



# Development of Vanadate Sensitive Human Erythrocytes Insulin Receptor Tyrosine Phosphatase Assay

岡田, 有美

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1999-03-03

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2309

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002309>

※ 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）	岡田有美（兵庫県）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	博ろ第1669号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与の日付	平成11年3月3日
学位論文題目	Development of Vanadate Sensitive Human Erythrocytes Insulin Receptor Tyrosine Phosphatase Assay (vanadate 感受性ヒト血球インスリン受容体脱リン酸化酵素測定法の開発)
審査委員	主査 教授 春日 雅人 教授 千原 和夫      教授 横野 浩一

### 論文内容の要旨

インスリンが結合することによりインスリン受容体は内因性のチロシinkinナーゼが活性化され、インスリンの情報は細胞内に伝達されていく。インスリン受容体のチロシinkinナーゼの障害は typeA のインスリン受容体異常症だけでなく、インスリン抵抗性のある NIDDM や肥満の症例にも認められている。インスリン受容体のチロシinkinナーゼは自己リン酸化により up-regulate されているが、protein tyrosine phosphatase はチロシinkinナーゼを不活化すると考えられている。in vitro ではインスリン受容体チロシinkinナーゼに対する protein tyrosine phosphatase の研究はこれまでもなされているが、今回、インスリン受容体チロシinkinナーゼの protein tyrosine phosphatase について in vitro でなく in vivo で測定することを試みた。ヒト赤血球のインスリン受容体自己リン酸化に対して tyrosine phosphatase の阻害物質である sodium orthovanadate がどのように作用しているかを検討し、vanadate に感受性のある phosphatase の脱リン酸化能の測定する方法を開発した。

ヒト赤血球自己リン酸化インスリン受容体標本の作製は、まず300μl のヘパリン採血した血液を10 mM HEPES を含む RPMI medium にて洗浄し、各濃度のインスリンを含む medium にて37℃, 15分間刺激し、4℃の低張液にて反応を停止した。その後この赤血球に500μl の50mM HEPES NaOH, 0.15M NaCl, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mg/ml bacitracin, 1 mM vanadate, 1 % Triton X 100を加え可溶化し、その上清を sample とした。自己リン酸化インスリン受容体及び総インスリン受容体の測定は時間分解蛍光法により行った。すなわち抗インスリン受容体抗体である 3B6 を固層化した96穴マイクロタイタープレートに100μl の sample を加え incubation した後、洗浄し、自己リン酸化インスリン受容体であればユーロピウム標識した抗フォスホチロシン抗体、総インスリン受容体であればユーロピウム標識した抗インスリン受容体抗体を加え incubation し、再度洗浄後 DELFIA enhancement solution を加え Wallac Fluormeter にて蛍光強度を測定した。

まず赤血球中にインスリン受容体チロシinkinナーゼに対する protein tyrosine phosphatase が含まれているかを検討した。100nM インスリンにて刺激した赤血球を RPMI medium にて洗浄、10℃, 1 mM vanadate 存在及び非存在下で培養し、経時的にインスリン受容体リン酸化 (Auto-IR) を測定したと

ころ、vanadate 非存在下ではインスリン受容体リン酸化は徐々に低下したが vanadate 存在下では30分間ほぼ変化はなかった。(Fig. 1)。

次に定常状態でのインスリン受容体チロシンキナーゼとその protein tyrosine phosphatase の測定を行うために以下の検討を行った。100nM インスリンにて刺激を行った場合の vanadate 至適濃度について検討したところ0.2mM にてインスリン自己リン酸化能は最大値となり、最大の効果が得られた (Fig. 2)。また同様に刺激時間についても検討したが、vanadate 存在下でも非存在下でもインスリン自己リン酸化能は3~15分の間でほぼ一定であった (Fig. 3 A)。0.1nM~100nM のインスリンにて刺激を行ったところ、1 mM vanadate 存在及び非存在下でも濃度依存性にインスリン受容体自己リン酸化能は上昇し、10nM インスリン刺激にて submaximam, 100nM インスリン刺激にて max. となった。また vanadate 存在下での自己リン酸化インスリン受容体 (Auto-IR) と vanadate 非存在下での Auto-IR の差はどの濃度の刺激でも一定であった (Fig. 3 B)。vanadate が直接インスリン受容体チロシンキナーゼに作用していないことを確認するために in vivo にてインスリン受容体をインスリンで刺激したが vanadate 存在下、非存在下で不変であった (Fig. 4)。そこで測定は 1 mM vanadate 存在下または非存在下で100nM インスリン、37℃にて15分間刺激を行うことにした。protein tyrosine phosphatase 活性として (vanadate 存在下での Auto-IR と vanadate 非存在下での Auto-IR の差) を総インスリン受容体数で割った値とした。

25例の正常者と32例の糖尿病患者についてこの方法を用いて protein tyrosine phosphatase 活性の測定を行った (Table 1) と、正常者と健常者の protein tyrosine phosphatase 活性には有意な差は認められなかった。

NIDDM の原因としてインスリン分泌不全とインスリン抵抗性が考えられているが、インスリン抵抗性のある患者の一部ではインスリン受容体の異常も指摘されている。しかしインスリン受容体キナーゼは in vivo ではその kinase と phosphatase の動的バランスにより調節されていると考えられる。このためインスリン受容体のリン酸化に対する phosphatase は以前より研究されてきたが in vitro における実験であった。ヒト赤血球を用いての cell system でのインスリン受容体の自己リン酸化能の測定法は確立していたため、今回はこの方法を用いて cell system でのインスリン受容体のリン酸化に対する phosphatase 活性を測定することを試みた。

インスリンにて刺激した赤血球を vanadate 存在及び非存在下で培養し経時的に Auto-IR を測定したところ、vanadate 非存在下ではインスリン受容体リン酸化は徐々に低下したが vanadate 存在下ではほぼ変化なく赤血球中にインスリン受容体チロシンキナーゼに対する phosphatase が含まれていると考えられた (Fig. 1) また in vivo にて vanadate が in vivo 受容体自己リン酸化に作用していないため (vanadate 存在下での Auto-IR と vanadate 非存在下での Auto-IR の差) が phosphatase の活性を示していると考えられた。vanadate 存在下での Auto-IR と vanadate 非存在下での Auto-IR の差はどのインスリン濃度の刺激でも一定であったことから phosphatase の活性はインスリン受容体の自己リン酸化に関係ないことが示唆された。

25例の正常者と32例の糖尿病患者についてこの方法を用いて protein tyrosine phosphatase 活性の測定を行ったが protein tyrosine phosphatase 活性には有意な差は認められなかった。糖尿病ではこの活性が低下するという報告や逆に上昇するという報告もみられるが、これらは in vitro での実験であるためと考えられた。

また、今後はこの測定法を用いて protein tyrosine phosphatase 異常の患者を発見するのに用いることができると考えられた。

Fig. 1

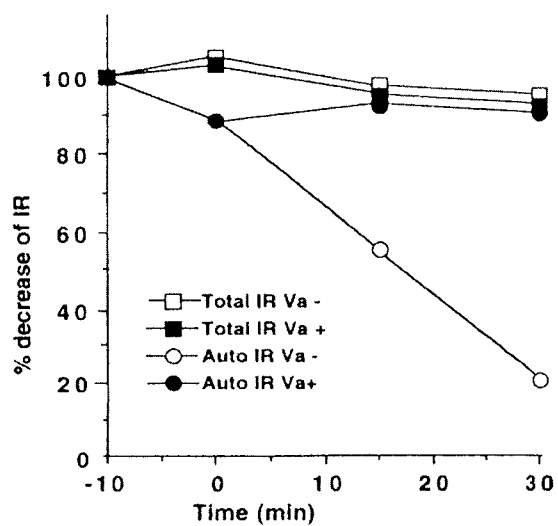
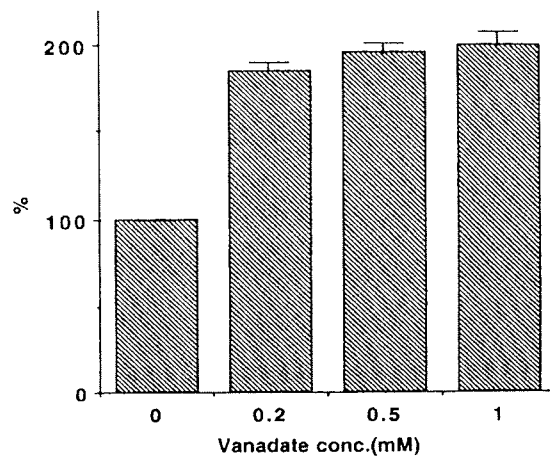


Fig. 2



B

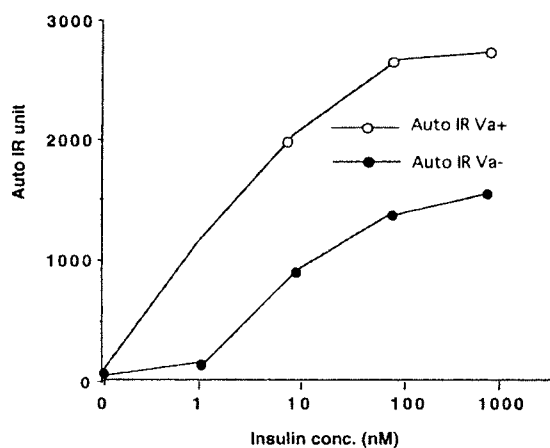


Fig. 3

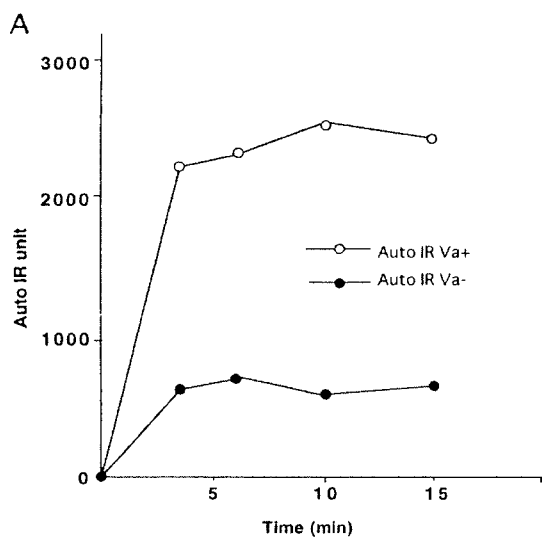


Fig. 5

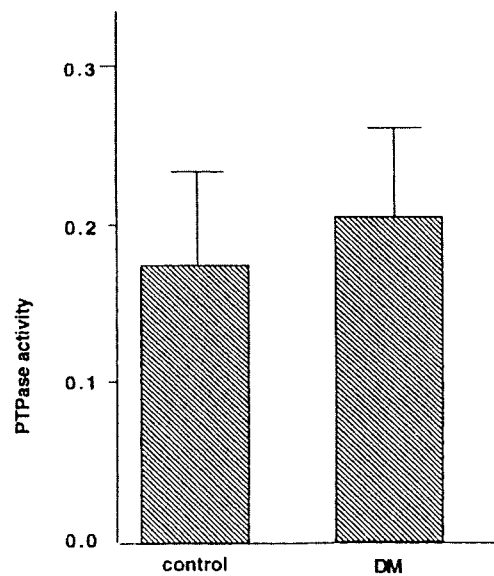


Fig. 4

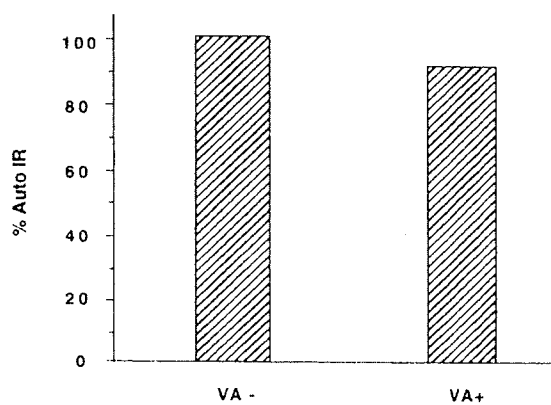


Table 1

Clinical characteristics of study subjects

	Control	NIDDM
Number	25	32
Age	49.5 ± 11.6	58.9 ± 8.7
Fasting plasma glucose (mmol/l)	5.52 ± 0.45	8.09 ± 1.89*
Σ IRI (pmol/ml)	1026 ± 526.2	736.8 ± 543.0
Total insulin receptors (unit)	5007.5 ± 1284.7	5017.4 ± 1926.4

Values are means ± S.D.

Σ IRI represents sum of plasma insulin at 0, 30, 60, 90, and 120 min during standard oral glucose tolerance test.

\* $P < 0.05$  vs. control subjects.

## 論文審査の結果の要旨

2型糖尿病の成因のひとつとして、インスリン作用の不足、すなわちインスリン抵抗性が想定されている。インスリン作用の第一歩はインスリン受容体のチロシン残基の磷酸化であり、これによりインスリン受容体に内在するチロシンキナーゼが活性化されインスリン作用が細胞内へ伝達される。従ってインスリン受容体のチロシン残基の磷酸化の程度により、インスリン作用が規定されている可能性がある。インスリン受容体のチロシン磷酸化は、内在するチロシンキナーゼ活性と protein tyrosine phosphatase 活性によって制御されている。本研究ではヒト赤血球中に存在し、チロシン磷酸化されたインスリン受容体を基質とする脱磷酸化能を測定する系を開発し、糖尿病患者と健常者と比較検討した。

予備実験から、赤血球にはチロシン磷酸化されたインスリン受容体を脱磷酸化する protein tyrosine phosphatase 活性があり、これは vanadate により阻害されること、この phosphatase 活性はインスリン刺激によって活性化されないことが明らかになった。従って、測定系としては、1 mM vanadate 存在下または非存在下で、赤血球と100nM インスリンを37℃、15分間インキュベーションし、インスリン受容体のチロシン磷酸化を測定した。そして protein tyrosine phosphatase 活性としては、vanadate 存在下と非存在下のインスリン受容体チロシン磷酸化の差を総インスリン受容体数で割った値を用いた。

25例の正常者と32例の糖尿病患者についてこの方法を用いて protein tyrosine phosphatase 活性の測定を行った。健常者と糖尿病患者の protein tyrosine phosphatase 活性には有意な差は認められなかった。従って、チロシン磷酸化したインスリン受容体に対する protein tyrosine phosphatase 活性の変化が2型糖尿病の主要な成因とは考えられなかった。本研究はヒト赤血球インスリン受容体の protein tyrosine phosphatase 活性について研究したものであるが、intact cell を用いて vanadate 感受性のインスリン受容体脱リン酸化能を測定する方法を確立し、重要な知見を得たものとして価値のある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。