



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 添加後の経時的变化 : 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。