

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成9年度博士課程 入学

氏名 トンソン・ブーンリット

指導教官 小野 憲一郎

論文題目 : Effects of insulin-like growth factor-I on fetal growth and placental amino acids transport in pregnant rats
(和訳 ラットの胎仔発育ならびに胎盤アミノ酸輸送に及ぼすインスリン様成長因子-Iの作用に関する研究)

インスリン様成長因子-I (insulin like growth factor - I: IGF-I) はインスリンファミリーに属する成長因子の一つで、成長ホルモン依存性に肝臓で産生され、血中に存在し、成長ホルモンの示す生理活性を仲介するとされている。しかしながら、妊娠期においては、母体血中 IGF-I は成長ホルモンに関連なく増加し、その分泌制御は視床下部・下垂体ではなく胎盤によると推測されている。また、その濃度が出生仔の体重と有意な相関を示すこと、あるいは胎盤には IGF-I のレセプターが多数存在することなどから、胎盤を介して胎仔発育に重要な役割を果たしていると考えられている。すなわち、胎盤における糖やアミノ酸輸送など胎仔への栄養輸送を活性化することで、胎仔発育を促進させると推測されているが、その詳細は不明である。一方、アミノ酸は胎仔の発育を考える上で最も重要な栄養素の一つで、蛋白質合成あるいはエネルギー産生の基質であるアミノ酸の母体から胎仔への輸送は胎仔発育に決定的な役割を果たしている。実際、妊娠ラットを絶食させると、胎仔血中アミノ酸濃度

の低下と胎仔重量の低下が認められており、また各種動物において胎仔血中アミノ酸濃度は母体血中のそれに比較して高値を示す。したがって、IGF-I の胎児発育に及ぼす影響を考える上では、胎盤のアミノ酸輸送との関連を明らかにする必要がある。そこで、ラットの胎仔発育ならびに胎盤アミノ酸輸送に及ぼす IGF-I の作用について検討を加えた。一方、胎盤アミノ酸輸送は数種の輸送系を介すると報告されているが、とくに胎仔発育には体蛋白構成アミノ酸である分枝アミノ酸ならびにエネルギー源となる糖原性アミノ酸の輸送に重要なアミノ酸輸送系 L-システムに注目し、その輸送担体の発現、ならびにその制御と IGF-I との関連についても検索した。

まず、第 1 章では胎仔重量、胎盤重量、ならびに母体血中、臍帯血中、胎仔血中アミノ酸濃度に及ぼす IGF-I の影響について検討した。妊娠ラットに合成ヒト IGF-I (1、2、および 4 $\mu\text{g/g}$ 体重) を、妊娠 18 日目から 21 日目まで、12 時間おきに計 6 回投与し、胎子ならびに胎盤重量を測定するとともに、母体動脈血、臍帯静脈血ならびに胎子血中のアミノ酸濃度を高速液体クロマトグラフィで測定した。母体の体重増加率、摂餌量、胎仔数に IGF-I 投与による影響は認められなかった。IGF-I を 1 および 4 $\mu\text{g/g}$ 投与した群では、対照群 (生理食塩水投与) に比較して、胎仔重量、胎盤重量、各血中アミノ酸濃度に差は認められなかった。しかしながら、2 $\mu\text{g/g}$ 体重投与群で、胎子重量、胎盤重量に有意な増加が認められ、また胎子へのアミノ酸取り込みを表す、胎子血中/母体血中アミノ酸濃度比で、ロイシン、イソロイシン、トリプトファン、フェニルアラニン、チロシンならびにアルギニンの有意な高値が認められた。したがって、IGF-I は胎盤のこれらアミノ酸輸送を増強させることで、胎子発育に影響を及ぼしていると考えられた。

第 2 章では、胎盤微絨毛膜小胞を用いたアミノ酸輸送活性に及ぼす IGF-I の影響について検討した。すなわち、第一章と同様に合成ヒト IGF-I を投与した妊娠ラットから妊娠 21 日目に胎盤を採取し、胎盤微絨毛膜小胞を調製した。得られた微絨毛膜小胞を用いて、コラーゲンマトリックスの構成アミノ酸であるプロリン、体蛋白構成アミノ酸であるロイシン、エネルギー源となるアミノ酸であ

るアラニンの取り込みを測定した。いずれの用量を投与したラットから調製した微絨毛膜小胞も対照ラットから得られた小胞とマーカーとなる酵素活性、膜の方向性、精製率など、その性状に差は認められず、IGF-I は胎盤微絨毛膜小胞の特性に影響を与えないものと考えられた。一方、微絨毛膜小胞へのアミノ酸取り込みは、検討したいずれのアミノ酸についても Michaelis-Menten kinetics に従う飽和曲線を示した。得られた基質親和性定数 (K_m) ならびに最大取り込み量 (V_{max}) では、IGF-I を $1 \mu\text{g}$ 投与した群のナトリウム依存性のプロリン取り込み、ならびに $2 \mu\text{g}$ 投与群のナトリウム非依存性のアラニン取り込みで K_m 値の増加が、 $1 \mu\text{g}$ 投与群のナトリウム依存性プロリン取り込みの V_{max} に有意な増加が認められた。したがって、IGF-I は胎盤のアミノ酸取り込み、とくにプロリンに代表されるアミノ酸輸送系を増強させることで、胎児発育に関連すると推測された。

第3章では、胎盤に存在すると報告されている各種アミノ酸輸送系のうち、アミノ酸輸送系 L-システムに着目し、その輸送担体のサブユニットである LAT1 (L-type amino acid transporter 1)、LAT2 (L-type amino acid transporter 2)、ならびに膜表在性の糖蛋白で、LAT のシャペロンである 4F2 のメッセンジャー RNA の発現を検討した。すなわち、第1章、第2章の結果から合成ヒト IGF-I を $2 \mu\text{g/g}$ 体重の用量で投与した妊娠ラットから妊娠 2 日目に胎盤を採取し、RNA を抽出した後、Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法で、各 mRNA 発現量を解析した。各 mRNA の発現量は各 PCR 産物を組み込んだプラスミドの標準曲線から算出した。IGF-I 投与により LAT1 ならびに 4F2 mRNA の発現量には対照群と差は認められなかったが、LAT2 mRNA の発現量は投与群で有意に高かった。したがって、IGF-I は少なくとも胎盤微絨毛膜のアミノ酸輸送担体である LAT2 の発現量を増加させ、胎盤のアミノ酸輸送活性を増強させることで、胎児発育に関連するものと考えられた。

第4章では、IGF-I による LAT2 の転写調節領域について Chinese hamster ovary 細胞 (CHO-K1) を用いて検討した。まず、CHO-K1 細胞の IGF-I による LAT2 mRNA の変動を検討した。すな

わち、CHO-K1 細胞を 500 nM の IGF-I 存在下で、37℃、5% CO₂ の条件で 1 ならびに 2 時間培養し、LAT2 mRNA の発現量を RT-PCR 法で測定した。CHO-K1 細胞の LAT2 mRNA 量は IGF-I 添加により、いずれの培養時間においても対照（無添加）と比較して有意に増加した。ついで、LAT2 遺伝子の 5' 側上流の単離を試みた。すなわちラットの白血球から得たゲノム DNA を 4 種（Dra I、Eco RV、Pvu II、Stu I）の制限酵素で切断した後、Universal Genomewalker Kit を用いて 5' 端に adaptor sequence を導入した。ついで、adaptor sequence をセンスプライマーとし、LAT2 遺伝子の 80-104 に位置する配列をアンチセンスプライマーとして PCR 法で増幅し、Pvu II で切断した断片から最長の約 2 kb の PCR 産物を得た。得られた PCR 産物をクローニングし、LAT2 遺伝子の 5' 側約 2 kb の領域を単離し、その塩基配列を決定した。つぎに、この領域について長さの異なる 8 種の断片を作成し、それらのプロモーター活性を secretory alkaline phosphatase (SEAP) を用いたレポーターアッセイで検討した。すなわち、CHO-K1 細胞に各断片を組み込んだプラスミドを導入し、IGF-I の 50 ならびに 500 nM 存在下、37℃で 9 時間培養した培養上清の SEAP 活性を測定した。検討した約 2 kb の転写調節領域の内、転写開始部位近傍の 88 bp の領域で対照に比較して有意な SEAP 活性の増加が認められ、転写開始点を 1 として-409 までの 423 bp の領域では有意な抑制が認められた。転写開始部位近傍の 88 bp の領域で認められる SEAP 活性は他の領域に比較すると著しく低い値ではあるものの、検討しえた 5' 上流 2 kb の転写調節領域について考えると、この領域が IGF-I による LAT2 遺伝子発現調節に関与する可能性があるものと推測された。

以上の結果から、IGF-I は胎盤の L システムのアミノ酸輸送担体である LAT2 をコードする遺伝子転写を活性化し、LAT2 の産生を増加させ、母体のアミノ酸輸送活性を増強させることで、胎児発育に関連しているものと推測された。