



Title	硬骨魚類インスリンの一次構造、遺伝子構造および分泌動態に関する研究
Author(s)	安藤, 忠
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産学)
Dissertation Number	乙第5414号
Issue Date	1998-12-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3146386
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51573
Type	doctoral thesis
File Information	000000331577.pdf



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（水産学）	氏名	安藤 忠
学位論文題名			
硬骨魚類インスリンの一次構造、遺伝子構造および分泌動態に関する研究			
<p>硬骨魚類において、インスリンは栄養素、特にタンパク質・アミノ酸の同化制御に key hormone として深く関わっている。したがって、硬骨魚類においてインスリンの分泌動態、作用機序を明らかにすることは、栄養素の効率的な同化、ひいては成長を促進する技術を開発する上で重要である。そして、硬骨魚類のインスリンの一次構造は変異性が高く、魚種ごとに生物活性が異なることが予想され、さらに複数の分子種を有する魚種が認められるため、各魚種において各分子種の生化学的同定および分泌動態を調査することが必要である。</p> <p>以上のような背景を踏まえ、本研究はマツカワおよび数種の硬骨魚類においてインスリンの一次構造、遺伝子構造を解明し、複数のインスリン分子種の産生様式を明らかにした。さらに、マツカワインスリン酵素免疫測定法を新たに開発し、マツカワにおける2分子種のインスリンの分泌動態の一端を解明した。</p> <p>第1章では、マツカワはB鎖のN末端の伸長（Pyr-Ala）の有無のみが異なる2分子種のインスリンを有することを明らかにした。そして、5個体の脾抽出物を個体ごとに調製して、逆相HPLCに負荷したところ、インスリン-IおよびIIに対応するUV吸収ピークがすべての個体に認められ、両インスリンは非対</p>			

対立性遺伝子に支配されていることが示唆された。次に、PCRによりマツカワのゲノミック DNA からプレプロインスリン遺伝子を増幅し、塩基配列の解析を行った。その結果、単一の遺伝子が得られ、この遺伝子から演繹されたアミノ酸配列はインスリン-I および II に一致した。そして、この遺伝子の一部の塩基配列をプローブとしてゲノミックサザンブロットを行ったところ、3種の制限酵素のそれぞれにより消化されたゲノミック DNA において1本ずつのバンドが検出された。これらのことから、マツカワの2分子種のインスリンは単一のプレプロインスリンからシグナルペプチドのC末端の切断箇所が2箇所にわたるため生じると考えられた。

第2章では、マツカワにおける2分子種のインスリンの産生様式がマツカワに特異的なものか否かを、イシガレイ、カツオ、ホッケの3種からインスリンを精製するとともに、それらの一次構造を解析することにより検討した。

マツカワと系統的に遠縁であるイシガレイもB鎖のN末端の伸長 (Pyr-Ala) の有無のみが異なる2分子種のインスリンを有することが確認された。このことからカレイ類の多くの種がマツカワインスリン-I および II に対応する2分子種のインスリンを含むことが考えられた。

1個体のカツオからインスリンを精製したところ、インスリン-I および II が得られた。これらの間には50残基中11残基の配列置換が認められ、インスリン-IIのB鎖のN末端はインスリン-Iのそれに比較して1残基伸長していた。また、脊椎動物のインスリンのB鎖16残基目はレセプターと結合する領域を構成するため保存性が高く、ほとんどの種において Tyr であるが、カツオインスリン-Iのそれは Asn であった。さらに、3個体の臍抽出

物を個体ごとに逆相 H P L C に負荷したところ、インスリン-I および II に対応する U V 吸収ピークがすべての個体において確認された。これらのことから、カツオのインスリン-I と II は異なる 2 遺伝子座に支配された分子種であり、生物活性が異なることが予想された。

ホッケにおいても 2 分子種のインスリン (I 、 II) の存在が確認された。そして、両分子種間に 5 1 残基中 1 1 残基の置換、およびインスリン-I の A 鎖の N 末端に 3 残基の伸長が認められた。また、ホッケ インスリン-II とカツオ インスリン-II 間のアミノ酸配列の置換残基数は 4 残基であったが、ホッケ インスリン-I とカツオ インスリン-I のそれは 1 7 残基であった。さらに、5 個体のホッケから得られた臍抽出物を逆相 H P L C に個体ごとに負荷したところ、すべての個体においてインスリン-I および II に対応する U V 吸収ピークが認められた。これらのことは、ホッケにおいてもインスリン-I および II は異なる 2 遺伝子座に支配されていること、およびカツオとホッケが分岐した後にそれぞれの種においてインスリン-I 遺伝子はインスリン-II 遺伝子の重複により生じたことを示唆している。また、ホッケのインスリン-I と II 間において、レセプターと結合する領域を構成する部分にアミノ酸配列の置換および伸長が認められたことから、ホッケにおいてもカツオと同様にインスリン-I と II 間の生物活性が異なることが予想された。

第 3 章においては、ビオチン標識マツカワインスリン-II と抗マツカワインスリン-II 血清を使用した競合免疫測定法を開発した。そして、この測定法によりアミノ酸とグルコースのインスリン分泌誘導能を投与実験により比較したところ、アルギニンが強い誘導能を有することが示された。一方、哺乳類において強い誘

導能を示すグルコースの効果は弱かった。次に、アルギニン投与あるいは餌料給餌によりインスリン分泌を誘導したマツカワから血漿を採取し、逆相 H P L C に負荷して得られた各フラクションのインスリン量を測定した。その結果、インスリン免疫反応はアルギニン投与および餌料給餌のいずれの実験区においても 2 つの反応ピークとして認められ、それらの溶出時間はマツカワのインスリン-I と II のそれらにそれぞれが一致した。このことはマツカワにおいて 2 分子種のインスリンが成熟分子として血液中に分泌されること、およびアルギニンおよび摂餌後の栄養素の同化に両インスリンがともに作用することを示唆している。

本研究において、硬骨魚類のインスリンには (1) 単一のプレプロインスリンから成熟型へ変換される過程でシグナルペプチドの切断箇所が異なるために 2 分子が生じる様式と、(2) 2 遺伝子座の産物として 2 分子種が生じる様式の 2 つの分子多型の産生様式が存在することが明らかになった。そして、本研究において使用した 4 魚種すべてにおいて複数のインスリンの存在が明らかになったことから、さらに他の硬骨魚類においても未知のインスリン分子が存在する可能性が考えられる。そのため、栄養素代謝の研究対象種において複数のインスリンの存在可能性、分泌動態さらにそれらの間に機能分化があるか否かを検討することが必要であろう。そして、これらの知見およびインスリンの測定法は硬骨魚類、特に異体類においてインスリンを中心にした内分泌系制御による効率的なタンパク質・アミノ酸の同化制御技術開発の基礎として重要になると考えられる。

主 論 文

硬骨魚類インスリンの一次構造、遺伝子構造
および分泌動態に関する研究

安 藤 忠

平成10年

(2)

硬骨魚類インスリンの一次構造、遺伝子構造 および分泌動態に関する研究

安藤 忠

目次

緒言	1
第1章 マツカワ インスリンの精製と一次構造、遺伝子構造の解析	5
第1節 マツカワ インスリンの精製と一次構造の解析	6
第2節 マツカワ プレプロインスリン遺伝子の塩基配列解析	22
第2章 硬骨魚類 インスリンの一次構造と多型性	35
第1節 イシガレイ インスリンの一次構造と多型性	35
第2節 カツオ インスリンの一次構造と多型性	49
第3節 ホッケ インスリンの一次構造と多型性	62
第3章 マツカワ インスリン-I、IIの血液への分泌	75
第1節 マツカワ インスリンの酵素免疫測定法の開発	76
第2節 アミノ酸、グルコース、餌料のインスリン分泌誘導効果	85
第3節 インスリン-I、IIの血液への分泌	94
総合考察	100
摘要	114
謝辞	118
引用文献	119

緒言

動物に摂食された栄養素は消化により小分子に分解された後、腸から吸収され、血流を介して各細胞に吸収されて同化あるいは異化に使用される。この過程において、インスリンは血液にとけ込んだ糖やアミノ酸の濃度の上昇により分泌が誘導され、摂取した栄養素の同化にkey hormoneとして重要な役割を果たす。すなわち、インスリンは主に肝臓や筋肉において栄養素の異化過程を抑制する（葛谷ら, 1980; Mortimer and Mondon, 1970; Rannels *et al.*, 1975）とともに、血液中からの栄養素の取り込み、およびそれらの同化を促進する（Fulks *et al.*, 1975; 葛谷ら, 1980; Monier *et al.*, 1983）。特に、糖代謝においてインスリンは血糖値降下作用を持つ唯一のホルモンであるため、血糖濃度調整を担うkey hormoneとされる。そして、ヒトにおいてはインスリンが糖尿病と深い関わり合いを持つことから、その治療に応用することを目的として細胞の代謝から臨床応用の分野まできわめて多くの知見が蓄積されてきた。

一方、魚類においては、ウシインスリン投与により血漿のアミノ酸あるいはグルコースの濃度が顕著に低下すること（Furuichi and Yone, 1982, Murai and Ogata, 1990）、アミノ酸投与によりインスリンの分泌が誘導されること（Ince and Thope, 1977, Plisetskaya *et al.*, 1991）、インスリン投与によりアミノ酸のタンパク質への変換が促進されること（Inui and Ishioka, 1983, Plisetskaya *et al.*, 1984）が示されてきた。これらのことは魚類においても哺乳類と同様に栄養素の代謝、特に同化にインスリンが深く関わることを示している。しかしながら、魚類においてグルコースの投与によるインスリンの分泌誘導効果は哺乳類と異なり弱い（Ince and Thope, 1977）。そして、魚類の多くは炭水化物をほとんど摂取しない肉食種であり、糖利用能は一般的に低い（池田, 1979; 示野ら, 1977）。特にヒラメはタンパク質要求性が高く、炭水化物および脂肪の利用能がコイやニジマスに比較して低い（菊池ら,

1993; 菊池・古田, 1998)。以上のことは魚類、特に異体類において、糖よりもアミノ酸・タンパク質がエネルギー源として重要であること、さらにインスリンが糖代謝よりもアミノ酸代謝に深く関わっていることを示している。したがって、インスリンの分泌動態、作用機序を明らかにすることは、増養殖対象魚類における栄養素、特にタンパク質やアミノ酸の効率的な同化、ひいては成長を促進する技術を開発する上で重要である。

実際に、魚類において血中インスリン濃度と成長速度が相関関係を示すこと (Sundby *et al.*, 1991)、インスリン投与により成長が促進されること (Ludwig *et al.*, 1977; Ablett *et al.*, 1981a; Plisetskaya *et al.*, 1991) が示されてきた。これらのことはインスリンが成長に必要な物質の同化制御に深く関係することを示唆している。

しかし、これまでインスリンの生理学的研究が行われた魚類はサケ・マス類、ウナギなど少ない種に限られ、海産種を使用した研究はほとんど認められない。しかも、得られた知見が断片的であるため、さらに他の魚種、特に水産上重要な異体類、タイ類などの海産種においてインスリンの分泌動態、作用機序に関する研究を進展させることが必要である。

生理活性を有するタンパク質・ペプチド類の一次構造や遺伝子構造を解明することは、それらの生理的機能や作用機序を理解する上で必要不可欠である。これまで、20種以上の魚類 (魚上綱) においてインスリンのアミノ酸配列が報告されてきた。それらの配列は種間で変異性が高いため対象種ごとに構造を解析する必要がある。そして、カツオ (Yamamoto *et al.*, 1960, Kotaki, 1961; Kotaki, 1962; Kotaki *et al.*, 1962; Kotaki, 1963)、toadfish (Smith, 1966) などにはアミノ酸配列が置換している2分子種のインスリンが存在することが知られている。これらのインスリンの全アミノ酸配列は未解明であるが、各分子種間において機能分化が遂げられている可能性

が考えられる。そのため、研究対象種において複数のインスリンが存在するか否かを検討することはインスリンの作用機序を理解する上で重要な課題である。そして、硬骨魚類においては、ヌマガレイの1種、*Pleuronectes flesus* (*Platichthys flesus*のシノニム) のブロックマン小体が電気泳動法で移動度が異なる2つのインスリン様物質を含むことが報告されている (Jorgensen, 1960)。さらに*P. flesus*のブロックマン小体抽出物の逆相クロマトグラフィーを行った際に、インスリンが溶出された直後のフラクションに弱いインスリン様免疫反応が検出される (Conlon *et al.*, 1987)。これらの報告は異体類が2分子種のインスリンを有する可能性を示している。

異体類は、ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) をはじめ、マツカワ (*Verasper moseri*)、イシガレイ (*Kareius bicoloratus*)、マガレイ (*Limanda herzensteini*) など、水産上重要な種を多く含み、種苗放流および養殖が盛んに行われている。したがって、異体類の栄養素同化に重要な役割を果たすと考えられるインスリンの生化学的性質や分泌動態を解明することは、異体類において、より効率的な種苗養成技術を開発する上で重要な課題である。

近年、我が国の水産において異体類の中ではマツカワが特に注目されている。本種は市場価格がヒラメを上回ることが多く、高級魚として種苗生産、実験的養殖が行われている。そして、本種は低水温下で成長が早く、水温の低い北海道東岸で放流した全長10cmの稚魚が1年後に25cm程度に成長する (中川, 1992)。また、飼育環境下においても同様の成長速度を示す (中川, 1993)。このため、本種は寒冷海域における増養殖対象種として注目されている。その一方、資源量は極めて低い水準にあり、絶滅に瀕している (南, 1994)。したがって、マツカワにおける栄養素同化機構を解明することは、本種が低温で高い成長速度を示す機構を解明する上で重要であるとともに、資源量回復のためのより効率的な生産技術の確立に重要である。また、このことは現行の飼育条件下で成長速度が遅い異体類 (マガレイ、マコガレイなど) の成長を

改良する技術の確立にも応用できる可能性がある。さらに、本種は体表が厚い皮膚と異体類としてはやや大型の鱗に覆われているためハンドリングに強い耐性を有すること、人工餌料のみによる飼育が可能であること、採卵から種苗生産、親魚養成までが可能な完全養殖が実現化しつつあること、成熟までに最低2年以上必要とするため生理的状态が一定である期間が長いことなど、内分泌研究用魚種として好都合な特徴を合わせ持っている。

本研究は、マツカワと数種の硬骨魚類を使用し、栄養素同化のkey hormoneであるインスリンの一次構造、遺伝子構造を解明し、硬骨魚類において複数のインスリンが産生される様式を明らかにした。そして、新たにインスリンの測定法を開発し、マツカワにおける2分子種のインスリンの分泌動態の一端を解明した。本研究は3章から構成され、第1章では、マツカワ インスリンの一次構造と遺伝子構造を解析し、マツカワにおける2分子種のインスリンの産生様式を明らかにした。第2章では、マツカワ以外の硬骨魚のインスリンの一次構造を解析し、硬骨魚類における複数のインスリンの産生様式を検討した。第3章では、マツカワ インスリンに特異的な酵素免疫測定法を開発し、これを用いて血漿中に含まれるインスリン分子の同定を行い、マツカワの2分子種のインスリンが血液中に分泌されることを免疫学的に確認した。そして、最後にインスリンにおける分子多型の産生様式と存在意義、魚類におけるインスリンの生理作用、および異体類の栄養利用の特徴の3点に関して総合的に論議した。

第1章 マツカワ インスリンの精製と一次構造の解析

過去30年間に60種以上の脊椎動物からインスリンが精製され、その一次構造が決定されてきた。それらの種のほとんどはインスリンを1分子種のみ有するが、ラット (*Rattus norvegicus*; Smith, 1966)、マウス (*Mus musculus*; Markussen, 1971; Buenzli *et al.*, 1972)、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*; Shuldiner *et al.*, 1989a, b) は2分子種のインスリンを有する。このうち、アフリカツメガエルの胚において、2分子種をコードするインスリン遺伝子は異時的に発現することが知られている (Shuldiner *et al.*, 1991)。このことはアフリカツメガエルの2分子種のインスリンがそれぞれ機能分化していることを示唆している。

魚類においてインスリンの精製、一次構造の解析は20種以上について行われてきた。このうち、カツオ (*Katsuwonus pelamis*; Yamamoto *et al.*, 1960; Kotaki, 1961; Kotaki, 1962; Kotaki *et al.*, 1962; Kotaki, 1963)、toadfish (学名不記載; Smith, 1966)、ギンザメ (*Hydrolagus colliei*; Conlon and Thim, 1986)、ヘラチョウザメ (*Polyodon spathula*; Nguyen *et al.*, 1994) が複数の分子種のインスリンを有する。しかしながら、カツオとtoadfishのインスリンの全アミノ酸配列は未解明であり、さらに、この4魚種におけるインスリンの各分子種の産生様式、分子種間の機能分化の程度は未解明である。また、異体類においても2分子種のインスリンの存在が示唆されている (Jorgensen, 1960; Conlon *et al.*, 1987)。しかし、それらのうち一方の分子種の構造は未解明である。

本章では、マツカワ (*Verasper moseri*) において、第1節でインスリンの精製と一次構造解析、第2節でプレプロインスリン遺伝子の構造解析および複数のプレプロインスリン遺伝子の存在可能性の検討を行った。

第1節 マツカワ インスリンの精製と一次構造の解析

異体類のインスリンの一次構造の解析は、Conlon *et al.*(1987)がヌマガレイの一種 (*Platichthys flesus*) において行っている。彼らは*P. flesus*のブロックマン小体がインスリンに加え、インスリン様免疫活性を示す物質を含むことを報告した。しかしながら、この物質の構造解析は行われなかった。本節では、マツカワにおいてインスリンおよびインスリン様物質の精製および構造解析を行った。

材料と方法

*Sep-Pak*法によるマツカワのブロックマン小体抽出物の調製： マツカワ (N=4) から胆嚢上のブロックマン小体 (550mg) を摘出し、インスリン抽出まで冷凍保存した。冷凍されたブロックマン小体を10mlのエタノール/0.7M塩酸 (3:1, v/v) 中で細切後、テフロン-ガラスホモジナイザーでホモジナイズし、その後、4°Cで一晩スターラーにより攪拌した。次にホモジネートを4°Cで20分間、10,000×*g*で遠心分離して上清を得、減圧遠心濃縮によりこの上清からエタノールを除去した。再度、4°Cで20分間、10,000×*g*で遠心分離し、沈殿を除去した。次に得られた上清を、終濃度が0.1% (v/v) になるようにトリフルオロ酢酸 (TFA) を加えた後、0.1% TFAで平衡化した*Sep-Pak* C18カートリッジ (Millipore, Milford, MA) に負荷した。溶出に80% アセトニトリル/0.1% TFA (v/v) を使用して、得られた溶出液を500 μ lまで濃縮し、再度、終濃度が0.1% (v/v) になるようにTFAを加えた。

ブロックマン小体抽出物のエタノール/ジエチルエーテル沈殿法による調製： この調製法はCutfield *et al.* (1986) の方法に若干の変更を加えたものである。各ブロックマン小体 (N=5; 51–124 mg) を5倍量 (v/w) の2% HCl/90% エタノール (v/v) 中で

細切、ホモジナイズ後、ホモジネートを4℃で一晩攪拌し、2℃で20分間、10,000×gで遠心した。生じた沈殿は同じく5倍量の5% HCl/75% エタノール (v/v) 中でホモジナイズし、同条件下で6時間攪拌した。次に10,000×g、20分間、2℃で遠心分離後、二つの上清を混合し、アンモニア水を攪拌しながら沈殿が生じるまで加えた。4℃で20分間インキュベート後、沈殿は2℃で20分間、10,000×gで遠心分離によって除去された。次に得られた上清に使用したブロックマン小体の1/12倍量 (v/w) の6N HCl、同じく1/25倍量 (v/w) の2M 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.4)、さらに同じく1/30倍量 (v/w) の3.4M NaCl、上清の2.2倍容のエタノール、同じく4倍容のジエチルエーテルを加えた。4℃で一晩インキュベート後、2℃で20分間、3,000×gで遠心分離し、沈殿 (エタノール/ジエチルエーテル沈殿) を風乾し、3M酢酸に溶解した。

マツカワ インスリンの逆相クロマトグラフィーによる精製： ブロックマン小体抽出物をODS-120Tカラム (2.0×150mm、東ソー、東京) を使用した逆相クロマトグラフィーに負荷した。なお、溶出液として0.1% TFA (v/v) と0.1% TFA/50% アセトニトリル (v/v) を使用し、カラムチャンバー温度を30℃、流速を100μl/分に調整し、115分間の直線濃度勾配により溶出した。そして、溶出されたフラクションを集め、各フラクションの成分について質量分析を行った。得られたフラクションのうち、*m/z* 6000付近を示したものを減圧遠心濃縮により100μlまで濃縮し、さらにμRPC C2/C18 SCカラム (2.0×100mm、Pharmacia、Uppsala、Sweden) を使用した逆相クロマトグラフィーにより精製した。溶出液は上記のものと同じであるが、アセトニトリル濃度を5分間で22.5% (v/v) まで、次の70分で42.5% (v/v) まで、さらに次の10分間で50% (v/v) まで上昇させた。溶出は280nmの吸光度でモニターされ、SMARTシステム (Pharmacia) をHPLC装置として使用した。

インスリン酵素免疫測定法： 得られたフラクションのインスリン様免疫活性は抗ウシインスリン血清と西洋ワサビペルオキシダーゼ/ウシインスリン複合体を使用した競合酵素免疫測定法により測定された (Andoh and Nagasawa, 1997)。

構造解析： 質量分析により m/z 6000付近を示したフラクション中の成分を次の方法により還元カルボキシメチル化した。すなわち、フラクションを減圧遠心濃縮により50 μ lまで濃縮し、400 μ lの7M グアニジン塩酸塩、10mM エチレンジアミン四酢酸、20mM ジチオスレイトールを含む500mM Tris-HCl (pH 8.8)と混合し、37°Cで2時間インキュベートし、さらに33 μ lの20mM ヨード酢酸ナトリウムと混合して同じく37°Cで30分間インキュベートした。この操作により生じたインスリンA鎖とB鎖をResource RPC 1mlカラム (6.4 \times 30mm, Pharmacia) を使用した逆相クロマトグラフィーにより分離した。溶出液には0.1% TFA (v/v) と0.1% TFA/100% イソプロパノール (v/v) を使用し、30°Cで流速を500 μ l/分とし、33分間の直線濃度勾配で溶出した。アミノ酸配列解析はプロテインシーケンサー (ABI476A, Perkin Elmer, Norwalk, CT) を用いて行った。質量分析は飛行時間測定型の質量分析装置、Kompact MALDI IあるいはIII (島津製作所、京都) により正イオン、直線測定モードでマトリックスとして2-(4-hydroxyphenyl-azo)benzoic acidを使用して測定した。

ピログルタメートアミノペプチダーゼによる消化： Sカルボキシメチル化インスリンB鎖を含むフラクションを10 μ lまで減圧遠心濃縮し、1mUのPfuピログルタメートアミノペプチダーゼ (宝酒造、大津)、100 μ lの1mM エチレンジアミン四酢酸および10mM ジチオスレイトールを含む50mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を加えて50°Cで48時間インキュベートした。消化後、終濃度0.1% TFAを加えて μ RPC C2/C18 SCカラムを使用した逆相クロマトグラフィーにより消化物を精製した。溶出液には0.1% TFA (v/v) と

0.1% TFA/50% アセトニトリル (v/v) を使用し、30°Cで流速は100 μ l/分、100分間の直線濃度勾配で溶出した。

結果

マツカワ インスリンの精製： Sep-Pak法により調製されたブロックマン小体抽出物のODS-120Tカラムでの溶出パターンを図1-1-1に示した。77~79分のフラクションは抗ウシインスリン血清を使用した酵素免疫測定法 (Andoh and Nagasawa, 1997) においてインスリン様免疫反応を示した。そこでこのフラクションを μ RPC C2/C18 SCカラムによりさらに精製した。その結果、二つの卓越する紫外線吸収ピークが認められ、それぞれのピークをマツカワ インスリン (I、II) と仮定した (図1-1-2)。収量はブタ インスリンの276nmでの吸光度が1.06であることを便宜的に使用して換算すると、それぞれ5 nmolであった。次に、インスリン-IあるいはIIを含むフラクションの成分について、還元カルボキシメチル化処理を行い、逆相クロマトグラフィーによりA、B鎖を分離した (図 1-1-3)。どちらのフラクションにおいてもウシ インスリンのAあるいはB鎖の溶出時間付近に紫外線吸収ピークが認められた。

マツカワ インスリンの生化学的特徴： インスリン-I、IIのA鎖は21残基であり、インスリン-IのB鎖は30残基であった (表1-1-1)。これらのアミノ酸配列は他の硬骨魚類のインスリンと高い相同性を示し (図1-1-4)、マツカワのインスリンであると結論された。そして、質量分析の実測値とアミノ酸配列から予測された分子量はよく一致し、得られたアミノ酸配列が確かめられた (表1-1-2)。しかし、インスリン-IIのB鎖については有意なphenylthiohydantoin-アミノ酸 (PTH-アミノ酸) が各エドマン分解サイクルにおいて認められずN末端がブロックされていると考えられた。そこでインスリン-IIのB鎖についてPfuピログルタメートアミノペプチダーゼ消化により

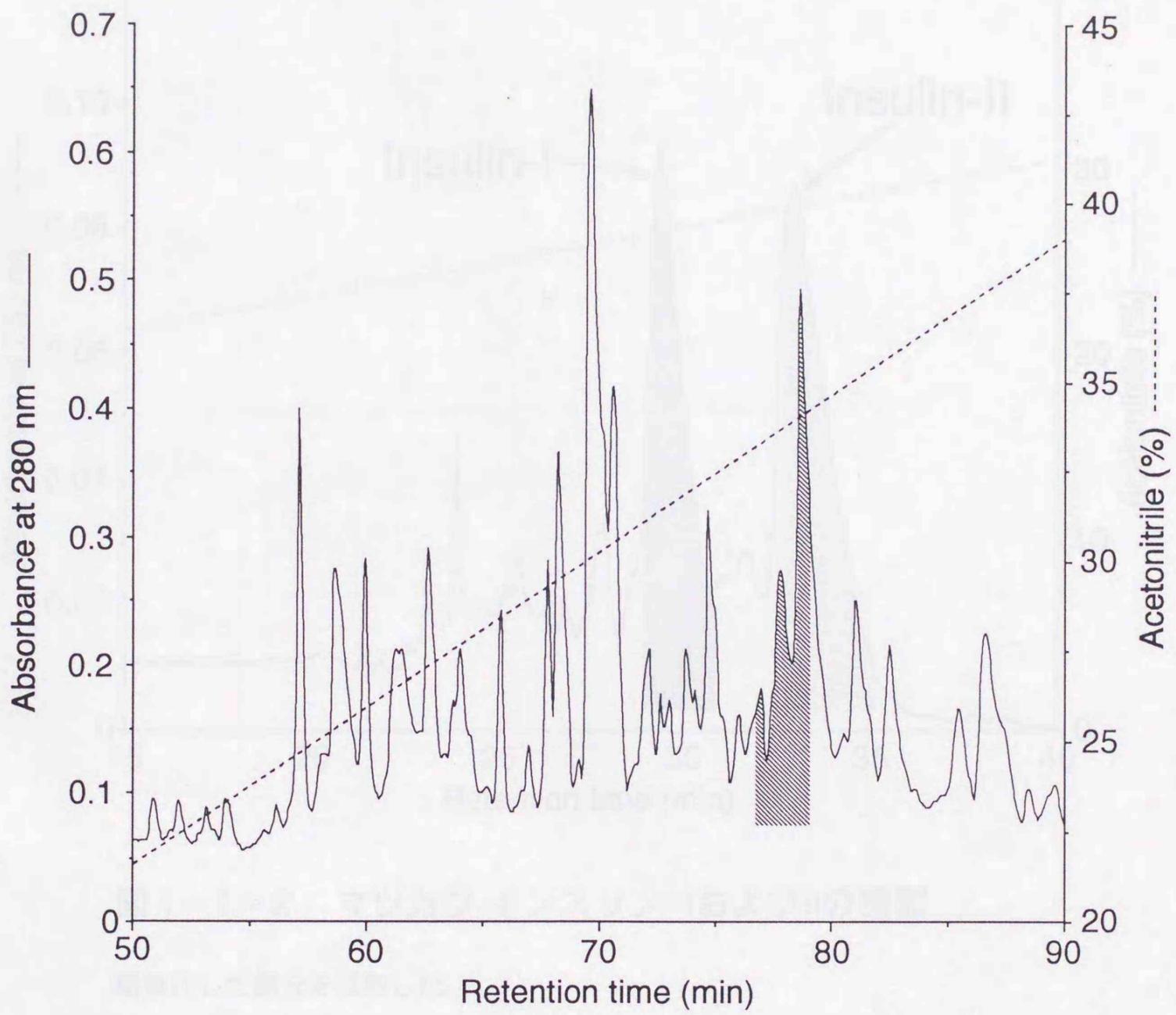


図 1-1-1 マツカワ ブロックマン小体抽出物の逆相クロマトグラフィー

Sep-Pak法により抽出物を調製し、網かけした部分を採取して次の精製段階で使用した。

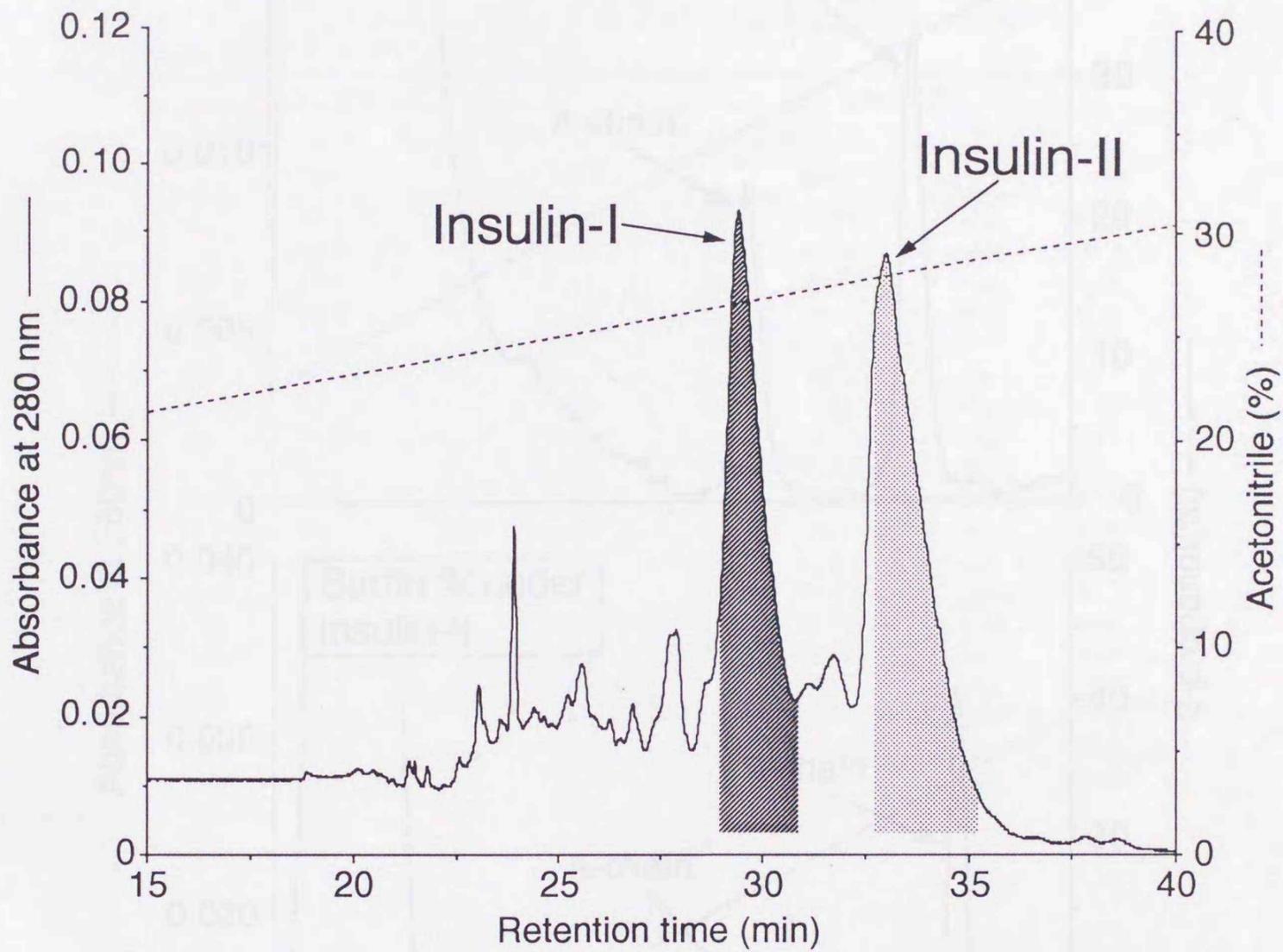


図 1-1-2 マツカワ インスリン-IおよびIIの精製

網掛けした部分を採取した。

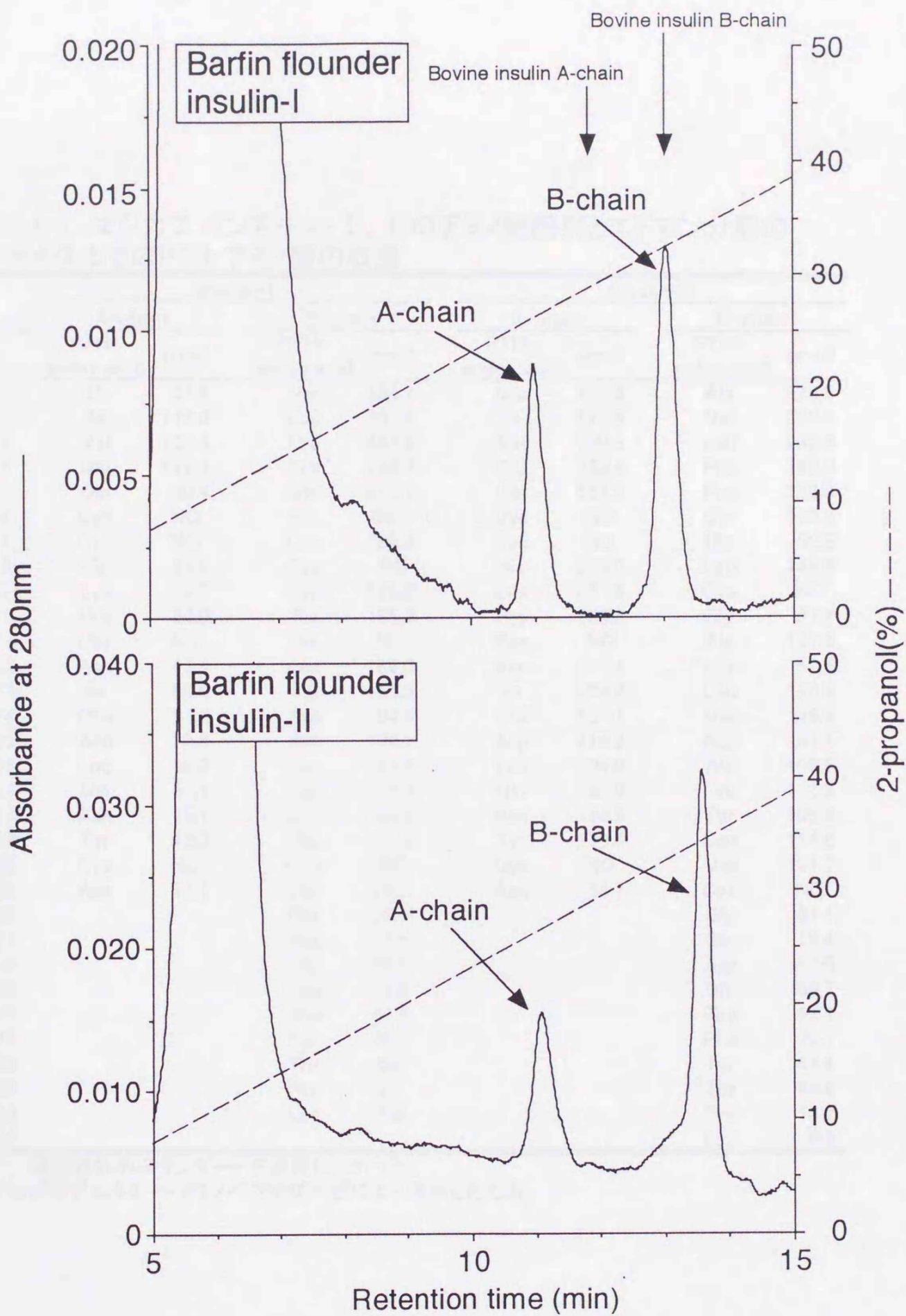


図 1-1-3 還元カルボキシメチル化処理後のマツカワ インスリン-IおよびIIのA、B鎖の分離

各インスリンの両鎖についてアミノ酸配列解析を行った。カルボキシメチル化したウシインスリンのA、B鎖の溶出時間を矢印で示した。

表1-1-1 マツカワ インスリン-I、II のアミノ酸配列とエドマン分解の各サイクルでのPTH-アミノ酸の収量

Cycle	Insulin-I				Insulin-II			
	A-chain		B-chain		A-chain		B-chain*	
	PTH-amino acid	pmol						
1	Gly	63.9	Val	330.7	Gly	454.8	Ala	225.5
2	Ile	118.3	Leu	301.0	Ile	679.4	Val	239.4
3	Val	122.5	Pro	247.2	Val	790.8	Leu	233.6
4	Glu	122.2	Pro	185.7	Glu	768.6	Pro	165.0
5	Gln	80.4	Gln	253.7	Gln	634.2	Pro	128.0
6	Cys	NQ	His	89.3	Cys	NQ	Gln	123.3
7	Cys	NQ	Leu	186.9	Cys	NQ	His	52.5
8	His	33.6	Cys	NQ	His	278.0	Leu	149.9
9	Lys	78.7	Gly	122.0	Lys	411.6	Cys	NQ
10	Pro	50.0	Ala	165.9	Pro	225.8	Gly	97.4
11	Cys	NQ	His	78.5	Cys	NQ	Ala	137.6
12	Asn	48.5	Leu	155.0	Asn	217.4	His	51.5
13	Ile	60.8	Val	166.5	Ile	204.2	Leu	128.9
14	Phe	63.6	Asp	104.9	Phe	237.1	Val	128.6
15	Asp	39.3	Ala	133.1	Asp	216.8	Asp	61.1
16	Leu	55.2	Leu	114.6	Leu	204.0	Ala	109.5
17	Gln	37.1	Tyr	114.2	Gln	165.0	Leu	113.2
18	Asn	35.1	Leu	122.5	Asn	148.2	Tyr	105.6
19	Tyr	42.3	Val	120.2	Tyr	170.4	Leu	114.5
20	Cys	NQ	Cys	NQ	Cys	NQ	Val	101.5
21	Asn	12.7	Gly	58.6	Asn	54.7	Cys	NQ
22			Glu	34.0			Gly	61.1
23			Arg	54.5			Glu	19.4
24			Gly	38.6			Arg	62.5
25			Phe	34.8			Gly	52.7
26			Phe	41.5			Phe	63.7
27			Tyr	20.0			Phe	74.7
28			Thr	6.0			Tyr	44.4
29			Pro	3.1			Thr	12.6
30			Lys	1.8			Pro	13.7
31							Lys	6.9

NQ: 濃度既知のスタンダードを使用しなかった。

*: *Pfu*ピログルタメートアミノペプチダーゼにより消化したものの。

A-chain		1	5	10	15	20
Barfin flounder-I ⁽¹⁾		G	I	V	E	Q
Barfin flounder-II ⁽¹⁾		-----				
Flounder ⁽²⁾		-----				
Anglerfish ⁽³⁾		-----R-----				
Carp ⁽⁴⁾		-----E-----				
Chum salmon ⁽⁵⁾		-----				
Ray ⁽⁶⁾		H		N	T	S
Hagfish ⁽⁷⁾				R	S	Y
Lamprey ⁽⁸⁾				R	K	S

B-chain		1	5	10	15	20	25	30
Barfin flounder-I ⁽¹⁾		V	L	P	P	Q	H	L
Barfin flounder-II ⁽¹⁾	pQA	-----						
Flounder ⁽²⁾		-V-----						
Anglerfish ⁽³⁾		A	A		S		D	N
Carp ⁽⁴⁾		N	A	G	A	N	S	E
Chum salmon ⁽⁵⁾		A	A	A		S		K
Ray ⁽⁶⁾		L	P	S			E	F
Hagfish ⁽⁷⁾		R	T	T	G		K	D
Lamprey ⁽⁸⁾		S	A	L	T	G	A	G

図 1-1-4 マツカワ インスリン-I、IIのアミノ酸配列と他魚種のインスリンとの比較

pQはピログルタミン酸を示す。-はマツカワ インスリン-IIに一致した配列を示す。各配列は次の文献から引用した。(1) *Verasper moseri*, 本研究; (2) *Platichthys flesus*, Conlon et al. (1987); (3) *Lophius amaricanus*, Neuman et al. (1969); (4) *Cyprinus carpio*, Makower et al. (1982); (5) *Oncorhynchus keta*, Rusakov et al. (1990); (6) *Torpedo marmorata*, Conlon and Thim (1986); (7) *Myxine glutinosa*, Peterson and Steiner (1975); (8) *Lampetra fluviatilis*, Conlon et al. (1995)。

表1-1-2 マツカワインスリンのA鎖、B鎖の質量分析

	Insulin-I		Insulin-II	
	A-chain	B-chain	A-chain	B-chain undigested** digested**
(M+H) ⁺ measured	2672	3457	2674	3639
(M+H) ⁺ expected	2674	3461	2674	3644

* : ピログルタメートアミノペプチダーゼ未消化物

** : ピログルタメートアミノペプチダーゼ消化物

デブロッキングを行った。消化後、逆相クロマトグラフィーにより消化物を精製したところ、未消化のインスリン-IIのB鎖が溶出される溶出時間(63分)に紫外線吸収は認められず、これよりも早く溶出される紫外線吸収ピーク(59分)が認められたため(図1-1-5)、*Pfu*ピログルタメートアミノペプチダーゼにより完全に消化されたと判断した。このピークの成分についてアミノ酸配列解析を行ったところ、31残基から構成される配列が得られ、N末端のAla以外はインスリン-IのB鎖の配列と一致した(表1-1-1)。そして、インスリン-IIのB鎖の(M+H)⁺は*Pfu*ピログルタメートアミノペプチダーゼ消化後に112 mass units 減少した(表1-1-2)。この差はピログルタミン酸(Pyr)の質量数にほぼ一致する。これらの結果はインスリン-IIのB鎖N末端はピログルタミン酸であることを示している。さらに、インスリン-IIのB鎖の質量分析による実測値とアミノ酸配列解析から予測された分子量はよく一致し、得られたアミノ酸配列が確かめられた(表1-1-2)。

図1-1-4において、決定されたマツカワ インスリン-I、IIのアミノ酸配列を他魚種のインスリンと比較した。マツカワ インスリン-IIはB鎖のN末端のPyr-Alaのみがマツカワ インスリン-Iと異なっていた。

各個体におけるインスリン-IおよびIIの産生： 5個体のマツカワからエタノール/ジエチルエーテル沈殿法により個体ごとに調製されたブロックマン小体抽出物についてODS-120Tカラムを使用した逆相クロマトグラフィーによって分析した結果、すべての抽出物の紫外線吸収パターンは一致した。そのうちの3個体のものを図1-1-6に示した。マツカワ インスリン-I、IIが溶出される溶出時間(78-80分)付近に二つの紫外線吸収ピーク(79分および80分)が認められた。5個体のうち1個体についてこれら二つの紫外線吸収ピークを含むフラクションの成分について質量分析を行ったところ、(M+H)⁺ はそれぞれが*m/z* 5779および*m/z* 5964であった。これらの値はインスリン-I

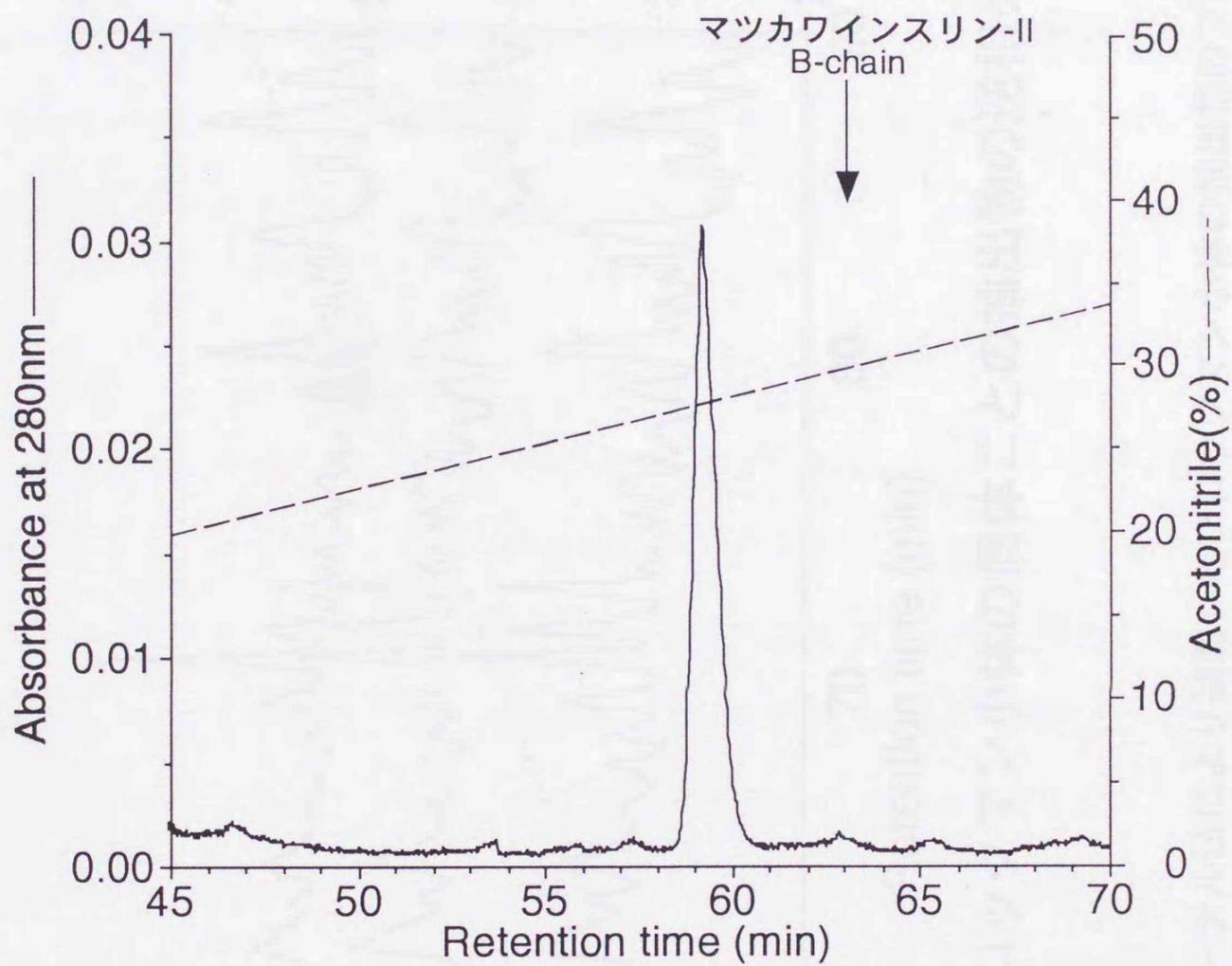


図 1-1-5 *Pfu*ピログルタメートアミノペプチダーゼで消化されたマツカワインスリン-IIのB鎖の逆相クロマトグラフィーによる精製

消化前のマツカワインスリン-IIの溶出時間を矢印で示した。

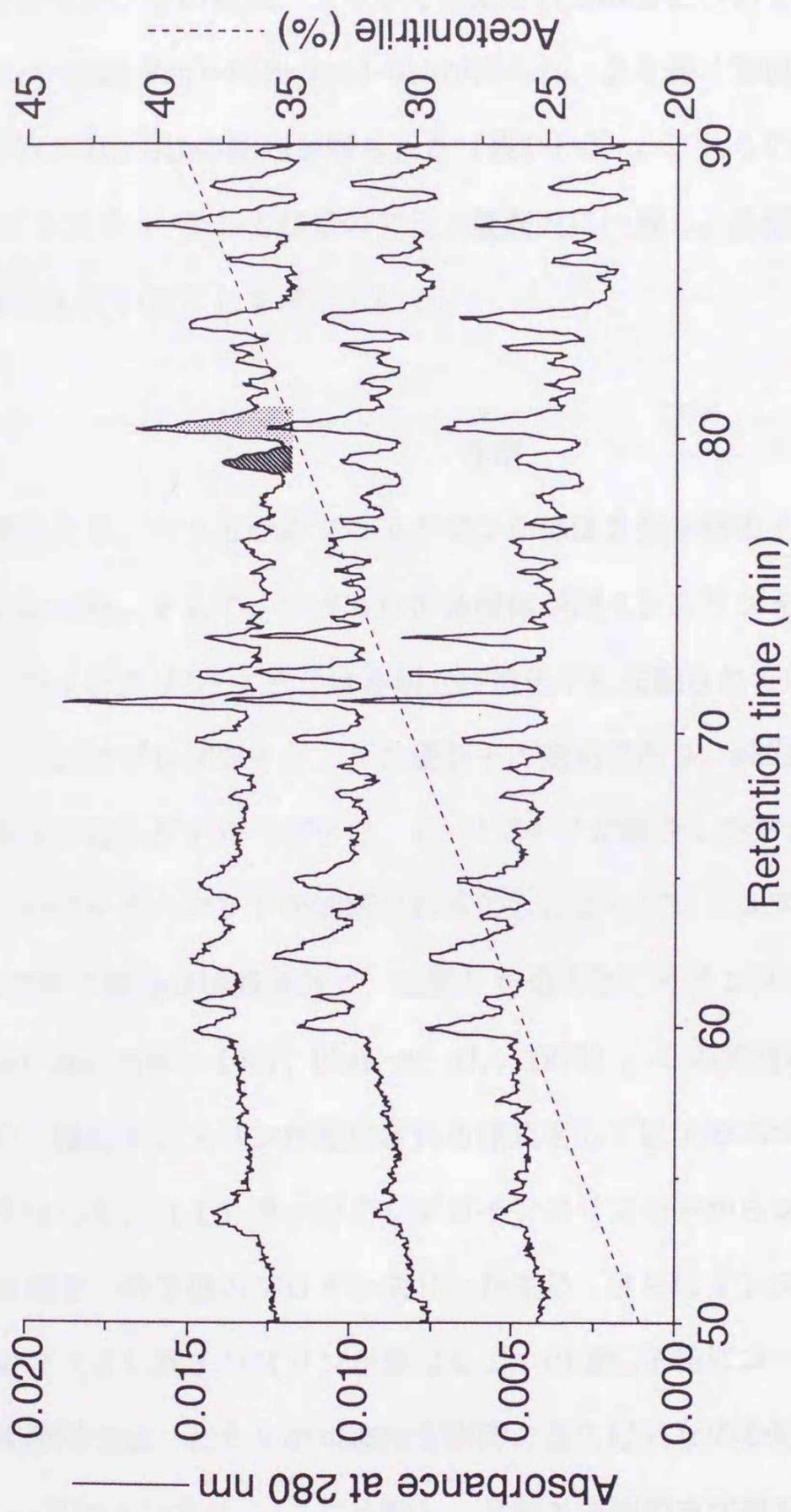


図1-1-6 マツカワのブロックマン小体の個体ごとの抽出物の逆相クロマト
グラフィ

個体ごとにエタノール/ジエチルエーテル法により調製したブロックマン小体の抽出物のプロファイルを示した。アミノ酸配列解析および質量分析に使用した部分を網かけした。なお、プロファイルは解析した5個体のうち3個体分について示した。

およびIIの予測値の m/z 5782および m/z 5965とよく一致した。さらに各紫外線吸収ピークの成分について、還元カルボキシメチル化処理を行わずに5残基目までアミノ酸配列分析を行った。その結果、より早く溶出された成分については(Gly,Val)-(Ile,Leu)-(Val,Pro)-(Glu,Pro)-Glnが得られ、より遅く溶出された成分についてはGly-Ile-Val-Glu-Glnの配列が得られた(表1-1-3)。これらの分析結果はそれぞれマツカワ インスリン-IおよびIIのアミノ酸配列に一致し、各個体がインスリン-IおよびIIを産生していることを示している。

考察

本研究により、マツカワのブロックマン小体は2分子種のインスリンを含むことが明らかになった。そして、マツカワの各個体が両インスリンを産生していることから、マツカワのインスリン-IとIIは非対立性遺伝子に支配されていると考えられる。

インスリンはプレプロインスリン遺伝子の産物であり、mRNAから翻訳された時点ではインスリンにシグナルペプチド、C-ペプチドが結合したプレプロインスリンである。その後、シグナルペプチドが切断されることによりプロインスリンに変換され、さらにC-ペプチド部分が切断されて、成熟した分子としてインスリンが産生される

(Steiner and Oyer, 1967; Chan *et al.*, 1976)。この知見に従えばマツカワにおいて、2分子種のインスリンが産生される様式として以下の二つが可能性として考えられる。すなわち、(1)単一のプレプロインスリン分子からシグナルペプチドが切断される段階で二分子種のプロインスリンが生じ、さらにインスリンに変換される可能性、および(2)両インスリンが異なる二つの遺伝子座にコードされている可能性である。現段階では、どちらの可能性が実際の産生様式なのか結論できない。また、インスリン-IIはインスリン-Iに比較し、B鎖N末端のみが異なるため、インスリン-IIは中間産物であり成熟分子はインスリン-Iのみである可能性も考えられる。これらの

表1-1-3 個体ごとに精製したインスリンのN末端のアミノ酸配列とエドマン分解の各サイクルでのPTH-アミノ酸の収量

Cycle	Fraction of 79-80 min		Fraction of 80-81 min	
	PTH-Amino acid	pmol	PTH-Amino acid	pmol
1	Gly	71.8	Gly	17.4
	Val	100.2		
2	Ile	106.4	Ile	18.2
	Leu	92.9		
3	Val	101	Val	16.7
	Pro	74.9		
4	Glu	70.9	Glu	10.4
	Pro	64.5		
5	Gln	119	Gln	12.3

ことは第1章第2節および第3章第3節で検討する。

これまで脊椎動物においてインスリンの一次構造は60種以上について報告されてきたが、N末端がピログルタミン酸であるインスリンは報告がなく、マツカワのインスリン-IIは新規のインスリンである。しかしながら、インスリンスーパーファミリーに属するリラキシンはラットにおいてA鎖N末端が (Marie *et al.*, 1981)、ブタ (James *et al.*, 1977; Schwabe *et al.*, 1977) およびサメの一種 (*Odontaspis taurus*; Gowan *et al.*, 1981) においてはB鎖N末端がピログルタミン酸である。また、カイコ (*Bombyx mori*) のボンビキシンのB鎖 (Nagasawa *et al.*, 1990)、およびモノアラガイ (*Lymnaea stagnalis*) のMolluscan insulin related peptide (MIP; Li *et al.*, 1992a, b) のA、B両鎖においてもピログルタミン酸である。ボンビキシンとMIPは無脊椎動物のインスリン様ペプチドである。Li *et al.* (1992a)はMIPのA鎖において長期間の保存がN末端のグルタミンのピログルタミン酸化を引き起こすことを報告している。また、生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンおよび甲状腺刺激ホルモン放出ホルモンのピログルタミン酸は下垂体に含まれるグルタミルシクラーゼによる消化によりグルタミンから変換される (Fischer and Spiess, 1987)。現段階では、マツカワインスリン-IIのピログルタミン酸がグルタミンからどのような過程を経て変換されるのかは不明である。

Geiger and Langer (1973) は des-(Phe-Val)^{B1-B2}-insulin と des-(Phe-Val-Asn)^{B1-B3}-[Pyr^{B4}]insulin の血糖降下作用がウサギにおいて95~100%あるいは70%の活性を示すことを報告している。Pullen *et al.* (1976) はX線による三次構造解析によりB鎖N末端はインスリンレセプターと相互作用する部位 (B23-26) とは反対側に位置することを示した。また、Hoffman *et al.* (1977) はB鎖N末端にビオチンを修飾したヒトインスリンが脂肪細胞を使用したバイオアッセイで通常インスリンに比較して、94±9.6%の活性を示すことを報告している。さらに、B鎖のN末端がヒトインスリン

に比較して5残基伸張しているヤツメウナギ (*Lampetra fluviatilis*) のインスリンは [3-¹²⁵I]iodotyrosine-A14]ヒトインスリンとヒトインスリンレセプターを使用し、レセプターアッセイでブタインスリンと同等の結合阻害効果を示す (Conlon *et al.*, 1995)。これらのことは、インスリンレセプターと結合する際にB鎖のN末端が重要ではないことを示唆している。さらに、このことは硬骨魚類のインスリンにおいてアミノ酸の置換がB鎖のN末端付近に集中していることから支持される (図1-1-4)。したがって、マツカワのインスリン-I とIIは同程度の生物活性を有することが予想される。

第1段階目の逆相クロマトグラフィーではインスリン-IIを含むと考えられる溶出液をすべて採取しなかった。紫外線吸光度から判断すると、第1段階目の逆相クロマトグラフィーにおける実際のインスリン-IIの収量はインスリン-Iのその2倍程度と推定される。さらにインスリン-IとIIのこの収量比はSep-Pak法(第2章)による精製法においても同程度である(安藤・長澤、未発表)。これらのことは、ブロックマン小体に含まれるインスリンのうち、多くがインスリン-IIであり、血中のインスリンは、インスリン-IIを高いレベルで含むことが予想される。このことは第3章で検討する。

第2節 マツカワプレプロインスリン遺伝子の塩基配列解析

前節ではマツカワがB鎖N末端の2残基のアミノ酸配列が異なる2分子種のインスリンを有することを示した。そして、このうちの1分子種はB鎖のN末端がこれまで脊椎動物のインスリンで報告例がないピログルタミン酸によりブロックされていた。このような2分子種のインスリンが産生される様式としては、(1)単一のプレプロ

インスリン分子からシグナルペプチドが切断される段階で二分子種のプロインスリンが生じ、さらにそれぞれがインスリンに変換される可能性、(2) 両インスリンが異なる二つの遺伝子座にコードされている可能性が考えられた。本節では、マツカワにおいてプレプロインスリン遺伝子の塩基配列解析を行い、さらにゲノム中において複数のプレプロインスリン遺伝子が存在するか否か検討した。

材料と方法

プレプロインスリン遺伝子の塩基配列解析: マツカワ (体重: 400g) の肝臓 (0.1g) からcatrimox-14 (Iowa Biotechnology Corp., Oakdate, IA) あるいはGenとるくん (宝酒造) を使用してゲノミックDNAを得た。そしてこのゲノミックDNAをtemplateにして3段階から成るpolymerase chain reaction (PCR)によりプレプロインスリン遺伝子領域のDNAを特異的に増幅させた。第1段階目には、魚種間で保存的なアミノ酸配列部分であるB鎖の15~20残基目およびA鎖の1~6残基目に対応するプライマー、Pr-1およびPr-2 (表1-2-1) を使用した。PCRの反応条件は、94°Cで30秒、50°Cで30秒、72°Cで60秒とし、遺伝子増幅装置 model 9600 (Perkin Elmer) を使用して30サイクル繰り返した。増幅されたDNAはアガロース電気泳動を行い、バンドを切り出し溶出した後、pT7Blue T-Vector (Novagen Inc., Madison, WI)にサブクローニングした。そして、DNA断片の挿入が確認されたcloneの挿入DNAの両鎖の塩基配列をdideoxytermination法 (Sanger *et al.*, 1977) により決定した。

第2段階目には、第1段階で決定した塩基配列から設計したプライマー (Pr-3~8; 表1-2-1)、ゲノミックDNAおよびLA PCR *in vitro* cloning kit (宝酒造) を使用したnested PCRにより、インスリンB鎖のN末端付近部分あるいはA鎖のC末端付近部分をコードするDNA部分を増幅させた。なお、インスリンB鎖をコードするDNAの上流側領域の増幅にはゲノミックDNAをHindIIIあるいはXba Iで切断した後にキット付属

表 1-2-1 PCRに使用したプライマーの塩基配列とそれらに対応する領域、アミノ酸配列、ゲノミックDNAでの位置および伸長方向

プライマー	塩基配列	PCR段階	対応する領域	対応するアミノ酸配列	ゲノミックDNAでの位置(bp)**	伸長方向
Pr-1	5'-CGCCCTCTATCTGGT(CG)TG-3'	1st	B鎖	DALYLVC	440-457	下流
Pr-2	5'-GCACTGCTCTAC(AG)AT(AG)-3'	1st	A鎖	GIVEQC	709-725	上流
Pr-3	5'-TGCCTCGCTTCACCATCA-3'	2nd(Eco RI)	C-ペプチド	EMMKRGI	692-711	上流
Pr-4	5'-TTGGGGGTGTAGAAAGCC-3'	2nd(Eco RI)	B鎖	GFFYTPK	468-487	上流
Pr-5	5'-GAGACGTGGACCCCTCTGTG-3'	2nd(Xba I)	C-ペプチド	RDVDP LL	490-509	下流
Pr-6	5'-GATGATGGTGAAGCGAGGCA-3'	2nd(Xba I)	C-ペプチド	EMMKRGI	692-711	下流
Pr-7	5'-TGCAGGTCAAAGATGTTACA-3'	2nd(Hind III)	A鎖	CNIFDLQ	738-757	上流
Pr-8	5'-CAGCACTGCTCCACGATGCC-3'	2nd(Hind III)	A鎖	GIVEQC	708-724	上流
Pr-9	5'-TTTCAGTTTTCTCCAAGAT-3'	3rd	シグナルペプチド	-----M	309-329	下流
Pr-10	5'-TCAGTTGCAGTAGTTCTGCA-3'	3rd	A鎖	LQNYCN*	754-773	上流
Pr-11	5'-ATGGGGCGCTGTGGCTCCAGTCT-3'	cDNA	シグナルペプチド	MAALWLQS	327-350	下流
Pr-12	5'-CTAACGGACTCCGGGCTGAGCGGC-3'	cDNA	-	-----	776-799	上流
Pr-13	5'-TCTCTGCTCGTCCCTAATGCTCGTG-3'	cDNA	シグナルペプチド	SLLV LMLV	354-377	下流
Pr-14	5'-TCAGTTGCAGTAGTTCTGCAGGTC-3'	cDNA	A鎖	DLQNYCN*	750-773	上流

*: 終止コドン

: アミノ酸配列に対応しない

** : 図 1-2-1 を参照

のカセット配列を持つDNAをライゲーションしたDNAを使用した。また、A鎖をコードするDNAの下流側領域の増幅にはゲノミックDNAを *EcoR* I で消化し、上述と同様にカセットDNAをライゲーションしたDNAを使用した。PCRの反応条件は、94°Cで30秒、50°Cで120秒、72°Cで60秒で30回の繰り返しとした。塩基配列の決定は第1段階と同様に行った。

第3段階として、第2段階で決定したB鎖のN末端付近およびA鎖のC末端付近をコードする塩基配列を持ったプライマー (Pr-9, Pr-10; 表1-2-1) を使用し、94°Cで30秒、50°Cで120秒、72°Cで60秒でPCRを30サイクル繰り返し行った。増幅されたDNAは第1段階で述べたと同様にダイレクトシーケンシングを行い、塩基配列を決定した。

プレプロインスリンmRNAの塩基配列解析: マツカワ (体重: 400g) のブロックマン小体を液体窒素で凍結した後、RNA抽出用キット (RNeasy; Quiagen, Hilden, Germany) を用いてtotal RNAを抽出した。次に得られたtotal RNAをtemplateとして逆転写酵素 (M-MLV reverse transcriptase, Promega Inc., Madison, WI) により42°C、1時間反応させ、cDNAライブラリーを作製した。次にこれをtemplateとして2回のPCRから成るnested PCRを行い、シグナルペプチドの中間部分からA鎖のC末端までをコードする領域を増幅した。PCRの条件は、94°Cで30秒、50°Cで120秒、72°Cで60秒で30サイクルの繰り返しとした。使用したプライマー (Pr-11~14) を表1-2-1に示した。増幅された産物はベクター (pGEM T-Vector, Promega) によりサブクローニングし、上述の方法により塩基配列を決定した。

サザンブロット解析: マツカワ (体重: 400g) の肝臓からゲノミックDNAを抽出し、*EcoR* I、*Bam*HI、*Hind*IIIの3制限酵素の各々で37°Cで一晩消化し、それらのうちの各10μgを0.8%アガロースゲルによる電気泳動に供した。次にDNAをゲルからナイロン膜

(Qiabrane; Qiagen) に転写し、標識プローブと55°Cで一晩、0.5M NaClと4% Blocking reagent (Amersham, Buckinghamshire, UK)を含む AlkPhos Direct hybridization buffer (Amersham) 中でハイブリダイズさせた。なお、標識プローブにはプライマー、Pr-11~14 (表1-2-1) を使用したnested PCRによりゲノミックDNAから増幅されたDNAにAlkphos Direct labelling reagent (Amersham) を使用してアルカリフォスファターゼを標識したものをを使用した。洗浄は2M 尿素、0.1% SDS、150mM NaCl、10mM MgCl₂、0.2% blocking reagent (Amersham) を含む50mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を使用して60°C、10分間、2回、次に室温で2M NaClを含む1M Tris緩衝液 (pH 10.0) で5分間、1回行った。検出は化学発光試薬 (CDP-Star, Amersham) と発光検出フィルム (Hyperfilm-ECL, Amersham) により行った。

結果

マツカワ プレプロインスリン遺伝子の塩基配列解析: ゲノミックDNAから第1段階目のPCRによりB鎖のC末端とC-ペプチドをコードする領域を含む0.28kbのDNAが増幅された。第2段階目のPCRでは、*Xba* I で消化されたゲノミックDNAから0.54kbのシグナルペプチドおよびその上流域、B鎖のN末端部を含む領域のDNAが増幅された。*Hind*III で消化されたゲノミックDNAから同じくシグナルペプチドおよびその上流域、B鎖N末端部を含む領域の0.50kbのDNAが増幅された。*Eco*R I で消化されたゲノミックDNAからはA鎖およびその下流域の0.25kbのDNAが増幅された。そして、第三段階目のPCRでシグナルペプチドのN末端からA鎖のC末端をコードする0.48kbのDNAが増幅された。この段階で決定された配列が第一、第二段階の塩基配列と完全に一致したことから、得られた5遺伝子断片の配列が1遺伝子に由来する塩基配列であり、マツカワ プレプロインスリン遺伝子の全長の塩基配列が決定されたと結論した (図1-2-1)。決定した塩基配列、遺伝子構造および使用したプライマーの位置を図1-2-2に示した。そして、こ

ac ttc ttc acc tcc tcc tcc ttt ttg tgt gtt tct agt tct ttc cct atg ttc tca ctc	59	
cat ttt cat cct ttg ctt ctc ctc gtc ttc agt tat ttt cag atc cgt cat ctc tta agg	119	
taa aac gat ttg aaa cct ctt cac tga tgt ctt cat gtc aaa act gaa agc tga ttt agt	179	
tta gaa aaa taa tat <u>gta taa aaa</u> aag act tca gat gaa gaa tcg gtc tca ttg tcg gac	239	
ggt gcc aac att taa aaa atc tat ttt ttc caa gct ttc att taa aaa atg ata aga taa	299	
aag cgt gtg ttt cag ttt tcc tcc aag	ATG GCG GCG CTG TGG CTC CAG TCT GTC TCT CTG	359
	M A A L W L Q S V S L	11
CTC GTC CTA ATG CTC GTG TCA TGG TCG GGC TCC CAG GCC GTG CTC CCC CCA CAG CAC CTC	419	
	TCA TGG TCG GGC TCC CAG GCC GTG CTC CCC CCA CAG CAC CTC	42
L V L M L V S W S G S Q A V L P P Q H L	31	
TGT GGC GCT CAC CTG GTC GAC GCC CTC TAC CTG GTC TGT GGC GAG AGA GGC TTC TTC TAC	479	
TGT GGC GCT CAC CTG GTC GAC GCC CTC TAC CTG GTC TGT GGC GAG AGA GGC TTC TTC TAC	102	
C G A H L V D A L Y L V C G E R G F F Y	51	
ACC CCC AAG AGA GAC GTG GAC CCT CTG CTG Ggt gag aac atg aca gct tta aac aca gaa	539	
ACC CCC AAG AGA GAC GTG GAC CCT CTG CTG G	133	
T P K R D V D P L L G	62	
cct tga aat gaa cca gaa ctt cct caa cag tca ctt gga ctc ggt ctc atg aga aac tcg	599	
tgt ctc tca gGT TTC CTT CCT GCG AAG TCG GGC GGA GCT GCA GCG GGC GGC GAG AAC GAG	659	
	GT TTC CTT CCT GCG AAG TCG GGC GGA GCT GCA GCG GGC GGC GAG AAC GAG	183
	F L P A K S G G A A A G G E N E	78
GTG GCC GAG TTC GCC TTC AAG GAC CAG ATG GAG ATG ATG GTG AAG CGA GGC ATC GTG GAG	719	
GTG GCC GAG TTC GCC TTC AAG GAC CAG ATG GAG ATG ATG GTG AAG CGA GGC ATC GTG GAG	243	
V A E F A F K D Q M E M M V K R G I V E	98	
CAG TGC TGC CAC AAG CCC TGT AAC ATC TTT GAC CTG CAG AAC TAC TGC AAC TGA acg ccg	779	
CAG TGC TGC CAC AAG CCC TGT AAC ATC TTT	273	
Q C C H K P C N I F D L Q N Y C N *	115	
ctc agc ccg gag tcc gtt agc ccc ccg acc cat cac ccc cct cac gcc ccg gcc ctt tgc	839	
gtc aga gga acg gca ctg ctg tga aat gga tga aat tat ttt tcc tag aag <u>ata aag</u> ttt	899	
tgt gaa ttc	908	

図1-2-1 マツカワ プレプロインスリン遺伝子の塩基配列

コード領域を大文字で、非コード領域を小文字で示した。また、ゲノミックDNAの配列はゴシック体で、cDNAの配列はイタリックで示した。塩基配列から演繹されるアミノ酸配列はゴシック体の一文字表記で示された。TATA boxを実線のアンダーラインで、ポリA付加シグナルを点線のアンダーラインで示した。

これらの遺伝子断片にクローン間で塩基配列の違いは認められなかった。

マツカワ プレプロインスリン遺伝子の構造： cDNAライブラリーから増幅されたDNAの塩基配列からプレプロインスリン遺伝子のC-ペプチド領域を切断するイントロンの位置が明らかになった（図1-2-1、図1-2-2）。切断個所は7残基目のGlyに対応するGGTの2塩基対目の上流側であり、このイントロンは99bp、両端がGTおよびAGであった。そして、マツカワ プレプロインスリン遺伝子のコード領域は348bpと結論された。また、シグナルペプチド領域の上流側124bpにTATA boxが、またA鎖C末端領域の終始コドンの下流側116bpにポリA付加シグナルが認められた（図1-2-1）。A、B両鎖のコード部分の塩基配列から演繹されるアミノ酸配列は第一章で明らかにされたインスリン-IおよびIIのものと完全に一致した。

図1-2-3には、シグナルペプチド領域およびC-ペプチド領域の塩基配列を示した。塩基配列から演繹されるシグナルペプチドは22残基から構成され、中間部分に疎水性領域のLeu-Leu-x-Leuを含んでいた。C-ペプチドは37残基から構成され、両端に塩基性アミノ酸のArgあるいはLysが2残基連続した配列が結合していた。

ゲノミックサザンブロット解析： 3制限酵素で切断されたゲノミックDNAのサザンブロット解析において、*EcoR* Iによる消化では3.0kb、*Bam*HIにより3.3kb、*Hind*IIIにより2.9kbのバンドが検出された（図1-2-4）。いずれの制限酵素消化による場合も陽性バンドは一本であり、マツカワのゲノムにおいてプレプロインスリン遺伝子はシングルコピーであることが示された。

考察

3段階のPCRにおいて異なるプライマーを使用しても塩基配列の異なるDNAが増幅さ

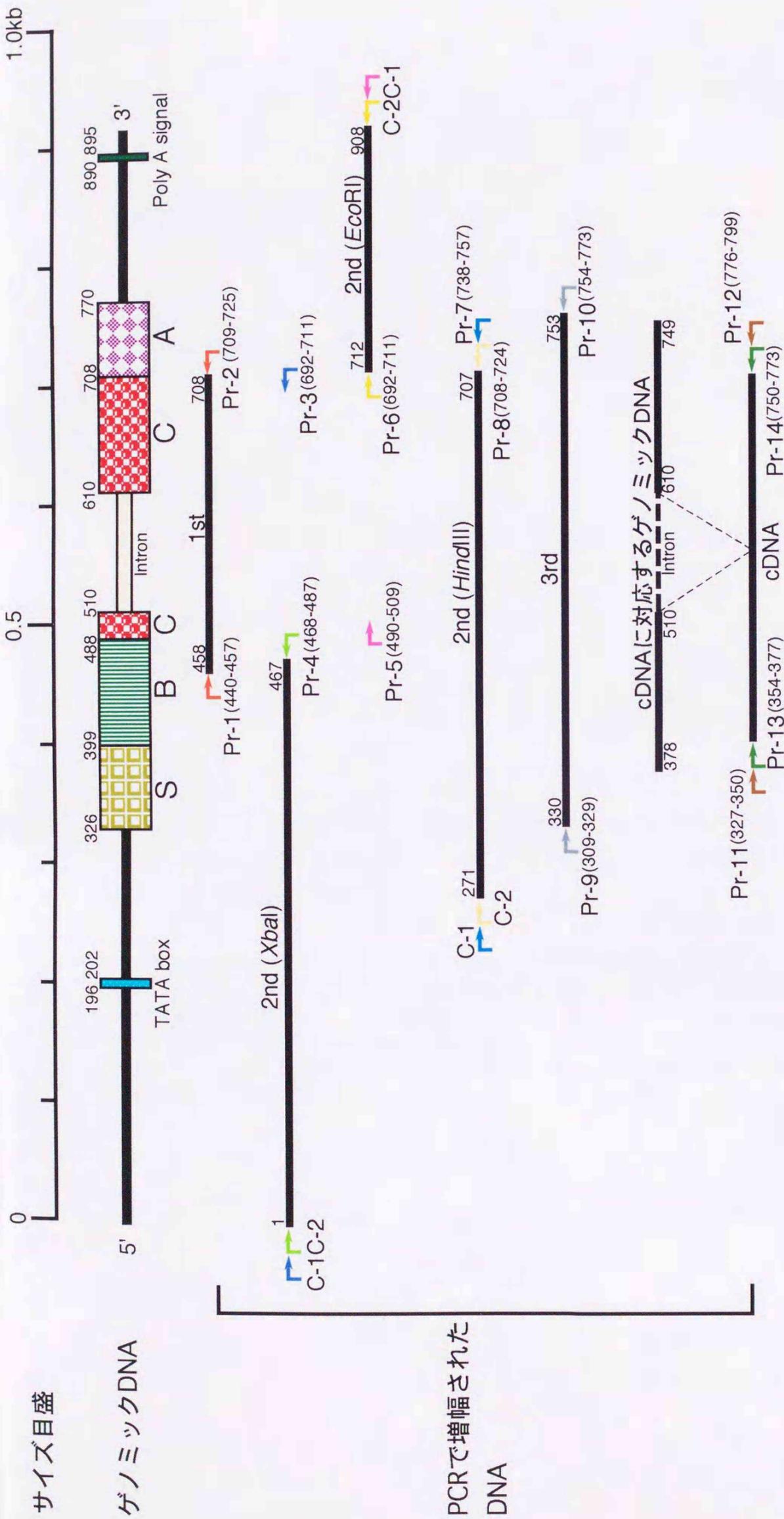


図1-2-2 マツカワプレプロインスリンの遺伝子構造と各PCR段階で増幅されたDNA、およびそれらの増幅に使用されたプライマーの相対位置の模式図

S : シグナルペプチドコード領域、B : B鎖コード領域、C : C-ペプチドコード領域、A : A鎖コード領域。増幅された各DNAの両端の数字はゲノミックDNA上での位置を示す。各プライマーセットは同色で示し、括弧内の数字は各プライマーのゲノミックDNA上での対応する位置を示す。第2段階目のPCRにおいてはゲノミックDNAの消化に使用した制限酵素を示した。また、増幅されたDNAの塩基配列からプライマーの配列を除いて示した。C-1およびC-2はLA PCR *in vitro* cloning kit (宝酒造) に付属するプライマーで各DNAにライゲーションされたカセット配列に対応する。

Signal peptide

	1	5	10	15	20	25
Barfin flounder ^{(1)*}	MAALWLQSV SLLVLMLVSWSGSQA					
Anglerfish ^{(2)*}	-----F-----LV-----					
Carp ^{(3)*}	-- V-I-AG A--F-LA--SVNA					
Chum salmon ^{(4)*}	-- F---AA -----LAL-PGVDA					
Hagfish ^{(6)*}	--LSPFLAAVIP---L-SRAPP-ADT					

C-peptide

	1	5	10	15	20	25	30	35
Barfin flounder ^{(1)*}	KRDVDPLLGFLPAKSGGAAAGG ENEVAEFAFKDQMEMMVKR							
Anglerfish ^{(2)*}	-----Q-----P-----A-AD-----							
Carp ^{(3)*}	-----P-----P--AQ -T---D-----HA-VIR--							
Chum salmon ^{(4)*}	-----I---SP--AK --- -YP---T-----							
Eel ⁽⁵⁾	--E-----SP---Q -----DD-PY-G-G-L							
Hagfish ^{(6)*}	---TGA-AA---LAYAE DNESQDDESIGINEVLKS--							

図1-2-3 塩基配列から演繹されたマツカワ プレプロインスリンのシグナルペプチドおよびC-ペプチドのアミノ酸配列とこれまで報告された他魚種との比較

-はマツカワのシグナルペプチドあるいはC-ペプチドに一致した配列、空白は欠失した配列を示す。また、アスタリスクをつけたアミノ酸配列は塩基配列から演繹されたもの。各配列は次の文献から引用した。(1) *Verasper moseri*, 本研究; (2) *Lophius americanus*, Hobart et al. (1980); (3) *Cyprinus carpio*, Hahn et al. (1983); (4) *Oncorhynchus keta*, Koval et al. (1989); (5) *Anguilla anguilla*, Conlon and Thim (1989); (6) *Myxine glutinosa*, Chan et al. (1981)。

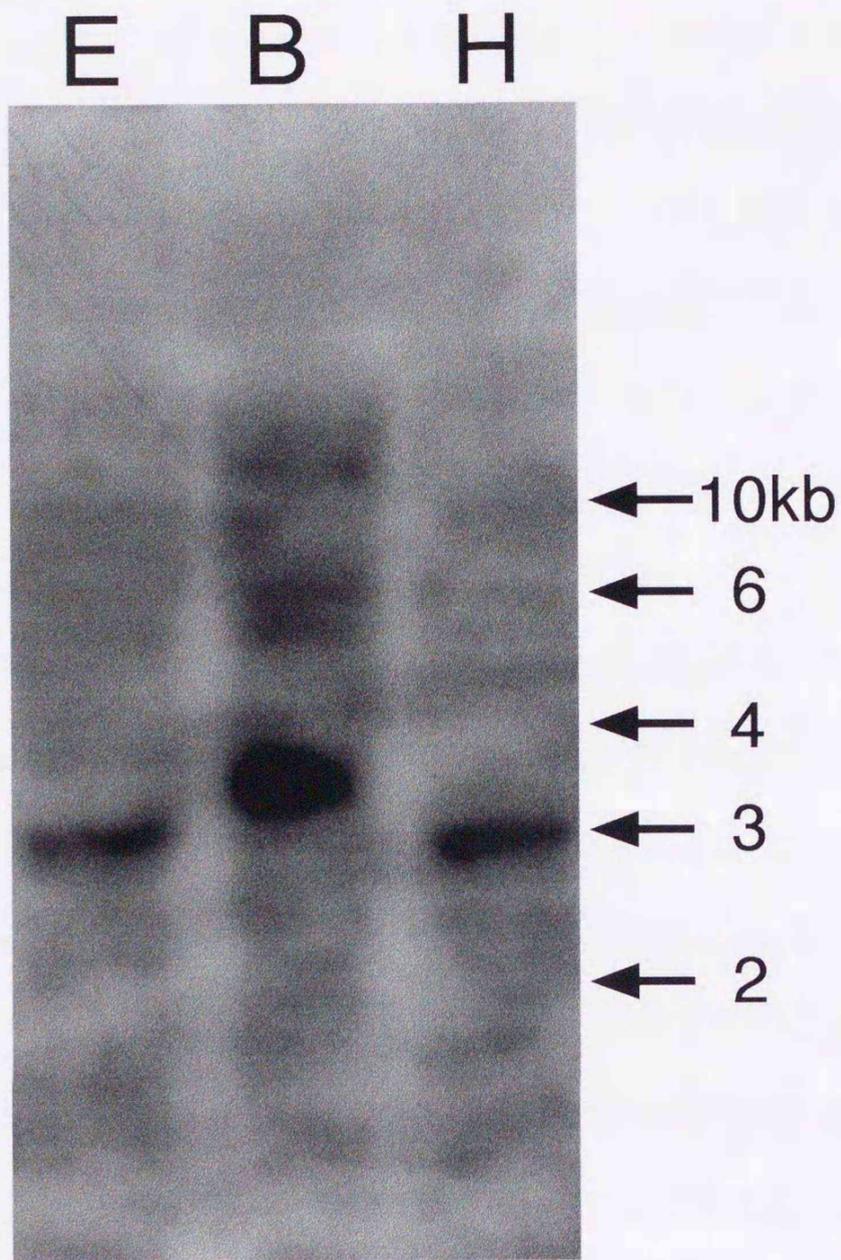


図1-2-4 マツカワプレプロインスリン遺伝子をプローブに使用したマツカワゲノミックDNAのサザンブロット解析

各レーンはLane E: *EcoRI*、Lane B: *BamHI*、Lane H: *HindIII*を示す。

れなかったこと、およびゲノミックサザンブロッティングの結果から、マツカワ プレプロインスリンはゲノム中に1コピーのみが存在することが示された。このことは前章で提唱されたマツカワにおける2分子種のインスリンの産生様式の(1)の仮説を支持するものである。すなわち、マツカワにおいて2分子種のインスリンは異なる2遺伝子から翻訳されるものではなく、単一のプレプロインスリン遺伝子の産物がプロセッシングの際のシグナルペプチド部分の切断箇所の違いから2分子種に変換されるものと判断された。

インスリンのシグナルペプチドの切断は小胞体膜上で行われる。この際、シグナルペプチダーゼによってシグナルペプチドはプレプロインスリンから切断され、プロインスリンが産生される (Chan *et al.*, 1976)。この過程においてシグナルペプチドの切断される箇所が種によって変異しているとの報告例はない。しかしながら、実際には前節で論じたようにB鎖のN末端付近はインスリンレセプターと結合の際には重要な働きを果たさないことから、インスリン分子内では最も種間での変異性が高い(第1章第1節、図1-1-4)。そして、シグナルペプチドのC末端付近の変異性はB鎖のN末端付近と同様に高い(図1-2-3)。したがって、マツカワにおけるインスリン-IおよびIIは自然選択圧の低さにより、シグナルペプチド切断系における中立的な突然変異が保存されているものと考えられる。

これに類似した複数のインスリン分子種の産生様式はギンザメ (Pacific ratfish; *Hydrolagus colliei*) において報告されている。Conlon *et al.* (1986)はギンザメから4分子種のインスリン (I-31、I-36、I-37、I-38) を精製している。アミノ酸配列解析からこれら4分子種はB鎖とC-ペプチドの結合部分の切断箇所の違いにより単一のプロインスリンから生じる可能性が考えられている。そして、ギンザメのインスリンはB鎖C末端に8残基の伸長がありながら、ラット脂肪細胞を使用した結合アッセイでは3-[I¹²⁵]iodotyrosyl^{A-14}ヒトインスリンに対して同等の結合を示す

(Conlon *et al.*, 1989)。したがって、B鎖とC-ペプチドの結合領域もB鎖末端と同様にインスリン活性発現に重要ではないと推定される。しかしながら、*H. colliei*においてゲノム中のプレプロインスリン遺伝子のコピー数、および血液中での4種のインスリンの存在は調査されておらず、これらの4分子種の産生様式、成熟分子型は推定に止まっている。

これまでインスリン遺伝子の塩基配列が決定された硬骨魚類はアンコウ (*Lophius americanus*; Hobart *et al.*, 1980)、コイ (*Cyprinus carpio*; Hahn *et al.*, 1983)、シロサケ (*Oncorhynchus keta*; Koval *et al.*, 1989; Kavsan *et al.*, 1993)に限られる。特に、ゲノミックDNAのインスリン遺伝子の塩基配列を決定した研究は本研究がシロサケに続いて2例目である。

シロサケにおいては、ゲノム中に少なくとも2つのインスリン遺伝子が存在することが示されている (Sorokin *et al.*, 1982; Kashuba *et al.*, 1986; Koval *et al.*, 1989; Kavsan *et al.*, 1993)。サケ科魚類は4倍体性であり全ゲノムが倍化したことにより遺伝子が重複したためと考えられる。Kavsan *et al.* (1993)はPCRによりC-ペプチドからA鎖をコードする領域の下流域までのイントロンを含む塩基配列をこのうちの2遺伝子について増幅し配列を決定した。C-ペプチドを分断するイントロン領域は265bp (インスリン-I) および287bp (インスリン-II) から構成されていた。このイントロンの長さはマツカワ インスリン遺伝子のその約3倍であった。そして、シロサケインスリンの2遺伝子のイントロン間で78bp (26%) に置換、挿入、欠失が認められた。一方、A鎖領域では2bp (3%) のみの置換であった。これらのことはイントロン領域の進化速度はA鎖領域のそれよりも速く、自然選択圧が弱いことを示している。そのため、マツカワにおいて塩基配列の欠失、あるいはシロサケにおいて挿入が起こったと考えられる。さらに、イントロンの長さは種間に高い変異性があることが予想される。

Breathnach and Chambon (1981) は真核生物のイントロンの末端は上流側がGT、下流側がAGであることを発見した (Chambonの法則あるいはGT-AG rule)。シロサケのインスリン-IIのC-ペプチド領域を分断するイントロンの両端の塩基配列はGT-AGであり、Chambonの法則に従うが、インスリン-IのそれはGC-AGであり、Chambonの法則に従わない。マツカワのC-ペプチド領域のイントロンの塩基配列はGT-AGであり、Chambonの法則に従った。マツカワと同様にChambonの法則に従うインスリン-II遺伝子がよりインスリンの祖先型遺伝子に近い特徴を保存していると考えられる。

遺伝子の塩基配列から演繹されたシグナルペプチドのアミノ酸配列の種間での相同性はA、B両鎖のそれに比較してかなり低かった (図1-2-3)。このことはシグナルペプチドのアミノ酸配列にかかる自然選択圧が弱いことを示している。しかしながら、シグナルペプチドの特徴的配列である中央部分の疎水性領域 (Leu-Leu-x-Leu) は本種を含めて魚類においてよく保存されていた。

一方、C-ペプチドのアミノ酸配列も種間での変異性が高く、両端の塩基性アミノ酸の2残基以外に保存的領域は認められなかった。特に中央部分にはマツカワとアンコウにおいて5あるいは6残基の挿入が認められた。そして、マツカワのC-ペプチドはアンコウのもの (38残基) に次いで長かった。C-ペプチドにおけるこの変異性はアミノ酸配列およびその長さにかかる自然選択圧が弱く、重要性が低いことを示している。

哺乳類 (ヒト、Bell *et al.*, 1980)、鳥類 (ニワトリ; Perler *et al.*, 1980)、シロサケ (Rusakov *et al.*, 1990) においては、TATA boxとシグナルペプチド領域間にイントロンの存在が知られている。本研究ではこのイントロンの同定は行わなかった。

第2章 硬骨魚類インスリンの一次構造と多型性

第1章において、マツカワにおけるインスリンの2分子種の一次構造、遺伝子構造、産生様式を解明した。この産生様式は脊椎動物において新規のものであるが、マツカワに特異的なものかどうかは不明である。また、硬骨魚類においてカツオ

(*Katsuwonus pelamis*; Yamamoto *et al.*, 1960; Kotaki, 1961; Kotaki, 1962; Kotaki *et al.*, 1962; Kotaki, 1963)、toadfish (学名不記載; Smith, 1966)、ヘラチョウザメ (*Polyodon spathula*, Nguyen *et al.*, 1994) において2分子種のインスリンの存在が報告されており、各分子種の内部にアミノ酸配列の置換が認められることから、それらは2遺伝子にコードされていると考えられる。しかしながら、これらのうちカツオとtoadfishのインスリンの全アミノ酸配列は決定されていない。また、これらの魚種における2分子種のインスリンは対立性遺伝子により支配されているものか、あるいはそれらの産生様式が種特異的なものかどうかは不明である。

本章では、硬骨魚類におけるこのようなインスリンの2分子種の存在性、産生様式がそれぞれの魚種に特異的なものかどうかについて検証する。第1節ではイシガレイ (*Kareius bicoloratus*)、第2節ではカツオ (*K. pelamis*)、第3節ではホッケ (*Pleurogrammus azonus*) を取り上げて、それぞれの種のインスリンを精製し、一次構造を決定することにより複数のインスリン遺伝子の存在性を検討した。

第1節 イシガレイ インスリンの精製と一次構造

前章においてマツカワが2分子種のインスリンを有し、1分子種のプレプロインスリンからこれら2分子種のインスリンが産生されることを示した。本節ではカレイ科

(Pleuronectidae) に属するがマツカワとは系統的に遠縁であるイシガレイ (*Kareius bicoloratus*) においてインスリンの2分子種の存在性を検証した。

材料と方法

イシガレイ インスリンのSep-Pak法による精製： イシガレイの胆嚢上のブロックマン小体 (N=10、340mg) からSep-Pak法 (第1章第1節) によりSep-Pak cartridge (Millipore) から溶出液を得た。そして、減圧遠心濃縮機による濃縮後、この溶出液からODS-120Tカラム (4.6×250mm, 東ソー) を使用した逆相クロマトグラフィーによりインスリンを精製した。流速は500 μ l/分、カラムチャンバーの温度を30°Cに調整し、0.1% TFA (V/V) と0.1% TFA/50% アセトニトリル (v/v) を使用した31分間の直線濃度勾配により溶出した。さらに μ RPC C2/C18 SCカラム (2.1×100 mm, Pharmacia) を使用した逆相クロマトグラフィーにより、同じく0.1% TFA (v/v) と0.1% TFA/50% アセトニトリル (v/v) を使用し、流速を100 μ l/分として精製した。アセトニトリル濃度は5分間で9%まで、次の5分間で10%まで、その次の70分間で40%まで上昇させた。A、B両鎖の分離、質量分析およびアミノ酸配列解析は第1章第1節の方法により行った。ただし、プロテインシーケンサーにはABI 476A (Perkin Elmer) およびPPSQ-21 (島津製作所, 京都) を使用した。インスリンの収量はブタインスリンの276nmでの吸光度が1.06であることを便宜的に使用して換算した。

イシガレイ インスリンのエタノール/ジエチルエーテル沈殿法による精製： イシガレイのブロックマン小体 (160mg) から、エタノール/ジエチルエーテル沈殿法 (第1章第1節) により得られた沈殿を3 M 酢酸に溶解した。次に、2°Cで10,000×g、10分間の遠心分離により不溶物を除去した後、ODS-120Tカラム (2.0×150 mm, 東ソー) を使用した逆相クロマトグラフィーによりインスリンを精製した。溶出液として、

0.1% TFAと0.1% TFA/50% アセトニトリルを使用し、溶出条件は 30°Cで流速を100 μ l/分として115分間の直線濃度勾配とした。さらに μ RPC C2/C18 SC (Pharmacia) を使用した逆相クロマトグラフィーにより精製した。クロマトグラフィーの条件は第1章第1節にしたがった。ただし、アセトニトリル濃度を次の通り変化させた。0.1% TFAの3分間の溶出の後、アセトニトリル濃度を5分間で25%まで、次の70分間で40%まで、さらに10分間で50%まで上昇させた。A、B鎖の分離は第1章第1節の方法にしたがったが、カラムにSource15(4.6 \times 100 mm, Pharmacia)を使用し、2-propanol濃度を22.5分間で60%(v/v)まで、次の5分間で100%(v/v)まで上昇させた。

結果

イシガレイ インスリンの精製およびアミノ酸配列解析: Sep-Pak法によって得られたブロックマン小体の抽出物のODS-120T カラム (4.6 \times 250mm) を使用した逆相クロマトグラフィーでの溶出プロファイルを図2-1-1に示す。25-26分に溶出されるフラクションを採取し (図2-1-1)、 μ RPC C2/C18 SCを使用した次の段階でさらに精製した (図2-1-2)。63分と65分に見られた紫外線吸収ピークを含むフラクションの成分は質量分析でそれぞれ m/z 5768および m/z 5950を示し、イシガレイのインスリン-IおよびIIであると考えられた。そこでこれらの成分を還元カルボキシメチル化処理し、さらにA、B両鎖を前述の方法により分離した後 (図2-1-3)、プロテインシーケンサーでアミノ酸配列を解析した。インスリン-Iの両鎖およびインスリン-IIのA鎖についてはアミノ酸配列が決定され (表2-1-1)、それらは質量分析の結果とよく一致した (表2-1-2)。しかし、インスリン-IIのB鎖はエドマン分解で有意なPTH-アミノ酸が認められず、N末端がブロックされていると考えられた。インスリン-IおよびIIの収量はそれぞれ13.9ng、17.2ngであった。

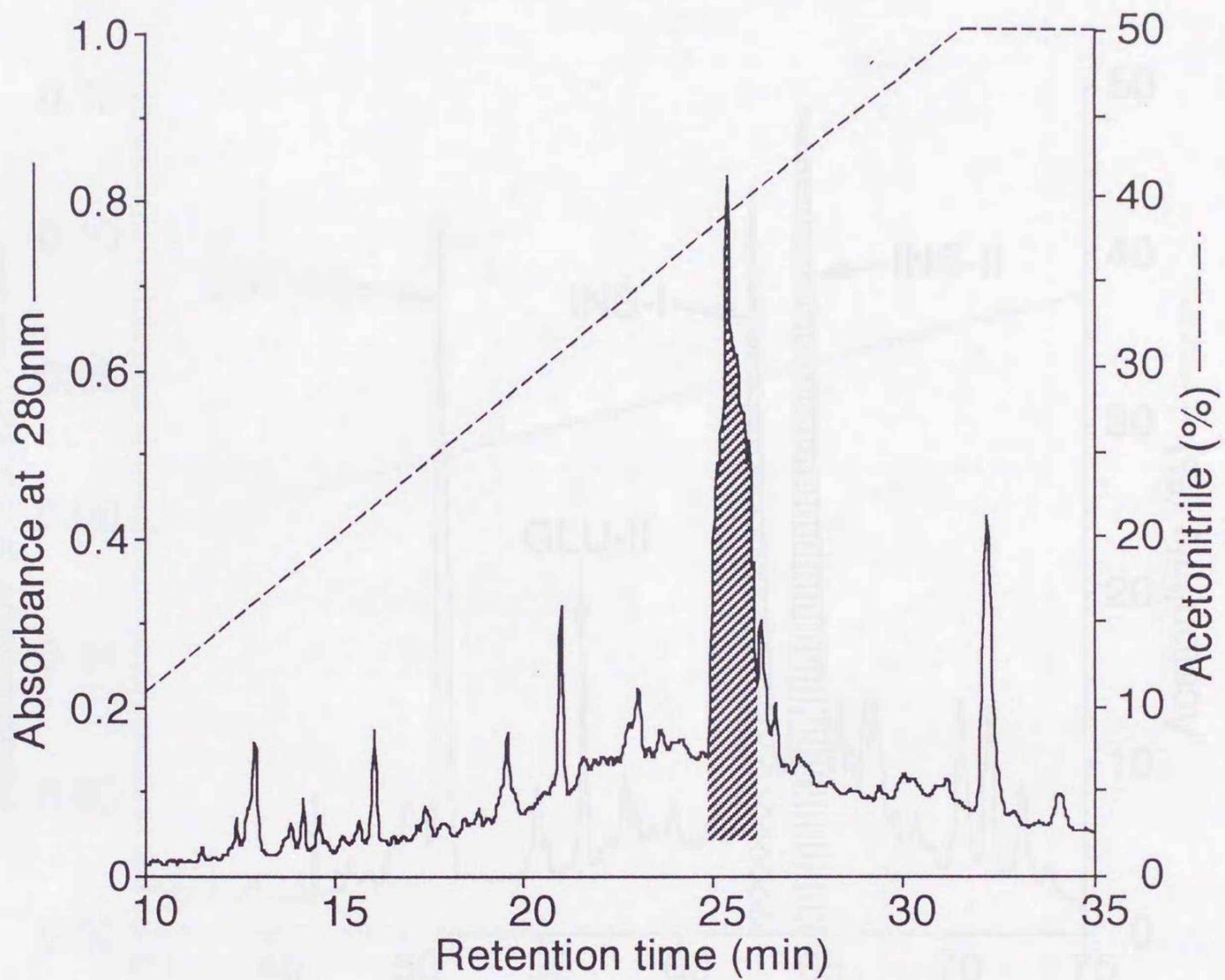


図 2-1-1 Sep-Pak法によるイシガレイ ブロックマン小体
抽出物の逆相クロマトグラフィー

網掛けの部分採取し、次の精製段階で使用した。

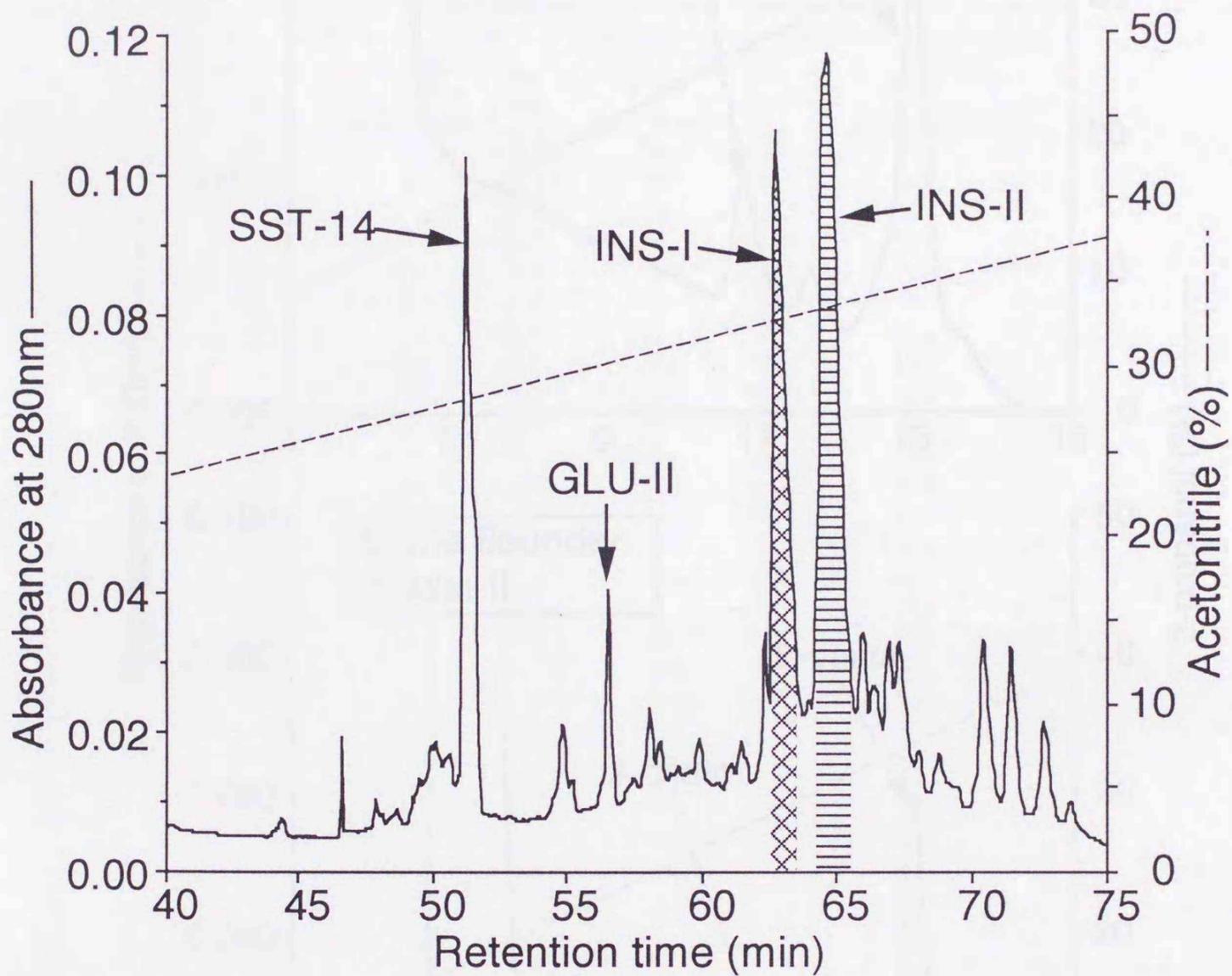


図 2-1-2 Sep-Pak法によるイシガレイ インスリンの精製

SST-14、GLU-II、INS-I、INS-IIはそれぞれソマトスタチン-14、グルカゴン-II、インスリン-I、インスリン-IIを示す。網掛けされた部分について構造解析を行った。

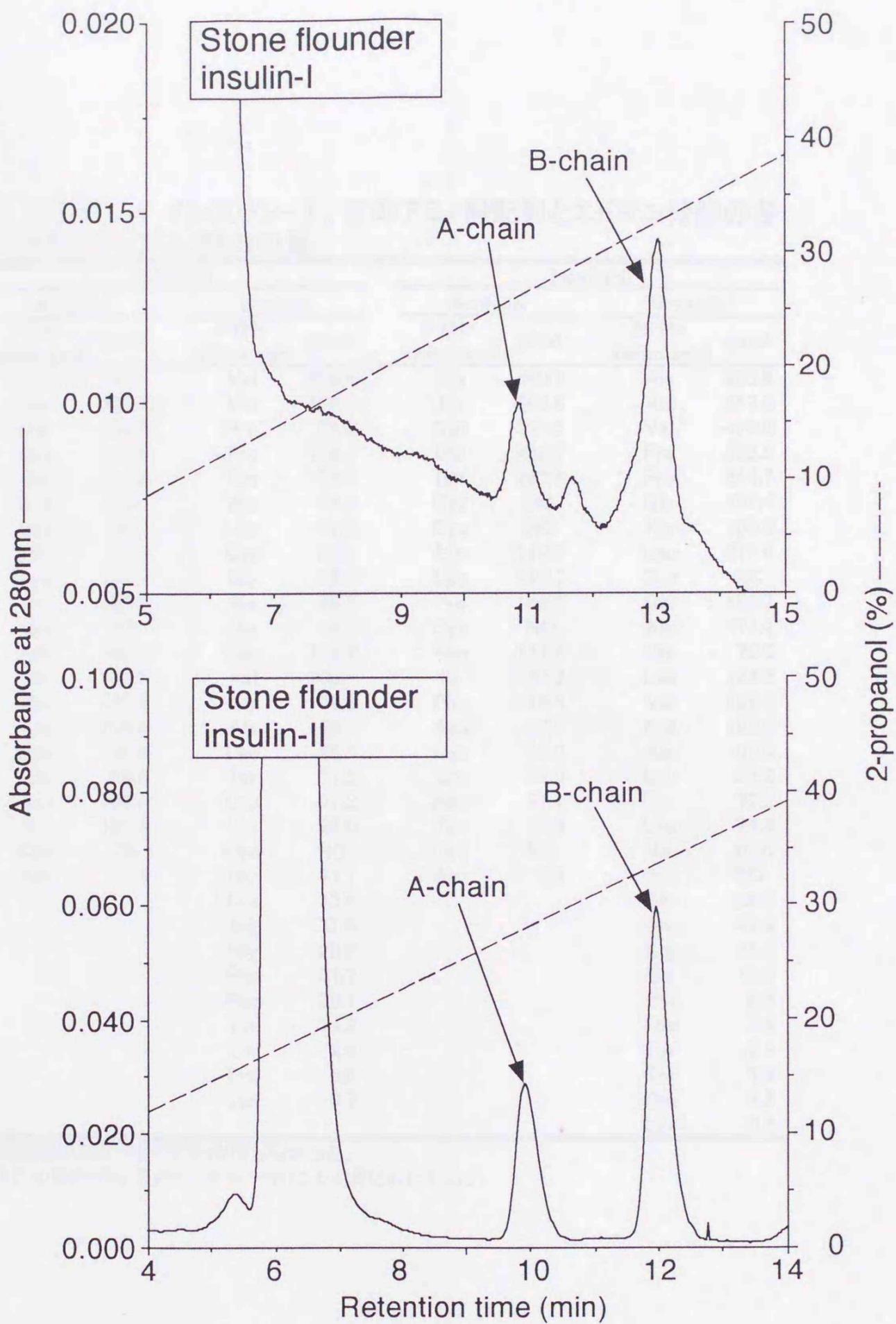


図 2-1-3 還元カルボキシメチル化処理後のイシガレイ
 インスリン-I、IIのA、B鎖の分離

矢印で示したピークを含むフラクションについてアミノ酸配列解析を行った。

表2-1-1 イシガレイ インスリン-I、II のアミノ酸配列とエドマン分解の各サイクルでのPTH-アミノ酸の収量

Cycle	Insulin-I				Insulin-II			
	A-chain		B-chain		A-chain		B-chain*	
	PTH-amino acid	pmol						
1	Gly	265.5	Val	230.6	Gly	300.1	Ala	465.9
2	Ile	300.3	Val	178.2	Ile	366.1	Val	457.9
3	Val	328.0	Pro	94.3	Val	327.5	Val	428.0
4	Glu	246.2	Pro	133.7	Glu	256.9	Pro	333.5
5	Gln	200.9	Gln	74.1	Gln	232.4	Pro	244.7
6	Cys	NQ	His	64.6	Cys	NQ	Gln	191.4
7	Cys	NQ	Leu	141.5	Cys	NQ	His	100.8
8	His	85.4	Cys	NQ	His	148.4	Leu	211.4
9	Lys	159.4	Gly	54.6	Lys	197.2	Cys	NQ
10	Pro	180.6	Ala	89.3	Pro	168.2	Gly	150.7
11	Cys	NQ	His	44.1	Cys	NQ	Ala	177.4
12	Asn	183.1	Leu	126.7	Asn	112.2	His	75.5
13	Ile	164.0	Val	109.7	Ile	137.2	Leu	134.2
14	Phe	167.8	Asp	30.6	Phe	110.5	Val	132.7
15	Asp	109.4	Ala	65.7	Asp	87.7	Asp	102.2
16	Leu	138.2	Leu	95.3	Leu	96.0	Ala	91.6
17	Gln	86.6	Tyr	51.3	Gln	59.9	Leu	82.3
18	Asn	104.2	Leu	91.2	Asn	51.4	Tyr	75.2
19	Tyr	123.8	Val	82.0	Tyr	47.0	Leu	74.3
20	Cys	NQ	Cys	NQ	Cys	NQ	Val	61.0
21	Asn	41.4	Gly	31.1	Asn	5.3	Cys	NQ
22			Glu	13.5			Gly	26.5
23			Arg	37.0			Glu	41.5
24			Gly	20.2			Arg	25.1
25			Phe	31.7			Gly	11.6
26			Phe	36.1			Phe	6.2
27			Tyr	14.2			Phe	7.4
28			Thr	2.6			Tyr	3.4
29			Pro	6.6			Thr	1.5
30			Lys	6.7			Pro	1.2
31							Lys	0.3

NQ: 濃度既知のスタンダードを使用しなかった。

*: *Pfu*ピログルタメートアミノペプチダーゼにより消化したもの。

表2-1-2 イシガレイインスリンのA、B鎖の質量分析

	Insulin-I		Insulin-II	
	A-chain	B-chain	A-chain	B-chain undigested* digested**
(M+H) ⁺ measured	2669	3442	2673	3629
(M+H) ⁺ expected	2674	3447	2674	3518

* : ピログルタレートアミノペンタダールゼ未消化物

** : ピログルタレートアミノペンタダールゼ消化物

インスリン-IIの精製及びアミノ酸配列解析： エタノール/ジエチルエーテル沈殿法によりインスリン-IIについて再度調製した。図2-1-4にエタノール/ジエチルエーテル沈殿の3M酢酸溶液の逆相クロマトグラフィーにおける溶出プロファイルを示した。79分および81分に溶出された成分について、質量分析を行ったところ、 $(M+H)^+$ がそれぞれ m/z 5768および m/z 5950を示したことから、これらのフラクションはインスリン-Iおよびインスリン-IIを含むと考えられた。そして、これらの収量はそれぞれ14.6nmolおよび19.8nmolと推定された。このうち、インスリン-IIについて μ RPC C2/C18 SC カラムを使用した逆相クロマトグラフィーによりさらに精製した(図2-1-5)。得られたインスリン-IIについて、マツカワインスリン-IのB鎖と同様に還元カルボキシメチル化処理、A、B両鎖の分離を行った(図2-1-3)。そして、B鎖をPfuピログルタメートアミノペプチダーゼにより消化し、さらに逆相クロマトグラフィーにより消化物を精製した(図2-1-6)。精製された消化物は質量分析で消化前のものと比較し112 mass unitsの減少を示した(表2-1-2)。アミノ酸配列解析を行った結果、この消化物はN末端がAlaである31残基から構成され、2残基目以降はインスリン-IのB鎖に一致することが明らかになった(表2-1-1)。これらのことからイシガレイインスリン-IIのB鎖はN末端にPyr-Alaの伸長を伴い、この伸長以外の配列はインスリン-IのB鎖に一致すると結論した。また、イシガレイのインスリン-IおよびIIのアミノ酸配列はマツカワのそれらにインスリン-IIのB鎖の2残基目を除いて一致した。この箇所はマツカワがLeuであったが、イシガレイのそれはValであった(図2-1-7)。

考察

Jorgensen (1960) は *Pleuronectes flesus* (*Platichthys flesus*のシノニム) が電気泳動法で移動度の異なる二つのインスリン (IIa、IIb) を有することを報告した。これらインスリンのA鎖の移動度は同一であったが、IIbのB鎖の移動度はIIaのそれ

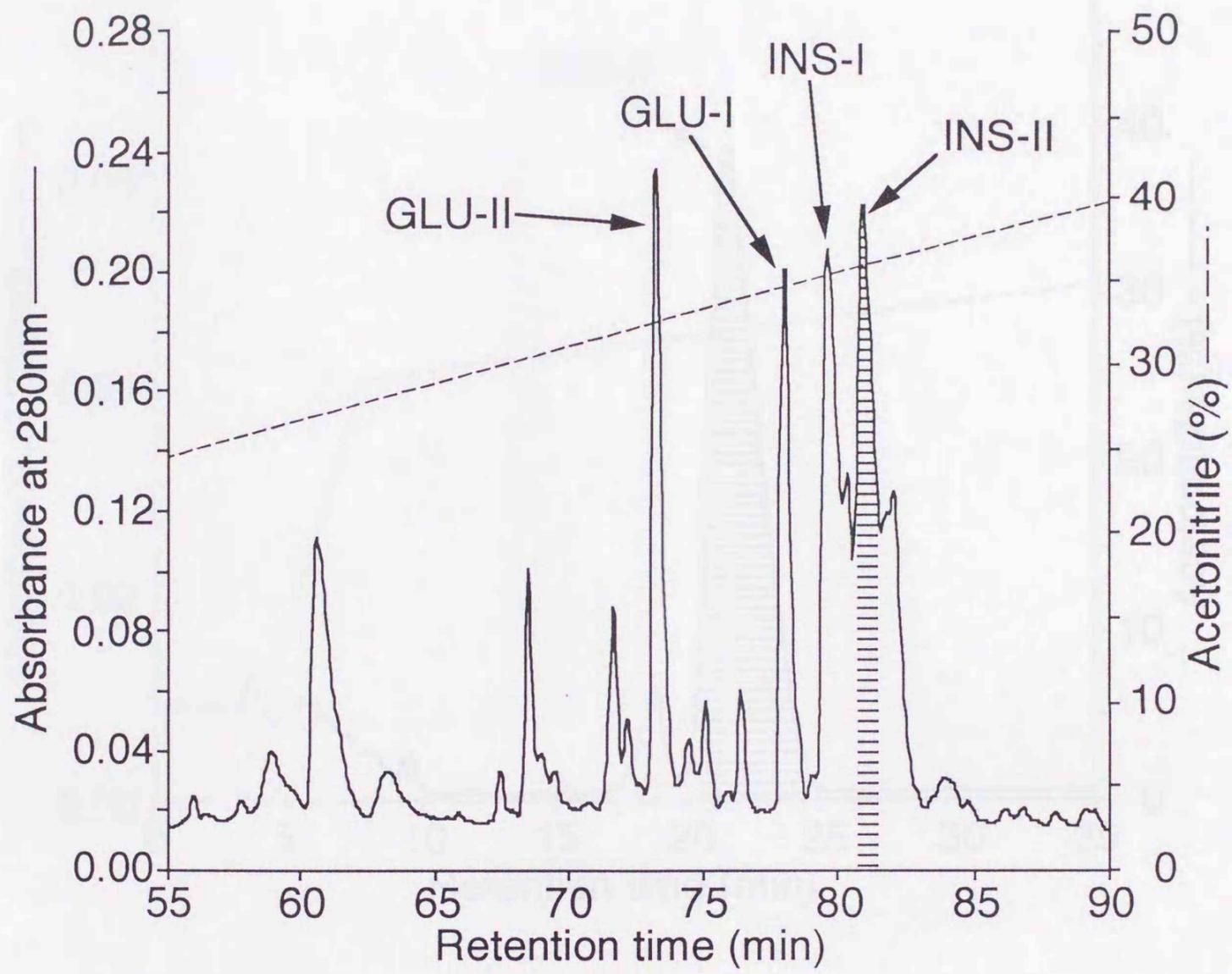


図2-1-4 エタノール/ジエチルエーテル沈殿法によるイシガレイ
インスリンの精製

GLU-I、GLU-II、INS-I、INS-IIはそれぞれグルカゴン-I、グルカゴン-II、インスリン-I、インスリン-IIを示す。インスリン-II（網掛けした部分）についてさらに精製した。

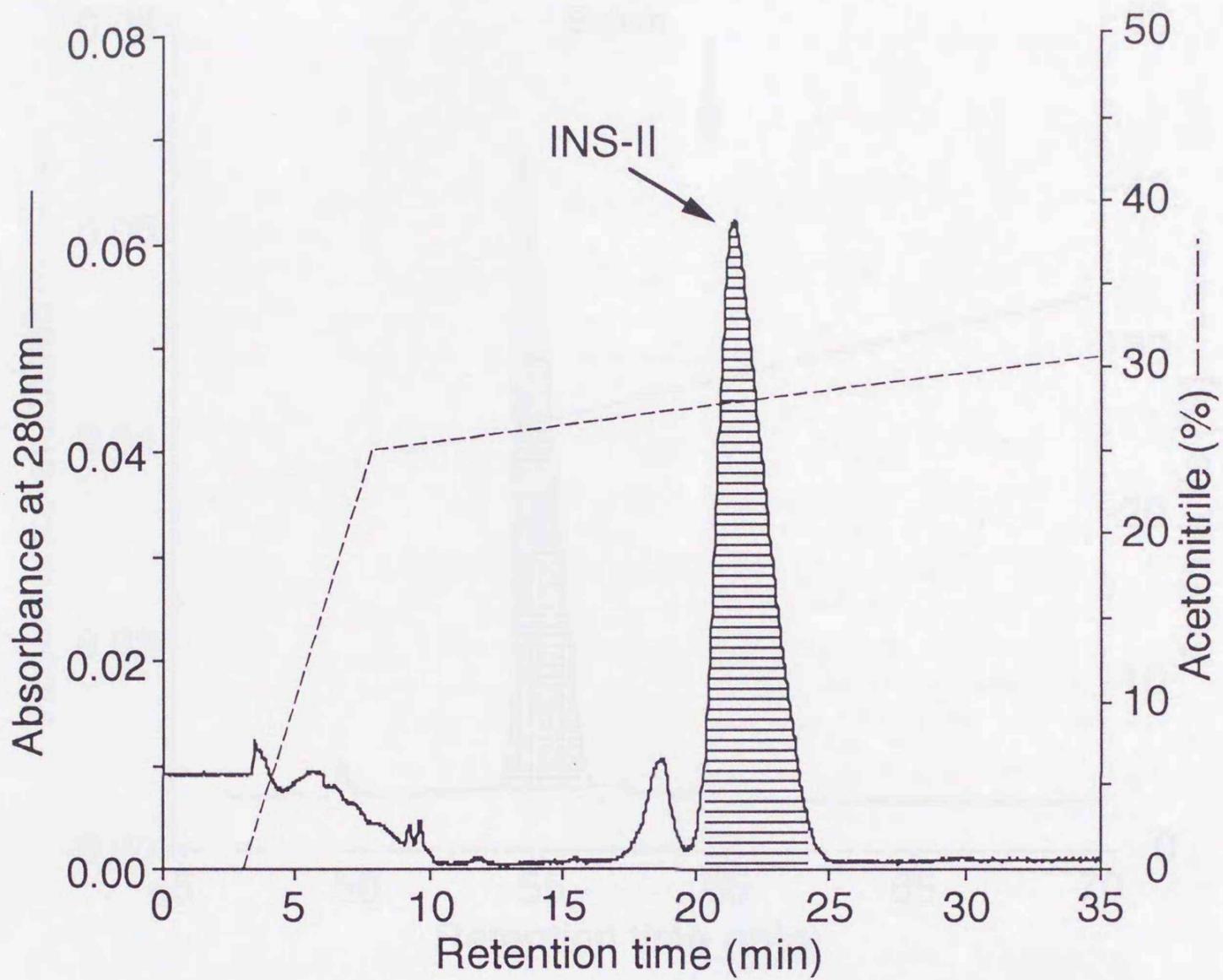


図 2-1-5 エタノール/ジエチルエーテル沈殿法によるイシガレイ
インスリンの精製

網掛けした部分のフラクションを構造解析に使用した。INS-IIはインスリン-IIを示す。

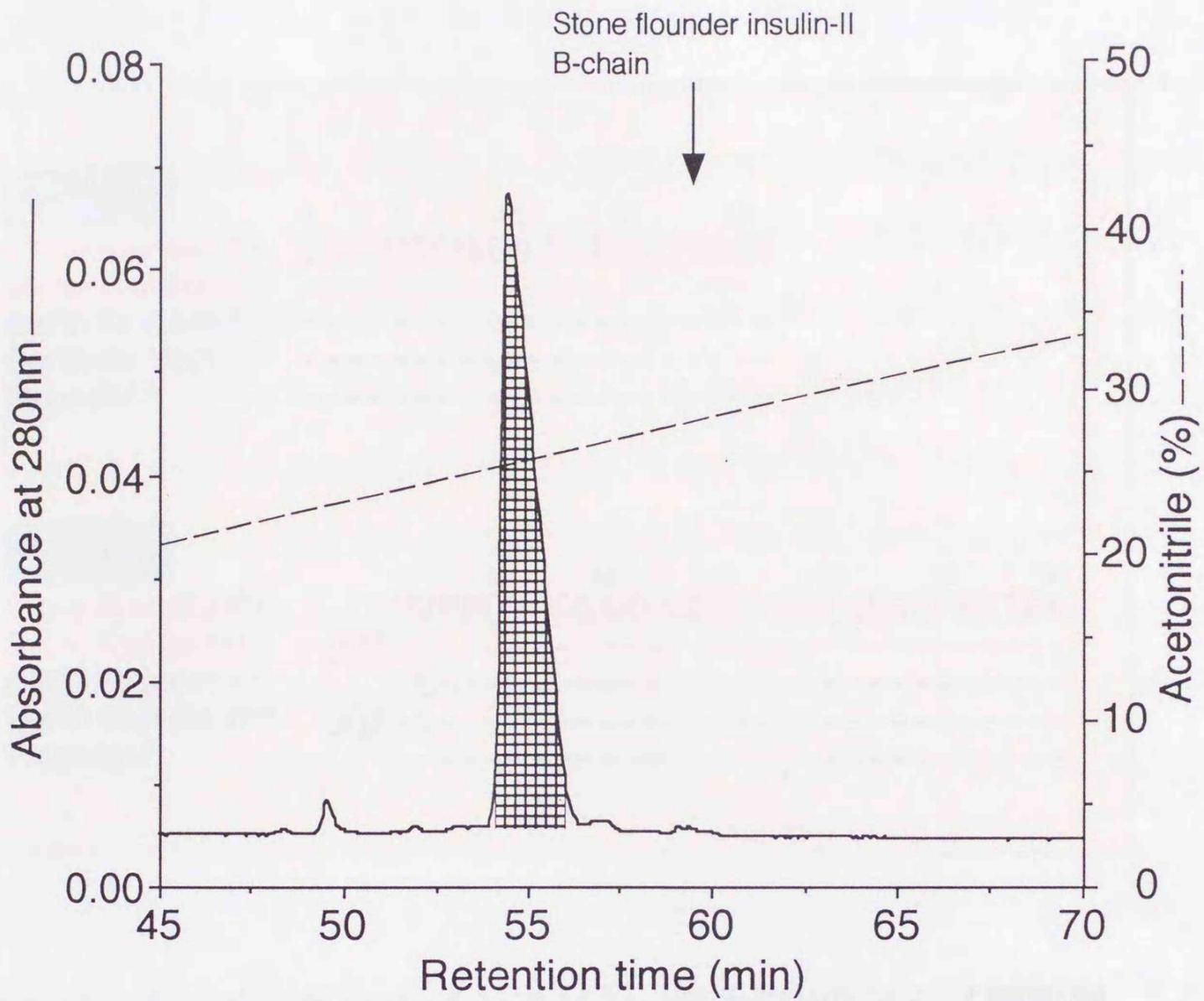


図2-1-6 ピログルタマートアミノペプチダーゼで消化されたイシガレイ インスリン-IIのB鎖の精製

矢印は消化前のイシガレイ インスリン-IIのB鎖の溶出時間を示す。網掛けした部分のフラクションについて構造解析を行った。

A-chain

	1	5	10	15	20
Stone flounder-I ⁽¹⁾	GIVEQCCHKPCNIFDLQNYCN				
Stone flounder-II ⁽¹⁾	-----				
Barfin flounder-I ⁽²⁾	-----				
Barfin flounder-II ⁽²⁾	-----				
Flounder ⁽³⁾	-----				

B-chain

	1	5	10	15	20	25	30
Stone flounder-I ⁽¹⁾	VVPPQHLCGAHLVDALYLVCGERGFFYTPK						
Stone flounder-II ⁽¹⁾	pQA	-----					
Barfin flounder-I ⁽²⁾	-L	-----					
Barfin flounder-II ⁽²⁾	pQA-L	-----					
Flounder ⁽³⁾	-----						

図 2-1-7 イシガレイ インスリン-IおよびIIのアミノ酸配列
と他カレイのインスリンとの比較

pQはピログルタミン酸を示す。各アミノ酸配列は次の文献から引用した。(1) *Kareius bicoloratus*、本研究；(2) *Verasper moseri*、第1章第1節、(3) *Platichthys flesus*、Conlon et al. (1987)

よりも大きかった。このことは*P. flesus*の両インスリン間でB鎖のインスリンのアミノ酸配列が異なることを示している。Conlon *et al.* (1987) は*P. flesus*のブロックマン小体が逆相クロマトグラフィーでインスリンの直後に溶出されるインスリン様免疫反応陽性物質を含むことを報告している。また、Andoh and Nagasawa (1998) はヌマガレイ (*P. stellatus*) もマツカワと同様にブロックマン小体に2分子種のインスリンを含み、そのうちの一方はB鎖がブロックされていることを報告した。さらにマガレイ (*Limanda herzensteini*) においてブロックマン小体は逆相クロマトグラフィーで溶出時間が異なる二つのインスリン様免疫活性を示す物質を含んでいた。これら二つの物質のうち、遅く溶出される物質のN末端アミノ酸配列は非還元条件下でGly-Ile-Val-Glu-Glnであり、マツカワインスリンのA鎖と一致したが、B鎖に対応するPTH-アミノ酸は得られなかった(安藤・長澤、未発表)。これらの事実はカレイ類の多くの種がマツカワと同様にインスリン-Iに加え、B鎖のN末端がブロックされたインスリン-IIを有することを示唆している。

イシガレイのインスリン-IおよびIIともにB鎖2残基目はValであったが、マツカワでは両インスリンともにLeuであった。このことはカレイ類における2分子種のインスリンが、2遺伝子の産物ではなく、1遺伝子座にコードされているプレプロインスリンの産物であるとする考え方(第1章第2節)を支持する。

イシガレイにおいて、インスリン-IIの収量はSep-Pak法(図2-1-2)、沈殿法(図2-1-3)のどちらにおいてもインスリン-Iの1.2~1.4倍であった。一方、マツカワにおいてはインスリン-IIの収量は両方法においてインスリン-Iの約2倍であった(図1-1-1、安藤・長澤、未発表)。これらの結果はブロックマン小体中に含まれるインスリン-IとIIの存在比がイシガレイとマツカワにおいて異なることを示している。このことはマツカワとイシガレイでインスリン-IおよびIIの産生様式が同様でありながら、プレプロインスリンからインスリン-IおよびIIに変換される効率が異なることを示唆

している。

第2節 カツオ インスリンの精製と一次構造の解析

Yamamoto *et al.*(1960)はカツオ (*Katsuwonus pelamis*) がイオン交換クロマトグラフィーにおいて溶出時間の異なる2分子種のインスリンを有することを報告した。この報告は脊椎動物において2分子種のインスリンを有する種が存在することをはじめて確認したものである。続いて、Kotakiらがこれら2分子種の部分構造、アミノ酸組成を解析したが、全一次構造決定には至らなかった (Kotaki, 1961; 1962; Kotaki *et al.*, 1962; Kotaki, 1963)。そして、Yamamoto *et al.*(1960)から38年を経過した現在でも未だ全アミノ酸配列は未解明である。

第1章ではマツカワにおいて、1遺伝子にコードされているプレプロインスリン遺伝子の産物から2分子種のインスリンが産生されることを示した。そして、第2章第1節においてカレイ類の多くが2分子種のインスリンを有し、それらがマツカワと同様の様式により産生されると考えられた。カツオにおいては2分子種のインスリン間には内部のアミノ酸配列の置換があることがアミノ酸組成分析から予想された

(Kotaki, 1961; 1962; Kotaki *et al.*, 1962; Kotaki, 1963)。したがって、カツオの2分子種のインスリンの産生様式はマツカワのそれとは異なり、2遺伝子にコードされた2つのプレプロインスリンから変換された産物であると考えられる。そこで、本節ではカツオにおいて2分子種のインスリンの一次構造を決定し、それらの産生様式を明らかにすることを目的とした。

材料と方法

4個体のカツオからブロックマン小体 (25-65mg) を抽出し、エタノール/ジエチルエーテル沈殿法 (第1章第1節) によりエタノール/ジエチルエーテル沈殿を生じさせた。この沈殿を3M 酢酸に溶解し、2°Cで10,000×g、10分間の遠心分離により沈殿を除去し、得られた上清から逆相クロマトグラフィーによりインスリンを精製した。逆相クロマトグラフィーの条件は第2章第1節にしたがった。ただし、第1段階目の逆相クロマトグラフィーではODS-120Tカラム (2.0×150mm, Tosoh) を使用し、アセトニトリル濃度を5分間で25%、次の50分間で46%、さらに次の2.5分間で50%まで上昇させた。ここまでの精製は各個体ごとに行い、第2段階目以降の精製で1個体から得られた試料を使用してアミノ酸配列解析用の試料の調製を行った。第2段階目の逆相クロマトグラフィーでは、 μ RPC C2/C18 SCカラム (2.1×100mm, Pharmacia) を使用し、5分間で22.5%、次の70分間で37.5%、さらに次の10分間で50%まで上昇させた。さらに第3段階目の逆相クロマトグラフィーは第1段階目にしたがって行われた。精製されたカツオインスリンは第1章第1節の方法にしたがって還元カルボキシメチル化処理を行った後、AおよびB鎖を前節にしたがって分離した。そしてそれぞれについてプロテインシーケンサー (PPSQ-23、島津製作所; ABI 476A, Perkin Elmer) によりアミノ酸配列解析を行った。得られたペプチドの質量分析は第1章第1節の方法にしたがって行われた。

結果

図2-2-1に4個体のブロックマン小体から得られた抽出物の逆相クロマトグラフィーのプロファイルを示した。卓越する二つの紫外線吸収ピークがいずれの個体においても30分および32分に認められた。このうちの1個体についてこれらのピークを含むフラクションの成分について質量分析を行ったところ、それぞれの(M+H)⁺はm/z 5690と

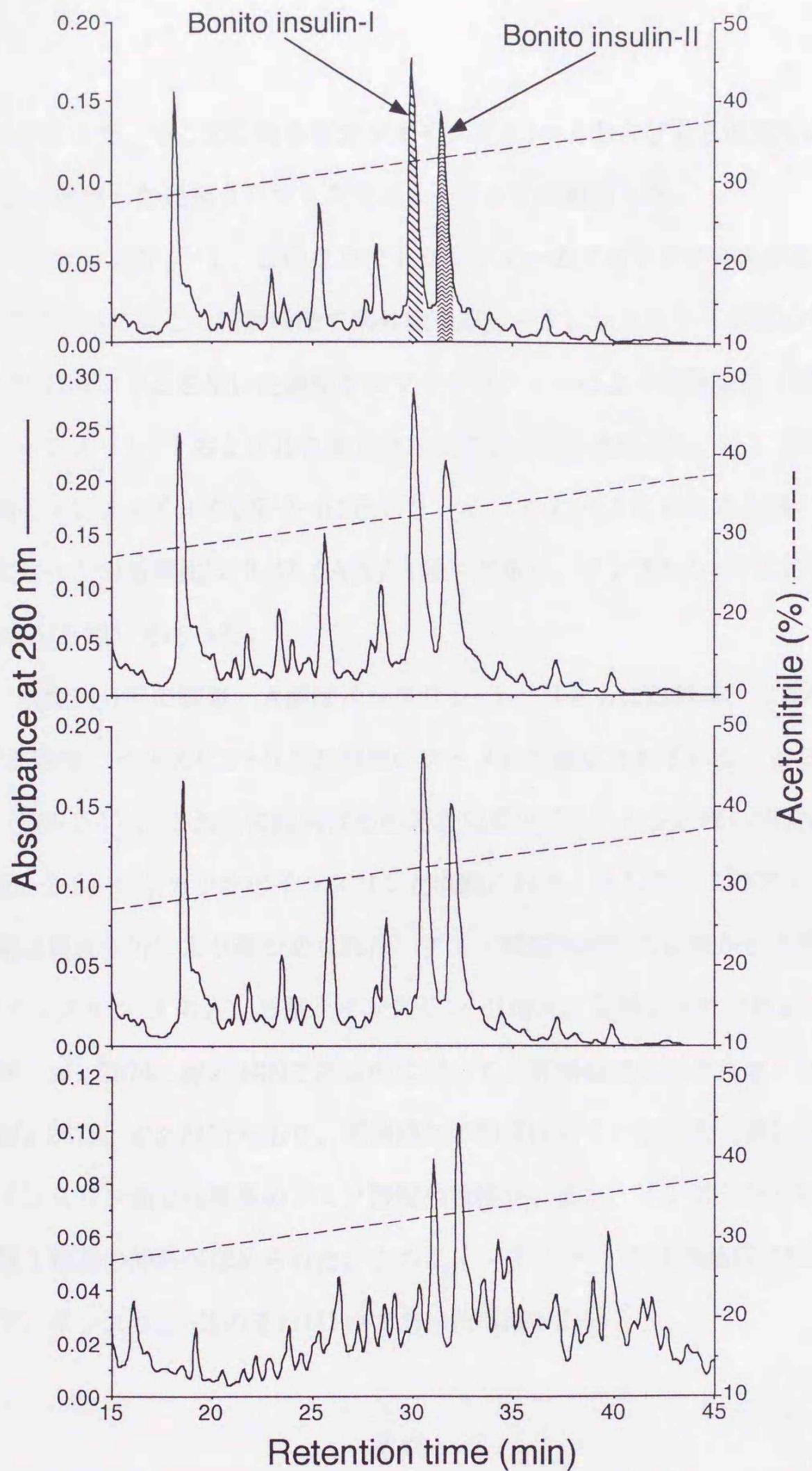


図2-2-1 カツオのブロックマン小体抽出物の逆相クロマトグラフィー

4個体のブロックマン小体から個体ごとに試料を調整した。網掛けした部分のフラクションについてさらに精製した。

m/z 5751であった。そこでこれらをカツオインスリン-I およびIIと仮定し、 μ RPC C2/C18 SCを使用した逆相クロマトグラフィーでさらに精製した。

図2-2-2にインスリン-I、IIのクロマトグラフィーのプロファイルを示した。インスリン-IIについてはこの精製段階で紫外線吸収ピークにショルダーが認められたため、さらにODS-120Tカラムを用いた逆相クロマトグラフィーにより精製した(図2-2-3)。そして、インスリン-I およびIIを還元カルボキシメチル化処理し、A、B両鎖を分離した段階のプロファイルを図2-2-4に示した。インスリン-IにおけるA鎖とB鎖の紫外線吸収ピークの面積比は0.47(A鎖/B鎖)であり、インスリン-IIにおけるそれは1.90(A鎖/B鎖)であった。

アミノ酸配列分析の結果、A鎖はインスリン-I、IIともに21残基、B鎖はインスリン-Iが29残基、インスリン-IIが30残基のアミノ酸で構成されていることが明らかになった(表2-2-1)。これらの配列は他の硬骨魚類のインスリンと高い相同性を示したこと(図2-2-5)からカツオのインスリンと判断された。そして、このアミノ酸配列解析の結果は質量分析により確かめられた。アミノ酸配列解析の結果から予想される($M+H$)⁺はインスリン-IのA、B鎖、インスリン-IIのA、B鎖がそれぞれ m/z 2690、 m/z 3350、 m/z 2674、 m/z 3420であるのに対して、実測値はそれぞれ m/z 2686、 m/z 3347、 m/z 2675、 m/z 3417であり、実測値と予想値はよく一致した(表2-2-2)。そして、両インスリン間で11残基のアミノ酸配列置換が、また、インスリン-IIのB鎖のN末端には1残基の伸長が認められた。さらにインスリン-Iの16残基目はAsnであるのに対して、インスリン-IIのそれはTyrであった(図2-2-5)。

考察

カツオからインスリン-I およびIIが精製され、アミノ酸配列が決定された。そして、調査されたすべての個体においてインスリン-I およびIIに対応する紫外線吸収ピーク

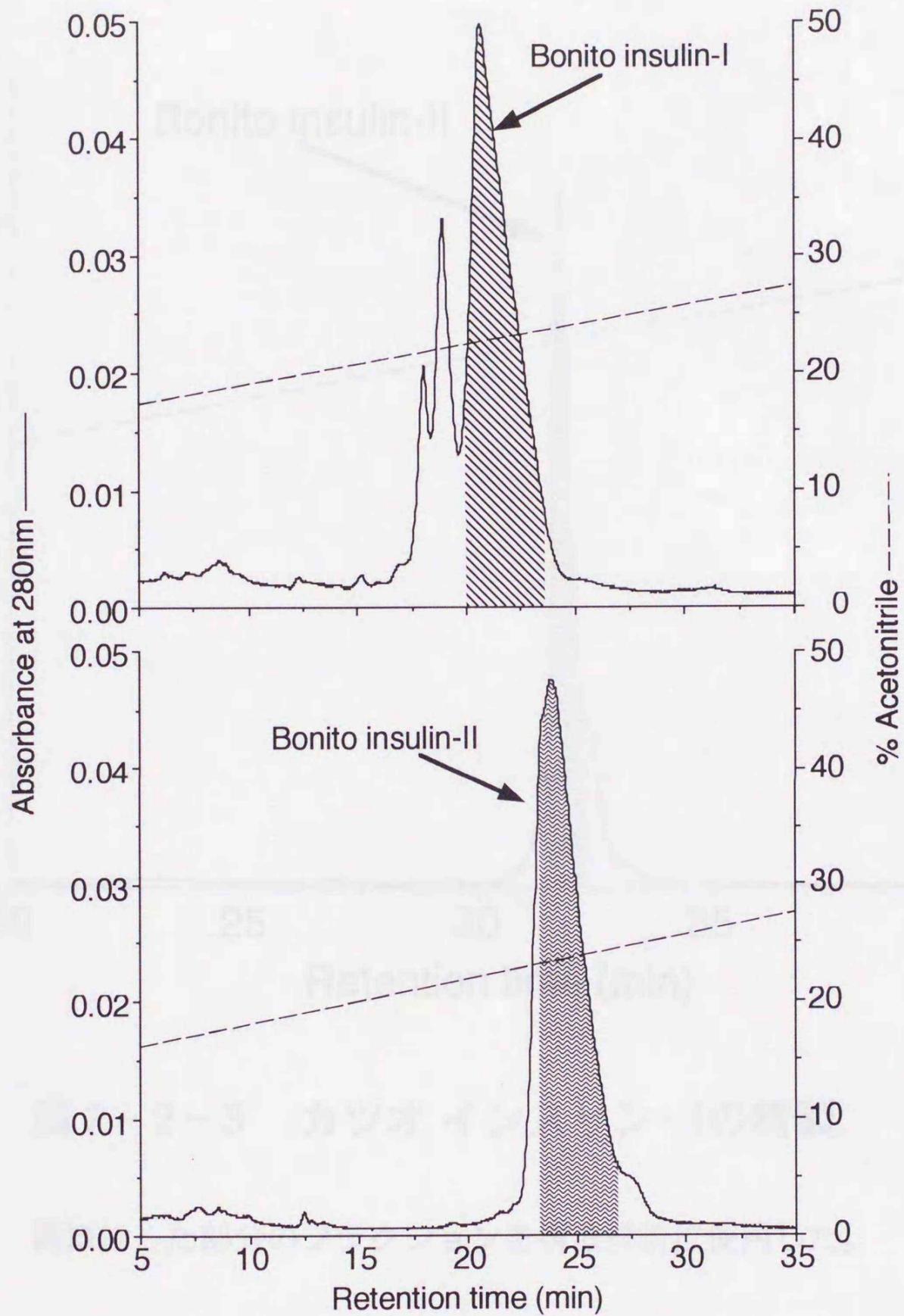


図 2-2-2 カツオ インスリン-I、IIの精製

網掛けした部分のフラクションについてさらに精製あるいは構造解析を行った。

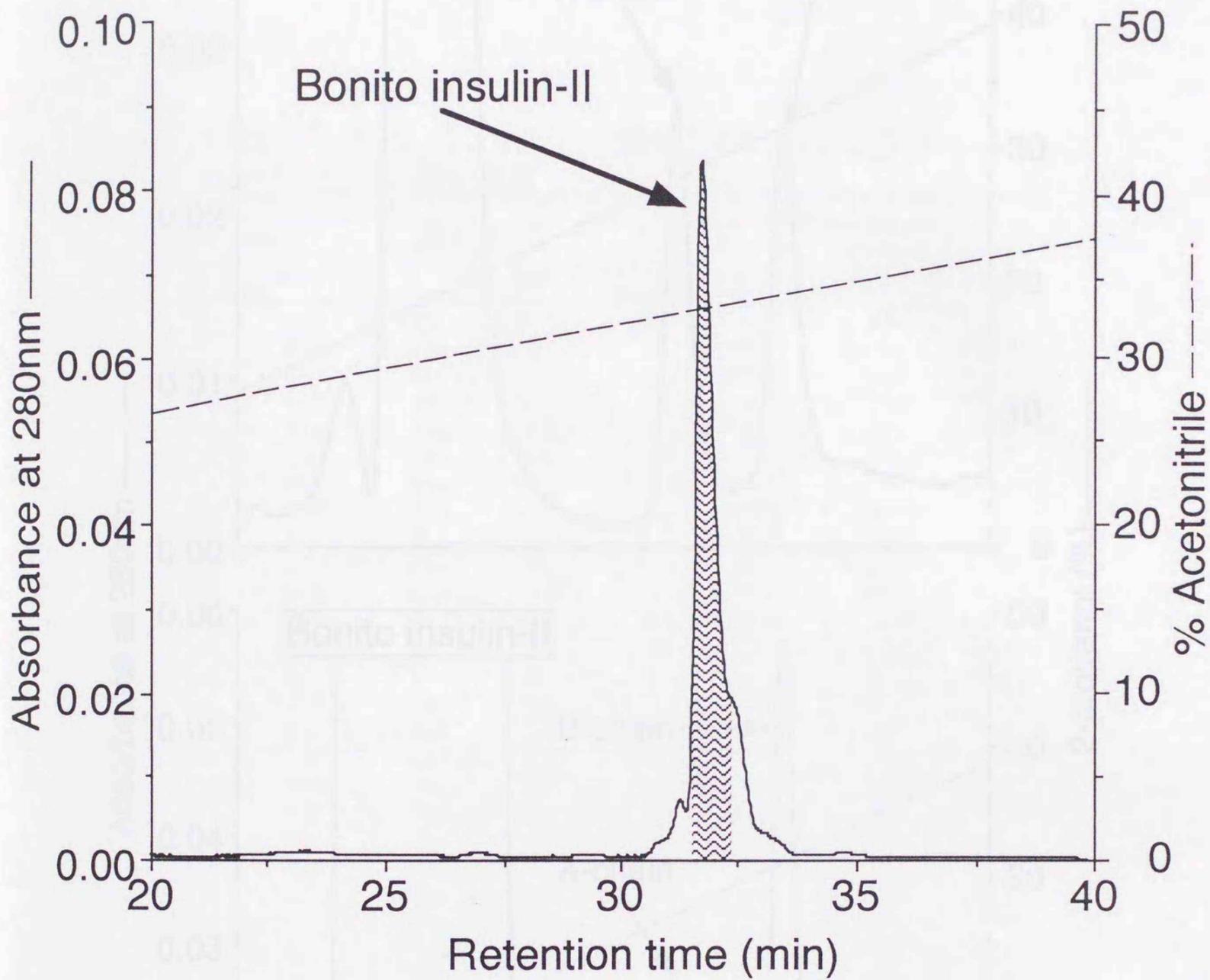


図 2-2-3 カツオ インスリン-IIの精製

網掛けした部分のフラクションを構造解析に使用した。

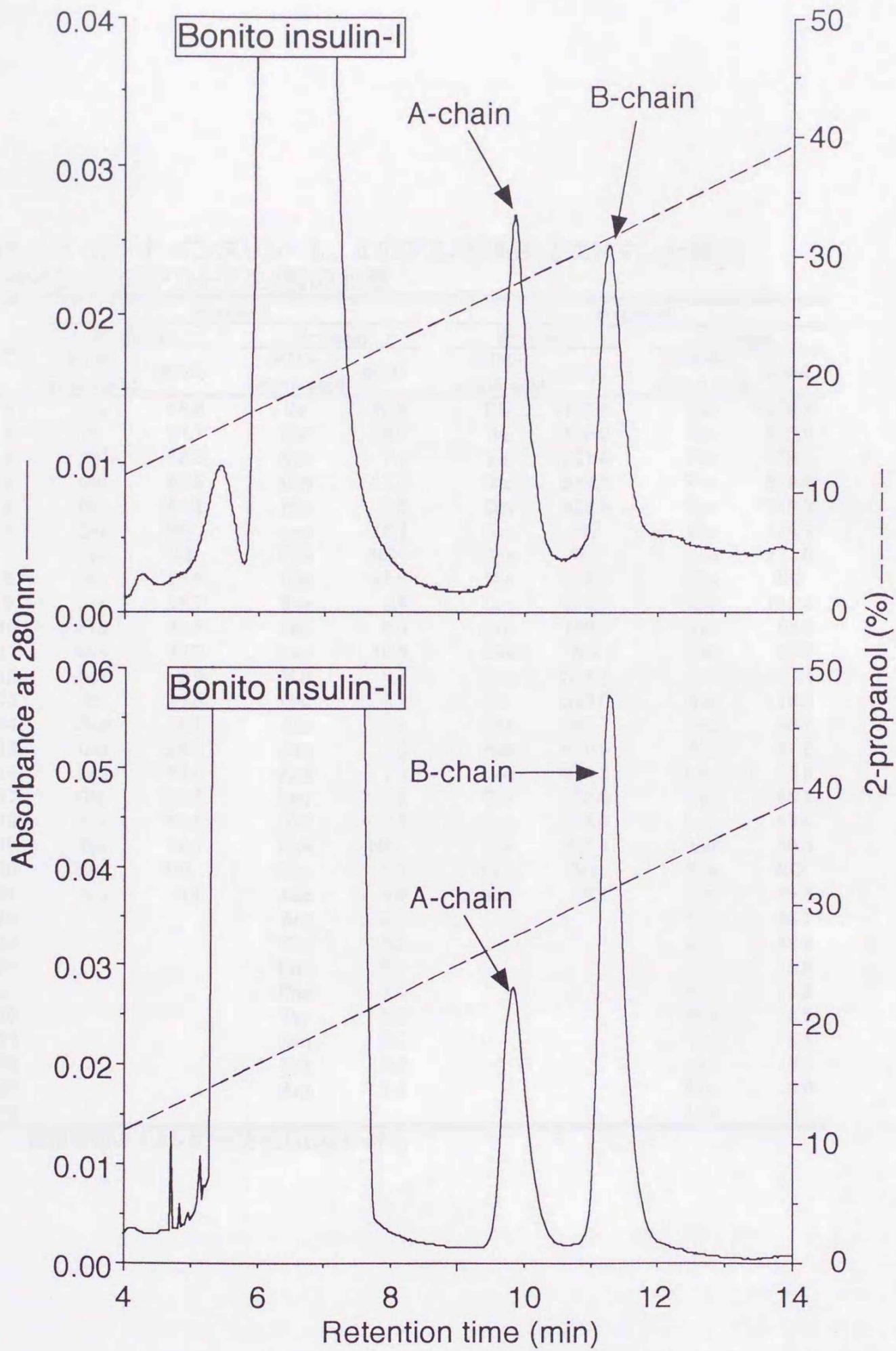


図2-2-4 カツオ インスリン-Iおよび-IIの還元カルボキシメチル化処理後のA、B鎖のHPLCによる分離

表2-2-1 カツオ インスリン-I、IIのアミノ酸配列とエドマン分解の各サイクルでのPTH-アミノ酸の収量

Cycle	Insulin-I				Insulin-II			
	A-chain		B-chain		A-chain		B-chain	
	PTH-amino acid	pmol	PTH-amino acid	pmol	PTH-amino acid	pmol	PTH-amino acid	pmol
1	Gly	48.9	Ile	26.2	Gly	1160.6	Ala	1056.2
2	Ile	61.7	Ser	8.7	Ile	1490.0	Ala	979.0
3	Val	63.3	Ser	7.1	Val	1331.8	Pro	659.1
4	Glu	64.5	Gln	17.7	Glu	949.3	Pro	539.9
5	Gln	47.2	His	8.2	Gln	928.8	Gln	318.0
6	Cys	NQ	Leu	16.7	Cys	NQ	His	194.7
7	Cys	NQ	Cys	NQ	Cys	NQ	Leu	271.0
8	His	25.6	Gly	11.5	His	576.9	Cys	NQ
9	Arg	32.7	Ser	4.4	Lys	833.7	Gly	168.4
10	Pro	35.2	His	6.3	Pro	730.7	Ser	52.6
11	Cys	30.0	Leu	10.6	Cys	NQ	His	65.7
12	Ser	9.6	Val	9.7	Asn	534.1	Leu	117.4
13	Ile	25.5	Glu	8.9	Ile	529.0	Val	110.3
14	Phe	26.9	Ala	8.4	Phe	462.7	Asp	93.4
15	Glu	26.3	Leu	9.2	Asp	430.9	Ala	81.5
16	Leu	23.0	Asn	7.9	Leu	374.2	Leu	82.6
17	Glu	24.3	Leu	8.8	Gln	288.6	Tyr	65.2
18	Asn	18.9	Val	7.8	Asn	246.0	Leu	88.9
19	Tyr	19.7	Cys	NQ	Tyr	212.1	Val	60.0
20	Cys	NQ	Gly	5.9	Cys	NQ	Cys	NQ
21	Asn	9.2	Asp	4.9	Asn	26.1	Gly	29.8
22			Arg	4.9			Glu	25.1
23			Gly	5.3			Arg	39.8
24			Phe	5.7			Gly	19.8
25			Phe	7.0			Phe	13.3
26			Tyr	5.0			Phe	18.9
27			Asn	5.0			Tyr	5.1
28			Pro	3.3			Asn	3.1
29			Arg	1.4			Pro	3.6
30							Lys	0.5

NQ: 濃度既知のスタンダードを使用しなかった。

A-chain

	1	5	10	15	20
Bonito-I ⁽¹⁾	G	I	V	E	Q
Bonito-II ⁽¹⁾	-	-	-	-	-
Barfin flounder-I ⁽²⁾	-	-	-	-	-
Barfin flounder-II ⁽²⁾	-	-	-	-	-
Stone flounder-I ⁽³⁾	-	-	-	-	-
Stone flounder-II ⁽³⁾	-	-	-	-	-
Tilapia ⁽⁴⁾	-	-	-	-	-
Sculpin ⁽⁵⁾	-	-	-	-	-
Anglerfish ⁽⁶⁾	-	-	-	-	-
Cod ⁽⁷⁾	-	-	-	-	-
Chum salmon ⁽⁸⁾	-	-	-	-	-
Japanese eel ⁽⁹⁾	-	-	-	-	-

B-chain

	1	5	10	15	20	25
Bonito-I ⁽¹⁾	I	S	S	Q	H	L
Bonito-II ⁽¹⁾	A	A	P	P	-	-
Barfin flounder-I ⁽²⁾	V	L	P	P	-	-
Barfin flounder-II ⁽²⁾	pQ	A	V	L	P	P
Stone flounder-I ⁽³⁾	V	V	P	P	-	-
Stone flounder-II ⁽³⁾	pQ	A	V	V	P	P
Tilapia ⁽⁴⁾	V	G	G	P	-	-
Sculpin ⁽⁵⁾	A	D	P	-	-	-
Anglerfish ⁽⁶⁾	V	A	P	A	-	-
Cod ⁽⁷⁾	M	A	P	P	-	-
Chum salmon ⁽⁸⁾	A	A	A	-	-	-
Japanese eel ⁽⁹⁾	G	S	T	-	-	-

図 2-2-5 カツオ インスリン-I、II のアミノ酸配列と他種のインスリンとの比較

pQはピログルタミン酸を、-はカツオ インスリン-Iと一致した配列を示す。各アミノ酸配列は次の文献から引用した。(1) *Katsuwonus pelamis*, 本研究; (2) *Verasper moseri*, 第1章第1節; (3) *Kareius bicoloratus*, 第2章第1節; (4) *Oreochromis nilotica*, Nguyen et al., 1995; (5) *Cottus scorpius*, Cutfield et al., 1986; (6) *Lophius americanus*, Neumann et al. (1969); (7) *Gadus callarias* (*G. morhua*のシノニム), Reid et al., 1968; (8) *Oncorhynchus keta*, Rusakov et al. (1990); (9) *Anguilla japonica*, Duan et al. (1992)。

表2-2-2 カツオインスリンのA、B鎖の質量分析

	Insulin-I		Insulin-II	
	A-chain	B-chain	A-chain	B-chain
(M+H) ⁺ measured	2686	3347	2675	3417
(M+H) ⁺ expected	2690	3350	2674	3420

が認められた。このことから、カツオにおいてインスリン-I およびIIは非対立性遺伝子の産物であると考えられる。さらに、インスリン-I とII間に内部のアミノ酸配列の置換が認められた。このことはカツオにおいて両インスリンが2つのインスリン遺伝子からそれぞれ産生されることを示している。この産生様式はラットと共通の様式(ラット型)であり、カレイ類の産生様式(カレイ型)と異なることを示唆している。

カツオ インスリン-IIとマツカワ インスリン-I間のアミノ酸配列置換は4残基のみであった。その一方、カツオ インスリン-Iはマツカワ インスリン-Iとの間に13残基の置換が認められ、カツオ インスリン-IIを含め、他の硬骨魚類のインスリンとも同程度のアミノ酸置換数を示した(図2-2-5)。カツオ インスリン-Iにおいて、かかっている自然選択圧が弱いと考えられるB鎖N末端を除くと、カツオインスリン-IIに比較して置換している8残基のアミノ酸のうち、6残基(A9、A15、A17、B18、B21、B29)は同義置換であり、これらによるインスリンの生物活性発現への影響は小さいことが予想される。また、A鎖12残基目のSerは脊椎動物の中では比較的保存性が低い箇所であり、同様に生物活性発現への影響は小さいと予想される。一方、ほとんどの脊椎動物のインスリンにおいてB鎖16残基目はTyrであり非常に保存性が高い箇所であるが、カツオ インスリン-IにおいてはAsnであった。この箇所はインスリン分子の表面に位置し、レセプターと結合する領域の一部を構成する(Blundell *et al.*, 1972; Blundell and Wood, 1975; Pullen *et al.*, 1976)。したがって、カツオにおいてはマツカワおよびイシガレイと異なり、インスリン-I とIIでは生物活性が異なる可能性が考えられる。

これまでインスリンの一次構造が決定された棘鱗上目魚類はカレイ類を除くとdaddy sculpin (*Cottus scorpius*, Cutfield *et al.*, 1986) とティラピア (*Oreochromis nilotica*, Nguyen *et al.*, 1995) があげられるが、これらが複数のインスリンを含むことは報告されていない。このことから、カツオの2つのインスリン

遺伝子はカツオあるいはその祖先種において重複によって生じたことが予想される。

この可能性に従えば、カツオにおいてインスリン-IIが祖先型分子の特徴を保存しており、インスリン-Iはインスリン-IIから遺伝子重複により生じたものと考えられる。

Yamamoto *et al.*(1960)はカツオ インスリン-IのB鎖1残基目をLeuと決定したが本研究の結果ではIleである。Yamamoto *et al.*(1960)はジニトロフェニル-アミノ酸(DNP-アミノ酸)法と濾紙電気泳動法により両鎖のN末端のアミノ酸を同定した。また、Kotakiら(Kotaki, 1961; Kotaki, 1962; Kotaki *et al.*, 1962; Kotaki, 1963)の結果にも本研究の結果と矛盾がある。Yamamoto *et al.*(1960)とKotakiらはインスリンをカツオブロックマン小体からアセトンで抽出後、得られた抽出物を15~25% NaClにより沈殿させ、この沈殿物をCM-celluloseを使用したイオン交換カラムクロマトグラフィーを2回繰り返すことによって精製した。このクロマトグラフィーは分離能が低く、1回目の溶出ではすべての紫外線吸収ピークが連続しており明確なインスリンのピークは認められない。したがって、Yamamoto *et al.*(1960)およびKotakiらの試料は不純物を高い割合で含むと考えられる。

一方、本研究において、試料の調製を塩酸/エタノール抽出物をアンモニア水によるアルカリ沈殿、エタノール/ジエチルエタノール沈殿により行った。マツカワブロックマン小体を試料にした場合、この方法により10kDa以上の物質はほとんど除去されることがSuperdex75 (Pharmacia)を使用したゲル濾過で確認された。これに続くODS-120Tカラムを使用した逆相クロマトグラフィーはマツカワの2残基のみ異なる二つのインスリンを分離する性能を示す。そして、アミノ酸配列解析はインスリン-Iについては島津製作所 PPSQ-23を、インスリン-IIについてはPerkin Elmer ABI 476Aを使用した。どちらの機種も液相あるいは気相エドマン分解によって得られた各サイクルのPTH-アミノ酸をHPLCにより分離し、溶出時間からアミノ酸を同定する。これらの解析装置において各PTH-アミノ酸の分離は完全である。さらに、質量分析による

(M+H)⁺は決定されたアミノ酸配列とよく一致することから、本研究で決定されたアミノ酸配列の信頼性は高いと考えられる。

Neumann and Humbel (1969) は Yamamoto *et al.* (1960) の方法によって調製されたマグロ・カジキ・カツオのインスリンの混合物を Kotaki から入手し、アミノ酸配列解析を行った。彼らはこの混合物を酵素消化によって断片化し、各断片をイオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過を組み合わせて分離した。各アミノ酸残基の同定はダンシル-エドマン分解、およびカルボキシペプチダーゼ A により遊離させた各断片の末端のアミノ酸を PTH-アミノ酸あるいは DNS-アミノ酸として薄層クロマトグラフィーにより同定している。また、各断片のアミノ酸組成は自動アミノ酸分析装置 (model 120B, Beckmann/Spico, Fullerton, CA) により行った。この一連の方法は Yamamoto *et al.* (1960) の方法により調製された試料をさらに多くの段階によって精製し、純度を高めて解析したことから、信頼性が高いと考えられる。そして、酵素消化によって得られた B 鎖 N 末端の断片の配列を検討したところ、量的に卓越するものとして Val-Ala-Pro-Pro-Gln-His-Leu-Cys、この配列より少ないものとして Ala-Ala-Pro-Pro-Gln-His-Leu-Cys が検出された。また、B 鎖の 20~22 残基の配列として Gly-Asp-Arg、および Gly-Glu-Arg が得られている。解析に使用されたインスリン混合物のマグロ、カジキ、カツオの各インスリンの混合比は不明であるが、これら決定されたアミノ酸配列のうち少ない方の配列は本節で決定されたカツオインスリン-II の配列と一致している。そして、これら以外の配列断片に混合物は認められなかった。これらの結果は本研究のカツオインスリン-II のアミノ酸配列解析結果の妥当性を支持する。しかしながら、インスリン-I に対応するアミノ酸配列を Neumann and Humbel (1969) は得ていない。このことは Kotaki らが一連の研究 (Kotaki, 1961; 1962; Kotaki, 1963) の中で主に解析の材料にインスリン-II を使用していたことから、Neumann and Humbel (1969) はインスリン-II の混合物を受け取ったためと推定される。

還元カルボキシメチル化処理後、逆相クロマトグラフィーのプロファイルにおいて紫外線吸収の高さの比がインスリン-I、II間で異なっていたのはTyr残基数の違いによるものと考えられる。インスリン-IではA、B鎖ともにTyrは1残基、一方、インスリン-IIはA鎖が1残基、B鎖が2残基有していた。紫外線吸収ピークの面積比はこのTyr残基数の比によく一致する。

第3節 ホッケ インスリンの精製と一次構造の解析

前節までに、棘鱗上目魚類には2分子種のインスリンを産生する二つの様式が存在することを明らかにした。すなわち、1分子種のプレプロインスリンからシグナルペプチド領域の切断箇所の違いから2分子種が生じる様式（カレイ型）、および2遺伝子の産物から2分子種が生じる様式である（ラット型）。本節では棘鱗上目に属する他の種としてホッケ (*Pleurogrammus azonus*) のインスリンを精製し、複数の分子種が存在するか否か検討した。

材料と方法

ホッケ (N=35) のブロックマン小体 (570mg) の塩酸アルコール抽出物からエタノール/ジエチルエーテル沈殿法により沈殿を得た。この沈殿を3Mの酢酸溶液に溶解し、2°Cで10,000×g、10分間の遠心分離により沈殿を除去した後、逆相クロマトグラフィーによってインスリンを精製した。精製されたホッケ インスリンは還元カルボキシメチル化処理を行った後、A、B鎖を分離し、それぞれについてプロテインシーケンサーによりアミノ酸配列解析を行った。この精製、構造解析過程は第2章第1節のイシガレイインスリン-IIの精製法にしたがった。なお、A、B鎖の分離にはSource15カラム

(4.6×100mm、Pharmacia) を使用し、溶出条件は第2章第1節にしたがった。得られたペプチドの質量分析は第1章第1節にしたがって行われた。

また、還元カルボキシメチル化処理、AおよびB鎖の分離後の回収率は配列解析によって明らかにされたTyr残基数に基づいて算出された。

そして、5個体のホッケについて個体ごとにブロックマン小体(11~20mg)から第1章第1節にしたがってエタノール/ジエチルエーテル沈殿を調製し、ODS-120T(2.0×150mm、Tosoh)を使用した逆相クロマトグラフィーで分析することにより複数のインスリンの分子種の各個体における存在可能性を検討した。クロマトグラフィーの分析条件は第1章第1節のマツカワのインスリンの個体別の調製法にしたがった。

結果

ホッケ インスリンの精製と構造解析: ODS-120Tカラム(2.0×150mm)を使用した逆相クロマトグラフィーの溶出プロファイルを図2-3-1に示した。卓越する二つの紫外線吸収ピークが29分および33分に認められ、これらをインスリン-IおよびIIと仮定した。そして、これらの紫外線吸収ピークを含むフラクションを採取し、さらに μ RPC C2/C18 SCカラムを使用した逆相クロマトグラフィーによりそれぞれの成分を精製した。図2-3-2にインスリン-IおよびIIのプロファイルを示した。精製されたインスリン-IおよびIIについて質量分析をおこなったところ、 $(M+H)^+$ は m/z 6050と m/z 5727であり、他種のインスリンに近似していた。次に、還元カルボキシメチル化処理を各インスリンについて行った後、逆相クロマトグラフィーによりA、B両鎖を分離した(図2-3-3)。還元前と比較した回収率は紫外線吸収値とアミノ酸配列解析によって明らかにされたTyr残基数からインスリン-IのA鎖およびB鎖について7.7%、44.6%、インスリン-IIのそれらについては78.5%、71.4%と算出された。インスリン-IのA鎖の回収率が極めて低かった。

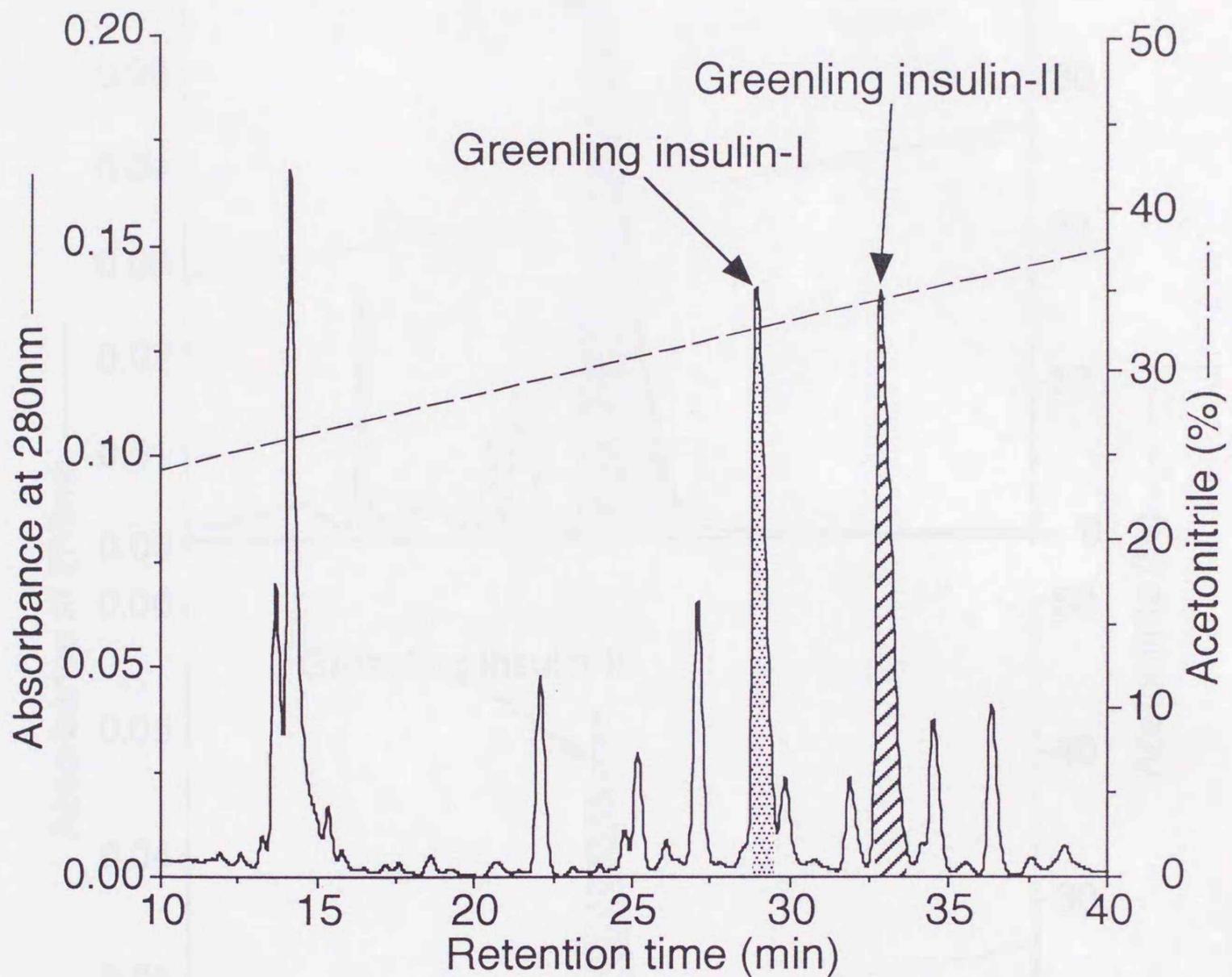


図2-3-1 ホッケのブロックマン小体抽出物の逆相クロマトグラフィー

網掛けした部分のフラクションをさらに精製した。

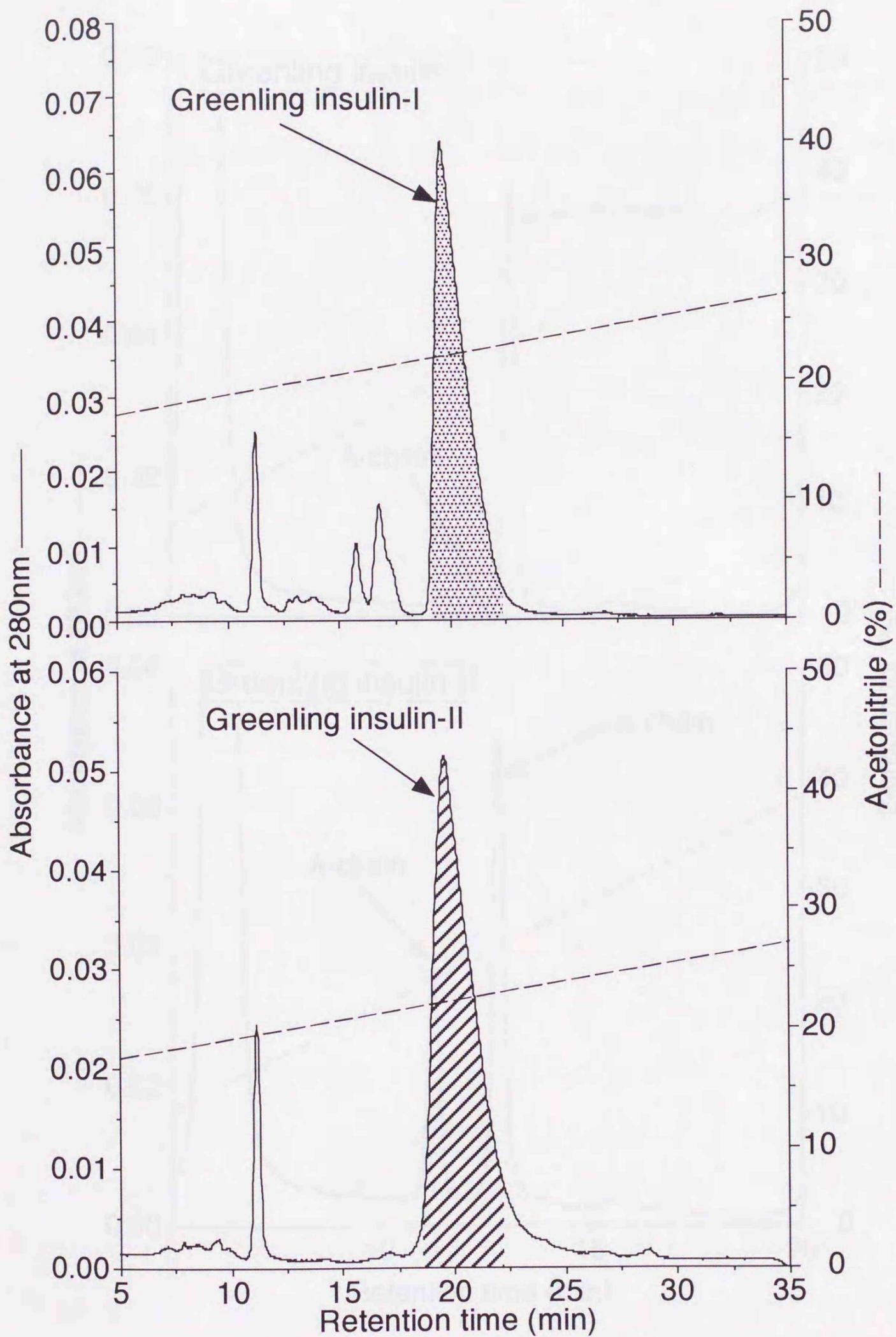


図2-3-2 ホッケインスリン-I、IIの逆相クロマトグラフィーによる精製

網掛けされた部分のフラクションを構造解析に使用した。

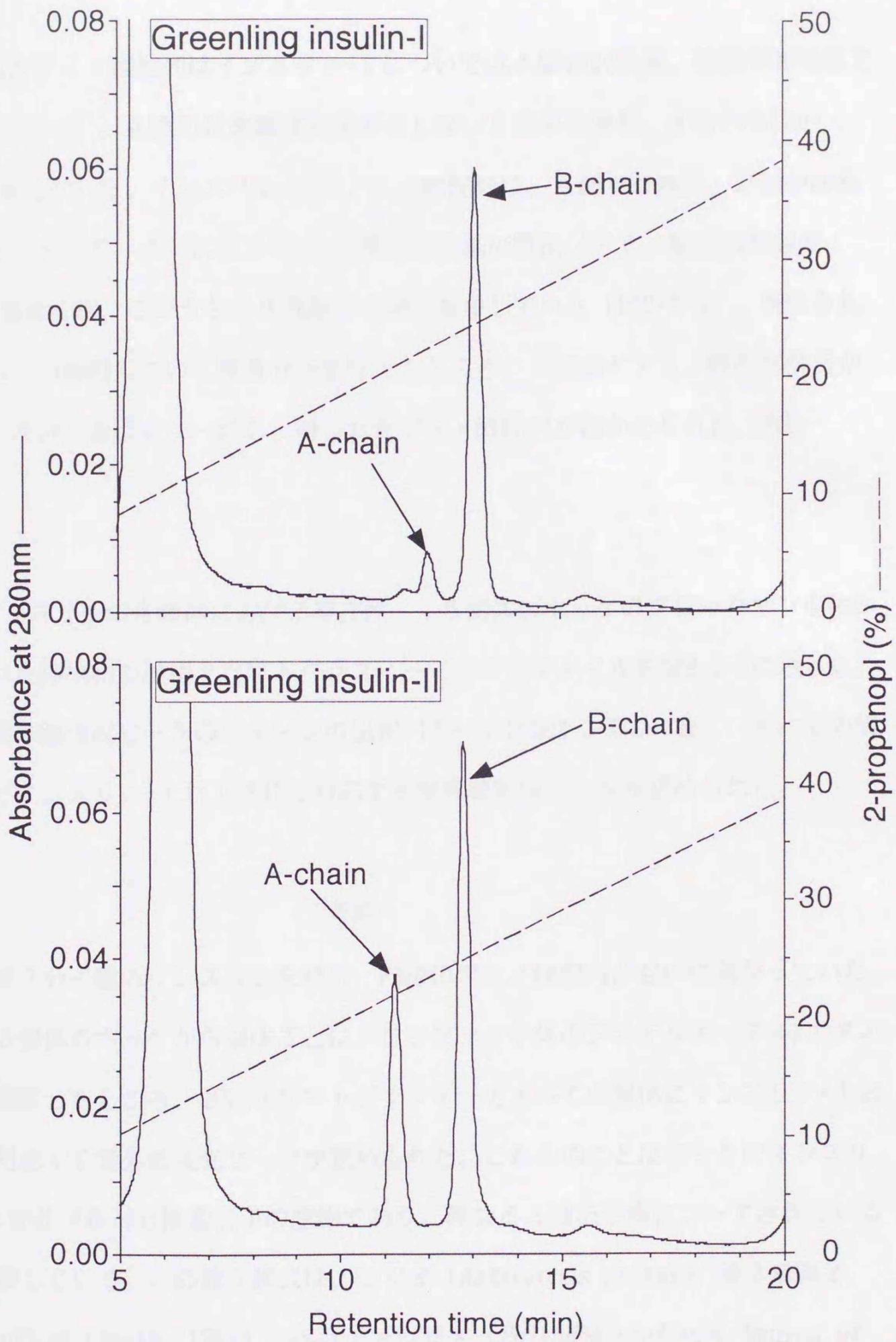


図 2-3-3 ホッケインスリン-I、IIの還元カルボキシメチル化処理後のA、B鎖の分離

決定されたアミノ酸配列はインスリン-IについてはA鎖が24残基、B鎖が30残基であった(表2-3-1)。A鎖のN末端は他種が有しない3残基の伸長、すなわちLeu-Met-Argを有していた。インスリン-IIのアミノ酸配列は、A鎖が21残基、B鎖が30残基であった。そして、インスリン-IとII間で11残基の置換(アミノ酸配列類似度: 78%)が認められ、このうちの9残基がA鎖に集中していた(図2-3-4)。精製されたインスリンの両鎖について質量分析を行ったところ、実測値とアミノ酸配列解析から予想された分子量はよく一致し、得られたアミノ酸配列が確かめられた(表2-3-2)。

ホッケ インスリンの各個体における存在性: 5個体のホッケのブロックマン小体から調製された抽出物の逆相クロマトグラフィーでのプロファイルを図2-3-5に示した。各個体の紫外線吸収ピークのパターンの出現パターンは図2-3-1に一致し、すべての個体についてインスリン-IおよびIIに対応する紫外線吸収ピークが認められた。

考察

ホッケは2分子種のインスリンを有し、内部のアミノ酸配列が互いに異なっていた。そして、5個体のホッケから個体ごとにブロックマン小体のジエチルエーテル/エタノール沈殿を調製したところ、逆相クロマトグラフィーですべての個体にインスリン-IおよびIIに対応する紫外線吸収ピークが認められた。これらのことはホッケのインスリン-IおよびIIが非対立性遺伝子の産物であり、異なる2遺伝子座にコードされていることを示唆している。この産生様式は、カツオ (*Katsuwonus pelamis*, 第2章第2節)、toadfish (Smith, 1966)、ヘラチョウザメ (*Polyodon spathula*, Nguyen *et al.*, 1994)と同様であり、ラット型の分子多型産生様式である。

ホッケと同様にカサゴ目に属するdaddy sculpin (*Cottus scorpius*)は一分子種の

表2-3-1 ホツケ インスリン-I、II のアミノ酸配列とエドマン分解の各サイクルでのPTH-アミノ酸の収量

Cycle	Insulin-I				Insulin-II			
	A-chain		B-chain		A-chain		B-chain	
	PTH-amino acid	pmol						
1	Leu	114.4	Thr	216.2	Gly	599.1	Ala	1288.2
2	Met	117.0	Ser	113.9	Ile	690.3	Ser	237.8
3	Arg	46.6	Gly	518.5	Val	711.2	Gly	980.7
4	Ser	14.1	Pro	413.6	Glu	367.9	Pro	844.4
5	Ile	75.8	Gln	348.6	Gln	379.4	Gln	660.8
6	Leu	72.1	Gln	477.7	Cys	NQ	His	415.3
7	Glu	47.1	Leu	393.6	Cys	NQ	Leu	823.9
8	Lys	53.9	Cys	NQ	His	228.1	Cys	NQ
9	Cys	NQ	Gly	301.4	Arg	198.5	Gly	657.8
10	Cys	NQ	Ser	44.5	Pro	332.5	Ser	124.3
11	Phe	47.9	His	92.8	Cys	NQ	His	328.8
12	Glu	27.8	Leu	282.7	Asn	220.2	Leu	556.4
13	Ala	45.1	Val	277.9	Ile	328.4	Val	532.7
14	Cys	NQ	Asp	90.1	Phe	289.2	Asp	256.4
15	Ser	7.0	Ala	253.5	Asp	143.1	Ala	466.1
16	Ile	27.4	Leu	241.4	Leu	281.9	Leu	478.8
17	Thr	9.0	Tyr	240.5	Gln	206.0	Tyr	445.6
18	Asp	12.0	Leu	272.3	Asn	169.8	Leu	472.8
19	Leu	21.8	Val	240.8	Tyr	225.6	Val	423.4
20	Gln	14.1	Cys	NQ	Cys	NQ	Cys	NQ
21	Ser	3.9	Gly	174.7	Asn	105.6	Gly	338.8
22	Tyr	13.6	Asp	90.4			Asp	198.2
23	Cys	NQ	Arg	138.0			Arg	270.4
24	Asn	4.1	Gly	159.9			Gly	294.2
25			Phe	166.6			Phe	294.7
26			Phe	217.7			Phe	382.2
27			Tyr	159.4			Tyr	270.0
28			Asn	102.1			Asn	192.6
29			Pro	75.5			Pro	123.3
30			Lys	51.3			Lys	87.2

NQ: 濃度既知のスタンダードを使用しなかった。

Insulin A-chain

	1	5	10	15	20
Greenling-I ⁽¹⁾	LMRSILEKCCFEACSIDLQSYCN				
Greenling-II ⁽¹⁾	G-V-Q--HRP-N-F---N---				
Barfin flounder-I ⁽²⁾	G-V-Q--HKP-N-F---N---				
Barfin flounder-II ⁽²⁾	G-V-Q--HKP-N-F---N---				
Bonito-I ⁽³⁾	G-V-Q--HRP---FE-EN---				
Bonito-II ⁽³⁾	G-V-Q--HKP-N-F---N---				
Anglerfish ⁽⁴⁾	G-V-Q--HKP-N-F---N---				
Carp ⁽⁵⁾	G-V-Q--HKP-N-FE--N---				
Salmon ⁽⁶⁾	G-V-Q--HRP-N-F---N---				
Japanese eel ⁽⁷⁾	G-V-Q--HKP-N-F---N---				
Lamprey ⁽⁸⁾	G-V-Q--HRK---Y-MEN---				

Insulin B-chain

	1	5	10	15	20	25	30
Greenling-I ⁽¹⁾	TSGPQQLCGSHLVDALYLVCGRGFFYNPK						
Greenling-II ⁽¹⁾	A-----H-----						
Barfin flounder-I ⁽²⁾	VLP--H--A-----E-----T--						
Barfin flounder-II ⁽²⁾	pQ	AVLP--H--A-----E-----T--					
Bonito-I ⁽³⁾	ISS-H-----E--N-----R						
Bonito-II ⁽³⁾	AAP--H-----E-----						
Anglerfish ⁽⁴⁾	VAPA-H--A-----E-----						
Carp ⁽⁵⁾	NAGAN-H-----E-----P-----						
Salmon ⁽⁶⁾	AAA-H-----K-----						
Japanese eel ⁽⁷⁾	GST-H-----E--F---DK---FN--						
Lamprey ⁽⁸⁾	SALTGA-GTH-----E--V-----T-SKT						

図2-3-4 ホッケインスリン-IおよびIIのアミノ酸配列と他魚種のインスリンとの比較

pQはグルタミン酸を、-はホッケインスリン-Iと一致したアミノ酸配列を示す。各アミノ酸配列は次の文献から引用した。(1) *P. azonus*, 本研究; (2) *Verasper moseri*, 第1章第1節; (3) *Katsuwonus pelamis*, 第2章第2節; (4) *Lophius americanus*, Neumann et al. (1969); (5) *Cyprinus carpio*, Makower et al. (1982); (6) *Oncorhynchus keta*, Rusakov et al. (1990); (7) *Anguilla japonica*, Duan and Hirano (1992) (8) *Lampetra fluviatilis*, Conlon et al. (1995)

表2-3-2 ホツケインスリンのA、B鎖の質量分析

	Insulin-I		Insulin-II	
	A-chain	B-chain	A-chain	B-chain
(M+H) ⁺ measured	3003	3402	2700	3380
(M+H) ⁺ expected	3003	3403	2701	3382

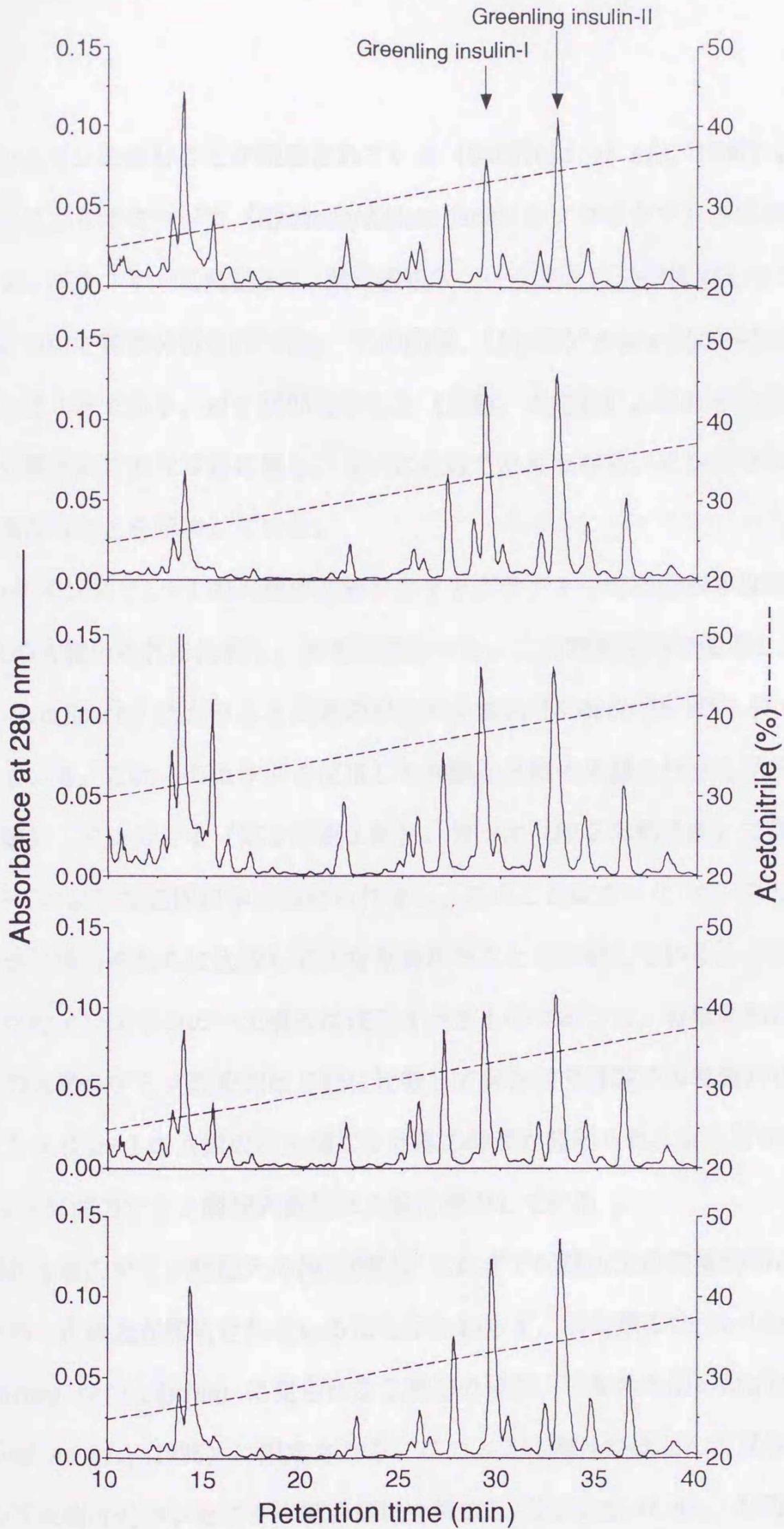


図2-3-5 個体ごとに調製したホッケのブロックマン小体抽出物の逆相クロマトグラフィー

5個体から調製した抽出物のプロファイルを示した。矢印はホッケインスリン-I、IIの溶出時間を示す。

みのインスリンを含むことが報告されている (Cutfield *et al.*, 1986)。また、本節の精製法によりオクカジカ (*Myoxocephalus jaok*) のブロックマン小体の抽出物を逆相クロマトグラフィーに負荷し、紫外線吸収ピークごとに分画採取したフラクションの成分について質量分析を行った。その結果、 $(M+H)^+$ が m/z 5000~7000を示すフラクションは1本であり、 m/z 5695を示した (安藤、未発表)。これらのことはホッケはカジカ類と共にカサゴ目に属し、互いに近縁でありながら、インスリンの産生分子種数が異なることを示唆している。

ホッケインスリン-IのA鎖の逆相クロマトグラフィーでの回収率はホッケインスリン-IIのA鎖のそれに比較し、非常に低かった。この精製段階で使用したResource RPCカラムはSource 15カラムと共通の樹脂系充填剤 (Source 15 RPC, Pharmacia) を使用している。これらのカラムを使用してA鎖とB鎖の分離を行ったマツカワ (第1章第1節)、イシガレイ (第2章第1節)、カツオ (第2章第2節) ではホッケインスリン-Iのような低回収率は認められない。このことはホッケインスリン-Iの物理的性質が他種のそれらに比較してかなり異なることを示唆している。

ホッケのインスリンの一次構造は注目すべきものであった。脊椎動物においてインスリンのA鎖のアミノ酸配列はB鎖に比較して保存的で種間での変異が小さい。しかし、インスリン-IのA鎖のN末端に3残基の伸長が認められ、さらにホッケインスリン-IとII間のアミノ酸配列置換はA鎖に集中していた。

A鎖N末端のアミノ酸配列の伸長例は、これまで60種以上の脊椎動物においてインスリンの一次構造が報告されているにもかかわらず、両生類のthree-toed amphiuma (*Amphiuma tridactylum*) に見られる2残基の伸長、すなわちAla-Argの1例 (Conlon *et al.*, 1996) に限定される。このように例外がほとんど見られないことはA鎖のN末端付近がレセプター結合領域を構成し (Pullen *et al.*, 1972)、生物活性の発現に重要であるとする見解 (Zahn *et al.*, 1972) を支持している。しかしながら、

Conlon *et al.* (1996)は $[^{125}\text{I-Tyr}^{\text{A14}}]$ インスリンを使用したリセプターアッセイにより three-toed amphiumaのインスリンのヒトインスリンレセプターに対するaffinityがブタインスリンのそれよりも高いことを報告した。また、A鎖のN末端にアルギニン を付加したウシインスリンがウシインスリンレセプターに対してウシインスリンよりも高いaffinityを示すことが報告されている。この現象はA鎖の末端がArgの存在により正の荷電を持つことによりレセプターと結合しやすくなるためと考えられている (Rosen *et al.*, 1980)。ホッケインスリン-IはA鎖に多くの置換を含むにもかかわらず、6箇所のシステインの位置およびレセプターと直接結合するB鎖のGly²⁴-Phe²⁵-Phe²⁶-Tyr²⁷は完全に保存されており、しかもN末端付近にArgを持つことから、インスリンレセプターに対して高いaffinityを示す可能性が考えられる。

ホッケインスリン-IIのB鎖のアミノ酸配列はアンコウインスリン (Neumann *et al.*, 1969)、カレイインスリンに比較しB鎖のN末端付近を除くと、他の部分は一致するか3残基の置換のみであった。このことから、ホッケインスリン-I遺伝子よりもホッケインスリン-II遺伝子がより祖先遺伝子の配列を保存しており、ホッケインスリン-I遺伝子はホッケインスリン-II遺伝子から派生したものと考えられる。この遺伝子の進化パターンはカツオのインスリン-IおよびIIに類似している。そして、ホッケのインスリン-IおよびII間のアミノ酸配列類似度 (78%) よりもカツオとホッケのインスリン-Iのアミノ酸配列類似度 (66%) が低いことから、各インスリン-I遺伝子はホッケとカツオがそれぞれ分化した後にそれぞれの種のインスリン-II遺伝子から独立して生じた遺伝子であると考えられる。

B鎖のアミノ酸配列はホッケインスリン-I、II間で高い相同性を示し、置換しているアミノ酸配列は1残基目 (ThrとAla) および6残基目 (GlnとHis) の2残基のみであった。そして、N末端の4残基までを除くとマツカワあるいはアンコウのインスリンのB鎖の配列とは2~4残基のみの置換であり、両インスリンともにA鎖とは対照

的にB鎖は他魚種のインスリンと相同性が高かった。硬骨魚において、A鎖のアミノ酸配列はB鎖のそれよりも相同性が高く、サケ、カレイ、カツオ、ウナギ、アンコウ間では1~2残基の置換のみである(図2-3-4)。なぜ、ホッケインスリン-IのA鎖に置換が多いのかその理由は不明である。

ホッケにおいてインスリン-IとIIの収量は紫外線吸収値から推定してほぼ同程度であった(図2-3-1, 図2-3-5)。このことからアミノ酸配列置換に富むホッケインスリン-Iが通常タイプのインスリン-IIとともにブロックマン小体内でほぼ1:1で産生されることが予想される。

第3章 マツカワ インスリン-I、IIの血液への分泌

第1章でマツカワのブロックマン小体からの抽出物に2分子種のインスリンの存在が認められたが、これらの分子種が血液中に分泌されるかどうかは不明である。また、複数のインスリンの分子種を有する脊椎動物において、血液中に分泌されるインスリンを同定した調査例は認められない。特に、マツカワのインスリン-IとIIのアミノ酸配列の相違はB鎖N末端の2残基のみであることから、インスリン-IIはB鎖N末端が分泌前に切断されてインスリン-Iに変換される可能性が考えられる。したがって、マツカワ インスリンの血液中における両分子種の存在性を検討し、成熟型として血液中に分泌されるインスリンの同定を行うことが重要である。しかしながら、血液中に分泌されたインスリンを精製し、構造解析を行うことは、血液が極めて多種の蛋白質、ペプチドを含むこと、血中インスリン濃度は最高値で数十ng/ml程度であることなどから困難であることが予想される。さらに、インスリン-I、IIに特異的な免疫測定法の開発は両インスリンのアミノ酸配列がほとんど同じであることから期待できない。

インスリン-IとIIは構造的類似性が高いが、逆相クロマトグラフィーにより分離が可能である(第1章第1節)。そこで、インスリン分泌を誘導した個体の血液を逆相クロマトグラフィーで分画し、両分子種を認識する免疫測定法により分子種を同定することが期待できる。本章では、マツカワにおいて血液中のインスリン-IおよびIIの存在性を明らかにするために以下の4点、すなわち、(1)マツカワインスリン-I、IIをともに認識する免疫測定法の開発(第1節)、(2)血中インスリン濃度と摂餌の関係の解明および(3)インスリン分泌誘導作用を持つ物質の検索(第2節)、(4)血漿を逆相クロマトグラフィーにより分画し、各フラクションのインスリン免疫活性から血漿中のインスリン-I、IIの存在性の確認(第3節)、について行った。

第1節 マツカワ インスリンの酵素免疫測定法の開発

これまで魚類において、インスリン測定のための免疫測定法はホモロガス放射免疫測定法としてメクラウナギ用 (Emdin and Steiner, 1980)、タラ用 (Patent and Foa, 1971)、サケ用 (Plisetskaya *et al.*, 1986; Rusakov *et al.*, 1990)、catfish用 (Albert, 1982)、カツオ用 (Furuichi *et al.*, 1980; Tilzey *et al.*, 1985) のものが開発されてきた。Tilzey *et al.* (1985) は抗カツオインスリン抗血清と I^{125} で標識したカツオインスリンを使用した放射免疫測定法を開発したが、turbotの血清はカツオインスリンと平行性を示さないことを報告している。このことは魚類においてインスリン免疫測定法は対象種のインスリンに対する抗血清を使用したホモロガス測定法を開発する必要性を示唆している。

また、放射免疫測定法は感度が高く、手順が単純であるという利点を有するが、その一方、廃液、廃棄物の処理が困難、測定者の健康に悪影響を及ぼす、標識ホルモンが不安定である、などの欠点を有する。それに対して、酵素免疫測定法は放射免疫測定法におけるこれらの問題点がない。そこで、本節ではマツカワインスリン酵素免疫測定法を新たに開発し、その検出限界量、特異性を検討した。

材料と方法

抗マツカワ インスリン-II血清の作製： 第1章第1節の方法（エタノール/ジエチルエーテル沈殿法）により精製したマツカワ インスリン-IIをモルモットに2週間間隔で80 μ gずつ3回、さらに30 μ gずつ3回注射した。第1回目の注射にはフロイントの完全アジュバントを使用し、第2回目以降にはフロイントの不完全アジュバントを使用した。最後の注射から2週間後に全採血し血清を得、シリンジフィルター（口径：0.45 μ m）で濾過し抗マツカワインスリン-II抗血清（Lot.951219-01）とした。

ビオチン化マツカワ インスリン-IIの作製： 第1章第1節の方法（エタノール/ジエチルエーテル沈殿法）で精製したマツカワ インスリン-II (50 μ g)をbiotin labeling kit (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) を使用してビオチン化した。このキットはbiotinamidocaproateを使用して分子中のアミノ基をビオチン化する。未反応のbiotinamidocaproateを0.01% チメロザールを含むリン酸緩衝液（50mM リン酸緩衝液, 140mM NaCl, pH 7.4; PBS）で平衡化したSephadex G-25 Superfine (3.2 \times 100mm, Pharmacia) を使用したゲル濾過で除去した。

マツカワ インスリン酵素免疫測定法： アフィニティー精製された抗ホルモットIgG抗体溶液（Chemicon, Temecula, CA）を0.02% アジ化ナトリウムを含む50mM 炭酸水素ナトリウム緩衝液（pH 9.6）で10 μ g/mlに希釈し、96穴マイクロプレート（Immuron 600 FIA Black plate, Greiner, Germany）に 125 μ lずつ分注して、4 $^{\circ}$ Cで一晩コーティングした。次に、0.05% Tween20を加えた PBS (PBS-T) による3回の洗浄後、75 μ lの抗血清-ビオチン化マツカワインスリン-II混合液（抗血清:1/44,000、ビオチン化マツカワインスリン-II:200 pg/ml、1% BSAを含むPBS）および5 μ lのインスリン標準溶液あるいはサンプルを分注し、4 $^{\circ}$ C、一晩インキュベートした。このステップでの希釈には1% BSAおよび0.01% チメロザールを含むPBS (PBS-AT) を使用した。再びPBS-Tによる3回の洗浄後、streptavidin-peroxidase (Boehringer) をPBS-ATで1/40,000に希釈した溶液を100 μ lずつ各ウェルに分注し、15 $^{\circ}$ Cに調整したウォーターバス中で2~3時間インキュベートした。5回のPBS-Tによる洗浄後、氷上で3-*p*-(hydroxyphenyl)propionic acidを30mM含む100mM リン酸緩衝液（pH 8.0）を分注し、さらに15 μ lの0.026% 過酸化水素溶液を分注した。次に15 $^{\circ}$ Cに調整したウォーターバス中で65~100分間インキュベート後、プレートを氷上に移し、100 μ lの150mM グリシン-NaOH緩衝液（pH 10.3）で発色反応を停止した。そして、蛍光強度を蛍光プレー

トリーダー (Fluoroskan-II、Labsystems、Helsinki、Finland) により、励起波長 320 nm、測定波長 405 nm として各ウェルの蛍光強度を測定した。以上の操作の概略を 図3-1-1 に示した。

マツカワあるいはカツオのブロックマン小体抽出物の逆相クロマトグラフィー： マツカワのブロックマン小体抽出物の逆相クロマトグラフィーを第1章第1節に、カツオのブロックマン小体抽出物の逆相クロマトグラフィーを第2章第2節にしたがって行った。得られた各フラクションを110倍にPBS-ATで希釈し、各フラクションの5 μ l を酵素免疫測定法に使用した。

結果

酵素免疫測定法の特異性および感度： 図3-1-2に標準曲線と哺乳類膵ホルモンとの交差性を示した。マツカワ インスリン-I とIIの標準曲線は一致せず、インスリン-IIの検出限界がインスリン-Iのそれよりも低かった。ウェルあたりの検出限界量はインスリン-Iについては8 pg/well、インスリン-IIについては4 pg/wellであった。ヒト ソマトスタチン、ヒト グルカゴン、ヒト 膵ポリペプチドとの交差性は認められなかった。ウシ インスリンはこれら哺乳類のペプチドホルモンよりも蛍光強度が低い傾向を示したが、マツカワ インスリンとの平行性は認められなかった。

マツカワブロックマン小体抽出物との交差性： マツカワのブロックマン小体抽出物の逆相クロマトグラフィーの各フラクションの免疫活性を測定した結果を図3-1-3に示した。インスリン-IあるいはIIを含む76~83分に溶出されるフラクションに免疫反応陽性が認められた。これらのフラクションは79~80分のフラクションがもっとも反応が高く、110倍に希釈したにもかかわらず検出上限を越えた。これら以外の多くのフラ

Coating of anti-guinea pig IgG

Step 1

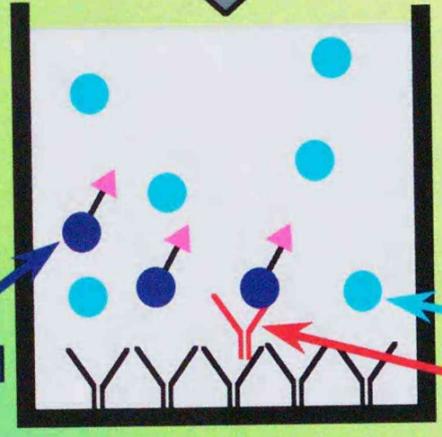


Competition of biotinylated insulin-II and insulins in sample over anti-insulin-II IgG

Step 2

Biotinylated insulin-II

Insulins
Guinea pig anti-insulin-II



Introduction of streptavidin-HRP*

Step 3

Streptavidin-HRP



Detection of HRP activity by fluorescence microplatereader

Step 4

Substrate: $H_2O_2 + HPPA^{**}$

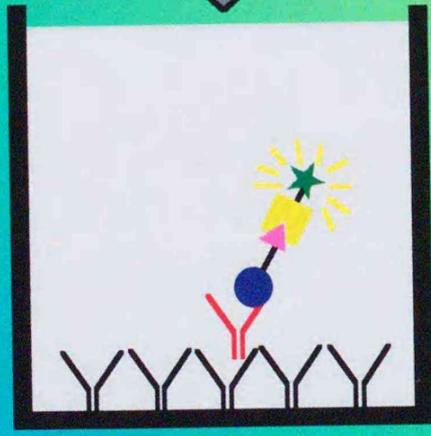


図 3-1-1 マツカワインスリン酵素免疫測定法の手順

*: Horseradish peroxidase
**: 3-(p-hydroxyphenyl)propionic acid

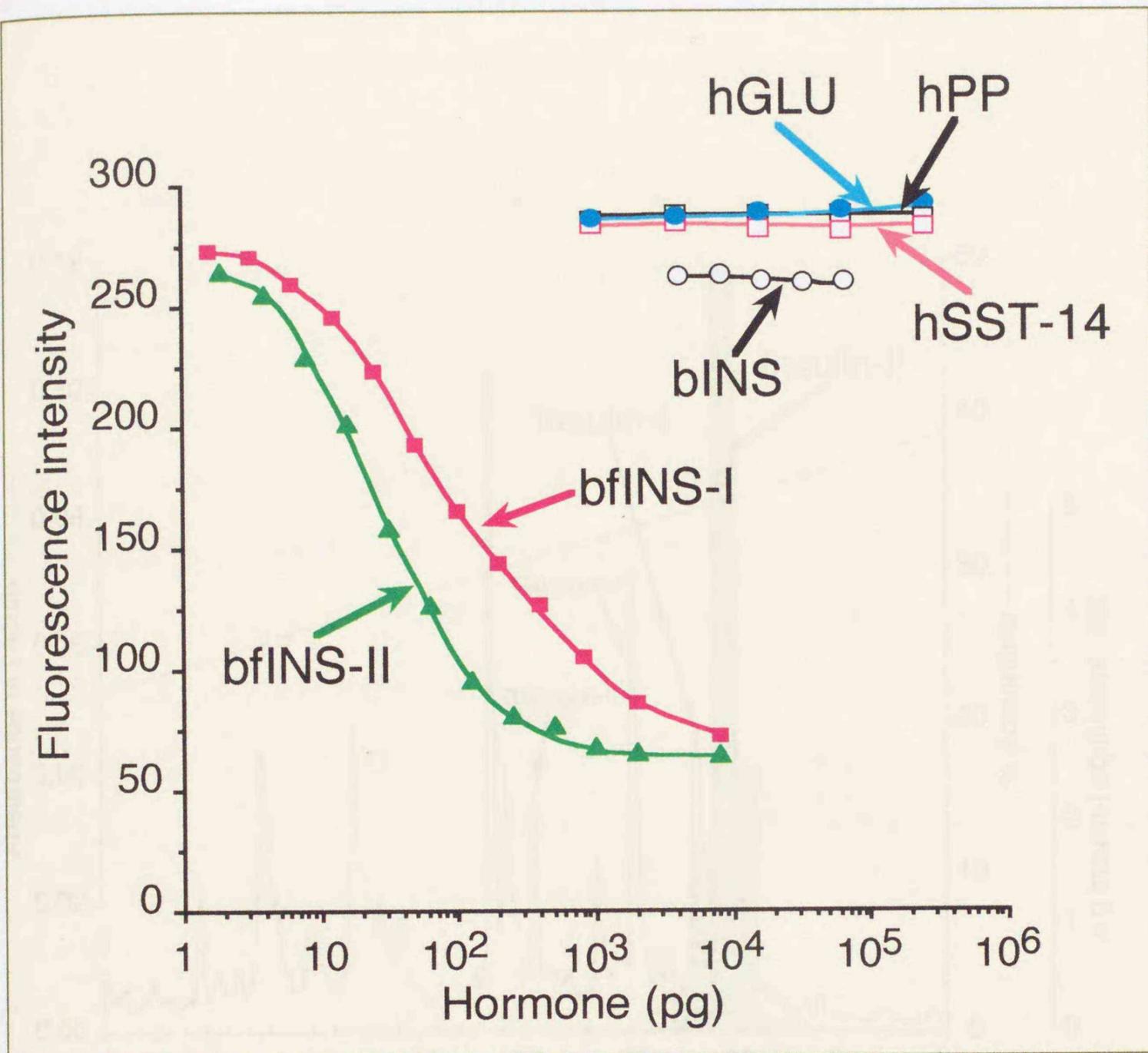


図 3-1-2 マツカワ酵素免疫測定法の結合阻害曲線

bfINS-I、bfINS-II、bINS、hGLU、hPP、hSST-14はそれぞれマツカワインスリン-I、マツカワインスリン-II、ウシインスリン、ヒトグルカゴン、ヒトパンクレアティックポリペプチド、ヒトソマトスタチン-14を示す。

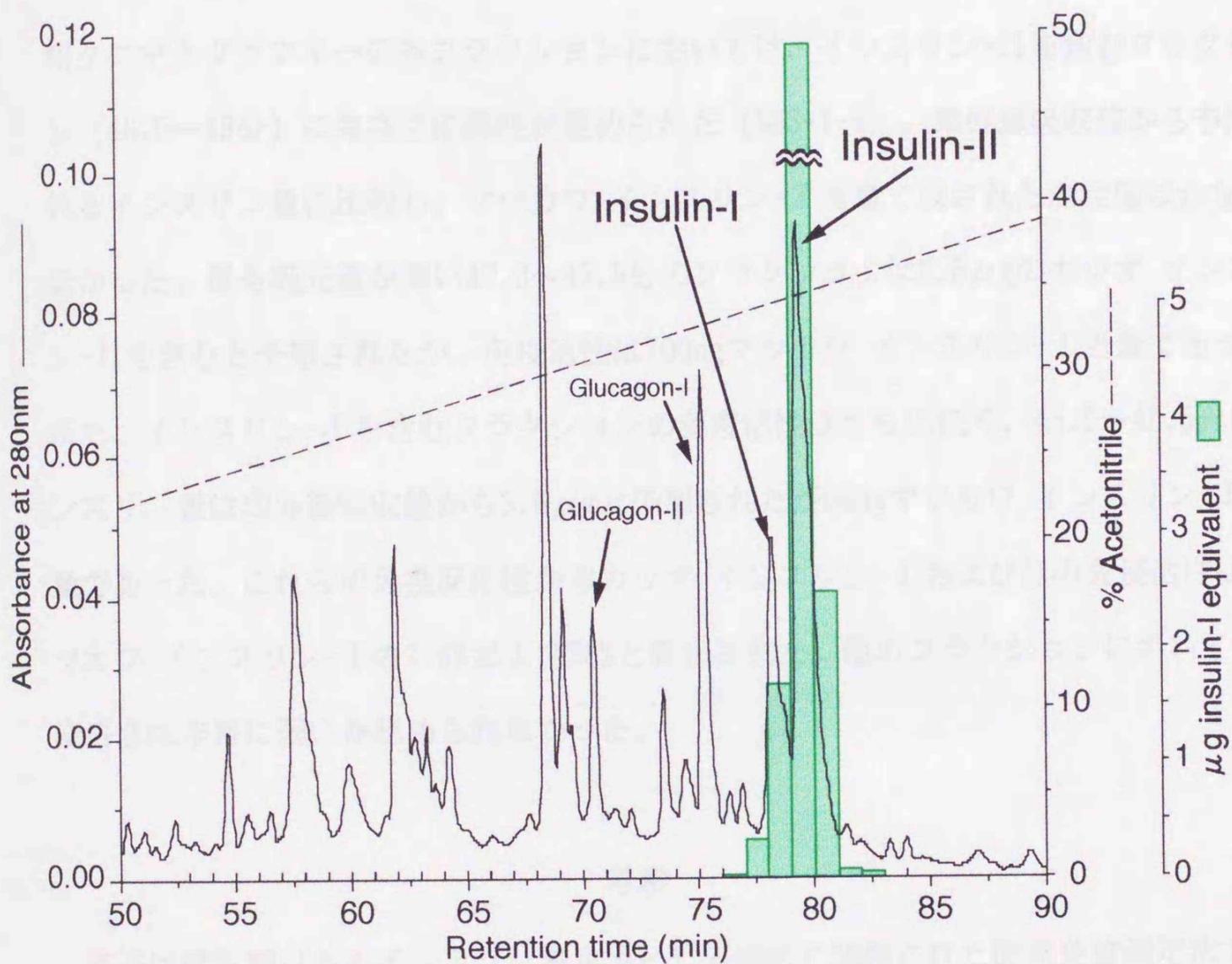


図3-1-3 マツカワのブロックマン小体抽出物の逆相クロマトグラフィーによるフラクションのインスリン免疫反応性

各フラクションの免疫反応性はマツカワインスリン-I当量として示した。79-80分のフラクションは測定上限を越えた。

クションに高い紫外線吸収ピークが観察されたが免疫活性は認められなかった。

カツオブロックマン小体抽出物との交差性：カツオのブロックマン小体抽出物の逆相クロマトグラフィーの各フラクションにおいては、インスリン-IIを含むフラクション(46.5~49分)に免疫反応陽性が認められた(図3-1-4)。紫外線吸収値から予想されるインスリン量に比較し、マツカワインスリン-I当量で表された測定値はかなり低かった。最も吸光値が高い47.0~47.5分のフラクションは2.5 μ gのカツオインスリン-IIを含むと予想されたが、免疫活性は700ngマツカワインスリン-I当量であった。また、インスリン-Iを含むフラクションの免疫活性はさらに低く、45.5~46.5分のインスリン量は紫外線吸収値から3.6 μ gと予想されたが60ngマツカワインスリン-I当量であった。これらの免疫反応性からカツオインスリン-IおよびIIの免疫活性はマツカワインスリン-Iの1.6%および28%と算出された。他のフラクションにおいては免疫活性は非常に弱いか認められなかった。

考察

本法は哺乳類以外のインスリン測定用として初めて開発された酵素免疫測定法である。検出限界量はタラ用(Patent and Foa, 1971)、あるいはサケインスリン用放射免疫測定法(Plisetskaya *et al.*, 1986)と同等であった。

哺乳類膵ホルモンおよびマツカワのブロックマン小体抽出物のインスリンを含まないフラクションと交差性は認められず、本法の高い特異性が示された。マツカワにおいて、インスリン-I、II間でアミノ酸配列が異なるのはB鎖のN末端の2残基のみである。したがって、本法において使用した抗血清がインスリン-Iに比較してインスリン-IIとの交差性が高かったことは、抗血清がインスリン-IIのB鎖のN末端を認識する抗体を多く含んでいたためと考えられる。また、Geiger and Langer (1973)はヒト

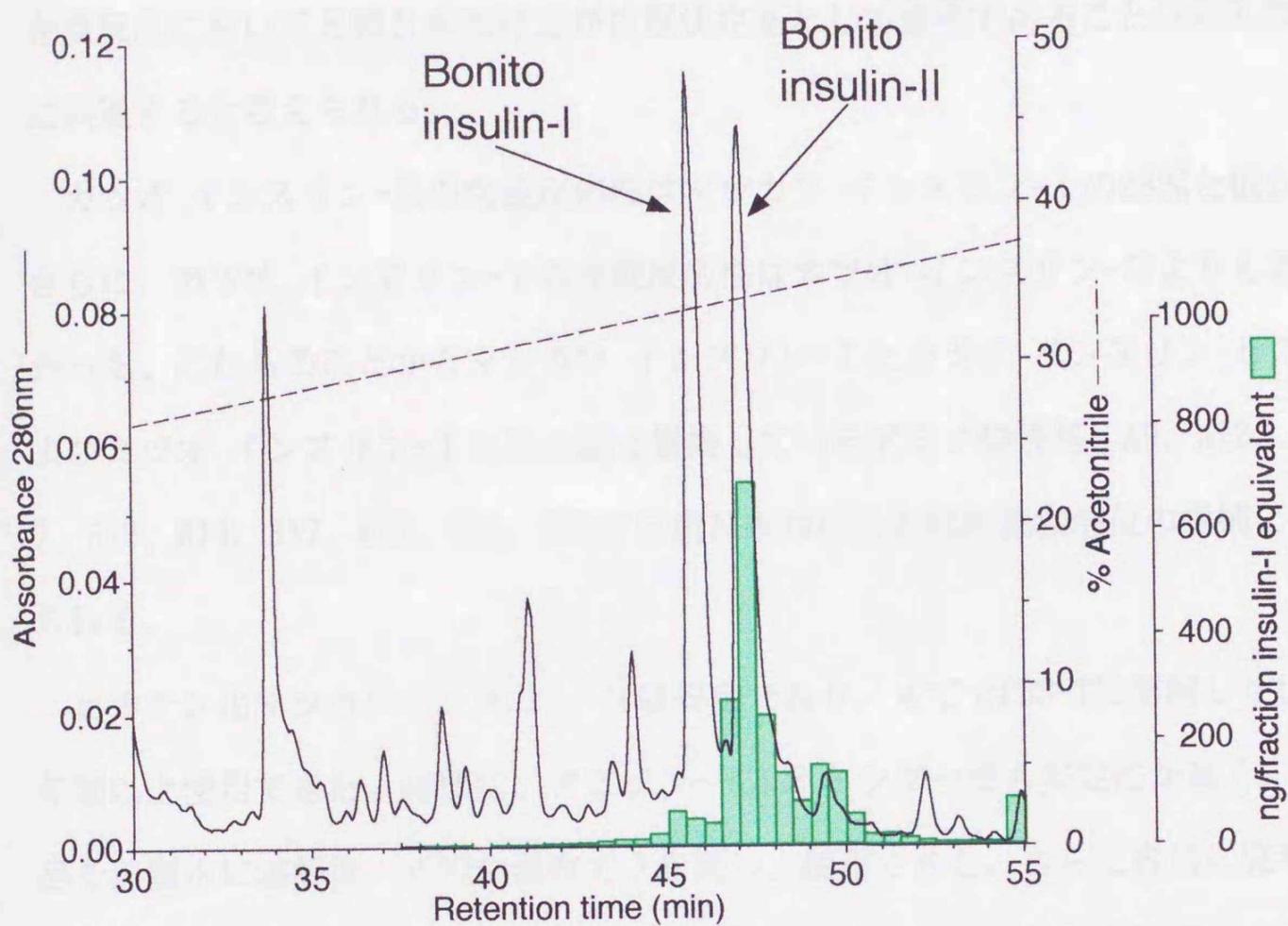


図 3-1-4 カツオブロックマン小体抽出物の逆相クロマトグラフィーのフラクションの免疫反応性

各フラクションの免疫反応性はマツカワインスリン-I当量として示した。

のdes-(Phe-Val)^{B1-B2}-insulinのウサギ血糖降下作用が通常インスリンに比較し95～100%であるのに対して、免疫反応性は2%であることを報告している。インスリンの免疫反応においてB鎖N末端付近が抗原決定基として重要であることは哺乳類と魚類に共通すると考えられる。

カツオ インスリン-IIの免疫反応性はマツカワ インスリン-Iの28%と低かった。さらに、カツオ インスリン-Iの免疫反応性はカツオ インスリン-IIよりも著しく低かった。これらのことからマツカワ インスリン-Iとカツオ インスリン-IIの間、およびカツオ インスリン-IとIIの間で置換しているアミノ酸残基、A9、A12、A14、A17、B10、B14、B17、B22、B28、B30がB鎖N末端以外の抗原認識部位の候補として考えられる。

ビオチン化マツカワインスリン-IIは安定であり、4℃でPBS-Tに溶解した状態で2年間以上使用できた。同様に、アビジン-ペルオキシダーゼも安定性が高く、凍結乾燥品を蒸留水に溶解後、4℃の保存で2年間以上使用できた。さらに容易に廃棄処理できる。これらのことは不安定で廃棄法に規制がある放射性同位元素標識のインスリンに優る点である。

これまでいくつかの魚種において放射免疫測定法が確立され、血中のインスリン濃度の測定に応用されてきた。しかしながら、使用した実験魚が複数のインスリンを有する場合はこれまで開発された放射免疫測定法では正確に測定できない可能性が考えられる。このことはこれまで開発された放射免疫測定法においてほとんど考慮されていないと思われる。特にカツオおよびホッケのインスリン濃度の測定に際してはこの点に注意が必要である。

本節で開発した測定法において、インスリン-IIに対する免疫活性はインスリン-Iに対するそれよりも高かった。したがって、測定試料が両インスリンを含んでいる場合には、標準物質としてインスリン-Iを使用すると測定値は高濃度ほど過剰評価され

るのに対して、インスリン-IIを使用すると同じく過小評価されるようになる。したがって、血中に分泌されているインスリンの各分子種の組成を検討することが正確なインスリン濃度の把握に重要である。

第2節 アミノ酸、グルコース、餌料の インスリン分泌誘導効果

前節では、マツカワ インスリンを特異的に検出、定量する酵素免疫測定法を開発した。血液中のインスリンを免疫学的に同定するためには、インスリンを分泌誘導する物質の検索を行い、どのような生理的状态下でインスリンが分泌されるのかを調査する必要がある。魚類において摂餌により血中インスリン濃度が上昇し、絶食により減少することが報告されている (Navarro *et al.*, 1993; Navarro and Gutierrez, 1995)。また、アミノ酸とグルコースはインスリン分泌誘導作用を持つことが知られている (Ince and Thope, 1977; Ronner and Scarpa, 1987; Plisetskaya *et al.*, 1991)。本節では、マツカワについて給餌と血中インスリン濃度の関係、およびアミノ酸とグルコースのインスリン分泌誘導効果を比較検討した。

材料と方法

給餌と血清中インスリン濃度の関係 (実験1) : マツカワ (体長: 120~160mm) を 15°Cに調整した300 lの水槽で飼育した。給餌区には毎日一回、人工餌量 (C-3000、協和発酵、東京) を飽食量与えた。一方、絶食区は実験終了まで無給餌とした。実験開始から17日後に実験魚を0.01% 4-アミノ安息香酸エチルを含む海水に浸して麻酔し、各個体の尾柄部から注射器により採血した。採取した血液は室温で1時間放置した後、

2°Cで 800×g、10分間、および10,000×g、10分間の遠心分離により血餅および血球を除去した。得られた上清は血清とし、解析まで冷凍保存した。そして、前節で開発した酵素免疫測定法により血清の総インスリン濃度を測定した。なお、標準物質としてPBS-ATに溶解したマツカワインスリン-Iを使用し、測定値をマツカワインスリン-I等量とした。

アミノ酸とグルコースのインスリン分泌誘導効果 (実験2) : マツカワ (体長: 170~210mm) を一ヶ月間絶食させ、15°Cに調整した300 l 水槽中で飼育した。実験1と同様に4-アミノ安息香酸エチルにより麻酔し、0.7MのL-アルギニン塩酸塩 (アルギニン)、L-ヒスチジン塩酸塩 (ヒスチジン)、D-グルコース (グルコース)、NaClをそれぞれ10μl/g体重の割合で筋肉注射した。ただし、それらのうち、前2者の溶液は2 M NaOHによりpH 7.4に調整した。注射直前から1.5時間ごとに4.5時間後までヘパリン処理した注射器により尾柄部から採血し、2°Cで 800×g、10分間、および10,000×g、10分間の遠心分離により血球を除去した。得られた上清は血漿として解析まで冷凍保存した。前節で開発した酵素免疫測定法により、得られた血漿を試料として総インスリン濃度を測定した。標準物質にPBS-ATに溶解したマツカワインスリン-Iを使用し、測定値をマツカワインスリン-I等量とした。

血漿第1級アミン濃度をfluorescamineを使用した蛍光測定法 (Stein *et al.*, 1972) により測定した。すなわち、血漿10μlに90μlの5% トリクロロ酢酸を加え、室温で1時間インキュベートした後、10,000×g、10分間の遠心により沈殿物を除去した。得られた上清の10μlに1.5mlの0.2M ホウ酸溶液 (pH 9.0) および500μlの0.01% fluorescamineアセトン溶液を加え、励起波長390nm、測定波長485nmにより蛍光強度を測定した。標準物質にL-ロイシンを使用した。

さらに、血漿グルコース濃度をグルコース測定キット、Glu-C Test WAKO (和光純薬、

東京) により、血漿10 μ lを使用して測定した。

結果

実験1において、給餌区の血清総インスリン濃度は18.4 \pm 3.7ngインスリン-I当量/mlであり、絶食区の1.5 \pm 0.1ngインスリン-I/ml当量よりも有意に高かった(図3-2-1)。

実験2において、アルギニン注射区の血漿インスリン濃度は注射直前の2.6 \pm 0.3ng/ml(平均 \pm SEM)から注射3時間後には最高値の95.3 \pm 23.5ng/mlに達し、アルギニンの強いインスリン分泌誘導作用が認められた。一方、グルコース注射区の血漿インスリン濃度は注射直前の2.9 \pm 0.1ng/mlから1.5時間後に最高値の6.5 \pm 0.6ng/mlまで上昇したが、アルギニンに比較して効果が弱かった。これらの効果はいずれも注射直前(0hr)の濃度と比較して有意であった($p < 0.05$)。これに対して、ヒスチジンおよびNaClの場合にはインスリン分泌誘導効果は認められなかった(図3-2-2)。

血漿第1級アミン濃度はアルギニンおよびヒスチジン注射区において1.92 \pm 0.09 μ mol/mlおよび2.21 \pm 0.11 μ mol/mlから注射後1.5時間に最高値の13.63 \pm 0.78 μ mol/mlおよび16.45 \pm 0.51 μ mol/mlに達し、その後緩やかに減少した。グルコースおよびNaCl注射区においては有意な減少が認められたがそれらの効果は小さかった(図3-2-3)。

血漿中のグルコース濃度はグルコース注射区で0.88 \pm 0.06 μ mol/mlから注射後1.5時間で22.36 \pm 0.32 μ mol/mlの最高値を示す有意な増加が認められた。その後、時間の経過と共に緩やかに減少した。アルギニン、ヒスチジン、およびNaClの各注射区においてもそれぞれ有意な上昇が認められたが、それらの上昇の程度はグルコース注射区の場合に比較して小さかった(図3-2-3)。

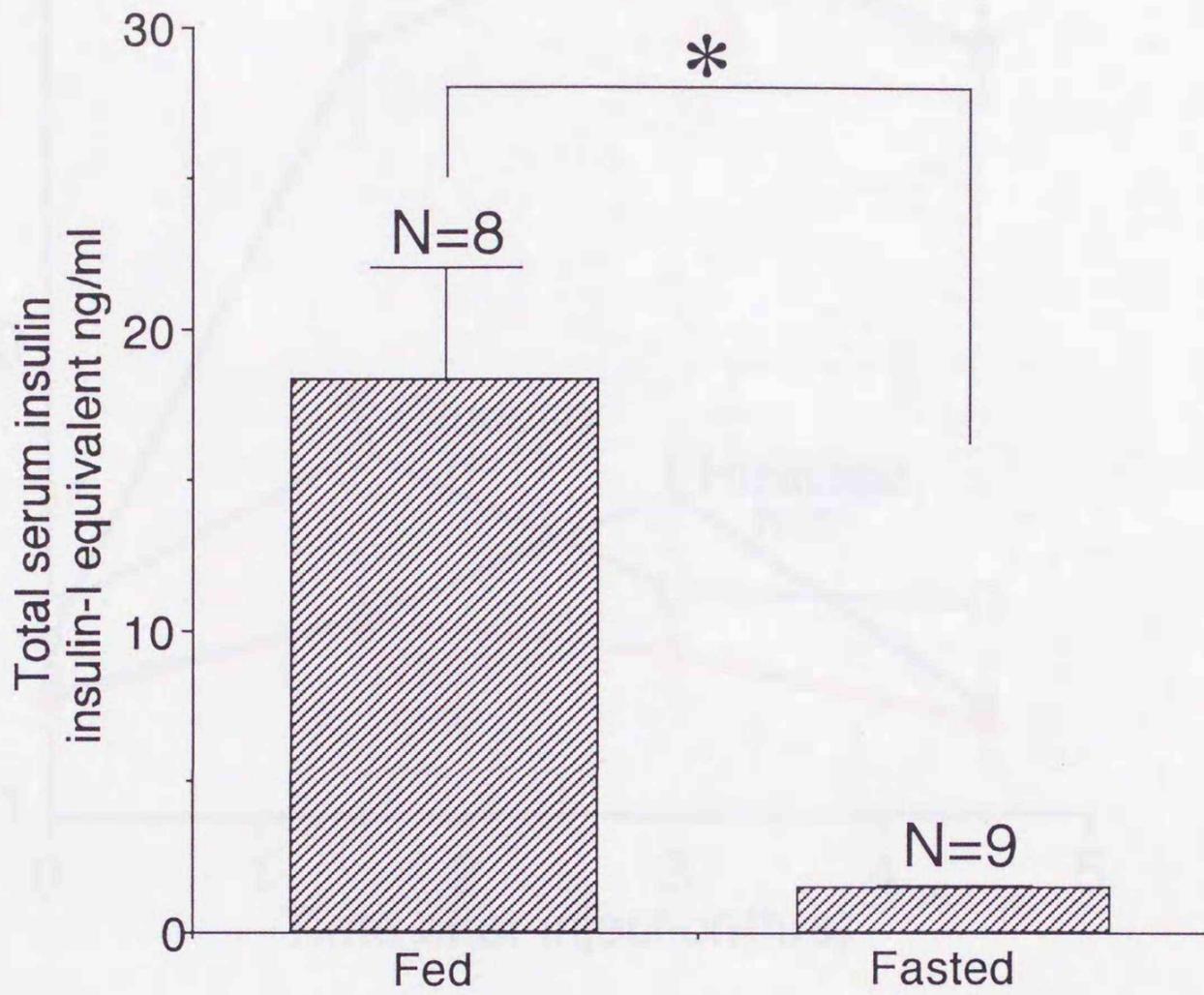


図 3-2-1 給餌と血清中インスリン含量の関係

血清中総インスリン含量をマツカワインスリン-I当量として、平均値とその標準誤差を示した。給餌区には毎日飽食量の人工餌料を与え、絶食区は17日間絶食させた。* : $P < 0.01$

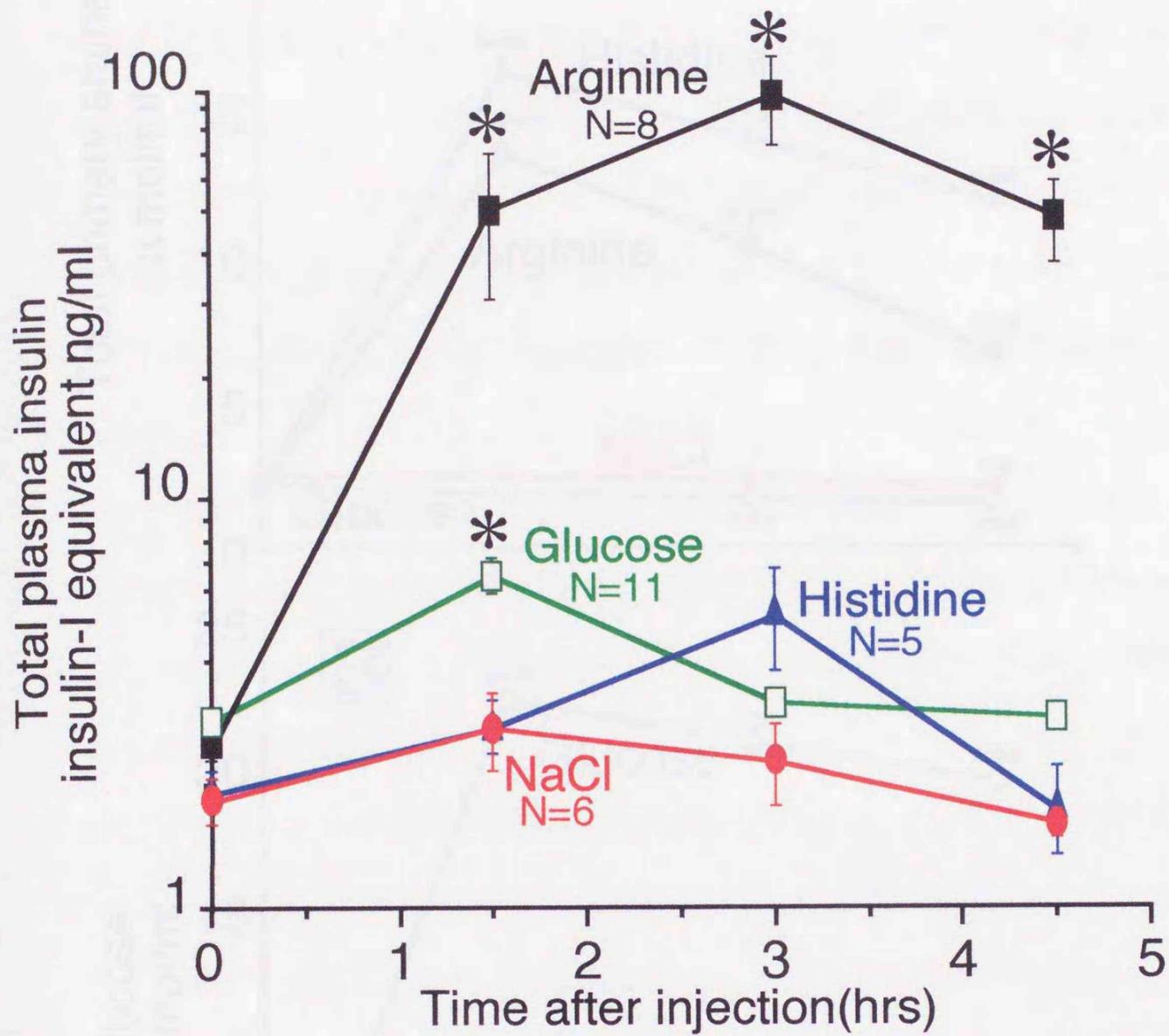


図 3-2-2 アルギニン、ヒスチジン、グルコース、NaCl の筋肉注射によるインスリン分泌誘導効果

血漿インスリン濃度をマツカワインスリン-I当量として表した。各実験区において注射直前の値と比較して有意差 (P<0.05) が認められたものを*で示した。

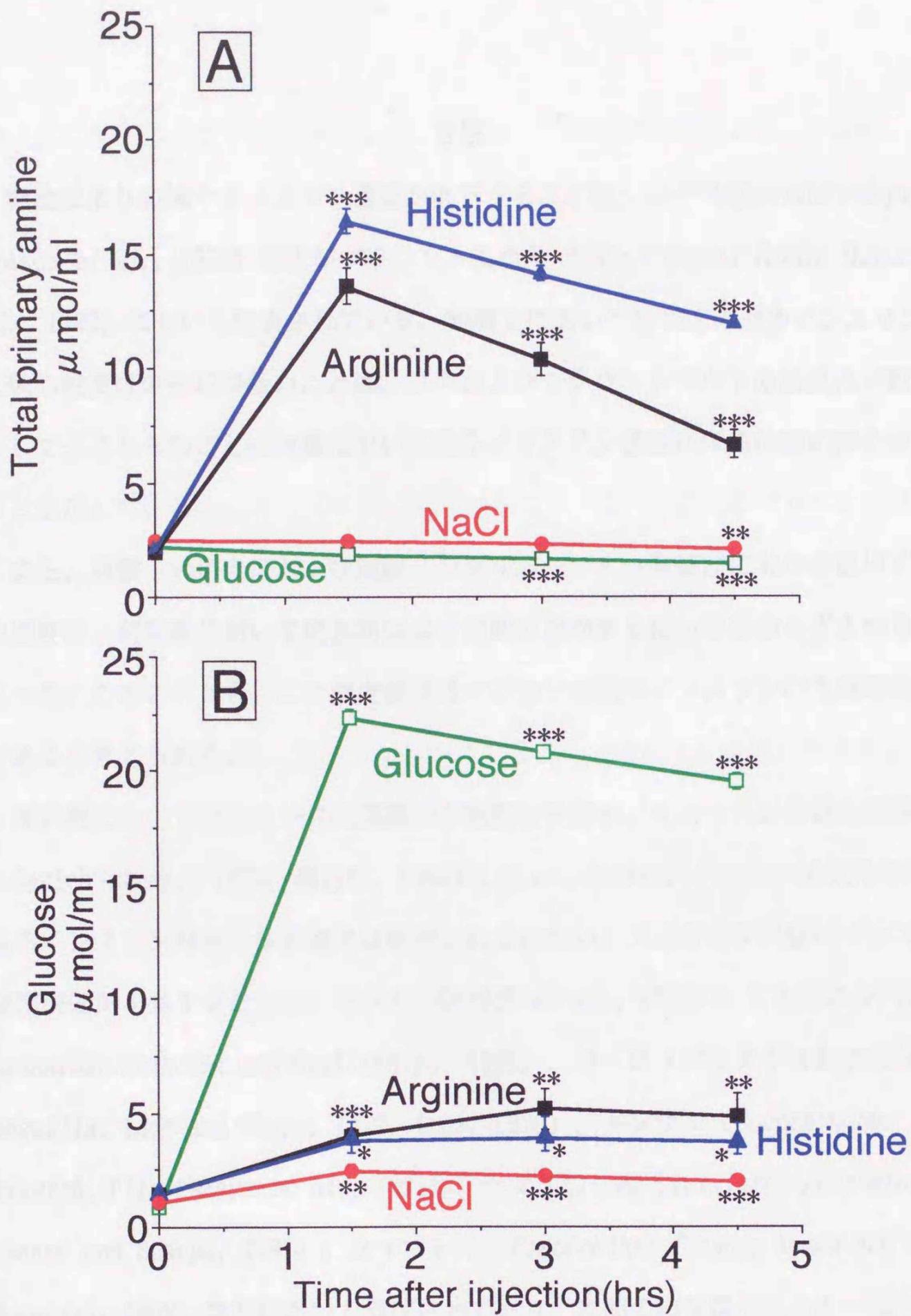


図 3-2-3 アミノ酸および糖の注射後の血漿中第 1 級アミン濃度(A)およびグルコース濃度(B)の変化

第 1 級アミン量はLeu 当量とした。各実験区の注射直前の濃度と比較し有意差が認められたものを*、**、***とし、それぞれ、 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ を示す。

考察

絶食により血液中インスリン濃度が低下することは、コイ (*Cyprinus carpio*; Blasco *et al.*, 1991) およびブラントラウト (*Salmo trutta fario*; Navarro *et al.*, 1992) において報告されている。実験 1 において給餌区の血中インスリン濃度に比較し絶食区のそれが低いことは、コイおよびブラントラウトの結果に一致する。そして、これらのことは魚類において血中インスリン濃度が栄養状態に深くかかわることを示している。

また、実験 1 の絶食区および実験 2 の全グループの注射直前における血中インスリン濃度は、両実験において絶食期間は 2 週間の差があるにもかかわらず 1 ~ 3 ng/ml であった。このことから、この濃度範囲はマツカワの血中インスリンの生理的最低濃度であると考えられる。

哺乳類においてグルコースは膵臓の B 細胞を刺激し、インスリン分泌を誘導する (Gerich *et al.*, 1974; 葛谷ら, 1980)。しかしながら、グルコース以外の栄養素によるインスリン分泌の作用機序は解明されていない。アルギニンが強いインスリン分泌誘導効果を有することは、ラット (Gerich *et al.*, 1974)、ヒキガエル (*Bufo arenarum*; Francini and Gagliardino, 1995)、ヨーロッパウナギ (*Anguilla anguilla*; Ince and Thope, 1977; Ince, 1979)、ギンザケ (*Oncorhynchus kisutch*; Plisetskaya *et al.*, 1991)、ナマズの種類 (*Ictalurus punctatus*; Ronner and Scarpa, 1987)、ヌマガレイ (*Platichthys flesus*; Andoh and Nagasawa, 1998) などにおいて確認されており、本節の結果はそれらと一致している。

ラットにおいては、抗グルカゴン抗体の投与により血中グルカゴンが中和されると、アルギニンの投与によるインスリン分泌が抑制される。このことからアルギニン投与によるグルカゴン分泌は間接的にインスリン分泌を誘導すると考えられている (Tan *et al.*, 1985)。しかしながら、マスノスケ (*O. tschawytscha*) においては抗グルカ

ゴン抗体を投与してもアルギニンのインスリン分泌誘導効果は抑制されない (Plisetskaya *et al.*, 1991)。また、カジカ的一种 (*Myoxocephalus scorpius*) のブロックマン小体においてはインスリンを分泌するB細胞が血流の最上流部に位置することが示されている (Syed Ali, 1985)。さらに、ナマズの一种 (*I. punctatus*) のブロックマン小体を使用した灌流実験において、アルギニン投与によるインスリン分泌はグルカゴン分泌とタイムラグを置かずに同調する (Ronner and Scarpa, 1987)。これらの結果は異なる種で得られた結果であるが、魚類においてアルギニンはインスリン分泌とグルカゴン分泌を独立に誘導することを示唆し、さらに魚類ではアルギニンが哺乳類の場合と異なりB細胞を直接刺激することによりインスリン分泌を誘導する可能性を示している。

タラあるいはウシインスリンが魚類の血漿アミノ酸濃度を顕著に低下させることはウナギ (*Anguilla japonica*; Inui and Yokote, 1975)、Northern pike (*Esox lucius*; Ince and Thope, 1978)、コイ (*Cyprinus carpio*; Murai and Ogata, 1990) において報告されている。また、Murai and Ogata (1990) はコイにインスリンを投与することにより肝臓、筋肉、赤血球中の遊離アミノ酸量が低下することを報告している。さらにInui *et al.* (1978) はウシインスリンがhagfish (*Eptatretus stouti*) の筋肉への ^{14}C -グリシンの取り込みを促進すること、また、Inui and Ishioka (1983) はウシインスリンがウナギ (*A. japonica*) 肝組織および筋肉組織での ^{14}C -グリシンのタンパク質への変換を促進することを報告している。同様に、Plisetskaya *et al.* (1984) はサケ肝細胞培養系においてギンザケ (*O. kisutch*) のインスリンが ^{14}C -ロイシンのタンパク質への変換を促進することを報告している。これらのことは魚類においてインスリンがアミノ酸の同化に深くかかわることを示している。したがってマツカワなどの魚類において認められたアルギニンのインスリン分泌誘導作用は、インスリンのアミノ酸同化作用に応答したものであると考えられる。

一方、ヒスチジンのインスリン分泌誘導効果はヒスチジン投与後の血漿第1級アミノ酸濃度がアルギニン注射区と同様に高い値を示したにもかかわらず認められなかった。この結果はヨーロッパウナギ (*A. anguilla*; Ince and Thope, 1977) およびサケ・マス類 (Plisetskaya *et al.* 1991) における結果と一致している。しかしながら、ウナギ (*A. japonica*; Inui and Yokote, 1975) およびコイ (Murai and Ogata, 1990) に対してウシインスリンを注射すると血漿中ヒスチジン濃度は減少する。これらのことは各アミノ酸のインスリン分泌誘導効果の強さとインスリンによる各アミノ酸の血中濃度降下効果の強さに相関がないことを示している。

マツカワでは、グルコースのインスリン分泌誘導効果は有意ではあったが極めて弱かった。このことは、哺乳類がグルコースによって強いインスリン分泌誘導作用を示すことと異なっていた。ヨーロッパウナギ (*A. anguilla*) においてはグルコースによるインスリン分泌誘導効果がアルギニン、リジンに比較して低いことが報告されている (Ince and Thope, 1977; Ince, 1979)。Furuichi and Yone (1982) はコイ、マダイ (*Pagrus major*)、ブリ (*Seriola quinqueradiata*) に対してグルコースを注射すると血中グルコース濃度が長時間高い値で維持され、しかもブリ、マダイ、コイの順番でこの傾向が顕著であることを報告している。そして、これらの魚種にウシインスリンをグルコースと共に注射した場合には血中グルコース濃度がいずれの種においてもすみやかに下降した。また、示野ら (1977) もコイよりもブリの方がグルコース注射による高血糖が長時間続くことを観察している。一方、グルコースを投与されたマツカワの血漿グルコース濃度は注射後1.5時間から4.5時間にわたり高い値を維持しており、ブリやマダイと同様の傾向を示した。マツカワ、ブリ、マダイは肉食魚であり、天然環境下では炭水化物をほとんど摂取しない。これらのことは、肉食魚においてインスリンは血糖値の降下作用を有するにもかかわらず、グルコースはインスリン分泌誘導効果が小さいこと、およびグルコース代謝制御に関してインスリンは哺乳類の場

合ほど深く関係しないことを示している。

古市・米 (1972) はマダイにおいて 反復採血することにより血糖値が上昇することを観察し、麻酔剤を使用しない場合あるいは採血を繰り返す場合にこの傾向が顕著になることから、採血によるストレスによりこの現象が引き起こされたと考えた。実験 2 におけるグルコース注射区以外の実験区のマツカワにおける血糖値の上昇はマダイの場合と同様の現象であり、繰り返し採血によるストレスが関係すると考えられる。また、グルコース注射区およびNaCl注射区のマツカワにおいて血漿中総アミン量がわずかに減少したことは、採血による希釈効果と考えられる。

アルギニン注射区のマツカワにおける血漿インスリン濃度の最高値は平均95.3 ng/mlであったが、この値はギンサケ (30ng/ml, *O. kisutch*; Plisetskaya *et al.* 1991) において知られている値よりかなり高かった。本節ではインスリン濃度をインスリン-I 当量としており、血漿中にインスリン-IIが含まれている場合には過剰評価をしたと考えられる。この可能性については次節で検討する。

第3節 血液中のインスリン-I および-IIの存在

第1章第1節では、マツカワのブロックマン小体がインスリン-I およびIIを含むことを明らかにした。そして、それらのブロックマン小体からの収量比から考えて、新規のインスリンであるインスリン-IIがインスリン-Iと同様に血液中に分泌されることが予想された。本節では第3章第1節で開発された酵素免疫測定法を使用して、血漿の逆相クロマトグラフィーのフラクションの免疫反応性を測定することにより血液中の両インスリンの存在性を検討する。

材料と方法

マツカワ（体長：180～290 mm）をアルギニン区、給餌区、コントロール区の3実験区に分割し、15°Cに調整した300 lの水槽中で、流水条件下で1ヶ月間絶食飼育した。その後、アルギニン区は第3章第2節にしたがって0.7M L-アルギニン塩酸塩溶液を筋肉注射、給餌区は人工餌量（ヒラメ・トラフグ育成用おとひめ7号、日清製粉、東京）を飽食給餌した。コントロール区は無給餌とした。0.01% 4-アミノ安息香酸エチルを含む海水浸漬により麻酔し、アルギニン区の場合、注射の直前および3時間後に、また、給餌区の場合には、給餌4時間後に、さらにコントロール区の場合には、特に時間を指定せずにヘパリン処理した注射器により採血した。血液から分離した血漿は解析まで冷凍保存した。

各個体の血漿（500 μ l）を解凍後、室温で112 μ lの水酢酸を攪拌しながら加え、5分間攪拌した。次に270 μ lの飽和硫酸アンモニウム溶液を同じく攪拌しながら加え、さらに10分間攪拌した。次に室温で10,000 \times g、10分間、遠心分離し、上清をシリンジフィルター（ポアサイズ：0.2 μ m）で濾過した。得られた溶液のうち600 μ lを逆相クロマトグラフィーに負荷した。ただし、このクロマトグラフィーにおいてはODS-120Tカラム（2.0 \times 150mm、Tosoh）を用い、0.1% TFAで平衡化した後、アセトニトリル濃度を5分間で25%まで、次の50分間で37.5%まで、さらに次の10分間で50%まで上昇させて行った。溶出液は280nmの吸光度でモニターし、そして、マツカワ インスリン-IおよびIIが溶出される34.3～44.8分にわたり30 μ lずつフラクションを採取した。採取した各フラクションのうち5 μ lをマツカワインスリン酵素免疫測定に使用し、各フラクションのインスリン量をインスリン-IおよびIIを標準物質として測定した。

結果

アルギニン区の注射直前のマツカワの血漿インスリン濃度は、2.2～3.1ngインスリ

ン-I 当量/mlであった。一方、注射3時間後では、2個体は109.5および190.1ng/ml インスリン-I 当量であり、他の2個体は測定上限(200ng/ml)を越えていた。給餌区の血漿インスリン濃度は給餌4時間後で29.0~113.4ngインスリン-I 当量/mlであった。絶食区の血漿インスリン濃度は検出限界以下~4.0ngインスリン-I 当量/mlであった。

血漿の逆相クロマトグラフィーのフラクションについてインスリン免疫反応性を測定したところ、アルギニン区、給餌区の全個体について、インスリン免疫反応が認められた(図3-3-1)。インスリン免疫反応は両実験区の全個体において38分および39.5分付近のフラクションに二つのピークとして認められた。これらの溶出時間に紫外線吸収ピークは認められなかったが、これらの溶出時間は精製されたインスリン-I およびIIの溶出時間に一致する。前半の免疫反応ピークをインスリン-I、後半の免疫反応ピークをインスリン-IIと仮定すると、検出されたインスリン量はアルギニン区においてインスリン-I が578~1,478pg/個体(平均855pg/個体)、インスリン-IIが417~1,230pg/個体(平均667pg/個体)、給餌区においてインスリン-I が297~676pg/個体(平均486pg/個体)、インスリン-IIが194~618pg/個体(平均364pg/個体)であった。コントロール区においては全個体の各フラクションにインスリン免疫反応は認められなかった。

考察

脊椎動物においてラット(Smith, 1966)、マウス(Buenzli *et al.*, 1972)、アフリカツメガエル(Shuldiner *et al.*, 1989a,b)、カツオ(Yamamoto *et al.*, 1960)、toadfish(Smith, 1966)、ヘラチョウザメ(Nguyen *et al.*, 1994)が2分子種のインスリンを有することが知られている。しかし、これらの種において、血中に両分子種が分泌されていることを示したデータはインスリンの生理作用を考察する上で重要であるにもかかわらず得られていない。本研究はこのことを調査した初めての研究で

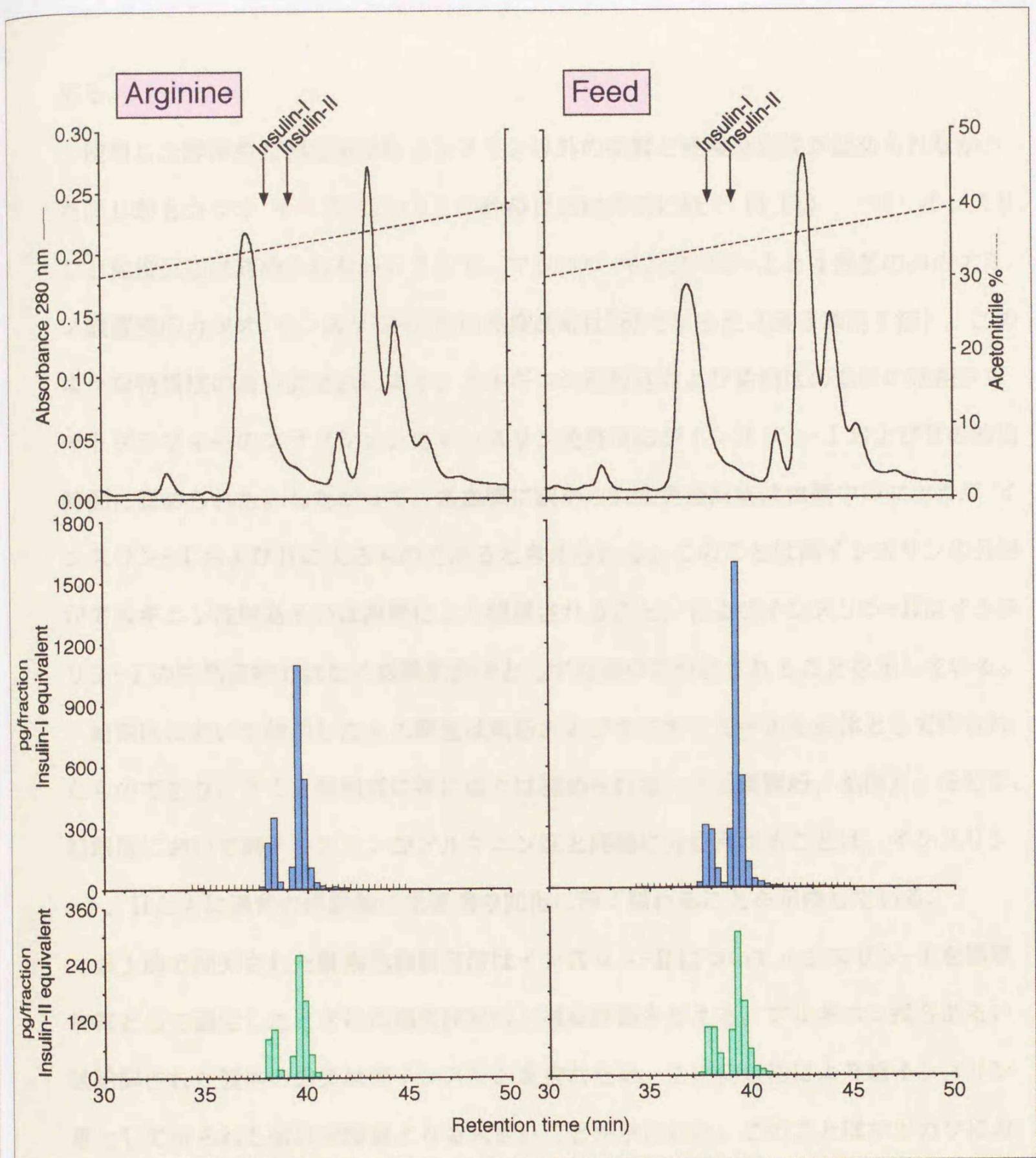


図 3-3-1 アルギニン注射あるいは給餌後個体の血漿中インスリン-I およびIIの免疫学的同定

アルギニン注射区、給餌区ともに4個体について調査し、そのうちの1個体ずつの逆相クロマトグラフィーのプロファイル、免疫反応性をインスリン-I当量およびインスリン-II当量として示した。

ある。

使用した酵素免疫測定法ではインスリン以外の物質と免疫反応性が認められなかった。しかもカツオ インスリン-Iとの免疫反応は非常に低く(1.6%)、ウシ インスリンと免疫反応は認められない。そして、マツカワ インスリン-Iと4残基のみのアミノ酸置換のカツオ インスリン-IIとの免疫反応は28%であった(第3章第1節)。このような特異性の高い測定法により、アルギニン注射区および給餌区の血漿の逆相クロマトグラフィーのフラクションにインスリン免疫反応がインスリン-IおよびIIの溶出時間に認められた。したがって、各血漿に認められた免疫反応は血漿中のマツカワ インスリン-IおよびIIによるものであると考えられる。このことは両インスリンの分泌がアルギニン注射あるいは摂餌により誘導されること、およびインスリン-IIはインスリン-Iの中間産物ではなく成熟型分子として血液中に分泌されることを示している。

給餌区において使用した人工餌量は魚粉およびオキアミミールを主体として作られたものであり、アミノ酸組成に特に偏りは認められない(日清製粉, 私信)。そして、給餌区において両インスリンがアルギニン区と同様に分泌されることは、インスリン-I、IIともに通常の摂餌後の栄養素の同化に深く関わることを示唆している。

第1節で開発された酵素免疫測定法はインスリン-IIについてインスリン-Iを標準物質として測定したときに高濃度試料ほど過剰評価を与える。アルギニン投与あるいは給餌された個体の血漿は両インスリンを含むため、この測定法により総インスリン量として得られた値は実際量よりも大きいことが示された。このことはマツカワにおいてこのインスリン測定法では、相対的な濃度変動を把握することは可能であるが、絶対的なインスリン濃度の定量が高濃度試料では困難であることを示している。

本節では、酢酸を加えた硫酸沈殿により血漿からタンパク質を除去した。この方法では500 μ lの血漿から200~300 μ lのタンパク質沈殿が得られることから、血漿中からタンパク質が高い割合で除去されていると考えられる。他法として、Sep-Pak C18

cartridgeにより血漿からタンパク質を除去した後、逆相クロマトグラフィーで分画し各フラクションの免疫反応性を測定したところ、試料ごとに陽性フラクションの溶出時間が著しく異なり溶出時間によるインスリン-IおよびIIの同定は不可能であった。これは試料ごとに血漿中タンパク質濃度、組成が異なるためであると考えられる。しかしながら、上述のように酢酸-硫酸による除タンパク法を用いた場合、インスリン陽性フラクションの溶出時間はアセトニトリルの濃度勾配が緩やかであるにもかかわらず、すべての個体でインスリン陽性フラクションの溶出時間は一致し、そのずれは20秒（フラクション1本に相当）以下であった。このことは本法が簡単でありながら血漿中の除タンパク法として優れていることを示している。その一方、全フラクションの血漿インスリンの合計値は数ng/mlに止まった。逆相クロマトグラフィーカラムに吸着した血漿中の物質は紫外線吸収度から判断して数十 μ gであることから、血漿中におけるインスリン量の割合はインスリン以外の物質に対して著しく低いと考えられる。さらに本法ではセミマイクロボアカラムを使用したため、血漿インスリンの回収率が低くなったと考えられる。

本節の絶食区のマツカワの血漿のクロマトグラフィーフラクションにおいて、インスリン免疫反応が検出されなかったことはアルギニン注射区および給餌区のマツカワの血漿の場合に比較してインスリン濃度が低かったためと考えられる。

総合考察

インスリンはアミノ酸などの栄養素の代謝・同化制御に重要な役割を果たす。そこで、本研究はマツカワを中心に硬骨魚類のインスリンの生化学的特徴、多型性の産生様式、分泌動態を解明し、増養殖魚において効率的に餌料の栄養素を同化させ、成長を促進する技術を開発するための基礎的知見の集積に資することを目的として行った。以下、インスリンにおける分子多型の産生様式と存在意義、硬骨魚類におけるインスリンの生理作用、異体類の栄養利用の特徴について論議する。

インスリンにおける分子多型の産生様式と存在意義

これまで、インスリンの一次構造が決定された脊椎動物の多くは1分子種のみインスリンを有する。しかしながら、本研究においてマツカワ（第1章第1節）、インガレイ（第2章第1節）、カツオ（第2章第2節）、ホッケ（第2章第3節）が2分子種のインスリンを有することが明らかになった。

マツカワにおいて、インスリン-IおよびIIが単一のプレプロインスリンからシグナルペプチド部分の切断箇所の違いにより生じていることが示された（第1章第1節、第2節）。このような2分子種が産生される様式（カレイ型）は新規のタイプである。一方、カツオ、ホッケの2分子種のインスリンは各々の魚種の分子種間の内部のアミノ酸配列に置換が認められたことから、ラットおよびアフリカツメガエルと同様に2遺伝子座にコードされていると考えられる（ラット型）。また、ギンザメ

(*Hydrogus colliei*)はB鎖のC末端のみが異なる4分子種のインスリンを有する。このインスリンの分子多型は単一のプロインスリンからC-ペプチドがB鎖から切断される箇所が異なることにより生じていると考えられる（ギンザメ型; Conlon *et al.*, 1989)。これらのことから、脊椎動物におけるインスリン分子の産生様式は(1)単

一遺伝子-単一分子種産生型（通常型）、（2）単一遺伝子-複数分子種産生型、（3）複数遺伝子-複数分子種産生型（ラット型）の3つに分類される。さらに、（2）はシグナルペプチドC末端切断箇所変異型（カレイ型）とC-ペプチドN末端切断箇所変異型（ギンザメ型）に細分される。図4-1にこれら4型のうち通常型を除く3型について模式的に示した。ただし、ギンザメ型においてはギンザメのインスリンをコードする遺伝子についての情報がないため、さらに調査が必要である。

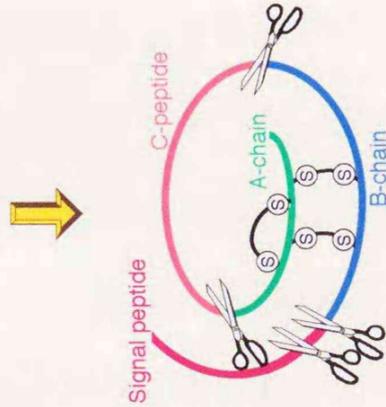
アフリカツメガエル (Kobel and Du Pasquire, 1986) とヘラチョウザメ (Dingerkus and Howell, 1976) は4倍体性であり、ゲノムセットの倍化によりインスリン遺伝子の重複が起こったと考えられる。さらにシロサケも4倍体性であり、少なくとも2つ以上のインスリン遺伝子が存在することが確認されている (Sorokin *et al.*, 1982; Kashuba *et al.*, 1986; Koval *et al.*, 1989; Kavsan *et al.*, 1993)。しかし、シロサケからは1分子種のみがペプチドとして精製されている (Rusakov *et al.*, 1990)。その理由として、一方のインスリン遺伝子が“silent gene”として発現していない可能性が考えられている (Rusakov *et al.*, 1990) が、証明はされていない。

カツオおよびホッケのインスリンの2分子種は、アミノ酸配列を比較した結果からそれぞれの種あるいはそれらの祖先種において単一のインスリン遺伝子が重複して生成したものと考えられた (第2章第2節および第3節)。これらの種におけるインスリン遺伝子の重複は棘鱗上目魚類の多くが2倍体であり、特にホッケの染色体数は46本であること (Matsumiya *et al.*, 1980) からゲノムセットの倍化によるものとは考えにくい。

ラットのインスリン-I遺伝子はインスリン-II遺伝子のレトロトランスポゾンによる重複の結果、生じたものと考えられている (Soares *et al.*, 1985)。このことは次の事実から支持される。すなわち、ラットインスリン-I遺伝子はC-ペプチドコード

カレイ型

プレプロインスリン遺伝子



Insulin-I

Insulin-II

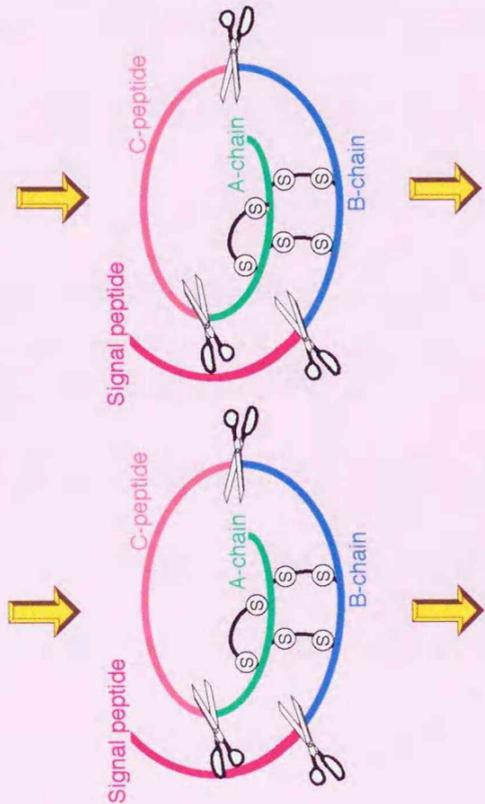
カレイ類

ラット型

プレプロインスリン遺伝子



プレプロインスリン遺伝子



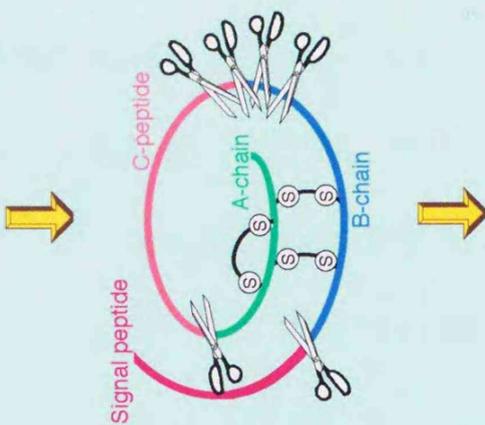
Insulin-I

Insulin-II

マウスト
ラフツオケ
アカホツケ
toadfish
ヘラチヨウザメ

ギンザメ型

プレプロインスリン遺伝子



Insulin-38

Insulin-37

Insulin-36

Insulin-31

ギンザメ

図4-1 脊椎動物におけるインスリンの分子多型産生様式

領域のイントロンを欠き、両端に順方向反復配列を持つとともに、3' 下流側にポリA付加シグナルの残骸を持つ。カツオおよびホッケのインスリンの遺伝子がこのような構造を有するのことは現在のところ不明である。今後、それらの遺伝子構造を調査し、レトロトランスポゾンによる重複の結果であるか否かを解明するが重要であろう。

近年、脊椎動物のインスリンと相同性の高い分子が脊椎動物のみならず無脊椎動物からも発見されており、インスリンスーパーファミリーを構成している。現在、このファミリーに属する分子は、脊椎動物からインスリン、インスリン様成長因子-IおよびII、リラキシン (James *et al.*, 1977)、ライディッヒ細胞インスリン様ペプチド (Burkhardt *et al.*, 1994) が、無脊椎動物からナメクジウオ (*Brachiostoma californiensis*, Chan *et al.*, 1990)、ホヤ (*Chelyosoma productum*, McRory and Sherwood, 1997) のインスリン様ペプチド、カイコ (*Bombyx mori*) のボンビキシン (Nagasawa *et al.*, 1984, 1986)、バッタ (*Locusta migratoria*) の *Locusta insulin like peptide* (Lagueux *et al.*, 1990; Kromer-Metzger and Lagueux, 1994)、モノアラガイ (*Lymnaea stagnalis*) の molluscan insulin-related peptide (MIP, Smit *et al.*, 1988)、カイメン (*Geodia cydonium*) のカイメンインスリン様ペプチド (Robitzki *et al.*, 1989) が知られている。

Chan *et al.* (1990) はナメクジウオのインスリン様分子はインスリンとインスリン様成長因子の両方の特徴を有することから、インスリンとインスリン様成長因子遺伝子の分岐はナメクジウオと hagfish が分岐した後に起こったと考えた。しかし、ホヤからはインスリンに特徴的な B、C、A の各ドメインに対応するインスリン様ペプチドをコードする遺伝子と、インスリン様成長因子に特徴的な B、C、A、D、E の各ドメインに対応するインスリン様ペプチドをコードする遺伝子の二つがクローニングされた (McRory and Sherwood, 1997)。このことはインスリンとインスリン様成長因子の各遺伝子の分岐はホヤと脊椎動物の分岐以前である可能性を示している。

また、hagfish (*Myxine glutinosa*) からインスリン様成長因子は1分子種のみが同定されている (Nagamatsu *et al.*, 1991)。そして、ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) からインスリン様成長因子-I、IIが同定されている (Shamblott and Chen, 1992)。したがって、インスリン様成長因子-IとIIの各遺伝子の分岐はhagfishとサケ目魚類の分岐以後に生じた分子種であると考えられる。

ボンビキシンには少なくとも5分子種の存在が知られている (Nagasawa *et al.*, 1984; Nagasawa *et al.*, 1986; Maruyama *et al.*, 1988)。そして、注目すべきことにボンビキシン遺伝子には少なくとも30の存在が確認されており多重遺伝子族を形成している (Kondo *et al.*, 1996; Tsuzuki *et al.*, 1997)。これまで同定されたすべてのボンビキシン遺伝子はイントロンを欠失していること、および両端に順方向繰り返す配列を有することから、ラットのインスリンと同様にレトロトランスポゾンによって増幅したものである可能性が考えられている (Iwami *et al.*, 1990)。しかしながら、カイコにおいてボンビキシンがどのような生理作用を司っているのか、あるいは分子種間で生理作用に違いがあるのかについては明確ではない。

さらに、モノアラガイのMIPも多重遺伝子族を形成し、少なくとも3つのペプチド (I, Li *et al.*, 1992a, II, Li *et al.*, 1992b, III, Li *et al.*, 1992c) と5つの機能的遺伝子 (I, Smit *et al.*, 1988; II, Smit *et al.*, 1991; V, Smit *et al.*, 1992; III, Smit *et al.*, 1993; VII, Smit *et al.*, 1996)、さらに2つの偽遺伝子 (IV, VI; Smit *et al.*, 1998) の存在が確認されている。ゲノミックDNAの解析はMIP-I~VI遺伝子について行われ、MIP-I~IIIおよびVはTATA boxとシグナルペプチドコード領域、およびC-ペプチド領域を分断するイントロンを含むことが明らかにされている (Smit *et al.*, 1998)。したがって、MIPはレトロトランスポゾンによって増幅したものではないと考えられるが、どのような機構により遺伝子の重複が起こったのかは不明である。また、MIPは成長の制御に深く関わる脳のlight green cells領

域において発現していることから、モノアラガイの成長ホルモンである可能性が考えられた (Smit *et al.*, 1988) が、その機能は未だ実証されていない。

このように、動物においてインスリン遺伝子は進化の歴史とともにゲノムセットの倍化、レトロトランスポゾンなどによる多数回の重複を繰り返している。さらに、カレイ類およびギンザメにおいては成熟分子への変換過程での切断箇所の違いにより分子多型が生じている。そして、脊椎動物においては明確な機能分化がインスリン、インスリン様成長因子、リラキシン間において行われてきた。

本研究が扱った4魚種 (マツカワ、イシガレイ、カツオ、ホッケ) のすべてにおいてインスリンは2分子種存在した。これまで30種の魚類においてインスリンが精製されており、それらのアミノ酸配列を本研究の結果と合わせ図4-2に整理した。真骨魚類ではティラピア (*Oreochromis nilotica*; Nguyen *et al.*, 1995)、daddy sculpin (*Cottus scorpius*; Cutfield *et al.*, 1986)、アンコウ (*Lophius americanus*; Neumann *et al.*, 1969)、タラ (*Gadus callarias*, *G. morhua*のシノニム; Reid *et al.*, 1968)、サケ類 (*Oncorhynchus kisutch*; Plisetskaya *et al.*, 1985; *O. keta*; Rusakov *et al.*, 1990)、ウナギ類 (*Anguilla rostrata*; Conlon *et al.*, 1991; *A. japonica*; Duan *et al.*, 1992) からインスリンが精製され一次構造が決定されている。これらの種から精製されたインスリンは1分子種のみであった。インスリンを2分子種有する種に系統的、生態的あるいは生理的共通点は認められず、個々の種において複数のインスリンが存在する意義は異なることが予想される。

アフリカツメガエルの胚において、インスリン-I とIIの各遺伝子の発現ステージや器官が異なっており、両遺伝子が機能的に分化している可能性が示されている

(Shuldiner *et al.* 1991)。一方、変態後のアフリカツメガエルにおける2分子種のインスリンの発現量比はいくつかの異なる生理的状态においても顕著な違いが認められない。したがって、変態後のアフリカツメガエルにおけるインスリン-I とIIの発現

Insulin A-chain

Class	Subclass	Infraclass	Species	5	10	15	20																	
Osteichthyes	Actinopterygii	Teleostei	Barfin flounder-I(1)	G	I	V	E	Q	C	C	H	K	P	C	N	I	F	D	L	Q	N	Y	C	N
			Barfin flounder-II(1)	-----																				
			Stone flounder-I(2)	-----																				
			Stone flounder-II(2)	-----																				
			Flounder(3)	-----																				
			Tilapia(4)	-----E-----T-----																				
			Sculpin(5)	-----R-----RV-E-----																				
			Bonito-I(6)	-----R--S--E-E-----																				
			Bonito-II(6)	-----																				
			Greenling-I(7)	LMRS-L-K--FEA-S-T---S---																				
			Greenling-II(7)	-----R-----																				
			Anglerfish(8)	-----R-----																				
			Cod(9)	---D---R--D-----																				
			Carp(10)	-----S--E-----																				
			Coho salmon(11)	-----																				
			Chum salmon(12)	-----																				
			Pink salmon(12)	-----																				
			American eel(13)	-----S-----																				
			Japanese eel(14)	-----																				
			Osteichthyes	Actinopterygii	Holostei	Bowfin(15)	-----L---T-YEMEK---																	
						Gar(16)	-----T-YE-E-----																	
			Osteichthyes	Actinopterygii	Chondrostei	Kaluga sturgeon(17)	-----S--SLY--E----																	
						Russian sturgeon(18)	-----S--SLY--E----																	
						Paddlefish-I(19)	-----S--SLYH-E----																	
						Paddlefish-II(19)	-----S--SLY--E----																	
			Osteichthyes	Actinopterygii	Dipnoi	Lungfish(20)	-----SLYE-EN---VP																	
						Bichir(21)	-----DTP-SLYD-EN---																	
			Osteichthyes	Actinopterygii	Brachiopterygii	Ray(22)	----H---NT-SL---EG---																	
						Elephantfish(23)	-----NT-SLVN-EG---																	
Chondrichthyes	Holocephali	Ratfish(24)	-----NT-SLAN-EG---																					
		Rabbitfish(25)	-----NT-SLAN-EG---																					
Agnatha			Lamprey(Lampetra)(26)	-----RK-S-Y-ME----																				
			Lamprey(Petromyzon)(27)	-----RK-S-Y-ME----																				
			Lamprey(Geotria)(28)	----K---NR-S-YQMES---																				
			Hagfish(29)	-----KR-S-Y-L-----																				

図4-2 これまで報告された魚類インスリンのアミノ酸配列

全配列が決定されたものを示した。各アミノ酸配列は次の文献から引用した。(1) *Verasper moseri*, 第1章第1節; (2) *Kareius bicoloratus*, 第2章第1節; (3) *Platichthys flesus*, Conlon et al. (1987); (4) *Oreochromis nilotica*, Nguyen et al. (1995); (5) *Cottus scorpius*, Cutfield et al. (1986); (6) *Katsuwonus pelamis*, 第2章第2節; (7) *Pleurogrammus azonus*, 第2章第3節; (8) *Lophius americanus*, Neumann et al. (1969); (9) *Gadus callarias* (*G. mohrua*のシノニム), Reid et al. (1968); (10) *Cyprinus carpio*, Makower et al. (1982); (11) *Oncorhynchus kisutch*, Plisetskaya et al. (1985); (12) *O. keta*, *O. gorboscha*, Rusakov et al. (1990); (13) *Anguilla rostrata*, Conlon et al. (1991a); (14) *A. japonica*, Duan et al. (1992); (15) *Amia calva*, Conlon et al. (1991b); (16) *Lepisosteus spathula*, Pollock et al. (1987); (17) *Huso dauricus*, Andoh et al. (unpublished data); (18) *Acipenser guldenstaedti*, Rusakov et al. (1998); (19) *Polyodon spathula*, Nguyen et al. (1994); (20) *Protopterus annectens*, Conlon et al. (1997); (21) *Polypterus senegalensis*, Conlon et al. (1998); (22) *Torpedo marmorata*, Conlon and Thim (1986); (23) *Callorhynchus milii*, Berks et al. (1989); (24) *Hydrolagus coliei*, Conlon et al. (1989); (25) *Chimaera monstrosa*, Conlon et al. (1988); (26) *Lampetra fluviatilis*, Conlon et al. (1995); (27) *Petromyzon marinus*, Plisetskaya et al. (1988b); (28) *Geotria australis*, Conlon et al. (1995); (29) *Myxine glutinosa*, Peterson and Steiner (1975)

Insulin B-chain

	5	10	15	20	25	30
Barfin flounder-I	VLPPQHLCGAHLVDALYLVCGERGFFYTPK					
Barfin flounder-II	pQA-----					
Stone flounder-I	-V-----					
Stone flounder-II	pQA-V-----					
Flounder	-V-----					
Tilapia	-GG-	S-		D-		N-R
Sculpin	AD-	S-		D-		N--
Bonito-I	ISS-	S-	E--	N--	D-	N-R
Bonito-II	AA-	S-				N--
Greenling-I	TSG--	Q--	S-		D-	N--
Greenling-II	ASG--	S-			D-	N--
Anglerfish	-A-A-	S-			D-	N--
Cod	MA-	S-			D-	N--
Carp	NAGA-	S-			PT-	N--
Coho salmon	AAA-	S-			K-	N--
Chum salmon	AAA-	S-			K-	N--
Pink salmon	AAA-	S-			K-	N--
European eel	AST-	S-	E-		SN--	FN--D
Japanese eel	GST-	S-			DK--	FN--
Bowfin	AAS-	S-	E--	F--	S--	N-NKS
Gar	AAN-	S-	E-		K-	N-NKV
Kaluga sturgeon	AAN-	S-	E-			NKV
Russian sturgeon	AAN-	S-	E-			NKV
Paddlefish-I	AAN-	S-	E-			NKV
Paddlefish-II	AAN-	S-	E-			NKV
Lungfish	AVLN-				ADN-	KPSG
Bichir	AANR-	S-	E-		N-	I-SKM
Ray	L-S-	S-	E-	F-	PK--	Y-L--A
Elephantfish	V-T-R-	S-		F-	E-	S--QI
Ratfish	V-T-R-	S-		F-		SP-PIRELEPLL
Rabbitfish	V-T-R-	S-		F-	E-	SP-PIRELEPLL
Lamprey(<i>Lampetra</i>)	SALTGAGGT-	S-	E-	V-	D-	SKT
Lamprey(<i>Petromyzon</i>)	SALTGAGGT-	S-	E-	V-	D-	SKT
Lamprey(<i>Geotria</i>)	SALTGSGGNY-	SY-		A-	P-	STPV
Hagfish	RTTG-	LD--	NA--	IA--	V----	DPTLM

図 4-2 (続き) これまで報告された魚類インスリンのアミノ酸配列

は同時的に制御されており、胚における発現制御機構と異なると考えられている

(Celi *et al.*, 1994)。

ラットの卵黄嚢 (Giddings and Carnaghi, 1989; Guggenheim and Permutt, 1986; Muglia and Locker, 1984) と胎児肝 (Muglia and Locker, 1984; Rau *et al.*, 1989; Giddings and Carnaghi, 1990) においてはインスリン-I 遺伝子の発現は認められず、インスリン-II 遺伝子のみが発現している。これらの現象はアフリカツメガエルの胚におけるインスリン-I と II の各遺伝子に認められる異時的発現と共通する。

また、ラットの成体においてインスリン-I と II の遺伝子の発現はどちらも同時的に制御されているが、インスリン-II 遺伝子の方が生理的条件の変化により早くしかも強く反応することが報告されている (Giddings *et al.* 1991)。

アフリカツメガエルとラットにおけるインスリン-I と II 間でのアミノ酸配列の置換数はそれぞれ 3 残基および 2 残基で、アミノ酸配列のホモロジーは 94 および 96% であった。このことは分子種間でのホモロジーが高いにもかかわらず、分子種間で遺伝子の発現レベルにおける機能分化が起こる可能性があることを示している。

カレイ類におけるインスリンの多型性は生物活性に与える影響が小さい領域のアミノ酸の伸長によること (第 1 章第 1 節)、単一の遺伝子にコードされていること (第 1 章第 2 節)、および両分子種ともにアミノ酸および摂餌により血液中に分泌されること (第 3 章第 3 節) から各分子種が機能的に分化していることは考えにくい。したがって、カレイ類における両インスリン間の機能分化は未発達であり、2 分子種が存在する生理的意義は小さいと考えられる。

一方、カツオおよびホッケのインスリン-I、II 間のアミノ酸配列のホモロジーは、A および B 鎖の伸長部分を除いて算出すると、共に 78% であった。このホモロジーはアフリカツメガエルやラットの分子種間の値よりも小さく、哺乳類において生理作用、分泌動態が明確に異なるインスリン様成長因子-I、II 間の 78% (ヒト,

Rinderknecht and Humbel, 1978; Sussenbach, 1989) と同等であった。そして、カツオおよびホッケのそれぞれの種においてインスリン-I、II間で置換しているアミノ酸残基はインスリンリセプターとの結合に重要な部分を含むことが予想された。これらのことからカツオおよびホッケのインスリン-IおよびII間において生物活性の違いあるいは機能分化が発達している可能性が考えられる。このことを検討することは今後の課題である。

本研究において使用した4種の硬骨魚類は産生様式に差異があるが、すべての種から2分子種のインスリンが精製された。さらに他の硬骨魚類においても未知のインスリン分子が存在する可能性が考えられるため、栄養素代謝の研究対象種においては複数のインスリンの存在可能性およびそれらの分泌動態について検討することが重要である。

硬骨魚類におけるインスリンの生理作用

これまで魚類において報告されたインスリン投与によって誘導された現象として、(1) アミノ酸の組織中への取り込み促進 (ウナギ, *Anguilla japonica*, Inui and Yokote, 1975; Northern pike, *Esox lucius*, Ince and Thope, 1978; ニジマス, *Salmo gairdneri*, Ablett *et al.*, 1981b, コイ, *Cyprinus carpio*, Murai and Ogata, 1990)、(2) アミノ酸のタンパク質への変換促進 (ウナギ, *A. japonica*, Inui and Ishioka, 1983; ギンザケ肝細胞, *Oncorhynchus kisutch*, Plisetskaya *et al.*, 1984)、(3) 成長の促進 (ギンザケ, *O. kisutch*, Ludwig *et al.*, 1977; ニジマス, *S. gairdneri*, Ablett *et al.*, 1981a)、(4) 血糖値の降下 (マダイ, *Pagrus major*, ブリ, *Seriola quenqueradiata*, コイ, *C. carpio*, Furuichi and Yone, 1982; sea bass, *Dicentrarchus labrax*, Perez *et al.*, 1989)、(5) 血中グルカゴン濃度の降下 (sea bass, *D. labrax*, Perez *et al.*, 1989)、(6) 血

中コレステロールの降下 (sea bass, *D. labrax*, Perez *et al.*, 1989)、(7) 血中遊離脂肪酸濃度の降下 (sea bass, *D. labrax*, Perez *et al.*, 1989)、(8) 糖新生の抑制 (ウナギ肝細胞, *A. japonica*, Hayashi and Ooshiro, 1985)、(9) グルコースからグリコーゲンへの変換促進 (ウナギ肝細胞, *A. japonica*, Hayashi and Ooshiro, 1985) があげられる。これらの生理作用は魚類においても哺乳類同様にインスリンが栄養分の同化制御に深く関わることを示唆している。しかしながら、これらのうちPerez *et al.* (1989) 以外は哺乳類インスリンを使用し、また、Perez *et al.* (1989) はsea bassにカツオインスリンを投与した。ウシインスリンと魚類インスリン間には少なくとも13残基のアミノ酸置換が認められる。また、第2章において、カツオとホッケが生物活性を異にすると予想されるインスリンを2分子種ずつ有することを示した。したがって、魚類におけるインスリンの生理作用を理解するためには、実験に使用する種のインスリンを使用し生理活性を確かめること、またインスリンの各分子種における作用の違いを検討することが重要である。さらに、実験に使用する魚種の血中インスリン濃度の生理的変動範囲を把握し、インスリンの投与実験を行うことが今後の研究の進展に必要である。

さらに、魚類においてインスリンは銀毛化、遡上遊泳、成長の制御にも関与する。ギンザケ (*O. kisutch*) の銀毛化初期において血漿インスリン濃度のサージが認められる。そして、smoltとstuntの血漿インスリン濃度を比較すると前者が高い傾向を示した (Plisetskaya *et al.*, 1988a)。また、カラフトマス (*O. gorbuscha*) においては産卵遡上期には摂餌量が減少するにもかかわらず、雄の血漿インスリン濃度は変化せず、雌のそれはむしろ上昇することが報告された (Plisetskaya *et al.*, 1987)。これらの現象は、銀毛化中 (Dickhoff, 1993) あるいは遡上遊泳中 (Plisetskaya *et al.*, 1987) に必要なエネルギーを蓄積するためと考えられた。

Duan and Hirano (1992) はウナギ (*A. japonica*) においてインスリン様成長因子

-Iのみならずインスリンが生理的濃度で軟骨組織の成長制御に関係することを示した。この結果は、サケ・マス類においてインスリンの投与が成長を促進すること (O. Kistch, Ludwig *et al.*, 1977; *S. gairdneri*; Ablett *et al.*, 1981a)、および成長速度と血漿インスリン濃度が比例すること (*S. gairdneri*, *S. salar*, *O. kisutch*; Sundby *et al.*, 1991) に一致するものであり、魚類においてインスリンは成長に直接関与することを示したものである。

このように魚類においてインスリンは栄養素の代謝を司るとともに、銀毛化や産卵回遊時の生理的状態の変化に深く関係し、さらに成長に直接的に関与することが示されている。したがって、魚類においてインスリンは栄養代謝を伴う様々な生理現象において重要な役割を果たしていることが考えられる。

異体類は初期発育過程において劇的な形態変化である「変態」を遂げる。この時期は種苗を管理したり良質な種苗を生産する上できわめて重要である (山野, 1995)。異体類の変態はサケ・マス類の銀毛化に類似する面が多い。そして、変態期には多くの組織、器官における形態的、生理的変化に伴って大量の栄養素が急激に同化されることが予想される。したがって、異体類の変態においてもインスリンが重要な役割を果たしていることが考えられる。今後、異体類において変態期付近のインスリンの分泌動態を解明することは、異体類のより安定した種苗生産法を確立する上で重要な知見になることが予想される。

異体類の栄養利用の特徴

本研究では、主にマツカワのインスリンの生化学的特徴、産生様式、分泌の特徴を明らかにした。そこで、ここでは異体類の栄養利用の特徴について整理したい。

菊池ら (1993) はヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) において餌量中の炭水化物含有率を増加させるとともにタンパク質含有率を減少させると日間摂餌率が上昇し、餌

料変換効率および成長速度が低下することを報告した。さらに菊池・古田(1998)は同様に脂肪含有率を増加させ、タンパク質含有率を減少させた場合にも餌料変換効率と成長速度が低下することを報告している。これらの結果から菊池・古田(1998)は餌料のタンパク質含量をできるだけ高くすることがヒラメの養成に重要と結論している。

一方、Aksnes *et al.*(1996)はAtlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) においても餌量中の炭水化物含有率を増加させ、タンパク質含有率を減少させるとヒラメと同様に餌料効率、成長速度ともに低下することを報告した。しかし、Atlantic halibutにおいては33%まで脂肪含有率を増加させても餌料効率が低下しないことも報告された。また、Bromley(1980)は脂肪含有率が少なく、タンパク質含有率が多いほど体重増加率が高いことをturbot (*Scophthalmus maximus*) において報告している。

ブリ (*Seriola quinqueradiata*) も異体類と同様に肉食魚であり炭水化物利用能が低いことが報告されている(示野ら, 1977)。しかし、ブリにおいては餌料中のタンパク質の一部を脂肪で置換することにより餌料変換効率を上昇させ、成長速度を促進できることが示されている(示野ら, 1980)。また、飼料中の脂質の割合を高めることにより餌料中のタンパク質の割合を71%から55%に低下させても成長速度が低下しないことも報告されている(竹田ら, 1975)。これらのことはブリが高い脂質利用能を持つこと、異体類よりもタンパク質依存度が低いことを示唆している。

コイ (*Cyprinus carpio*) においては、餌料中のタンパク質の一部を脂肪で置換することによる餌料変換効率、成長速度の変化は認められない。しかし、コイは40%の炭水化物を含む餌料を給餌した場合の炭水化物の消化率が40%と見積もられており(竹内ら, 1979a)、魚類としては炭水化物利用能が比較的高い。そして、餌料中の至適タンパク質含量は31~33%と推定された(竹内ら, 1979b)。この値はヒラメで報告されている値(60%以上、菊池・古田, 1998)よりも著しく低い。これらのことは異体類に脂

質利用能の種差が認められること、および異体類は成長に必要なエネルギーおよび物質としてタンパク質に依存する割合がブリ、コイに比較して高いことを示している。したがって、異体類においてタンパク質代謝を制御する技術を開発することが、栄養素を効率的に同化させ成長を促進する上で必要である。

マツカワの栄養利用能を検討した研究例は認められない。しかし、マツカワの食性についていくつかの報告がある。中川（1992）、中川（1993）、門間（1996）は漁獲されたマツカワの胃内容物組成について調査した。北海道の東岸沿岸およびオホーツク海沿岸で漁獲された個体について調査したところ、マツカワの胃内容物は甲殻類、軟体動物類、魚類で占められた。このことからマツカワは完全な肉食魚であり、ヒラメと同様にタンパク質に依存する割合が高いことが考えられる。

以上のことから、異体類の成長においてアミノ酸・タンパク質は特に重要な栄養素であり、これらを効率的に同化させるためにはインスリン分泌系を中心にして内分泌系を制御することが重要であると考えられる。

最後に

本研究において、硬骨魚類の2分子種のインスリンの生化学的同定、そして特にマツカワにおいてインスリンのホモログス酵素免疫測定法の開発、アミノ酸およびグルコースのインスリン分泌誘導効果の評価、血液中の2分子種のインスリンの免疫学的同定を行った。これらの知見および測定法は今後、硬骨魚類、特に異体類においてインスリンを中心にした内分泌系制御によるタンパク質・アミノ酸の効率的な同化制御技術開発の基礎として重要になると考えられる。

摘要

硬骨魚類において、インスリンは栄養素、特にタンパク質・アミノ酸の同化制御に key hormone として深く関わっている。したがって、硬骨魚類においてインスリンの分泌動態、作用機序を明らかにすることは、栄養素の効率的な同化、ひいては成長を促進する技術を開発する上で重要である。そして、硬骨魚類のインスリンの一次構造は変異性が高く、魚種ごとに生物活性が異なることが予想され、さらに複数の分子種を有する魚種が認められるため、各魚種において各分子種の生化学的同定および分泌動態を調査することが必要である。

以上のような背景を踏まえ、本研究はマツカワおよび数種の硬骨魚類においてインスリンの一次構造、遺伝子構造を解明し、複数のインスリン分子種の産生様式を明らかにした。さらに、マツカワインスリン酵素免疫測定法を新たに開発し、マツカワにおける2分子種のインスリンの分泌動態の一端を解明した。

第1章では、マツカワはB鎖のN末端の伸長 (Pyr-Ala) の有無のみが異なる2分子種のインスリンを有することを明らかにした。そして、5個体の臍抽出物を個体ごとに調製して、逆相HPLCに負荷したところ、インスリン-IおよびIIに対応するUV吸収ピークがすべての個体に認められ、インスリン-IおよびIIは非対立性遺伝子に支配されていることが示唆された。次に、PCRによりマツカワのゲノミックDNAからプレプロインスリン遺伝子を増幅し、塩基配列の解析を行った。その結果、単一の遺伝子が得られ、この遺伝子から演繹されたアミノ酸配列はインスリン-IおよびIIに一致した。そして、この遺伝子の一部の塩基配列をプローブとしてゲノミックサザンブロットを行ったところ、3種の制限酵素のそれぞれにより消化されたゲノミックDNAにおいて1本ずつのバンドが検出された。これらのことから、マツカワの2分子種のインスリンは単一のプレプロインスリンのシグナルペプチドのC末端の切断箇所が2箇所にわたるため生じると考えられた。第2章では、マツカワにおける2分子種のインス

リンの産生様式がマツカワに特異的なものか否かを、イシガレイ、カツオ、ホッケの3種からインスリンを精製するとともに、それらの一次構造を解析することにより検討した。

マツカワと系統的に遠縁であるイシガレイもB鎖のN末端の伸長 (Pyr-Ala) の有無のみが異なる2分子種のインスリンを有することが確認された。このことからカレイ類の多くの種がマツカワインスリン-IおよびIIに対応する2分子種のインスリンを含むことが考えられた。

1個体のカツオからインスリンを精製したところ、インスリン-IおよびIIが得られた。これらの間には11残基の配列置換が認められ、インスリン-IIのB鎖のN末端はインスリン-Iのそれに比較して1残基伸長していた。また、脊椎動物のインスリンのB鎖16残基目はレセプターと結合する領域を構成するため保存性が高く、ほとんどの種においてTyrであるが、カツオインスリン-IのそれはAsnであった。さらに、3個体の臍抽出物を個体ごとに逆相HPLCに負荷したところ、インスリン-IおよびIIに対応するUV吸収ピークがすべての個体において確認された。これらのことから、カツオのインスリン-IとIIは異なる2遺伝子座にコードされた分子種であり、生物活性が異なることが予想された。

ホッケにおいても2分子種のインスリンの存在が確認された。そして、両分子種間に11残基の置換 (アミノ酸配列類似度: 78%)、およびインスリン-IのA鎖のN末端に3残基の伸長が認められた。また、ホッケインスリン-IIとカツオインスリン-II間のアミノ酸配列類似度は92%であったが、ホッケインスリン-Iとカツオインスリン-Iのそれは66%であった。さらに、5個体のホッケから得られた臍抽出物を逆相HPLCに個体ごとの負荷したところ、すべての個体においてインスリン-IおよびIIに対応するUV吸収ピークが認められた。これらのことは、ホッケにおいてもインスリン-IおよびIIは異なる2遺伝子座に支配されていること、およびカツオとホッ

ケが分岐した後にそれぞれの種においてインスリン-I 遺伝子はインスリン-II 遺伝子の重複により生じたことを示唆している。また、ホッケのインスリン-I とII間において、レセプターと結合する領域を構成する部分にアミノ酸配列の置換および伸長が認められたことから、ホッケにおいてもカツオと同様にインスリン-I とII間の生物活性が異なることが予想された。

第3章においては、ビオチン標識マツカワインスリン-IIと抗マツカワインスリン-II血清を使用した競合免疫測定法を開発した。そして、この測定法によりアミノ酸とグルコースのインスリン分泌誘導能を投与実験により比較したところ、アルギニンが強い誘導能を有することが示された。一方、哺乳類において強い誘導能を示すグルコースの効果は弱かった。次に、アルギニン投与あるいは餌料給餌によりインスリン分泌を誘導したマツカワから血漿を採取し、逆相HPLCに負荷して得られた各フラクションのインスリン量を測定した。その結果、インスリン免疫反応はアルギニン投与および餌料給餌のいずれの実験区においても2つの反応ピークとして認められ、それらの溶出時間はマツカワのインスリン-I とIIのそれらにそれぞれが一致した。このことはマツカワにおいて2分子種のインスリンが成熟分子として血液中に分泌されること、およびアルギニンおよび摂餌後の栄養素の同化に両インスリンがともに作用することを示唆している。

本研究において、硬骨魚類のインスリンには(1)単一のプレプロインスリンから成熟型へ変換される過程でシグナルペプチドの切断箇所が異なるために2分子が生じる様式と、(2)2遺伝子座の産物として2分子種が生じる様式の2つの分子多型の産生様式が存在することが明らかになった。そして、本研究において使用した4魚種すべてにおいて複数のインスリンの存在が明らかになったことから、さらに他の硬骨魚類においても未知のインスリン分子が存在する可能性が考えられる。そのため、栄養素代謝の研究対象種における複数のインスリンの存在可能性、分泌動態、さらにそ

これらの間に機能分化があるか否かを検討することが必要であろう。そして、これらの知見および測定法は硬骨魚類、特に異体類においてインスリンを中心にした内分泌系制御による効率的なタンパク質・アミノ酸の同化制御技術開発の基礎として重要になると考えられる。

謝辞

本研究の取りまとめについて御指導と御助言を賜り、本論文を御校閲戴いた北海道大学水産学部 山崎 文雄 教授に謹んで深謝の意を表す。また、北海道大学水産学部 西田 清義 教授、原 彰彦 教授、後藤 晃 博士には本論文の御校閲を戴いた。ここに深く感謝申し上げます。さらに、本研究を進めるにあたり、種々のご便宜をお計り下さるとともにペプチドの分離精製、構造解析について御指導を戴いた東京大学大学院農学生命科学研究科 長澤 寛道 教授に心より感謝申し上げます。(社)日本栽培漁業協会 今村 茂生 部長、同じく厚岸事業場 錦 昭夫 場長、渡邊 研一 氏から絶滅に瀕している貴重なマツカワを研究材料として恵与戴いた。北海道区水産研究所 靄田 義成 博士、日本海区水産研究所 南 卓志 博士、北海道区水産研究所 松原 孝博 博士、同じく大久保 信幸 氏から本研究を進めるにあたり多くの御指導、御助言、御助力を戴いた。さらに、北海道区水産研究所 小林 義幸 氏にはマツカワの飼育施設および飼育水のきわめて精密な管理を昼夜を問わず行って戴いた。心より御礼申し上げます。

なお、本研究の一部は農林水産省連携開発研究「水産生物育種の効率化基礎技術の開発」および東京大学海洋研究所共同利用制度の補助を受けた。

引用文献

- Ablett RF, Sinnhuber RO, Holmes RM, Selivonchick DP (1981a) The effect of prolonged administration of bovine insulin in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Gen Comp Endocrinol* 43: 211-217
- Ablett RF, Sinnhuber RO, Holmes RM, Selivonchick DP (1981b) The effect of bovine insulin on [¹⁴C]glucose and [³H]leucine incorporation in fed and fasted rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Gen Comp Endocrinol* 44: 418-427
- Aksnes A, Hjertnes T, Opstvedt J (1996) Effect of dietary protein level on growth and carcass composition in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture* 145: 225-233
- Albert SG (1982) Immunological characterization of catfish (*Ictalurus punctatus*) insulin and proinsulin. *Comp Biochem Physiol* 72B: 605-612
- Andoh T, Nagasawa H (1997) Competitive enzyme immunoassay using antiserum against mammalian insulin for monitoring the purification of fish insulins. *Bull Hokkaido Natl Fish Res Inst* 61: 17-26
- Andoh T, Nagasawa H (1998) Stimulation of insulin secretion by amino acids in the starry flounder, *Platichthys stellatus*. *Bull Hokkaido Natl Fish Res Inst* 62: 107-113
- Bell GI, Pictet RL, Rutter WJ, Cordell B, Tischer E, Goodman HM (1980) Sequence of human insulin gene. *Nature* 284: 26-32
- Berks BC, Marshall CJ, Carne A, Galloway SM, Cutfield JF (1989) Isolation and structural characterization of insulin and glucagon from the holocephalan species *Callorhynchus milii* (elephantfish). *Biochem J* 263: 261-266
- Blasco J, Fernandez J, Gutierrez J (1991) Fasting and refeeding in carp, *Cyprinus carpio* L.: the mobilization of reserves and plasma metabolite and hormone variations. *J Comp Physiol* 162B: 539-546
- Blundell T, Dodson G, Hodgkin D, Mercola D (1972) Insulin: the structure in the crystal and its reflection in chemistry and biology. *Adv Protein Chem* 26: 279-402
- Blundell T, Wood SP (1975) Is the evolution of insulin Darwinian or due to selectively neural mutation? *Nature* 257: 197-203.
- Breathnach R, Chambon P (1981) Organization and expression of eukaryotic split genes coding for protein. *Annu Rev Biochem* 50: 349-383
- Bromley PJ (1980) Effect of dietary protein, lipid and energy content on the growth of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture* 19: 359-369
- Buenzli HF, Glatthaar B, Kunz P, Muelhaupt E, Humbel RE (1972) Amino acid sequence of the two insulins from mouse (*Mus musculus*). *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 353: 451-458
- Burkhardt E, Adham IM, Brosig B, Gastmann A, Mattei MG, Engel W (1994) Structural organization of the porcine and human genes coding for a Leydig cell-specific insulin-like peptide (LEY I-L) and chromosomal localization of the human gene (INSL3). *Genomics* 20: 13-19
- Celi FS, Tanner K, Roth AK, Roth AE, Shuldiner AR (1994) The two nonallelic *Xenopus* insulin genes are expressed coordinately in the adult pancreas. *Gen Comp Endocrinol* 95: 169-177
- Chan SJ, Keim SJ, Steiner DF (1976) Cell-free synthesis of rat preproinsulins:

- Characterization and partial amino acid sequence determination. *Proc Natl Acad Sci USA* 73: 1964-1968
- Chan SJ, Emdin SO, Kwok SC, Kramer JM, Falkmer S, Steiner DF (1981) Messenger RNA sequence and primary structure of preproinsulin in a primitive vertebrate, Atlantic hagfish. *J Biol Chem* 256: 7595-7602
- Chan SJ, Cao QP, Steiner DF (1990) Evolution of the insulin-like superfamily: cloning of a hybrid insulin/insulin-like growth factor cDNA from amphioxus. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9319-9323
- Conlon JM, Thim L (1986) Primary structure of insulin and a truncated C-peptide from an elasmobranchian fish, *Torpedo marmorata*. *Gen Comp Endocrinol* 64: 199-205
- Conlon JM, Davis M, Thim L (1987) Primary structure of insulin and glucagon from the flounder (*Platichthys flesus*). *Gen Comp Endocrinol* 66: 203-209
- Conlon JM, Andrews PC, Falkmer S, Thim L (1988) Isolation and structural characterization of insulin from the holocephalan fish, *Chimaera monstrosa* (rabbit fish). *Gen Comp Endocrinol* 72: 154-160
- Conlon JM, Goke R, Andrews PC, Thim L (1989) Multiple molecular form of insulin and glucagon-like peptides from the Pacific ratfish (*Hydrolagus colliei*). *Gen Comp Endocrinol* 73: 136-146
- Conlon JM, Thim L (1989) Isolation and primary structure of the C-peptide of proinsulin from the European eel (*Anguilla anguilla*). *Comp Biochem Physiol* 93B: 359-362
- Conlon JM, Andrews PC, Thim L, Moon TW (1991a) The primary structure of glucagon-like peptide but not insulin has been conserved between the American eel, *Anguilla rostrata* and the European eel, *Anguilla anguilla*. *Gen Comp Endocrinol* 82: 23-32
- Conlon JM, Youson JH, Whittaker J (1991b) Structure and receptor-binding activity of insulin from a holostean fish, the bowfin (*Amia calva*). *Biochem J* 276: 261-264
- Conlon JM, Bondareva V, Rusakov Y, Plisetskaya EM, Mynarcik DC, Whittaker J (1995) Characterization of insulin, glucagon, and somatostatin from the river lamprey, *Lampetra fluviatilis*. *Gen Comp Endocrinol* 100: 96-105
- Conlon JM, Cavanaugh ES, Mynarcik DC, Whittaker J (1996) Characterization of an insulin from the three-toed amphiuma (Amphibia: Urodota) with an N-terminally extended A-chain and high receptor-binding affinity. *Biochem J* 313: 283-287
- Conlon JM, Platz JEP, Nielsen PF, Vaudry H, Vallarino M (1997) Primary structure of insulin from the African lungfish, *Protopterus annectens*. *Gen Comp Endocrinol* 107: 421-427
- Conlon JM, Fan H, Fritsch B (1998) Purification and structural characterization of insulin and glucagon from the bichir *Polypterus senegalis* (Actinopterygii: Polypteriformes). *Gen Comp Endocrinol* 109: 86-93
- Cutfield JF, Cutfield SM, Carne A, Emdin SO, Falkmer S (1986) The isolation, purification and amino-acid sequence of insulin from the teleost fish *Cottus scorpius* (daddy sculpin). *Eur J Biochem* 158: 117-123
- Dickhoff WW (1993) Hormones, metamorphosis, and smolting. In "The endocrinology of growth, development, and metabolism in vertebrates" Ed by Schreibman MP, Scanes CG, Pang PKT, Academic Press, Inc., San Diego, CA, pp 519-540
- Dingerkus G, Howell WM (1976) Karyotypic analysis and evidence of tetraploidy in the north American paddlefish, *Polyodon spathula*. *Science* 194: 842-844
- Duan C, Hirano T (1992) Effects of insulin-like growth factor-I and insulin on the *in*

- vitro* uptake of sulphate by eel branchial cartilage: evidence for the presence of independent hepatic and pancreatic sulphation factors. *J Endocrinol* 133: 211-219
- Duan C, Noso T, Moriyama S, Kawauchi H, Hirano T (1992) Eel insulin: isolation, characterization and stimulatory actions on [³⁵S]sulphate and [³H]thymidine uptake in the branchial cartilage of the eel *in vitro*. *J Endocrinol* 133: 221-230
- Emdin S, Steiner D (1980) A specific antiserum against insulin from the Atlantic hagfish, *Myxine glutinosa*: Characterization of the antiserum, its use in a homologous radioimmunoassay, and immunofluorescent microscopy. *Gen Comp Endocrinol* 42: 251-258
- Fischer WH, Spiess J (1987) Identification of a mammalian glutaminyl cyclase converting glutaminyl into pyroglutaminyl peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 3628-3632
- Francini F, Gagliardino JJ (1995) An *in vitro* model suitable for studying insulin secretion in amphibians. *Gen Comp Endocrinol* 98: 121-128
- Fulks RM, Li JP, Goldberg AL (1975) Effects of insulin, glucose, and amino acids on protein turnover in rat diaphragm. *J Biol Chem* 250: 290-298
- Furuichi M, Nakamura Y, Yone Y (1980) A radioimmunoassay method for determination of fish plasma insulin. *Bull Japan Soc Sci Fish* 46: 1177-1181
- 古市政幸・米康夫(1972) 魚類血糖におよぼす反復採血および麻酔の影響. 九大農学芸誌 26: 577-581
- Furuichi M, Yone Y (1982) Effect of insulin on blood sugar levels of fishes. *Bull Japan Soc Sci Fish* 48: 1289-1291
- Geiger R, Langner D (1973) Insulin-analoga mit N-terminal verkürzter B-Kette. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem Bd* 354: 1285-1290
- Gerich JE, Charles MA, Grodsky GM (1974) Characterization of the effects of arginine and glucose on glucagon and insulin release from the perfused rat pancreas. *J Clin Invest* 54: 833-841
- Giddings SJ, Carnaghi LR (1989) Rat insulin-II gene expression by extrapancreatic membranes: A non-pancreatic source for fetal insulin. *J Biol Chem* 264: 9462-9469
- Giddings SJ, Carnaghi LR (1990) Selective expression and developmental regulation of the ancestral rat insulin-II gene in fetal liver. *Mol Endocrinol* 4: 1363-1369
- Giddings SJ, Carnaghi LR, Fisher LJ, Miller CP (1991) Differential regulation of rat insulin I and II messenger RNA synthesis effects of fasting and cyproheptadine. *Mol Endocrinol* 5: 549-554
- Gowan LK, Reinig JW, Schwabe C, Bedarkar S, Blundell TL (1981) On the primary and tertiary structure of relaxin from the sand tiger shark (*Odontaspis taurus*). *FEBS Lett* 129: 80-82
- Guggenheim NZ, Permutt MA (1986) Identical transcription initiation sites for proinsulin ribonucleic acid in three insulin-expressing tissues. *Endocrinology* 118: 1710-1715
- Hahn V, Winkler J, Rapoport TA, Liebscher DH, Coutelle C, Rosenthal S (1983) Carp preproinsulin cDNA sequence and evolution of insulin genes. *Nucleic Acids Res* 11: 4541-4552.
- Hayashi S, Ooshiro Z (1985) Effects of glucagon, insulin, and the eel serum in the eel liver cells in primary culture. *Bull Japan Soc Sci Fish* 51: 1123-1127
- Hoffmann K, Finn FM, Friesen H-J, Diaconescu C, Zahn H (1977) Biotinylinsulins as potential tools for receptor studies. *Proc. Natl Acad Sci USA* 74: 2697-2700
- Hobart PM, Shen LP, Crawford R, Pictet RL, Rutter WJ (1980) Comparison of the nucleic

- acid sequence of anglerfish and mammalian insulin mRNAs from cloned cDNAs. *Science* 210: 1360-1363
- 池田静徳 (1979) 魚類の糖代謝. 蛋白質・核酸・酵素 24: 292-299
- Ince BW, Thope A. (1977) Glucose and amino acid-stimulated insulin release *in vivo* in the European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Gen. Comp. Endocrinol* 31: 249-256
- Ince BW, Thope A (1978) The effects of insulin on plasma amino acid levels in the Northern pike, *Esox lucius* L. *J Fish Biol* 12: 503-506
- Ince BW (1979) Insulin secretion from the *in situ* perfused pancreas of the European silver eel, *Anguilla anguilla* L. *Gen Comp Endocrinol* 37: 533-540
- Inui Y, Yokote M (1975) Gluconeogenesis in the eel-VI. Effects of hepatectomy, alloxan and mammalian insulin on the behaviour of plasma amino acids. *Bull Japan Soc Scient Fish* 41: 1105-1111
- Inui Y, Yu JYL, Gorbman A (1978) Effect of bovine insulin on the incorporation of [¹⁴C]glycine into protein and carbohydrate in liver and muscle of hagfish, *Eptatretus stouti*. *Gen Comp Endocrinol* 36: 133-141
- Inui Y, Ishioka H (1983) Effects of insulin and glucagon on the incorporation of [¹⁴C]glycine into the protein of the liver and opercular muscle of the eel *in vitro*. *Gen Comp Endocrinol* 51: 208-212
- Iwami M, Adachi T, Kondo H, Kawakami A, Suzuki Y, Nagasawa H, Suzuki A, Ishizaki H (1990) A novel family C of the genes that encode bombyxin, an insulin-related brain secretory peptide of the silkworm *Bombyx mori*: isolation and characterization of gene C-1. *Insect Biochem* 20: 295-303
- James R, Niall HD, Kwok S, Bryant-Greenwood GD (1977) Primary structure of porcine relaxin: homology with insulin and related growth factor. *Nature* 267: 544-546
- Jorgensen C (1960) Electrophoretic properties of two insulins isolated from flounder (*Pleuronectes flesus*). *Acta Endocrinol suppl* 51: 1233
- Kashuba VI, Kavsan VM, Petrenko AI, Dmitrenko VV, Koval AP (1986) Allelic polymorphism of the salmon preproinsulin gene. *Mol Biol* 20: 845-852
- Kavsan V, Koval A, Petrenko O, Roberts Jr. CT, LeRoith D (1993) Two insulin gene are present in the salmon genome. *Biochem Biophys Res Comm* 191: 1373-1378
- 菊池弘太郎・本田晴郎・清野通康 (1993) ヒラメの成育促進技術の開発, 1. 餌料のタンパク質含量と成長. 電力中央研究所報告 U93025: 1-15
- 菊池弘太郎・古田岳志 (1998) ヒラメ稚魚期における餌量炭水化物、脂肪の利用能. 電力中央研究所報告 U97080: i-iv+1-22
- Kobel HR, Du Pasquire L (1986) Genetics of polyploid *Xenopus*. *Trends Genet* 2: 310-315
- Kondo H, Ino M, Suzuki A, Ishizaki H, Iwami M (1996) Multiple gene copies for bombyxin, an insulin-related peptide of the silkworm *Bombyx mori*: Structural signs for gene rearrangement and duplication responsible for generation of multiple molecular forms of bombyxin. *J Mol Biol* 259: 926-937
- Kotaki A (1961) Studies on insulin. II. Amino acid composition and terminal sequences of bonito insulin. *J Biochem* 50: 256-253
- Kotaki A (1962) Studies on insulin. III. On the structure of the alanyl chain of bonito insulin. *J Biochem* 51: 301-309
- Kotaki A, Kurioka U, Satake K (1962) Studies on insulin. IV. On the amino acid composition of glycylic chain of bonito insulin-I. *J Biochem* 50: 375-379
- Kotaki A (1963) Studies on insulin. V. On the structure of the glycylic chain of bonito

- insulin-II. *J Biochem* 53: 61-70
- Koval AP, Petrenko AI, Demetrenko KGM (1989) Nucleotide sequence of the chum salmon preproinsulin gene. *Mol Biol* 23: 473-480
- Kromer-Metzger E, Lagueux M (1994) Expression of the gene encoding an insulin-related peptide in *Locusta* (Insecta, Orthoptera). Evidence for alternative promotor usage. *Eur J Biochem* 221: 427-434
- 葛谷信貞・矢内原昇・葛谷健・兼子俊男 (1980) インスリン, p 1-210, 講談社サイエンティフィク, 東京
- Lagueux M, Lwoff L, Meister M, Goltzene F, Hoffman JA (1990) cDNAs from neurosecretory cells of brain of *Locusta migratoria* (Insecta, Orthoptera) encoding a novel member of the superfamily of insulins. *Eur J Biochem* 187: 249-254
- Li KW, Geraerts WPM, Ebberink RHM, Joose J (1992a) Purification and sequencing of molluscan insulin-related peptide I (MIP I) from the neuroendocrine light green cells of *Lymnaea stagnalis*. *Mol Cell Endocrinol* 85: 141-150
- Li KW, Geraerts WPM, Joose J (1992b) Purification and sequencing of molluscan insulin-related peptide II from the neuroendocrine light green cells of *Lymnaea stagnalis*. *Endocrinology* 130: 3427-3432
- Li KW, Geraerts WPM (1992c) Isolation and chemical characterization of a novel insulin-related neuropeptide from the freshwater snail, *Lymnaea stagnalis*. *Eur J Biochem* 205: 675-678
- Ludwig B, Higgs DA, Fagerlund UHM, McBride JA (1977) A preliminary study of insulin participation in the growth regulation of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Can J Zool* 55: 1756-1758
- Makower A, Dettmer R, Rapoport TA, Knospe S, Behlke J, Prehn S, Franke P, Etzold G, Rosenthal S (1982) Carp insulin: Amino acid sequence, biological activity and structural properties. *Eur J Biochem* 122: 339-345
- Marie JJ, Borjesson, BW, Walsh JR, Niall HD (1981) Limited sequence homology between porcine and rat relaxin: implications for physiological studies. *Endocrinology* 108: 726-729
- Markussen J (1971) Mouse insulins-separation and structures. *Int J Protein Res* 3: 149-155
- Maruyama K, Hietter H, Nagasawa H, Isogai A, Tamura S, Suzuki A, Ishizaki H (1988) Isolation and primary structure of bombyxin-IV, a novel molecular species of bombyxin from the silkworm, *Bombyx mori*. *Agric Biol Chem* 52: 3035-3041
- Matsumiya T, Sakamoto K, Nishikawa S (1980) Chromosomes of four species of the family Hexagrammidae (Scopaeniformes). *Japan J Ichthyol* 27: 273-276
- McRory JE, Sherwood NM (1997) Ancient divergence of insulin and insulin-like growth factor. *DNA Cell Biol* 16: 939-949
- 南卓志 (1994) 日本の希少な野生生物に関する基礎資料 (I) 分冊 II, 海産魚類, pp 284-288, 水産庁
- Monier S, LeCam A, LeMarchand-Brustel Y (1983) Insulin and insulin-like growth factor I. Effects on protein synthesis in isolated muscles from lean and goldthioglucose-obese mice. *Diabetes* 32: 392-397
- 門間春博 (1996) 能取湖に放流したマツカワから得られた 2, 3 の情報. 北水試だより 33: 1-3
- Mortimoer GE, Mondon CE (1970) Inhibition by insulin of valine turnover in liver. *J Biol Chem* 245: 2375-2383
- Muglia L, Locker J (1984) Extrapancratic insulin gene expression in the fetal rat.

Proc Natl Acad Sci USA 81: 3635-3639

- Murai T, Ogata H (1990) Changes in free amino acid levels in various tissues of common carp in response to insulin injection followed by force-feeding an amino acid diet. *J Nutr* 120: 711-718
- 中川亨(1992) マツカワ, 平成2年度日本栽培漁業協会事業年報: 348-351
- 中川亨(1993) マツカワ, 平成3年度日本栽培漁業協会事業年報: 54-56
- Nagamatsu S, Chan SJ, Falkmer S, Steiner DF (1991) Evolution of the insulin gene superfamily. *J Biol Chem* 266: 2397-2402
- Nagasawa H, Kataoka H, Isogai A, Tamura S, Suzuki A, Ishizaki H, Mizoguchi A, Fujiwara Y, Suzuki A (1984) Amino terminal amino acid sequence of the silkworm prothoracicotropic hormone: Homology with insulin. *Science* 226: 1344-1345
- Nagasawa H, Kataoka H, Isogai A, Tamura S, Suzuki A, Mizoguchi A, Fujiwara Y, Suzuki A, Takahashi SY, Ishizaki H (1986) Amino acid sequence of a prothoracicotropic hormone of the silkworm *Bombyx mori*. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 5840-5843
- Nagasawa H, Kataoka H, Suzuki A (1990) Chemistry of *Bombyx* prothoracicotropic hormone and bombyxin. In "Molting and metamorphosis" Ed by E Ohnishi and H Ishizaki, Japan Scientific Societies Press, Tokyo and Springer-Verlag, Tokyo, pp 33-48
- Navarro I, Gutierrez J, Planas J (1992) Changes in plasma glucagon, insulin and tissue metabolites associated with prolonged fasting in brown trout (*Salmo trutta fario*) during two different seasons of the year. *Comp Biochem Physiol* 102A: 401-407
- Navarro I, Carneiro MN, Parrizas M, Maestro JL, Planas J, Gutierrez J (1993) Post-feeding levels of insulin and glucagon in trout (*Salmo trutta fario*). *Comp Biochem Physiol* 104A: 389-393
- Navarro I, Gutierrez J (1995) Fasting and starvation. In "Metabolic biochemistry" Ed by PW Hochachka and TP Momsen, Elsevier, Amsterdam, pp 393-434
- Neumann PA, Humbel RE (1969) Isolation of a single component of fish insulin from a bonito-tuna-swordfish insulin mixture and its complete amino-acid sequence. *Int J Protein Res* 1: 125-140
- Neumann PA, Koldenhof M, Humbel RE (1969) Amino acid sequence of insulin from the anglerfish (*Lophius piscatorius*). *Hoppe-Seyle's Z Physiol Chem* 350: 1286-1288
- Nguyen TM, Mommsen TP, Mims SM, Conlon JM (1994) Characterization of insulins and proglucagon-derived peptides from a phylogenetically ancient fish, the paddlefish (*Polyodon spathula*). *Biochem J* 300: 339-345.
- Nguyen TM, Wright Jr JR, Nielsen PF, Conlon JM (1995) Characterization of the pancreatic hormones from the Brockmann body of the tilapia: implications for islet xenograft studies. *Comp Biochem Physiol* 111C: 33-44
- Patent GJ, Foa PP (1971) Radioimmunoassay of insulin in fishes; experiments in vivo and in vitro. *Gen Comp Endocrinol* 16: 41-46
- Perez J, Gutierrez J, Carrillo M, Zanuy S, Fernandez J (1989) Effect of bonito insulin injection on plasma immunoreactive glucagon levels and carbohydrate and lipid metabolism of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Comp Biochem Physiol* 94A: 33-36.
- Perler F, Efstratiadis A, Lomedico P, Gilbert W, Kolodner R, Dodgson J (1980) The evolution of genes: The chicken preproinsulin gene. *Cell* 20: 555-566
- Peterson JD, Steiner DF (1975) The amino acid sequence of the insulin from a primitive vertebrate, the Atlantic hagfish (*Myxine glutinosa*). *J Biol Chem* 250: 5183-5191
- Plisetskaya EM, Bhattacharya S, Dickhoff WW, Gorbman A (1984) The effect of insulin on

- amino acid metabolism and glycogen content in isolated liver cells of juvenile coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Comp Biochem Physiol* 78A: 773-778
- Plisetskaya EM, Polluck HG, Rouse JB., Hamilton JW, Kimmel JR (1985) Characterization of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) insulin. *Regul Pept* 11: 105-116
- Plisetskaya EM, Dickhoff WW, Panquette TL, Gorbman A (1986) The assay of salmon insulin by homologous radioimmunoassay. *Fish Physiol Biochem* 1: 37-43
- Plisetskaya EM, Donaldson EM, Dye HM (1987) Plasma insulin levels during the spawning migration of the pink salmon, *Oncorhynchus gorbuscha*. *J Fish Biol* 31: 21-23.
- Plisetskaya EM, Swanson P, Bernard MG, Dickhoff WW (1988a) Insulin in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during the parr to smolt transformation. *Aquaculture* 72: 151-164.
- Plisetskaya EM, Pollock HG, Elliott WM, Youson JH, Andrews PC (1988b) Isolation and structure of lamprey (*Petromyzon marinus*) insulin. *Gen Comp Endocrinol* 69: 46-55
- Plisetskaya EM, Buchelli-Narvaez LI, Hardy RW, Dickhoff WW (1991) Effects of injected and dietary arginine on plasma insulin levels and growth of pacific salmon and rainbow trout. *Comp Biochem Physiol* 98A: 165-170
- Polluck HG, Kimmel JR, Hamilton JW, Rouse JB, Ebner KE, Lance V, Rawitch AB (1987) Isolation and structure of alligator gar (*Lepisosteus spathula*) insulin and pancreatic polypeptide. *Gen Comp Endocrinol* 67: 375-382
- Pullen RA, Lindsay DG, Wood SP, Blundell TL, Wollmer A, Krail G, Brandenburg D, Zahn H, Gliemann J, Gammeltoft S (1976) Receptor-binding region of insulin. *Nature* 259: 369-373
- Rannels DE, Kao R, Morgan HE (1975) Effect of insulin on protein turnover in heart muscle. *J Biol Chem* 250: 1694-1701
- Rau K, Muglia L, Locker J (1989) Insulin-gene expression in extrafetal membranes in rats. *Diabetes* 38: 39-43
- Reid KBM, Grant PT, Youngson A (1968) The sequence of amino acids in insulin isolated from islet tissue of the Cod (*Gadus callarias*). *Biochem J* 110: 289-296
- Rinderknecht E, Humbel RE (1978) The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* 253: 2769-2776
- Robitzki A, Schroder HC, Ugarkovic D, Pfeifer K, Uhlenbruck G, Muller WEG (1989) Demonstration of an endocrine signaling circuit for insulin in the sponge *Geodia cydonium*. *EMBO J* 8: 2905-2909
- Ronner P and Scarpa A. (1987) Secretagogues for pancreatic hormone release in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Gen Comp Endocrinol* 65: 354-362
- Rosen P, Simon M, Reinauser H, Friesen HJ, Diaconescu C, Brandenburg D (1980) Binding of insulin to bovine liver plasma membrane. *Biochem J* 186: 945-952
- Rusakov YI, Karasev VS, Bondareva VM, Pertseva MN, Pankov YA (1990) Isolation, primary structure, and biological and immunological properties of pink and chum salmon insulins. *Comp Biochem Physiol* 95B: 477-481
- Rusakov YI, Moriyama S, Bondareva VM, Kolychev AP, Amemiya Y, Yasuda A, Kawauchi H (1998) Isolation and characterization of insulin in Russian sturgeon (*Acipenser guldenstaedti*). *J Peptide Res* 51:395-400
- Sanger FS, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 5463-5467
- Schwabe C, McDonald JK, Steinetz BG (1977) Primary structure of the B-chain of porcine

- relaxin. *Biochem Biophys Res Commun* 75: 503-510
- 示野貞夫・細川秀毅・平田博武・竹田正彦 (1977) ハマチとコイの糖代謝比較. *日水誌* 43: 213-217
- 示野貞夫・細川秀毅・竹田正彦・梶山英俊 (1980) 配合餌料のカロリー・タンパク質比がハマチの成長、餌料効率および体成分に及ぼす影響. *日水誌* 46: 1083-1087
- Shamblott MJ, Chen TT (1992) Identification of a second insulin-like growth factor in a fish species. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8913-8917
- Shuldiner AR, Bennett C, Robinson ER, Roth J (1989a) Isolation and characterization of two different insulins from an amphibian, *Xenopus laevis*. *Endocrinology* 125: 469-477
- Shuldiner AR, Philips S, Robert Jr. CT, LeRoith D, Roth J (1989b) *Xenopus laevis* contains two nonallelic preproinsulin genes. *J Biol Chem* 264: 9428-9432
- Shuldiner AR, De Pablo F, Moore CA, Roth J (1991) Two nonallelic insulin genes in *Xenopus laevis* are expressed differentially during neurulation in prepancreatic embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7679-7683
- Smith LF (1966) Species variation in the amino acid sequence of insulin. *Am J Med* 40: 662-666
- Smit AB, Vreugdenhil E, Ebberink RHM, Geraerts WPM, Klootwijk J, Joose J (1988) Growth controlling molluscan neurons produce the precursor of an insulin-related peptide. *Nature* 331: 535-538
- Smit AB, Geraerts WPM, Meester I, Van Heerikhuizen H, Joose J (1991) Characterization of a cDNA clone encoding molluscan insulin-related peptide II of *Lymnaea stagnalis*. *Eur J Biochem* 199: 699-703
- Smit AB, Thijsen SFT, Geraerts WPM, Meester I, Van Heerikhuizen H, Joose J (1992) Characterization of a cDNA clone encoding molluscan insulin-related peptide V of *Lymnaea stagnalis*. *Mol Brain Res* 14: 7-12
- Smit AB, Van Marle A, Van Elk R, Bogerd J, Van Heerikhuizen H, Geraerts WPM (1993) Evolutionary conservation of the insulin gene structure in invertebrates cloning of the gene encoding molluscan insulin related-peptide III from *Lymnaea stagnalis*. *J Mol Endocrinol* 11: 103-113
- Smit AB, Spijker S, Van Minnen J, Burke JF, De Winter F, Van Elk R, Geraerts WPM (1996) Expression and characterization of molluscan insulin-related peptide VII from the mollusc *Lymnaea stagnalis*. *Neuroscience* 70: 589-596
- Smit AB, Van Kesteren RE, Li KW, Van Minnen J, Spijker S, Van Heerikhuizen H, Geraerts WPM (1998) Towards understanding the role of insulin in the brain: lessons from insulin-related signaling systems in the invertebrate brain. *Prog Neurobiol* 54: 35-54
- Soares MB, Schon E, Henderson A, Karathanasis SK, Cate R, Zeitlin S, Chirgwin J, Efstratiadis A (1985) RNA-mediated gene duplication: the rat preproinsulin I gene is a functional retroposon. *Mol Cell Biol* 5: 2090-2103
- Sorokin AV, Petrenko OI, Kavsan VM, Kozlov YI, Debabov VG, Zlochevskij ML (1982) Nucleotide sequence analysis of the cloned salmon preproinsulin cDNA. *Gene* 20: 367-376
- Stein S, Bohlen P, Dairman W, Leimgruber W, Weigle M (1972) Fluorescamine: A reagent for assay of amino acids, peptide, proteins, and primary amines in the picomole range. *Science* 178: 871-872

- Steiner DF, Oyer PE (1967) The biosynthesis of insulin and probable precursor of insulin by a human islet cell adenoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 57: 473-480
- Sundby A, Eliassen K, Refsti T, Plisetskaya E (1991) Plasma levels of insulin, glucagon and glucagon-like peptide in salmonids of different weights. *Fish Physiol Biochem* 9: 223-230
- Sussenbach JS (1989) The gene structure of the insulin-like growth factor family. *Prog Growth Factor Res* 1: 33-48
- Syed Ali S (1985) Microvasculature of the principal islets in the scorpion fish, *Myoxocephalus scorpius*. *Arch Histol Jpn* 48: 363-371
- Tan K, Atabani G, Marks V (1985) Divergent effects of glucagon antibodies on arginine and glucose stimulated insulin secretion in the rat. *Diabetologia* 28: 441-444
- 竹田正彦・示野貞夫・細川秀毅・梶山英俊・会所建志 (1975) ハマチの成長、飼料効率および体成分に及ぼす餌料のカロリー・蛋白質比の影響. *日水誌* 41: 443-447
- 竹内俊朗・渡辺武・荻野珍吉 (1979a) コイ用餌料におけるエネルギー源としての炭水化物と脂質. *日水誌* 45: 977-982
- 竹内俊朗・渡辺武・荻野珍吉 (1979b) コイ用餌料の至適エネルギー・タンパク質比. *日水誌* 45: 983-987
- Tilzey JF, Waights V, Holmes R (1985) The development of a homologous teleost insulin radioimmunoassay and its use in the study of adrenaline on insulin secretion from isolated pancreatic islet tissue of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* (R.). *Comp Biochem Physiol* 81A: 821-825
- Tsuzuki S, Masuta T, Furuno M, Sakurai S, Iwami M (1997) Structure and expression of bombyxin E1 gene: a novel family gene that encodes bombyxin-IV, an insect insulin-related neurosecretory peptide. *Comp Biochem Physiol* 117B: 409-416
- Yamamoto M, Kotaki A, Okuyama T, Satake K (1960) Studies on insulin. I. Two different insulins from Langerhans islet of bonito fish. *J Biochem* 48: 84-92
- 山野恵祐 (1995) ヒラメの変態に関する発生学的・内分泌学的研究. 北海道大学博士学位論文. pp 1-105
- Zahn H, Brandenburg D, Gattner HG (1972) Molecular basis of insulin action: Contributions of chemical modifications and synthetic approaches. *Diabetes* 21(Suppl 2): 468-475

