— 綜 説 —

インスリンの作用機転

竹内 節彌

日本医科大学名誉教授

Action mode of insulin

Setsuya Takeuchi

Prof. Emer., Nippon Medical School

[I] インスリン受容体

insulin (Ins.) は target cell の plasma membrane に存在する insulin receptor (Ins-recept.) と結合することによって、そのすべての生理的機能を発揮する。そして、Ins. と Ins-recept. との結合の様式は固定受容体様式 (fixed receptor model) に従う。

ここ 20 年間にわたり、Ins. の細胞内における状態に関する観察が繰り返し報告されてきた。その多くが labeled hormone を利用する研究であったが、Ins. が細胞内に存在するという事実とその生理活性の発現機転との関係について、それらの報告は積極的言及を全く欠いていた。細胞 Ins. と plasma protein との結合が大部分非特異的であるようにみえたことと、それが lysosomal fraction に多量発見されたこと、したがって細胞内 Ins. は degradation process にあると判断されたこと、などがその生理活性との関係を云々する余裕を失わしめたのであった。しかし、丹念に繰り返されたこれらの観察は、二つの極めて発展的な視野を用意する事実を捕捉していたのである。

その一つは、1971 年に Freychet ら¹⁾によって高い生理活性を持つ monoiodoinsulin がこの種の研究に導入され、plasma membrane fraction から Ins. に高い選択的親和性を有する fraction が抽出され、それと Ins. との結合こそが Ins. の生理活性の発揮に essential であることが証明されたことである。いわゆる Ins-recept. fraction が発見された。しかし、このことは皮肉にも細胞内 Ins. がその生理活性を有していないということを間接的に証明する結果を招いてしまったのであった。

もう一つの注目すべき事実は、ラット脂肪細胞の homogenate の sucrose density gradient centrifugation 分画では、細胞内 Ins. が lysosomal fractions に見出されず、Golgi rich fraction に集中して発見されたことである²⁾。これは、plasma membrane に結合していた Ins. が Golgi rich fraction に移動する過程そのものが endocytotic process にほかならないこと、また、その時 Ins. が Ins-recept. と結合したままの状態 で細胞内を移動する可能性についての二、三の傍証などに支えられて、Ins. の糖代謝促進作用の基盤となるべき glucose transport system の存在する位置を plasma membrane に限定せず、細胞内にもわたる一連の構造を持つものと把握する極めて斬新な仮説を用意するものであった³⁾。しかし、Ins. の作用機転についての考察にはまだ不十分な点があって、Ins. 欠損状態における glucose transport と Ins. 作用下のそれとの間に質的な変化を予想する点 (translocation hypothesis of insulin action of glucose transport, reported by T. Kono, 1984⁴⁾)、なお多分に、反論の入る余地を残している (後述)。

Ins-recept. : Freychet ら⁵⁾、ならびに Cuatrecasas ら⁶⁾はラット肝細胞を用い、Gavin ら⁷⁾はヒトの培養 lymphocytes を用い、それぞれの plasma membrane fraction 中に Ins-recept. fraction の存在を証明した。

Cuatrecasas ら⁸⁾はラットの肝細胞および脂肪細胞から Ins. に対して強い結合性を示す蛋白分画を分離し、これを insulin binding protein (IBP) と名付け、Ins-recept. の機能を全面的に代行するものと考えた。Lawrence ら⁹⁾は anti-IBP-serum によって、Ins. と Ins-recept. との結合とその代謝面への影響を完全に

遮断できると報告している。Miller and Lerner¹⁰⁾は bovine pituitary extract から IBP と Ins. との結合を阻害する a large peptide を分離し、これを diabetogenic peptide と呼んでいる。Miller らのこの diabetogenic peptide と、Lawrence らの使用した anti-IBP 抗体との間の化学的・機能的相互関係などについては現在まだ完全には解明されたとは言いがたいが、Ins. の生理活性が全面的に Ins-recept. との結合に依存しているという事実だけは確認される。

Cuatrecasas¹¹⁾の報告によるとラットの肝あるいは脂肪細胞から抽出した Ins-recept. fraction はともに、 $Mr=300,000$, frictional ratio=1.7, stokes radius=71 Å の asymmetrical protein であったという。Freychet ら⁵⁾は Ins-recept. と monoiodo-Ins. の結合が 20 ng/ml (3.3 nM) の native Ins. の共存によって 50% 阻止され、さらに、高濃度の native Ins. の共存によって最高 90% まで抑制され、human Ins., porcine Ins., bovine Ins. との結合性を 100% とした場合、proinsulin (porcine), desoctapeptide Ins. (bovine) および desalanine-desasparagine Ins. (bovine) との結合性はそれぞれ 20%, 1.9%, および 1.7% であったという。

Scatchard analysis の結果、Ins. と Ins-recept. との結合は high affinity-low capacity site (equilibrium constant = $1.98 \pm 0.14 \times 10^9$, capacity = 0.11 ± 0.01) と、low affinity-high capacity site (equilibrium constant = $1.43 \pm 0.07 \times 10^8$, capacity = 2.09 ± 0.11) とから成る 2 orders of receptor sites model に従うことが証明された。Kono and Barham¹²⁾の計算では 1 個のラット脂肪細胞に約 160,000 個の Ins-recept. が存在し、その内約 4,000 個の receptor が Ins. によって占められた時に max. effect を生ずる。この数値は約 100 分子の Ins. が min. effect を起こし、約 3,000 分子の Ins. が max. effect を生ずるとする Crofford¹³⁾の成績とほぼ一致する。また Deutsch ら¹⁴⁾は latent (silent?) receptor の存在について言及し、Czech は receptor complex は互いに disulfide 結合によって結ばれた α (Mr 135,000) および β (Mr 90,000) の 2 個の subunit からなっている¹⁵⁾ことを指摘した。Shia and Pilch¹⁶⁾は β -subunit 自身が insulin-activated protein kinase であると主張したが、Czech は前出の論文の中で、Ins. が β -subunit の phosphorylation を刺激すると報告している。 β -subunitこそ、Ins-recept. の機能を代表するものであるろう。

結合型 Ins-recept. からの情報の伝播：一般に fixed receptor model において、結合型 receptor から発せられる情報は、① second messenger を介し、細胞内の proteolytic process を励起する route と、② receptor の存在する位置から周囲の plasma membrane に伝播し、諸種物質の膜透過性を変化させる route と、二様の経路をたどって target cell の機能に影響を与えるのが常であるが、Ins. の場合、① route において決定的な役割を果たすはずの second messenger の本態に関してはいまだ十分解明されたとは言いがたい。他の多くの polypeptide hormone の receptor action において確認されている細胞内 cAMP 濃度の上昇は Ins. の場合認められず、cAMP 濃度はかえって低下傾向を示す場合が多い。それほどの程度 Ins. の生理活性の発現に関与しているものか、必ずしも証明されたとは言いがたい。また一時は細胞内の cGMP の増加が注目されたこともあったが、cGMP が Ins-recept. の second messenger であるとする直接的な証拠も得られなかった¹⁷⁾。Krahl¹⁸⁾は、② route によって K^+ , Mg^{++} の膜透過性 (out $\rightarrow$ in) が上昇し、それに伴って細胞内に進入する K^+ , Mg^{++} そのものが second messenger としての役割を果たす、という仮説を提唱している。また最近、Czech¹⁵⁾は Ins. によって tyrosine kinase が高まること、同時に、細胞の内部の Ins-recept. protein と tyrosine kinase との結合物の量が増加することを証明し、この結合物が Ins-recept. の情報を mediate する可能性について論じている。しかし、それを Ins-recept. の second messenger であるとは結論しなかった。彼は、むしろ phosphorylated β -subunit そのものをこれに擬している。

② route をたどる Ins-recept. からの情報が、著明な glucose, amino-acids, cations などの細胞内への移動の増加を惹起するものであることには異論の余地はないのであるが、その詳細な機序に関しては現段階に至ってもその知られるところはなほ乏しい。plasma membrane の性状を概括的に表し、かつ、最も把握しやすい計測値である membrane potential に対する Ins. の作用について若干の検討がなされているのみである。

椎名¹⁹⁾は、*Rana catesbeiana* の縫工筋の resting potential が $5 \times 10^{-4} \sim 5 \times 10^{-5}$ U/ml の Ins. を添加後過分極の状態を示すと報告している。このいわゆるインスリン過分極と呼ばれる現象については、1959 年に Zierler²⁰⁾が incubation medium 中の K^+ 濃度が 5.9

mM である場合に限り認めたことであるが、彼はこれを Ins. の Na^+ -pump 刺激作用に帰している。椎名は 2~5 mM の濃度範囲において、 K^+ はインスリン過分極に影響を及ぼさなかったと述べているのであるが、 K^+ 欠乏食で 3 週間以上飼育したラットの横隔膜について観察した Otsuka and Ohtsuki²¹⁾ は K^+ 濃度 0.5 mM という低カリウム環境下で、インスリン過分極が起こることを見出し、それを Ins. の細胞膜 Na^+ 透過性の一過性上昇作用に対応させている。これらの事実はすべて結合型 Ins-recept. からの情報が膜の Na^+ 透過性(out $\rightarrow$ in)に一過性亢進を起こさせ、同時に過分極あるいは脱分極を起こさせていることを物語っている。② route に Na^+ -pump が介在していることに紛れはないが、 Na^+ -pump の機能状態と膜電位が相関することは Ins. の場合に限られた現象ではなく、当然過ぎるほど当然な話であるに違いない。

先述の Zierler や Otsuka らの観察は必ずしも Ins. の代謝面への影響の観察と直結して行われたわけではないが、 10^{-6} ~ 10^{-5} g/ml の d-tubocurarine の添加によってインスリン過分極が抑制されたという椎名の観察は、ラット横隔膜標本の glucose uptake に対する Ins. の刺激作用が d-tubocurarine, flaxedil などの membrane stabilizers の共存下で消失したという竹内ら^{22,23)} の報告と勘案した時、特に注目し値するものになるだろう。上記の薬物の membrane stabilizing effect によってインスリン過分極の招来が阻止された時、それ以後に続いて起こるはずの Ins. の代謝面への影響も消失してしまう可能性を示唆しているからである。すなわち、インスリン過分極がなぜ起こるのかは分からない。しかし、それが阻止されれば、その代謝作用も発揮されない。

[II] グルコース摂取

Ins. は末梢組織の target cell に直接作用し、そのグルコース摂取を増大させる。Ins. のこの作用は、その強弱に差はあっても、臓器の別、あるいは target cell の種類を問わない。そして、一般には glucose uptake と呼ばれているこの現象が細胞外から細胞内への glucose の単純な移動に基づくものであることは 1970 年代の末までには確認された。

glucose transport の kinetic parameter に対する Ins. の作用は K_m に変化を与えることなしに V_{max} を増加させることであるとされており^{24,25)}、その際、特筆すべき著明な細胞内生化学的随伴現象を伴わないこ

とを特徴とする。しかし、glucose が膜を横切るに際してある種の carrier が一定の役割を担う可能性、また、その carrier の合成過程とそれに対する Ins. の刺激作用などについては現在まだ結論を得るに至っていない。

この carrier は plasma membrane を構成する protein の一部が endocytotic に遊離してきたものであるろうと考えられているのであるが、Weis and Narahara²⁴⁾ は、カエルの縫工筋ならびにラット脂肪細胞を用い、trypsin が Ins. に酷似した glucose transport の増加作用を示すことを見出し、これを trypsin によって plasma membrane を構成する protein の一部が分解され、その分解物が glucose carrier として機能したためであると考えた。つまり彼らは Ins. が glucose carrier の合成を促進させて二次的に glucose transport を増加させるのではないかと考えたわけである。しかし、これに対しては Ins. の作用発現が非常に速やかであることを根拠に反対する意見が多い。すなわち trypsin 添加後の glucose uptake の変化に類似の現象が他にも見出されるからであって、例えば、ラット脂肪細胞に phosphorylase a or b を適用した場合にも似たことが起こる。これに対しては、これらの酵素が膜表面の lipoprotein の限界索を平板型からミセル型に変えるため、膜表面に細隙を生じ、glucose の通過を容易にするためである²⁶⁾と説明されている。現段階においては glucose の translocation (out $\rightarrow$ in) に特定の carrier が介在するとする考え方を支持するような結果は得られていない。

前述のように、Krahl¹⁸⁾ は K^+ , Mg^{2+} を Ins-recept. の second messenger に擬したのだが、一方、細胞外に存在する cations は Ins. の glucose translocation にあまり影響を与えない。すなわち、incubation medium の cations の濃度を変化させても Ins. の作用に有意の増減を発見しないのが常である²⁷⁾。一方、 Ca^{2+} , K^+ 濃度の低下または EDTA の前処置などによって Ins. の横紋筋・脂肪細胞の glucose uptake の消失²⁸⁾、 O_2 消費の増減²⁹⁾ などについて知られているのであるが、それらが Ins. の glucose uptake に対する直接的な結果なのか、membrane potential の変化を介する間接的影響なのかを確認する確実な証拠は得られていない。というのは、Ins. のグルコース摂取刺激作用に対する receptor action はその細胞が本来持っているはずのグルコース摂取機能の単純な機能上昇であるに違いないからである。その間に質的な飛躍が介在するはずもない。ここに異質の反応が励起される可能性を前提にするの

ははなはだしく適当でない。しかしなお前述のように Ins. が「Vmax 増加, Km 不変」という transport kinetic parameter の変化を起こすことを認めるならば、それが transport system の数、すなわち、receptor 総数が変化するか、intrinsic activity が変動するか、いずれかの可能性についてまず論議しなければならない^{27,28)}。また前者に関しては silent receptor の存在比率の問題が解決されなくてはならず、後者に関しても細胞種による反応の相違の問題がまず解決されなくてはならない。最近、Kono⁴⁾は glucose transport system の分布する位置を plasma membrane 上のみに限らず、plasma membrane から microsomal membrane までを含めた一連の機構に分布するものと把握することによって、細胞内の Ins. が積極的な役割を果たす機会がありうることを示唆した。先に Cushman ら^{30,31)}が脂肪細胞の plasma membrane fraction 中の D-glucose-inhibitable cytochalasin B-binding activity が Ins. によって増加すること、またその間 microsomal activity が低下することを報告していたことは、Kono らの Ins. の作用を glucose transport system の translocation に求める仮説⁴⁾の樹立に大いに力を添えたことは確かだろう。なぜなら、Cushman らの観察の上に cytochalasin B によって glucose transport が抑制されること、D-glucose-inhibitable cytochalasin B-binding site と glucose transport system とが機能的に一致するようにみえること、ならびに、Ins. がこの system の総数を増加させるようにみえることなどに関する彼らの知見を積み重ねてみると、microsomal membrane 上の D-glucose-inhibitable cytochalasin B-binding site (=Ins-recept.) がこの反応に関与しているだろうという予測が得られるはずであるからである。すなわち、彼らは従来は plasma membrane にのみ存在すると信じられてきた Ins-recept. と構造的にも極めて近い receptor-protein が microsomal membrane 上にも存在すると主張していることになってしまう。この間の事情を説明して彼らは basic な状態——Ins. の欠損状態を彼らはこの basic という字で表しているのであるが、これは多くの誤解を生みかねない用語だろう。厳密な意味において Ins. 欠損状態にあるラット脂肪細胞標本作製することは不可能に近い——にある細胞においては、glucose utilization を limiting step とする glucose transport が、insulinize された細胞においては plasma membrane の transport それ自体を limiting

step とするように変質してしまうのだと言っている。一方、plasma membrane から microsomal membrane までの間にいくつかの compartment に分かれた glucose pool の存在を想定することの当否についても容易には判断を下せない。また、Ins-recept. が endocytotic に細胞内に取り込まれることと Ins. の細胞内活性とを直結させて考えるのもいささか飛躍が大き過ぎよう。Ins. が microsomal membrane の glucose permeability を変えたとしても、その時 Ins. が microsomal membrane に必ず接触していなければならないとする理由は全くないし、Ins. が plasma membrane の receptor に結合し、そこから発せられる情報が、何らかの形で、microsomal membrane に伝達されることは十分ありうることだからである。Ins-binding receptor の endocytotic internalization をもって直ちに Ins. が細胞内の生化学的過程に直接影響を与えるのだという理論の根拠とすることはいささか早計に過ぎるだろう。細胞内にその存在が証明された Ins. はやはり従来のごとく、崩壊過程にあるものと解釈しておきたい。

【Ⅲ】インスリン反応にみられる細胞特性

インスリン感受性を有する細胞が Ins. に接触した場合、最初に発生する反応の様式は同じであっても、それに続いて起こる反応にはそれぞれの細胞の固有機能の反映によって少なからざる差異を生ずる。それらの差異は生理的環境からかけ離れた環境条件下で行われた観察、例えば、大量の Ins. を投与した後の代謝位相の変化や、高濃度の Ins. と接触させた摘出組織の代謝相に対する観察においてしばしば認められてきたところだが、従来は往々にしてそれらの結果を直ちに全体に敷衍させるか、あるいは逆に、個々の特殊例と見なされるか、いずれも両極端に分かれる評価を受ける嫌いがあった。しかし、薬物の作用はそれぞれの細胞特性に応じて現れるという大原則を忘れないならば、殊更にインスリンの場合のみにみられる奇異な現象とするには当たらない。要はその評価を細胞特有の生理的活性との結び付きに求めることが最優先課題だということである。一例を挙げれば、前述のインスリン過(脱)分極という現象は target cell が excitable membrane を有する場合に限り認められることであって、その条件を欠く細胞、すなわち、脂肪・肝細胞などにおいては認められない³²⁾。しかし、だからといって Ins. が excitable membrane を有さない細胞の membrane

potential 維持機構に対して無作用であることを意味するものではない。Krishna ら³²⁾は同時に、norepinephrine 脱分極に対して Ins. は拮抗すると報告している。この一見矛盾しているようにみえる観察結果に対する唯一の解釈は、excitable membrane を有する細胞においては過（脱）分極という形で表現されるような膜特性の変化が、脂肪細胞においてはわれわれの測定法が有意の変化としてとらえることができないような形で惹起されているのだということだろう。そしてそれを傍証するのはこの時観察に使われたラット脂肪細胞の resting potential が比較的低かった（40～50mV）という事実であるに違いない。以下、使用臓器細胞種によって、殊更に拡大認識される Ins. の作用を臓器細胞別に記述してみたい。

Ins. と肝細胞：ラットの横隔膜標本や脂肪細胞標本を用いて観察する限り、Ins. は細胞内 cAMP 濃度に有意の変化を与えないと結論された（前述）。そこには cAMP を Ins. の second messenger として殊更に取り上げなければならない根拠は全く見当らない。しかし、それは Ins. が Ins-recept. に結合しても細胞内の adenylyclase 活性には全く変化が起らないということ必ずしも意味していない。細胞内 cAMP 濃度を上昇させることによって肝細胞の機能に影響を与えることがすでによく知られている glucagon や catecholamines などの cAMP 増加作用を Ins. は阻止し³³⁾、exogenous cAMP 添加の影響も消失させる³⁴⁾。Park ら³⁵⁾は摘出肝還流標本におけるこれらの諸氏の観察報告を綜説した際、Ins. には細胞内 cAMP 濃度の上昇を妨げる作用があると結論せざるを得なかった。また、この事実が Ins. 作用の細胞レベルでの研究に多用されてきた横隔膜標本や脂肪細胞標本においては確認できず、肝細胞標本において始めて確認されたということは、肝細胞には glucagon や catecholamines などの cAMP 濃度の変化を介して作用を発揮する薬物に対して極めて高い感受性を有する代謝過程が備わっていることを意味しているのであって、cAMP が肝細胞の Ins-recept. の second messenger として機能していることを示しているものではない。その証拠に、この「肝細胞内 cAMP 濃度安定化現象」によって Ins. の肝細胞に与える影響のすべてを説明できるわけではなく、特にこの「細胞内 cAMP 濃度安定化作用」を引き起こさないような微量 Ins. が惹起する「basal loss of K⁺」抑制現象はその最たるものであろう。そして、こ

の現象こそ excitable membrane を有する細胞に見出されるインスリン過（脱）分極現象と対応する肝細胞独特の反応なのである。Ins. に対する細胞の initial reaction は細胞内外への Na⁺あるいは K⁺の移動であって、それが membrane potential の変化として現れるか、cAMP 安定化作用として現れるかはそれぞれの観察に用いられた細胞種に本来的に備わった代謝特性のいかに依存しているのである。

Ins. と脂肪細胞：Ins. のラット脂肪細胞に対する作用は次の4項目にまとめられる。

(i) 脂肪細胞内に蓄積された glucose の CO₂, glyceride glycerol, fatty acids, glycogen などへの conversion が増加する³⁶⁾。

(ii) α -amino-iso-butylic acid, methionine などの amino acids の細胞内への取込みが増加する³⁷⁾。

(iii) (ii)項に挙げられた amino acids などの protein への incorporation が増加する^{29,38)}。

(iv) catecholamines によって刺激された lypolysis の亢進は抑制される³⁹⁾。

これら4項目の内、(ii)～(iv)までは glucose の非存在下でも認められる。すなわち、これらの反応は glucose uptake の増加によって惹起されたものではなく、(i)とは無関係の機序によって現われてくるものと考えられる。

前述のようにラット脂肪細胞の cAMP は Ins. によって変化しないか、やや低下の傾向を示す場合が多いのであるが、その場合特に強調されているのは glucose transport rate の変化と細胞内 cAMP 濃度の上下とは直接連動しないという事実である^{40,41)}。そして一方、(ii)、(iii)の反応もまた細胞内 cAMP 濃度とあまり平行しない^{42,43)}。残る(iv)だけは肝細胞の場合と同じように、Ins. の「cAMP 安定化作用」を弱いながらも証明しているとみることができよう。Jungas⁴²⁾はその活性を adenylyclase 系に依存する pyruvate dehydrogenase の活性と Ins. との関連の可能性について言及している。すなわち lactate, pyruvate などから long chain fatty acid に至る脂肪合成過程の limiting step として、この酵素の存在意義に注目したのである。

Coore ら⁴⁴⁾はこの脂肪細胞中のこの酵素の活性が Ins. との接触後高まること、また、adrenaline, ACTH, dibutyryl-cAMP がこの Ins. の影響を阻止すること、そして、この pyruvate dehydrogenase が心、腎、肝

の同種酵素と同じ性質を持つものであること、したがって、ATP-dependent kinase、および Mg^{++} -dependent phosphatase によって catalyse されることなどを報告している。Sica and Cuatrecasas⁴⁵⁾も、Ins. による pyruvate dehydrogenase 活性の上昇は puromycin, cycloheximide (高濃度) によって抑制され、actinomycin によっては抑制されないと報告している。

この Ins. による pyruvate dehydrogenase 活性上昇という現象は、この酵素が Ins-recept. の second messenger としての役割を果たしているのではないかという淡い期待をわれわれに抱かせた。もしそうなら、glucose uptake の増加と脂肪合成の促進とを間接的にもせよ連絡する重要な役目をこの酵素に期待することができるかも知れなかった。かねてから、dichloroacetate およびその誘導体の抗糖尿病作用について検討していた Crabb and Harris⁴⁶⁾や Stacpoole ら⁴⁷⁾がこの種の血糖下降薬の作用機転を mitochondria 分画の中の pyruvate dehydrogenase complex の活性上昇に求めて以来、この酵素の担っている glucose transport system への貢献度ならびにその機序などについて、改めて注目を集めた。入念に繰り返された Phase I test の結果は、この種の薬物には血中 triglyceride 値、cholesterol 値および lactate 値を低下させる作用があることを示していた。これは dichloroacetate 誘導体が在来の血糖低下薬と全く作用機転を異にすることを物語っていたが、同時に、その血糖低下作用の直接の原因が骨格筋の中のこの酵素の活性上昇であることが証明され、脂肪細胞中のそれはあまり変化していないことが証明されるに及んで問題は再び振り出しに戻らざるを得なかったのである。確かにこの酵素は glucose transport system と密接な関係を保つものではあるかも知れない。しかし、その関係は少なくとも直接的ではない。

ラット脂肪細胞においても Ins-recept. の second messenger の役割を担っているようにみえるのは K^+ や Na^+ などの無機イオンである。Rhodbell⁴⁸⁾はこの種の細胞においても、Ins. の作用発現には K^+ の存在が必要であったとし、Lambert ら^{49,50)}、Letarte ら⁵¹⁾は K^+ の欠損下でも Ins. の効果が完全に消失するわけではなく、また Mg^{++} の存在も必須でないことを指摘し、この点こそ脂肪細胞の特徴であると述べ、脂肪細胞における glucose transport system に対する Ins. の作用はやはり sodium dependent であると結論付けた。

Krishna ら³²⁾が norepinephrine-induced depolarization に対する Ins. の抑制機転を、Ins. が K^+ の細胞内への進入の様式を変化させることに求めているのはこの際大変興味深い。先述のように、それ自体は脂肪細胞の membrane potential を変化させないとしてもなお Ins. が膜電位維持機構に対して何らかの影響を与えている可能性について彼は発言したことになるからである。

Ins. と培養細胞、特に乳腺組織細胞：培養された乳腺細胞の増殖に対し Ins. が DNA, RNA および蛋白質の合成調節を通じて大きな影響を与えるという事実は、1960 年代末から 1970 年にかけての諸研究によって、ほぼ確実視されるようになった。標準化された培養条件下では 70% 以上の細胞が Ins. に反応して増殖を開始するといわれている。Turkington⁵²⁾、Turkington and Riddle⁵³⁾は培養開始後 8~12 h 以内に前駆物質の RNA への incorporation が始まり、それよりやや遅れて、DNA 合成の増加が、同時に、核内の RNA-polymerase 活性にも上昇が認められるという。この現象は、彼らおよび Stockdale and Topper⁵⁴⁾が Ins. によって DNA-replication が始まり、続いて細胞分裂が惹起されることを証明するに及んで想像以上の波紋を巻き起こした。すなわち、これはこれまでこの小論を支えてきた基本的態度「Ins-recept. の作用発現は fixed receptor model に従う」としてきた前提を大幅に変更する必要が生ずる可能性が出てきたのである。これに類する薬物作用の波及形式は mobile receptor model に従ってその作用を発揮する薬物に多く見出される。Ins. 作用の核内への波及を承認するためには、これまで Ins-recept. と一括総称してきたものの中に mobile receptor model に従うものが混じっていたか、あるいは、細胞の種類によっては Ins-recept. 自身が mobile receptor model に従っている場合があるのか、いずれかを認めなければならなくなるだろう。しかし、現時点においてこの問題に対して直接的な討論を行うのはいささか性急に過ぎるだろう。というのは、培養細胞を使用する観察の方法論的限界——cell coating という操作の妥当性——と、乳腺細胞の特殊性——Ins. 以外の物質、なかんずく prolactin, growth factors などに対する感受性——という二つの事情が絡まっているからである。

培養乳腺細胞の DNA, RNA の合成に変化を与える物質には prolactin, GH, growth factors などが知ら

れている⁵⁵⁾。それぞれ単独よりも併用によってその作用強度を著しく増す。growth factors と Ins. はともに細胞の分裂と分化を促進し、prolactin は post-mitotic period に影響して、insulin-mediated cell division によって形成された細胞の protein-kinase の合成を高める⁵⁶⁾とする報告もある。この三者は極めてよく似た作用機序を持つらしい。

乳腺細胞の mitosis には、元来、cAMP の細胞内濃度は rate limiting になりえないとされてきた。prolactin が cAMP の濃度を高めるのに反し、Ins. は cAMP 濃度に影響を与えない。このゆえか、Ins. と prolactin は synergistic であると考えられることが多い。ところが、growth factors と Ins. は additive であると信じられている。

epithelial growth factor を始めとする各種の growth factors の基本的構造はすべて Ins. に酷似しており⁵⁶⁾、Ins. を含めてそれらの間には、それぞれの polypeptide chain を構成する amino acids の配列に多少の相違があるだけである。現在では、これまで個々、別々に報告されてきた複数の growth factors が、human placenta あるいは human hepatoma cell から分離された human basic fibroblast growth factor (bFGF)⁵⁷⁾ と同一であることが証明された。Moscatelli ら⁵⁸⁾によると、Mr 25,000 bFGF は Mr 18,000 bFGF に分解してから bFGF-receptor に結合するらしい。残念ながら現在までのところ、この物質の結晶が、生理的活性を詳しく検討しうるだけの量分離されたという報告に接していない。

growth factors の中でその作用が Ins. に通ずる一面を有するもの、すなわち、insulin-like growth factors (IGF) の receptor の構造もまた、Ins-recept. のそれに酷似していることが分かってきた。Massagué and Czech⁵⁹⁾によると、Ins-recept. の β -subunit と全く同じ構造を有する subunit を insulin-like growth factor receptor は持っているという。

growth factor receptor は Ins-recept. と同じく type I および type II と呼ばれる二つの subunit からなっている。type II は IGF 1 に高い親和性を有し、Ins. に対する親和性は低い。type I は IGF 2 に親和性を有し、Ins. には結合しない。type I は三つの disulfide-linked form (Mr 35,000 と Mr 29,000) によって構成される点、Ins-recept. に極めてよく似ている。しかし、そのアミノ酸配列には Ins-recept. β -subunit のそれに共通するところがなく、Ins. の細胞分裂に対する

作用発現機構には参加していないものと考えられる。これに対して IGF 2 のほうは明らかに Ins. との結合性が認められ⁶⁰⁾、この種の Ins. の作用を代表しうるものと考えられている。

[IV] 以後の問題点

Ins. は Ins-recept. に結合することによって始めてその生理作用を発揮する。Ins. という hormon の生理学的な働きを理解するためのこの大前提は、次のように言い換えることができるだろう。Ins-recept. を有さない細胞は Ins. に反映しない。例えば、赤血球の細胞膜の表面には、Ins-recept. は存在しない。したがって、この血球はインスリン感受性を持たないと理解される。

1984 年に Czech¹⁵⁾ は Ins-recept. に関する四つの問題点を指摘した。

- 1) Ins-recept. 自体の生化学的特性の正確な把握。
- 2) second messenger の決定。
- 3) glucose transport のような target cell membrane system の解明。
- 4) Ins. に反応する cytoplasmic enzyme の存在に対する確証。

今回のこの小論は 1)～3) の問題提起に関する回答に限ってはある程度の進展を示したように思われる。しかし 4) に関してはいまだ十分な回答が用意されたとは言えない。また、われわれが Ins-recept. と把握しているものの中に、silent receptor がどの程度含まれているかを証明すべき方法を開発していないのである。

前述のごとく、赤血球は insulin insensitive であるとされている。しかし同時に、われわれは少なからざる量の Ins. が赤血球の表面に吸着されるという事実を知っている。従来この種の現象は、細胞膜表面を構成する蛋白質には Ins. に特異的に結合するもの——receptor protein——と、非特異的に結合するものがあり、Ins. の生理活性発揮に関与するのは前者だけに限られる、と説明されるのが常であった。いうまでもなく、後者の場合の結合の様式については、一般的に吸着その他の可逆的過程が想定されているのであるが、これまで述べてきた諸家の観察成績は、この場合にもう一つ別の結合の形、すなわち、化学的には特異的結合でありながら、生理的活性を伴わない場合がありうることを示している。一定の化学的物質と特異的な結合を果たしながら細胞の生理的反応を惹起しない

receptor, すなわち, silent receptor の存在を前提にしない限り, この問題は解決しない¹⁴⁾.

先述のごとく^{12,13)}, ラット脂肪細胞 1 個には約 160,000 の Ins-recept. が存在する. その約 1/40 に相当する receptor が Ins. によって占拠された時, Ins. の max. effect が発生するとされているのであるから, その場合の残りの 39/40 の receptor は生理活性の発現にはあまり積極的に参加してはいないことになってしまう. もちろん, 39/40 のすべてが silent receptor であると断定することはできないし, またすべきでもない. ただ, その中で silent receptor の占める割合を正確に知るための有効な方法を, われわれが持っていないだけである.

Ins-silent receptor が存在するという仮説はそれだけで現在臨床的に繁用されている receptor count technique によって得られる計測値の診断的意味を激減させることだろう. 例えば, インスリン感受性という臨床的概念は Ins-recept. の数の大小に大きく依存している. しかし, silent receptor の占める割合が変化しないと仮定した場合, Ins-recept. 総数が増加するとインスリン感受性は変化しないか, 低下する. silent receptor の占める割合が増加(減少)すれば, インスリン感受性は低下(上昇)するはずである.

正確な insulin-sensitivity を測定するには, まず, silent receptor の数をその場その場において逐時的に計測する方法を開発しなければならない.

今後の Ins. 研究がどのような経過をたどるかを予測することは大変難しい. しかし, 当然その存在が予測されている silent receptor に対する処置と, いまだに判明しない second messenger system の実態とその機転, ならびに Ins-mobile receptor の存在の可能性などについての正確な把握なしには大きな飛躍を望むことはできないだろう. そして, それに関する手掛りは IGF 2 に対応する receptor と Ins-recept. との間にみられるような受容体間の融通性に基づいて想定された「family of receptor (レセプター家族)」¹⁵⁾なる概念的把握の内にあるのではなからうか. これによって, polypeptide hormones, ならびに autacoids の受容体を大きく分類する観念がこれからの研究を支えるようになるかも知れない. 各種の receptor それぞれの生理的役割と receptor structure を対応させることによって, 首尾一貫した論旨による Ins. の作用機転が説かれる日が早晚来るに違いないし, また, その日の決して遠くはないことを私は期待している.

文 献

- 1) Freychet, P., Roth, J. and Neville, D.M., Jr.: Monoiodoinsulin; Demonstration of its biological activity and binding to fat cells and liver membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 43, 400~408, 1971.
- 2) Kono, T., Robinson, F.W., Sarver, J.A., Vega, F.V. and Pointer, R.H.: Action of insulin in fat cells. *J. Biol. Chem.*, 252, 2226~2233, 1977.
- 3) Suzuki, K. and Kono, T.: Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 2542~2545, 1980.
- 4) Kono, T.: Translocation hypothesis of insulin action on glucose transport. *Fed. Proc.*, 43, 2256~2257, 1984.
- 5) Freychet, P., Roth, J. and Neville, D.M., Jr.: Insulin receptors in the liver; Specific binding of [¹²⁵I]insulin to the plasma membrane and its relation to insulin bioactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68, 1833~1837, 1971.
- 6) Cuatrecasas, P., Desbuquois, B. and Krug, F.: Insulin-receptor interactions in liver cell membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 44, 333~339, 1971.
- 7) Gavin, J.R., Buell, D. and Roth, J.: Water-soluble insulin receptors from human lymphocytes. *Science*, 178, 168~169, 1972.
- 8) Cuatrecasas, P.: Affinity chromatography and purification of the insulin receptor of liver cell membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 1277~1281, 1972.
- 9) Lawrence, J.C., Jr., Larner, J., Kahn, C.R. and Roth, J.: Autoantibodies to the insulin receptor activate glycogen synthetase in rat adipocytes. *Mol. Cell. Biochem.*, 22, 153~157, 1978.
- 10) Miller, T.B. and Larner, J.: Anti-insulin actions of a bovine pituitary diabetogenic peptide on glycogen synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 2774~2777, 1972.
- 11) Cuatrecasas, P.: Properties of the insulin receptor isolated from liver and fat cell membranes. *J. Biol. Chem.*, 247, 1980~1991, 1978.
- 12) Kono, T. and Barham, F.W.: The relationship between the insulin-binding capacity of fat cells and the cellular response to insulin; Studies with intact and trypsin-treated fat cells. *J. Biol. Chem.*, 246, 6210~6216, 1971.
- 13) Crofford, O.B.: The uptake and inactivation of native insulin by isolated fat cells. *J. Biol. Chem.*, 243, 362~369, 1968.
- 14) Deutsch, P.J., Wan, C.F., Rosen, O.M. and Rubin, C.S.: Latent insulin receptors and possible receptor precursors in 3T3-L1 adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 133~136, 1983.
- 15) Czech, M.P.: New perspectives on the mechanism of insulin action. *Recent Progr. Horm. Res.*, 40, 347~377, 1984.
- 16) Shia, M.A. and Pilch, P.F.: The β subunit of the insulin receptor is an insulin-activated protein kinase. *Biochemistry*, 22, 717~721, 1983.
- 17) Larner, J., Lawrence, J.C., Roach, P.L., DePaoli-Roach, A.A., Walkenbach, R.J. and Guinovart, J.: About insulin and glycogen. "Cold Spring Harbor Symposium on

- Cell Proliferation", p. 95, Cold Spring Harbor, New York, 1979.
- 18) Krahle, M.E.: Insulin action at the molecular level; Facts and speculations. *Diabetes*, 21(Suppl. 2), 695~702, 1972.
 - 19) 椎名美純: 食用ガエルの縫筋筋静止膜電位, 坐骨神経伝導速度におよぼす insulin, d-tubocurarine の影響. *日医大誌*, 41, 102~108, 1974.
 - 20) Zierler, K.L.: Effect of insulin on membrane potential and potassium content of rat muscle. *Am. J. Physiol.*, 197, 515~523, 1959.
 - 21) Otsuka, M. and Ohtsuki, I.: Mechanism of muscular paralysis by insulin with special reference to periodic paralysis. *Am. J. Physiol.*, 219, 1178~1182, 1970.
 - 22) 竹内節弥, 戸部満寿夫, 佐々木利子: Curare の糖代謝に及ぼす影響. 第34回日本薬理学会総会, 札幌, 1961-07, *日薬理誌*, 57, 100\$, 1961.
 - 23) 竹内節弥, 戸部満寿夫, 佐々木利子: Curare 様作用物質の Insulin 効果におよぼす影響. 第35回日本薬理学会総会, 東京, 1962-04, 58, 113\$~114\$, 1962.
 - 24) Weis, L.S. and Narahara, H.T.: Regulation of cell membrane permeability in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, 244, 3084~3091, 1969.
 - 25) Vinten, J., Gliemann, J. and Østerlind, K.: Exchange of 3-O-methylglucose in isolated fat cells. *J. Biol. Chem.*, 251, 794~800, 1976.
 - 26) Mongar, J.L. and de Reuck, A.V.S.: *Enzyme and Drug Action*. p. 63, Churchill, London, 1962.
 - 27) Gould, M.K. and Chaudry, I.H.: The action of insulin on glucose uptake by isolated rat soleus muscle. I. Effects of cations. *Biochim. Biophys. Acta*, 215, 249~257, 1970.
 - 28) Gould, M.K. and Chaudry, I.H.: The action of insulin on glucose uptake by isolated rat soleus muscle. II. Dissociation of a priming effect of insulin from its stimulatory effect. *Biochim. Biophys. Acta*, 215, 258~263, 1970.
 - 29) Jeanrenaud, B. and Renold, A.E.: *Physiopathology of Adipose Tissue*. (Vague, J. ed.), p. 20, Excerpta Medica, Amsterdam, 1969.
 - 30) Cushman, S.W., Wardzala, L.J., Simpson, I.A., Karnieli, E., Hissin, P.J., Wheeler, T.J., Hinkle, P.C. and Salans, L. B.: Insulin-induced translocation of intracellular glucose transporters in the isolated rat adipose cell. *Fed. Proc.*, 43, 2251~2255, 1984.
 - 31) Cushman, S.W. and Wardzala, L.J.: Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell; Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, 255, 4758~4762, 1980.
 - 32) Krishna, G., Moskowitz, J., Dempsey, P. and Brodie, B. B.: The effect of norepinephrine and insulin on brown fat cell membrane potentials. *Lif. Sci.*[1], 9, 1353~1361, 1970.
 - 33) Exton, J.H. and Park, C.R.: Interaction of insulin and glucagon in the control of liver metabolism. "Handbook of Physiology, Sect. 7 Endocrinology, Vol. I Endocrine Pancreas" (Greep, R.O. and Astwood, E.B. sect. eds., Steiner, D.F. and Freinkel, N. vol. eds., Geiger, S.R. ex. ed.), p. 437~455, American Physiological Society, Washington, D.C., 1972.
 - 34) Exton, J.H., Lewis, S.B., Ho, R.J., Robison, G.A. and Park, C.R.: The role of cyclic AMP in the interaction of glucagon and insulin in the control of liver metabolism. *Ann. NY Acad. Sci.*, 185, 85~100, 1971.
 - 35) Park, C.R., Lewis, S.B. and Exton, J.H.: Relationship of some hepatic actions of insulin to the intracellular level of cyclic adenylate. *Diabetes*, 21(Suppl. 2), 439~446, 1972.
 - 36) Rodbell, M., Jones, A.B., de Cingolami, G.E.C. and Birnbaumer, L.: The actions of insulin and catabolic hormones on the plasma membrane of the fat cells. *Recent Progr. Horm. Res.*, 24, 215~254, 1968.
 - 37) Riggs, T.R.: *Biochemical Action of Hormones*. (Litwack, G. ed.), Vol. I, p. 157, Academic Press, New York, 1970.
 - 38) Krahle, M.E.: *Action of Insulin on Cell*. p. 63, Academic Press, New York, 1961.
 - 39) Crofford, O.B. and Renold, A.E.: Glucose uptake by incubated rat epididymal adipose tissue; Characteristics of the glucose transport system and action of insulin. *J. Biol. Chem.*, 240, 3237~3244, 1965.
 - 40) Snyder, J.G.J., Corbin, J.D. and Park, C.R.: *Int. Symp. Pharmacol. Horm. Polypeptides Proteins*, Milano, p. 367, 1968.
 - 41) Fain, J.N., Kovacev, V.P. and Scow, R.O.: Antilipolytic effect of insulin in isolated fat cells of the rat. *Endocrinology*, 78, 773~778, 1966.
 - 42) Jungas, R.L.: Effect of insulin on fatty acid synthesis from pyruvate, lactate or endogenous sources in adipose tissue; Evidence for the hormonal regulation of pyruvate dehydrogenase. *Endocrinology*, 84, 1368~1375, 1970.
 - 43) Halperin, M.L. and Robinson, B.H.: Mechanism of insulin action on control of fatty acid synthesis independent of glucose transport. *Metabolism*, 20, 78~86, 1971.
 - 44) Coore, H.G., Denton, R.M., Martin, B.R. and Randle, P.J.: Regulation of adipose tissue pyruvate dehydrogenase by insulin and other hormones. *Biochem. J.*, 125, 115~127, 1971.
 - 45) Sica, V. and Cuatrecasas, P.: Effects of insulin, epinephrine and cyclic adenosine monophosphate on pyruvate dehydrogenase of adipose tissue. *Biochemistry*, 12, 2282~2291, 1973.
 - 46) Crabb, D.W. and Harris, R.A.: Mechanism responsible for the hypoglycemic actions of dichloroacetate and 2-chloropropionate. *Arch. Biochem. Biophys.*, 198, 145~152, 1979.
 - 47) Stacpoole, P.W., Vlasak, J., Gonzales, M., Oshiro, Y. and Bodor, N.S.: Dichloroacetate derivatives; Effects on blood glucose and lactate levels in fasted rats. *Diabetes*, 34(Suppl. 1), 60A, 1985.
 - 48) Rodbell, M.: Metabolism of isolated fat cells. VI. The effects of insulin, lipolytic hormones, and theophylline on glucose transport and metabolism in "ghosts". *J. Biol. Chem.*, 242, 5751, 1967.
 - 49) Lambert, A.E., Junod, A., Stanfacher, W., Jeanrenaud, B. and Renold, A.E.: Organ culture of fetal rat pancreas. I. Insulin release induced by caffeine and by sugars and some derivatives. *Biochim. Biophys. Acta*, 184, 529~539,

- 1969.
- 50) Lambert, A.E., Jeanrenaud, B., Junod, A. and Renold, A. E.: Organ culture of fetal rat pancreas. II. Insulin release induced by amino and organic acids, by hormonal peptides, by cationic alterations of the medium and by other agents. *Biochim. Biophys. Acta*, 184, 540~553, 1969.
- 51) Letarte, J. and Renold, A.E.: Ionic effects on glucose transport and metabolism by isolated mouse fat cells incubated with or without insulin. I. Lack of effect of medium Ca^{2+} , Mg^{2+} or PO_4^{3-} . *Biochim. Biophys. Acta*, 183, 350~356, 1969.
- 52) Turkington, R.W.: Hormonal regulation of rapidly labeled ribonucleic acid in mammary cells *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, 245, 6690~6697, 1970.
- 53) Turkington, R.W. and Riddle, M.: Hormone-dependent formation of polysomes in mammary cells *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, 245, 5145~5152, 1970.
- 54) Stockdale, F.E. and Topper, Y.J.: The role of DNA synthesis and mitosis in hormone-dependent differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 56, 1283~1289, 1966.
- 55) Majumder, G.C. and Turkington, R.W.: Hormonal regulation of protein kinases and adenosine-3',5'-monophosphate-binding protein in developing mammary gland. *J. Biol. Chem.*, 246, 5545~5554, 1971.
- 56) Shooter, E.M., Yanker, B.A., Landreth, G.E. and Sutter, A.: Biosynthesis and mechanism of action of nerve growth factor. *Recent Progr. Horm. Res.*, 37, 417~446, 1981.
- 57) Baird, A., Esch, F., Mormède, P., Ueno, N., Ling, N., Böhlen, P., Ying, S.-Y., Wehrenberg, W.B. and Guillemin, R.: Molecular characterization of fibroblast growth factor; Distribution and biological activities in various tissue. *Recent Progr. Horm. Res.*, 42, 143~205, 1986.
- 58) Moscatelli, D., Joseph-Silverstein, J., Presta, M. and Rifkin, D.B.: Multiple forms of an angiogenesis factor; Basic fibroblast growth factor. *Biochimie*, 70, 83~87, 1988.
- 59) Massagué, J. and Czech, M.P.: The subunit structures of two distinct receptors for insulin-like growth factors I and II and their relationship to the insulin receptor. *J. Biol. Chem.*, 257, 5038~5045, 1982.
- 60) King, G.L., Rechler, M.M. and Kahn, C.R.: Interaction between the receptors for insulin and the insulin-like growth factors on adipocytes. *J. Biol. Chem.*, 257, 10001~10006, 1982.

(受付: 1989年 3月 6日)