



Title	インスリンレセプター遺伝子発現機序の追求：インスリンレセプターmRNAの合成，分解に対するDexamethasoneの影響
Author(s)	岩間， 令道
Citation	大阪大学，1988，博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36546
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	いわ 岩	ま 間	のり 令	みち 道
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	8305	号	
学位授与の日付	昭和63年7月7日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文題目	インスリンレセプター遺伝子発現機序の追求—インスリンレセプター mRNAの合成, 分解に対する Dexamethasone の影響—			
論文審査委員	(主査) 教授 鎌田 武信 (副査) 教授 垂井清一郎 教授 宮井 潔			

論文内容の要旨

〔目 的〕

ステロイドホルモンは、糖代謝偏位をもたらすと同時に、インスリンレセプターのダイナミクスに影響を与えるものと考えられる。本研究では、インスリンレセプター mRNA レベルに及ぼすデキサメサゾン (Dex) の影響を検討すると共に、さらに actinomycin D を添加し RNA 合成を阻害することにより、インスリンレセプター mRNA の合成、分解の両面より Dex のインスリンレセプター遺伝子発現に及ぼす影響を解析せんとした。

〔方 法〕

37°C, 5%CO₂ 存在下にて、10% fetal calf serum 添加 RPMI 1640 培地を用いて培養した IM-9 細胞について 10⁶ 個/ml に調整後、以下の実験に供した。

1) インスリン結合測定

Dex 10⁻⁶ M 存在下にて、24 時間培養した IM-9 細胞について、¹²⁵I 標識インスリンを用いたインスリンレセプターアッセイを行い、インスリンレセプター数、親和性を求めた。

2) インスリンレセプター mRNA レベルに及ぼすデキサメサゾンの影響の検討

a) Dex 濃度による影響 : Dex 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸ M 存在下において、24 時間培養後、後述の方法により RNA を回収し、インスリンレセプター mRNA レベルを測定した。

b) Dex 添加後の経時的変化 : Dex 添加直前及び Dex 10⁻⁶ M 添加後、2, 4, 6, 12, 24 時間におけるインスリンレセプター mRNA レベルの変化を検討した。

3) インスリンレセプター mRNA 分解に及ぼす Dex の影響

Dex 10^{-6} M存在下において12時間培養後, actinomycin D $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ を添加し, 添加後0, 4, 8, 12時間のRNAを回収し, インスリンレセプター mRNA レベルを測定した。

4) RNA回収と dot hybridization

約 10^8 個のIM-9細胞よりGTC/CsCl法により total RNAを回収した後, 各5, 10, 20, $40 \mu\text{g}$ を2.2M formaldehyde 存在下に, 65°C , 15分間, 変性を行い, nitrocellulose filter へ dot blot し, vacuum baking を行った。 42°C にて20時間 prehybridization を行った後, ヒトインスリンレセプター α -subunit の一部及び β -subunit の全てを含む cDNA phINSR 13-1 を EcoR I 処理して得られた4.2kb の probe を用いて, 42°C にて24時間, hybridization を行った。次いで, -70°C にて24時間 autoradiogram を行った後, 液体シンチレーションカウンターにて各 dot 部分の放射活性を測定した。

結果は Mean $\pm$ SD で表し, 各検体間の有意差検定は Student's t-test を用いた。

[成 績]

1) Dex のインスリン結合に及ぼす影響

IM-9細胞に Dex 10^{-6} Mを添加し, 24時間培養を行った結果, specific ^{125}I -insulin binding は Dex 非添加時 (2.5%) に比し, Dex 添加時, 4.0%に増加した。一方, レセプターアッセイでは, 親和性には変化はなく, Dex 添加により binding site の50%の増加を認めた。

2) Dex のインスリンレセプター mRNA レベルに及ぼす影響

IM-9細胞に Dex 10^{-8} , Dex 10^{-7} , Dex 10^{-6} , Dex 10^{-5} Mを添加し, 24時間培養を行った結果, Dex 非添加24時間培養後のインスリンレセプター mRNA レベルを100%とすると, それぞれ $174 \pm 12\%$, $187 \pm 7\%$, $329 \pm 34\%$, $368 \pm 27\%$ ($n=4$) と, Dex濃度に依存して増加することを認めた。

また, IM-9細胞に Dex 10^{-6} Mを添加し, 0, 2, 4, 6, 12, 24時間のインスリンレセプター mRNA レベルを測定した結果, 前値を100%とするとそれぞれ $130 \pm 7\%$, $121 \pm 18\%$, $179 \pm 36\%$, $291 \pm 37\%$, $344 \pm 12\%$ ($n=4$) と, 約6時間後より著しく増加し, S字状を呈した。

なお, 同一の検体について, ヒト β actin cDNA を用いて dot hybridization を行ったが, β actin mRNA レベルは Dex による影響を認めず一定であった。

3) Dex のインスリンレセプター mRNA 分解に及ぼす影響

Actinomycin D 添加直前のインスリンレセプター mRNA レベルを100%とし, 各時点におけるインスリンレセプター mRNA レベルを検討したところ, Dex 添加時には actinomycin D 添加後4時間 $60 \pm 7\%$, 8時間 $30 \pm 4\%$, 12時間 $18 \pm 5\%$ ($n=5$) であり, Dex 非添加時は, Actinomycin D 添加後4時間 $58 \pm 4\%$, 8時間 $29 \pm 5\%$, 12時間 $22 \pm 6\%$ ($n=5$) であり, 各時点において両群間に有意差を認めなかった。また, 以上の成績から求めたインスリンレセプター mRNA の半減期は Dex 添加時, 4.7 ± 0.8 時間, Dex 非添加時, 5.2 ± 0.8 時間であり, 両者間に有意差は認めなかった。

[総 括]

(1) グルココルチコイド添加により, IM-9細胞は, 濃度・時間依存性にインスリンレセプター mRNA が増加することを認めた。

(2) Actinomycin DによりRNA合成を阻害することにより求めたインスリンレセプター mRNA の

半減期は Dex の添加の有無により変化がなく, Dex はインスリンレセプター mRNA の分解には影響を与えないことを認めた。

以上, IM-9 細胞を用いて Dex によるインスリンレセプター mRNA 合成・分解に及ぼす影響を検討した結果, Dex はインスリンレセプター mRNA の分解には影響を与えることなく, 転写を亢進させることが明かとなった。

論文の審査結果の要旨

グルココルチコイドによりインスリンレセプター数が増加することが知られている。今日まで, その作用機序は明かではなかった。本論文は, デキサメサゾンのインスリンレセプター遺伝子に及ぼす影響を検討し, デキサメサゾンがインスリンレセプター mRNA を濃度依存性, 時間依存性に増加させることを認めたが, さらに, actinomycin D 添加により RNA 合成を阻害した際にはインスリンレセプター mRNA の半減期が不変であったことより, デキサメサゾンはインスリンレセプター mRNA の分解には影響を与えず, mRNA の合成の亢進を惹起する事を明かにしたものであり, 学位論文としての意義は大きい。