



単クローン性抗体を用いたインスリン分解酵素の組織分布と細胞内局在に関する研究

秋山, 裕之

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1989-01-11

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1235

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001235>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	秋 山 裕 之 (広島県)
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博ろ第1035号
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位授与の日付	平成元年1月11日
学位論文題目	単クローン性抗体を用いたインスリン分解酵素の組織分布と細胞内局在に関する研究

審査委員	主査 教授 馬 場 茂 明
	教授 藤 田 拓 男 教授 伊 東 宏

論文内容の要旨

目 的

細胞レベルにおけるインスリンの分解機構には、low density lipoproteinやepidermal growth factorの分解に認められると同様のlysosomal pathwayの関与に加えて、インスリンに高親和性を有し、これを限定分解するプロテアーゼであるinsulin-degrading enzyme (IDE)の関与が示唆されている。すでに志伊らは、IDEに対する特異的な単クローン性抗体をヒト培養肝癌細胞にmicroinjectionすることにより、正常細胞において部分的にインスリン分解を抑制し得ることを報告した。さらにIDEがin vivoにおいて ^{125}I -インスリンとcross-linkされることも示された。以上の結果より、最近IDEが細胞レベルにおけるインスリン分解に重要な生理的意義を有しているとの考えが有力になりつつある。従来、IDEは肝や骨格筋をはじめとする多くの組織に存在することが報告されてきたが、これらの実験系では部分精製した酵素を用いて ^{125}I -インスリンの分解活性を測定したにすぎず、各種臓器におけるIDEの直接的な定量は未だ成されていない。また、インスリンが細胞膜表面の受容体に結合後、インスリン受容体複合体として細胞内に取り込まれ分解される過程で、IDEと接触し限定分解を受けるのかは明らかでない。IDEは主に細胞内可溶性分画より抽出精製されているが、本酵素の細胞内局在に関しても不明な点が多い。そこで本研究は、単クローン性IDE抗体を用いたラジオイムノアッセイ(RIA)法、免疫組織化学、Immunoblotting法により、IDEの各組織分布および細胞内局在を検討し、インスリンの生体内代謝機構を解明することを目的とした。

材料と方法

体重200g前後のWistar系雄性ラットを断頭ト殺後、肝、腎、脳、骨格筋を得、ホモジナイズ

し、 $100,000 \times g$ 、30分間遠沈後上清を各組織可溶性分画とした。RIA法はラットのIDEを認識する単クローン性抗体9B12と28H1によるサンドイッチ法を用いた。本法において求めたIDE量を蛋白量にて換算し、従来のトリクロロ酢酸を用いたインスリン分解の比活性と比較検討した。免疫光顕および電顕は、ラット肝臓を固定液にて灌流後、凍結切片を作製し、その切片上で酵素抗体法を行なった。光顕は単クローン性IDE抗体9B12およびペルオキシダーゼ標識ヒツジ抗マウスIgG F(ab')₂を用いた間接法で、電顕は単クローン性IDE抗体9B12Fab fraction - horseradish peroxidase conjugateを用いた直接法で行なった。Immunoblotting法はde Duveの方法に準じてラット肝細胞内小器官を分別遠沈し単離後、各 $100 \mu g$ を7.5% SDS polyacrylamide gel電気泳動(SDS-PAGE)で分離、ニトロセルロース膜に転写後、 $5 \mu g/ml$ 濃度の9B12とincubationし、ついでペルオキシダーゼ標識抗マウスIgGを第2抗体として反応させた後、diaminobenzidineを基質として酵素抗体法を行なった。RIA法は前述のサンドイッチ法にて測定した。尚、エンドゾームはBergeronの方法に準じて精製し、Triton X-100にて可溶化後Immunoblotting法およびRIA法に供した。

成 績

単クローン性IDE抗体9B12および28H1を用いたRIA法は良好な平行性および回収率を示した。本RIA系を用いて肝、腎、脳、骨格筋の可溶性分画におけるIDEの定量を行なったところ、蛋白量に換算したIDE量はそれぞれ2.9, 1.3, 1.0, $0.4 \mu g/mg$ proteinで肝に最も多くのIDEが存在した。TCA法によるインスリン分解の比活性のIDE量に対する比率は、肝、脳、骨格筋ではほぼ同等であったが、腎のみ約2倍を示した。これは従来可溶性分画中のインスリン分解活性の大部分はIDEによるものと報告されているが、腎にはIDE以外に他の多くの非特異的なプロテアーゼが存在する可能性を示唆するものと考えられた。

次にインスリン分解の主臓器である肝を用いてIDEの細胞内局在を免疫組織学的手法により検討した。光顕レベルでのIDE免疫反応性は、主に肝細胞および胆管上皮に認められ、また門脈域周辺は中心静脈周囲より強いzonal distributionが認められた。それに比して正常マウスグロブリンを用いた対照においては、メチルグリーンによる核の染色と非特異的なkuppfer細胞の染色のみが認められた。ラット肝細胞内における電顕レベルでのIDE免疫反応性は主に細胞質に認められ、細胞膜、ミトコンドリア、核における存在は明らかではなかった。

次に、肝細胞各分画を単離可溶化し、これらの分画におけるIDEの存在をImmunoblotting法にて検討した。IDEはSDS-PAGE上、110kdの単一蛋白として同定される。今回のImmunoblotting法にて細胞質にはIDEと考えられる110kdのbandが認められたが、ライソゾーム、細胞膜、ミトコンドリアの各分画には明らかなbandは認められなかった。

さらに前述のRIA法を用いて肝細胞各分画におけるIDEの定量を行なったが、細胞質のみ測定可能であり、ライソゾーム、細胞膜、ミトコンドリアには検出し得なかった。

最近、EGFと同様にインスリンも細胞膜面受容体に結合後、internalizationされエンドゾーム

内で一部限定分解されるという報告がみられる。このため今回の免疫電顕ではその局在が明らかでなかったエンドゾームを分離精製し、エンドゾームにおけるIDEの存在の有無をImmunoblotting法およびRIA法にて検討したが検出し得なかった。その原因として、感度の問題の他に、エンドゾームのIDEが細胞質のIDEと異なる可能性も考えられた。

結 論

我々はインスリンの生体内代謝機構にインスリンに対して高い親和性を有する蛋白分解酵素であるIDEの重要性を報告してきた。今回、IDEに特異的な単クローン性抗体を用いてIDEの組織分布および細胞内局在について検索し、以下の結論を得た。

1. サンドイッチ法によるRIA系を用いてIDEのラット組織分布を検討したところ、肝、腎、脳、骨格筋の全てにIDEの存在が認められた。また、IDEは肝に最も多量に存在する可能性が示された。
2. RIA法によるIDE量と従来のTCA法で得られたインスリン分解活性の比較では、肝を100%とした場合、脳、骨格筋では83~117%とほぼ同等であったが、腎では約2倍であり、インスリン分解活性がそのままIDE量を反映し得ないことが示唆された。
3. 酵素抗体法による免疫光顕でのラット肝IDE免疫反応性は、肝静脈よりも門脈周辺の肝細胞に強く、また、胆管上皮にもIDEの存在が認められた。
4. 免疫電顕では、IDE免疫反応性は粗面小胞体周辺の細胞質に存在し、細胞膜、核、ミトコンドリアには認められなかった。
5. Immunoblotting法およびRIA法の結果からも同様に、IDEが細胞質可溶性分画にのみ存在することが示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

細胞レベルにおけるインスリンの分解機構には、インスリンに高親和性を有し、これを限定分解するプロテアーゼであるinsulin-degrading enzyme (IDE) の関与が示唆されてきた。従来、IDEは肝、骨格筋をはじめ多くの組織に存在することが報告されてきたが、これらの実験系では部分精製した酵素を用いて、¹²⁵I-インスリンの分解活性を測定したにすぎず、各種臓器におけるIDEの直接的な定量は未だなされていない。また、IDEは主に細胞内可溶性分画より抽出精製されているが、本酵素の細胞内局在に関しても不明な点が多い。

そこで、本研究者は、単クローン性IDE抗体を用いたRIA,免疫組織化学、immunoblotting法によって、IDEの各組織分布および細胞内局在を検討し、インスリンの生体内代謝機構を解明することを目的とした。

教室で作成した単クローン性IDE抗体9B12、および28H1を用いたサンドイッチ法によるRIAを開発、本法が良好な平行性及び回収率を示したことより、本RIA系を用いて肝、腎、脳、骨格

筋の可溶性分画における IDE の定量を行った。

その結果、IDE は各種組織に一定量が存在することを証明したが、中でも肝に最も多量に存在することを認めた。

次いで、RIA 法による IDE 量と、従来法である TCA 法で得られたインスリン分解活性とを比較した。肝を100%とした場合、脳、骨格筋では83-117%とほぼ同等であったが、腎では約2倍であり、インスリン分解活性がそのまま IDE 量を反映しえないことを示唆された。とくに腎では IDE 以外のインスリン分解に対する非特異的プロテアーゼが存在する可能性があるものと考えられる。

組織局在を酵素抗体法による免疫光顕で検索したところ、ラット肝 IDE 免疫反応性は、肝静脈よりも門脈周辺の肝細胞に強く、また胆管上皮にも IDE の存在が認められた。この事実は、インスリンが胆管を通じて排泄される可能性を示唆しているほか、インスリン分解が生理学的に肝細胞で強く行なわれていることを示している。

次いで、免疫電顕所見では、IDE 免疫反応性は粗面小胞体周辺の細胞質に存在することを証明し、IDE が細胞内で合成されていることを示唆した。そこで、肝細胞各分画を単離可溶化し、これらの分画における IDE の存在を immunoblotting 法にて検討した。細胞質のみに分子量110kd の単一蛋白バンドが認められ、これは志伊らが報告した IDE の分子量に一致するものであり、その細胞内存在を明らかに証明する結果であった。

以上の研究は、初めて肝における IDE の細胞内局在を直接的に検索し得たものであり、意義あるものと思われる。

すなわち、IDE のもつ生理的意義に関して、インスリンが細胞膜インスリン受容体複合体の internalization, coated vesicle, endosome, さらに receptosome での分解過程等に関連することを示唆し、今後の研究に寄与するところが大であると考えられる。

よって本研究者は医学博士の学位をうる資格ありと判定された。