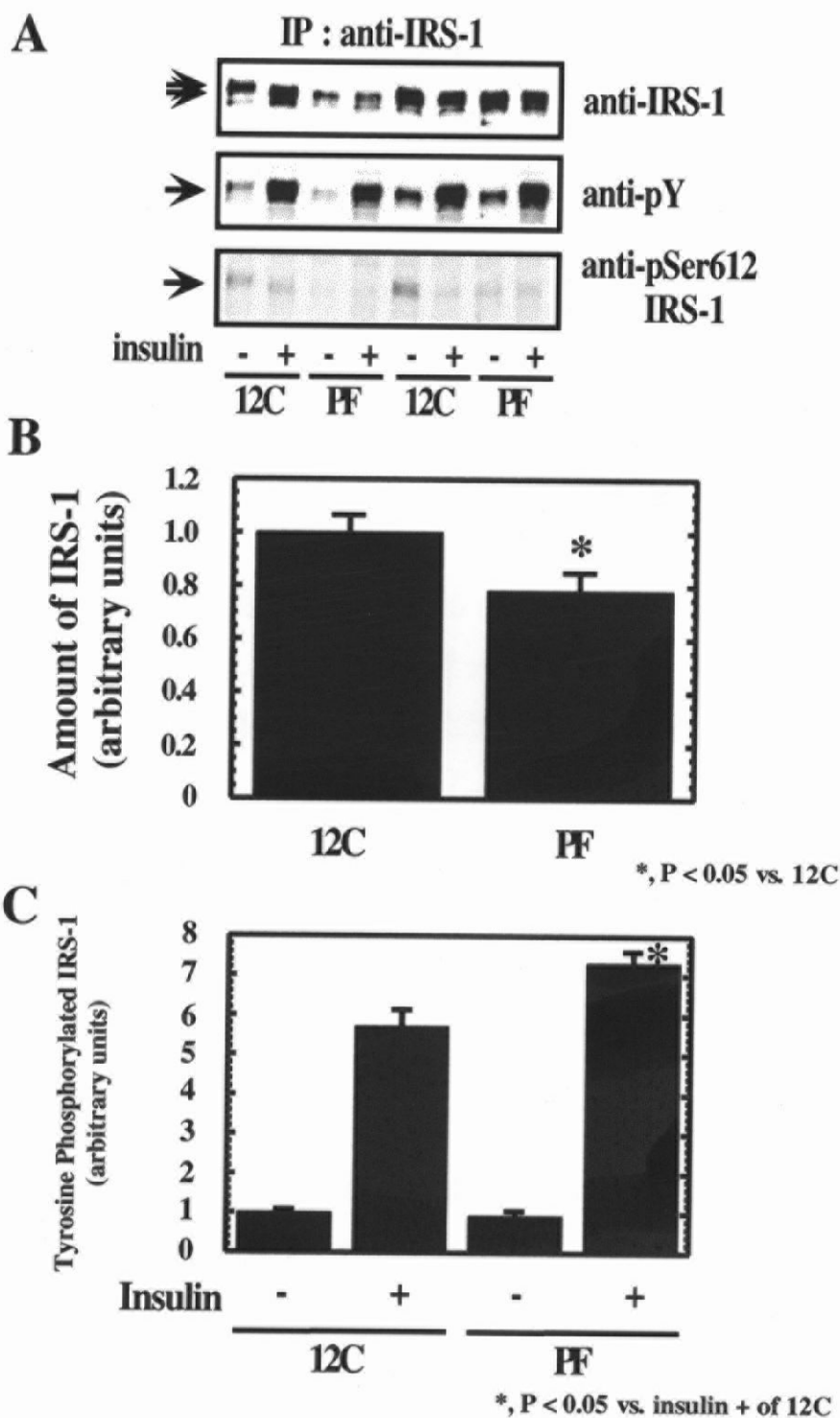


Fig. 2-1-6

Effect of dietary protein on the amount and the insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1 in the skeletal muscle of pair-fed rats.

Rats were fed on 12C or PF for 7 days and injected with vehicle or insulin after being fed on respective diets for 1.5 h. The amount of diet supplied to the 12C-rats that consumed by the PF-rats on previous 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).

第二節 STZ 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

動物の飼育

5 週齢の Wistar 系雄ラット(120~140 g)に 3 日間ペレットを自由摂食させた後、食餌を 12C に切り替えて 7 日間 10 時から 18 時まで給餌した。食餌を 12C に切り替えてから 4 日目の 11 時半(すなわちその日の摂食開始後 1.5 時間)に尾静脈より採血し、血糖値を測定した。その翌日(食餌を 12C に切り替えてから 5 日目)の摂食開始前に、Normal 群(24 頭)と STZ 群(36 頭)に分けた。そして、STZ 群のラットの腹腔内に、50 mM クエン酸バッファー(pH4.5)に溶解した STZ (Sigma)を一匹あたり 65 mg/kg B. W. 投与した。Normal 群のラットにはクエン酸バッファーのみを投与した。STZ 投与して 2 日後に再度尾静脈から採血し血糖値を測定して、糖尿病の発症を確認した。糖尿病発症の確認をした翌日に、さらに各群を 12C 群、PF 群に分けて、実験食期間中も各食餌を 10 時から 18 時まで給餌した。以上の飼育スケジュールは次ページの図にまとめた。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⁻、PF⁻)群とインスリン注入(12C⁺、PF⁺)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/匹)を「1・1・1 方法」で示したように下行大静脈より注入した後、1 分後に肝臓を、2 分後に腓腹筋を摘出し、直ちに液体窒素中で凍結し、後の分析に供するまで-80 °Cで保存した。各群の内訳は以下のとおりである。

Normal-12C ⁻ 群 : 5 頭	STZ-12C ⁻ 群 : 8 頭
Normal-12C ⁺ 群 : 5 頭	STZ-12C ⁺ 群 : 7 頭
Normal-PF ⁻ 群 : 6 頭	STZ-PF ⁻ 群 : 7 頭
Normal-PF ⁺ 群 : 6 頭	STZ-PF ⁺ 群 : 8 頭

また、全てのラットから尾静脈より、インスリン非注入群からは頸動脈より採血した。尾静脈血は血糖値測定用に、頸動脈血はインスリン濃度測定用にした。ヘパリン血漿は氷冷後、遠心分離(3,000×g, 10 min, 4 °C)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 °Cで保存した。

増加した。実験開始後、12C 群は徐々に体重増加していくのに対し、PF 群では実験食に切り替えた翌日より顕著に体重が減少し、その後も緩やかに減少した。一方 STZ 群では、STZ 投与した後の体重はほとんど変動せず、実験開始後 STZ-12C 群では、Normal-12C 群に比べてその増加の程度は小さいが、体重増加が観察された。実験開始後の STZ-PF 群では Normal-PF 群と同様に体重がゆるやかに減少した。

摂食量は STZ 投与 2 日前(-5 日目)から示した(Fig. 2-2-1 B)。Normal 群では 12C 摂取により徐々に摂食量が増えたが、PF 群は実験食に切り替えた日から 12C 群に比べて有意に減少し、その後やや減少した。一方、STZ 投与群では STZ 投与日の摂食量が Normal 群に対して顕著に減少しており、その後 2 日間の摂食量は変化しなかった。実験食期間中、STZ-12C 群では次第に摂食量が増加し、Normal-12C 群より摂食量が増加した。それに対して STZ-PF 群では、実験食開始後も摂食量はほぼ変化しなかった。

2. 血糖値の変化

血糖値は 1.5 時間摂食時に測定し、STZ 投与前(Fig. 2-2-2 A)、STZ 投与後 2 日目(Fig. 2-2-2 B)および解剖当日(Fig. 2-2-2 C)について結果を示した。STZ 投与前では、どの群の血糖値も約 170 mg/dl と同程度であった。STZ 投与後 2 日目では、Normal 群の血糖値は約 160 mg/dl であったのに対し、STZ 群では約 600 mg/dl であり、Normal 群に対して顕著に血糖値が上昇しており、糖尿病の発症が確認できた。解剖当日では、Normal 群の血糖値は約 160 mg/dl であったのに対し、STZ-12C 群は顕著に血糖値は高かった。ところが、STZ-PF 群では血糖値が非常に高かった 15 頭中 4 頭を除いた値は約 180 mg/dl であり、いったん糖尿病発症により血糖値が上昇したものの、血中グルコースの消去能を上昇させるような何らかの機構が働いて血糖値が正常値に近い値まで回復したものと考えられる

3. 血中インスリン濃度

血中インスリン濃度については、各群のインスリン非注入群の解剖時(1.5 時間摂食後)の頸動脈血中の濃度を示した(Fig. 2-2-3)。Normal-PF 群の血中インスリン濃度は Normal-12C 群の約 45%にまで顕著に低下していた。また、Normal-12C 群と STZ 両群では、有意に STZ 群で低下していた。Normal-PF 群と STZ 両食餌群間には有意な差はなかったが、Normal-PF 群に比べて STZ 両群の方が血中インスリン濃度は低かった。

今回の実験では、STZ 投与群の血中インスリン濃度は通常 STZ 投与後に見られる例と

比較すると高めになっているが、本実験の目的は I 型糖尿病の影響の解析ではなく、食餌群間における血中インスリン濃度の違いの影響を排除することであったため、その目的には合致していると判断して、以下の解析を行った。

4. STZ 投与ラットにおける肝臓 IR β の量および自己リン酸化の変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 β 自己リン酸化

インスリン無刺激群間で Normal 群と STZ 群の IR β 自己リン酸化量を比較すると(Fig. 2-2-4 A 上段)、STZ のインスリン無刺激両食餌群では Normal のインスリン無刺激両食餌群の約 30%低下していた。STZ-12C-群と STZ-PF-群を比較すると、Normal 群の場合と同様に、STZ-PF-群では STZ-12C-群の約 1.4 倍に増加していた。さらに IR β 量は、STZ 群では Normal 群と同様に 12C 群に比べて PF 群で増加していた(Normal-PF 群は Normal-12C 群の約 1.6 倍, STZ-PF 群は STZ-12C 群の約 1.3 倍, Fig. 2-2-4 A 下段, Fig. 2-2-4 B)。したがって、IR β 量あたりの自己リン酸化量は STZ のインスリン無刺激両食餌群では Normal のインスリン無刺激両食餌群の約 45%低下していたが、STZ 群間の食餌による差は観察されなかった(Fig. 2-2-4 C)。

② インスリン刺激時の IR β 自己リン酸化

STZ-12C+群と STZ-PF+群の IR β 自己リン酸化量を比較すると(Fig. 2-2-4 A 上段)、Normal 群で観察されたのと同様に STZ-PF+群では STZ-12C+群の約 1.3 倍に増加していた。先にも述べたように、IR β 量も STZ-12C 群に比べて STZ-PF 群で増加していたので、IR β 量あたりの自己リン酸化量は Normal 群と同様に STZ 群間の食餌による差は観察されなかった。(Fig. 2-2-4 C)。

以上の STZ 投与ラットを用いた実験より、肝臓 IR β 量の変動は Normal 群と同様に観察され、食餌により変動する循環血中インスリン濃度の関与は小さく、食餌タンパク質の影響が大きいということが明らかになった。

5. STZ 投与ラットにおける肝臓 IRS-1 の量およびチロシンリン酸化の変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

インスリン無刺激群間で Normal 群と STZ 群の IRS-1 チロシンリン酸化量を比較すると(Fig. 2-2-5 A 上段)、IR β の場合と同様に STZ のインスリン無刺激両食餌群では Normal のインスリン無刺激両食餌群の約 30%低下していた。STZ-12C-群と STZ-PF-群を比較すると、Normal 群の場合と同様に、STZ-PF-群では STZ-12C-群の約 1.7 倍に増加していた。IRS-1 量に関しても、Normal 群の場合と同様に STZ-12C 群に比べて STZ-PF 群では約 1.7 倍に増加していた(Fig. 2-2-4 A 下段, Fig. 2-2-4 B)。よって、IRS-1 量あたりのチロシンリン酸化量は、Normal 群と同様に、STZ-12C-群と STZ-PF-群間で同程度であった(Fig. 2-2-5 C)。

② インスリン刺激時の IRS-1 のチロシンリン酸化

STZ-12C+群と STZ-PF+群の IRS-1 自己リン酸化量を比較すると(Fig. 2-2-4 A 上段)、Normal 群で観察されたのと同様に(Normal-PF+群で Normal-12C+群の約 2.4 倍に増加)、STZ-PF+群では STZ-12C+群の約 1.8 倍に増加していた。IRS-1 量は Normal 群および STZ 群の PF 群で増加していたので、IRS-1 量あたりのチロシンリン酸化量は、Normal 群と同様な傾向を示し、STZ-PF+群では STZ-12C+群の約 1.3 倍に増加していたが、有意な差ではなかった。このときの Normal-PF+群は Normal-12C+群の約 1.5 倍に増加しており、その差は有意であった(Fig. 2-2-5 C)。

以上の STZ 投与ラットを用いた実験より、IR β 量の変動と同様に肝臓 IRS-1 量は食餌により変動する循環血中インスリン濃度の関与は低く、食餌タンパク質の影響を受けて変動するということが裏づけられた。また、IRS-1 のインスリン依存性チロシンリン酸化が PF 摂取により増加傾向を示すということも、血中インスリン濃度の影響は少なく、主にタンパク質栄養の影響を受けて起こる現象であることが明らかになった。

6. STZ 投与ラットにおける骨格筋 IR β の量および自己リン酸化の変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 β 自己リン酸化

Normal のインスリン無刺激両食餌群間で IR β 自己リン酸化量を比較すると、Normal-PF \cdot では Normal-12 \cdot の約 35%低下していたのに対し、STZ のインスリン無刺激両食餌群間で IR β 自己リン酸化量を比べると食餌による差は認められなかった(Fig. 2-2-6 A 上段)。IR β 量に関しては、Normal 群および STZ 群ともに 12C 摂取に比べて PF 摂取でやや増加していたが、各々有意差はなかった(Fig. 2-2-6 A 下段, Fig. 2-2-6 B)。したがって、IR β 量あたりの自己リン酸化量は、Normal のインスリン無刺激両食餌群間で比較すると Normal-PF \cdot では Normal-12C \cdot の約 40%低下していたのに対し、STZ のインスリン無刺激両食餌群間では同程度であった(Fig. 2-2-6 C)。本章第一節の結果から、骨格筋 IR はインスリン無刺激状態では血中インスリン濃度に応答するであろうことが推察された。Fig. 2-2-6 の結果についても、Normal 群では PF 摂取による血中インスリン濃度の低下に依存して IR β 自己リン酸化量も低下し、STZ 群では 12C 群と PF 群の血中インスリン濃度は同程度であったために、IR β 自己リン酸化量も同程度であったと考えられる。

② インスリン刺激時の IR β 自己リン酸化

STZ-12C+群と STZ-PF+群の IR β 自己リン酸化量を比較すると、STZ-PF+群でやや増加傾向を示していたが(STZ-12C 群の約 1.2 倍に増加 : Fig. 2-2-6 A 上段)、IR β 量も STZ-PF 群でやや増加していたので(STZ-12C 群の約 1.3 倍に増加 : Fig. 2-2-6 B)、IR β 量あたりの自己リン酸化量は両群間で同程度であった(Fig. 2-2-6 C)。

以上の結果から、骨格筋 IR は、STZ 投与ラットにおいても、12C 群に自由摂食させた場合や Pair-feeding の場合と同様に食餌タンパク質の影響は小さかったので、食餌タンパク質の影響を受けにくいと考えられた。

7. STZ 投与ラットにおける骨格筋 IRS-1 の量およびチロシンリン酸化の変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

Normal のインスリン無刺激両食餌群間で IRS-1 チロシンリン酸化量を比較すると、

Normal-PF-では Normal-12C-の約 45%低下していたのに対し、STZ のインスリン無刺激両食餌群間で IR β 自己リン酸化量を比べると両群間で同程度であった(Fig. 2-2-7 A 中段)。IRS-1 量に関しては、Normal 群では PF 群で 12C 群の約 40%減少していたのに対し、STZ 群では PF 群で 12C 群の約 20%減少していたが、有意な差はなかった(Fig. 2-2-7 A 上段, Fig.2-2-8 B)。したがって、IRS-1 量あたりのチロシンリン酸化量に関しては、Normal 群および STZ 群のインスリン無刺激両食餌群間では同程度であった(Fig. 2-2-7 C)。

② インスリン刺激時における IRS-1 のチロシンリン酸化

STZ-12C+群と STZ-PF+群の IRS-1 のチロシンリン酸化量を比較すると、STZ-PF+群で STZ-12C+群の約 1.3 倍に増加していたが(Fig. 2-2-7 A 中段)、先に述べたように IRS-1 量も STZ-PF 群で減少傾向であったので(Fig. 2-2-7 B)、IRS-1 量あたりのチロシンリン酸化量は STZ-PF+群で STZ-12C+群の約 1.8 倍に有意に増加していた(Fig. 2-2-7 C)。これらは Normal 群と同様な結果と言える。

③ IRS-1 の量とセリンリン酸化状態

IRS-1 量に関して、PF 摂取による減少程度は STZ 投与により小さくなっていた(Fig. 2-2-7 A 上段, Fig. 2-2-7 B)。また、Normal-12C 群と STZ-12C 群を比較すると、有意な差ではないものの STZ-12C 群で Normal-12C 群の約 20%減少していた。したがって、PF 摂取による骨格筋 IRS-1 の減少には血中インスリン濃度の影響が大きいと考えられる。

IRS-1 のセリンリン酸化状態に関しては、IRS-1 のバンドシフト、すなわち PF 群に比べて 12C 群での IRS-1 の泳動度の減少は STZ 群でも差は小さいながらも観察された(Fig. 2-2-7 A 上段)。Ser612 のリン酸化も、12C 群では Normal 群および STZ 群とも明確に検出されたが、PF 群では STZ 処理の有無に関わらず非常に低レベルであった(Fig. 2-2-7 下段)。

以上の STZ 投与ラットの結果より、骨格筋 IRS-1 に関しては、そのインスリン依存性チロシンリン酸化およびセリンリン酸化は血中インスリン濃度の影響よりも食餌タンパク質の影響の方が大きいということが考えられた。IRS-1 のセリンリン酸化については、Normal 群に比べて STZ 群では、12C 摂食による IRS-1 の泳動度の減少程度が小さかったことから、Ser612 以外の他のセリン残基のリン酸化に関して、血中インスリン濃度が関

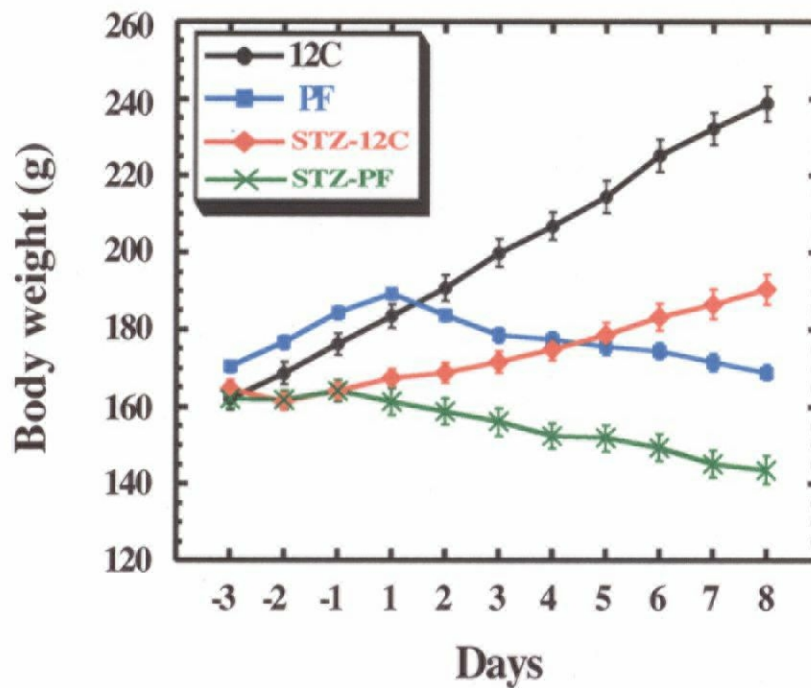
与している可能性が考えられた。一方、IRS-1 量の変動には血中インスリン濃度の変動が大きく、循環血中インスリン濃度が低下すると IRS-1 量が低下するということが明らかになった。

8. STZ 投与ラットにおける肝臓および骨格筋 IRS-2 の量およびチロシンリン酸化の変化に対する食餌タンパク質の影響

肝臓の IRS-2 に関しては、Normal 群と同様に STZ 群でも、PF 群でのみチロシンリン酸化が観察でき、インスリン刺激によりそのチロシンリン酸化は増強していた(Fig. 2-2-8 A 上段)。さらに、PF 摂取による IRS-2 のチロシンリン酸化量の増加はそのタンパク質量の増加を伴っていた(Fig. 2-2-8 A 下段)。したがって、第一章で観察された肝臓 IRS-2 に関する変化は、循環血中インスリン濃度の影響は低く、食餌タンパク質の影響が大きいということが示された。

一方、骨格筋の IRS-2 に関しては、Normal 群では PF 群でのみインスリン依存性チロシンリン酸化が観察された。STZ 群では PF 群より程度は小さいが 12C 群でもインスリン依存性チロシンリン酸化が観察された(Fig. 2-2-8 B)。ここでも、IRS-2 量についても検討したが、イムノブロット法では検出できなかった。したがって、骨格筋 IRS-2 のインスリン依存性チロシンリン酸化の変化に対しては、食餌タンパク質だけでなく血中インスリン濃度の影響も関与しており、循環血中インスリン濃度が低くなると IRS-2 のインスリン依存性チロシンリン酸化が増加することが示された。

A Body weight



B Food intake

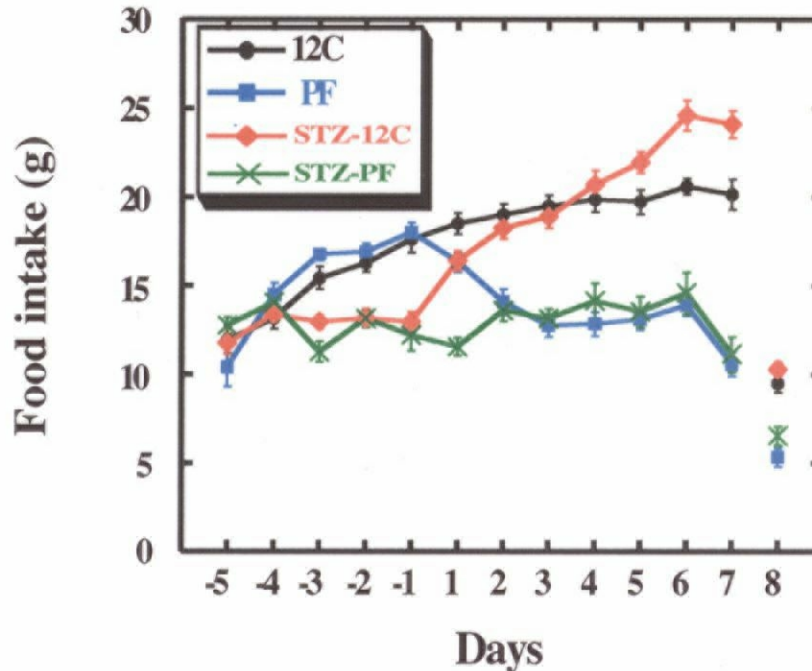


Fig. 2-2-1

Change of body weight and food intake of STZ-treated rats.

12C; n=10, PF; n=12, STZ-12C; n=15, STZ-PF; n=15

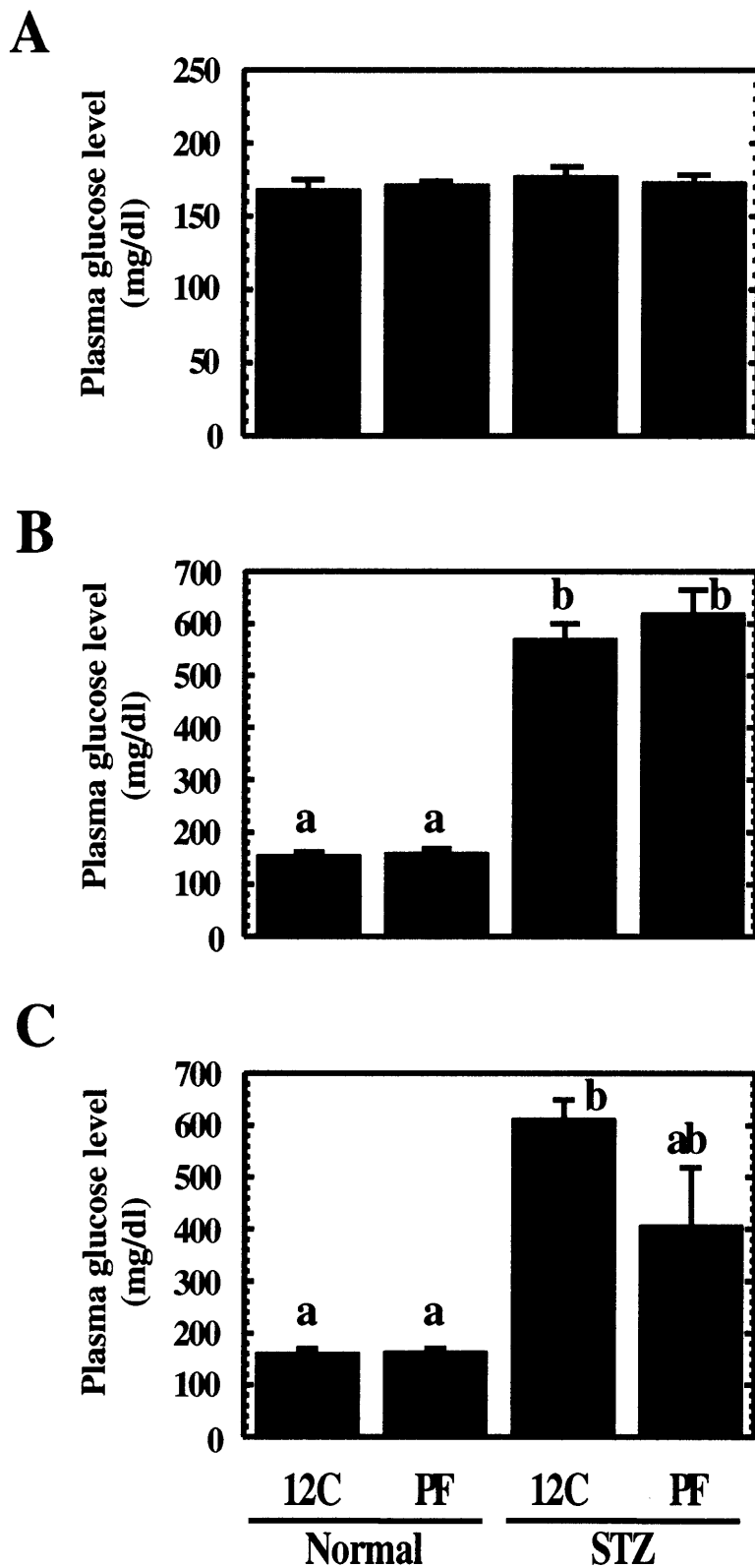


Fig. 2-2-2
Plasma glucose level of normal and STZ-treated rats after feeding for 1.5 h.

A : Before STZ injection. B : After 2 days of STZ injection. C : At sacrifice.

12C; n=10, PF; n=12, STZ-12C; n=15, STZ-PF; n=15

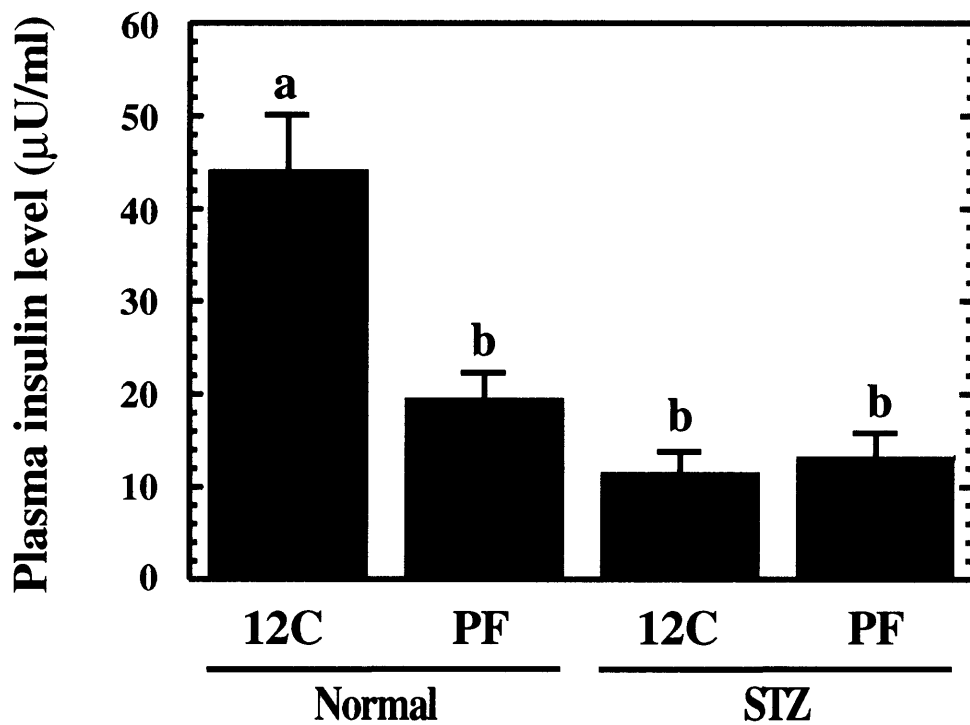


Fig. 2-2-3
Plasma insulin of level normal and STZ-treated rats
after feeding for 1.5 h.

12C; n=10, PF; n=12, STZ-12C; n=15, STZ-PF; n=15

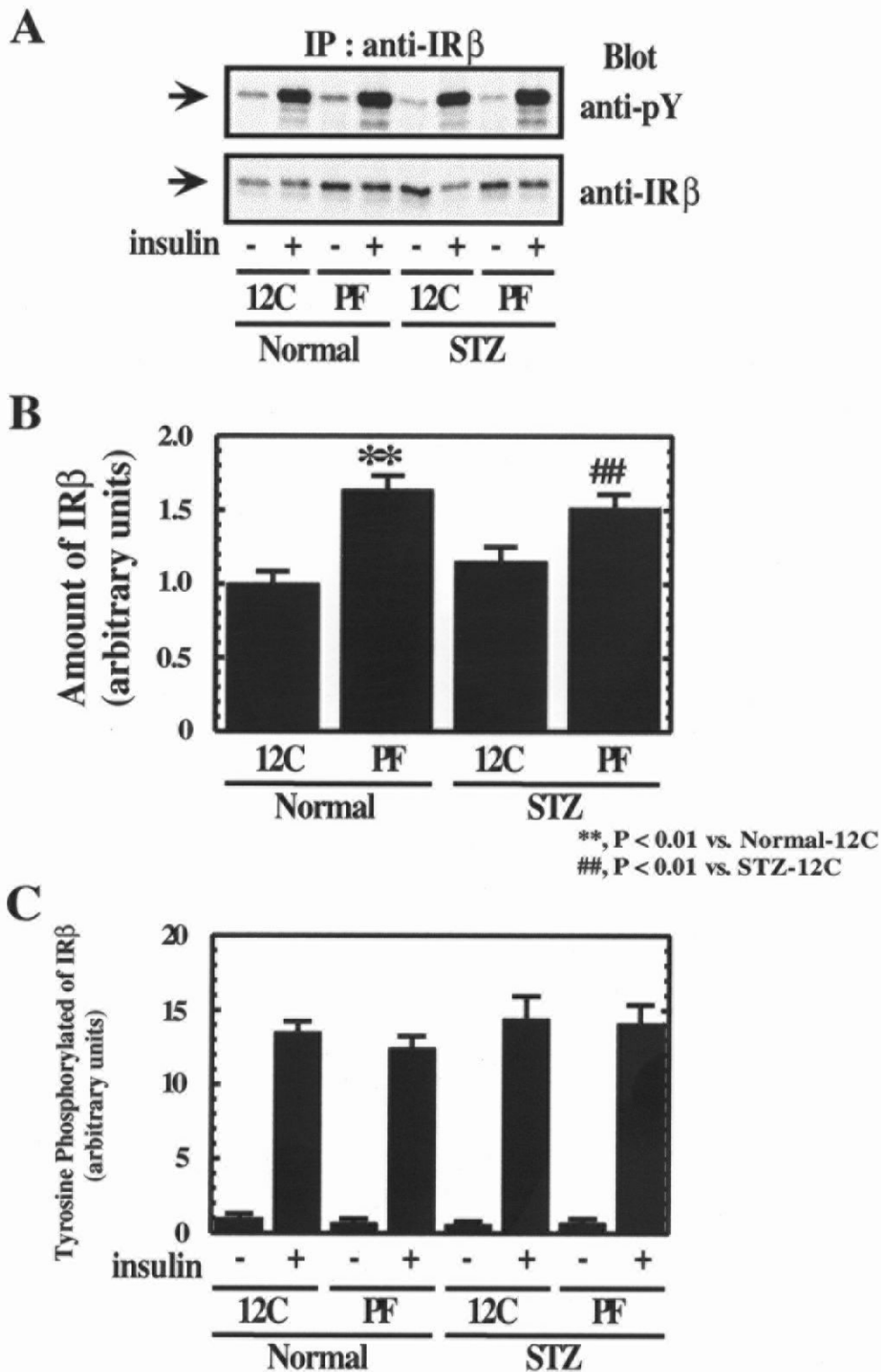


Fig. 2-2-4

Effect of dietary protein on the amount and the insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of insulin receptor β subunit in the liver of STZ-treated rats.

A : Representative blots of immunoblot analyses.

B : Quantitative analysis for the amount of IR β

C : Quantitative analysis for the tyrosine phosphorylated IR β

12C-; n=5, 12C+; n=5, PF-; n=6, PF+; n=6, STZ-12C-; n=8, STZ-12C+; n=7
 STZ-PF-; n=7, STZ-PF+; n=8

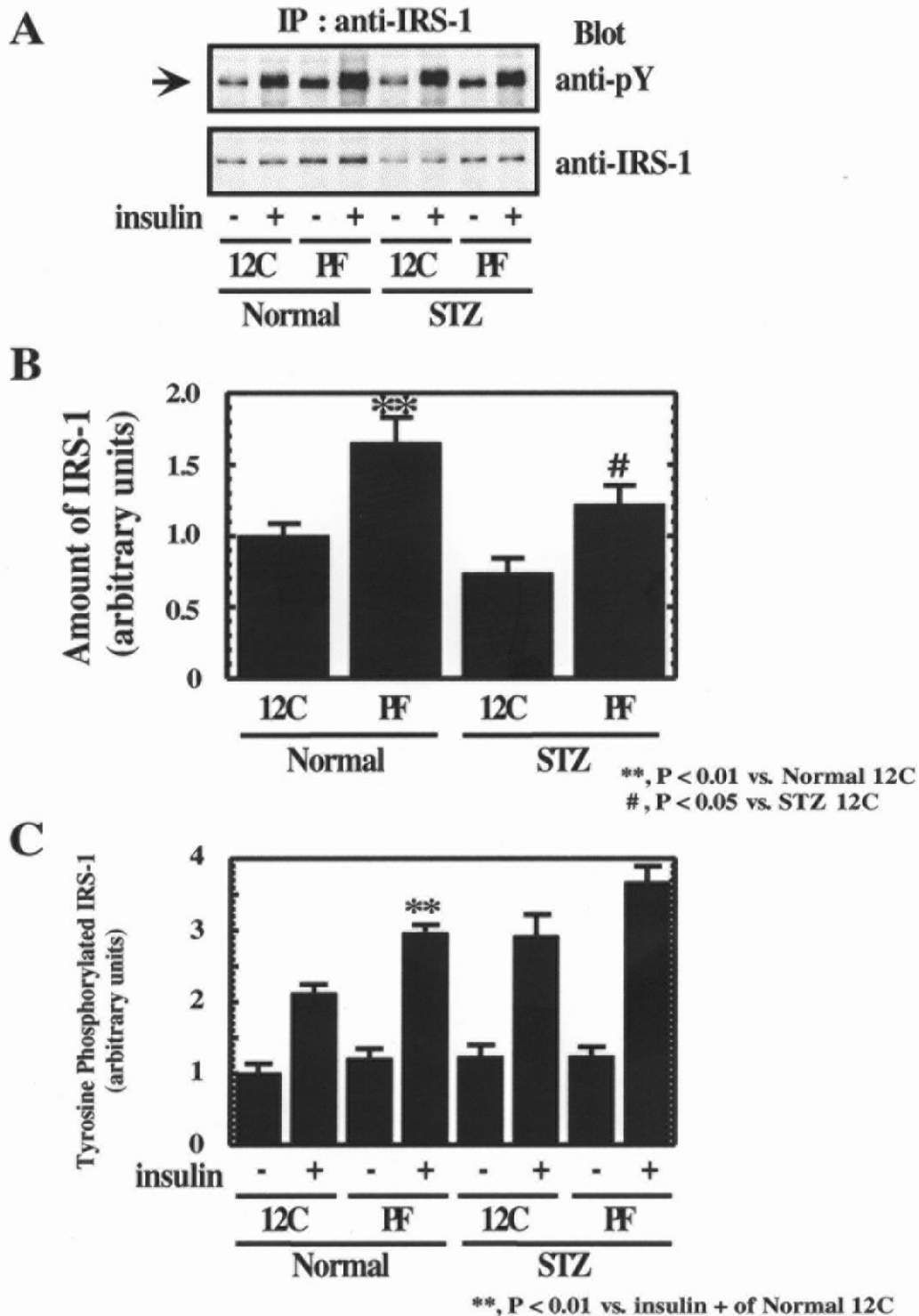


Fig. 2-2-5
Effect of dietary protein on the amount and the insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1 in the liver of STZ-treated rats.

A : Representative blots of immunoblot analyses.

B : Quantitative analysis for the amount of IRS-1.

C : Quantitative analysis for the tyrosine phosphorylated IRS-1.

12C-; n=5, 12C+; n=5, PF-; n=6, PF+; n=6, STZ-12C-; n=8, STZ-12C+; n=7
 STZ-PF-; n=7, STZ-PF+; n=8

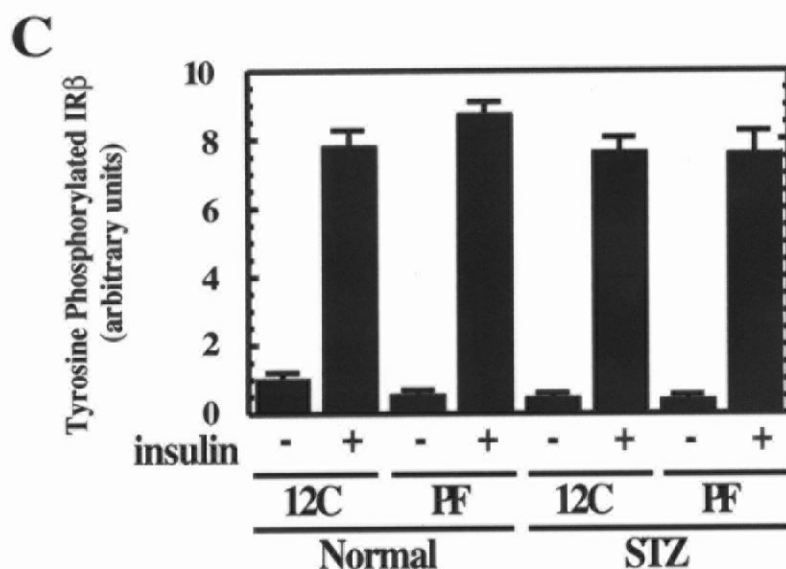
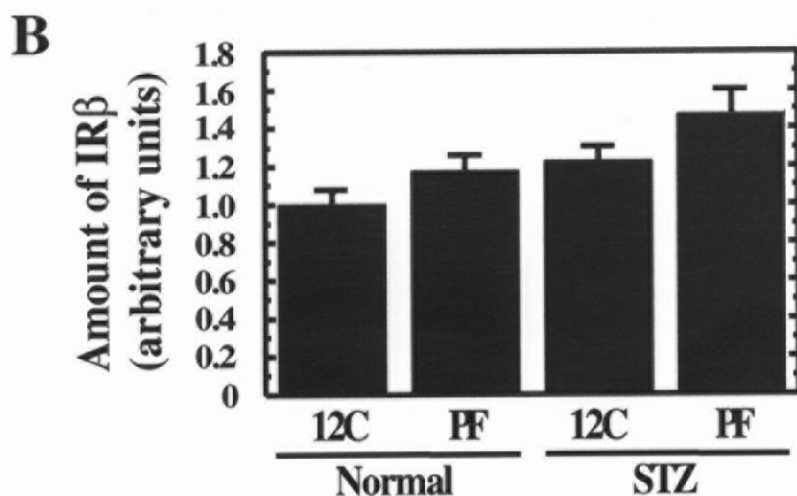
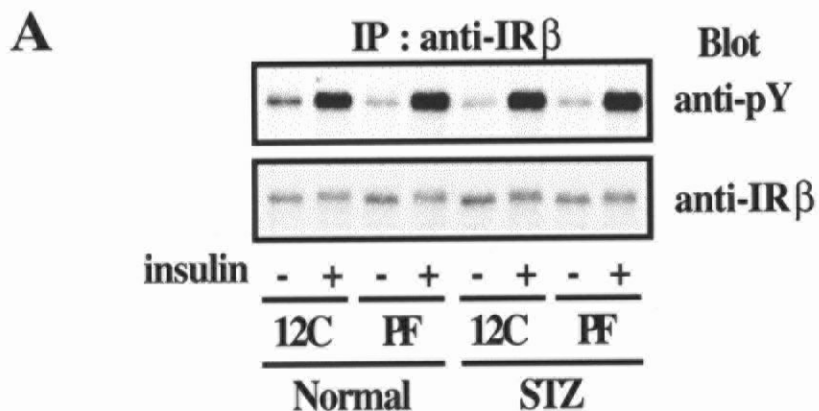


Fig. 2-2-6
Effect of dietary protein on the amount and the insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of insulin receptor β subunit in the skeletal muscle of STZ-treated rats.

A : Representative blots of immunoblot analyses.

B : Quantitative analysis for the amount of IR β

C : Quantitative analysis for the tyrosine phosphorylated IR β

12C-; n=5, 12C+; n=5, PF-; n=6, PF+; n=6, STZ-12C-; n=8, STZ-12C+; n=7
 STZ-PF-; n=7, STZ-PF+; n=8

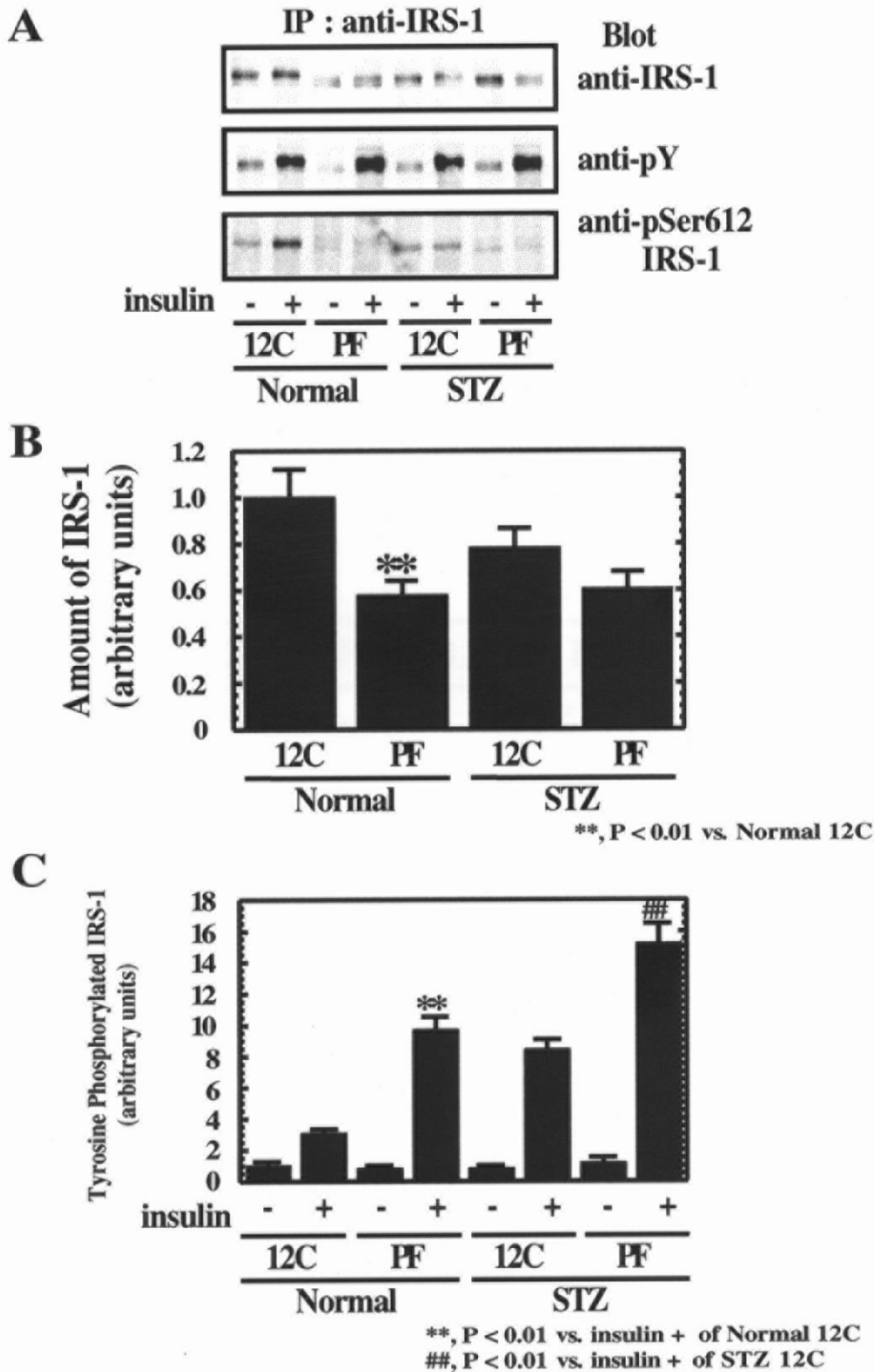


Fig. 2-2-7
Effect of dietary protein on the amount and the insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1 in the skeletal muscle of STZ-treated rats.

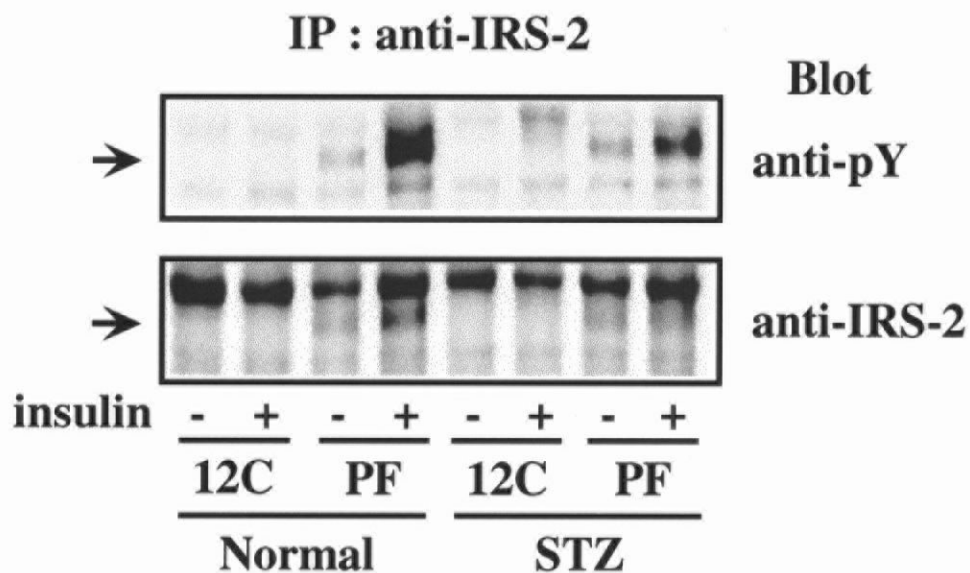
A : Representative blots of immunoblot analyses.

B : Quantitative analysis for the amount of IRS-1.

C : Quantitative analysis for the tyrosine phosphorylated IRS-1.

12C-; n=5, 12C+; n=5, PF-; n=6, PF+; n=6, STZ-12C-; n=8, STZ-12C+; n=7
 STZ-PF-; n=7, STZ-PF+; n=8

A Liver



B Muscle

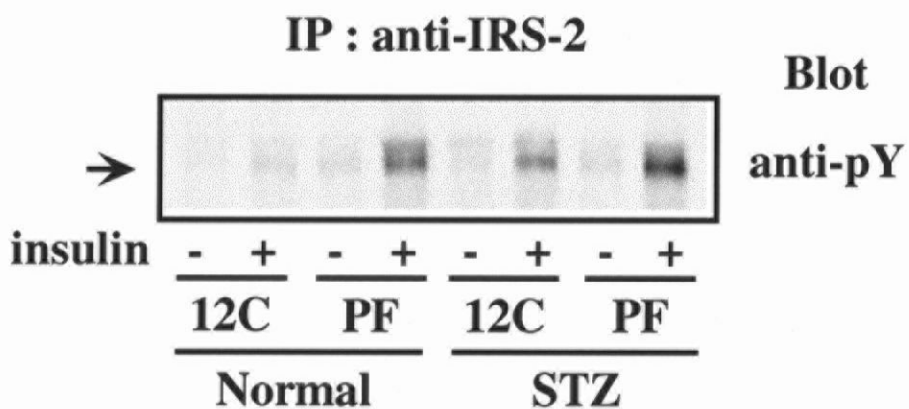


Fig. 2-2-8

Effect of dietary protein on the amount and the insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-2 in the liver and the skeletal muscle of STZ-treated rats.

第三節 肝臓および骨格筋における IRS 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

Total RNA の調製

肝臓および骨格筋の組織約 0.1 g を TRIzol reagent (Invitrogen) 1 ml 中で、ポリトロン型ホモゲナイザーを用いて速やかにホモゲナイズした。homogenate にクロロホルム 200 μ l (用いた TRIzol reagent の 1/5 量) を加えて激しく振とうし、遠心分離 (12,000 \times g, 15 min, 4 $^{\circ}$ C) した。上清 (TRIzol の約 60%) に等量のイソプロパノールを加えてよく混和し 10 分間室温放置後、再度遠心分離 (12,000 \times g, 15 min, 4 $^{\circ}$ C) した。沈殿として得られた total RNA を 75%エタノール 1 ml で洗い、沈殿を乾燥した後、MilliQ 水に溶かした。RNA 濃度は Gene Quant Pro (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて 260 nm の吸光度により測定し、後の分析に供するまで -20 $^{\circ}$ C で保存した。

プライマーの設計

PCR に用いたプライマーは、既に報告されている rat IRS-1 mRNA (Accession No. NM_012969 sequence position : 2048-2467) と rat IRS-2 mRNA (Accession No. AF087674 sequence position : 64-341) をもとに設計した。合成は Invitrogen に依頼した。

IRS-1 sense primer 5'- ATCGCTACATCCCAGGTGCTAC- 3'
antisense primer 3'- CCCCATTTTCCTTTGCGGTTGCT- 5'
IRS-2 sense primer 5'- ACCCAGCCTCATCACTCAGC- 3'
antisense primer 3'- AGCAGTGAAGAGGAGGAGGC- 5'

1st strand cDNA の合成

下記の反応液を調製し、75 $^{\circ}$ C、15 分間反応させた後、氷上で 2~3 分間静置した。

total RNA	5 μ g
MilliQ 水	9 μ l
Oligo (dT) ₁₂₋₁₈ (500 μ g/ml) (Invitrogen)	1 μ l
<hr/>	
total	12 μ l

さらに下記の試薬を加え、25 °C、10分反応後、42 °C、5分反応させた。

5×1st strand buffer (Invitrogen)	6 µl
10 mM dNTP (Invitrogen)	1 µl
0.1 M DTT (Invitrogen)	3 µl
MilliQ 水	3 µl

その後、逆転写酵素である Super Script II (200 units : Invitrogen) 1 µl 添加し、42 °C、50分反応後、70 °C、15分反応し、1st strand cDNA を得た。

PCR 反応

1st strand cDNA	2 µl
10×PCR buffer (Perkin Elmer)	5 µl
2 mM dNTP (Perkin Elmer)	5 µl
sense primer (10 pmol/µl)	1 µl
antisense primer (10 pmol/µl)	1 µl
Taq DNA polymelase (Ampli Taq Gold : Perkin Elmer)	0.5 µl
MilliQ 水	35.5 µl
<hr/>	
	total 50 µl

上記のような PCR 反応溶液を調製し、以下の反応条件で PCR 反応を行った。

94 °C	10 min	} 30 cycles
94 °C	30 sec	
55 °C	30 sec	
72 °C	30 sec	
72 °C	7 min	

サブクローニング

PCR 産物は、常法に従い、pGEM®-T Easy Vector (Promega) にサブクローニングを行った。さらに、ABI PRISM™310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer) でシーケンスを読み、インサートとその方向を確認した。

RNA probe のラベル法

In vitro transcription による cRNA プロブの合成は、Fu らの方法(Fu, Z. W. *et al*, 2001)に従った。

RNase Protection Assay

Hybridization Buffer に 1 サンプル 2×10^5 cpm の probe を加えたものを 30 μ l ずつ total RNA に加えてよく攪拌し、85 $^{\circ}$ C で 5 分間変性させた後、45 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートした。次に、Digestion Buffer 270 μ l 加えて 37 $^{\circ}$ C で 30 分~1 時間インキュベート後、10% SDS 20 μ l と Proteinase K (Invitrogen) 2.5 μ l を加えて 37 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした。次に、下記のものに加えてよく攪拌し、-20 $^{\circ}$ C で 30 分間放置した。

3 M CH ₃ COONa (pH6.0)	30 μ l
tRNA (5 μ g/ μ l) (New England Biolabs)	4 μ l
エタノール	780 μ l

遠心分離 (12,000 \times g, 30 min, 4 $^{\circ}$ C) 後、上清を除いて沈殿を乾燥し、Sample Buffer 10 μ l を加えて 95 $^{\circ}$ C で 5 分間処理し、氷上で急冷し、8%変性ポリアクリルアミドゲル(0.5% 0.5 \times TBE Buffer) で電気泳動 (定電圧 45 W, 70 min) した。泳動終了後、ゲルをろ紙 (3MM Whatman) に移し、ゲルドライヤーで乾燥した。乾燥したゲルをイメージングプレート (BAS III: 富士写真フィルム) に感光させ、FLA3000 (富士写真フィルム) を用いて検出、定量を行った。内部標準には、glyceraldehyde-3-phosphoric acid dehydrogenase (GAPDH) mRNA を用いた。各種 buffer 組成は、下記のとおりである。

4 \times Hybridization Buffer

0.5 M Tris-HCl (pH 7.6)	80 μ l
0.5 M EDTA (pH 8.0)	8 μ l
5 M NaCl	320 μ l
10 % SDS	40 μ l
MilliQ 水	552 μ l

右のものをホルムアミドで 4 倍希釈して使用。

Digestion Buffer

1 \times STE buffer	10 ml
RNase A	40 μ l
RNase T1 (100,000 U/ml)	10 μ l

Sample Buffer

0.5 M EDTA (pH 8.0)	20 μ l
ホルムアミド	950 μ l
Dye Mix	30 μ l

2-3-2 結果

1. 肝臓および骨格筋における IRS-1 遺伝子発現に対する食餌タンパク質の影響

肝臓における IRS-1 mRNA 量の結果は、Fig. 2-3-1 に示した。タンパク質レベルでは PF 摂取により IRS-1 量は増加していたが、IRS-1 mRNA 量は 12C 群と PF 群で同程度であり、食餌タンパク質の影響は観察されなかった。また、STZ 投与ラットの肝臓における IRS-1 mRNA 量についても検討を行ったところ、Normal 群と同様に STZ 群でも食餌タンパク質の影響は観察されなかった(Fig. 2-3-3 A)。

骨格筋における IRS-1 mRNA 量の結果は、Fig. 2-3-2 に示した。タンパク質レベルでは PF 摂取により IRS-1 量は減少していたが、IRS-1 mRNA 量は 12C 群と PF 群で変化はみられず、STZ 投与ラットの骨格筋に関しても、IRS mRNA は食餌タンパク質の影響を受けず、変動が見られなかった(Fig. 2-3-3 B)。

したがって、タンパク質栄養状態による肝臓および骨格筋の IRS-1 量の制御は、mRNA レベルではなされず、翻訳もしくは分解による制御が重要であると考えられる。

2. 肝臓および骨格筋における IRS-2 遺伝子発現に対する食餌タンパク質の影響

肝臓における IRS-2 mRNA 量の結果は、Fig. 2-3-4 に示した。タンパク質レベルでは PF 摂取により IRS-2 量は顕著に増加していたが、IRS-2 mRNA 量も PF 群で 12C 群の約 1.6 倍に増加していた。STZ 投与ラットの肝臓の IRS-2 mRNA 量も測定したところ(Fig. 2-3-5)、STZ 群は Normal 群よりやや増加傾向を示しており、さらに STZ-12C 群と STZ-PF 群で同程度であり、食餌タンパク質による効果は消失した。したがって、食餌タンパク質の影響ではなく、循環血中インスリン濃度が低下すると肝臓の IRS-2 mRNA 量が増加するという関係が明らかになった。

骨格筋に関しては、イムノブロット法で IRS-2 量の検出はできなかったので、タンパク質レベルでの IRS-2 量の変動は不明であった。そこで、mRNA 量について検討したところ、PF 群で 12C 群の約 2.8 倍に増加していた(Fig. 2-3-6)。また、STZ 投与ラットの骨格筋の IRS-2 mRNA 量は、Normal 群よりやや増加傾向を示し、さらに 12C 群より PF 群で有意ではないが約 2.2 倍に増加していた(Fig. 2-3-7)。したがって、骨格筋における IRS-2 mRNA 量の制御には食餌タンパク質の影響が大きく関与しているということが考えられた。また、骨格筋 IRS-2 は PF 摂取によりタンパク質量として増加していることが示唆された。

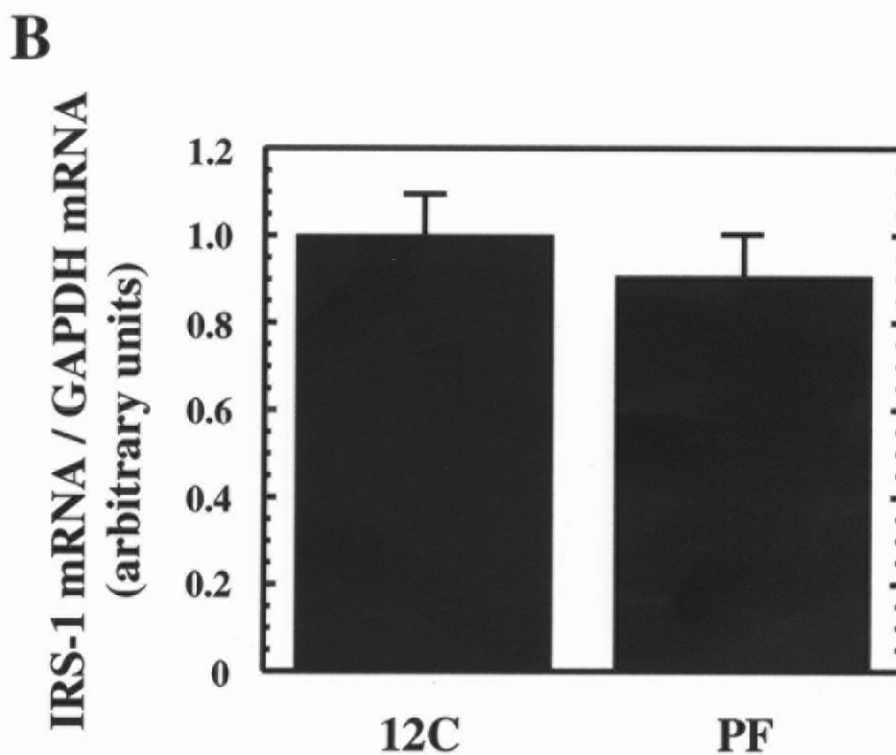
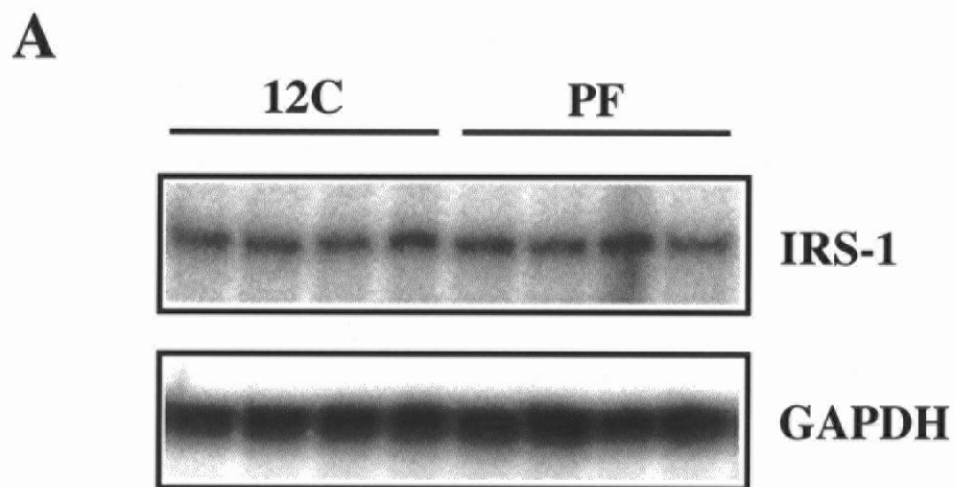
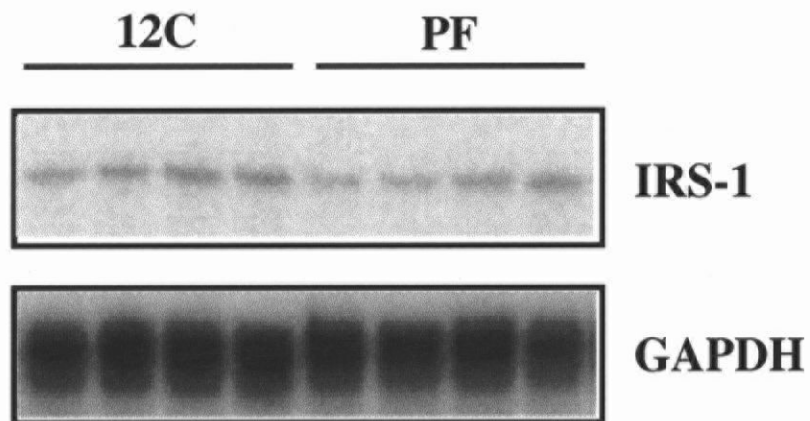


Fig. 2-3-1
Effect of dietary protein on the gene expression of IRS-1 in the liver.
 Rats were fed on 12C or PF diet for 7 days (8h a day ad libitum) and for 1.5 h on the 8th day.

A : Representative bands of RNase protection assay.

B : Quantitative analysis (n = 5).

A



B

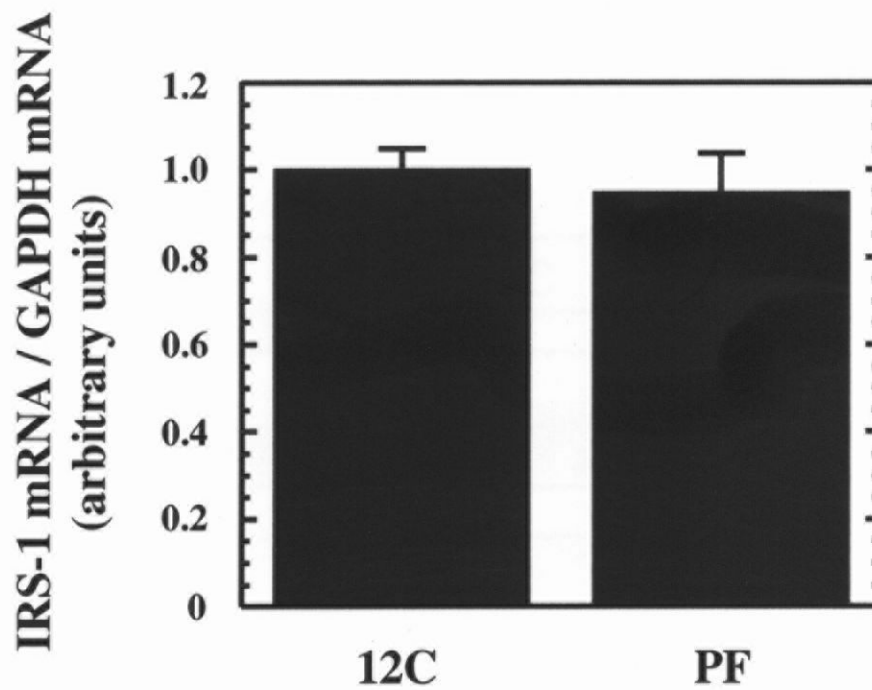


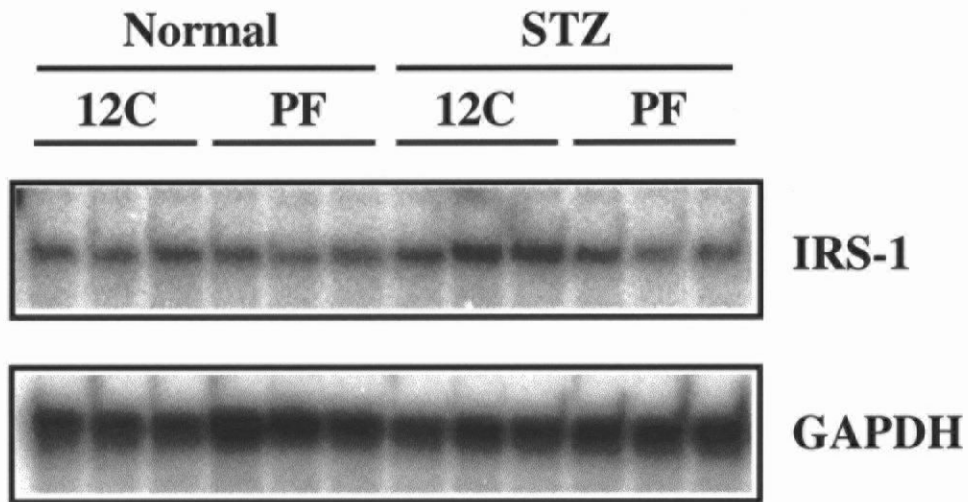
Fig. 2-3-2

Effect of dietary protein on the gene expression of IRS-1 in the skeletal muscle. Rats were fed on 12C or PF diet for 7 days (8h a day ad libitum) and for 1.5 h on the 8th day.

A : Representative bands of RNase protection assay.

B : Quantitative analysis (n = 5).

A Liver



B Skeletal muscle

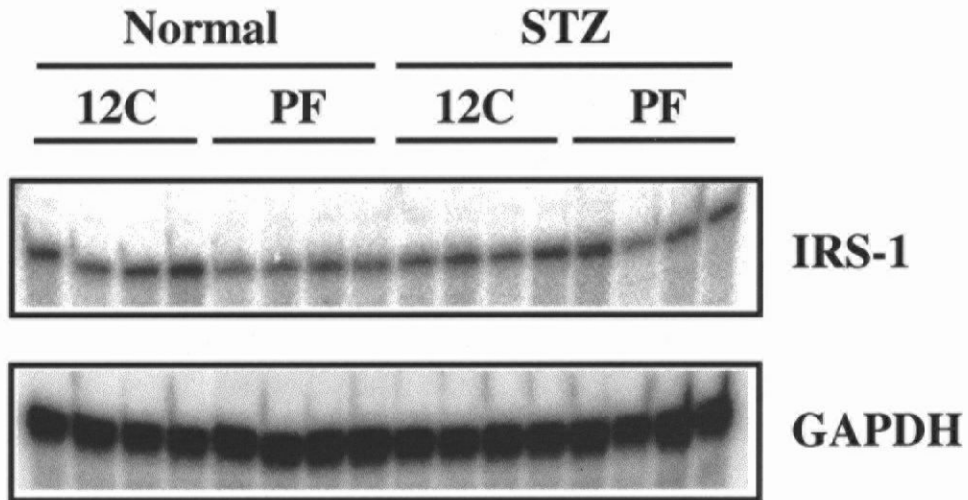


Fig. 2-3-3
Effect of dietary protein on the gene expression of IRS-1 in the liver and the skeletal muscle of STZ-treated rats.

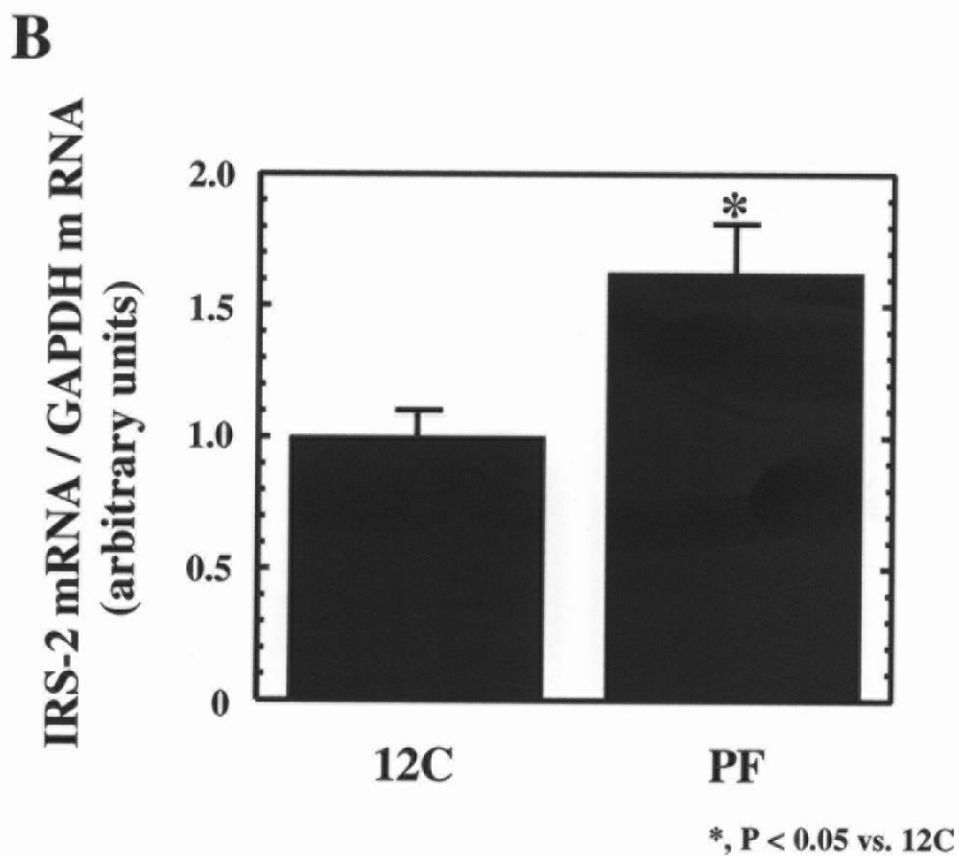
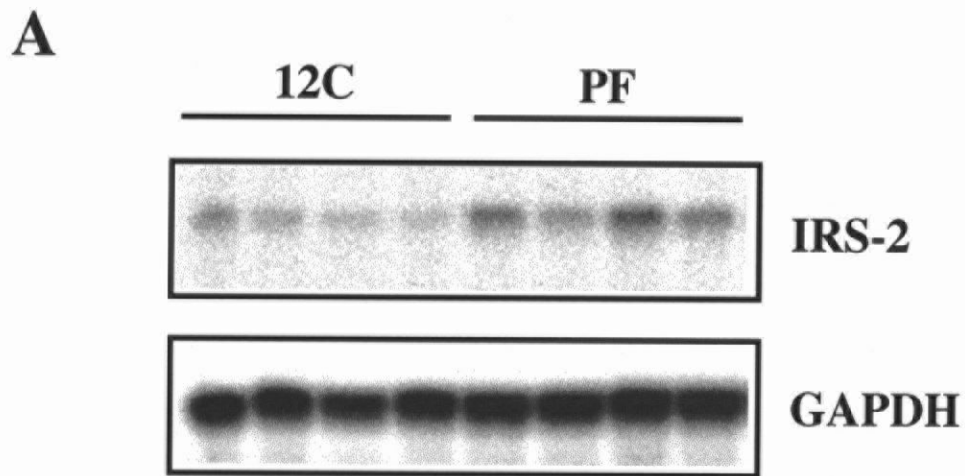
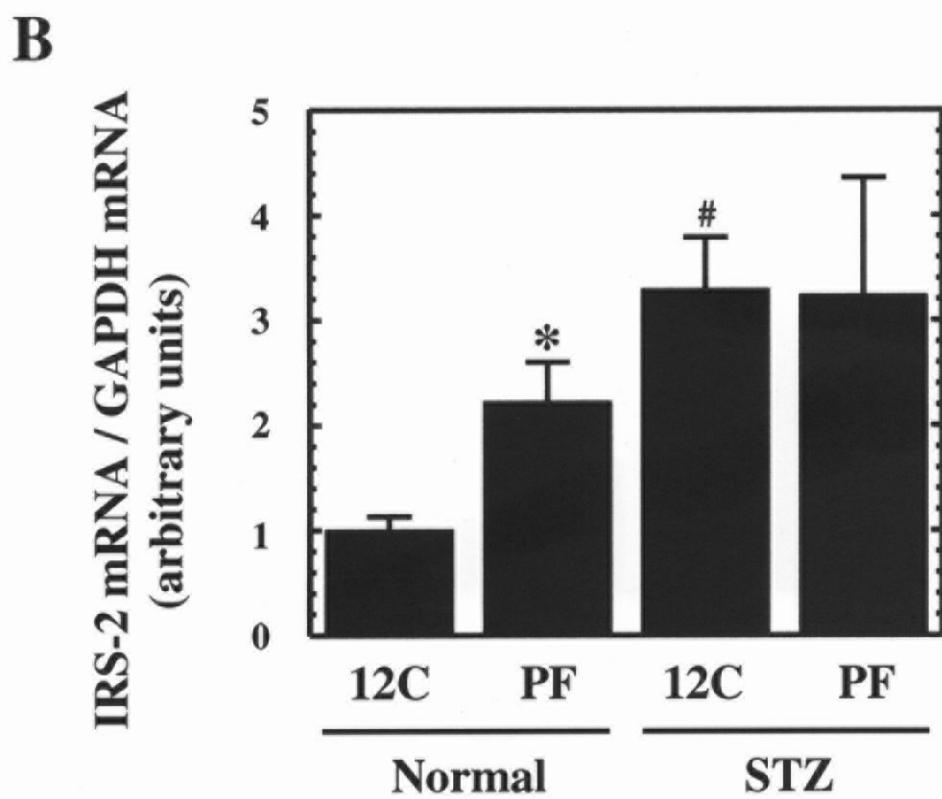
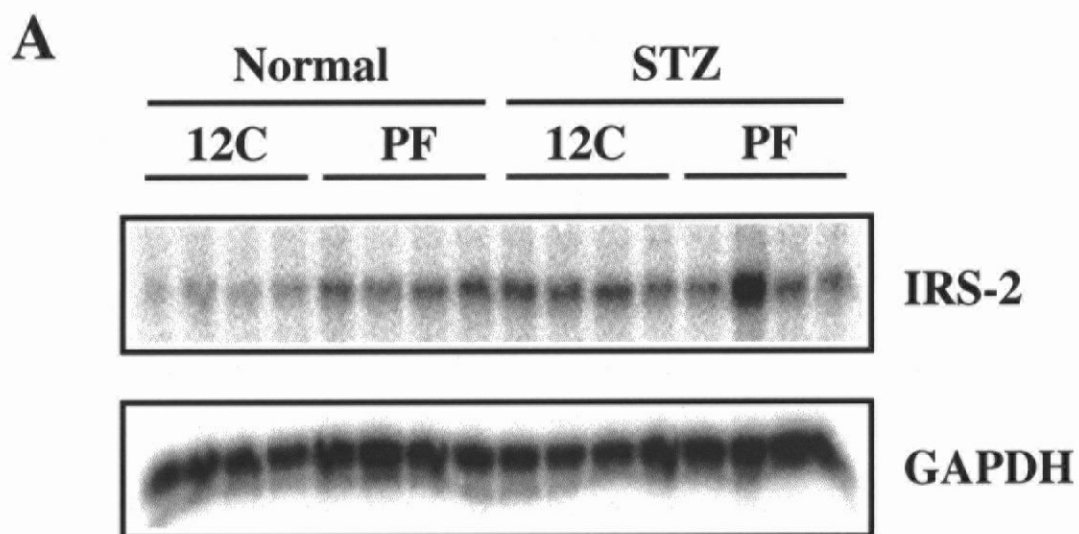


Fig. 2-3-4

Effect of dietary protein on the gene expression of IRS-2 in the liver. Rats were fed on 12C or PF diet for 7 days (8h a day ad libitum) and for 1.5 h on the 8th day.

A : Representative bands of RNase protection assay.

B : Quantitative analysis (n = 5).



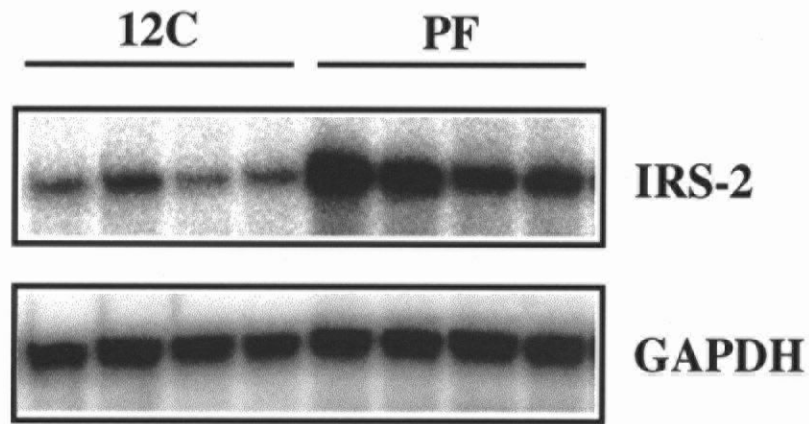
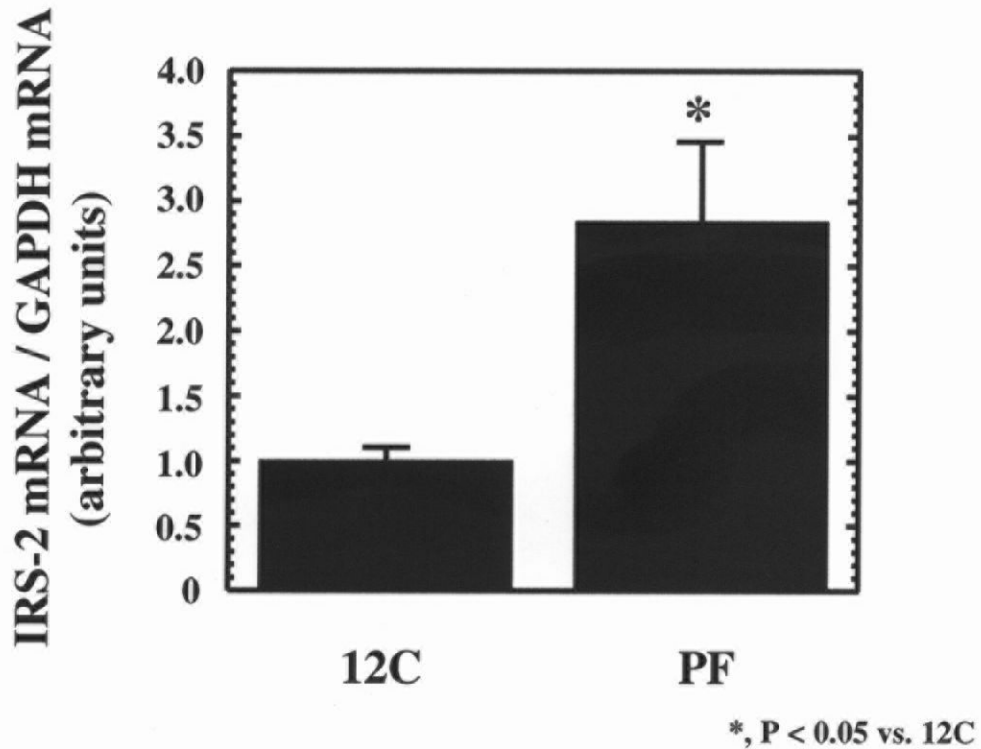
* and #, $P < 0.05$ vs. Normal-12C

Fig. 2-3-5

Effect of dietary protein on the gene expression of IRS-2 in the liver of STZ-treated rats.

A : Representative bands of RNase protection assay.

B : Quantitative analysis (n = 5).

A**B****Fig. 2-3-6**

Effect of dietary protein on the gene expression of IRS-2 in the skeletal muscle. Rats were fed on 12C or PF diet for 7 days (8h a day ad libitum) and for 1.5 h on the 8th day.

A : Representative bands of RNase protection assay.

B : Quantitative analysis (n = 5).

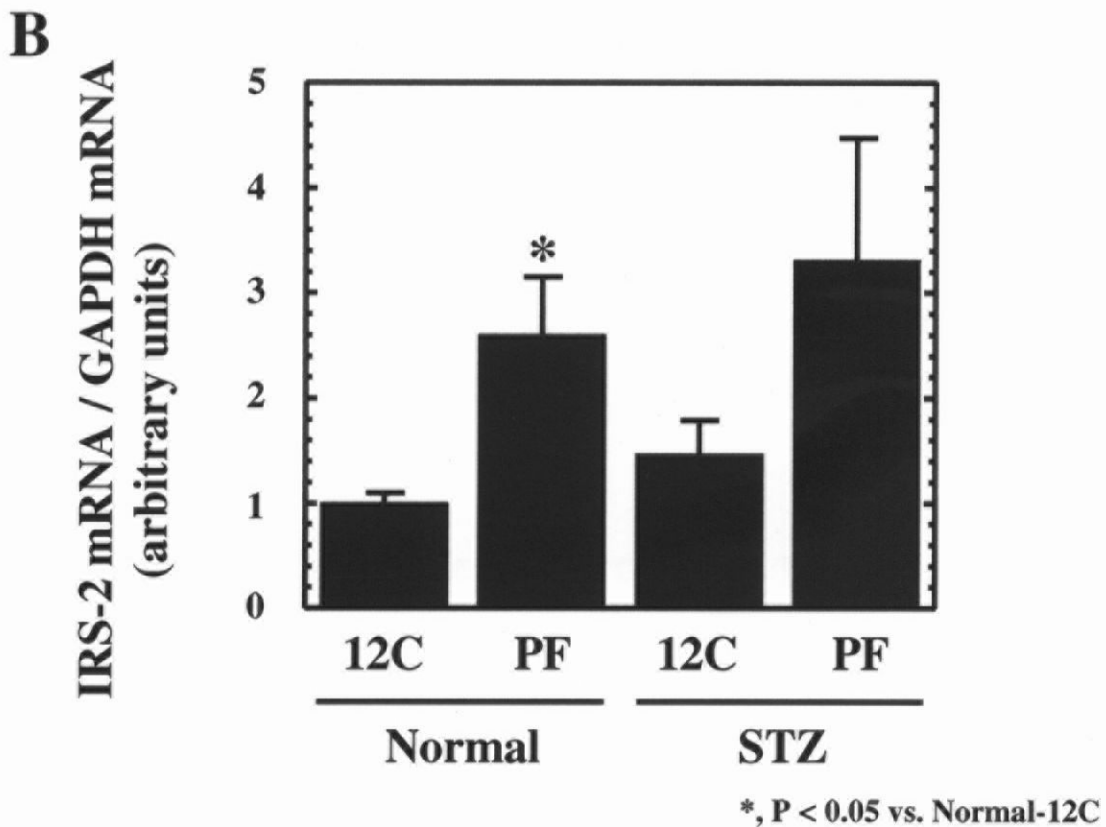
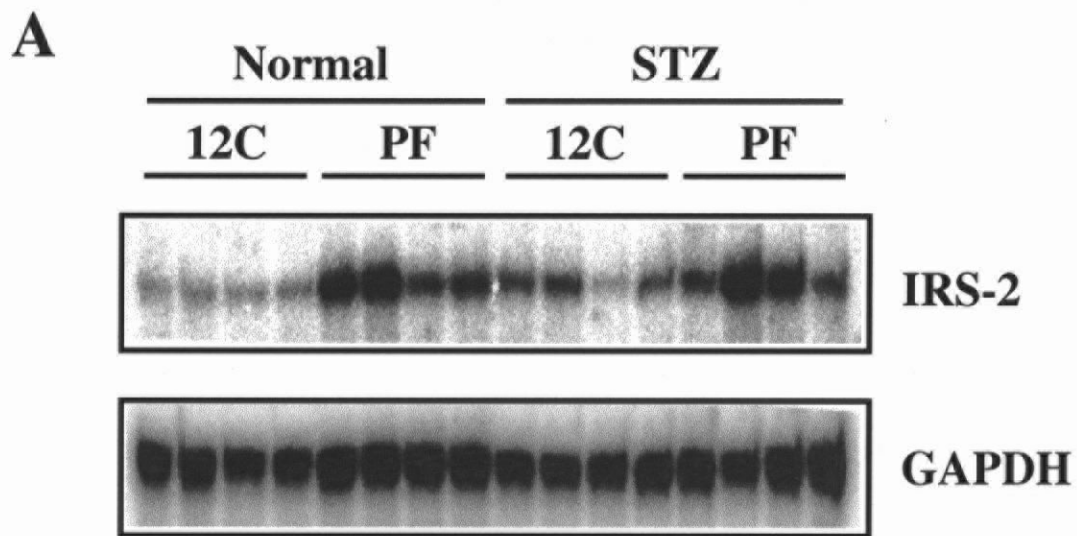


Fig. 2-3-7
Effect of dietary protein on the gene expression of IRS-2 in the skeletal muscle of STZ-treated rats.

A : Representative bands of RNase protection assay.

B : Quantitative analysis (n = 5).

第四節 食餌タンパク質による骨格筋 IRS-1 セリンリン酸化状態の変動に寄与する因子の検索

2-4-1 方法

PKC 活性測定

骨格筋より protein extract を「1-1-1 方法」と同様に調製し、そのサンプルを用いて PKC 活性は、Protein kinase C enzyme assay system (Amersham Pharmacia Biotech) を用い、添付のプロトコールに従って測定した。この assay system では conventional PKC (α , β , γ)の活性のみ測定可能であり、他のカルシウム非依存型の novel PKC (δ , ϵ , θ , η)と atypical PKC (λ , ζ)の活性は測定不可能である。

TNF α mRNA の測定

第一章にて飼育した 12C 群および PF 群の精巣周囲脂肪組織を用い、脂肪組織に発現している TNF α mRNA 量を RNase Protection Assay により測定した。以下に示す部分以外は「2-3-1 方法」と同様に行った。

total RNA の調製

精巣周囲脂肪組織約 0.3~0.4 g を TRIzol reagent 1.5 ml でホモゲナイズした後、遠心分離(12,000×g, 10 min, 4 °C)して上部の脂肪を除き、その後の操作は「2-3-1 方法」と同様に行った。

プライマーの設計

PCR に用いたプライマーは、既に報告されている rat TNF α mRNA (Accession No.X66539 sequence position : 292-691)をもとに設計し、合成は Invitrogen に依頼した。

<i>TNFα</i>	sense primer	5'- AACCAACCAAGCACAGGAGCAGC- 3'
	antisense primer	3'- CAAAGTAGACCTGCCCGGACTC- 5'

2-4-2 結果

1. 骨格筋における cPKC 活性

骨格筋タンパク質中の cPKC 活性の結果は、Fig. 2-4-1 に示した。12C 群と PF 群の骨格筋で cPKC の活性は同程度であった。したがって、少なくとも食餌タンパク質による IRS-1 のセリンリン酸化状態の変化に、cPKC は関与しないということが明らかになった。

2. 脂肪組織における TNF α 遺伝子発現量に対する食餌タンパク質の影響

精巣周囲脂肪組織における TNF α mRNA 量の結果は、Fig. 2-4-2 に示した。TNF α mRNA 量も 12C 群と PF 群で同程度であり、食餌タンパク質の効果は観察されなかった。ただ、脂肪量は 12C 群の方が多いので、体全体の TNF α 量は 12C 群で増加しているのかもしれない。なお血中の TNF α 量に関しては、rat TNF α Immunoassay Kit (コスモ・バイオ株式会社)を用いて測定を試みたが、検出限界以下であった。

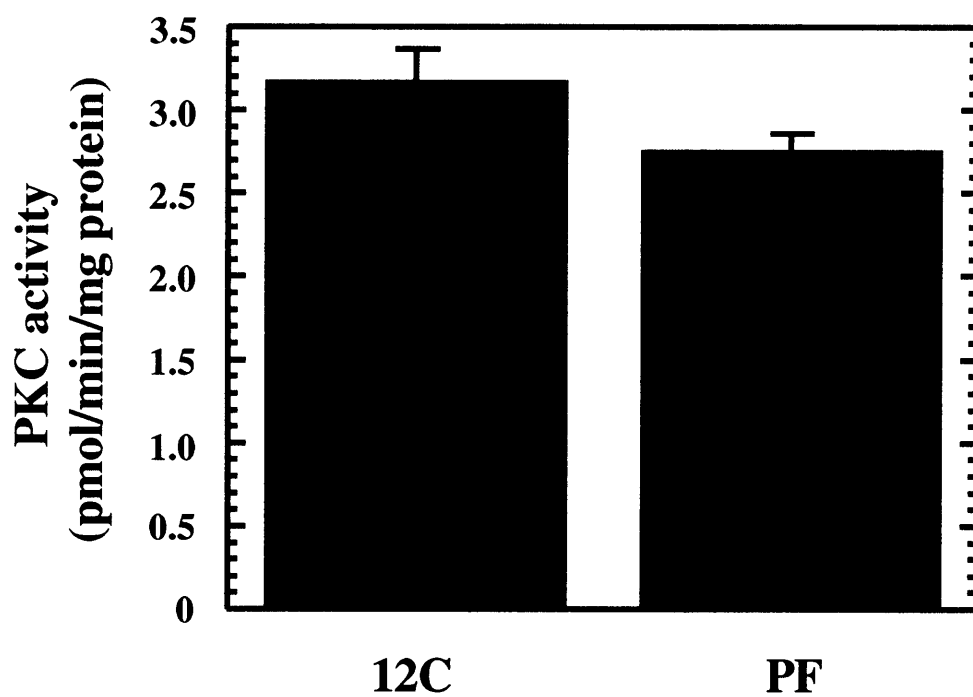


Fig. 2-4-1
cPKCs activity in the skeletal muscle. Rats were fed on 12C or PF diet for 7 days (8h a day ad libitum) and for 1.5 h on the 8th day.

Data represent the mean \pm S. E. for five rats.

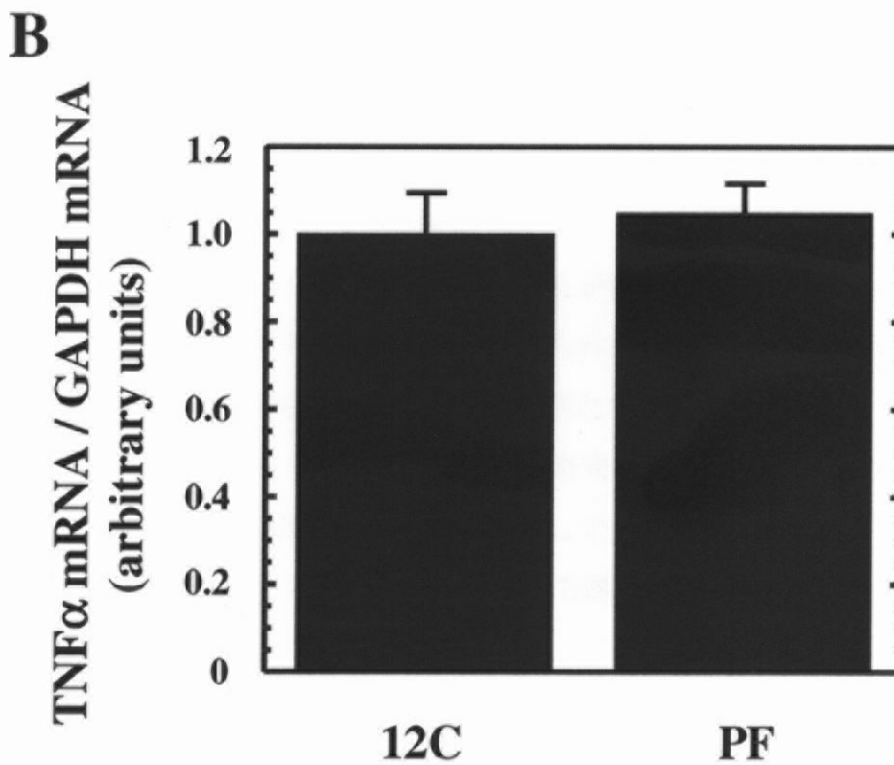
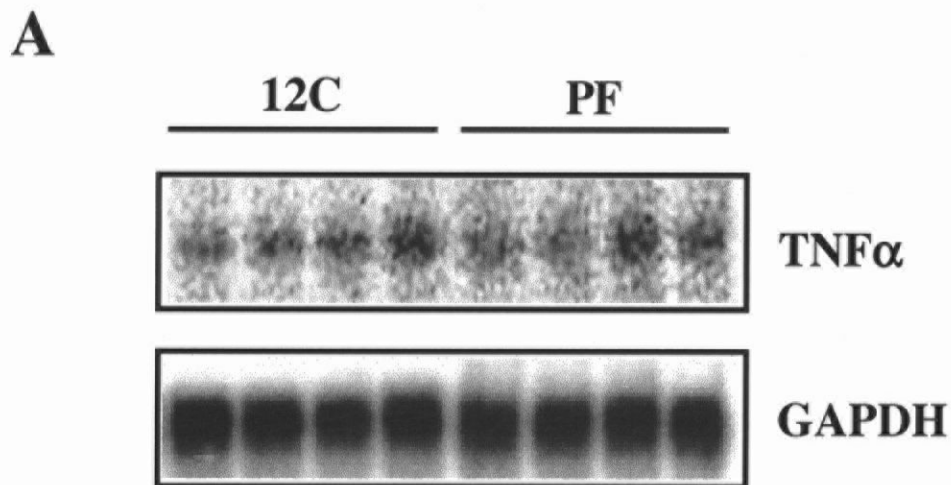


Fig. 2-4-2

Effect of dietary protein on the gene expression of TNF α in the adipose tissues. Rats were fed on 12C or PF diet for 7 days (8h a day ad libitum) and for 1.5 h on the 8th day.

A : Representative bands of RNase protection assay.

B : Quantitative analysis (n = 5).

第五節 考察

1. タンパク質およびアミノ酸のインスリン情報伝達経路に対する抑制効果

本章では、まず第一章で食餌タンパク質の効果が確認された現象に対して、タンパク質栄養状態により変動する血中アミノ酸濃度が直接影響しているかどうか、pair-feeding ラットと STZ 投与ラットを用いて検討した。pair-feeding では、12C と PF の間で血中インスリン濃度が同程度であるが、自由摂取に比べて 12C の血中アミノ酸濃度が低めであり、アミノ酸の効果が小さくなると予想される。STZ 投与では、摂食量は 12C と PF の間で差があるが、血中インスリン濃度は両群で同程度に低く保たれたため、両群間における血中アミノ酸濃度の差が大きく、pair-feeding よりもアミノ酸シグナルの影響が大きくなると考えられる。以上のことを考慮して得られた結果をまとめると、PF 摂取による肝臓の IR 量および IRS-1, -2 量の増加、骨格筋の IRS-1 のセリンリン酸化およびインスリン依存性チロシンリン酸化には食餌タンパク質の影響が大きく、血中インスリン濃度の関与は少ないということが明らかになった。それに対して、骨格筋の IRS-1 量の変化は食餌タンパク質の効果より血中インスリン濃度の影響が大きく、IRS-2 のインスリン依存性チロシンリン酸化も血中インスリン濃度への依存性が大きいことが示唆された。Pair-feeding では全体的に食餌タンパク質の効果をやや弱める傾向が見られたことから、摂食量の減少による血中アミノ酸濃度の減少も関与していることが示唆された。

序論でも少し触れたが、Reis らのラットを用いた研究の他に、培養細胞系でアミノ酸のインスリン情報伝達経路の初期段階への影響を検討している報告がある。これらの研究において一貫している点は、アミノ酸により mTOR/p70S6 キナーゼ経路が活性化することである。Hara らの CHO-IR 細胞(IR を高発現している CHO 細胞)を用いた研究(Hara, K. *et al*, 1998)によると、IR や IRS-1 のインスリン依存性チロシンリン酸化、インスリン刺激による PI3 キナーゼおよび Akt/PKB 活性化に対してアミノ酸の効果はなかった。よって、アミノ酸とインスリンの情報伝達は mTOR より上流ではクロストークしていないと結論している。それに対して、Patti らの Fao hepatoma や HepG2 といった肝細胞を用いた研究(Patti, M. -E. *et al*, 1998)では、IRS-1, -2 のインスリン依存性チロシンリン酸化、IRS-1 と Grb2 および PI3 キナーゼとの結合、インスリンによる PI3 キナーゼの活性化がアミノ酸により抑制されていた。本研究の第一章、第二章で観察された、タンパク質栄養状態の悪化に伴った肝臓および骨格筋での IR および IRS の up-regulation 効果は、Reis

らや Patti らの結果にとよく一致している。

さらに、タンパク質およびアミノ酸が糖新生や糖の取り込みに対するインスリン作用を制御しているということは、代謝研究においてよく調べられている(Kettelhut, I. C. *et al*, 1980、Peret, J. *et al*, 1981、Tessari, P. *et al*, 1985、Rossetti, L. *et al*, 1989、Pisters, P. W. *et al*, 1991、Tappy, L. *et al*, 1992、Flakoll, P. J. *et al*, 1992)。特に、高たんぱく質摂取により空腹時血糖値の上昇、肝臓における糖産生の増加、それに対して糖利用の減少が起こることが報告されている。また、adipocyte を用いた Marshall らの実験では、アミノ酸がインスリンの糖取り込み促進作用を阻害し、その中でも特にグルタミンの効果が大きいことを示している(Traxinger, R. R. *et al*, 1989、Marshall, S. *et al*, 1991)。そして、このグルタミンによるインスリン作用の阻害効果はヘキソースアミン生合成経路の活性化によるものであり、その律速酵素である glutamine:fructose-6-phosphate aminotransferase のインスリン抵抗性に対する重要性が示された(Crook, E.D. *et al*, 1993、Hebert Jr, L. F. *et al*, 1996)。以上のことから、タンパク質およびアミノ酸の、糖代謝に関するインスリン作用に対する down-regulation 効果が明らかになっている。そして最近、培養細胞系で初めて、インスリンとアミノ酸のシグナルのクロストークにより糖取り込みの抑制が起こることが証明された(Tremblay, F. *et al*, 2001)。それによると、アミノ酸により短時間のインスリン刺激に対する応答は影響を受けないが、30 分以上の長時間のインスリン刺激で活性化した p70S6 キナーゼにより IRS-1 のセリンリン酸化が増加する。そして、アミノ酸は p70S6 キナーゼの活性化に必須であり、IRS-1 のセリンリン酸化の増加にも重要であるとされていた。このアミノ酸による IRS-1 を介した down-regulation 機構により、インスリン依存性糖取り込みが抑制された。したがって、この知見と同様な、アミノ酸の IRS-1 のセリンリン酸化に対する影響が観察された本研究においても、タンパク質栄養の悪化に伴いインスリンの糖取り込み促進効果が亢進するであろうことが予想された。また、STZ 投与により I 型糖尿病を誘発したのを血糖値の上昇で確認したラットに PF を一週間給餌し、血糖値が回復していたという現象からもそのことが推察できた。これに関しては、次章で検討をした。

2. IRS-1, -2 量のタンパク質栄養状態による制御機構

本章では、PF 摂取による肝臓での IRS-1, -2 量の増加と、骨格筋での IRS-1 量の減少は、mRNA レベルでの変化を伴うかどうかを検討した。イムノプロット法で検出できなかった

骨格筋の IRS-2 に関しても同様に mRNA 量の変化を検討した。その結果、肝臓、骨格筋共に IRS-1 mRNA 量は両群間で差がなく、IRS-2 mRNA 量は PF 食摂取で増加していた。IRS-1, -2 は肥満によるインスリン抵抗性を示す *ob/ob* マウスや Zucker fatty ラットで、その量が減少し、それには mRNA 量の減少も伴うということが示されている (Kerouz, N. J. *et al*, 1997, Anai, M *et al*, 1998)。これらの動物モデルは hyperinsulinemia を示すため、IRS-1, -2 の遺伝子発現およびタンパク質量はインスリンによる負の制御を受けるのではないかと考えられた。さらに、IRS-2 遺伝子には、インスリンによりその遺伝子発現が抑制される PEPCK と完全に一致するインスリン応答領域が存在し、インスリンによりその転写が阻害されるという報告もなされている (Zhang, J. *et al*, 2001)。よって、STZ 投与ラットを用いて肝臓および IRS-1, -2 量、および mRNA 量の変動に血中インスリン濃度が関与しているかどうか検討した。その結果、PF 摂取による肝臓 IRS-1, -2 量の増加は血中インスリン濃度の影響は少なく血中アミノ酸濃度の効果が大きかった。それに対して、PF 摂取による骨格筋 IRS-1 量の減少は血中インスリン濃度の変動に依存していた。mRNA レベルでは、肝臓および骨格筋 IRS-1 mRNA 量は血中インスリン濃度および血中アミノ酸濃度に依存せず変動しなかった。それに対して、IRS-2 mRNA 量は、肝臓において、血中インスリンレベルが非常に低い STZ 投与ラットで増加していた。さらに、STZ 投与ラットの肝臓 IRS-2 mRNA は、食餌タンパク質による変化が観察されなかったことから、PF 摂取による増加は血中インスリン濃度の低下によるもので、食餌タンパク質の効果ではないことが示された。一方、STZ 投与ラットの骨格筋 IRS-2 mRNA は、PF 摂取により増加する傾向が観察され、食餌タンパク質の影響を大きく受けることが考えられた。以上の結果から、食餌タンパク質による IRS-2 量の制御は mRNA レベルの制御が関与していることが明らかになり、イムノブロット法で検出できなかった骨格筋の IRS-2 もタンパク質量として増加していることが示唆された。また、肝臓と骨格筋では IRS-2 mRNA 量の制御機構が異なるということが考えられた。それに対して IRS-1 量の制御に関しては、翻訳もしくは分解による制御が重要であることが示された。インスリン誘導性の分解が、IRS-1 と IRS-2 では異なるという報告がなされている。すなわち、インスリンの長期間刺激により IRS-1 の分解はセリンリン酸化の増加に伴い、ユビキチン-プロテアソーム系を介して誘導されるが、IRS-2 はセリンリン酸化の増加は起こるが分解されにくい (Sun, X. J. *et al*, 1999, Pederson, T. M. *et al*, 2001, Takano, A. *et al*, 2001)。このことから、IRS-1 は mRNA による制御を受けずに翻訳および分解で制御され、IRS-2 はむしろ mRNA によ

る制御を受けるといえるであろう。

3. 骨格筋 IRS-1 のセリンリン酸化に対する PKC および TNF α の影響

本章では、PF 摂取により減少する骨格筋 IRS-1 のセリンリン酸化に関与する因子を検索する目的で、IRS-1 のセリンリン酸化への関与が報告されている PKC と TNF α に注目して検討を行った。だが、骨格筋の cPKC 活性および脂肪組織における TNF α 発現量は食餌タンパク質の影響を受けていなかった。

PKC が IRS-1 のセリンリン酸化を誘導することは、ホルボールエステルを用いた検討で明らかになったものである(De Fea, K., *et al*, 1997 a)。したがって、3つの PKC サブクラスのうち、ホルボールエステル結合部位を持たない atypical PKC (PKC λ , ζ)の IRS-1 セリンリン酸化への関与はないものと考えて実験を行った。PKC λ , ζ はインスリンにより活性化され、PI3-キナーゼの下流に位置して GLUT4 の細胞膜へのトランスロケーションや糖取り込みに関与していると考えられている(Standaert, M. L. *et al*, 1997、Kotani, K. *et al*, 1998)。しかし最近になって、PKC ζ が IRS-1 をセリンリン酸化するという報告がなされた(Ravichandran, L. V. *et al*, 2001、Liu, Y. M. *et al*, 2001)。したがって、cPKC ではなく、PKC ζ 活性が食餌タンパク質の影響を受けて変動し、IRS-1 のセリンリン酸化を誘導している可能性が考えられる。

TNF α は、脂肪細胞より分泌され、肥満におけるインスリン抵抗性の原因因子として知られている(Hotamisligi, G. S. *et al*, 1993, 1994 a)。TNF α により IRS-1 がセリンリン酸化されることも明らかになっており、TNF α によるインスリン抵抗性は、IRS の down-regulation 機構によって誘導されると考えられている(Feinstein, R. *et al*, 1993、Hotamisligi, G. S. *et al*, 1994 b, 1996、Kanety, H. *et al*, 1995)。インスリン抵抗性の主要な現象としては、骨格筋における糖取り込みの現象が挙げられるが、脂肪組織から分泌された TNF α がどのように骨格筋に作用するかは明らかになっていない。肥満によるインスリン抵抗性を示しているヒトより単離した脂肪細胞から産生される TNF α 量は ELISA 法で確認できるが、血中 TNF α 量は測定できないとの報告(Hotamisligi, G. S. *et al*, 1995)があるので、endocrine 様式よりはむしろ paracrine 様式で骨格筋等の他組織に作用していると考えられている。本研究において血中 TNF α 濃度の ELISA 法での測定を試みたが、非常に低濃度で検出できなかったのは、このためであると考えられる。また、進行した糖尿病腎症患者には低タンパク質食療法を行うことが知られているが、その患者の末梢血単

核細胞からの TNF α 産生には低タンパク質食摂取による影響がなかったという報告 (Nishimura, M. *et al*, 1997)がある上に、今回脂肪組織の TNF α mRNA 量は食餌タンパク質による変化がなかったことから、食餌タンパク質による骨格筋 IRS-1 のセリンリン酸化には TNF α はあまり関与しないという可能性が考えられた。

4. まとめ

以上のように本章では、第一章で観察された、タンパク質栄養状態の悪化による IRS を介した up-regulation 効果の大部分が、タンパク質栄養状態により変動する血中アミノ酸濃度のシグナルにより制御されているということを示した。さらに、その up-regulation 機構の一つである IRS-1, -2 量の制御機構は、各因子によって異なると共に、IRS-2 に関しては組織により異なるという可能性が示唆された。このような食餌タンパク質による IRS を中心とした情報因子の制御が、どのようなインスリン生理作用発現に影響を及ぼしているのかは非常に興味深く、次章においてそれらの一部について検討を加えることにした。