

### 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

第一章、第二章では、タンパク質栄養状態によって大きく変動するインスリン情報伝達因子について検討した。その結果、タンパク質栄養状態が悪化すると、肝臓では IR および IRS-1,2 量の増加、骨格筋では IRS-1 量の減少、セリンリン酸化の減少およびインスリン感受性の増大が起こり、IRS-2 量の増加が観察された。

そこで、本章ではこれらの因子の変化がどのようなインスリン生理作用発現に影響を及ぼすかについて検討を試みた。これまでに、タンパク質栄養状態の悪化によりタンパク質合成の低下および分解の抑制が起こり、インスリンのタンパク質合成促進作用を抑えることが明らかになっている。また、タンパク質あるいはアミノ酸欠乏によるインスリン情報伝達系の down-regulation が、どのような機構により引き起こされるかに関しても明らかになってきている(Van Sluijters, D. A. *et al*, 2000、Shah, O. J. *et al*, 2000)。しかし、本研究においては PF 摂取によるインスリン情報伝達初期因子の up-regulation 効果が観察されており、タンパク質栄養がタンパク質合成亢進作用以外のインスリン生理作用に対する影響が考えられる。さらに、ラットを用いた Reis らの研究で、低タンパク質食の長期摂取によりグルコースクリアランス能が上昇するということが示されており(Reis, M. A. B. *et al*, 1997)、タンパク質栄養がインスリンの糖代謝制御作用に影響を及ぼすであろうことが考えられた。

したがって、本章ではインスリンの糖代謝制御作用に注目し、肝臓では糖新生の律速酵素である phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) の遺伝子発現を RNase Protection Assay によって測定し、骨格筋では糖の取り込み量を代謝されないグルコースアナログである 2-deoxyglucose を用いて検討を行った。また、肝臓に関しては、脂肪酸合成の律速酵素である fatty acid synthase (FAS) の遺伝子発現についても PEPCK と同様な検討を行った。

## 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

#### PEPCK mRNA の測定

第一章にて飼育した 12C 群および PF 群の肝臓を用いて total RNA を調製し、RNase Protection Assay により PEPCK mRNA 量を測定した。プライマー設計以外は「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 PEPCK gene, exon 1-3 (Accession No. K03243)をもとに設計し、合成は Invitrogen に依頼した。

**PEPCK** sense primer 5'- GAAGTGAGGAAGTTTGTGGAAGGC- 3'  
antisense primer 3'- GTGTCTCTCTGCTCTTGGGTAATG- 5'

#### FAS mRNA の測定

PEPCK の mRNA 量測定と同様に、RNase Protection Assay により FAS mRNA 量を測定した。プライマーの設計のみ以下に示し、後は「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 FAS mRNA (Accession No. X13415, sequence position : 88-456)をもとに設計し、合成は Invitrogen に依頼した。

**FAS** sense primer 5'- AGCAGGCACACACAATGGACCC- 3'  
antisense primer 3'- TTAGCAGCAGGTTGATCCCGCC- 5'

### 3-1-2 結果

#### 1 : 肝臓 PEPCK 遺伝子発現に対する食餌タンパク質の影響

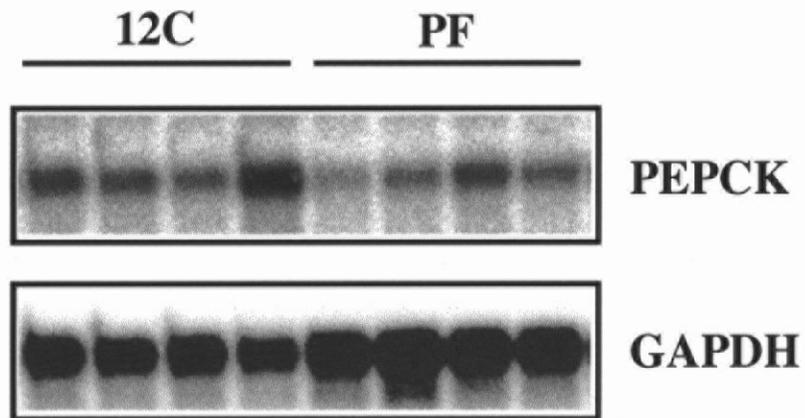
肝臓 PEPCK mRNA 量の測定結果を、Fig. 3-1-1 に示す。肝臓 PEPCK mRNA 量は、PF 群で 12C 群の約 50%まで減少していたが、有意な差ではなかった。PEPCK 遺伝子はインスリンにより転写が抑制される遺伝子であり、この結果は PF 摂取により起こる IR および IRS-1,2 の up-regulation が関与している可能性が示唆される。すなわち、タンパク質栄養状態の悪化により、インスリン感受性の上昇を介して糖新生の抑制が起こるとい

機構が考えられる。

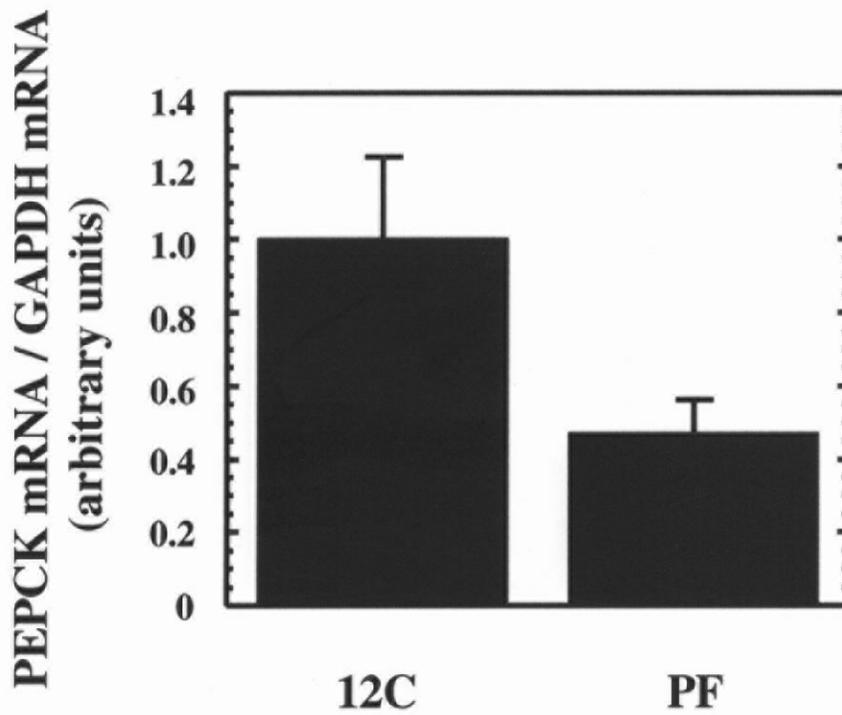
## 2：肝臓 FAS 遺伝子発現に対する食餌タンパク質の影響

肝臓 FAS mRNA 量の測定結果を、Fig. 3-1-2 に示す。肝臓 FAS mRNA 量は、PF 群では 12C 群の約 70%減少していた。したがって、FAS 遺伝子に関しては、PF 摂取により起こる IR および IRS-1,2 の up-regulation 以外の制御機構が関与していると考えられた。

**A**



**B**



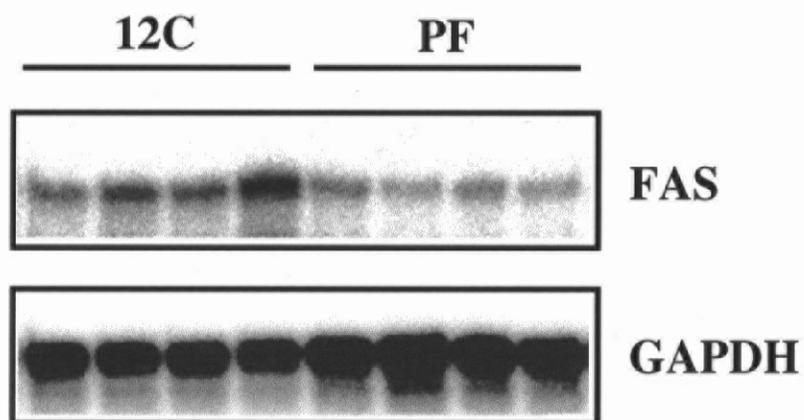
**Fig. 3-1-1**

**Effect of dietary protein on the gene expression of PEPCK in the liver. Rats were fed on 12C and PF diets for 7 days (8 h a day ad libitum) and for 1.5 h at 8th day.**

**A :** Representative bands of RNase protection assay.

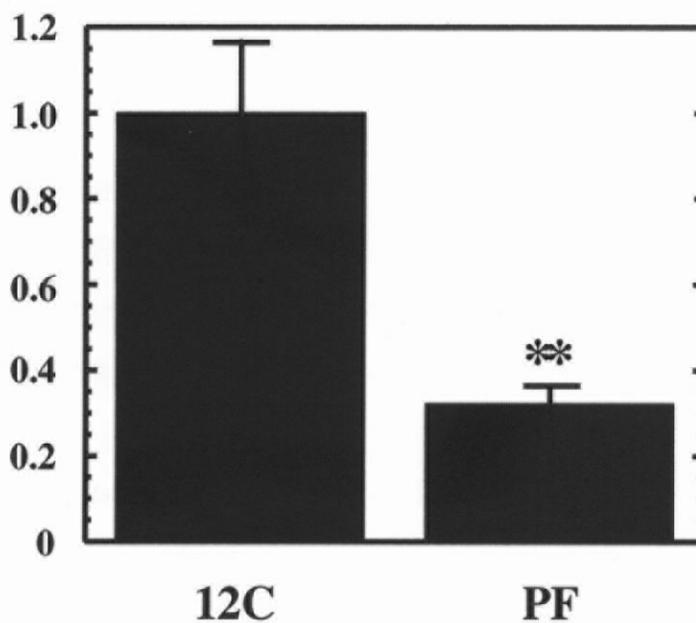
**B :** Quantitative analysis (n = 5).

**A**



**B**

FAS mRNA / GAPDH mRNA  
(arbitrary units)



\*\* , P < 0.01 vs. 12C

**Fig. 3-1-2**

**Effect of dietary protein on the gene expression of FAS in the liver. Rats were fed on 12C and PF diets for 7 days (8 h a day ad libitum) and for 1.5 h at 8th day.**

**A : Representative bands of RNase protection assay.**

**B : Quantitative analysis (n = 5).**

## 第二節 骨格筋におけるインスリンの糖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

#### Rat ヒラメ筋における 2-deoxy-D-glucose を用いたグルコース輸送の測定

第一章第三節の方法に従って飼育したラットの両脚よりヒラメ筋をネブタール麻酔下で摘出し、一方をインスリン刺激(12C+ or PF+)群、もう一方をインスリン無刺激(12C- or PF-)群とした。摘出したヒラメ筋は、Buffer A 4 ml 中で 35 °C で 60 分間プレインキュベートした後、新鮮な Buffer A または Buffer A に 10 nM インスリン添加したもの 4 ml 中で 35 °C で 30 分間インキュベート後、Buffer B または Buffer B に 10 nM インスリン添加したもの 4 ml 中で 29 °C で 12 分間、extracellular space からグルコースを除くために洗浄し、続いて、Buffer C または Buffer C に 10 nM インスリン添加したもの 4 ml 中で 29 °C で 20 分間インキュベート後、ヒラメ筋に付着している余分な Buffer をろ紙で吸い取り、速やかに液体窒素に浸けて取り込みを停止させた。その後、1 ml の水でヒラメ筋を 10 分間煮沸し、氷上で 1~2 分静置後、vortex でよく攪拌して、遠心分離 (12,000×g, 5 min, 4 °C) し、得られた上清 200 µl をクリアゾル 10 ml によく混和させ、液体シンチレーションカウンターで <sup>14</sup>C と <sup>3</sup>H の放射能を測定した。また同時に各々のヒラメ筋をインキュベートしていた incubation medium についても同様に、液体シンチレーションカウンターで <sup>14</sup>C と <sup>3</sup>H の放射能を測定した。各種 Buffer の組成は以下に示した。

#### **Krebs-Ringer bicarbonate Buffer (KRB)**

117 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 24.6 mM NaHCO<sub>3</sub>, 25 mM HEPES (pH 7.4 NaOH)

**Buffer A** KRB+8 mM glucose+32 mM mannitol+0.1% BSA (RIA grade : Sigma)

**Buffer B** KRB+40 mM mannitol+0.1% BSA

**Buffer C** KRB+8 mM 2-deoxy-D-[2,6-<sup>3</sup>H]-glucose (2.25 µ Ci / ml) (Amersham)

+30 mM D-[1-<sup>14</sup>C]-mannitol (0.3 µ Ci / ml) (Amersham)

+2 mM sodium pyruvate

+0.1% BSA

グルコースの取り込み量は以下のように計算した。total muscle water 値 (ml) は、筋湿量(g) から筋乾燥重量 (g) を引いた値であるが、実際にヒラメ筋 3 つ分を湿重量測定後、100 °C のオーブンで乾燥させて乾燥重量を出して total muscle water 値を算出したところ、どれも筋湿重量の約 80% であったので、以後 total muscle water 値は筋湿重量の 80% の値とした。extracellular water space 値 (ml) は、インスリン依存的に細胞内に取り込まれない糖の一つであるマンニトールの濃度を用いて算出した。すなわち、ヒラメ筋中のマンニトール濃度と incubation medium 中のマンニトール濃度が等しいという仮定から、ヒラメ筋中の  $^{14}\text{C}$  の放射能値 (dpm) と incubation medium 中の  $^{14}\text{C}$  の放射能値 (dpm) より算出した。intracellular water space 値 (ml) は、intracellular water space 値から extracellular water space 値を差し引いた値とし、extracellular water space 中のグルコース濃度と incubation medium 中のグルコース濃度が等しいという仮定から、incubation medium 中の  $^3\text{H}$  の放射能値 (dpm) より extracellular water space 中のグルコース濃度を算出し、その値をヒラメ筋中の  $^3\text{H}$  の放射能値 (dpm) から差し引いた値をヒラメ筋中に取り込まれたグルコース濃度とした。以上の方法は、Hansen らの方法を参考にした(Hansen, P. A. *et al*, 1994)。

### 3-2-2 結果

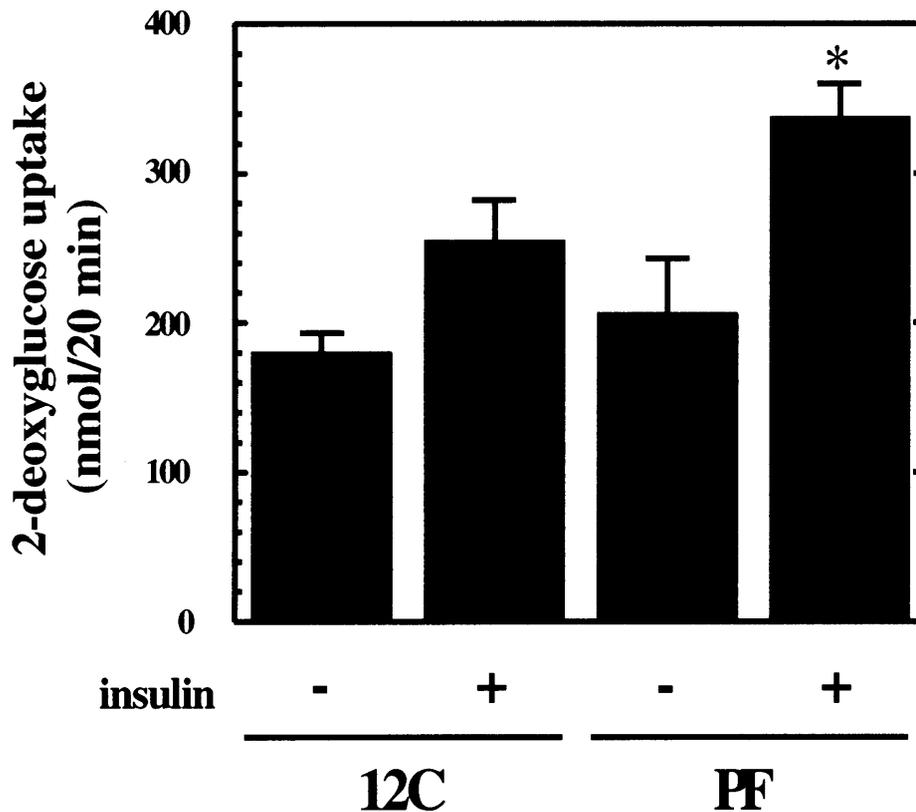
まず、Tabel 3-2-1 に 12C 群および PF 群のヒラメ筋湿重量を示した。PF 群のヒラメ筋湿重量は 12C 群の約 70% まで顕著に減少しており、これは体重減少に相関していた。2-deoxyglucose の取り込み量に関しては、Fig. 3-2-1 に示した。2-deoxyglucose の取り込み量は、インスリン無刺激状態の 12C-群と PF-群では同程度(12C- ;  $180.2 \pm 12.1$  nmol/20 min, PF- ;  $206.4 \pm 37.0$  nmol/20 min)であるが、各群ともにインスリン刺激によりその値は顕著に増加した。そして、インスリン刺激状態の 12C+群と PF+群で 2-deoxyglucose の取り込み量を比較すると、PF+群で 12C+群の約 1.3 倍に増加していた(12C+ ;  $254.5 \pm 27.3$  nmol/20 min, PF+ ;  $337.5 \pm 21.2$  nmol/20 min)。この結果は、骨格筋において観察された、PF 摂取による IRS-1,2 の up-regulation に対応し、PF 摂取により骨格筋のインスリン感受性が上昇するという仮定に対して矛盾がなかった。この実験は、別のラットを用いてもう一度行ったが、同様な結果が得られた。

**Table 3-2-1**

**Effect of dietary protein on soleus muscle weight.**

Groups	Soleus muscle weight (mg)
12C	100.3 ± 2.9
PF	76.8 ± 1.7 *

Data represent the mean ±S. E. for ten soleus muscles. \*, P < 0.01 vs. 12C



\*, P < 0.05 vs. insulin + of 12C

**Fig. 3-2-1**

**Effect of dietary protein on 2-deoxyglucose uptake in the soleus muscle. Rats were fed on 12C and PF diets for 7 days (8 h a day ad libitum).**

Data represent the mean ±S. E. for five soleus muscles.

### 第三節 考察

本章では、タンパク質栄養状態の悪化による IRS の変化が実際にインスリン生理作用を調節し得るのかを検討するために、肝臓ではインスリンによりその発現が制御されている PEPCK、FAS の遺伝子発現について、骨格筋ではインスリン依存性の糖取り込み量について検討した。その結果、肝臓での PEPCK mRNA 量は PF 摂取により減少し、PF 摂取による糖新生の抑制効果が考えられたが、FAS mRNA 量も PF 摂取により顕著に減少しており、インスリン作用の増強は観察されなかった。したがって、インスリンシグナルとは独立して、PF 摂取によって両遺伝子が抑制されるという可能性が考えられる。骨格筋におけるインスリン依存性の糖取り込み量は PF 摂取で増加し、末梢組織での糖利用に対して食餌タンパク質の効果が観察できた。

以下、組織ごとに、インスリン生理作用発現に対するタンパク質栄養状態の影響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の PEPCK および FAS 遺伝子発現の抑制

PEPCK 遺伝子発現は、インスリンにより抑制され、グルカゴンやグルココルチコイドにより亢進する。このインスリン作用は、PI3-キナーゼの活性化に依存しており、その下流の p70S6 キナーゼや MAP キナーゼは関係ないことが報告されている(Sutherland, C. *et al*, 1995、Gabbay, R. A. *et al*, 1996、Sutherland, C. *et al*, 1998)。本研究では、その効果は顕著でなかったものの、PEPCK 遺伝子発現が PF 摂取により抑制されることが明らかになった。このことから、PF 摂取による肝臓 IRS-1, -2 量の増加によりインスリンに対する応答性が上昇することによって、PI3 キナーゼの活性化の亢進が起こるであろうことが考えられる。また、PEPCK 遺伝子の上流にはインスリン応答領域が存在することが知られており、インスリンにより発現が抑制される glucose 6-phosphatase および IGFBP-1 遺伝子にも存在することが明らかになっている。したがって、これらの遺伝子発現も PEPCK 遺伝子と同様な情報伝達機構で制御されることが考えられる。近年、IGFBP-1 遺伝子のインスリンによる制御機構には、インスリンにより活性化された Akt/PKB が FKHR のリン酸化が関与していることが明らかになった(Cichy, S. B. *et al*, 1998、Guo, S. *et al*, 1999)。よって、インスリンによる PEPCK 遺伝子の制御にも Akt/PKB-FKHR が関与すると考えられた。しかし、その制御に Akt/PKB-FKHR は関与せず、GSK-3 が関与し

ているということが示された(Kotani, K. et al, 1999、Lochhead, P. A., 2001)。第一章で PF 摂取による肝臓 Akt1/PKB $\alpha$  の Ser473 のインスリン依存性リン酸化の PF 摂取による増加が観察されなかったことは、この知見を支持するとも考えられた。

FAS 遺伝子は、脂肪酸合成における律速酵素であり、その遺伝子発現はインスリンにより亢進する。したがって、PF 摂取に応じた肝臓 IRS-1, -2 量の増加によりインスリン応答性が上昇することにより、FAS 遺伝子発現の亢進が起こると予想していたが、本章の実験によりそれは抑制されていた。インスリンによる FAS 遺伝子の転写制御がどのような情報伝達系を経て行われるかは未知である。しかし最近 Yin らは、オカダ酸の作用によってインスリンによる FAS 遺伝子発現が阻害されることから、インスリンの FAS 遺伝子発現制御機構にはセリン/スレオニンの脱リン酸化反応が関与しているということを示した(Yin, D. et al, 2001)。彼らは、オカダ酸による IRS-1 のセリンリン酸化(Tanti, J.-F. et al, 1994)も FAS 遺伝子発現の阻害に関与していると考えているが、本研究において肝臓での IRS-1 のセリンリン酸化の変化は SDS-PAGE では観察されず、食餌タンパク質の影響はなかった。また、FAS 遺伝子を含んだ一連の lipogenic enzymes のインスリンによる転写活性化には、SREBP-1c の活性化を介することが示されている(Shimano, H. et al, 1999、Shimomura, I. et al, 1999、Foretz, M. et al, 1999)。この SREBP-1c は hyperinsulinemia による IRS-2 の減少によりその発現量が増加し、それに伴い脂肪酸合成が促進することが示されている(Shimomura, I. et al, 2000)。さらに IRS-2 ノックアウトマウスでは、SREBP-1 の発現量が増加し、さらにその下流にある FAS の発現量も増加していた(Tobe, K. et al, 2001)。このことから、インスリンの SREBP-1c を介した FAS 遺伝子発現の制御機構は、IRS 経路とは異なる可能性が考えられる。本研究において、PF 摂取により IRS-2 量の増加が起こっていたことから、SREBP-1c 量が 12C 摂取に比べて PF 摂取により低下している可能性が考えられ、それに伴い FAS 遺伝子発現が低下していたという可能性もある。さらに、慢性タンパク質欠乏が原因の Kwashiorkor 病の特徴的な症状として脂肪肝があるが、短期間のタンパク質欠乏では肝臓での脂質合成促進は起こらず、IRS を中心としたインスリン情報伝達経路が活性化されている状態を長期間維持することで徐々に促進されるのかもしれない。

## 2. タンパク質栄養状態の悪化による骨格筋のインスリン依存性糖取り込みの亢進

第二章の考察でも述べたが、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ことは代謝研究で明らかになっている。また、培養細胞系での研究においても、アミノ酸がインスリン依存性糖取り込みを抑制することが示された(Tremblay, F. *et al*, 2001)。そして本研究では、生体においても同様に、PF 摂取によってインスリン依存性糖取り込みが亢進するということを示し、これが血中アミノ酸濃度の低下による骨格筋 IRS-1, -2 のインスリン応答能の上昇を介していると予想された。さらに Tremblay らは L6 myotube 細胞を用いて、13 個のアミノ酸個々の、糖取り込みに対するインスリン作用の抑制効果を調べており、Cys、His、Leu、Thr および Tyr の効果が大きいことを示していた。これらのアミノ酸の効果を支持する研究を同じグループが報告している(Lavigne, C. *et al*, 2001)。彼らは、高脂肪食にカゼインもしくはタラのタンパク質を添加したものを 4 週間給餌したラットの骨格筋に関して、インスリン依存性の糖の取り込みを検討した。その結果、タラのタンパク質添加食群に比べてカゼイン添加食群の方がインスリン依存性糖取り込みは抑えられていた。タラのタンパク質添加食群とカゼイン添加食群の血中アミノ酸濃度組成を比べると、Tremblay らの実験でインスリン作用抑制効果が大きかったアミノ酸のうち、Cys を除いた全てにおいてカゼイン添加食群の方が高いレベルを示していた。したがって、タンパク質およびアミノ酸によるインスリン依存性糖取り込み抑制効果は、タンパク質の種類やそのアミノ酸組成によってその程度が異なることが考えられる。

## 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

前章までのラットを用いた実験系で、タンパク質栄養状態の悪化によりインスリン情報伝達初期因子である IR および IRS-1,2 の up-regulation が起こり、それらは肝臓と骨格筋では異なる機構で制御されていることが示唆された。しかし、その分子メカニズムをさらに詳細に解析するにはラットを用いた実験系では限界があり、これまでに明らかになった現象をよく反映したモデル系の確立が必須である。そこで本章では、骨格筋の IRS-1 で観察された現象、すなわち PF 摂取による IRS-1 の量の減少、セリンリン酸化の減少およびインスリン依存性チロシンリン酸化の増強効果に注目し、ラット由来の筋細胞である L6 myotube 細胞を用いてアミノ酸含有もしくは欠乏培地で培養し、それらの現象の再現を試みた。

### 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

##### L6 myoblast 細胞の培養および myotube への分化

ラット骨格筋由来 L6 myoblast (ATCC No. CRL1458、東京大学大学院農学生命科学研究科 高橋伸一郎助教授より御供与)は、通常未分化な myoblast の状態で培養されるが、分化誘導することにより筋肉に特徴的な性質をもった多核の myotube にまで最終分化する性質を有する細胞である。

まず L6 myoblast 細胞を CO<sub>2</sub> インキュベーター(37 °C、Air 95%/CO<sub>2</sub> 5%)中で、75 cm<sup>2</sup> フラスコ(IWAKI)を用い、10% fetal bovine serum (FBS ; Sigma)、100 U/ml penicillin (Invitrogen)および 100 µg/ml streptomycin (Invitrogen)を添加した Dalbecco's modified Eagle medium (DMEM ; Sigma)で subconfluent になるまで培養した。その L6 myoblast 細胞を 100 mm<sup>2</sup> dish(IWAKI)に約 1×10<sup>4</sup> Cells で播種し、10% FBS 添加 DMEM で 2 日間培養した。その後、2% FBS 添加 DMEM に切り替えて 10 日から 14 日間培養することにより myotube へと分化させた。この間、培地は 2 日おきに交換した。以下の実験では、この方法により約 70~80%分化した myotube を用いた。

### Cell lysate の調製

2% FBS 添加 DMEM で分化させた L6 myotube 細胞を、minimum essential medium (MEM) で 2 回洗浄後、同じ MEM で 24 時間培養して血清の影響を取り除いた。その後、終濃度 100 nM インスリンで 0、0.5、1、2、3、4、5、10 分間刺激した。インスリン刺激後、直ちに氷冷 PBS(-) で洗浄後、液体窒素で dish ごと急凍して反応を停止させた。それから、750  $\mu$ l の氷冷 Lysis Buffer [50 mM HEPES-NaOH (pH 7.4), 2.5 mM EDTA, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 100 mM NaF, 1 mM PMSF, 2  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ g/ml pepstatin, 1  $\mu$ g/ml leupeptin, 1% Triton X-100] で可溶化し、遠心分離(11,000 $\times$ g, 3 min, 4  $^{\circ}$ C)後、上清を分取した。以上の cell lysate の調製は、Kato らの方法を参考にした(Kato, H. *et al*, 1993)。

### 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。

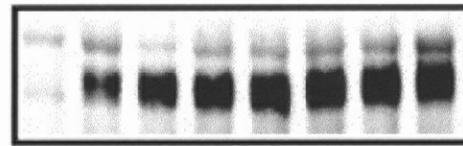
## 4-1-2 結果

L6 myotube 細胞のインスリン刺激に応答した IRS-1 のチロシンリン酸化の時間的変化を、Fig. 4-1-1 に示した。IRS-1 のインスリン依存性チロシンリン酸化は、インスリン刺激後 3~4 分後に最大に達した(Fig.4-1-1 A 上, Fig.4-1-1 B)。また、インスリン刺激時間 4 分以降では後になるほど IRS-1 の泳動度が減少する傾向が観察された(Fig. 4-1-1 A 下)。ラットの骨格筋と同様に、L6 myotube 細胞でもインスリンの長時間刺激による IRS-1 のセリンリン酸化の増加が起こることが示された。

以上の結果から、以後のアミノ酸含有もしくは欠乏培地で培養した L6 myotube 細胞をインスリン刺激する際には、刺激時間 3 分にすることにした。

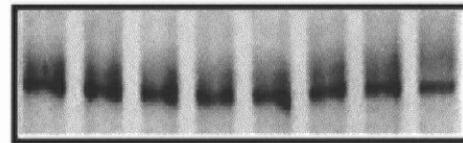
**A****Time of insulin stimulation (min)**

0 0.5 1 2 3 4 5 10



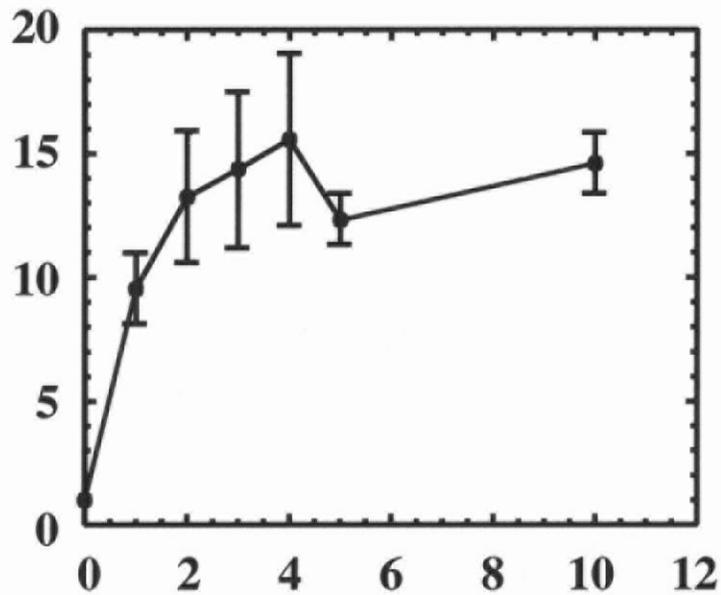
Blot

anti-pY



anti-IRS-1

IP : anti-IRS-1

**B**Tyrosine phosphorylated IRS-1  
(arbitrary units)

Time of insulin stimulation (min)

**Fig. 4-1-1****Time course of tyrosine phosphorylation of IRS-1 in L6 myotube.**

A : Representative blots of immunoblotting analyses.

B : Quantitative analysis (n = 3).

## 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

### 4-2-2 方法

#### L6 myoblast 細胞の培養および myotube への分化

「4-1-1 方法」で示したのと同様に行った。

#### 24 時間アミノ酸欠乏培地で培養した L6 myotube 細胞の cell lysate の調製

2% FBS 添加 DMEM で分化させた L6 myotube 細胞を、1×アミノ酸含有 MEM (1×AA+)もしくはアミノ酸欠乏(AA-)に切り替えて 24 時間培養した。各 MEM に切り替える際は、2 回各培地で洗浄した。その後、終濃度 100 nM インスリンで 3 分間刺激し、それから直ちに氷冷 PBS(-)で洗浄し、液体窒素で dish ごと急凍して反応を止めた。以後の操作は、「4-1-1 方法」で示したのと同様に行った。また、第三章の pair-feeding ラットを用いた実験で、血中アミノ酸濃度の差が大きいと考えられるほど、インスリン情報因子に対するタンパク質栄養状態の影響が顕著に観察されるということが明らかになったので、4 倍濃度のアミノ酸含有 MEM(4×AA+)で培養した L6 myotube についても同様に検討した。AA+に含まれるアミノ酸組成は次のとおりである。1×amino acids concentration for MEM : L-Arginine 6320 mg/L, L-Cystine 1200 mg/L, L-Glutamine 292 mg/L, L-Histidine·HCl·H<sub>2</sub>O 2100 mg/L, L-Isoleucine 2620 mg/L, L-Leucine 2620 mg/L, L-Lysine·HCl 3625 mg/L, L-Methionine 755 mg/L, L-Phenylalanine 1650 mg/L, L-Threonine 2380 mg/L, L-Tryptophan 510 mg/L, L-Tyrosine 1800 mg/L, L-Valine 2340 mg/L

#### 6 時間アミノ酸欠乏培地で培養した L6 myotube 細胞の cell lysate の調製

2% FBS 添加 DMEM で分化させた L6 myotube 細胞を、1% BSA および 20 mM HEPES を添加して pH7.4 に NaOH で調整した DMEM で 2 回洗浄後、同じ培地で 18 時間培養し、さらに 1×アミノ酸含有 MEM (1×AA+)もしくはアミノ酸欠乏(AA-)に切り替えて 6 時間培養した。各 MEM に切り替える際は、2 回各培地で洗浄した。その後、終濃度 100 nM インスリンで 3 分間刺激した後、直ちに氷冷 PBS(-)で洗浄し、液体窒素で dish ごと急凍して反応を止めた。以後の操作は、「4-1-1 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。

## イムノプロットティング

「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。

## 4-2-2 結果

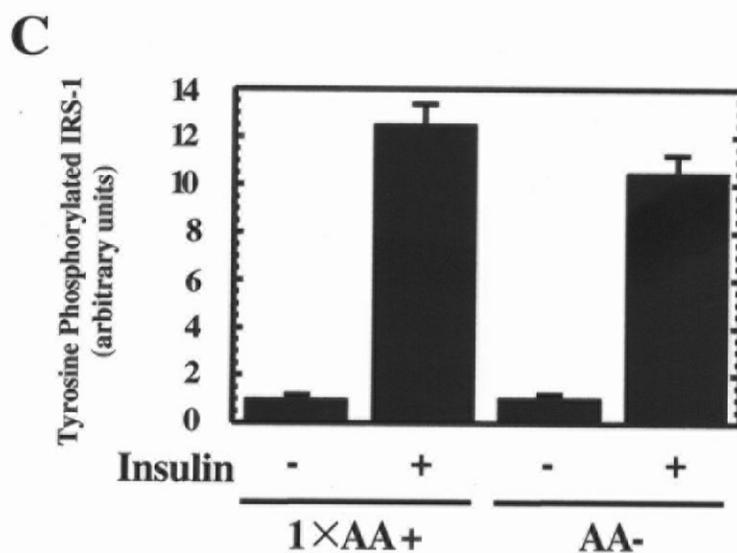
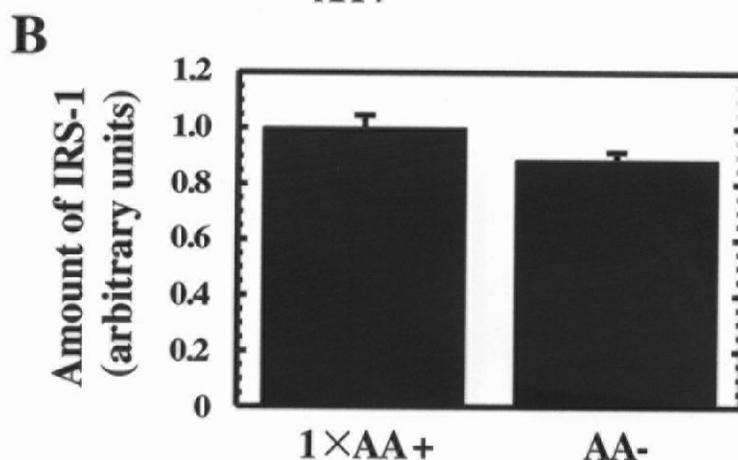
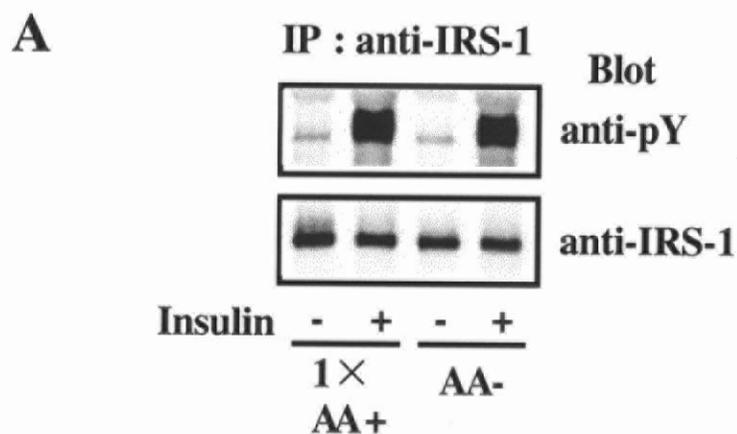
### 1 : L6 myotube 細胞において 24 時間アミノ酸欠乏状態が IRS-1 に及ぼす影響

24時間アミノ酸含有もしくは欠乏培地で培養したL6 myotube 細胞のIRS-1について、1×AA+群とAA-群を比較した結果はFig.4-2-1に、4×AA+群とAA-群を比較した結果はFig. 4-2-2に示した。培養時間24時間では、培地中アミノ酸の有無およびアミノ酸濃度の差は、L6 myotube 細胞のIRS-1には影響を与えなかった。

### 2 : L6 myotube 細胞において 6 時間アミノ酸欠乏状態が IRS-1 に及ぼす影響

6時間アミノ酸含有もしくは欠乏培地で培養したL6 myotube 細胞のIRS-1についてのイムノプロットの結果をFig. 4-2-3に示した。24時間培養した場合と異なり、1×AA+群とAA-群でIRS-1のバンドシフトが確認された。1×AA+群でIRS-1の泳動度の減少が起こり、見かけの分子量が増加していることから、アミノ酸によりIRS-1のセリンリン酸化が増加することが考えられた。この結果は、ラットを用いた実験でみられたPF摂取によりIRS-1のセリンリン酸化が減少するという結果と一致していた。しかし、6時間の培養ではIRS-1の量およびインスリン依存性チロシンリン酸化には影響を与えなかった。

以上の結果から、食餌タンパク質によるIRS-1のセリンリン酸化状態の変動に関してはL6 myotube 細胞で再現でき、この培養条件でのIRS-1セリンリン酸化機構の解析が可能となった。



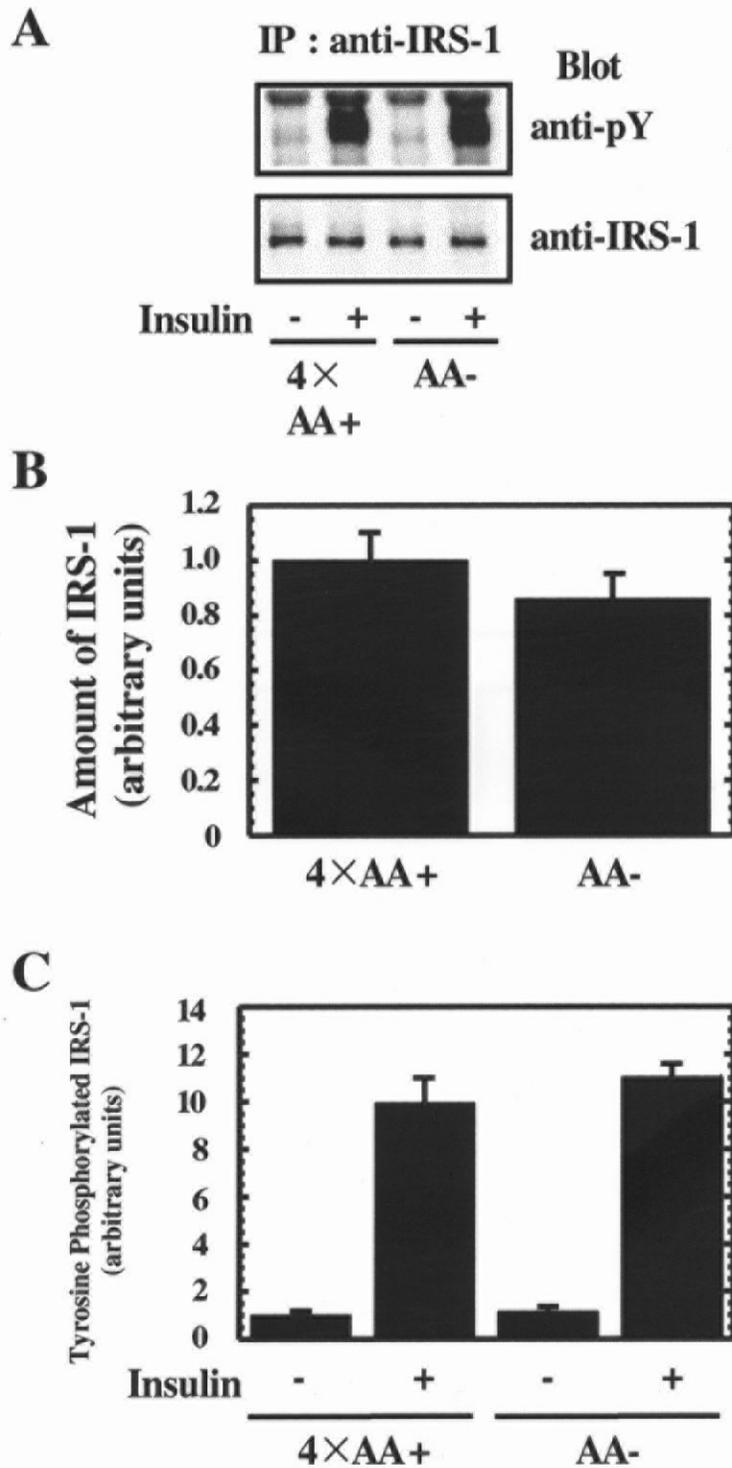
**Fig. 4-2-1**

Effect of amino acids on the amount, the serine phosphorylation and the insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1 in L6 myotube. Cells were incubated in 1×AA+ or AA- medium for 24 h.

A : Representative blots of immunoblot analyses.

B : Quantitative analysis for the amount of IRS-1 (n = 6).

C : Quantitative analysis for the tyrosine phosphorylated IRS-1 (n = 3).



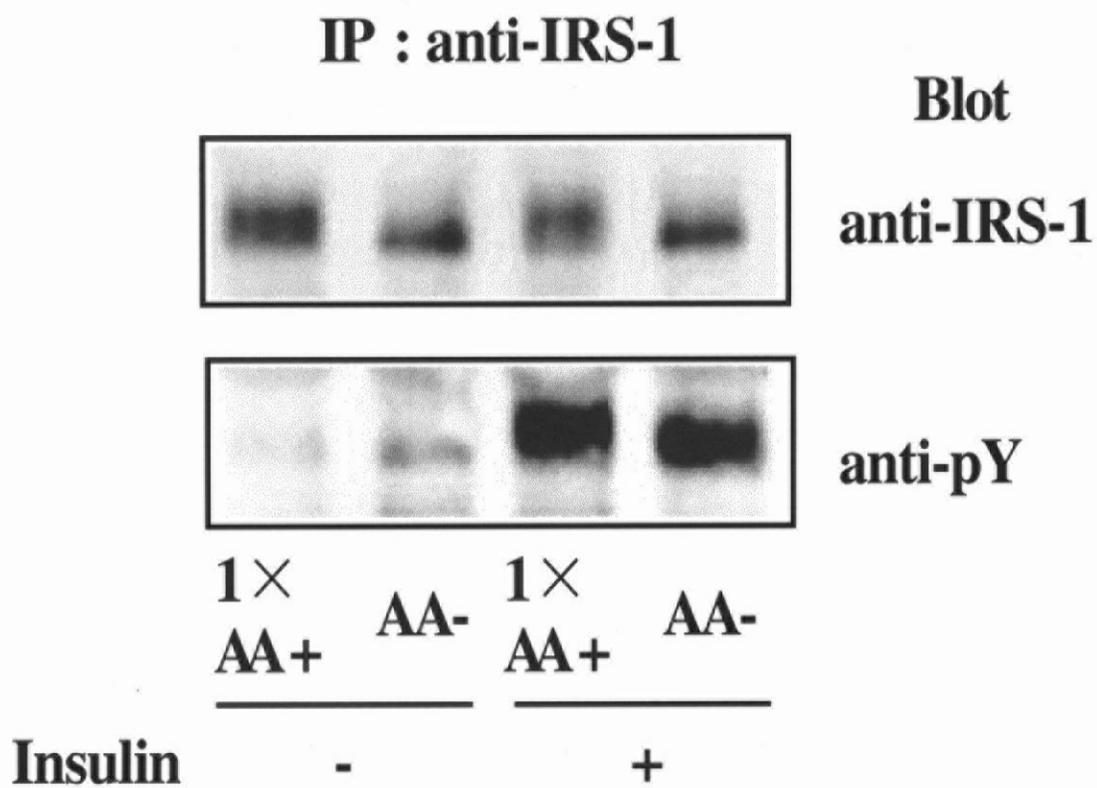
**Fig. 4-2-2**

Effect of amino acids on the amount, the serine phosphorylation and the insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1 in L6 myotube. Cells were incubated in 4×AA+ or AA- medium for 24 h.

A : Representative blots of immunoblot analyses.

B : Quantitative analysis for the amount of IRS-1 (n = 6).

C : Quantitative analysis for the tyrosine phosphorylated IRS-1 (n = 3).



**Fig. 4-2-3**

**Effect of amino acids on the amount, the serine phosphorylation and the insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1 in L6 myotube. Cells were incubated in  $1\times$  AA+ or AA- medium for 6 h.**

### 第三節 考察

本章では、タンパク質栄養状態の悪化に伴い起こった現象の分子メカニズムを詳細に解析するために、その現象を培養細胞のモデル系で再現することを試みた。特に骨格筋における IRS-1 の現象に注目し、ラット由来の筋細胞である L6 myotube 細胞を用いて、無血清のアミノ酸含有もしくは欠乏 MEM 培地で 24 時間培養した場合と、18 時間無血清 DMEM 培地で培養後、無血清のアミノ酸含有もしくは欠乏 MEM 培地で 6 時間培養した場合の IRS-1 の量、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ついて検討した。その結果、24 時間培養ではアミノ酸の影響は観察できず、アミノ酸濃度の増加によっても IRS-1 の状態は変化しなかったが、6 時間培養でアミノ酸による IRS-1 のバンドシフトが観察された。この培養条件においては IRS-1 量およびインスリン依存性チロシンリン酸化に関しては変化が見られなかったため、さらなる培養条件の検討が必要であるが、この培養条件での IRS-1 のセリンリン酸化機構の解析が可能となった。

培養細胞系において、アミノ酸の IRS-1 への影響を検討している研究は、先にも紹介した Patti ら(1998)、Takano ら(2001)および Tremblay ら(2001)の 3 つが挙げられる。それぞれの培養条件に関して比較する。Patti らは、subconfluent から 12~18 時間 0.5%BSA 添加 RPMI 1640 で培養後、アミノ酸含有もしくは欠乏 RPMI 1640 で 1 時間培養した Fao hepatoma 細胞を用いている。この時の培地中アミノ酸濃度および組成は、絶食時におけるラット門脈血に合わせている。彼らは、アミノ酸存在下においては IRS-1 のインスリン依存性チロシンリン酸化の増強を観察しているが、セリン/スレオニンのリン酸化によるバンドシフトは観察していない。Takano らは、3T3-L1 細胞を 16 時間無血清条件で培養後、MEM 完全培地もしくはアミノ酸欠乏 MEM で 1 時間培養して実験に用いた。その結果、インスリン長時間刺激による IRS-1 のセリンリン酸化の増加とそれに続いて起こる分解が、アミノ酸欠乏では抑制されていた。彼らは短時間のインスリン刺激に対する IRS-1 の応答に関しては検討していない。Tremblay らは、L6 myotube 細胞を 4 時間無血清条件下で培養後、Takano らと同様にアミノ酸添加もしくは欠乏 MEM で 1 時間培養して実験に用いた。彼らは、Takano らと同様な知見を得ており、さらにインスリンシグナルの伝達に重要な短時間刺激に対する IRS-1 の応答にはアミノ酸の影響がないとしている。ここで、Takano らと Tremblay らの実験は、長時間のインスリン刺激により誘導される IRS-1 のセリンリン酸化と分解に対するアミノ酸の影響を検討している点で、本研究および Patti

らの実験の検討とは異なる。しかし、アミノ酸の IRS-1 に対する down-regulation 効果という点では一致している。以上のように、上記のいずれの実験もアミノ酸欠乏時間は 1 時間であった。したがって、本章の実験で検討したアミノ酸欠乏時間の 6 時間よりさらに短時間における検討が重要であると考えられる。また、24 時間アミノ酸欠乏を維持した場合には、細胞自体がその環境に適応してしまっていて、アミノ酸の影響を観察できなくなっているとも考えられる。

## 総合討論

本研究では、生体において、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及ぼすか、インスリンの主な標的組織である肝臓と骨格筋において検討を試みた。その結果、得られた現象を下記の表にまとめた。

### Summary of the effect of protein malnutrition on insulin signal transduction

		PF			
<b>Body weight</b>		↓			
<b>Food intake</b>		↓			
<b>Plasma insulin</b>		↓			
		PF Muscle	Dependency on Basal Insulin Level	PF Liver	Dependency on Basal Insulin Level
<b>IRS-1</b>	<b>Amount pY/Protein</b>	↓	<b>Yes or No</b>	↑	<b>No</b>
	<b>pS612</b>	↑	<b>No</b>	↑?	
	<b>Mobility shift</b>	↓↓	<b>No</b>	?	
	<b>mRNA</b>	+	<b>No</b>	—	
<b>IRS-2</b>	<b>Amount pY</b>	?	<b>Yes or No</b>	↑	<b>No</b>
	<b>mRNA</b>	↑	<b>Yes or No</b>	↑	<b>No</b>
		↑	<b>Yes or No</b>	↑	<b>Yes</b>

このようにタンパク質栄養条件の悪化に伴い、肝臓および骨格筋で主に IRS に対して異なる up-regulation 機構が働き、インスリンに対する応答性が上昇することが明らかになった。さらに、最終的にこれらの IRS の up-regulation 効果に対応して、骨格筋ではインスリン依存性糖取り込みの促進が起こることが明らかになった。一方肝臓では、インスリンによる糖取り込み促進効果は小さい器官であるため、PEPCK と FAS 遺伝子の発現について検討を行ったが、両者ともにその遺伝子発現は減少していた。よって、PEPCK に関しては IRS の変化が反映すると考えられたが、FAS に関しては IRS 以外の別の制御機構が関与していると考えられた。

以下では、これらの結果をふまえて、タンパク質栄養状態の悪化による IRS の up-regulation 効果へのホスファターゼ系の関与、糖尿病治療におけるタンパク質栄養の重要性およびインスリンとタンパク質栄養状態で変動する他のホルモンの相互作用の可能性について討論したい。

## 1. タンパク質栄養状態の悪化による IRS の up-regulation 効果に対するホスファターゼ系の関与

第三章において、IRS のセリンリン酸化の変化を仲介する因子について検討を行ったが、PKC や  $\text{TNF}\alpha$  については、その候補としての可能性は低いと考えられた。MAPK ファミリーが IRS-1 のセリンリン酸化に関与するという報告(De Fea, K. *et al*, 1997 b, Aguirre, V. *et al*, 2000, Rui, L. *et al*, 2001 b)があり、アミノ酸の欠乏に応答して ERK1/2 や JNK1 が活性化されるという報告もある(Franchi-Gazzola, R. *et al*, 1999)。しかし、今回の実験ではタンパク質栄養状態による ERK1/2 の変動は観察できず、IRS-1 のセリンリン酸化への関与の程度は未知である。

一方、インスリン作用は、情報伝達経路でキナーゼ系による制御の他にホスファターゼ系によっても制御されている。

オカダ酸は、セリン/スレオニンホスファターゼのうち、プロテインホスファターゼ 1 および 2A の阻害剤である。序章や第三章考察でも少し触れたが、Tanti らによってオカダ酸の作用が IRS-1 のセリンリン酸化を増加させ、IR や IRS-1 のインスリン依存性チロシンリン酸化や PI3 キナーゼの活性化を抑制することが示されている。したがって、生体において、セリン/スレオニンホスファターゼとセリン/スレオニンキナーゼのバランスによって、IRS-1 の状態を制御していることが考えられる。本研究において、骨格筋 IRS-1 のセリンリン酸化状態に関与する因子として、セリン/スレオニンキナーゼ系に注目したが、セリン/スレオニンホスファターゼ活性についても今後の重要な検討課題と考える。

プロテインチロシンホスファターゼもチロシンの脱リン酸化により、インスリン情報伝達因子に対して負の制御をしていることが知られている。中でも PTP-1B は、IR や IRS-1 をチロシン脱リン酸化して不活性化することが明らかになり、インスリン抵抗性に関与していることが明らかになっている(Elchebly, M. *et al*, 1999, Goldstein, B. J. *et al*, 2000)。PTP-1B ノックアウトマウスを用いた検討では、骨格筋でのインスリンによる糖取り込みが促進したが、白色脂肪細胞では影響を与えなかったことから、PTP-1B はインスリン感受性に対して組織特異的に影響を及ぼしていると考えられている(Klaman, L. D. *et al*, 2000)。このような知見から、PF 摂取ラットから摘出したヒラメ筋のインスリン依存性糖取り込み促進効果の亢進に対しても、IRS-1 のセリンリン酸化の減少だけでなく、PTP-1B の発現量の減少もしくは活性の低下も関与している可能性が考えられる。

さらに、インスリン刺激により活性化される PI3 キナーゼの産物であり、セカンドメッ

センジャーとして機能している、PI(3, 4, 5)P<sub>3</sub> を分解する酵素として、SHIP2 や PTEN がある。SHIP2 は 5-ホスファターゼであり、SHIP2 ノックアウトマウスは出生するが、インスリン感受性の亢進により高度な低血糖を示し、すぐ死んでしまう。SHIP2 の発現量が少ない SHIP2<sup>-/-</sup>マウスを用いた解析では、耐糖能が亢進し、骨格筋での GLUT4 のトランスロケーションやグリコーゲン合成の促進を伴ったインスリン感受性の亢進が観察された(Clément, S. *et al*, 2001)。したがって、SHIP2 はインスリン作用を負に制御する因子であることが明らかになった。PTEN は 3-ホスファターゼ活性を持った酵素である。PTEN を過剰発現させた 3T3-L1 細胞では、Akt や p70S6 キナーゼのインスリンによる活性化に続き、インスリン依存性 GLUT4 のトランスロケーションや糖取り込みも抑制されていた(Nakashima, N. *et al*, 2000)。このとき、インスリン依存性 IR や IRS-1 のチロシンリン酸化には影響がなかった。このように PTEN はインスリン作用を抑制する働きがあると認識されていたが、最近、PTEN が TNF $\alpha$ により誘導される IRS-1 のセリンリン酸化やそれに伴い起こるインスリン依存性チロシンリン酸化の減少を抑制することが明らかになった(Ozes, O. N. *et al*, 2001)。このような SHIP や PTEN の作用が、タンパク質栄養状態により変動し、インスリン情報伝達系に影響を与える可能性もある。

以上のような知見より、タンパク質栄養状態によるホスファターゼ系の変化を把握することも、インスリン情報伝達経路への影響を考える上では不可欠であると考えられる。

## 2. 糖尿病治療におけるタンパク質栄養の重要性

糖尿病の罹病期間が長くなると、合併症が発症・進展する。糖尿病性腎症は糖尿病合併症の一つであり、その発症や進展に関わる最も重要な危険因子は高血糖と高血圧であることが知られている。また、糖尿病性腎症は、慢性腎不全の主要な原疾患である。慢性腎不全の患者は、尿毒症の改善しや腎不全の進行速度および透析導入開始の遅延の目的で、食餌タンパク質摂取量が制限される。その上、体内の栄養素の維持と充実のために食物中のタンパク質の有効利用と適切なエネルギー摂取が必要である。低タンパク質食においては、十分なカロリー摂取のために炭水化物によるエネルギー依存度が大きくなり、過剰な糖摂取により糖代謝に悪影響を及ぼしかねない。しかし、経口糖負荷試験や高インスリン正常血糖クランプ試験により、低タンパク質食摂取により慢性腎不全患者のインスリン感受性が増加する上に、インスリンクリアランスも上昇することが示された(Rigalleau, V. *et al*, 1998)。したがって、上記の心配とは裏腹に、低タンパク質食摂取により糖代謝が改善

されることが明らかにされた。この臨床における知見は、本研究において観察された PF 摂取における肝臓および骨格筋での IRS を介したインスリン応答性の向上と対応する。以上のことより、糖尿病患者に対してはタンパク質欠乏による異化の亢進を念頭に置いて食餌タンパク質を適度に制限することによって、その症状が改善すると考えられる。さらに、高血糖によるヘキソースアミン生合成経路の活性化に伴う糖タンパク質の増加が腎臓障害を引き起こすことも明らかになっている。第二章考察でも述べたように、このヘキソースアミン生合成経路の活性化にアミノ酸も関与していることが示されており、この側面からも低タンパク質食は糖尿病の改善に有効であると考えられる。しかし、慢性腎不全患者で低タンパク質摂取により安息時エネルギー消費量が増加することが観察されており、さらに腎不全の進行と共に食欲が低下して栄養状態が悪化する上に、食餌タンパク質を制限している場合には食欲が低下して十分なエネルギー摂取が出来ず、栄養不良に陥りやすい。特に透析患者では、透析によって多量のアミノ酸が喪失するので、厳密な食餌タンパク質制限は重篤な栄養失調を引き起こし、危険である。したがって、慢性腎不全患者に食餌タンパク質を制限する上では、栄養不良を起こさないように、厳密な栄養指導が必要であると考えられている。したがって、糖尿病、糖尿病腎症、慢性腎不全から透析導入への病気の進行に伴って、食餌タンパク質のコントロール法を変化させる必要があると考えられている(Aparicio, M. *et al*, 2001、椿原 美治, 2001)。このように、タンパク質栄養の制御は糖尿病およびその合併症の治療に新たな方向性を寄与すると考えられ、タンパク質栄養が糖代謝へ与える影響を分子レベルで検討することは非常に重要である。本研究では主に IRS に対するタンパク質栄養状態の影響を検討したが、インスリンの糖代謝制御作用伝達を担っている他の因子に対する影響は未知であり、今後の更なる解析が期待される。

### 3. インスリンとタンパク質栄養状態により変動する他のホルモンの相互作用の可能性

タンパク質栄養状態の悪化により劇的に血中濃度が低下するホルモンとして、インスリン様成長因子 (IGF-I) が挙げられる(Takahashi, S. *et al*, 1990)。IGF-I はインスリンと異なり、血中では大部分が遊離型で存在せず、特異的な結合タンパク質(IGFBPs)と結合した状態で存在する。そして、IGFBPs と結合した IGF-I は、生理活性を示さない。このように、IGF-I の生理活性を調節している IGFBPs もタンパク質栄養状態により変動することが明らかになっている(Umezawa, T. *et al*, 1991)。IGFBP-3 は、acid-labile subunit (ALS) と IGF-I と三量体を形成し、それは血中における IGF-I の貯蔵型である。この IGFBP-3

の血中濃度は、タンパク質栄養状態の悪化に伴って減少する。一方、IGFBP-1の血中濃度は、タンパク質栄養状態の悪化に伴って増加する。それに伴い、遊離型IGF-Iと結合が増加し、IGFBP-1に結合したIGF-Iは速やかに血中から消去されることも明らかになっている(Thissen, J. P. *et al*, 1992)。このようなIGF-IおよびIGFBPsの制御によって、タンパク質栄養状態が良いときにはIGF-I活性をさらに上昇させる方向に、悪いときにはさらに低下させる方向に働いていると考えられている(竹中 麻子, 1998)。さらに、IGF-Iのシグナルは、インスリンレセプターと同様な構造をもったIGF-Iレセプターを介して細胞内へ伝達される。その細胞内伝達経路の大部分は、インスリンレセプターの情報伝達系と同様である。したがって、タンパク質栄養状態により変動するIRS-1, -2の制御に対して、同様にタンパク質栄養状態によって制御されているIGF-Iも関与しているであろうことが予想できる。培養細胞系において、IGF-Iはインスリンと同様に、PI3キナーゼを介してIRS-1のSer307をリン酸化することが報告されている(Rui, L. *et al*, 2001 b)。したがって、本研究において12C群で観察された骨格筋IRS-1のセリンリン酸化の増加の一つの原因として、高い血中IGF-Iレベルが関与している可能性もある。IRS-1のSer612のリン酸化にも、IGF-Iの関与が考えられる。また、Ruiらの結果を考慮に入れると、12C群ではIRS-1のSer307もリン酸化されている可能性が考えられる。最近、Ser307はIRS-1のPTBドメインの近傍にあるため、それがリン酸化されるとIRとの結合阻害が起こるといことが示された(Aguirre, V. *et al*, 2002)。したがって、良いタンパク質栄養状態の骨格筋IRS-1では、IGF-IシグナルとのクロストークによりSer612やSer307等のリン酸化が起こり、低栄養状態の場合と比べてIRとの結合やPI3キナーゼとの結合が抑制されるという仮説が考えられる。IRS-1のセリンリン酸化により、IGF-Iの情報伝達も抑制されると考えられるが、IGF-Iの生理作用として重要な増殖促進作用のシグナル伝達にはIRS-1を介さず、他の基質を介して伝達している可能性が高いと考えられる。また、IGF-Iとのクロストークという側面から考えると、IRS-1のセリンリン酸化が肝臓では観察されなかったことの説明ができる。すなわち、IGF-Iの主な産生組織である肝臓では、IRに対してIGF-Iレセプターの発現が非常に少ないので、IGF-Iシグナルがクロストークするとは考えにくい。

次に、IGF-Iの分泌を制御しているGHのシグナルとの相互作用について考察する。GHレセプターは、リガンドの結合により二量体化し、JAKによってチロシンリン酸化されたSTATによりシグナルを伝える。本論文の序章でも少し述べたが、GHはIRS-1, -2に作用

することが知られている。すなわち、一晩絶食させたラットの門脈から GH を注入すると JAK2 の活性化がおこり、そのチロシンキナーゼ活性の上昇により、IRS-1, -2 がチロシンリン酸化されることが明らかになっている(Thirone, A. C. P. *et al*, 1998)。一方、GH のトランスジェニックマウスの骨格筋では、IR の量の減少、IR および IRS-1 のインスリン依存性チロシンリン酸化の抑制、PI3 キナーゼのインスリンによる活性化の抑制が起こることが示された。したがって、これらのインスリン情報伝達系の down-regulation 効果が、GH 過剰によりおこる hyperinsulinemia やインスリン抵抗性に関与していると考えられている(Dominici, F. P. *et al*, 1999)。さらに、肝臓特異的 *igf-1* ノックアウトマウスでは骨格筋のインスリン感受性が低下していた(Yaker, S. *et al*, 2001)。それは、血中 IGF-I 濃度の減少に伴って negative-feedback 制御が働き、下垂体からの GH の分泌を促進して、血中 GH 濃度が上昇していたことによると Yaker らは考察している。この GH 分泌過剰により、膵島β細胞の増加によるインスリン分泌過剰が起こり、さらに骨格筋の IR および IRS-1 のインスリン依存性チロシンリン酸化の抑制が起きていた。以上のような知見から、GH 過剰状態により、何らかのセリン/スレオニンキナーゼの活性化が引き起こされ、IR や IRS-1 のセリンリン酸化を増加させ、インスリン応答性を低下させているということが考えられる。今回の実験では、血中 GH 濃度の測定は行っていないが、今回のような条件では大きな変動はないという結果が観察されている(黒田, 2000)。低タンパク質食で血中 GH 濃度が減少するという報告もあるが(Harel, Z. *et al*, 1993)、GH の振動型分泌様式などを考慮に入れると、正確な解析は難しい。

さらに、摂食抑制因子として知られるレプチンもインスリン作用との関連が注目されている。現在までに、レプチンやレプチンレセプターが欠損している *ob/ob* マウス、*db/db* マウスはインスリン抵抗性を呈すること、レプチンレセプターは中枢以外に肝臓、脂肪組織、骨格筋といったインスリンの標的組織にも存在すること(Takaya, K. *et al*, 1996、Friedman, J. M. *et al*, 1998)、レプチンは IRS-1 も活性化すること(Björbæk, C. *et al*, 1997)などが報告されている。しかし、レプチンとインスリンのクロストークについて報告されている現象を見ると、レプチンがインスリンのシグナルを増強する(Berti, L. *et al*, 1997、Kellerer, M. *et al*, 1997、Szanto, I. *et al*, 2000)といったものと、逆に抑制する(Burcelin, R. *et al*, 1999、Rossetti, L. *et al*, 1997、Liu, L. *et al*, 1998、Cohen, B. *et al*, 1996、Sweeney, G. *et al*, 2001) といったものがあり、統一した見解に至っていない。いずれにしても、タンパク質栄養状態の変化は、IRS の変化を介して、インスリンのみなら

ずレプチンの作用をも修飾している可能性があり、逆に IRS の変化の原因として、レプチンの作用の変化も関与しているという仮定も有り得る。

以上のように、タンパク質栄養状態で変動し得るホルモンのインスリン情報伝達系への相互作用の可能性について討論した。上記 3 つのホルモン以外にも、インスリンシグナルと相互作用し得るホルモンやサイトカインがあり、それらのホルモンがタンパク質栄養状態に応答して変動し得るかどうか興味深い点である。

#### 4. 総括

本研究により、インスリン情報伝達経路の上流段階でのアミノ酸とインスリンのシグナルの相互作用を *in vivo* において初めて明らかにした。また、アミノ酸による末梢組織での糖利用の阻害作用には IRS を介した制御機構が関与していることも明らかにした。また、食餌タンパク質制限の巧みなコントロールが糖尿病治療に効果的であるという可能性を分子レベルで示すことができた。

最後に、Tremblay らの L6 myotube 細胞を用いた知見を併せて、Fig. 5-1 に示したような 12C 摂取による骨格筋 IRS-1 のセリンリン酸化増加機構の仮説を考えた。しかし、アミノ酸による IRS-1 のセリンリン酸化に、mTOR キナーゼや mTOR が制御するセリン/スレオニンキナーゼ、および IGF-I が関与するかどうかは、今後解明していかなければならない課題である。それと共に、タンパク質栄養状態によるホルモン、サイトカインおよびホスファターゼ系の動向を把握することで、糖尿病発症の分子メカニズムに対してもより深い理解を与えるものと期待される。

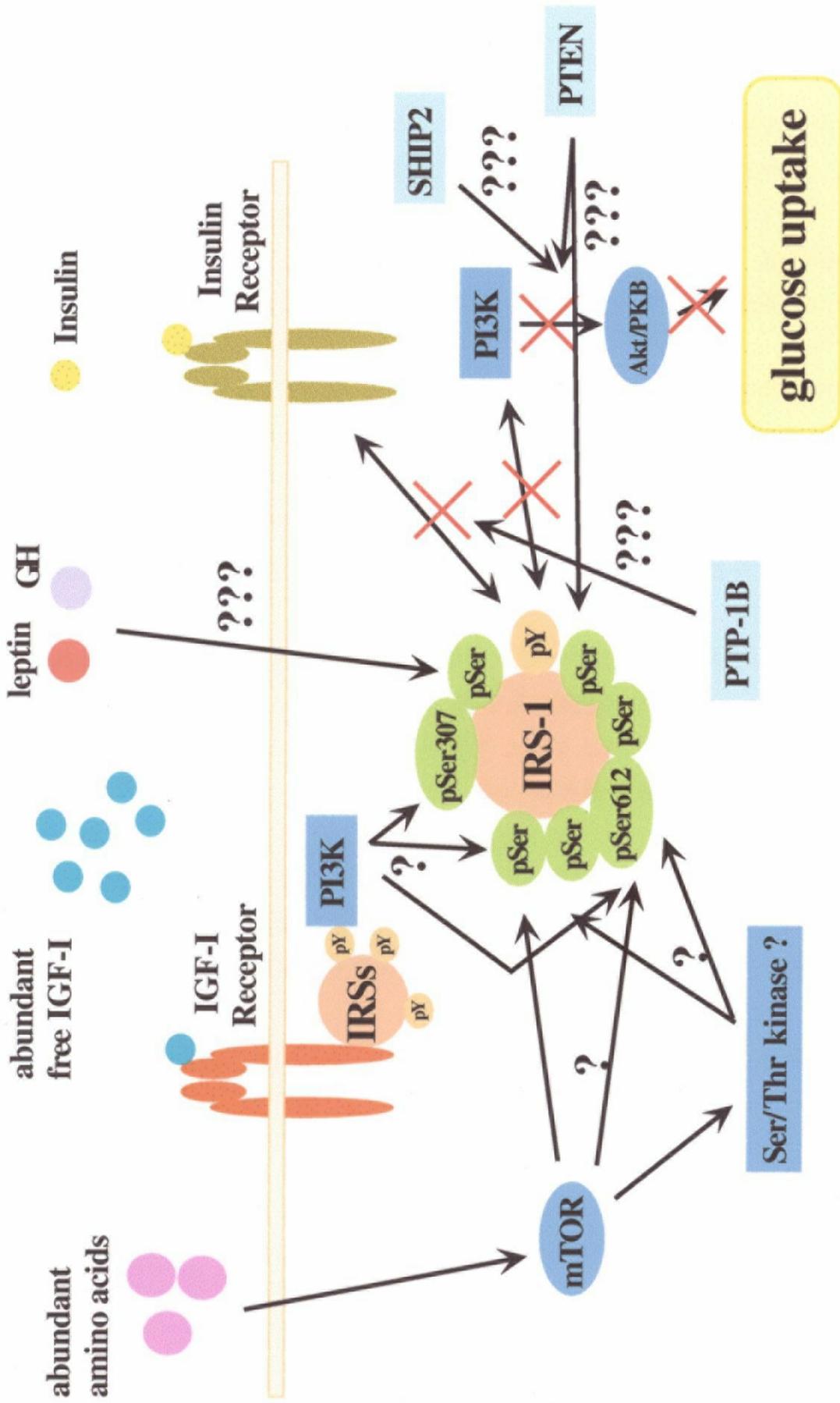


Fig. 5-1 Proposed mechanism of IRS-1 serine phosphorylation induced by 12C intake.

## 謝辞

本研究は東京大学大学院農学生命科学科応用生命科学専攻栄養化学研究室で行われたものであります。研究を行うにあたり、終始懇切な御指導、御鞭撻を賜りました当研究室助教授 加藤久典先生に厚く御礼申し上げます。

私を当研究室に受け入れて下さり、多くの御指導、御助言、御激励を下さいました東京大学名誉教授・現中部大学応用生物学部教授 野口忠先生に心より御礼申し上げます。

抗 IRS-2 抗血清および L6 細胞を御供与下さり、研究面で適切な御助言を下さりました東京大学大学院農学生命科学研究科助教授 高橋 伸一郎先生に心より感謝いたします。

ヒラメ筋を用いた糖取り込み実験を行うにあたり、御助言下さいました東京大学大学院農学生命科学研究科獣医生理学研究室 有賀 美也子博士に感謝いたします。

L6 細胞の培養にあたり、丁寧な御指導下さいました東京大学大学院農学生命科学研究科動物細胞制御研究室 大井 優子氏に感謝いたします。

研究面だけでなく様々な面で御配慮下さいました当研究室元助手・現中部大学応用生物学部助教授 大石 祐一先生、並びに当研究室派遣研究員 傅正偉博士に感謝いたします。

研究生活上の苦楽を共にした当研究室の室員並びに卒業生の皆様に感謝いたします。特に、研究において御協力頂いた大根 陽一郎氏に深く感謝いたします。

最後に、これまでの研究生活を支えてくれた家族に感謝いたします。

平成 14 年 1 月 7 日 豊島 由香

## 論文の内容の要旨

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

### 論文題目 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

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つ主要なホルモンであり、近年その細胞内情報伝達機構が急速に解明されてきた。インスリンレセプターは、インスリンが結合することによりチロシンキナーゼとして活性化され、**insulin receptor substrate (IRS)**をはじめとした細胞内基質がチロシンリン酸化される。ここに様々なアダプターや酵素が結合し、**phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)**カスケードやMAPキナーゼカスケードの活性化が起こり、生理作用発現に至る。II型糖尿病はこれらの情報伝達系の機能不全によりインスリン抵抗性を生ずる疾患であるが、インスリン抵抗に至る機構はなお不明である。IRS-1はチロシン以外のセリン/スレオニン残基もリン酸化されるが、このセリン/スレオニンリン酸化はIRS-1の活性低下や分解を誘導し、インスリン抵抗性の一因となり得ることが報告されている。他方、食餌から摂取される栄養素もインスリンなどのホルモンと同様に代謝制御のシグナルとして機能している。アミノ酸は、4E-BP1やp70S6Kなどの翻訳制御因子を調節するが、これは**mammalian target of rapamycin (mTOR)**と呼ばれるプロテインキナーゼを介している。インスリンによる翻訳制御もやはりmTORを介しているため、mTOR以下でインスリンとアミノ酸シグナルが相互作用していることは明らかであるが、インスリンシグナルの上流因子に対するアミノ酸シグナルの影響に関する研究報告は数少ない。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。生体での検討はさらに限られており、タンパク質栄養あるいは血中アミノ酸レベルによってインスリン情報伝達がどう影響を受けるかは未知の問題であった。

そこで本研究では、ラットにタンパク質を含まない食餌を給餌することでタンパク質悪栄養条件を誘導し、肝臓や骨格筋などのインスリン標的組織でその情報伝達経路がどのような変化を生じている

かを解析することにした。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ることが明らかになったので、その機構について検討を加えると共に、それが生体においてどのような意味を持つかについても解析を行った。

### 1: 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

まず、タンパク質を含まない食餌として無タンパク質食(PF)を、対照として 12%カゼイン食(12C)を摂取させたラットの肝臓と骨格筋を用いて、インスリンレセプター(IR)、IRS-1、IRS-2、Akt/protein kinase B(PKB)および古典的 MAPK である ERK1/2 のインスリン依存性リン酸化を指標にしてインスリン応答性を比較し、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を検討した。また、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、インスリン非注入時における上記各因子のリン酸化状態を比較し、生理的濃度のインスリンの情報伝達応答へのタンパク質栄養の影響を解析した。

1.5 時間摂食または 16 時間絶食状態の 5 週齢 Wistar 系雄ラットを麻酔後開腹し、下行大静脈より saturation dose のインスリン(1.4 U)を注入後、適時に肝臓および骨格筋を摘出し、上記各因子のおよびリン酸化をイムノブロット法で解析した。いずれの条件でも、肝臓では、PF 摂取によって IR 量、IRS-1 量および IRS-2 量が増加し、インスリン注入による IRS-1 チロシンリン酸化量は増加傾向を示し、IRS-2 チロシンリン酸化量は顕著に増加した。Akt/ PKB と ERK1/2 には食餌タンパク質の影響は観察されなかった。IR に関しては、receptor binding assay も行いインスリンとの結合量を測定したが両群間で同程度であった。骨格筋では、PF 摂取によって IRS-1 量が減少する一方で、IRS-1 セリンリン酸化量の減少およびインスリン注入による IRS-1 量あたりのチロシンリン酸化量が顕著に増加し、IRS-1 のインスリン感受性の上昇が観察された。IRS-2 に関して、その量はイムノブロット法では検出できなかったが、インスリン注入後のチロシンリン酸化量は肝臓の場合と同様に PF で顕著に増加した。さらに、IRS-1、-2 の下流に位置する Akt/PKB のインスリン依存性 Ser473 リン酸化も PF 摂取により増強していたが、ERK1/2 への影響は観察できなかった。以上のことから、タンパク質栄養状態が悪化すると骨格筋で IRS-1、-2/PI3K/PKB 経路のインスリン応答能の上昇が起こるであろうことが推察できた。

一方インスリン注入をしない場合では、PF 群の肝臓において、絶食状態の IR および IRS-1 のチロシンリン酸化量が減少していた。1.5 時間摂食状態では血中インスリン濃度が低下しているのにも関わらず、IR および IRS-1 のチロシンリン酸化量は 12C と同程度であったことから、生理的濃度のインスリンに対するこれらの因子の応答能が上昇している可能性が考えられた。この場合の骨格筋では肝臓とは異なり、絶食状態でも 1.5 時間摂食時と同様に PF 食摂取によって IR のチロシンリン酸化が減少していたので、生理的濃度のインスリンに対する応答能が変化するかどうか考察できなかった。先述した骨格筋における IRS-1 のセリンリン酸化状態の変化は、SDS-PAGE におけるバンドシフトと、Ser612 (ヒトでは 616 位)のリン酸化を特異的に認識する抗体を用いた解析で観察できたが、この現象は肝臓では観察されず骨格筋に特異的であった。よって、血中アミノ酸濃度の上昇により組織特異的に何らかのセリン/スレオニンキナーゼの活性化が起こり、IRS-1 セリンリン酸化の上昇を引き起こすという IRS-1 セリンリン酸化経路が考えられた。

## 2: 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

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各因子の変化に対して、PF 摂取により低下した摂食量および血中インスリン濃度の影響が関与しているかどうか検討するために、12C 摂食量を PF 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たラットを用いて解析を行った。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可能性が考えられた。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るため、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、肝臓における IR 量および IRS-1, -2 量の増加、骨格筋における 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結論された。それに対し、骨格筋における 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 では一般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 IRS 等に影響があると考えられた。

次に、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。この IRS-2 mRNA 量の増加は、血中インスリン濃度の変動に依存していた。このように、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、さらに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。IRS-1 については、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。

さらに、IRS-1 のセリンリン酸化に関与する因子として PKC や TNF $\alpha$  が報告されているため、骨格筋での PKC 活性と脂肪組織における TNF $\alpha$  遺伝子発現について検討したが、食餌タンパク質の効果は顕著でなかった。

## 3: タンパク質栄養状態がインスリン情報伝達経路の初期因子の遺伝子発現およびインスリンの生理作用に及ぼす影響

タンパク質栄養状態の悪化による IRS を介したインスリン情報伝達経路の up-regulation が実際にインスリン作用を調節し得るのかを検討するために、肝臓ではインスリンによりその発現が促進する phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)、fatty acid synthase (FAS) の遺伝子発現について、骨格筋では糖取り込み量について検討した。肝臓での PEPCK mRNA 量は PF 摂取により減少し、PF 摂取による糖新生の抑制効果が考えられたが、FAS mRNA 量も PF 摂取により顕著に減少しており、脂肪酸合成促進効果は見られなかった。慢性タンパク質欠乏が原因の Kwashiorkor 病の特徴的な症状として脂肪肝があるので、短期間のタンパク質欠乏では肝臓での脂質合成促進は起こらず、インスリン情報伝達経路が活性化されている状態を長期間維持することで徐々に促進されるのかもしれ

ない。骨格筋における糖の取り込み量は PF 摂取で増加し、末梢組織での糖利用に対して食餌タンパク質の効果が観察できた。

#### 4：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

これまでで明らかになった現象の分子メカニズムをより詳細に解析するために、その現象を培養細胞のモデル系で再現することを試みた。特に骨格筋での IRS-1 の現象に注目し、ラット由来の筋細胞である L6 myotube 細胞を用いて、18 時間無血清 DMEM 培地で培養後、無血清のアミノ酸含有もしくは欠乏 MEM 培地で 6 時間培養した場合と、無血清のアミノ酸含有もしくは欠乏 MEM 培地で 24 時間培養した場合における IRS-1 の量、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ついて検討した。24 時間培養ではアミノ酸の影響は観察できず、アミノ酸濃度の増加によっても変化しなかったが、6 時間培養でアミノ酸による IRS-1 のバンドシフトが観察された。このとき IRS-1 量およびインスリン依存性チロシンリン酸化に関しては変化が見られなかったため、さらなる培養条件の検討が必要であるが、この培養条件での IRS-1 のセリンリン酸化機構の解析が可能となった。

#### 総括

以上の *in vivo* で明らかになったタンパク質栄養状態の悪化のインスリン情報伝達因子に対する効果を下の表にまとめた (Table 1)。本研究により、インスリン情報伝達経路の上流段階でのアミノ酸とインスリンのシグナルの相互作用を *in vivo* において初めて明らかにした。また、アミノ酸による末梢組織での糖利用の阻害作用には IRS を介した制御機構が関与していることも明らかにした。

**Table 1 Summary of the effect of protein malnutrition on insulin signal transduction**

		PF			
<b>Body weight</b>		↓			
<b>Food intake</b>		↓			
<b>Serum insulin</b>		↓			
		PF Muscle	Dependency on Basal Insulin Level	PF Liver	Dependency on Basal Insulin Level
<b>IRS-1</b>	<b>Amount</b>	↓	<b>Yes or No</b>	↑	<b>No</b>
	<b>pY/Protein</b>	↑	<b>No</b>	↑?	
	<b>pS612</b>	↓↓	<b>No</b>	?	
	<b>Mobility shift</b>	+	<b>No</b>	—	
	<b>mRNA</b>	—	<b>No</b>	—	
<b>IRS-2</b>	<b>Amount</b>	?		↑	<b>No</b>
	<b>pY</b>	↑	<b>Yes or No</b>	↑	<b>No</b>
	<b>mRNA</b>	↑	<b>Yes or No</b>	↑	<b>Yes</b>

pY ; tyrosine phosphorylation, pS612 ; phosphorylation of Ser612

## 参考文献

- Aguirre, V., Uchida, T., Yenush, L., Davis, R. and White, M. F. (2000) The c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser307. *J. Biol. Chem.*, 275, 9047-9054
- Aguirre, V., Werner, E. D., Giraud, J., Lee, Y. H., Shoelson, S. E. and White, M. F. (2002) Phosphorylation of Ser 307 in IRS-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J. Biol. Chem.*, 277, 1531-1537
- Anai, M., Funaki, M., Ogihara, T., Terasaki, J., Inukai, K., Katagiri, H., Fukushima, Y., Yazaki, Y., Kikuchi, M., Oka, Y. and Asano, T. (1998) Altered expression levels and impaired steps in the pathway to phosphatidylinositol 3-kinase activation via insulin receptor substrate 1 and 2 in Zucker Fatty rats. *Diabetes*, 47, 13-23
- Anderson, C. M. and Olefsk, J. M. (1991) Phorbol ester-mediated protein kinase C interaction with wild-type and COOH-terminal truncated insulin receptors. *J. Biol. Chem.*, 266, 21760-21764
- Aparicio, M., Chauveau, P. and Combe, C. (2001) Are supplemented low-protein diets nutritionally safe? *Am. J. Kidney Diseases*, 37, S71-S76
- Araki, E., Lipes, M. A., Patti, M. -E., Bruning, J. C., Haag III, B., Johnson, R. S. and Kahn, C. R. (1994) Alternative pathway of insulin signaling in mice with targeted disruption of IRS-1 gene. *Nature*, 372, 186-190
- Argetsinger, L. S., Hsu, G. W., Myers, Jr., M. G., Billestrup, N., White, M. F. and Carter-Su, C. (1995) Growth hormone, interferon- $\gamma$ , and leukemia inhibitory factor promoted tyrosyl phosphorylation of insulin receptor substrate-1. *J. Biol. Chem.*, 270, 14685-14692
- Argetsinger, L. S., Norstedt, G., Billestrup, N., White, M. F. and Carter-Su, C. (1996) Growth hormone, interferon- $\gamma$ , and leukemia inhibitory factor utilize insulin receptor substrate-2 in intracellular signaling. *J. Biol. Chem.*, 271, 29415-29421
- Avruch, J. (1998) Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Mol. Cell. Biochem.*, 182, 31-48
- Balage, M., Gruzard, J., Sornet, C., Simon, J., Dardevet, D. and Manin, M. (1990) Insulin binding and receptor tyrosine kinase activity in rat liver and skeletal muscle: effect of starvation. *Metabolism*, 39, 366-373
- Berti, L., Kellerer, M., Capp, E. and Haring, H. U. (1997) Leptin stimulates glucose transport and glycogen synthesis in C2C12 myotubes: evidence for a PI3-kinase mediated effect. *Diabetologia*, 40, 606-609
- Berti, L., Mosthaf, L., Kroder, G., Kellerer, M., Tippmer, S., Mushack, J., Seffer, E., Seedorf, K. and Haring, H. (1994) Glucose-induced translocation of protein kinase C isoforms in Rat-1 fibroblasts is paralleled by inhibition of the insulin receptor tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.*, 269, 3381-3386
- Björbæk, C., Uotani, S., da Silva, B. and Flier, J. S. (1997) Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of leptin receptor. *J. Biol. Chem.*, 272, 32686-32695
- Böllag, G. E., Roth, R. A., Beaudoin, J., Mochly-Rosen, D. and Koshland, D. E., Jr. (1986) Protein kinase C directly phosphorylates the insulin receptor in vitro and reduces its protein-tyrosine kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 5822-5824
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254
- Bruks, D. J., White, M. F. (2001) IRS proteins and  $\beta$ -cell function. *Diabetes*, 50, S140-S145

- Brunet, A., Bonni, A., Zigmund M. J., Lin, M. Z. Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C. Blenis, J. and Greenberg, M. E. (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor. *Cell*, 96, 857-868
- Burcelin, R., Kamohara, S., Li, J., Tannenbaum, G. S. Charron, M. J. and Friedman, J. M (1999) Acute intravenous leptin infusion increases glucose turnover but not skeletal muscle glucose uptake in ob/ob mice. *Diabetes*, 48, 1264-1269
- Chin, J. E. Liu, F. and Roth, R. A. (1994) Activation of protein kinase C $\alpha$  inhibits insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1. *Mol. Endocrinol.*, 8, 51-58
- Chin, J. E., Dickens, M., Tavare, J. M. and Roth, R. A. (1993) Overexpression of protein kinase C isozymes  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\gamma$ , and  $\epsilon$  in cells overexpressing the insulin receptor. *J. Biol. Chem.*, 268, 6338-6347
- Cichy, S. B., Uddin, A., Danilkovich, A., Guo, S., Klippel, A. and Unterman, T. G. (1998) Protein kinase B/Akt mediates effects of insulin on hepatic insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression through a conserved insulin response sequence. *J. Biol. Chem.*, 273, 6482-6487
- Clément, S., Krause, U., Desmedt, F., Tanti, J. F., Behends, J., Pesesse, X., Sasaki, T., Penninger, J., Doherty, M., Malaisse, W., Dumont, J. E., Le Marchand-Brustel, Y., Erneux, C., Hue, L. and Schurmans, S. (2001) The lipid phosphatase SHIP2 controls insulin sensitivity. *Nature*, 409,92-97
- Cohen, B., Novick, D. and Rubinstein, M. (1996) Modulation of insulin activities by leptin. *Science*, 15, 1185-1188
- Cong, L. N., Chen, H., Li, Y., Zhou, L., McGibbon, M. A., Taylor, S. I. and Quon, M. J. (1997) Physiological role of Akt in insulin-stimulated translocation of GLUT4 in transfected rat adipose cells. *Mol. Endocrinol.*, 11, 1881-1890
- Crook, E. D., Daniels, M. C., Smith, T. M., McClain, D. A. (1993) Regulation of insulin-stimulated glycogen synthase activity by overexpression of glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase in rat-1 fibroblasts. *Diabetes*, 42, 1289-1296
- Cross, D. A., Aless, D. R., Cohen, P., Andjekovich, M. and Hemmings, B. A. (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, 378, 785-789
- De Fea, K. and Roth, R. A. (1997 a) Protein kinase C modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation requires serine 612. *Biochemistry*, 36, 12939-12947
- De Fea, K. and Roth, R. A. (1997 b) Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation and function by mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 272, 31400-31406
- Delahaye, L., Moth-Satney, I., White, M. F., Van Obberghen, E. (1998) Interaction of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) with phosphatidylinositol 3-kinase: IRS-1 serine phosphorylation of serine for alanine in potential IRS-1 serine phosphorylation site. *Endocrinology*, 139, 4911-4919
- Dominici, F. P., Cifone, D., Bartke, A. and Turyn, D. (1999) Alterations in the early steps of the insulin-signaling system in skeletal muscle of GH-transgenic mice. *Am. J. Physiol.*, 277, E447-E454
- Elchebly, M., Payette, P., Michaliszyn, E., Cromlish, W., Collins, S., Loy, A. L., Normandin, D., Cheng, A., Himms-Hagen, J., Chan, C. -C., Ramachandran, C., Gresser, M. J., Tremblay, M. L. and Kennedy, B. P. (1999) Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science*, 283, 1544-1548
- Fantin, V. R., Lavan, B. E., Wang, Q., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Keller, S. R. and

- Lienhard, G. E. (1999) Cloning, tissue expression, and chromosomal location of the mouse insulin receptor substrate 4 gene. *Endocrinology*, 140, 1329-1337
- Feinstein, R., Kanety, H., Papa, M. Z., Lunenfeld, B. and Karasik, A. (1993) Tumor necrosis factor- $\alpha$  suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. *J. Biol. Chem.*, 268, 26055-26058
- Flakoll, P. J., Wentzel, L. S., Rice, D. E., Hill, J. O. and Abumrad, N. N. (1992) Short-term regulation of insulin-mediated glucose utilization in four-day fasted human volunteers: role of amino acid availability. *Diabetologia*, 35, 357-366
- Foretz, M., Guichard, C., Ferré, P. and Foufelle, F. (1999) Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 12737-12742
- Frachi-Gazzola, R., Visigalli, R., Bussolati, O., Dall'Asta V. and Gazzola, G. C. (1999) Adaptive increase of amino acid transport system A requires ERK1/2 activation. *J. Biol. Chem.*, 274, 28922-28928
- Friedman J. M. and Halaas, J. L. (1998) Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395, 763-770
- Fu, ZW., Noguchi, T. and Kato, H. (2001) Differential regulation of IGFBP-2 and IGFBP-5 gene expression by vitamin A status in Japanese quail. *Am. J. Physiol.*, 281, E138-E146
- Gabbay, R. A., Sutherland, C., Gnudi, L., Kahn, B. B., O'Brien, R. M. and Granner, D. K. (1996) Insulin regulation of PEPCK gene expression does not require activation of the Ras/MAP kinase signaling pathway. *J. Biol. Chem.*, 271, 1890-1897
- Goldstein, B. J., Bittner-Kowalczyk, A., White, M. F. and Harbeck, M. (2000) Tyrosine dephosphorylation and deactivation of insulin receptor substrate-1 by protein-tyrosine phosphatase 1B. *J. Biol. Chem.*, 273, 4283-4289
- Guo, S., Rena, G., Cichy, S., He, X., Cohen, P. and Unterman, T. (1999) Phosphorylation of serine 256 by protein kinase B disrupts transactivation by FKHR and mediates effects of insulin on insulin-like growth factor-binding protein-1 promoter activity through a conserved insulin response sequence. *J. Biol. Chem.*, 274, 17184-17192
- Hadley, M. E. (2000) 「ENDOCLYNOLOGY」 fifth edition, 250-276
- Hansen, P. A., Gulve, E. A. and Holloszy, J. O. (1994) Suitability of 2-deoxyglucose for in vitro measurement of glucose transport activity in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, 76, 979-985
- Hara, K., Yonezawa, K., Weng, Q. -P., Kozlowski, M. T., Belham, C. and Avruch, J. (1998) Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *J. Biol. Chem.*, 273, 14484-14494
- Harel, Z. and Tannebaum G. S. (1993) Dietary protein restriction impairs both spontaneous and growth hormone-releasing factor-stimulated growth hormone release in the rat. *Endocrinology*, 133, 1035-1043
- Haruta, T., Uno, T., Kawahara, J., Takano, A., Egawa, K., Sharma, P. M., Olefsky, J. M. and Kobayashi, M. (2000) A rapamycin-sensitive pathway down-regulates insulin signaling via phosphorylation and proteasomal degradation of insulin receptor substrate-1. *Mol. Endocrinol.*, 14, 783-794
- Havrankova, J., Roth, J. and Brownstein, M. (1978) Insulin receptors are widely distributed in the

- central nervous system of the rat. *Nature*, 272, 827-829
- Hedo, J. A., Harrison, L. C. and Roth, J. (1981) Binding of insulin receptors to lectins: evidence for common carbohydrate determinants on several membrane receptors. *Biochemistry*, 20, 3385-3393
- Herbert, L. F. Jr., Daniels, M. C., Zhou, J., Crook, E. D., Turner, R. K., Simmons S. T., Neidigh, J. L., Zhu, J. S., Baron, A. D. and McClain, D. A. (1996) Overexpression of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase in transgenic mice leads to insulin resistance. *J. Clin. Invest.*, 98, 930-936
- Hill, M. M., Clark, S. F., Tucker, D. F., Birnbaum, M. J., James, D. E. and Macaulay, S. L. (1999) A role for protein kinase B $\beta$ / Akt2 in insulin-stimulated GLUT4 translocation in adipocytes. *Mol. Cell. Biol.*, 19, 7771-7781
- Holness M. J. (1999) The impact of dietary protein restriction on insulin secretion and action. *Proc. Nutr. Society*, 58, 647-653
- Hotamisligil, G. S. and Spiegelman, B. M. (1994 a) Tumor necrosis factor  $\alpha$ : a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes*, 43, 1271-1278
- Hotamisligil, G. S., Budavari, A., Murray, D. and Spiegelman, B. M. (1994 b) Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. *J. Clin. Invest.*, 94, 1543-1549
- Hotamisligil, G. S., Arner, P., Caro, J. F., Atkinson, R. L. and Spiegelman, B. M. (1995) Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.*, 95, 2049-2015
- Hotamisligil, G. S., Paraldi, P., Budavari, A., Ellis, R., White, M. F. and Spiegelman, B. M. (1996) IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- $\alpha$ -and obesity-induced insulin resistance. *Science*, 271, 665-668
- Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S. and Spiegelman, B. M. (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 259, 87-91
- Iiboshi, Y., Papst, P. J., Kawasome, H., Hosoi, H., Abraham, R. T., Houghton, P. J. and Terada, N. (1999) Amino acid-dependent control of p70<sup>src</sup>. *J. Biol. Chem.*, 274, 1092-1099
- Ito, Y., Ariga, M., Takahashi, S. -I., Hidaka, T. and Noguchi, T. (1997 a) Change in tyrosine phosphorylation of insulin receptor and insulin receptor substrate-1 (IRS-1) and association of p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase with IRS-1 after feeding in rat liver *in vivo*. *J. Endocrinol.*, 154, 267-273
- Ito, Y., Takahashi, S. -I., Takenaka, A., Hidaka, T. and Noguchi, T. (1997 b) Starvation-increased insulin-dependent tyrosine phosphorylation of the 195-kDa protein in intact rat liver. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 2122-2124
- Kahn, C. R. (1994) Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. *Diabetes*, 43, 1066-1084
- Kandel, E. S. and Hay, N. (1999) The regulation and activities of multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp. Cell Res.*, 253, 210-219
- Karasik, A., Rothenberg, P. L., Yamada, K., White, M. F. and Kahn, C. R. (1990) Increased protein kinase C activity is linked to reduced insulin receptor autophosphorylation in liver of starved rats. *J. Biol. Chem.*, 265, 10226-10231
- Kato, H., Faria, T. N., Stannard, B., Roberts Jr., C. T., and LeRoith, D. (1993) Role of tyrosine kinase activity in signal transduction by the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor. *J. Biol. Chem.*,

- Kellerer, M., Koch, M., Metzinger, E., Mushack, J., Capp, E. and Haring H. U. (1997) Leptin activates PI-3 kinase in C2C12 myotubes via janus kinase-2 (JAK-2) and insulin receptor substrate-2 (IRS-2) dependent pathways. *Diabetologia*, 40, 1358-1362
- Kanety, H., Feinstein, R., Papa, M. Z., Hemi, R. and Karasik, A. (1995) Tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). *J. Biol. Chem.*, 270, 23780-23784
- Kennelly, P. J., and Krebs, E. G. (1991) Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatase. *J. Biol. Chem.*, 266, 15555-15558
- Kerouz, N. J., Horsch, D., Pons, S. and Kahn, C. R. (1997) Differential regulation of insulin receptor substrate-1 and -2 (IRS-1 and IRS-2) and phosphatidylinositol 3-kinase isoforms in liver and muscle of the obese diabetic (*ob/ob*) mouse. *J. Clin. Invest.*, 100, 3164-3172
- Kettelhut, I. C., Foss, M. C. and Migliorini, R. H. (1980) Glucose homeostasis in a carnivorous animal (cat) and in rats fed a high-protein diet. *Am. J. Physiol.*, 239, R437-R444
- Kitamura, T., Ogawa, W., Sakaue, H., Hino, Y., Kuroda, S., Takata, M., Matsumoto, M., Maeda, T., Konoshi, H., Kikkawa, U. and Kasuga, M. (1998) Requirement for activation of the serine-threonine kinase Akt (protein kinase B) in insulin stimulation of protein synthesis but not of glucose transport. *Mol. Cell. Biol.*, 18, 3708-3717
- Klaman, L. D., Boss, O., Peroni, O. D., Kim, J. K., Martino, J. L., Zabolotny, A, Shulman, G. I., Neel, B. G. and Kahn, B. B. (2000) Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *Mol. Cell. Biol.*, 20, 5479-5489
- Kohn, A. D., Summers, S. A., Birnbaum, M. J. and Roth, R. A. (1996) Expression of a constitutive active Akt Ser/ Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J. Biol. Chem.*, 271, 31372-31378
- Kops, G. J. P. L., de Ruiter, N. D., De Vries-Smits A. M. M., Powell, D. R. Bos, J. L. and Burgering, B. M. T (1999) Direct control of forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature*, 398, 630-634
- Kotani, K., Ogawa, W., Hino, Y., Kitamura, T., Ueno, H., Sano, W., Sutherland, C., Granner, D. K. and Kasuga, M. (1999) Dominant negative forms of Akt (protein kinase B) and atypical protein kinase C1 do not prevent insulin inhibition of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription. *J. Biol. Chem.*, 274, 21305-21312
- Kotani, K., Ogawa, W., Matsumoto, M., Kitamura, T., Sakaue, H., Hino, Y., Miyake, K., Sano, W., Akimoto, K., Ohno, S. and Kasuga, M. (1998) Requirement of atypical protein kinase C $\lambda$  for insulin stimulation of glucose uptake but not for Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell. Biol.*, 18, 6971-6982
- Lallena, N. -J., Diaz-Meco, M. T., Bren, G., Paya, C. V. and Moscat, J. (1999) Activation of I $\kappa$ B kinase  $\beta$  by protein kinase C isoforms. *Mol. Cell. Biol.*, 19, 2180-2188
- Lavan, B. E., Lane, W. S. and Lienhard, G. E. (1997 a) The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. *J. Biol. Chem.*, 272, 11439-11443
- Lavan, B. E., Fantin, V. R., Chang, E. T., Lane, W. S., Keller, S. R. and Lienhard, G. E. (1997 b) A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the

- insulin receptor substrate family. *J. Biol. Chem.*, 272, 21403-21407
- Lavigne, C., Tremblay, F., Asselin, G., Jacques, H. and Marette, A. (2001) Prevention of skeletal muscle insulin resistance by dietary cod protein in high fat-fed rats. *Am. J. Physiol.*, 281, E62-E71
- Li, J., De Fea K. and Roth, R. A. (1999) Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation by an Akt/phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J. Biol. Chem.*, 274, 9351-9356
- Liu, L., Karkaniyas, G. B., Morales, J. C., Hawkins, M., Barzilai, N., Wang, J. and Rossetti, L. (1998) Intracerebroventricular leptin regulates hepatic but not peripheral glucose fluxes. *J. Biol. Chem.*, 273, 31160-31167
- Liu, Y. M., Paz, K., Herschkovitz, A., Alt, A., Tennenbaum, T., Sampson, S. R., Ohba, M., Kuroki, T., LeRoith, D. and Zick, Y. (2001) Insulin stimulates PKC $\zeta$ -mediated phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). *J. Biol. Chem.*, 276, 14459-14465
- Lochhead, P. A., Coghlan, M., Rice, S. Q. J. and Sutherland, C. (2001) Inhibition of GSK-3 selectively reduces glucose-6-phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression. *Diabetes*, 50, 937-946
- Long, W., Saffer, L., Wei, L. and Barrett, E. J. (2000) Amino acids regulate skeletal muscle PHAS-I and p70 S6-kinase phosphorylation independently of insulin. *Am. J. Physiol.*, 279, E301-E306
- Marshall, S., Garvey, W. T. and Traxinger, R. R. (1991) New insights into the metabolic regulation of insulin action and insulin resistance: role of glucose and amino acids. *FASEB J.*, 5, 3031-3036
- Mothe, I. and Obberghen, E. V. (1996) Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on multiple serine residues, 612, 632, 662, and 731, modulates insulin action. *J. Biol. Chem.*, 271, 11222-11227
- Nakae, J., Park, B. -C. and Accili D. (1999) Insulin stimulates phosphorylation of forkhead transcription factor FKHR on serine 253 through a wortmannin-sensitive pathway. *J. Biol. Chem.*, 274, 15982-15985
- Nakashima, N., Sharma, P. M., Imamura, T., Bookstein, R., and Olefsky, J. M. (2000) The tumor suppressor PTEN negatively regulates insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.*, 275, 12889-12895
- Nishimura M., Hatakeyama, E., Wakabayashi, Y., Nakano, H., Suzuki, S., Miura, Y., Tsuchida, H. and Yamada, K. (1997) Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in insulin sensitivity and effect of low protein diet on the TNF- $\alpha$  response in patients with diabetic renal failure. *Nippon Jinzo Gakkai Shi*, 39, 740-745
- Ozes, O. N., Akca, H., Mayo, L. D., Gustin, J. A., Maehama, T. Dixon, J. E. and Donner, D. B. (2001) A phosphatidylinositol 3-kinase/ Akt/ mTOR pathway mediates and PTEN antagonizes tumor necrosis factor inhibition of insulin signaling through insulin receptor substrate-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 4640-4645
- Patti, M. -E., Brambilla, E., Luzi, L., Landaker, E. J. and Kahn, C. R. (1998) Bidirectional modulation of insulin action by amino acids. *J. Clin. Invest.*, 101, 1519-1529
- Paz, K., Liu, Y. F., Shorer, H., Hemi, R., LeRoith D., Quan, M., Kanety, H., Seger, R. and Zick, Y. (1999) Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) by protein kinase B positively regulates IRS-1 function. *J. Biol. Chem.*, 274, 28816-28822
- Pederson, T. M., Kramer, D. L. and Rondinone, C. M. (2001) Serine/Threonine phosphorylation of IRS-1 triggers its degradation. *Diabetes*, 50, 24-31

- Peret, J., Foustock, S., Chanez, M., Bois-Joyeux, B. and Assan, R. (1981) Plasma glucagons and insulin concentrations and hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and pyruvate kinase activities during and upon adaptation of rats to a high protein diet. *J. Nutr.*, 111, 1173-1184
- Pisters, P. W., Restifo, N. P., Cersosimo E., Brennan, M. F. (1991) The effects of euglycemic hyperinsulinemia and amino acid infusion on regional and whole body glucose disposal in man. *Metabolism*, 40, 59-65
- Raught, B, Gingras, A. -C. and Sonenberg, N. (2001) The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 7037-7044
- Ravichandran, L. V., Esposito, D. L., Chen, J. and Quon, M. J. (2001) Protein kinase C- $\zeta$  phosphorylates insulin receptor substrate-1 and impairs its ability to activate phosphatidylinositol 3-kinase in response to insulin. *J. Biol. Chem.*, 276, 3543-3549
- Reis, M. A. B., Carneiro, E. M., Mello, M. A. R., Boschero, A. C., Saad, M. J. A. and Velloso, L. A. (1997) Glucose-induced insulin secretion is impaired and insulin-induced phosphorylation of insulin receptor and insulin receptor substrate-1 are increased in protein-deficient rats. *J. Nutr.*, 127, 403-410
- Rena, G., Guo, S., Cichy, S. C., Unterman, T. G. and Cohen, P. (1999) Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by PKB. *J. Biol. Chem.*, 274, 17179-17183
- Rigalleau, V., Aparicio, M. and Gin, H. (1998) Effects of low-protein diets on carbohydrate metabolism and energy expenditure. *J. Renal Nutrition*, 8, 175-178
- Rojas, F. A., Hirata, A. E. and Saad, M. J. A. (2001) Regulation of IRS-2 tyrosine phosphorylation in fasting and diabetes. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 183, 63-69
- Rossetti, L., Massillon, D., Barzilai, N., Vuguin, P., Chen, W., Hawkins, M., Wu, J. and Wang, J. (1997) Short term effects of leptin on hepatic gluconeogenesis and *in vivo* insulin action. *J. Biol. Chem.*, 272, 27758-27763
- Rossetti, L., Rothman, D. L., De Fronzo, R. A., Shulman, G. I. (1989) Effect of dietary protein on *in vivo* insulin action and liver glycogen repletion. *Am. J. Physiol.*, 257, E212-E219
- Rui, L., Aguirre, V., Kim, J. K., Shulman, G. I., Lee, A., Corbould, A., Dunaif, A. and White, M. F. (2001 b) Insulin/IGF-1 and TNF- $\alpha$  stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser307 via distinct pathways. *J. Clin. Invest.*, 107, 181-189
- Rui, L., Fisher, T. L., Thomas, J. and White, M. F. (2001 a) Regulation of insulin/insulin-like growth factor-1 signaling by proteasome-mediated degradation of insulin receptor substrate-2. *J. Biol. Chem.*, 276, 40362-40367
- Saad, M. J., Araki, E., Miralpeix, M, Rptenberg, P. L., White, M. F. and Kahn, C. R. (1992) Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. *J. Clin. Invest.*, 90, 1839-1849
- Saltiel, A. R. and Kahn, C. R. (2001) Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414, 799-806
- Scott, P. H., Brunn, G. J., Kohn, A. D., Roth, R. A. and Lawrence, J. C., Jr. (1998) Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by a protein kinase B signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 7772-7777
- Shah, O. J., Anthony, J. C., Kimball, S. R. and Jefferson, L. S. (2000) 4E-BP1 and S6K1: translational integration sites for nutritional and hormonal information in muscle. *Am. J. Physiol.*, 279,

E715-E729

- Shigemitsu, K., Tsujishita, Y., Hara, K., Nanahoshi, M., Avruch, J. and Yonezawa, K. (1999) Regulation of translational effectors by amino acid and mammalian target of rapamycin signaling pathways. *J. Biol. Chem.*, 274, 1058-1065
- Shimano, H., Yahagi, N., Amemiya-Kudo, M., Hasty, A. H., Osuga, J-I, Tamura, Y., Shionoiri, F., Iizuka, Y, Ohashi, K., Harada, K., Gotoda, T., Ishibashi, S. and Yamada, N. (1999) Sterol regulatory element-binding protein-1 as key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *J. Biol. Chem.*, 274, 35832-35829
- Shimomura, I., Bashmakov, Y., Ikemoto, S., Horton, J. D., Brown, M. S. and Goldstein, J. L. (1999) Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 13656-13661
- Shimomura, I., Matsuda, M., Hammer, R. E., Bashmakov, Y., Brown, M. S. and Goldstein, J. L. (2000) Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and *ob/ob* mice. *Mol. Cell*, 6, 77-86
- Standaert, M. L., Galloway, L., Karnam, P., Bandyopadhyay, G., Moscat, J. and Faresse, R. V. (1997) Protein kinase C- $\zeta$  as downstream effector of phosphatidylinositol 3-kinase during insulin stimulation in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.*, 272, 30075-30082
- Steppan, C. M., Balley, S. T., Bhat, S., Brown, E. J., Banerjee, R. R., Wright, C. M., Patel, H. R., Ahima, R. S. and Lazar, M. A. (2001) The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, 409, 307-312
- Sun, X. J., Goldberg, J. L., Qiao, L. and Mitchell, J. J. (1999) Insulin-induced insulin receptor substrate-1 degradation is mediated by the proteasome degradation pathway. *Diabetes*, 48, 1359-1364
- Sun, X. J., Rothenberg, P., Kahn, C. R., Backer, J. M., Araki, E., Wilden, P. A., Cahill, D. A., Goldstein, B. J. and White, M. F. (1991) Structure of insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature*, 352, 73-77
- Sun, X. J., Wang, L. -M., Zhang, Y., Yenush, L., Myers, M. G., Jr., Glasheen, E., Lane, W. S., Pierce, J. H. and White, M. F. (1995) Role of IRS-2 in insulin and cytokine signaling. *Nature*, 377, 173-177
- Sutherland, C., O'Brien, R. M. and Granner, D. K. (1995) Phosphatidylinositol 3-kinase, but not p70/p85 ribosomal S6 kinase, is required for the regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression by insulin. *J. Biol. Chem.*, 270, 15501-15506
- Sutherland, C., Waltner-Law, M., Gnudi, L., Kahn, B. B. and Granner, D. K. (1998) Activation of the Ras-MAP kinase-RSK pathway is not required for the repression of PEPCK gene transcription by insulin. *J. Biol. Chem.*, 273, 3198-3204
- Sweeney, G., Keen, J., Somwar, R., Daniel, K., Garg, R. and Klip, A. (2001) High leptin levels acutely inhibit insulin-stimulated glucose uptake without affecting glucose transporter 4 translocation in L6 rat skeletal muscle cells. *Endocrinology*, 142, 4806-4812
- Sykotiis, G. P., and Papavassiliou, A. G. (2001) Serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1: a novel target for the reversal of insulin resistance. *Mol. Endocrinol.*, 15, 1864-1869
- Szanto, I. and Kahn, R. (2000) Selective interaction between leptin and insulin signaling pathways in a hepatic cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 2355-2360
- Takahashi, S., Kajikawa, M., Umezawa, T., Takahashi, S-I, Kato, H., Miura, T., Nam, T-J., Noguchi, T. and Naito, H. (1990) Effect of dietary proteins on the plasma immunoreactive insulin-like growth factor-1/somatomedin C concentration in the rats. *Br. J. Nutr.*, 63, 521-534

- Takano, A., Usui, I., Haruta, T., Kawahara, J., Iwata, M. and Kobayashi, M. (2001) Mammalian target of rapamycin pathway regulates insulin signaling via subcellular redistribution of insulin receptor substrate 1 and integrates nutritional signals and metabolic signals of insulin. *Mol. Cell. Biol.*, 21, 5050-5062
- Takaya, K., Ogawa, Y., Isse, N., Okazaki, T., Satoh, N., Masuzaki, H., Mori, K., Tamura, N., Hosoda, K. and Nakao, K. (1996) Molecular cloning of rat leptin receptor isoform complementary DNAs— identification of a missense mutation in Zucker fatty (*fa/fa*) rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 225, 75-83
- Takayama, S., White, M. F. and Kahn, C. R. (1988) Phorbol ester-induced serine phosphorylation of insulin receptor decreases its tyrosine kinase activity. *J. Biol. Chem.*, 263, 3440-3447
- Tamemoto, H., Kadowaki, T., Tobe, K., Yagi, T., Sakura, H., Hayakawa, T., Terauchi, Y., Ueki, K., Kaburagi, Y., Satoh, S., Sekihara, H., Yoshioka, S., Horikoshi, H., Furuta, Y., Ikawa, Y., Kasuga, M., Yazaki, Y., Aizawa, S. (1994) Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor-substrate-1. *Nature*, 372, 182-186
- Tang, E. D., Nunez, G., Barr, F. G. and Guan, K. -L. (1999) Negative regulation of forkhead transcription factor FKHR by Akt. *J. Biol. Chem.*, 274, 16741-16746
- Tanti, J. -F., Gremeaux, T., Van Obberghen, E. and Le Marchand-Brustel, Y. (1994) Serine/Threonine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 modulates insulin receptor signaling. *J. Biol. Chem.*, 269, 6051-6057
- Tanti, J. F., Grillo, S., Gremeaux, T., Coffey, P. J., Van Obberghen, E. and Le Marchand-Brustel, Y. (1997) Potential role of protein kinase B in glucose transport 4 translocation in adipocytes. *Endocrinology*, 138, 2005-2010
- Tappy, L., Acheson, K., Normand, S., Schneeberger, D., Thelin, A., Pachiardi, C., Riou, J. P. and Jequier, E. (1992) Effects of infused amino acids on glucose production and utilization in healthy human subjects. *Am. J. Physiol.*, 262, E826-E833
- Tessari, P., Inchiostro, S., Biolo, G., Duner, E., Nosadini, R., Tiengo, A. and Crepaldi, G. (1985) Hyperaminoacidaemia reduces insulin-mediated glucose disposal in healthy man. *Diabetologia*, 28, 870-872
- Thirone, A. C. P., Carvalho, C. R. O. and Saad, M. J. A. (1998) Growth hormone stimulates the tyrosine kinase activity of JAK2 and induces tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrates and Shc in Rat tissue. *Endocrinology*, 140, 55-62
- Thissen, J. P., Seneviratne, C., Moreira, P. and Reid, R. E. (1992) Increased serum clearance and degradation of <sup>125</sup>I-labeled IGF-I in protein-restricted rats. *Am. J. Physiol.*, 262, E406-E411
- Tobe, K., Suzuki, R., Aoyama, M., Yamauchi, Y., Kamon, J., Terauchi, Y., Matsui, J., Akanuma, Y., Kimura, S., Tanaka, J., Abe, M., Ohsumi, J., Nagai, R. and Kadowaki, T. (2001) Increased expression of the sterol regulatory element-binding protein-1 gene in insulin receptor substrate-2 (-/-) mouse liver. *J. Biol. Chem.*, 276, 38337-38340
- Traxinger, R. R. and Marshall, S. (1989) Role of amino acids in modulating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. *J. Biol. Chem.*, 264, 20910-20916
- Tremblay, F. and Marette, A. (2001) Amino acid and insulin signaling via the mTOR/p70 S6 kinase pathway. *J. Biol. Chem.*, 276, 38052-38060
- Umezawa, T., Ohsawa, Y., Miura, Y., Kato, H. and Noguchi, T. (1991) Effect of protein deprivation on

- insulin-like growth factor-binding proteins in rats. *Br. J. Nutr.*, 66, 105-116
- Van Sluijters, D. A., Dubbelhuis, P. F., Blommaart, E. F. C. and Meijer, A. J. (2000) Amino-acid-dependent signal transduction. *Biochem. J.*, 351, 545-550
- Wang, L. -M., Keegan, A. D., Li, W., Lienhard, G. E., Pacini, S., Gutkind, J. S., Myers, M. G., Jr., Sun, X. J., White, M. F., Aaponson, S. A., Paul, W. E. and Pierce, J. H. (1993) Common elements in interleukin 4 and insulin signaling pathways in factor-dependent hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 4032-4036
- Wang, X., Campbell, L. E., Miller, C. M. and Proud, C. G. (1998) Amino acid availability regulates p70 S6 kinase and multiple translation factors. *Biochem. J.*, 334, 261-267
- White, M. F. (1998) The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol. Cell. Biochem.*, 182, 3-11
- White, M. F., Maron, R. and Kahn, C. R. (1985) Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a M<sub>r</sub> 185,000 protein in intact cells. *Nature*, 318, 183-186
- Withers, D. J., Gutierrez, J. S., Towery, H., Burks, D. J., Ren, J. -M., Previs, S., Zhang, Y., Bernal, D., Pons, S., Shulman, G. I., Bonner-Weir, S. and White, M. F. (1998) Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*, 391, 900-904
- Yaker, S., Liu, J. L., Fernandez, A. M., Wu, Y., Schally, A. V., Frystyk, J., Chernausk, S. D., Mejia, W. and LeRoith, D. (2001) Liver-specific *igf-1* gene deletion leads to muscle insulin insensitivity. *Diabetes*, 50, 1110-1118
- Yamauchi, T., Tobe, K., Tamemoto, H., Ueki, K., Kaburagi, Y., Yamamoto-Honda, R., Takahashi, Y., Yoshizawa, F., Aizawa, S., Akanuma, Y., Sonenberg, N., Yazaki, Y. and T. Kadowaki (1996) Insulin signaling and insulin actions in the muscles and livers of insulin-resistant, insulin receptor substrate 1-deficient mice. *Mol. Cell. Biol.*, 16, 3074-3084
- Yin, D., Griffin, M. J. and Etherton, T. D. (2001) Analysis of the signal pathways involved in the regulation of fatty acid synthase gene expression by insulin and somatotropin. *J. Anim. Sci.*, 79, 1194-1200
- Yoshizawa, F., Kimball, S. R., Vary, T. C. and Jefferson, L. S. (1998) Effect of dietary protein on translation initiation in rat skeletal muscle and liver. *Am. J. Physiol.*, 275, E814-E820
- Zhang, J. Ou, J., Bashmakov, Y., Horton, J. D., Brown, M. S. and Goldstein, J. L. (2001) Insulin inhibits transcription of IRS-2 gene in rat liver through an insulin response element (IRE) that resembles IREs of other insulin-repressed genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 3756-3761
- Zick, Y. (2001) Insulin resistance: a phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling. *TREND in Cell Biology*, 11, 437-441
- 戸部 一之、門脇 孝 (1997) インスリン情報伝達異常と糖尿病, 糖尿病の最前線 (羊土社), 36-59
- 黒田 昌子 (2000) 「タンパク質栄養に対する応答において各組織の IGF-1 産生が果たす役割の検討」 東京大学修士論文
- 竹中 麻子 (1998) 「栄養状態とインスリン様成長因子」 日本農芸化学会誌, 72, 180-184
- 椿原 美治 (2001) 「透析患者における栄養障害の対策」 臨床栄養, 99, 886-892