

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：37109

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500791

研究課題名（和文） 妊婦・胎児栄養における IGF-1, IGFbps の役割

研究課題名（英文） Involvement of IGF-1 and IGFbps in nutrition during pregnancy and infancy

研究代表者

内山 文昭 (UCHIYAMA FUMIAKI)

中村学園大学・大学院栄養科学研究科・教授

研究者番号：20389331

研究成果の概要（和文）：

2 種類の飼料（アブラナ科の多年生植物マカ根の有無）と IGF-1 の生理作用に関わるタンパク質の挙動についてラット肝臓での遺伝子発現レベルを DNA マイクロアレイ解析で検討した。その結果、IGFBP-2 の遺伝子発現はマカ根の添加により 8.5 倍の遺伝子発現の上昇が観察された。それ以外の IGF-1 関連タンパク質は±50%の遺伝子発現レベルで変化した。これらの結果から、アブラナ科の多年生植物マカ根がラットの肝臓で特異的に IGFBP-2 の遺伝子発現を促進させることが判明した。

研究成果の概要（英文）：

This study investigated the expression profile of IGF-related genes in the liver of female rats with differential food intake with or without *Lepidium Meyenii* root by using DNA microarray. The expression of IGF-related genes presented in changes within ±50%. Uniquely, there was an 8.5-fold increase in IGFBP-2 mRNA expression. These results show that *Lepidium Meyenii* root may specifically induce the IGFBP-2 gene expression in rat liver.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
平成 23 年度	800,000	240,000	1,040,000
平成 24 年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食と栄養

キーワード：Insulin-like growth factor 1 (IGF-1)・IGF-binding proteins

## 1. 研究開始当初の背景

妊婦の栄養状態が胎児の発育に大きな影響を与えている。その影響は、単に胎児の発育にとどまらず、乳児期から成人・高齢期まで及んでいる。現在、この検証は疫学的研究から胎児・幼児期の発育が成人期以降で生活習慣病の原因になることが判明しているが、その原因について分子生物学的、あるいは生化的には解明されていない。

学的には解明されていない。

IGF-1 は生体の多くの細胞で増殖および生理機能維持をつかさどるホルモンであり、成長ホルモンによるエンドクリン型の発現誘導と局所では種々のシグナルによる遺伝子発現で産生されている。主な IGF-1 産生組織は肝臓である。IGF-1 は IGF-binding protein (IGFBP)、主に IGFBP-3 と結合して体循環し、

エンドクリン型ホルモンとして全身に IGF-1 を供給し、また、局所で独立して産生される IGF-1 はパラクリン (あるいはオートクリン) 型ホルモンとして機能している。

IGF-1 の各細胞での特異的な作用は、IGF-1 レセプターを介して中枢神経系、骨格筋、脂肪組織、肝臓、腎臓、骨などほとんどすべての組織で、組織の形成および再生に重要な役割を演じている。IGF-1 の組織特異的な作用発現は生体のバランスから考えると非常に重要な問題になり、その鍵は種々の IGF-BPs が関与した複雑なメカニズムにある。in vitro での IGF-1 と IGF-BPs の結合による作用は各々の事象で解明されている。また、IGF-1 の血中濃度は年齢依存型に減少し、その減少は脳の認知機能、脳でのアミロイドβの蓄積、筋力低下、骨形成などに相関しており、認知症は IGF-1 遺伝子発現を中心にして改善できる可能性が報告されている。このような背景から IGF-1 と IGF-BPs の産生量と摂取食物の関係を解析する。

## 2. 研究の目的

胎児期から幼児期の成長速度が成人期以降の疾病発生に重要な役割を果たしていることが疫学的に明らかになっている。その詳細なメカニズムを解明するため、胎児期から幼児期の成長速度を Insulin-like growth factor-I (IGF-1, インスリン様成長ホルモン) と 6 種類の IGF-binding proteins (IGF-BPs, IGF 結合蛋白質) の関係から明らかにする。そのため本研究は IGF-binding proteins の活性種の同定、IGF-binding proteins の遺伝子発現プロファイルの作製を目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) IGF-binding proteins の切断酵素である pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-a) を組換え体で作製する。

(2) IGF-1, IGF-BP の遺伝子発現プロファイルにおける食事の効果をラットを用いて検討する。

## 4. 研究成果

(1) pregnancy-associated plasma protein-A に関する研究

胎児期から幼児期の成長速度は Insulin-like growth factor-I (IGF-1, インスリン様成長ホルモン) が調整しており、ヒトの羊水および血中の IGF-1 は IGF 結合蛋白質と複合体を形成している。pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-a) は IGF 結合蛋白質を特異的に切断することにより IGF-1 を活性化されると考えられている。その酵素の切断機構について詳細なメカニズムは不明である。そこで平成 22

年度は PAPP-a という IGF 結合蛋白質の特異的切断酵素の性状を検討するために、PAPP-a 蛋白質のドメイン構造の組換え体による発現ユニットを作製した。羊水中の PAPP-a 蛋白質は proMBP タンパク質と複合体として存在し、その複合体ではプロテアーゼ活性が不活化されており、酵素活性の測定に用いることができない。また、PAPP-a は 1,547 のアミノ酸残基からなり、Arg-rich propeptide domain, LamG domain, metalloprotease domain, cystein rich repeat domain, Susil~4 domain, Notch domain から構成されており、プロテアーゼ活性の活性化、不活性化におけるドメインの寄与は不明である。そのため、各ドメイン構造を独立して、その組合せを遺伝子組換え体で作製することにした。各ドメインに対するプライマーを設計し、オリゴヌクレチドを調製した。そのプライマーを用いて PCR 反応を行い、各ドメインに相当する DNA 断片をアガロース電気泳動で検出した。一方、PAPP-a の基質は、IGFBP-4 および IGFBP-2 の切断部位が知られている。最短鎖の合成基質の得る目的で、様々な立体構造を有するペプチドを合成した。現在、PAPP-a の各ドメインを用いてプロテアーゼ活性を探索している。

平成 23 年度の研究は IGFBPs を定量するための ELISA の構築する計画であった。体液中の IGFBP-4 は intact IGFBP-4 のみならず特異的なプロテアーゼ切断による N-terminal domain と C-terminal domain の断片体が存在している。そこでそれら断片体を含めて ELISA で定量することを目的として intact IGFBP-4 および N-terminal domain と C-terminal domain の断片体を遺伝子組換え体を用いて調製することとした。それらの DNA は IGFBP-4 cDNA より PCR にて作製し、大腸菌での分泌発現用ベクターに結合させた。発現ベクターは alkaline phosphatase promoter, alkaline phosphatase signal sequence を用いた (中村学園大学薬膳科学研究所研究紀要、第 2 号、2009、1-8、バクテリオファージからアルカリフォスファターゼへのペプチド転送システム、内山)。その signal sequence の下流に IGFBP-4 cDNA および N-terminal domain と C-terminal domain DNA を融合させて組換え体を作製した。それら組換え体は MOPS 培地で 0.1 mM リン酸二水素カリウムの存在下でプロモーターを誘導した。菌体は浸透圧ショックを与えた後、ペリプラズマ分画の蛋白質を回収した。ペリプラズマ分画の蛋白質は SDS-PAGE で蛋白質を分離した後、抗 IGFBP-4 抗体を用いて Western Blotting を行った。その結果、通常の培養条件では IGFBP-4 の分子サイズを示す蛋白質は Western-Blotting で確認できていない。現在、種々の培養条件を検討している。

(2) IGF-1, IGFBP の遺伝子発現プロファイルにおける食事の作用に関する研究

ヒトおよび動物における成長は下垂体から分泌する成長ホルモン (GH) が担っており、GH は IGF-1 (インスリン様成長因子) の産生を促進しており、その IGF-1 が細胞増殖を誘発する。末梢における IGF-1 の主要な産生臓器は肝臓である。一方、IGF-1 は種々の IGF-binding proteins (IGFBPs) が存在し、細胞増殖の誘発と抑制に関与している。摂取食物と肝臓における IGF-1 およびその IGFBPs の遺伝子発現の関係を検討した。離乳食後の雌ラットに 2 種類の飼料 (同カロリー) を与え続け、成長期において体重、摂食量ともに有意差はなく、また GH の下垂体での遺伝子発現および血中濃度に有意差はないことを確認した。この状態で肝臓を摘出して RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析した。両群比較すると、 $\beta$ -actin の差異 (SE<10%、STDEV=3.94%) はほとんどなく、IGF-1 は variant 2, variant 4 で各々 STDEV=16.5%, 23.3% で大きな差異は認められなかった。7 種類の IGFBP (IGFBP 1 から 7) のうち、IGFBP 5 および IGFBP 7 以外は肝臓で発現しており、発現している IGFBPs のうち、IGFBP 2 は両群において 8.5 倍の遺伝子発現量の差異が存在した。その他の IGFBPs には大きな差異は認められなかった。以上の結果、食事成分は GH-IGF axis において肝臓での IGFBP 2 の遺伝子発現を大きく変化させることが判明した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① 内山文昭, 食品の多成分系生体応答機構、中村学園大学薬膳科学研究所・研究紀要、査読有、5 号、2012、1-4
- ② 内山文昭、治京玉記、消化管における食物成分の認知機構と生理機能の誘導、中村学園大学薬膳科学研究所・研究紀要、査読有、4 号、2011、1-5
- ③ Tamaki Jikyo and Fumiaki Uchiyama, Current Progress of Amniotic Fluid Proteome Analysis, Proceedings of PAMD Institute of Nakamura Gakuen University, 査読有、4, 2011, 6-24
- ④ Uchiyama F., Challenge in protein-small molecule Interactions. Proceedings of PAMD Institute of Nakamura Gakuen University, 査読有、3, 1-6, 2010

[学会発表] (計 12 件)

- ① 治京玉記、竹田亮介、緒方みさと、内山文

昭、ペルー産薬用植物マカのラットに対する黄体形成ホルモン (LH) の分泌促進効果の影響、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 28 日、神奈川県、パシフィコ横浜

- ② 緒方みさと、治京玉記、竹田亮介、内山文昭、マイクロアレイ解析によるマカの生理機能探索、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 28 日、神奈川県、パシフィコ横浜
- ③ T. Jikyo, T. Kimura and F. Uchiyama, 32 th International Symposium on the Separation of Proteins, Peptides and Polynucleotides, Application to protein analysis by thin layer chromatography, September 24, 2012, Istanbul, Turkey
- ④ 9 th European Symposium on Biochemical Engineering Science ISPPP, F. Uchiyama, M. Ogata and T. Jikyo, "Generation of the conformational propensities in phage peptide libraries" September 24, 2012, Istanbul, Turkey
- ⑤ 竹田亮介、緒方みさと、治京玉記、内山文昭、ファージディスプレイにおけるペプチド融合法と親和性、日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 30 日札幌
- ⑥ 緒方みさと、竹田亮介、治京玉記、内山文昭、ファージディスプレイによるランダムペプチドの鎖長と立体構造の変化、日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 30 日、札幌
- ⑦ 治京玉記、木村太郎、緒方みさと、内山文昭、TLC 法を用いたタンパク質解析への適用、日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 29 日、札幌
- ⑧ 河合真、信原一敬、治京玉記、内山文昭、陰イオン交換型シリカゲルの作成と蛋白質分離用 HPLC への応用、第 27 回日本イオン交換研究発表会・第 30 回溶媒抽出討論会 2011 年 11 月 25 日、宮崎
- ⑨ 内山文昭、治京玉記、竹田亮介、金子美帆子、ファージペプチドライブラリーを用いたストレプトアビジン結合ペプチドの同定、日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月 31 日、岡山
- ⑩ 治京玉記、竹田亮介、金子美帆子、内山文昭、HPLC 法を用いたヒト尿解析への適用、日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月 29 日、岡山
- ⑪ T. Jikyo and F. Uchiyama, Preference of amino acid residues in the synthesis of cyclic peptides, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2010/12/19, Hawaii Convention, Center

- ⑫ F. uchiyama, T. Chihara, T. Jikyo, S. Mori and M. Kaneko, Engineering of M13 minor coat protein generates conformational variability in phage peptide libraries, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2010/12/19, Hawaii Convention, Center

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内山 文昭 (UCHIYAMA FUMIAKI)  
中村学園大学・大学院栄養科学研究科・  
教授  
研究者番号：20389331

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：