Insulin 分解酵素による insulin の 初期限定分解産物の生化学的特性に関する研究

神戸大学医学部第二内科

(指導: 馬場 茂明 教授)

米 澤 一 仁

Biochemical Characteristics of an Initial Degradation Product of Insulin by Insulin-Degrading Enzyme

Kazuyoshi YONEZAWA

The Second Department of Internal Medicine,

Kobe University School of Medicine,

Kobe 650, Japan

(Director: Professor Shigeaki Baba)

We previously reported on the detection and HPLC separation of the initial degradation product (peak VI) of native insulin from the reaction of monocomponent porcine insulin with affinity-purified pig skeletal muscle insulin-degrading enzyme (IDE).

In the present study, we investigated the biological characteristics of the initial degradation product. Structural analysis of peak VI by amino acid composition and performate oxidation revealed that peak VI was composed of intact B-chain and a fragment of A-chain. *In vivo*, peak VI exhibited a hypoglycemic effect on rats. *In vitro*, this peptide had the binding capacity to insulin receptor of rat adipocytes and the ability to stimulate the glucose oxidation on rat adipocytes and the activity of insulin receptor kinase. However, the biological potencies of peak VI were 1/40 to 1/160 of those of insulin proper. Its reduced biological potencies were probably due to a decrease of affinity for insulin receptor, because both biological potencies of peak VI to bind to insulin receptor and to stimulate the glucose oxidation were 2.5% of insulin. Moreover peak VI showed the same full agonistic effect as insulin on the glucose oxidation at higher concentration. On the other hand, a cross-linking study suggested that peak VI preserves almost the same affinity to IDE as insulin.

These findings may indicate the possibility that pig skeletal muscle IDE cleaves peptide bonds within A-chain at an early step of degradation of native porcine insulin and generates peak VI, which is the next substrate to insulin for IDE and keeps reduced insulin-like biological potencies, and then peak VI is converted into several relatively low molecular weight products.

I 緒 言

Insulin は標的細胞膜面の receptor に結合した後、細胞内に internalization されて漸次分解される⁵⁾²⁰⁾³⁷⁾³⁸⁾。細胞内における insulin 分解機構に関して数多くの研究がなされて来たが、未だ正確な分解経路は確立されていない。我々はこの分解機構を明らかにするために insulin の特異的分解酵素による分解産物を分離同定し、その性状を検討することにした。最近、この種の研究としては、intact cell における insulin 分解産物の分離同定に関する報告がいくつかなされてきた¹⁾¹³⁾¹⁷⁾²³⁾³⁴⁾。一方、insulin の特異的分解酵素を精製し、その酵素による insulin の分解産物を分離同定する試みもなされてきた³⁾⁴⁾¹¹⁾¹²⁾¹⁹⁾³⁵⁾。著者等は、insulin に高親和性を有する細胞内中性 protease である insulin-degrading enzyme (IDE) を骨格筋又は赤血球から精製分離し、その特性及び生理的意義について検討してきた³¹⁾³⁹⁾⁴⁰⁾⁴¹⁾。Intact cell あるいは精製酵素を用いた実験系の双方において、ほとんどの研究が放射性同位元素の標識 insulin を用いてきた。超微量の insulin の分解産物の分離同定には標識 insulin は有力な手段となるが、放射性同位元素で標識する事によっておこる実験上のいくつかの欠点を指摘しなければならない。すなわち、第1に、insulin 分子内の放射性同位元素の位置が、IDE による insulin 分解動態に影響を与えるという報告が既にあり²⁷⁾、これは標識 insulin と非標識 insulin の分解が異なる危険性を示唆している。第2に、標識 insulin の分解産物のうち標識された部位を含まない分解産物を見逃してしまう可能性がある。第3に、moniodotyrosyl insulin を用いた実験で示されたように⁸⁾²²⁾²⁴⁾、標識された分解産物の生化学的性状が、非標識のものとは異なる危険性も存在する。従って、これらの諸問題を解決するために、我々は既報の如く⁴²⁾、非標識 insulin を用いてその分解産物の分離同定を試み、IDE による7つの分解産物 peak (peaks I~IV, VI~VIII) が経時的に出現することを報告した。特に、これら分解産物の中でも peak VI と名づけた分解産物は、insulin と IDE との incubation 30秒後に既に他の分解産物の peak に先んじて出現した。従って、我々はこの peak VI が insulin の初期限定分解産物である可能性を指摘してきた。

そこで本研究では、この peak VI の生物学的および生化学的性状、特に insulin 作用につき更に検討を加え、insulin 代謝の初期過程における IDE の生理的意義について考察することを目的とした。

II 材料および方法

1. 材料

ブタ骨格筋 IDE は affinity chromatography を用いて既述の如く精製した⁴⁰⁾⁴¹⁾。ブタ insulin は Novo 社、¹²⁵I]insulin (比活性150~200 μ Ci/ μ g) は Dainabott 社、 $[\gamma$ -³²P]ATP, D-[U-¹⁴C]glucose は Amersham 社、wheat germ agglutinin (WGA) カラムは Vector 社、Collagenase, Type I (比活性231units/mg) は Cooper Biomedical 社より入手した。

[¹²⁵I] insulin は使用直前に Sephadex G-50カラムで精製し用いた。HPLC システムは既述の如く⁴²⁾Gilson 社製、逆相カラムは Synchropack RP-P reverse phase column (C-18, 250 $\times$ 4.1mm, Synchrom 社) を用いた。なお、その他の試薬は市販品特級のものをを用いた。

2. 実験方法

1) HPLC による insulin 分解産物の分離

精製 IDE とブタ insulin を50mM リン酸緩衝液 (PH7.0) 中、37°C で incubation 後、逆相カラムを用いた Gilson HPLC システムにより insulin 分解産物を分離分取した⁴²⁾。

移動相は、A 液: 0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA), B 液: 0.1% TFA, 90% アセトニトリルを用

い、アセトニトリル1%/min の linear gradient elution を施行した。カラム温度は40°C、流速は1ml/min とし、溶出液を O. D. 210nm でモニターした。分取した peak 群を再度、同一条件の HPLC で rechromatography し、1 mg ウシ血清アルブミン (BSA: Sigma 社) を加え凍結乾燥後、-80°C に保存した。ただし過酸化およびアミノ酸分析に用いる場合は、BSA を添加しなかった。尚、insulin および各分解産物 peak の O. D. 積算値は recording integrator (chromatopack CR-2AX: 島津製作所) により peak 面積値 ($\mu\text{V}/\text{sec}$) として表示した。

Insulin 量と peak 面積値は正確に比例しており、1 μg (0.17nmol) プタ insulin を HPLC で分析すると peak 面積値は $1 \times 10^6 \mu\text{V}/\text{sec}$ であった。

2) insulin 分解産物の分子構造解析

蟻酸と H_2O_2 を 9 : 1 (容量比) の割合で混合して作製した過蟻酸により peak VI の S-S 結合を酸化開裂後、上述の HPLC システムで再分析した。

また peak VI を少量の phenol を含む 6 N HCl で溶解し、真空下110°C、24時間酸加水分解後、O-phthal aldehyde を用いた蛍光法を用いてアミノ酸分析装置 (LC-6 A アミノ酸分析システム: 島津製作所) にてアミノ酸構造の解析を行なった。

3) Insulin 分解産物による血糖降下作用の検討

絶食状態の体重200-240gm の雄性 Wistar 系ラットの頸静脈より、peak VI (peak 面積値 $1 \times 10^6 \mu\text{V}/\text{sec}$)、プタ insulin ($1 \times 10^6 \mu\text{V}/\text{sec} = 1 \mu\text{g}$) そして対照として溶解液として用いた10mM HCl を静注し、経時的に採血した。血糖は glucose oxidation 法にて測定した。

4) ラット脂肪細胞標品の調整

飽食状態で、体重200-240gm の雄性 Wistar 系ラットを断頭ト殺後、副睾丸脂肪組織を得た。この組織よりの脂肪細胞の調整は Rodbell²⁵⁾の方法に準じて施行した。脂肪組織を細切後、プラスチックチューブ内で3%BSAを含む20ml Krebs-Ringer Bicarbonate buffer (pH7.4: KRBB) 中で15mg の collagenase と incubate した。プラスチックチューブ内には5%CO₂:95%O₂の混合ガスを満たし、37°C の water bath 内で約40分間ゆっくり振とう後、脂肪細胞を nylon cloth を通過させて組織片と分離し、1%BSA, KRBB で3度洗浄し脂肪細胞標品とした。

5) Insulin 分解産物とラット脂肪細胞との binding assay

凍結乾燥した insulin 分解産物あるいはプタ insulin を50 μl 、10mM HCl に溶解後、450 μl の1%BSA, KRBB を加え同液で希釈した。1%BSA, KRBB 中に浮置した単離脂肪細胞を(¹²⁵I)insulin およびプタ insulin もしくは分解産物とともにプラスチックバイアル内で24°C、1時間 incubate 後、脂肪細胞を Gliemann らの oil-flotation 法⁹⁾により medium より分離した。即ち、cell suspension の200 μl aliquot を100 μl dinonyl phthalate を含むプラスチックマイクロチューブに移し遠沈した後、tube を切断し、三層中の最上層である細胞層を取り、 γ -counter でその放射活性を測定した。

6) ラット脂肪細胞の glucose oxidation に及ぼす insulin 分解産物の影響

Glucose oxidation assay は、武富らの方法³⁶⁾に従って行なった。即ち、1%BSA, KRBB に浮置した単離脂肪細胞を小チューブのついたプラスチックバイアルに分注し、glucose 0.2 μmoles , D-(U-¹⁴G) glucose 0.1 μCi そしてプタ insulin もしくは分解産物を添加後、バイアル内に5%CO₂:95%O₂混合ガスを満たしゴム製のストッパーで密閉後、37°C、90分間 incubate した。Incubation 終了時バイアル内に0.8ml 1NH₂SO₄を加え、小チューブ内には0.4ml の Hyamine を注入し、Hyamine に吸着された放射性 CO₂ を liquid scintillation spectrometer にて測定した。

7) ラット肝 insulin receptor 標品の調整

ラット肝 homogenate を 1% Triton X-100 を含む 50mM Hepes (pH7.6), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mg/ml bacitracin (buffer A) にて可溶化し, その 100,000×g 上清を WGA カラムに apply 後, 150mM NaCl を含む buffer A 続いて IMNaCl を含む buffer A で洗浄し, 0.3 M N-acetylglucosamine を含む 150mM NaCl, buffer A にて溶出した。溶出された蛋白 peak を 150 mM NaCl, buffer A で透析し, ラット肝 insulin receptor 標品とした²⁶⁾。また, モノクロナール抗 insulin receptor 抗体の affinity column を用いて高度に精製されたヒト胎盤由来の insulin receptor を, Stanford 大学薬理学教室の R. A. Roth 博士より提供をうけリン酸化実験に供した。

8) Insulin receptor kinase 活性に及ぼす insulin 分解産物の影響

Insulin receptor kinase 活性を β -subunit 自己リン酸化および histone 2b リン酸化反応を指標に検討した。Insulin receptor 標品とブタ insulin あるいは分解産物 (peak II あるいは peak VI) を 3 mM Mn^{2+} 存在下で, 24°C, 1 時間 preincubate した後, [γ -³²P] ATP と histone 2b (Cooper Biomedical 社) を加え, 24°C, 1 時間反応させた後, 還元 7.5% SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) を行ない, autoradiography にて解析した。同時に, SDS-PAGE 上の β -subunit (95K) および histone 2b (dye front) の部分のゲルを切り出し, その放射活性を liquid scintillation spectrometer にて測定した。

9) [¹²⁵I] insulin と IDE の結合に及ぼす insulin 分解産物の影響

ブタ insulin または peak VI 存在下に, IDE と [¹²⁵I] insulin を disuccinimidyl suberate (Pierce 社) を用いて, 既述の如く³⁰⁾ cross-link し還元 7.5% SDS-PAGE で分離後, autoradiography にて解析した。

III 結 果

1. Insulin 分解産物 peak VI の性状

IDE による insulin 分解産物の HPLC における elution profile を Fig. 1 に示したが, incubation 3 時間 (Fig. 1B) で, insulin peak である peak V 以外に 7 つの peak が出現した。Insulin より hydrophilic な位置に peak I, II, III, IV が, hydrophobic な位置に peak VI, VII, VIII が溶出され, 既報の如く⁴²⁾ これらが IDE による insulin 分解産物と考えられた。Incubation 10 分 (Fig. 1A) では, peak VI のみが出現していたが, この peak は incubation 後わずか 30 秒で出現し, 10 分まで増加し, その後 insulin の減衰曲線に平行して漸減した。一方, 他の分解産物の peaks は incubation 15 分頃より同定された。したがって, peak VI は IDE による insulin の初期限定分解産物と考えられた。

peak VI の構造特性を調べるため, 過マンガン酸法およびアミノ酸分析法にて解析した。Fig. 2A に示す如く, peak VI の HPLC 上の retention time は 26.2 分であるが, 過マンガン酸法により S-S 結合を酸化開裂後, 同条件の HPLC で解析すると, その main peak は Fig. 2B に示す様に, retention time 21.3 分の位置に溶出された。これは, Fig. 2C に示す対照の intact B 鎖の retention time と一致し, peak VI が少なくとも intact B 鎖を含む可能性を示している。

Table 1 に, peak VI のアミノ酸分析の結果を示した。この分析系において insulin peak である peak V のアミノ酸測定値は, ブタ insulin の理論値とほぼ一致した。peak VI については, バリン (Val), イソロイシン (Ile) の測定値が一定しないため Table には表記しなかった。またスレオニン

Fig. 1. Elution profiles on HPLC of peak VI. Porcine insulin was incubated with IDE for indicated times at 37°C. At 10 mins (A) and 3 hrs (B), the reaction mixture was chromatographed on HPLC.

Fig. 2. Elution profiles on HPLC of performate oxidation of peak VI. Intact peak VI (A), performate oxidized peak VI (B) or intact B-chain (C) was chromatographed on HPLC.

Table 1. Amino acid composition of peak VI. The lyophilized peak VI was hydrolyzed with 6M HCl containing a small amount of phenol in evacuated sealed tubes for 24 hrs at 110°C, and then subjected to amino acid analysis in a Shimadzu amino acid analyzer with O-phthalaldehyde detection system. Relative amino acid concentrations were converted to nearest integer values in parentheses, which indicated the amino acid compositions expected. Values are expressed as mole of amino acid per mole of peptide.

Amino acid	Porcine insulin (Theory)	B-chain (Theory)	Peak VI
Asp	3	1	1.78~1.98 (2)
Thr	2	1	1.35~1.50 (1~2)
Ser	3	1	1.86~2.08 (2)
Glu	7	3	4.30~4.80 (4~5)
Pro	1	1	1.06~1.19 (1)
Gly	4	3	3.82~4.27 (4)
Ala	2	2	2.02~2.26 (2)
Val	4	3	—
Ile	2	0	—
Leu	6	4	4.33~4.69 (4~5)
Tyr	4	2	2.00~2.24 (2)
Phe	3	3	2.50~2.79 (3)
His	2	2	2.13~2.38 (2)
Lys	1	1	1.05~1.18 (1)
Arg	1	1	1.00~1.12 (1)

(Thr), グルタミン酸 (Glu), ロイシン (Leu) の各アミノ酸の整数値も確定し得なかった。しかしながら, このアミノ酸分析結果を insulin B 鎖理論値と比較すると, 過酸酸化後の HPLC 分析結果と同様に, Peak VIは intact B 鎖を含み, それに A 鎖の fragment が S-S 結合を介して結合した形をとっている可能性が示唆された。

2. peak VIの生物活性

peak VIの in vivo, および in vitro における insulin 様生物活性をブタ insulin と比較検討した。まず in vivo における効果を検討するために, ラットに経静脈的に peak VIおよび insulin を投与し, それらの血糖に及ぼす影響を調べた。Fig. 3 に示すように, insulin (peak V) 投与群と比べ軽度で

Fig. 3. Hypoglycemic effect of intravenous injection of peak V (insulin) and peak VI on rats. Peak V (●) peak VI (■) or buffer (○) was injected intravenously into rats. Blood was sampled at indicated times. Blood glucose was measured using glucose oxidase method. Results are mean $\pm$ SD from three experiments, each consisting of three rats per sample. **Different from control, $P < 0.01$, *Different from control $P < 0.05$.

はあるが, peak VI 静注30分後に, 対照の10mM HCl 投与群に比して有意な ($P < 0.05$) 血糖降下作用を認めた。

続いて, ラット脂肪細胞 insulin receptor に対する insulin および各分解産物の結合性を in vitro にて比較検討した。peak IV, VI, VII, VIII, の添加による結合 [125 I] insulin の displacement curve は, insulin である peak V 添加時に比べ, 右に shift しており, これはこれら各 peak 群が弱いながらもラット脂肪細胞 insulin receptor との結合能を有することを示した (Fig. 4)。ED₅₀値 (peak 面積値) は, 各々 peak VI 約 $800 \times 10^3 \mu\text{V/sec/ml}$, peak V (insulin) 約 $20 \times 10^3 \mu\text{V/sec/ml}$ (20ng/ml) であり, peak VI の結合活性は insulin の約 1/40 であった。一方, peak I, II, III の添加では, 結合 [125 I] insulin の displace は全く認められず, これら peak 群は receptor に対する結合能を有さないことが判明した。

次に insulin および各分解産物のラット脂肪細胞における [U- 14 C] glucose oxidation を比軽検討した。peak IV, VI, VII, VIII, すなわち, insulin receptor 結合能を有する peak 群によって glucose oxidation が促進され, また, 高濃度で最大刺激効果が示された。しかし, dose response curve は右に shift しており, peak VI の ED₅₀値 (peak 面積値) は $16 \times 10^3 \mu\text{V/sec/ml}$ で, insulin である

peak V ($0.4 \times 10^3 \mu \text{ V/sec/ml} = 0.4 \text{ ng/ml}$) の約 1/40 であった (Fig. 5)。一方, peak I, II, III の receptor 結合能を有さない peak 群では, 高濃度でも glucose oxidation は全く促進されなかった。

Fig. 4. Binding capacity of peptides designated as peaks IV($\blacktriangle$), V($\circ$), VI($\square$), VII($\blacksquare$) and VIII($\triangle$) to rat adipocytes. The radioactivity in the cell layer was counted as total binding. The binding of [^{125}I]insulin in the presence of $330 \mu\text{g/ml}$ unlabeled porcine insulin was considered to be nonspecific binding and was subtracted from total binding. The specific binding (total binding - non specific binding), expressed as the percentage of [^{125}I]insulin specifically bound in the absence of unlabeled insulin, is plotted as a function of unlabeled insulin concentration or the area of each fragment.

Fig. 5. Effect of peptides designated as peaks IV($\blacktriangle$), V($\circ$), VI($\square$), VII($\blacksquare$) and VIII($\triangle$) on glucose oxidation by rat adipocytes. The stimulation of glucose oxidation by rat adipocytes, expressed as percent of maximum, is plotted as a function of the concentration of unlabeled insulin or the area of each fragment. The 0% stimulation and 100% stimulation represent the $^{14}\text{CO}_2$ production in the absence and in the presence of 10 ng/ml of unlabeled insulin, respectively.

3. Insulin receptor kinase 活性への peak VI と II の影響

以上の結果から、生理活性を持つ peak 群より peak VI を、持たない群より peak II を選び、insulin receptor kinase 活性への影響を β -subunit 自己リン酸化および histone 2b リン酸化反応を指標として、insulin と比較検討した。Fig. 6 には、高度精製ヒト胎盤 insulin receptor 標品を用いたリン酸化実験の autoradiography を示した。Insulin receptor β -subunit (95K) への ^{32}P の取り込みは対照のペプチド非添加 (lane D) と比べ、 $600 \times 10^3 \mu\text{V/sec/ml}$ (600ng/ml) peak V (insulin) 添加時 (lane A) が最も多く、peak VI の添加 (lane C) でも取り込みの増加が認められた。しかし、peak II の添加 (lane B) では β -subunit への ^{32}P の取り込みの増加は、ほとんど認められなかった。

更に、この実験系に histone 2b を添加し、insulin receptor kinase による histone 2b のリン酸化を検討した場合も、peak V, peak VI, peak II は同様の効果を示した。

Fig. 6. Effect of peak V(insulin), peak II and peak VI on the incorporation of the ^{32}P from $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ into highly purified human placental insulin receptors. Highly purified insulin receptors from human placenta was incubated with $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ for 1 hrs at 24°C without (lane D) or with preincubation with peak V (peak area $600 \times 10^3 \mu\text{V/sec/ml} = 600\text{ng/ml}$) (lane A), peak II ($600 \times 10^3 \mu\text{V/sec/ml}$) (lane B) or peak VI ($600 \times 10^3 \mu\text{V/sec/ml}$) (lane C) in the presence of MnCl_2 (3mM) for 1 hr at 24°C . The phosphorylation reaction was terminated by adding SDS-PAGE sample buffer and boiling for 3 mins. After reduction of disulfide bonds with 2-mercaptoethanol, these samples were analyzed by 7.5% SDS-PAGE and autoradiography.

ラット肝 insulin receptor 標品を用いて, insulin receptor kinase 活性の insulin および分解産物による dose response curve を検討した。Fig. 7 には, β -subunit 自己リン酸化を指標とした insulin receptor kinase 活性に及ぼす insulin および各分解産物濃度の影響を示した。600 $\times 10^3 \mu\text{V}/\text{sec}/\text{ml}$ peak V (insulin) で basal に比べ約2.3倍の ^{32}P の取り込みの増加が認められ, 2000 $\times 10^3 \mu\text{V}/\text{sec}/\text{ml}$ peak VI でも約1.8倍の増加が認められたが, 同濃度の peak II では刺激効果を認めなかった。peak VI 添加時の dose response curve では, 最大効果が得られる濃度までの検討が行なえていないため, ED_{50} 値による insulin との比較検討はできないが, 1.5倍の ^{32}P の取り込み増加をきたす peak 面積値で比較すると, insulin 4.4 $\times 10^3 \mu\text{V}/\text{sec}/\text{ml}$ (4.4ng/ml), peak VI 720 $\mu\text{V}/\text{sec}/\text{ml}$ であり, Peak VI は insulin の約 1/160の活性と考えられた。

Fig. 8 には, histon 2b リン酸化を指標とした insulin receptor kinase 活性に及ぼす insulin および各分解産物濃度の影響を示した。600 $\times 10^3 \mu\text{V}/\text{sec}/\text{ml}$ peak V (insulin) で約1.8倍, 2000 $\times 10^3 \mu\text{V}/\text{sec}/\text{ml}$ peak VI で約1.3倍と histone 2b のリン酸化の増加が認められた。一方, peak II は高濃度でも増加作用を示さなかった。

Fig. 7. Stimulation of the incorporation of the ^{32}P from [γ - ^{32}P]ATP into insulin receptor β -subunit catalyzed by insulin receptor kinase in the presence or absence of peak V (insulin), peak II or peak VI. Partially purified rat liver insulin receptors were incubated with various concentrations of either peak V (○), peak II (□) or peak VI (●) in the presence of 3mM MnCl_2 for 60 mins at 24°C. The phosphorylation reaction was then initiated by adding [γ - ^{32}P]ATP and was allowed to proceed for 60 mins at 24°C. The termination of the reaction and analysis were as in Fig. 6. After autoradiography, the gel corresponding to the β -subunit band (M_r 95,000) was excised and the radioactivity determined in a liquid scintillation counter. The stimulation of the incorporation of the ^{32}P , expressed as percent of control, is plotted as a function of the concentration of each fragment.

Fig. 8. Stimulation of the incorporation of the ^{32}P from $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ into histone 2b catalyzed by insulin receptor kinase in the presence or absence of peak V (insulin), peak II or peak VI. Partially purified rat liver insulin receptors were incubated with various concentrations of either peak V (○), peak II (□) or peak VI (●) in the presence of 3 mM MnCl_2 for 60 mins at 24°C . The phosphorylation reaction was then initiated by adding $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ and histone 2b and was allowed to proceed for 60 mins at 24°C . The termination of the reaction and analysis were as in Fig. 6. After autoradiography, the gel corresponding to the histone 2b (dye front) was excised and the radioactivity determined in a liquid scintillation counter. The stimulation of the incorporation of the ^{32}P , expressed as percent of control, is plotted as a function of the concentration of each fragment.

4. Peak VIのIDEの基質結合に及ぼす影響

^{125}I insulin と IDE の結合に及ぼす peak VI の影響を cross-linking 法を用いて解析した。Fig. 9 に示す如く、 ^{125}I insulin と IDE の cross-linking により、autoradiography 上、分子量 110K の蛋白が標識された。Insulin および peak VI は濃度依存性に ^{125}I insulin と IDE の結合を阻害し、完全に阻害する濃度は各々 $6 \times 10^{-6} \mu\text{V/sec/ml}$ ($6 \mu\text{g/ml}$) および $12 \times 10^{-6} \mu\text{V/sec/ml}$ であった。この結果は、初期限定分解産物である peak VI が IDE に対して insulin に近い親和性を有していることを示唆した。

IV 考 案

細胞レベルにおける insulin 分解機構には、IDE による分解系以外に、lysosome による分解系の関与が示唆されてきた⁷⁾²¹⁾。しかしながら最近の研究では、クロロキンなどの lysosomal inhibitor が種々の細胞において、insulin 分解にほとんど影響を与えなかったとの報告が多く⁶⁾¹⁰⁾¹⁶⁾⁴³⁾、このことは lysosome が insulin 分解にはあまり関与していない可能性を示していると思われる。

一方、以下の理由から、IDE による分解系が細胞レベルにおける insulin 分解に重要な生理的意義を有しているとの考え方が有力になりつつある。それらの理由の第 1 は、種々の細胞より抽出され

Fig. 9. Effect of peak V(insulin) and peak VI on cross-linking of [125 I]insulin to IDE. IDE was incubated with [125 I]insulin in the presence or absence of the various concentrations of peak V (A) or peak VI (B). After 30 mins at 0°C, disuccinimidyl suberate (final concentration 0.3mM) was added. After additional 40 mins at 0°C, the reaction was stopped by the addition of Tris (pH7.4) (final concentration 25mM). SDS-PAGE sample buffer was added and the preparations were boiled for 3 mins and analyzed by 7.5% SDS-PAGE and autoradiography.

る insulin 分解活性のほとんどが IDE であること¹⁰⁾³¹⁾³⁵⁾⁴⁰⁾, 第2は, NEM や PCMB といった IDE 活性阻害剤によって細胞レベルの insulin 分解が抑制されること⁶⁾¹⁰⁾¹⁵⁾²⁹⁾, 第3は, 志伊らが作製したヒト赤血球の cytosol IDE に対する4つのモノクローナル抗体をヒト hepatoma 細胞細胞質に microinject すると insulin 分解が抑制されること³²⁾, 第4は, 本研究で同定される様な insulin の限定分解産物が intact cell の肝細胞や fibroblast から抽出されること¹⁾¹³⁾¹⁷⁾²³⁾³⁴⁾, などである。

今回の研究では, IDE 分解系の生理的意義をさらに明らかにするため, IDE による insulin の初期限定分解産物と考えられる peak VI を HPLC システムで分離分取し, その構造解析および生物活性を in vivo, in vitro において詳しく検討した。過蟻酸化法による解析の結果, peak VI の構造は, intact B 鎖と A 鎖の fragment が S-S 結合を介して結合した形となっている可能性が示唆された。そこで IDE による A 鎖の分解部位を明らかにするためにアミノ酸分析を行なったが, その結果は前述の如く, Val, Ile の測定値が一定せず, また Thr など一部アミノ酸の整数値も確定し得なかった。その原因として, 一般的に, -Ile-Val-結合は, これらアミノ酸側鎖が α 炭素の近傍に枝分かれ構造をもつので立体障害のため加水分解に対して抵抗性を示し, この結合を定量的に切断するには長時間の加熱が必要であるといわれている。一方, 空気中の酸素をできる限り除去した条件下でも, Thr などは, 酸によって分解されやすく加熱時間に比例して分解量は増大すると考えられている¹⁴⁾。このように加水分解時間を含めた手技上の問題が, 今回, 確定的なアミノ酸分析値が得られなかった原因と考えられ, 今後詳しい検討が必要と思われる。生物活性においては, peak VI が insulin と比べ活性は低下しているが, 血糖降下作用, insulin receptor 結合能, glucose oxidation 刺激能, insulin receptor kinase 刺激能を有していることが示された。また, peak VI は IDE の基質として insulin に近い IDE に対する親和性を有する可能性も示唆された。

現在まで、分解産物の insulin 様生物活性を検討した報告には、Misbin ら¹⁷⁾が intact hepatocytes より単離した A₁₄ [¹²⁵I] monoiodo insulin の限定分解産物に関する報告、および、stentz ら³⁴⁾が intact human fibroblast を用いて、あるいはその fibroblast より部分精製した IDE を用いて得られた A₁₄ [¹²⁵I] monoiodoinsulin の分解産物を HPLC で分離し生物活性を検討した報告がある。双方とも分解産物の抗 insulin 抗体との反応性と insulin receptor 結合活性が低下していた。我々も既に peak VI の抗 insulin 抗体との反応性及び IM-9 リンパ球 insulin receptor との結合性が insulin と比べ低下していることを報告した⁴²⁾。この2つの生物活性以外の分離産物の insulin 様活性は今までに報告がなく、かつ標識をしていない native form の分解産物の insulin 様作用についての報告もない。今回の我々の in vivo, in vitro における insulin 様活性の検討は、insulin 分解産物の生理的意義を考える上で新しい知見を与えたものと思われる。

In vivo では、insulin と比べ軽度ではあるが、peak VI に血糖降下作用が認められた。この効果を in vitro での insulin 作用で説明するために、glucose oxidation について検討した結果、peak VI には促進作用が認められ、かつ、高濃度で最大刺激効果を示した。しかし、その dose response curve は insulin に比べ右に shift しており、in vitro でも in vivo 同様、peak VI の生物活性は insulin と比べ低下 (約2.5%) していた。すなわち、これは、receptor 結合活性の低下に起因すると考えられる。

insulin は標的細胞膜面の receptor に結合後、多様な生物学的作用を発揮するが、そのシグナル伝達に関しては、今だ不明な点が多い。すなわち、細胞内に internalization された insulin 分子あるいは fragment が細胞内で各種 insulin 作用を発現するという説³³⁾、また細胞膜より産生される insulin mediators が各種 insulin 作用の second messenger であるとする説²⁾²⁸⁾などがあるが、近年最も注目されているのは、insulin receptor β -subunit に存在する tyrosine kinase 活性がシグナル伝達において本質的役割を果たしているという考え方である⁷⁾¹⁸⁾。そこで peak VI においても、 β -subunit 自己リン酸化および histone 2b リン酸化反応を指標として insulin receptor kinase 活性促進能を検討した。その結果、insulin と比して低下しているが、同活性促進能を有していることが示された。したがって、in vivo, in vitro における peak VI の insulin 様作用は、insulin 同様、receptor の tyrosine kinase 活性促進を介して発現されているのかもしれない。

peak VI の IDE の基質としての重要性は、志伊らが開発した cross-linking 法³⁰⁾を用いて解析した。この方法は、IDE の [¹²⁵I] insulin による簡便な標識法であるとともに、この標識を阻害する非標識リガンドの濃度を測定することにより、そのリガンドの IDE に対する親和性を検討することを可能とした。この結果、peak VI は insulin とほぼ同等の IDE に対する親和性を有しており、細胞内における insulin に次ぐ第2の基質として重要と考えられた。以上より、HPLC の分解産物 peak の elution profile の結果とあわせて考えると、insulin は細胞内で、まず peak VI に分解され、その後より分子量の小さな分解産物へと代謝されていくと思われた。

Insulin の初期限定分解産物の構造解析、言い換えると、initial splitting position の同定に関する研究は、今までに数多くなされてきたが一定の見解を得るには至っていない。これに関する最初の詳しい報告は Duckworth らによってなされた³⁾。彼らはラット骨格筋より精製した insulin protease (IP: EC 3, 4, 22, 11) とブタ insulin を incubation し、その反応液を Sephadex G50 カラムに apply し、溶出された insulin peak から B 鎖の16位と17位のアミノ酸間が切断された分解産物、いわゆる "clipped insulin" を同定した。その後、さらに彼らは半合成 [³H] Phe^{B1}-insulin を IP で分解し、B₁₆₋₁₇間以外にも数個の B 鎖における分解部位を報告した⁴⁾。また、isolated he-

patocytes を用いた実験では, Assoian & Tager¹⁾が, [(¹²⁵I) iodotyrosil^{B1}] insulin を用いて同定された分解産物の検討から, A₁₃₋₁₄間および B 鎖における数ヶ所の splitting position を報告した。続いて, Misbin らが, 数種の標識 insulin を使って得た分解産物が, intact A 鎖と B 鎖の少なくとも 10 個のアミノ酸を失った fragment が S-S 結合でつながった構造を有すると報告した¹⁷⁾。これらの実験では分解産物の分離に Sephadex G50 カラムや PAGE が用いられてきたが, Stentz らが HPLC 法を使用して以来, その優れた分離能, 再現性, 簡便性のため, 以後のほとんどの分解産物の分離同定に関する研究には同法が用いられるようになった。精製酵素を用いた実験では, Hamel らが¹¹⁾²⁾, A₁₄[(¹²⁵I) insulin をはじめとする種々の moniodoinsulin を IP で分解した産物を HPLC で分離し, sulfitolysis やアミノ酸配列解析法を用いて, splitting position が A₁₃₋₁₄, A₁₄₋₁₉間そして B 鎖では B₁₃₋₁₄を含む 3 ケ所程度と推定している。Muir ら¹⁹⁾も, Duckworth が精製した IP を用いて, [³H] Phe^{B1} insulin および [³H] Gly^{A1} insulin の分解産物を種々の方法で構造解析し, その分解部位が A₁₃₋₁₄間および B₉₋₁₀間と推測している。一方, intact cell を用いた報告では単離ラット hepatocyte における A₁₄[(¹²⁵I) insulin などの moniodoinsulin の代謝産物を HPLC により分離し, sulfitolysis を施行した結果, intact A 鎖と B 鎖 fragment が同定されたとしている¹³⁾²³⁾。以上より, 現在までのところ, 精製酵素を用いた実験では insulin は A 鎖および B 鎖の複数の部位で分解されると考えられ, 一方, intact hepatocytes においては, insulin の分解産物は Assoian & Tager の報告があるものの, 他の実験結果からは B 鎖が分解され, A 鎖は intact のままであると推定されている様である。しかし, 我々が得た初期限定分解産物である peak VI は, 過蟻酸化法およびアミノ酸分析法の結果より, intact B 鎖を持ち, A 鎖が分解されていると考えられ, 上述の各報告とは異なった結果である。我々の精製酵素を用いた成績との相違の理由として考えられることは, まず第一に, 我々の実験系では非標識 insulin を用いたのに対して, 他の報告, 最初の Duckworth の報告以外は全て標識 insulin を用いている点である。前述の如く標識 insulin には種々の欠点があり, 中でも放射性同位元素の位置が酵素による insulin 分解動態に影響を与える²⁷⁾という欠点は, 標識 insulin が非標識とは違った分解動態を呈する可能性を示唆している。第 2 は, 精製酵素の由来組織の種差が考えられる。我々は, ブタ骨格筋よりの精製酵素を用いたが, 他の研究では, ラット骨格筋由来の酵素が主として用いられている。また, 実験系として intact cell 系か cell free 系かの違いが大きいのと思われるが, IDE の特性を調べる上では後者が優っている。また前述の様に標識 insulin を用いている影響が intact cell 系でも同様にあるかもしれない。

最後に, 今回の研究の結果, in vitro 系においてブタ骨格筋 IDE は非標識ブタ insulin を A 鎖から分解し, intact B 鎖と A 鎖 fragment を有す peak VI を生成する可能性が示唆された。この初期限定分解産物である peak VI は, いわゆる insulin 様作用活性は大きく低下しているものの, IDE に対する基質としての親和性は insulin とほぼ同程度に保たれており, IDE によりさらに分子量の小さな分解産物へと代謝されていくものと考えられた。

V 結 語

Insulin の細胞内分解機構を明らかにするため insulin 分解産物を分離同定しその性状を検討した。すなわち, 非標識ブタ insulin を高度精製ブタ骨格筋 IDE で分解し, 初期限定分解産物である peak VI を HPLC システムを用いて単離精製し, その生化学的性状につき詳しく検討した。

1) 過蟻酸化法およびアミノ酸分析法による peak VI の構造解析により, この peak は, intact B 鎖と A 鎖 fragment が S-S 結合でつながった形を有している可能性が示唆された。したがって, ブタ

骨格筋 IDE は、非標識ブタ insulin をまず A 鎖から限定分解していくと考えられた。

2) peak VI は、ブタ insulin と比較し各活性は低下しているものの、in vivo では血糖降下作用、in vitro では、insulin receptor 結合能、glucose oxidation および insulin receptor kinase 活性の促進能などの insulin 作用を有していた。しかし、この各活性の低下は、receptor 結合能低下に起因していると考えられた。

3) Cross-linking 法により、peak VI は、insulin とほぼ同等の IDE に対する affinity を有していることが確認された。これは peak VI が細胞内で insulin に次ぐ第 2 の基質として重要であることを示唆している。

4) 以上の結果より、IDE による insulin 分解過程を推定すると、IDE は insulin A 鎖をまず分解し、初期限定分解産物である peak VI を生成する。この分解産物は、insulin に比してその生物活性はかなり低下しているものの、IDE に対する affinity は良く保たれており、IDE によりさらに低分子量の分解産物へと分解されていくと思われた。

稿を終えるにあたり、終始、御懇切なる御指導及び御校閲を賜りました恩師馬場茂明教授に深謝致します。また直接御指導戴いた横野浩一博士、志伊光瑞博士および御指導、御助力下さった第 2 内科教室各位さらに武田薬品中央研究所武富滋久博士、東洋紡酵素研究所愛水重典博士に心より謝意を表わします。

尚、本論文の要旨は、第 29 回日本糖尿病学会総会、第 59 回日本内分泌学会総会および第 46 回米国糖尿病学会総会において発表した。

文 献

- 1) Assoian, R.K. and Tager, H.S.: Peptide intermediates in the cellular metabolism of insulin. *J. Biol. Chem.* 1982, 257: 9078–9085.
- 2) Cheng, K. and Lerner, J.: Intracellular mediators of insulin action. *Ann. Rev. Physiol.* 1985, 47: 405–424.
- 3) Duckworth, W.C., Stents, F.B., Heinemann, M. and Kitabchi, A.: Initial sites of insulin cleavage by insulin protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1979, 76: 635–639.
- 4) Duckworth, W.C. and Halban, P.A.: The proteolytic degradation of insulin: evidence for several cleavage sites on B-chain. *Diabetologia* 1980, 19: 270 (Abstract).
- 5) Duckworth, W.C., Kitabchi, A.E.: Insulin metabolism and degradation. *Endocr. Rev.* 1981, 2: 210–232.
- 6) Duckworth, W.C., Runyan, K.R., Wright, R.K., Halban, P.A. and Soloman, S.S.: Insulin degradation by hepatocytes in primary culture. *Endocrinology* 1981, 108: 1142–1147.
- 7) Ellis, L., Clauser, E., Morgan, D.O., Edery, M., Roth, R.A. and Rutter, W.J.: Replacement of insulin receptor tyrosine residues 1162 and 1163 compromises insulin-stimulated kinase activity and uptake of 2-deoxyglucose. *Cell* 1986, 45: 721–732.
- 8) Frank, B.H., Peavy, D.E., Hooker, C.S. and Duckworth, W.C.: Receptor binding properties of monoiodotyrosyl insulin isomers purified by high performance liquid chromatography. *Diabetes* 1983, 32: 705–711.
- 9) Gliemann, J., Osterlind, K., Vinten, J. and Gammeltoft, S.: A procedure for measurement of distribution spaces in isolated fat cells. *Biochem. Biophys. Acta.* 1972, 286: 1–9.
- 10) Goldfine, I.D., Williams, J.A., Bailey, A.C., Wong, K.Y., Iwamoto, Y., Yokono, K.,

- Baba, S. and Roth, R.A.: Degradation of insulin by isolated mouse pancreatic acini. Evidence for cell surface protease activity. *Diabetes* 1984, 33: 64–72.
- 11) Hamel, F.G., Peavy, D.E., Ryan, M.P. and Duckworth, W.C.: High performance liquid chromatographic analysis of insulin degradation by rat skeletal muscle insulin protease. *Endocrinology* 1986, 118: 328–333.
- 12) Hamel, F.G., Ryan, M.P. and Duckworth, W.C.: Characterization of 125 I-iodoinsulin degradation products formed by insulin protease. *Diabetes* 1985, 35 (Suppl.): 51A (Abstract).
- 13) Hamel, F.G., Peavy, D.E., Ryan, M.P. and Duckworth, W.C.: HPLC analysis of insulin degradation products from isolated hepatocytes. *Diabetes* 1987, 36: 702–708.
- 14) 池中徳治, 小谷昌司, 小出武比古, 高橋礼子, 戸田弘子, 松尾寿之: タンパク質の化学II, 1976, 30–40.
- 15) Kitabchi, A.E. and Stentz, F.B.: The effect of inhibitors of insulin processing on generation of insulin intermediate products from human fibroblast as detected high performance liquid chromatography (HPLC). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1985, 128: 163–170.
- 16) Marshall, S. and Olefsky, J.M.: Effects of lysomotropic agents on insulin interactions with adipocytes. Evidence for a lysosomal pathway for insulin processing and degradation. *J. Biol. Chem.* 1979, 254: 10153–10160.
- 17) Misbin, R.I., Almira, E.D. and Buynitzky, S.J.: Insulin metabolism in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 1983, 258: 2157–2162.
- 18) Morgan, D.O. and Roth, R.A.: Acute insulin action requires insulin receptor kinase activity. Introduction of an inhibitory monoclonal antibody into mammalian cells blocks the rapid effects of insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1987, 84: 41–45.
- 19) Muir, A., Offord, R.E. and Davies, J.G.: The identification of a major products of the degradation of insulin by 'insulin protease' (EC3.4.2.11). *Biochem. J.* 1986, 237: 631–637.
- 20) Olefsky, J.M., Kobayashi, M. and Chang, H.: Interactions between insulin and its receptors after the initial binding event. Functional heterogeneity and relationship to insulin degradation. *Diabetes* 1979, 28: 460–471.
- 21) 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.* 1982, 257: 8667–8673.
- 22) Peavy, D.E., Abram, J.D., Frank, B.H. and Duckworth, W.C.: Receptor binding and biological activity of specifically labeled [125 I]- and [127 I]-monoiodoinsulin isomers in isolated rat adipocytes. *Endocrinology* 1984, 114: 1818–1824.
- 23) Peavy, D.E., Hamel, F.G., Pell, M. and Duckworth, W.C.: Examination of cellular insulin degradation by isolated rat hepatocytes. *Diabetes* 1985, 34(Suppl): 50A (Abstract)
- 24) Podlecki, D.A., Frank, B.H., Kao, M., Horikoshi, H., Fridenberg, G., Marshall, S., Ciaraldi, 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* 1983, 32: 697–704.
- 25) Rodbell, M.: Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J. Biol. Chem.* 1964, 239: 375–380.
- 26) Roth, R.A., Morgan, D.O., Beaudoin, J. and Sara, V.: Purification and characterization of human brain insulin receptor. *J. Biol. Chem.* 1986, 261: 3753–3757.
- 27) Ryan, M.P., Peavy, D.E., Frank, B.H.

- and Duckworth, W.C.: The degradation of monoiodotyrosyl insulin isomers by insulin protease. *Endocrinology* 1984, 115: 591–599.
- 28) Saltiel, A.R., Judith, A.F., Sherline, P. and Cuatrecasas, P.: Insulin-stimulated hydrolysis of a novel glycolipid generates modulators of cAMP phosphodiesterase. *Science* 1986, 233: 967–972.
- 29) 志伊光瑞, 横野浩一, 今村諒道, 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 分解活性の酵素学的および免疫学的特性について一。日本内分泌会誌, 1984, 60: 30–43.
- 30) Shii, K., Baba, S., Yokono, K. and Roth, R.A.: Covalent linkage of 125 I-insulin to a cytosolic insulin-degrading enzyme. *J. Biol. Chem.* 1985, 260: 6503–6506.
- 31) Shii, K., Yokono, K., Baba, S. and Roth, R.A.: Purification and characterization of insulin-degrading enzyme from human erythrocytes. *Diabetes* 1986, 36: 675–683.
- 32) Shii, K. and Roth, R.A.: Inhibition of insulin degradation by hepatoma cells after microinjection of monoclonal antibodies to a specific cytosolic protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1986, 83: 4147–4151.
- 33) Steiner, D.F.: Insulin today. *Diabetes* 1977, 26: 322–340.
- 34) Stentz, F.B., Harris, H.L. and Kitabchi, A.E.: Early detection of degraded A- 125 I-insulin in human fibroblasts by the use of high performance liquid chromatography. *Diabetes* 1983, 32: 474–477.
- 35) Stentz, F.B., Harris, H.L. and Kitabchi, A.E.: Characterization of insulin-degrading activity of intact and subcellular components of human fibroblasts. *Endocrinology* 1985, 116: 926–934.
- 36) Taketomi, S. and Iwatsuka, H.: Effects of a synthetic hexapeptide (β -Ala-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-NH₂) on insulin binding and glucose metabolism of rat adipocytes. *Horm. Metab. Res.* 1979, 11: 498–502.
- 37) Terris, S. and Steiner, D.F.: Binding and degradation of 125 I-insulin by rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 1975, 250: 8389–8398.
- 38) Terris, S. and Steiner, D.F.: Retention and degradation of 125 I-insulin by perfused livers from diabetic rats. *J. Clin. Invest.* 1976, 57: 885–896.
- 39) Yokono, K., Imamura, Y., Sakai, H. and Baba, S.: Insulin-degrading activity of plasma membranes from rat skeletal muscle. Its isolation, characterization and biological significance. *Diabetes* 1979, 28: 810–817.
- 40) Yokono, K., Imamura, Y., Shii, K., Mizuno, N., Sakai, H. and Baba, S.: Immunochemical studies on the insulin-degrading enzyme from pig and rat skeletal muscle. *Diabetes* 1980, 29: 856–859.
- 41) Yokono, K., Imamura, Y., Shii, K., Sakai, H. and Baba, S.: Purification and characterization of insulin-degrading enzyme from pig skeletal muscle. *Endocrinology* 1981, 108: 1527–1532.
- 42) Yonezawa, K., Yokono, K., Yaso, S., Hari, J., Amano, K., Kawase, Y., Sakamoto, T., Shii, K., Imamura, Y. and Baba, S.: Degradation of insulin by insulin-degrading enzyme and biological characteristics of its fragments. *Endocrinology* 1986, 118: 1989–1996.
- 43) Ward, W.F. and Moss, A.L.: Effects of lysosomal inhibitors on 125 I-insulin and 125 I-asislofetuin degradation by the isolated perfused rat liver and isolated rat hepatocytes. *Diabetes* 1985, 34: 446–451.

(受付日: '87. 10. 13)