培養ヒトリンパ球 (Bri-7K) における インスリンのinternalizationと分解機構について

神戸大学医学部内科学第二講座

八十新治, 横野浩一, 志伊光瑞
播 穰治, 天野和彦, 曾 淑範
今村諒道, 馬場茂明

Evidence for the Internalization and Degradation of Insulin in Cultured Bri-7K Human Lymphocytes

**Shinji YASO, Koichi YOKONO, Kozui SHII,
Joji HARI, Kazuhiko AMANO, Shu-fan ZENG,
Yoshimichi IMAMURA and Shigeaki BABA**

Second Department of Internal Medicine,
Kobe University School of Medicine,
Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe

We have studied the internalization of insulin and the mechanism of insulin degradation in cultured Bri-7K human lymphocytes. The internalization of ^{125}I -insulin was observed by using an acid extraction technique by Heigler's method which removed surface-bound insulin, leaving only intracellular insulin associated with cells. Insulin binding to Bri-7K cells reached a peak at 15 min and showed a gradual fall thereafter at 37°C . Internalization of insulin rose with a peak in 30 min, and its rate was nearly 25% of the total specific cell-associated radioactivity. Insulin degrading activities in Bri-7K cells were examined as to precipitability with trichloroacetic acid (TCA method), Sephadex G-50 column chromatography (gel chromatography method) and the ability to bind to specific receptors on Bri-7K cells (rebinding method). Under conditions demonstrating that the insulin degradation didn't take place in the medium but was cell-mediated, the insulin degradation was not demonstrated by the TCA method. Chromatographic studies showed that the extractable radioactivity consisted almost entirely of intact insulin, whereas the supernatant and the nonextractable radioactivities consisted of large molecular weight material and intact insulin. Thus, the apparent degradation of insulin was not detectable by the TCA and gel chromatography methods, however, using the rebinding method, we could obtain results demonstrating that fair amounts of insulin in the supernatant were degraded. These results suggest that the products of insulin degradation are peptides with a molecular size similar to insulin itself but with little or no receptor binding activity.

In conclusion, insulin internalizes into Bri-7K cells at physiological temperature, and the mechanism of insulin degradation in Bri-7K cells seems to be a limiting proteolysis of insulin by specific enzyme(s).

I 緒 言

インスリンは、単離肝細胞や脂肪細胞など標的細胞の細胞膜に存在するインスリンレセプターに結合し、インスリンレセプター複合体を形成する。さらにその一部は endocytosis により細胞内に internalize され代謝されると考えられている^{7) 8) 13)}。しかし IM-9 細胞を始めとする培養ヒトリンパ球におけるインスリンの internalization や分解機構については、まだ不明点が多い^{4) 6) 24)}。我々は、培養ヒトリンパ球 (Bri-7K) 表面に多数のインスリンレセプター (15,000 個/cell) が存在し、又、インスリンに特異的な蛋白分解酵素 insulin-degrading enzyme (IDE)^{25) 26)} が存在することを報告した²⁰⁾。そこでこの Bri-7K 細胞における insulin internalization を含めたインスリン結合能とインスリン分解活性について検討し、従来報告されている IM-9 細胞の結果と比較した。

II 実験材料及び方法

1 実験材料

Bri-7K 細胞は RPMI 1640 (Flow 社, Virginia) に 10% fetal calf serum (Gibco 社, Grand Island), 2 mM glutamine, 2 mM Na-pyruvate, 10 mM Hepes, 50 μ M 2-mercaptoethanol を加え CO₂ incubator 内で継代培養した。Bri-7K 細胞は実験に供する前に 2 回生理食塩水で洗浄し、1% bovine serum albumin (BSA: Sigma 社, ST. Louis) を含む pH7.4 の Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM: 日水製薬, 東京) に浮遊させたものを用いた。¹²⁵I-porcine insulin (150 ~ 250 μ Ci/ μ g: Dainabott 社, 東京) は使用直前に Sephadex G-50 (Pharmacia 社, Piscataway) column で精製し、99% 以上が trichloroacetic acid (TCA) precipitability のものを用いた。Porcine monocomponent insulin は Novo 社製 (Copenhagen) を用いた。尚、その他の試薬は市販品特級のものを用いた。

2 実験方法

1) 37°C Incubation 中の Bri-7K 細胞生存率に関する検討

24 well の culture plate (Becton Dickison 社, Oxnard) 内で Bri-7K 細胞 2×10^6 個を 1% BSA を含む DMEM (pH7.4) 1000 μ l 中で、95% O₂-5% CO₂ 気相下に、37°C にて経時的に incubate し、細胞はその生存率を trypan blue による dye exclusion で測定した。また死滅したり傷害を受けた細胞より incubation medium 中に放出されると考えられるインスリン分解活性は以下の方法でその有無を検討した。

a) TCA 法⁵⁾

経時的に上清 900 μ l を分離し、その上清と精製した 0.2 ng の ¹²⁵I-insulin 100 μ l を 37°C, 30 分間 incubate し、そのうちの 500 μ l に 15% TCA 500 μ l を加え、1750 $\times$ g 15 分間遠心後の上清に移行した放射活性を求めることによりインスリン分解活性を測定した。

b) Rebinding 法¹⁹⁾

経時的に上清 900 μ l を分離し、その上清と精製した 0.2 ng の ¹²⁵I-insulin 100 μ l を 37°C, 30 分間

incubateしてインスリン分解反応を行ない, そのうちの500 μ l に新たな Bri-7K 細胞 2×10^6 個を加え, 15°C, 120分間 incubate し特異的結合を求めた。対照として精製 125 I-insulin を同様に Bri-7K 細胞と incubate して特異的結合を求め, これを100%とし特異的結合の減弱率をもって分解率とした。

2) Bri-7K細胞におけるインスリン結合能

精製した 125 I-insulin (0.2ng) と Bri-7K 細胞 2×10^6 個を 1% BSA・DMEM (pH7.4) 1000 μ l 中で37°C もしくは15°C にて経時的に incubate した。反応停止のために各 incubation 終了時に氷冷した 1% BSA・DMEM 1000 μ l を加え, 直ちに 4°C, 50×g で 5分間遠心し, 上清を分離した。上清は後で述べるインスリン分解活性測定のために分離し, 残った cell pellet は再度氷冷した 0.2% BSA・DMEM 500 μ l で 2回洗浄し, その放射活性を cell-associated radioactivity として測定した。 125 I-insulin の特異的結合は非標識インスリン 33 μ g 存在下の結合を非特異的結合とし, これを総結合から差引いて求めた。

3) Acid extraction technique の基礎的検討

一般にインスリンが internalize されないと報告されている 15°C¹⁰⁾ で Bri-7K 細胞と 125 I-insulin を 120分間 incubate 後, cell pellet を分離した。その cell pellet を Haigler らの方法⁹⁾ に準じた barbitol sodium acetate buffer, pH 3.0 中 4°C で経時的に incubate し, cell surface に結合している radioactivity の上清への解離率を検討した。対照として phosphate buffered saline, pH 7.3 を用いた。

4) Bri-7K細胞における insulin internalization の検討

Haigler らの方法に準じて行なった。つまり cell-associated radioactivity を acid extraction し, 残った cell pellet は nonextractable radioactivity (intracellular radioactivity) として表現した。すなわち後者はインスリンの internalization を意味するものである。そこで 37°C での Bri-7K 細胞における insulin internalization をインスリン結合能測定時と同様, 経時的に測定した。extractable (cell surface) 及び nonextractable (intracellular) radioactivity は非標識インスリン 33 μ g 存在下のそれぞれの radioactivity を差引いて求めた。

5) Bri-7K細胞によるインスリン分解活性の測定

インスリン結合能測定時での 37°C, 30分における extractable, nonextractable 及び supernatant の radioactivity を Sephadex G-50 column (1×39cm) による gel chromatography²³⁾ で解析した。ただし nonextractable radioactivity は 0.1% Triton X-100, 4 M urea, 1.5 M 酢酸にて可溶化した。尚, elution buffer として 1 M 酢酸を用いた。また supernatant 中のインスリン分解は前述のように TCA 法, rebinding 法でも測定した。

III 実験成績

1) 37°C incubation 中の Bri-7K細胞生存率について

Fig. 1 に示すように, Bri-7K 細胞の 37°C incubation における基礎的検討において, cell viability は 240分まで低下しなかった。又, TCA 法及び rebinding 法にても, 傷害細胞から medium 中へ放出されると考えられるインスリン分解活性は少なくとも 180分まで認められなかった。すなわち我々の用いた assay 系において 37°C, 120分まで Bri-7K 細胞の生存率及び細胞膜の特性は安定していることが証明された。

Fig. 1 Changes of cell viability and insulin degrading activity in the medium during the incubation. After Bri-7K cells (2×10^6) were incubated in $1000 \mu\text{l}$ of 1% BSA DMEM (pH7.4) for the indicated time at 37°C , cell suspensions were centrifuged and separated into cell pellets and supernatants. Supernatants were incubated with purified ^{125}I -insulin for 30min at 37°C . Insulin degrading activities from Bri-7K cells into the medium were examined by TCA (●—●) and rebinding methods (○—○). Cell pellets were used for the assay of trypan blue dye exclusion (■—■). Data represent the mean $\pm$ SEM.

2) Bri-7 K細胞におけるインスリン結合と internalization について

37°C 及び 15°C における ^{125}I -insulin の Bri-7 K 細胞への特異的結合を経時的にみたものを Fig. 2 に示したが、 37°C では15分で $5.6 \pm 0.5\%$ と頂値に達し、以後経時的に低下した。一方 15°C では、90分で $17.8 \pm 0.6\%$ となり以後恒常状態であった。次に、Bri-7 K 細胞においてもインスリンの internalization が認められるか否かを検討するために、まず acid extraction technique の基礎的検討を行なった。Fig. 3 で示すように、pH 7.3 の中性 buffer には cell surface に結合した radioactivity の medium 中への解離が殆んどみられなかったのに対し、pH 3.0 の酸性 buffer 中では高い解離率を示し、5分で最も良く、約92%であった。この結果より acid extraction の条件は 4°C 、5分を用いた。この acid extraction technique を用いて 37°C における ^{125}I -insulin の Bri-7 K 細胞への結合と internalization の状態を検討したのが Fig. 4 である。nonextractable radioactivity つまり insulin internalization は、total 及び extractable radioactivity よりもやや遅れて30分で頂値に達し、その割合は総結合の約25%であった。このことよりインスリンは Bri-7 K 細胞内にも internalize されることが示唆された。

Fig. 2 Effect of temperature on insulin binding to Bri-7K cells.

Bri-7K cells (2×10^6) were incubated in 1% BSA DMEM with purified ^{125}I -insulin ($0.1 \sim 0.3$ ng/ml) from 5 min to 120 min in the absence or presence of $33\mu\text{g}$ of unlabeled insulin at 37°C (upper panel), or 15°C (lower panel). After the terminal time of incubation, cells were washed three times by $500\mu\text{l}$ of ice chilled buffer. Specific bindings that have been corrected for nonspecific binding were determined. Data represent the mean $\pm$ SEM.

Time course of removal of cell-associated ^{125}I -insulin by pH 3.0 and 7.3.

After Bri-7K cells (2×10^6) were incubated with purified ^{125}I -insulin for 120 min at 15°C , cells were separated by centrifugation and were incubated with the barbitol sodium acetate buffer (pH 3.0, $\bullet$ — $\bullet$) or phosphate buffered saline (pH 7.3, $\circ$ — $\circ$) for the indicated time at 4°C . The radioactivity in the medium released from cell-associated ^{125}I -insulin was defined as the extractable radioactivity. % extractable radioactivity of removal of cell-associated ^{125}I -insulin was determined.

Fig. 4 Time course of cell surface and intracellular radioactivity in Bri-7K cells at 37°C.

Cells (2×10^6) were incubated with purified ^{125}I -insulin at 37°C and specific binding determined at the given time points. Intracellular (nonextractable) radioactivity was assayed by extracting with the barbitol sodium acetate buffer at each time point to release all cell surface bound (extractable) radioactivity. All points have been corrected for nonspecific binding.

Fig. 5 Determination of degradation by gel chromatography.

Bri-7K cells (5×10^6) were incubated with purified ^{125}I -insulin for 30 min at 37°C and centrifuged. The cell-associated radioactivities were separated into cell surface (extractable) and intracellular (nonextractable) radioactivities by using an acid extraction technique. Nonextractable radioactivity was solubilized in 0.1% Triton X-100, 4M urea and 1.5M acetic acid. A, supernatant; B, extractable; C, nonextractable radioactivities were applied to a Sephadex G-50 column.

3) Bri-7K細胞におけるインスリン分解活性について

インスリン結合能測定時での37℃, 30分における supernatant, extractable, nonextractable radioactivityをgel chromatographyで解析したものをFig. 5で示した。Fig. 5, A, Cで示すように supernatant 及び nonextractable 即ち intracellular radioactivity において void volumeに少量の peakを認めるのみで, A, B, Cの全てにおいて殆んどの radioactivityが ^{125}I -insulin peakと同一部位に溶出された。さらにインスリン結合能測定時の supernatant におけるインスリン分解活性を TCA 法及び rebinding 法で検討した結果をFig. 6に示した。TCA 法では120分の incubation でも6%と低く, gel chromatography 法の結果と同様にインスリン分解を殆んど認めなかったのに対し, rebinding 法でみると経時的にインスリン分解が増加し, 120分では約35%のインスリンがレセプターに対する結合能を失っていた。

Fig. 6 Insulin degradation in the supernatant after insulin binding assay. Bri-7K cells (2×10^6) were incubated with purified ^{125}I -insulin for the indicated time at 37°C and the supernatant was separated by centrifugation. Insulin degradation in the supernatant was assayed by 7.5% TCA and rebinding methods.

IV 考 察

今回の我々の研究は, 培養ヒトリンパ球 (Bri-7K) において, インスリンが細胞へ internalization されること, そしてインスリンはこの細胞において限定分解を受けることを示唆したものである。従来, 肝細胞や脂肪細胞などのインスリンの標的細胞においてはインスリンの internalization や分解が生じると報告されているが³⁾¹⁷⁾, 主として IM-9 を用いた培養ヒトリンパ球においてはこれらの機序が殆んど認められないとされていた。¹⁾¹⁹⁾ インスリンの internalization は肝細胞や線維芽細胞において ^{125}I -insulin の電顕的ラジオオートグラム⁸⁾や蛍光物質であるローダミンで標識したインスリンを用いた観察²²⁾により証明されたが, IM-9 を用いて可視的にレセプターの internalization を証明した報告はない。さらに internalization のもうひとつの証明として lysosomotropic agent であるクロロキンや塩化アンモニウムを用いた実験がある。つまりクロロキンで処理された肝細胞¹⁰⁾や脂肪細胞¹⁶⁾において, 37℃の条件下で細胞内に取り込まれた ^{125}I -insulin のライソ

ゾームにおける分解がクロロキンによって抑制され、その結果¹²⁵I-insulinの細胞への結合率が增加することを利用したものである。Baldwinら¹⁾はクロロキンを添加したIM-9細胞で¹²⁵I-insulinの結合率が増加しないことよりIM-9細胞においてインスリンのinternalizationが生じないとしたが、リンパ球には元来ライソゾーム系が殆んど欠除しているとされており¹²⁾、また我々の教室の曾による報告でもBri-7K細胞にはライソゾームのマーカー酵素であるcathepsin C活性が全く認められていない²⁸⁾。以上の結果はIM-9細胞においてもインスリンのinternalizationが生じる可能性を残すものと考えられる。最近、Haiglerら⁹⁾はacid extraction techniqueを用いてcell-associated radioactivityのうち細胞膜に結合しているradioactivityのみを解離することに成功し、epidermal growth factorのBALB 3T3細胞へのinternalizationを証明した。Olefskyら¹⁰⁾もこの方法を用いて脂肪細胞とIM-9細胞でインスリンのinternalizationを検討しているが、脂肪細胞に比して軽度ではあるがIM-9細胞においても認められている。インスリンのinternalizationの生理的意義がレセプターのdown regulationやインスリンの代謝に関与しているの²¹⁾¹⁰⁾であれば、IM-9¹¹⁾やBri-7K細胞においてもインスリンによるレセプターのdown regulationが認められることにより、レセプターのある細胞ではホルモンのinternalizationが生じると考えるのが理論的であるのかもしれない。

次に、Bri-7K細胞におけるインスリン分解活性を検討してみると、TCA法、gel chromatography法では明らかな¹²⁵I-insulinの分解が認められなかったがrebinding法でみるとかなりの¹²⁵I-insulinがこの細胞により分解されていた。Sonneら²⁴⁾はIM-9細胞においてインスリンの分解が認められないと報告しているが、彼らはその実験系に非特異的なプロテアーゼを阻害する目的でbacitracinを使用している。しかし、このbacitracinは単にプロテアーゼインヒビターとして作用するだけでなく、ホルモンの細胞内へのendocytosisをも阻害する作用を有しており¹⁸⁾、そのためレセプター依存性のインスリン分解を抑制してしまう可能性があると考えられる。さらに、今回の我々の報告のようにリンパ球にはライソゾーム活性が殆んど認められないことより、¹²⁵I-insulinがライソゾームにて低分子物質まで分解されることはなく、インスリンの分解をTCA法やgel chromatography法で同定することは困難と考えられる。つまり、我々が既に報告したようにIM-9細胞²⁷⁾にもBri-7K細胞²⁸⁾にもIDEが存在しており、¹²⁵I-insulinはIDEにより限定分解をうけるが、標的細胞のようにライソゾームにて低分子物質まで分解されず、分子量的に殆んど正常インスリンと変わらないまま残存している可能性が考えられる。最近、Misbinら¹⁴⁾はラット肝細胞における¹²⁵I-insulinの中間分解産物の存在を報告しており、これはゲルろ過では正常インスリンと殆んど区別できない分子量約5,000の物質であるがインスリンレセプターに対する結合性は正常インスリンに比して著明に低下している。ラット肝細胞にもIDEが存在していることより²¹⁾、この中間代謝産物が今回のBri-7K細胞に認められたと同様、IDEにより限定分解をうけた¹²⁵I-insulinのfragmentである可能性が考えられる。

V 結 語

培養ヒトリンパ球Bri-7K細胞におけるインスリンのinternalization及び分解機構を検討した。その結果以下の如くである。

1) 細胞からmedium中へ放出されるインスリン分解活性は120分まで認められず、同時にtrypan blue exclusionによるcell viabilityを検討したが低下を認めなかった。以上のことからインスリ

ン分解は cell-mediated によるものと考えられた。

2) 37℃でのインスリン結合能は15分で頂値に達し、以後経時的に低下した。15℃では90分で頂値に達し、以後恒常状態であった。インスリンの internalization は37℃において30分で頂値に達し、その割合は総結合の約25%であった。

3) Bri-7K細胞と¹²⁵I-insulinを37℃でincubateした時のmedium中のインスリン分解活性は、TCA法で120分、6%と低値であり、gel chromatography法でもsalt peakを認めなかった。しかし rebinding法でみると経時的にインスリン分解が増加し、120分では約35%であった。

4) cell-associated radioactivityのうちintracellular radioactivityは、gel chromatography法によりvoid volumeに少量を認めるのみで殆んどが¹²⁵I-insulin peakと同一部位に溶出された。又cell surface radioactivityは¹²⁵I-insulin peakのみであった。

以上の結果は、Bri-7K細胞においてもインスリンは細胞内にinternalizeされ、IDEにより分解されると考えられるが、この分解機構において細胞膜あるいは細胞内のIDEがどの程度の割合で関与しているのか、又インスリン作用にどのように関与しているのかは、いまだ不明で今後の重要な研究課題と考えられる。

尚、本論文の要旨は、第56回日本内分泌学会秋季大会において発表した。

本研究は文部省科学研究費補助金、一般研究(A)(課題番号58440083)、および一般研究(B)(課題番号58480426)によった。

文 献

- 1) Baldwin, D., Prince, M., Marshall, S. and Olefsky, J.M.: Regulation of insulin receptors: Evidence for involvement of an endocytotic internalization pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77: 5975-5978, 1980.
- 2) Blackard, W.G., Guzelian, P.S. and Small, M.E.: Down regulation of insulin receptors in primary cultures of adult rat hepatocytes in monolayer. *Endocrinology*, 103: 548-553, 1978.
- 3) Caro, J.F., Muller, G. and Glennon, J.A.: Insulin processing by the liver. *J. Biol. Chem.*, 257: 8459-8466, 1982.
- 4) Carpentier, J.L., Gorden, P., Amherdt, M., Von Obberghen, E., Kahn, C.R. and Orci, L.: ¹²⁵I-insulin binding to cultured human lymphocytes. Initial localization and fate of hormone determined by quantitative electron microscopic autoradiography. *J. Clin. Invest.*, 61: 1057-1070, 1978.
- 5) Duckworth, W.C. and Kitabchi, A.E.: Insulin and glucagon degradation by the same enzyme. *Diabetes*, 23: 536-541, 1979.
- 6) Gavin, J.R., Gorden, P., Roth, J., Archer, J.A. and Buell, D.N.: Characteristics of the human lymphocytes insulin receptor. *J. Biol. Chem.*, 248: 2202-2207, 1973.
- 7) Goldsteine, B.J. and Livingston, J.N.: An evaluation of the importance of lysosomal and neutral cytosol protease in insulin degradation by adipocytes. *Endocrinology*, 108: 953-961, 1981.
- 8) Gorden, P., Carpentier, J.L., Moule, M.L., Yip, C.C. and Orci, L.: A quantitative electron microscopic study of covalently bound ¹²⁵I-photoreactive insulin incubated with isolated hepatocytes. *Diabetes*, 31: 659-662, 1982.
- 9) Haigler, H.T., Maxfield, F.R., Willingham, M.C. and Pastan, I.: Dansylcadavaline inhibits

- internalization of 125 I-epidermal growth factor in BALB 3T3 cells. *J. Biol. Chem.*, 255: 1239–1241, 1980.
- 10) Kalant, N., Osaki, S., Maekubo, H., Mitmaker, B. and Cohen-Khallas, M.: Down-regulation of insulin binding by human and rat hepatocytes in primary culture: The possible role of insulin internalization and degradation. *Endocrinology*, 114: 37–43, 1984.
- 11) Kosmakos, F.C. and Roth, J.: Insulin-induced loss of the insulin receptor in IM-9 lymphocytes. *J. Biol. Chem.*, 255: 9860–9869, 1980.
- 12) 前川 聡, 小林 正, 大角誠治, 岩崎 誠, 繁田幸男: 培養ヒトリンパ球におけるインスリンレセプターの調節(第2報)—lysosomeにおけるインスリン分解—日本内分泌学会雑誌, 58: 334, 1982.
- 13) Marshall, S. and Olefsky, J.M.: The endocytotic-internalization pathway of insulin metabolism. Relationship to insulin degradation and activation of glucose transport. *Endocrinology*, 107: 1937–1945, 1980.
- 14) Misbin, R.I., Almira, E.C. and Buynitzky, S.J.: Insulin metabolism in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, 255: 2157–2162, 1983.
- 15) Misbin, R.I. and Mehl, T.D.: Insulin receptor binding and degradation in IM-9 cultured human lymphocytes importance of intracellular degradation. *J. Endocrinol. Invest.*, 3: 77–81, 1980.
- 16) Olefsky, J.M. and Kao, M.: Surface binding and rates of internalization of 125 I-insulin in adipocytes and IM-9 lymphocytes. *J. Biol. Chem.*, 257: 8667–8673, 1982.
- 17) Podlecki, D.A., Frank, B.H., Kao, M., Holikoshi, H., Freidenberg, G., Marshall, S., Ciarald, T. and Olefsky, J.M.: Characterization of the receptor binding properties of monoiodoinsulin isomers and the identification of different insulin receptor specificities in hepatic and extrahepatic tissues. *Diabetes*, 32: 697–704, 1983.
- 18) Roth, R.A.: Bacitracin: An inhibitor of the insulin degrading activity of glutathion-insulin transhydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 98: 431–438, 1981.
- 19) Rosa, U., Massaglis, G.F., Pennisi C.A., Rossi, A. and Cozzani, I.: Labelled proteins and tracer studies. Atomic Energy Commission Eurotom: 226–234, 1966.
- 20) 志伊光瑞, 横野浩一, 播 稔治, 今村諒道, 酒井英世, 馬場茂明: 培養ヒトリンパ球を用いたインスリン受容体およびインスリン分解酵素に対する抗体の作製, 日本内分泌学会雑誌, 58: 1185, 1982.
- 21) 志伊光瑞, 横野浩一, 播 稔治, 馬場茂明: 遊離ラット肝細胞におけるInsulin分解機構—Insulin分解活性の酵素学および免疫学的特性について—日本内分泌学会雑誌, 60: 30–43, 1984.
- 22) Schlessinger, J., Shecter, Y., Eillingham, M.C. and Pastan, I.: Direct visualization of binding, aggregation and internalization of insulin and epidermal growth factor on living fibroblastic cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 75: 2659–2663, 1978.
- 23) Sodayez, J.C., Sodayez-Goffaux, F.R. and Morris, Y.M.: 125 I-insulin: Kinetics of interaction with its receptor and rates of degradation in vivo. *American Physiological Society*: E3–E11, 1980.
- 24) Sonne, O. and Gliemann, J.: Insulin receptors of cultured human lymphocytes (IM-9). *J. Biol. Chem.*, 255: 7449–7454, 1980.
- 25) Yokono, K., Imamura, Y., Shii, K., Mizuno, N., Sakai, H. and Baba, S.: Immunochemical studies on the insulin-degrading enzyme from pig skeletal muscle. *Diabetes*, 29: 856–859, 1980.
- 26) Yokono, K., Imamura, Y., Shii K., Sakai, H. and Baba, S.: Purification and characterization of insulin-degrading enzyme from pig skeletal muscle. *Endocrinology*, 108: 1527–1532, 1981.
- 27) Yokono, K., Roth, R.A. and Baba, S.: Identification of

652 培養ヒトリンパ球(Bri-7K)におけるインスリンの internalization と分解機構について(八十, 他7名)

insulin-degrading enzyme on the surface of cultured human lymphocytes, rat hepatoma cells and primary culture of rat hepatocytes. *Endocrinology*, 111: 1102–1114, 1982.

28) Zeng, S.F.: Insulin degradation and insulin action on Bri-7 cultured human lymphocytes. *Kobe J. Med. Sci.*, 29: 95–105, 1983. (受付日: 59. 9. 14)