

Ⅱb族元素 (Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+}) 及びセレンのインスリン様作用について

江崎 治

(国立健康・栄養研究所, 臨床栄養部*)

Insulin Like Effects of IIb Group Metal Iones Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} and Selenate in Rat Adipocytes

Osamu EZAKI

National Institute of Health and Nutrition

Selenate was found to have several insulin-like effects in rat adipocytes: stimulation of glucose transport activity by translocation of two types of glucose transporters from intracellular sites to the plasma membrane, stimulation of cAMP phosphodiesterase activity, and stimulation of ribosomal S6 protein phosphorylation. Furthermore, in intact cells addition of 1mM selenate stimulated tyrosyl phosphorylation of 210-, 170-, 120-, 95-, 70-, and 60-kDa proteins but failed to stimulate insulin receptor kinase activity, suggesting that selenate stimulated other tyrosine kinase. In the presence of insulin, selenate enhances insulin receptor kinase activity and phosphorylations of insulin-stimulated tyrosyl phosphoproteins. These results may provide clues for the elucidation of the role of selenium in animals and the mechanism of insulin action.

Zn^{2+} (1mM), Cd^{2+} (1mM), and Hg^{2+} (0.1mM) belonging to the IIb group in the periodic table stimulated glucose transport activity and cAMP phosphodiesterase in rat adipocytes. The stimulation of glucose transport was due to the translocation of glucose transporters from the intracellular site to the plasma membrane. However, in intact adipocytes none of these ions stimulated insulin receptor kinase activity or phosphorylation of the 95-kDa subunit of insulin receptor or 170- or 60-kDa proteins at the tyrosyl residues. These proteins were markedly phosphorylated by addition of 0.3nM insulin which stimulated glucose transport activity as effectively as these metal ions. These results indicate that Zn^{2+} , Cd^{2+} , and Hg^{2+} mimic insulin action by a post-receptor / kinase mechanism.

*所在地：東京都新宿区戸山1-23-1 (〒162)

ある種の微量元素が、インスリン様作用を示すことはよく知られている。例えば Vanadate¹⁾ Zn^{2+ 2)}, Mn^{2+ 3)} 等は有名である。本研究では30数種類の元素の中から、糖輸送促進作用の存在する元素を選び出した所、今までの元素以外に Selenate⁴⁾, Cd²⁺, Hg^{2+ 5)} にインスリン様作用が存在することを見出した。特に Selenate は、これらの微量元素の中では最も強力であり、生理的濃度でも弱いながらインスリン様作用を示す可能性があり、又インスリンレセプターを介さないでその作用を発現することがわかった。

実験方法

ラット脂肪細胞をコラゲナーゼにより分離し、2nM インスリンの有無で各群の糖輸送活性を1mM の 3-O-methyl-D-glucose の3秒間の取り込み量で推定した⁶⁾。次に、糖輸送体の細胞内分布の変化を調べる目的で、赤血球型の糖輸送体 GLUT 1 とインスリン感受性組織に発現している GLUT 4 の細胞内での分布をイムノブロットング法で調べた。又、インスリンにより活性化される cAMP ホスホジエステラーゼ活性⁷⁾、リボソーム S6 蛋白のリン酸化を測定し⁸⁾、チロシン残基のリン酸化蛋白の同定には、全細胞の溶解物か、細胞の膜分画を用い、ホスホチロシン抗体を用いるイムノブロットング法を行なった。又、生きた細胞でのインスリンレセプターキナーゼの測定は、Klein 等の方法を用いた^{9,10)}。

実験結果

多くの元素の中からインスリン様作用を示す元素を選び出し、その作用の強い順に並べたのが Table 1 である。インスリンに活性化された最大の糖取り込み量の50%の値を得るのに必要な強度を示した。最も強力な作用を持つものが Selenate であり、その次に Vanadate, II b 族元素と続く。次に Selenate のインスリン作用について説明すると、セレネート (SeO₄²⁻) の濃度を変えて脂肪細胞に加えて、30分間インキュベートすると、Fig. 1 の A に示すように濃度依存的に糖輸送活性を促進させた。この糖

Table 1. The insulin-like effects of various elements

BEST 8 of INSULIN MIMICKERS	
1	SELENATE 0.1 mM
2	VANADATE 0.6 mM
3	Zn 0.7 mM
4	Cd 0.7 mM
5	Hg ?
6	Mn 10 mM
7	Mg ?
8	Ca ?

The concentration of elements was given to have the same potency to show 50% activity of maximal insulin-stimulated glucose transport rate

SELENATE-STIMULATED GLUCOSE TRANSPORT ACTIVITY

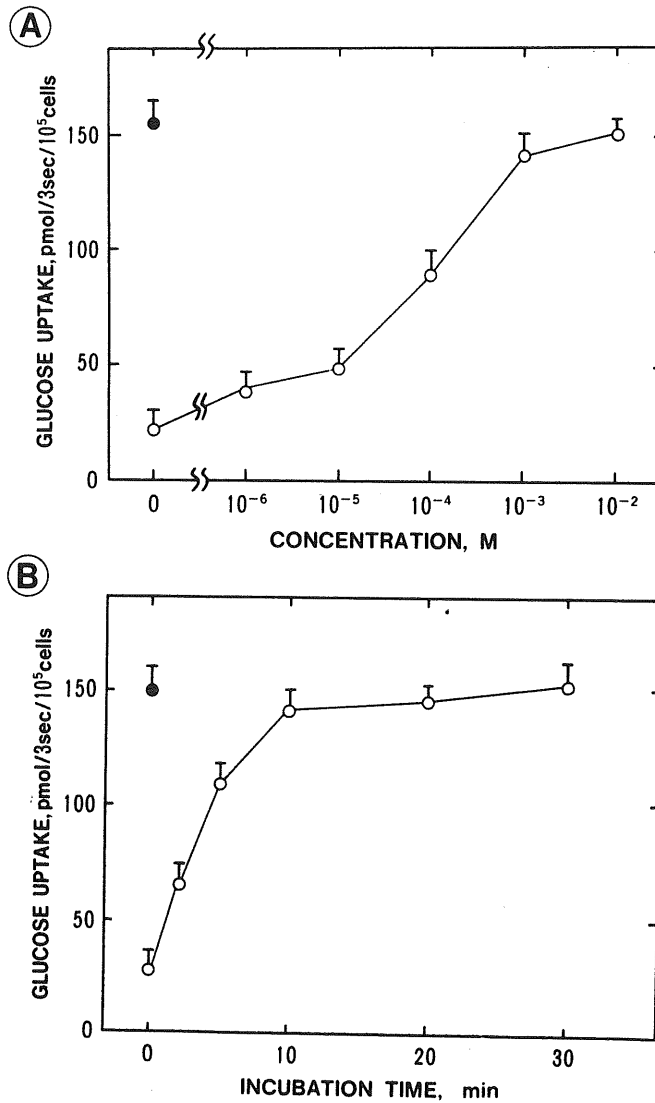


Fig. 1. Selenate-stimulated glucose transport activity. In panel A, isolated rat adipocytes in buffer A were exposed to the indicated concentrations of selenate for 30 min at 37°C (○). In panel B, cells were incubated with 1 mM selenate for the indicated periods at 37°C (○). At the end of the incubations, 3-O-¹⁴C]methyl-D-glucose uptake was measured. As control, cells were incubated with 1 nM insulin for 10 min (●). The data show mean values ± S.E. (n = 3).

GLUCOSE TRANSPORT ACTIVITY

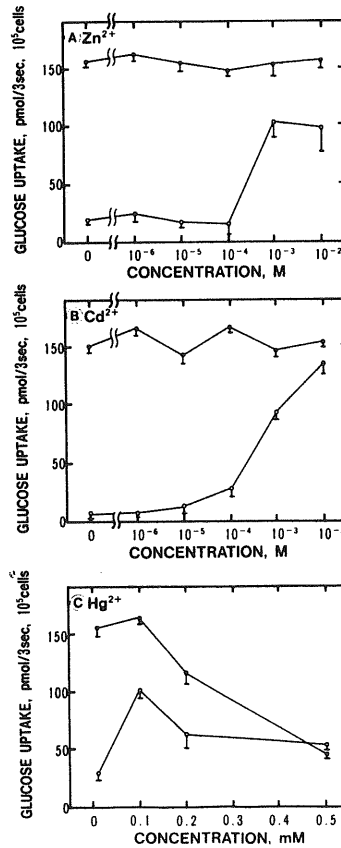


Fig. 2. Effects of concentrations of Zn²⁺, Cd²⁺, or Hg²⁺ on the 3-O-methyl-D-glucose uptake in the absence and presence of 1 nM insulin. Aliquots of adipocytes were exposed to the indicated concentrations of ZnSO₄ (A), CdCl₂ (B), and HgCl₂ (C) for 30 min at 37°C, mixed with 1 nM insulin (●) or without insulin (○), and incubated for an additional 10 min. At the end of incubation, 3-O-methyl-D-glucose uptake was measured. The data show mean values ± S.E. (n = 3).

輸送促進効果は1 μM の生理的濃度でも認められ、最大活性は1nM インスリン刺激によって得られる糖輸送活性とほぼ同程度であった。Fig. 1 の B に1mM セレネートによる糖輸送促進作用の時間的変化を示した。この促進作用は、2分後には認められ、10分後には最大活性となった。

次にインスリンの糖輸送促進作用は、細胞内に存在する2種類の糖輸送体の形質膜への移動で説明されることから、セレネート処理細胞の糖輸送体の分布を調べた。1mM セレネート処理により細胞内に存在する赤血球型糖輸送体 GLUT 1 は、その内71%が形質膜へ移動し、インスリン感受性組織に存在する糖輸送体 GLUT 4 は、細胞内の34%が形質膜へ移動した。この移動量は1nM インスリン刺激の場

合とほとんど同じであった。これらの結果は、それぞれの糖輸送体はセレネートにより形質膜へ移動し、そのために糖輸送活性が増加することを意味した。又、セレネートは他のインスリンの生理作用である cAMP ホスホジエステラーゼやリボソーム S6 蛋白のリン酸化も亢進することがわかり、主要なインスリンの情報伝達機構に影響を与えることがわかった。

以前の研究により、インスリン刺激により脂肪細胞に於いては、95-KDa のインスリンレセプターの他に170-KDa、60-KDa の蛋白のチロシン残基がリン酸化されることが知られている。セレネート刺激によっては、210-, 170-, 120-, 95-, 60-KDa の蛋白のチロシン残基がリン酸化された。インスリンによって刺激された170-, 95-, 60-KDa の蛋白は、セレネートとインスリンの同時刺激により、更に強く刺激された。

以上の data は1mM セレネートによってインスリンレセプターキナーゼが活性化されたか、他のチロシンキナーゼが活性化されたか、又はホスホチロシンホスファターゼを阻害したかを意味した。これらの可能性を調べるため、まず最初にインスリンレセプターキナーゼが活性化されるかどうかヒストン 2B を基質としてリン酸化の程度を調べた。1mM のセレネートはインスリンによるレセプターキナーゼ活性を更に増強したがセレネート自体はキナーゼを活性化しなかった。次にセレネートが Cell-free の系でホスホチロシンホスファターゼの阻害作用を示すかどうか調べた。インスリン処理をしてホスホチロシンをリン酸化させた後、1mM セレネートの存在下で37℃、10分間インキュベートした。何も入れないコントロールに於いては、ホスホチロシンは脱リン酸化された。1mM セレネートの存在下でもこれらの蛋白は脱リン酸化されたが、Ⅱb 族元素、Vanadate 等のホスファターゼの阻害剤の存在下ではこれらの蛋白の脱リン酸化は阻害された。これらの結果は細胞を壊した系に於いて、1mM の濃度でセレネートはチロシンキナーゼを活性化せず、又ホスホチロシンホスファターゼの阻害剤としても働いていないことを意味した。

同様にⅡb 族元素の糖輸送促進作用を調べた所、Fig. 2 に示すように糖輸送をインスリンと同じように促進するが、高濃度でのみ認められ、残念ながら生理的濃度では糖輸送促進作用は認められなかった。Hg²⁺ は糖輸送活性を濃度が高くなるに従って抑制したが、これは糖輸送体の直接の作用のためと思われた。又 Selenate と同様に cAMP ホスホジエステラーゼ、及びリボソーム S6 蛋白をリン酸化した。

次にチロシン残基のリン酸化の程度を調べた所、セレネートと異なり、内因性の基質と思われる170-KDa、60-KDa の蛋白はリン酸化せず、又インスリンレセプターキナーゼ活性も亢進させなかった。すなわちⅡb 族元素もセレネートと同様にインスリンレセプターキナーゼを介さないで作用を示すと思われる。

考 察

以上の研究から、インスリンレセプターキナーゼを介さないでインスリン作用を発現する元素及び化合物が存在することが明らかになった。特に Selenate は生理的濃度でもこのような作用を示すことから特に注目に値する。食物に含まれているセレン化合物は多くの化学形態を示すことから、セレンを多く含む食事を摂取してもインスリン作用が生体内で発現するという根拠はない。生体内でこれらの微量

元素を多く摂取すると実際に糖尿病状態が改善されるかどうかは今後の課題といえる。

しかしながら、インスリンレセプターキナーゼを介さないで作用する物質の存在することが明らかになったことにより、Selenateによく似た物質を作製することによりインスリンレセプターキナーゼの障害のある患者に対して有効に働く可能性を示した。

文 献

1. DUBYAK, G. R. and A. KLEINZELLER (1980) *J. Biol. Chem.* 255 : 5306
2. MAY, J. M. and C. S. CONTOREGGI (1982) *J. Biol. Chem.* 257 : 4362
3. UEDA, M., F. W. ROBINSON, M. M. SMITH and T. KONO (1984) *J. Biol. Chem.* 259 : 9520
4. EZAKI, O. (1990) *J. Biol. Chem.* 265 : 1124
5. EZAKI, O. (1989) *J. Biol. Chem.* 264 : 16118
6. KONO, T., F. W. ROBINSON and J. A. SARVER (1975) *J. Biol. Chem.* 250 : 7826
7. EZAKI, O., H. ITAKURA, M. KASUGA, Y. ANRAKU and M. KASAHARA (1986) In contemporary themes in biochemistry, ed. kon, O. L., Cambringe Univ. Press, ICSU Short Report vol. 6 : pp. 440-441
8. KLEIN, H. H., G. R. FREIDENBERG, M. KLABDE and J. M. OLEFFSKY (1986) *J. Biol. Chem.* 261 : 4691
9. KLEIN, H. H., G. R. FREIDENBERG, S. MATTAEI and J. M. OLEFSKY (1987) *J. Biol. Chem.* 262 : 10557