

My Thesis (私の学位論文)

ヘルスバイオサイエンス研究部分子薬理学分野教授 吉本勝彦

Yoshimoto K, Nakamura T, Ichihara A.

Reciprocal effects of epidermal growth factor on key lipogenic enzymes in primary cultures of adult rat hepatocytes : Induction of glucose-6-phosphate dehydrogenase and suppression of malic enzyme and lipogenesis

(成熟ラット初代培養肝細胞における上皮細胞成長因子の脂質合成系酵素に対する相反的效果：グルコース-6-リン酸脱水素酵素の誘導およびリンゴ酸酵素、脂質合成の抑制)

J Biol Chem 258:12355-12360, 1983 [本文へのリンク](#)

1979年岐阜大学医学部を卒業後、内科に進む前に基礎的トレーニングを受ける目的で、郷里の徳島大学大学院医学研究科(酵素病理学、市原明教授)に入学した。高校3年次の担任から、旧制松山高校で同級生であった市原先生を紹介して頂いたのが縁で、何の予備知識もなく飛び込んだ。その際、与えられたテーマは、「ラット初代培養肝細胞においてインスリンによるグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PDH) 誘導機構」を検討することだった。大学時代は全く実験・研究に従事したことがないため、中村敏一先生(当時講師、大阪大学名誉教授、紫綬褒章)から、メスピペットの使い方をはじめとする種々の生化学の実験手技や実験結果のプレゼンテーション法などの手ほどきを受けた。

G6PDHはペントースリン酸経路(脂肪酸やステロイドの合成に必要な補酵素であるNADPHや核酸の材料となる五炭糖を供給)の律速酵素である。ラット肝臓からG6PDHをイオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィーなどにより精製し、ウサギに免疫して抗体を得た。本抗体を用いて、インスリン処理によるG6PDHの合成速度および蛋白量の増加を確認した([J Biochem 91:681-693, 1982](#))。

NADPHは、ペントースリン酸経路とmalic enzymeによる反応により供給される。次のテーマは、本抗体を用いてG6PDH活性を特異的に抑制しペントースリン酸経路を遮断した際の代謝変化を検討することであった。培養肝細胞に抗体を導入する方法として、抗体を封入した赤血球を肝細胞と細胞融合させる方法や、リポソームに抗体を封入し肝細胞に取り込ませる方法を試したが、いずれも導入効率が悪いことから断念せざるを得なかった。現在ではsiRNAを用いると簡単に目的は達成されると考えられる。

その後、肝臓におけるリポ蛋白合成調節機構の解析に取り組んだ。脂質はアポ蛋白と結合しリポ蛋白として血液中で運搬される。そこで、肝細胞に脂肪酸合成酵素阻害剤を処理し脂質プールを低下させた場合、アポ蛋白合成も協調的に低下するとの仮説のもと、実験を行った。ラット血液からのリポ蛋白の単離、そこから各種アポ蛋白の精製、抗体作製を進めたが、肝細胞における脂質プール低下が十分に達成できず中断となった。当時は無血清培地では肝細胞を培養できず、培地の血清に含まれるリポ蛋白の影響が脂質プール低下に抑制的に作用した可能性がある。この課題も現在では肝細胞における脂質合成系酵素のsiRNAによるノックダウンやノックアウトマウスの作製により解決できる可能性がある。

学位論文が未完成で悩んでいた最終学年の春、中村先生が雄マウス顎下腺から上皮細胞増殖因子(EGF)を精製したのを機に、EGF添加によるG6PDH活性への影響を検討してみた。予想外にEGFもインスリンと同様にG6PDHを誘導すること、インスリンとEGFは相加的に作用すること、この誘導はG6PDH mRNAおよび蛋白の増加によることを認めた。当時、mRNA量の測定は、抽出したRNAをウサギ網状赤血球ライセートにおいて³⁵Sメチオニン下で翻訳させ、合成された蛋白を免疫沈降後、電気泳動し、G6PDH部分を切り取り、液体シンチレーションカウンターで測定す

するという間接的方法を取らざるを得なかった ([Biochim Biophys Acta 741:143-149, 1983](#))。

さらに、インスリンと甲状腺ホルモン (T_3) による malic enzyme 誘導および脂質合成促進を EGF は抑制することを見いだした。また G6PDH 誘導は低細胞密度で、malic enzyme 誘導は高細胞密度で増強されるという結果を得た。これらの結果から、G6PDH は休止細胞 (高細胞密度) では脂質合成に、また細胞増殖を示す細胞 (低細胞密度) では核酸合成促進に作用するという 2 面性を有するが、もう一つの NADPH 供給系である malic enzyme は脂質合成のみに作用することを見いだした。この結果をまとめて当時の生化学分野における最高峰である *J Biol Chem* に投稿できたのは 4 年次の 3 月であった。

さらに、この研究の過程において、肝細胞を低密度で培養すると細胞増殖に関与する酵素などが誘導されること、一方、高密度培養下では、肝細胞特異的な機能を有する蛋白の発現が増強することを見いだした。そこで低密度状態の細胞にラット肝臓より単離した細胞膜を添加すると高密度状態を模倣することができた。これは細胞間接触を介して細胞増殖あるいは肝特異的な機能発現に関するシグナルが伝達する可能性を示している ([Proc Natl Acad Sci USA 80:7229-7233, 1983](#))。

この時期は、1-3 年時に比して、実験が非常に楽しかった。自分で実験系を組み立て、結果が予想どおり得られた。1-3 年時は研究に対して受け身の状態であり、4 年次になってはじめて能動的に研究を進めることできたことが、良い結果を得られた理由であろう。

中村先生からの種々の助言を今でも思いだす。「実験台はヒカピカにする。試薬がこぼれても回収できるような状況にすること」、「セミナーや抄読会では必ず 1 つは質問すること」、「勉強しすぎてはいけない。実験するのが馬鹿らしくなる」、「論文は批判的に読むこと」、「成果は論文にすること。学会発表だけで、論文にできていない研究者がたくさんいる」、「学会発表法は京都大学医化学の早石研を見習え」、「米国では遺伝子を扱えるものがいくらでもいる。これからは蛋白を扱えるものが見直される時期がくる」などである。

酵素病理・酵素化学を中心とする医学部附属酵素研究施設や医学部生化学教室、栄養学科の多くの教室が、生命科学の諸問題に生化学的方法で取り組んでおり、当時、徳島大学は「生化学のメッカ」と言われたほどである。当時の市原研においては、市原明教授、中村敏一助教授、野田千征子助手 (元兵庫大学健康科学部教授)、田中啓二助手 (東京都医学総合研究所・所長、文化功労者)、富田優美子教務補佐員副手 (元分子酵素学研究センター助手) の教職員および医学部、歯学部、薬学部、獣医学部、医学部栄養学科出身の大学院生および学外の研究者が、初代培養肝細胞を用いて種々の研究を進めており、後の最盛期 (HGF やプロテアソームの発見)への助走時期だった。この環境下において、研究の面のみならず、多くの先輩・同級生・後輩と苦労を分かち合うことにより人間力向上の点でも鍛えられた 4 年間であった。

学位審査時 (1984 年 2 月、徳島大学医学部附属病院第一内科・医員) の発表で用いたスライドの一部を示す。当時のスライドは白黒で、シンプルなものしか作製できなかった。

