

Title	高脂肪食飼育ラットにおける肝 Epidermal Growth Factor (EGF) 受容体の動態 : インスリン受容体との比較検討
Author(s)	渡會, 隆夫
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37865">https://hdl.handle.net/11094/37865</a>
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、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>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	わた 渡	らい 會	たか 隆	お 夫
博士の専攻分野 の 名 称	博	士	(医 学)	
学 位 記 番 号	第	9 9 2 2	号	
学位授与年月日	平 成	3 年	10 月	14 日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当			
学 位 論 文 名	高脂肪食飼育ラットにおける肝 Epidermal Growth Factor (EGF) 受容体の動態 —インスリン受容体との比較検討—			
論文審査委員	(主査) 教 授	鎌田 武信		
	(副査) 教 授	三木 直正	教 授	矢内原千鶴子

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 〔目 的〕

Epidermal Growth Factor (EGF) 受容体とインスリン受容体は、共にチロシン特異的タンパク質キナーゼを有し、リガンド結合によりキナーゼが活性化されること、又自己リン酸化することなど、受容体機能上類似点を有する。従って、インスリン受容体の発現及び機能の制御を検討する際、EGF受容体と比較しその特長を明らかにすることが重要と考えられる。

一方、インスリン抵抗性はインスリン非依存性糖尿病患者の病態で重要な役割を果たしており、この状態におけるEGF受容体の機能制御に興味を持たれる。本論文においては、インスリン抵抗性を呈することが知られている高脂肪食飼育ラットを用い、肝EGFおよびインスリン受容体の結合能、自己リン酸化能を測定、比較検討し、両受容体の機能制御の特質を明らかにする事を通じてインスリン抵抗性の本体を追究せんとした。

### 〔方 法〕

- ① 高脂肪食飼育ラットの作成：体重120gのSprague-Dawley系雄性ラットを、高脂肪食（炭水化物15.5%、蛋白質24.5%、脂肪60%（主にラード））、又は対照食（ラット用標準飼料 炭水化物61%、蛋白質27%、脂肪12%（主にコーン油））にて2週間飼育し、断頭し、採血および肝の摘出を行った。
- ② 肝マイクロゾーム膜分画及び受容体分画の調製：肝をhomogenateし、核成分を除去後、遠心分離（ $10 \times 10^4 g$ , 90分間）し、得られた沈澱を再浮遊しマイクロゾーム分画とした。これをTriton

-X100 で可溶後、WGA カラムに吸着させ、N-アセチルグルコサミンにて溶出させ受容体分画とした。

- ③ インスリン及びEGF受容体結合能の測定：受容体分画のEGF、インスリン受容体の結合能は、同分画を $^{125}\text{I}$ -EGF（インスリン）、種々濃度の未標識EGF（インスリン）と16時間4℃で孵置後、受容体結合リガンドを、ポリエチレングリコール法で分離測定した。マイクロゾーム分画での結合能も同様に行い、膜結合リガンドをWhatmanGF/B フィルターにて捉え、遊離リガンドと分離した。
- ④ EGF受容体およびインスリン受容体自己リン酸化能の検討：各分画を4℃16時間リガンドと孵置後、5 mM  $\text{Mn}^{2+}$ 、10  $\mu\text{M}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP 存在下で自己リン酸化反応を行わせた後、Laemmli の buffer を添加し、煮沸によりリン酸化反応を止めた。SDS-PAGE, autoradiography にて、ゲル上のリン酸化蛋白部位を同定し、同部位の $^{32}\text{P}$  取り込みを液体シンチレーションカウンターにて測定した。
- ⑤ 統計処理：データは平均 $\pm$ SEMで表した。統計的有意差の検定には Student's unpaired t test を用い、 $p < 0.05$  を有意水準とした。

#### 〔成績〕

- ① 実験動物の特徴：高脂肪食飼育ラットで、対照ラットと比し、軽度の体重増加、インスリン値上昇を認めたが、血糖には変化を認めなかった。血中脂質は、高脂肪食群で有意に上昇していた。
- ② 受容体結合能

EGF 結合：受容体分画では、十分なEGF結合が得られなかった。高脂肪食群におけるマイクロゾーム膜分画のEGF結合能は $36.9 \pm 6.6\%$ と対照群の $59.9 \pm 6.2\%$ に比し有意に低下していた（ $p < 0.05$ ）。Scatchard 解析の結果、この低下は主に受容体数の減少によるものであった（対照群  $1795 \pm 119 \text{ pM}$  vs 高脂肪食  $936 \pm 141 \text{ pM}$ ,  $p < 0.05$ ）。

インスリン結合：受容体分画でのインスリン結合能は対照群  $24.7 \pm 4.5\%$ 、高脂肪食群  $26.0 \pm 3.8\%$ と両群で差を認めなかった。マイクロゾーム膜分画では高脂肪食群で、対照群の67%への有意の低下を認め（ $p < 0.05$ ）、Scatchard 解析の結果、主に親和性の低下によることが明らかとなった。

- ③ 受容体自己リン酸化

EGF受容体：受容体分画におけるEGF受容体の自己リン酸化能は、高脂肪食群では蛋白当りで有意に低下していた（EGF 420 nM 添加時対照群  $62.3 \pm 7.2$ 、高脂肪食群  $21.9 \pm 4.7 \text{ f moles}/10 \mu\text{g protein}/10 \text{ min}$ ,  $p < 0.05$ ）。マイクロゾーム分画では、蛋白量当りで高脂肪食群で有意に低下していた（EGF 420 nM 添加時、対照群  $49.6 \pm 3.1$ 、高脂肪食群  $20.2 \pm 2.9 \text{ f moles}/150 \mu\text{g}/10 \text{ min}$ ）が、受容体数当りでは有意差を認めなかった。

インスリン受容体：高脂肪食群では、インスリン受容体の自己リン酸化能は、全インスリン濃度において対照群の約 $\frac{1}{2}$ と著明に低下していた。この自己リン酸化能は受容体結合能で補正した後も、高脂肪食群で有意に低下していた（インスリン83nM添加時、対照群  $51.5 \pm 2.5$ 、高脂肪食  $23.5 \pm 4.4$

f moles /10% Binding Activity /10 min,  $p < 0.05$  )。

〔総括〕

高脂肪食摂取ラットにおいて以下の結論を得た。

- ① EGF 受容体の結合能は低下し、主に EGF 受容体数の減少によるものであった。
- ② EGF 受容体自己リン酸化能の低下は受容体数の低下によるものであり、受容体の質的異常ではないと考えられた。
- ③ インスリン受容体数に変化を認めず、膜分画では、インスリン受容体の結合親和性低下を認めた。
- ④ インスリン受容体自己リン酸化能は、受容体数補正後も低下しており、これは受容体キナーゼ活性それ自身の低下を意味した。
- ⑤ 両受容体共、自己リン酸化能低下を認めるが、EGF 受容体では受容体数減少、インスリン受容体ではキナーゼ活性の低下、と異なった原因によるものであった。

### 論文審査の結果の要旨

本論文は、インスリン抵抗性を呈する高脂肪食飼育ラットを用いて、共にチロシン特異的キナーゼ活性を有する EGF 及びインスリン受容体の発現及び機能の制御について検討したものである。

その結果、受容体自己リン酸化が、共に低下していることを認めた。さらに、その本態が、EGF 受容体では受容体数の減少、インスリン受容体ではキナーゼ活性自体の低下であることを明らかにし、両受容体の動態調節機序が異なることを証明した論文であり、学位論文としての意義は大きい。