

バナジウムに魅せられて

植木 寛

Be Fascinated by Vanadium

Hiroshi Ueki

ABSTRACT

Vanadium is an essential trace element for animals owing to its physiological and biochemical activities but it is still unknown whether the element is essential for humans. The effects of vanadate on lipoprotein lipase (LPL), a lipid-metabolizing enzyme, were tested using isolated rat fat pads. Vanadate increased the cellular LPL content through the stimulation of intracellular transport of the enzyme for activation, probably glycosylation. The stimulated release of LPL from the fat pads by vanadate was due to the increase in intracellular Ca^{2+} concentration, leading to the fusion of plasma membrane with vesicle including active LPL. Thus, vanadate appears to differ from both insulin and heparin with regard to the mechanism of action although it shows the insulin and heparin-mimic actions. Leptin is the product of the obese gene and secreted from adipose tissue into the circulation. Vanadate, in contrast to insulin, decreased the cellular leptin content and secretion by the increased degradation via a cAMP/PKA-dependent process involving proteasome activation. In hepatocytes, cAMP phosphodiesterase type 3 was stimulated via the increased mitogen-activated protein kinase activity by vanadate. On the other hand, the stimulation by insulin was dependent on the Akt kinase activation. The effects of vanadate were additive to those of insulin, suggesting that vanadate differs from insulin with regard to a receptor-signaling cascade. Furthermore, vanadate showed the anti-platelet and antithrombin actions, leading to the prolongation of blood clotting time. Thus, vanadate seems to be useful as biological tools and medicines.

はじめに

インスリンは、1921年 Banting と Best によって発見され、多くの糖尿病患者を救った。その後、合成治療薬の開発が精力的に行われ、インスリン治療の問題点である注射に変わって経口投与が可能なスルファニル尿素製剤やインスリン抵抗性改善薬などが見出され、患者の QOL の向上に多大の貢献をなした。しかしながら、これらの治療薬はすい臓β細胞からのインスリン分泌促進あるいは標的細胞でのインスリン感受性の正常化などが主たる作用機構であり、基本的にインスリンの存在が必須である。現在に至るも完全にインスリンに取って代わり得る安全性の高い薬物は見出されていない。若い頃の著者が挑戦したのが、インスリン代用薬の開発であった。まず手始めに行ったのはプロテアーゼのインスリン類似作用に関する研究である。微生物由来のプロテアーゼの一種である Pronase (プロナーゼ P、科研製薬) がマウス横隔膜のグルコース取り込みを促進することを見出し活性成分を精製し作用機構を解析した。¹⁻⁶⁾インスリン様活性酵素は、elastase 様の基質特異性を示すセリン酵素であり、その作用機構としては、インスリン受容体の部分消化がインスリンと類似のシグナルを与える可能性が示唆された。さらにラット脂肪細胞を用いて抗脂肪分解作用、糖の脂質への変換促進、pyruvate dehydrogenase 活性化などを検討したところ、いずれもインスリン類似の作用が認められた。⁷⁾本酵素をマウス腹腔内投与すると、血糖値は有意に低下し、脂肪酸の血糖への変換も抑制され、in vitro のみならず in vivo 投与においてもインスリン様活性が認められた。⁸⁾しかしながら投与部位に炎症が起こるなど生体投与に関しては、解決すべき課題が残った。Elastase (エラスチーム、エーザイ) は、経口投与によって、ヒトの血清脂質異常や動脈硬化性疾患で改善効果が認められていた。^{9,10)}そこでこの酵素のインスリン様作用について検討を行った。ラット脂肪細胞で elastase は、糖の取り込みや脂質合成の促進および pyruvate dehydrogenase 活性化などを示したのでこのインスリン様作用が脂質代謝異常改善効果の作用機構の一つであることを報告した。^{11,12)}このような研究背景を持って1983年に著者は新設の福山大学薬学部へ赴任した。ここでもインスリン代用薬開発の夢を追いつづけるべく、まず脂質代謝酵素 lipoprotein lipase (LPL) を標的酵素として選び、糖代謝でインスリン類似の作用示すことが報告されている物質についてラット脂肪組織を用いて予備的スクリーニングを行った。プロテアーゼ類、バナジウム化合物、コンカナバリン A、ポリアミン、H₂O₂, などの中でバナジウム化合物にインスリンを凌ぐ強力な LPL 活性増加作用が認められた。

バナジウムは自然界に広く分布し、ヒトは、毎日食物として10~60 μg のバナジウムを自然な形で摂取し、体内には、常に100~200 μg 程度存在する。今のところヒトでの明確な必須性は不明であるが、ウサギやラットでは欠乏症として、成長・体重増加遅延、鉄代謝異常、繁殖力低下、コレステロール代謝異常などが認められ、小動物では必須微量元素の一つであると考えられている。¹³⁾酵素に対する直接作用は、1970年代後半に Sigma の ATP 製品中に混在する Na⁺, K⁺-ATPase 阻害物質として偶然に見出され、¹⁴⁾これが引き金となって、バナジウムによる多くの酵素の活性調節に関する研究がなされたがその生理・生物作用は多岐

にわたり、未だに統一的理解が得られないほど複雑である。その上、バナジウムの化学は、生理的条件下でその酸化状態を容易に変えるため、かなり複雑である。¹⁵⁾ V^{5+} 酸化状態では陰イオン型、 VO_3^- (メタバナデート) や VO_4^{3-} (バナデート) として、一方、 V^{4+} 酸化状態では陽イオン型、 VO^{2+} (バナジル) として存在する。バナジルは、pH 7.4の緩衝液中1時間でその50%がバナデートへ酸化されるなど極めて不安定であり、実験結果の混乱を招く一因となっている。¹⁶⁾ Heyliger らは、ストレプトゾトシン実験糖尿病ラットにバナデートを飲料水に混ぜて6週間投与したところ、高血糖値は正常化し、糖尿病特有の心臓機能異常も改善するという驚くべき結果を報告した。¹⁷⁾ この作用は、血中インスリン濃度とは無関係であり、バナデート独自のインスリン類似作用が俄かに脚光を浴びた。その後、比較的毒性の低いバナジルの安定型であるその錯体化合物が合成され、ストレプトゾトシン実験糖尿病ラットに経口投与や腹腔内投与のいずれによっても高血糖値が正常状態に低下する事が確認された。^{18, 19)} ヒトへの臨床的応用として、2型糖尿病患者に6週間にわたってバナジルを投与して認められる血糖低下作用は、肝や筋肉でのインスリン感受性の亢進にもとづくものである可能性が示唆されている。²⁰⁾

本文では、バナデートが脂肪組織中の LPL 活性を増加し、細胞外への分泌を促進すること、一方同じ分泌たんぱく質の一種であるレプチンに対しては、インスリンと全く逆の負の調節を行うこと、またこれらの作用に関与する細胞内 cAMP 量を調節する phosphodiesterase (PDE) がインスリンと異なるリン酸化カスケードによって活性調節を受けることなどを述べる。

(1) バナデートによる LPL 活性の調節

LPL は脂肪組織で合成・分泌後、heparan sulfate proteoglycan によって血管壁表面に保留され、LDL や chylomicron 中のトリグリセリドを脂肪酸に分解し、脂質代謝の調節を行う主要酵素である。²¹⁾ 本酵素はインスリンによって合成が促進され、ヘパリンによって、活性化・血中遊離を受ける。²²⁾

摘出ラット副睾丸脂肪組織にバナデートやインスリンを作用させると、組織中の LPL 活性は2時間まで、両物質共に同様な増加を示した (Fig. 1-1)。²³⁾ インスリンは、LPL の生合成を促進するが、バナデートは酵素の糖鎖形成やゴルジ体移行の阻害剤であるモネンシンによる阻害から、LPL の活性化に必須である糖鎖形成と細胞内輸送促進に関与していることがわかった (Fig. 1-2)。さらにバナデートは、インスリンではほとんど認められない細胞からの LPL 分泌を促進した (Fig. 1-3)。²⁴⁾ この作用は、細胞内 Ca^{2+} 濃度に依存することが、細胞内 Ca^{2+} キレート剤の使用で明らかになった (Fig. 1-4)。ヘパリンも強力な LPL 分泌促進物質であるが、作用機構は異なった。この in vitro の結果に基づいて、ウサギへの in vivo 効果の検討を行った。バナデートを飲料水に混ぜて投与したところ、1週間でウサギが弱り、

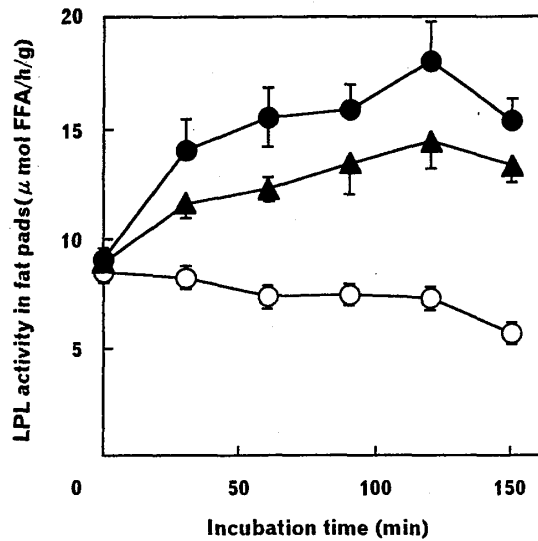


Fig. 1-1. Time Course of Increase in LPL Activity in Isolated Rat Fat Pads by Vanadate or Insulin

The fat pads were incubated with vanadate (2 mM, ●), insulin (3 nM, ▲), or neither one (○) in Krebs-Ringer bicarbonate buffer containing 5 mM glucose and 2% serum albumin, pH 7.4, (KRBGA) for up to 150 min. The incubated fat pads were homogenized and centrifuged. The resultant supernatant was used as crude LPL solution. The activity was assayed using the activated intralipos in the presence or absence of 1 M NaCl. The LPL activity calculated from values reduced in the presence of 1 M NaCl is expressed as μ mol free fatty acids (FFA) produced per h per g fat pads.

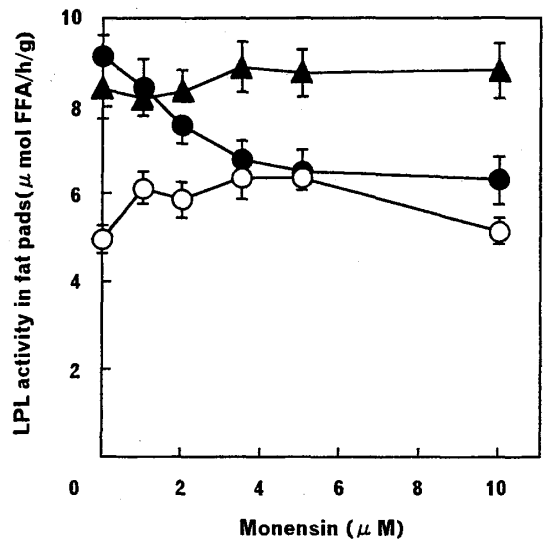


Fig. 1-2. Effect of Monensin on Increase in LPL Activity in Fat Pads by Vanadate or Insulin

The fat pads were preincubated with monensin at the indicated concentrations for 15 min and further incubated with vanadate (2 mM, ●), insulin (3 nM, ▲), or neither one (○) for 120 min.

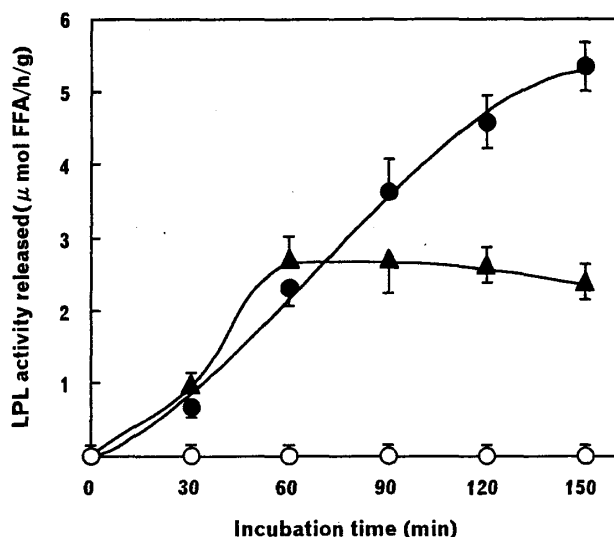


Fig. 1-3. Time Course of the Stimulatory Effects of Vanadate and Heparin on Release of LPL Activity from the Fat Pads

The fat pads were incubated with vanadate (2 mM, ●), heparin (5 U/ml, ▲), or neither one (○) for up to 150 min. The incubated fat pads were removed by centrifugation, and the resultant solution was used as the enzyme solution.

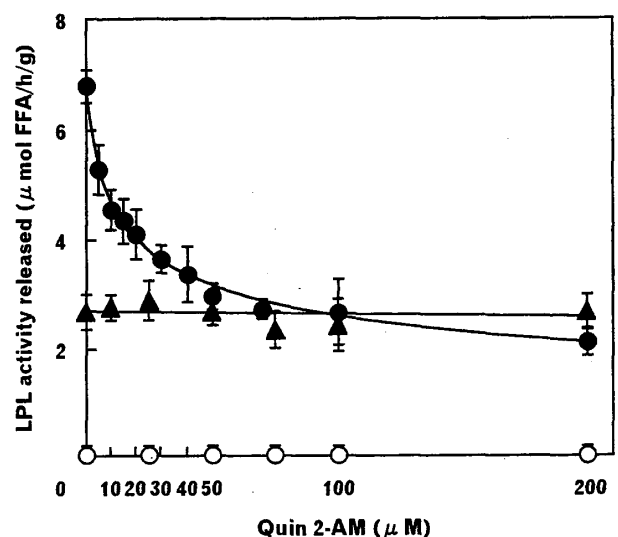


Fig. 1-4. Effect of Quin 2-AM Loading on Vanadate-Stimulated Release of LPL Activity from Fat Pads

The fat pads were preincubated with quin 2-AM at the indicated concentrations for 15 min and further incubated with vanadate (2 mM, ●), heparin (10 U/ml, ▲), or neither one (○) for 90 min.

低投与量のものも含めてすべてに毒性が現れ、実験は失敗した。採血に容易なためウサギを選んだが、ラットに比して極端に毒性の出やすい動物である事があとでわかった。その後間もなくして、外国の研究グループからバナデートをストレプトゾトシン実験糖尿病ラットに4週間経口投与すると高血糖が正常化するのみならず、脂肪組織や心臓の低 LPL 活性や肝臓の低 hepatic lipase 活性が回復すること、²⁵⁾またラット心臓をバナデートを含む循環液で還流すると LPL の放出が促進されることなどが報告された。²⁶⁾このようにバナデートによる in vitro および in vivo LPL 活性の調節に関する報告がなされたが、その機構は推定の域を出なかったのでこの解明に取り組んだ。バナデートによる LPL 活性の脂肪組織からの放出促進は細胞内 Ca^{2+} 濃度に依存したのでその調節因子について検討した。ラット脂肪組織にバナデートを反応させると30秒で inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) の最大増加が認められた (Fig.1-5)。²⁷⁾

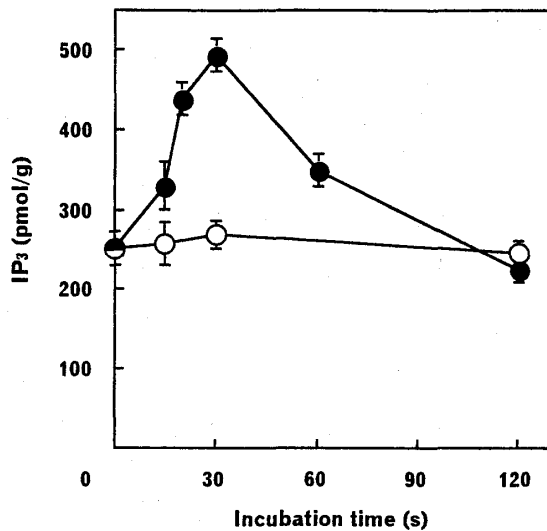


Fig. 1-5. Time Course of the Increasing Effect of Vanadate on IP_3 Content in Fat Pads

The fat pads were incubated with vanadate (2 mM, ●) or insulin (15 nM, ○) for the indicated periods. The incubated fat pads were quickly frozen to terminate the reaction and homogenized in cold 12.5% trichloroacetic acid (TCA). The IP_3 amount was determined using an IP_3 determination kit.

IP_3 は細胞内 Ca^{2+} プールから Ca^{2+} の放出を促進する2次情報伝達物質であることが知られており、バナデート処理脂肪組織から分離した IP_3 含有画分を [$^{45}Ca^{2+}$] -loaded endoplasmic reticulum に作用させると反応液中への [$^{45}Ca^{2+}$] の放出が促進された。この結果は、バナデートは IP_3 生成促進を介して細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させることを示す。次にバナデートの LPL 活性放出促進作用への cAMP-dependent protein kinase (PKA) 系の関与について検討した。バナデートの作用は PKA の阻害剤である H-8 によって強く阻害され、バナデート処理脂肪組織の PKA 活性は増大した。²⁸⁾バナデートは脂肪組織中の細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇と PKA の活性化を介して LPL の細胞外への放出を促進すると思われた。V⁴⁺化合物であるバナジルを牛血清アルブミン (BSA) で安定化したバナジル-BSA もまた脂肪組織中の LPL 活性を増加し、細胞外への放出も促進した (Fig.1-6)。²⁹⁾

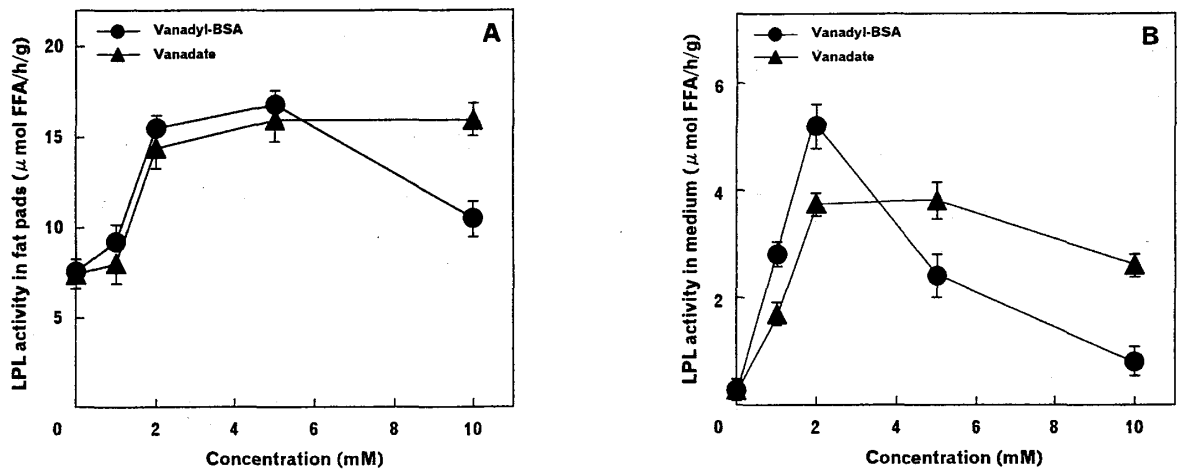


Fig. 1-6. Dose-Response Curves for Increasing Effects of Vanadyl-BSA and Vanadate on LPL Activity in Fat Pads or Medium

Vanadyl-BSA was prepared by preincubation with a molar ratio of 10 (vanadyl):1 (BSA) in KRBG at 37 °C for 1 h immediately before use. The fat pads were incubated with vanadyl-BSA or vanadate at the indicated concentrations for 90 min. (A) LPL activity in fat pads. (B) LPL activity in medium.

これらの結果からバナジウム化合物による LPL 放出促進作用は、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇による LPL が濃縮されている分泌顆粒と細胞膜との融合促進に基づくと考えられ、PKA は細胞外の Ca^{2+} 流入を促進する機構が想定された。Fig.1-7 は LPL の合成、プロセッシング、分泌についてバナデート、インスリンおよびヘパリンの作用を比較したものである。バナデートは、他の二者とは全く異なる機構で活性増加・分泌促進を示すことが明らかになった。

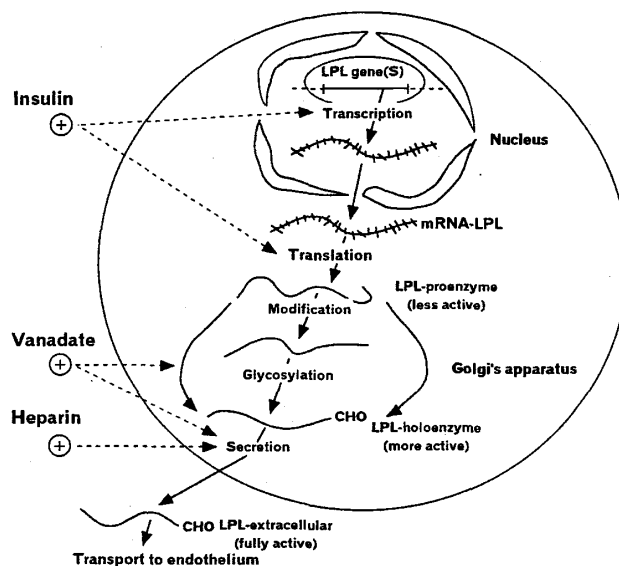


Fig. 1-7. Regulation of Synthesis, Processing, and Secretion of LPL in Adipocyte
CHO : Carbohydrate. + : Stimulation.

(2) バナデートによるレプチン代謝の調節

1994年、Friedman らによって発見された肥満遺伝子産物であるレプチンは主として脂肪細胞で作られ、分泌後血流に乗って大脳に達し視床下部の満腹中枢を刺激して満腹を感じさせると同時に、摂食中枢を抑制し、食欲を減退させる (Fig. 2-1)。³⁰⁾

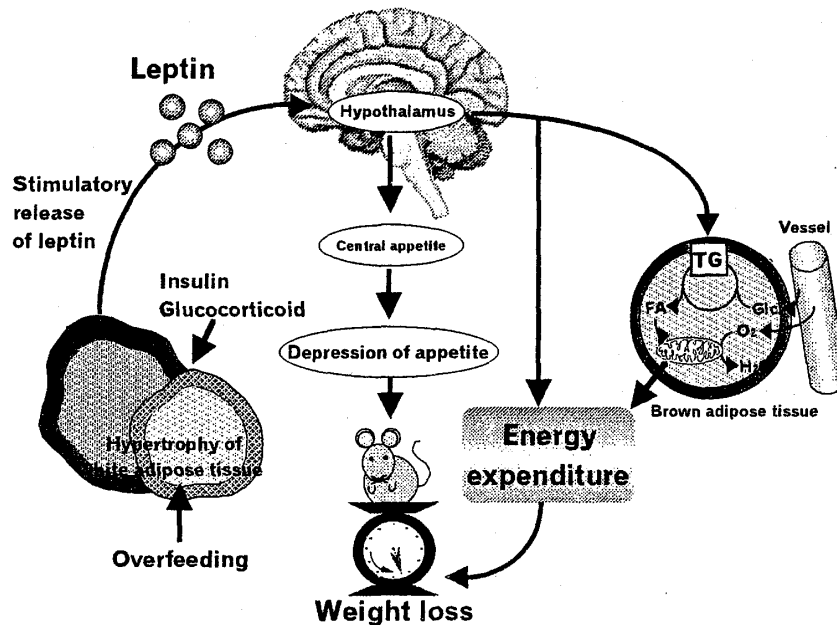


Fig. 2-1. Depression of Appetite, Energy Expenditure, and Weight Loss by Stimulatory Release of Leptin

さらにノルアドレナリンの分泌を高めエネルギー消費を増加させることも確認されている。レプチン遺伝子欠損マウスにレプチンを連日腹腔内投与すると体重、体脂肪、食欲、血中グルコース・インスリン濃度のすべてが低下する。³¹⁾インスリンはレプチンの生成・分泌を促進し、³²⁾ isopreterenol や β -adrenergic receptor agonist は生成・分泌を抑制する。³³⁾異常レプチンはプロテアソームで分解除去される。³⁴⁾バナデートの作用を検討するため、ウサギを用いてレプチン抗体を作成し、SDS-PAGE, Western immunoblot, Lane Analyzerなどを組み合わせた定量法を確立し、バナデートによる摘出マウス副睾丸脂肪組織からのレプチン分泌調節をインスリンと比較検討した。バナデートはインスリンと異なりレプチン分泌を抑制した (Fig. 2-2)。³⁵⁾この抑制作用は、cAMP / PKA 系の活性化に依存し、タンパク質生合成の抑制は無関係であったので脂肪組織のレプチン含量の変化を検討した。バナデートはインスリンと異なりレプチン含量を減少させた (Fig. 2-3)。³⁶⁾この減少作用は、Bupranolol (β_3 -アドレナリン受容体拮抗薬)、H-89 (PKA 阻害剤) や MG-132 (プロテアソーム阻害剤) によって阻止された。プロテアソームは ATP 依存性タンパク質分解系の主要構成成分で PKA によるリン酸化によって活性化を受け、ユビキチン化タンパク質を認識し特異的に分解する。^{37,38)}そこでバナデート処理脂肪組織からプロテアソーム画分を調製し、ユビキチン化 [¹²⁵I]レプチンの分解量を測定した。その結果、ATP-regenerating system と ubiquitination system が共存する反応系で 2 倍以上の分解促進が認められ、バナデートはユビキチン-プロ

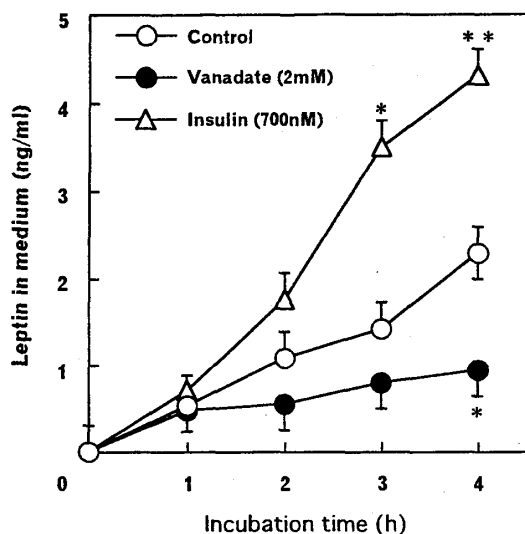


Fig. 2-2. Time Course of Leptin Secretion from Isolated Mouse Fat Pads Incubated with Vanadate or Insulin

The fat pads were incubated with 2 mM vanadate, 700 nM insulin, or neither one for up to 4 h. The incubated fat pads were removed by centrifugation, and the resultant solution was used as the leptin solution. Samples were subjected to SDS-PAGE followed by Western immunoblot analysis using anti-leptin antibody. The relative amount of leptin was determined by comparing the integrated density against known leptin standards. Significant differences compared with the control group at each time : * p < 0.01 and ** p < 0.001 .

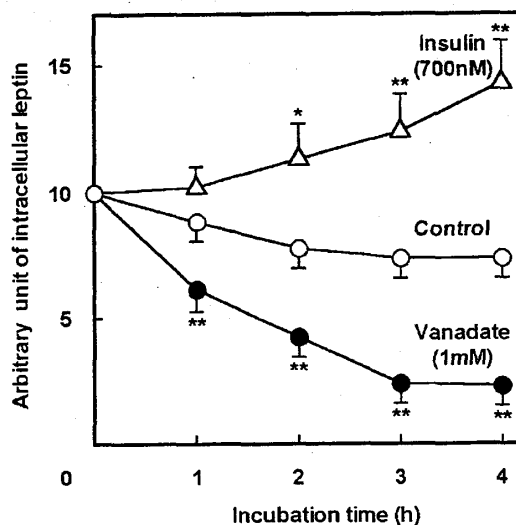


Fig. 2-3. Time Course of the effect of Vanadate or Insulin on the Leptin Content in the Fat Pads

The fat pads, which were incubated with 1 mM vanadate, 700 nM insulin, or neither one for up to 4 h, were homogenized and centrifuged. The infranatant was further centrifuged. The resultant supernatant was used to determine the intracellular leptin content. Data are the mean \pm SE from four different experiments, each performed in duplicate. Significant differences compared with the control group at each time: * p < 0.05 and ** p < 0.01 .

テアソーム系の活性化を介してレプチンの分解を促進することが確認された (Fig.2-4)。8-Br-cAMP 処理脂肪組織から得たプロテアソーム画分もまたレプチン分解を促進し、バナデートの作用を再現した (Fig. 2-5)。プロテアソーム画分のエンドペプチダーゼ活性がバナデート処理で2倍以上上昇した。結論としてバナデートは β_3 -アドレナリン受容体-cAMP / PKA 系を介してプロテアソームをリン酸化し、ユビキチン化レプチン分解を促進し、細胞内レプチン量や分泌を減少させることが解明された (Fig. 2-6)。

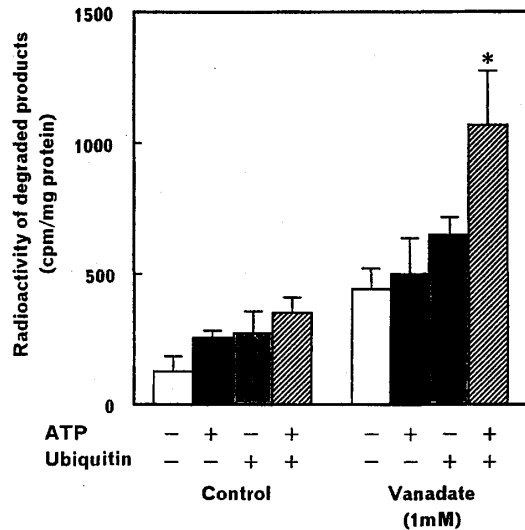


Fig. 2-4. Effect of Vanadate-Treated Proteasome Fraction on the Degradation of Exogenous Leptin

The fat pads incubated with or without 1 mM vanadate for 2 h were homogenized, sonicated, and centrifuged. After centrifugation of the infranant, the resultant supernatant was used as the proteasome fraction. [¹²⁵I] Leptin was incubated with the proteasome fraction, in the absence or presence of an ubiquitination and / or ATP-regenerating system for 1 h. Radioactivity of degraded products is expressed as cpm per mg protein of the proteasome fraction. Results are the mean ± SE from four separate experiments, each performed in duplicate. Significant differences compared with the vanadate-treated group in the presence of an ubiquitination system without ATP: * p < 0.05.

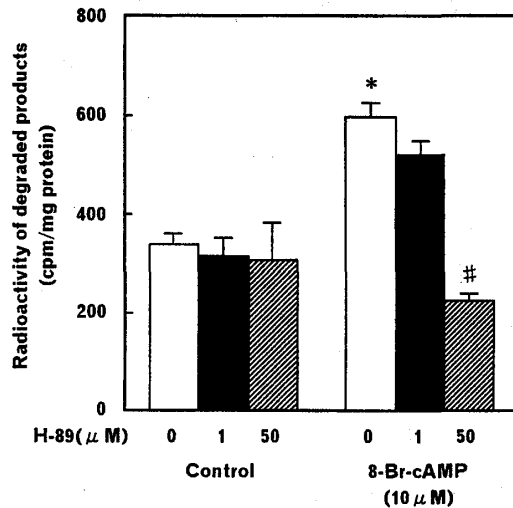


Fig. 2-5. Effect of the 8-Br-cAMP-Treated Proteasome Fraction on the Degradation of Exogenous Leptin in the Absence or Presence of H-89

The fat pads were preincubated with H-89 at the indicated concentrations for 15 min, before being treated with 10 μM 8-Br-cAMP. [¹²⁵I] Leptin was incubated with the 8-Br-cAMP-treated proteasome fraction, in the presence of ubiquitination and ATP-regenerating systems for 1 h. Radioactivity of degraded products is expressed as cpm per mg protein of the proteasome fraction. Results are the mean ± SE from four separate experiments, each performed in duplicate. Significant differences compared with the control group and with 8-Br-cAMP-treated group without H-89: * p < 0.01 and # p < 0.001, respectively.

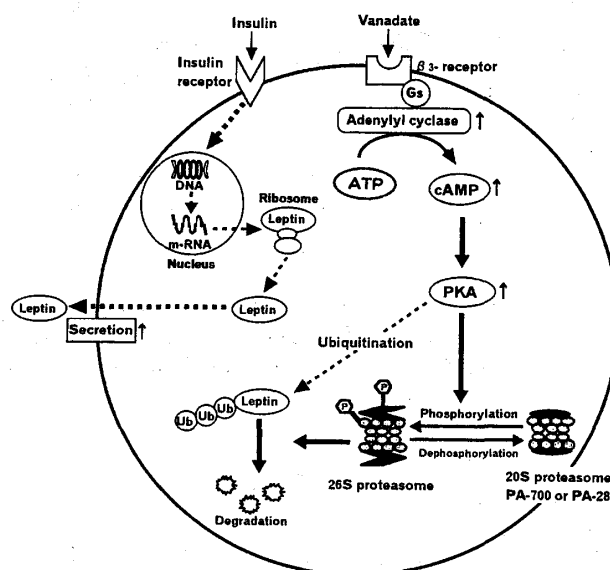


Fig. 2-6. Proposal Mechanisms of the Decrease in Intracellular Leptin by Vanadate

(3) バナデートによる PDE の活性化

環状ヌクレオチドの加水分解を触媒する酵素、PDE は本研究を開始した当時は5種類が見出されていたのみであったが現在は11種類に分類されている。³⁹⁾本酵素は cAMP および cGMP の生成酵素に拮抗して負の調節を行い、PKA や cGMP-dependent protein kinase によるリン酸化カスケードのモジュレーターの一つとして作用する。著者は以前、プロテアーゼが PDE を活性化することを報告し、⁴⁾本酵素の活性調節に興味を持っていたのでインスリン感受性 PDE 3 に対するバナデートの活性調節について検討した。ラット脂肪組織にバナデートを反応させると小胞体画分に存在する PDE 3 が活性化され、動力学的解析では Km 値には影響を与えず Vmax 値を上昇させた (Table 3-1)。⁴⁰⁾

Table 3-1. Kinetic Constants of PDE Activity in Particulate Fractions of Rat Adipocytes and Fat Pads Treated with or without Vanadate

	Km (μ M)		Vmax (pmol / min / mg)	
	Control	Vanadate	Control	Vanadate
Adipocytes	0.59	0.55	162	326
Fat pads	0.57	0.59	248	406

The adipocytes and fat pads were incubated with or without 2 mM vanadate for 60 min. Km and Vmax values were calculated from double reciprocal plots of the PDE activity in a range of substrate (cAMP) concentrations of 0.17 - 2 μ M.

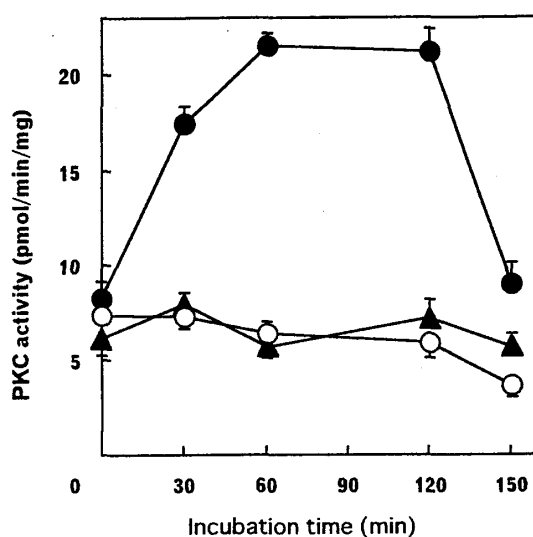


Fig. 3-1. Time Course of Stimulation of PKC Activity by Vanadate

The fat pads were incubated with 2 mM vanadate (●), 3 nM insulin (▲), or neither one (○) for up to 150 min. The PKC activities in the particulate fractions were determined with a PKC enzyme assay system kit.

その活性化に protein kinase C (PKC) を介するリン酸化カスケードが含まれる可能性が示唆された (Fig. 3-1)。さらに PDE3, protein tyrosine kinase (PTK) および myelin basic protein kinase (MBPK) 活性がバナデートによる活性化で類似のプロファイルを示した (Fig. 3-2) のでこれらの酵素の精製をカラムクロマトグラフィーで行い、PDE3 の直

接的活性化実験を行った。⁴¹⁾その結果、PDE3はMBPKによって直接活性化されること、またMBPKはPTKによって活性化されることなどが確認された(Fig. 3-3)。その後、MBPK活性はmitogen-activated protein kinase(MAPK)、PTK活性はMAPK kinase(MAPKK)である可能性が示唆された。近年、報告されたインスリンによる脂肪細胞中のPDE3の活性化機構は、バナデートの作用に含まれるリン酸化カスケードとは異なった。^{42,43)}そこで著者はラット肝細胞中のPDE3の活性化についてインスリンとバナデートの作用比較を行うために、まず肝細胞中に存在するPDE isozymeについてその局在と阻害剤に対する感受性を検討した。小胞体画分(105,000 g沈澱)のPDE活性はinsulin-activated、cGMP / milrinone-inhibited

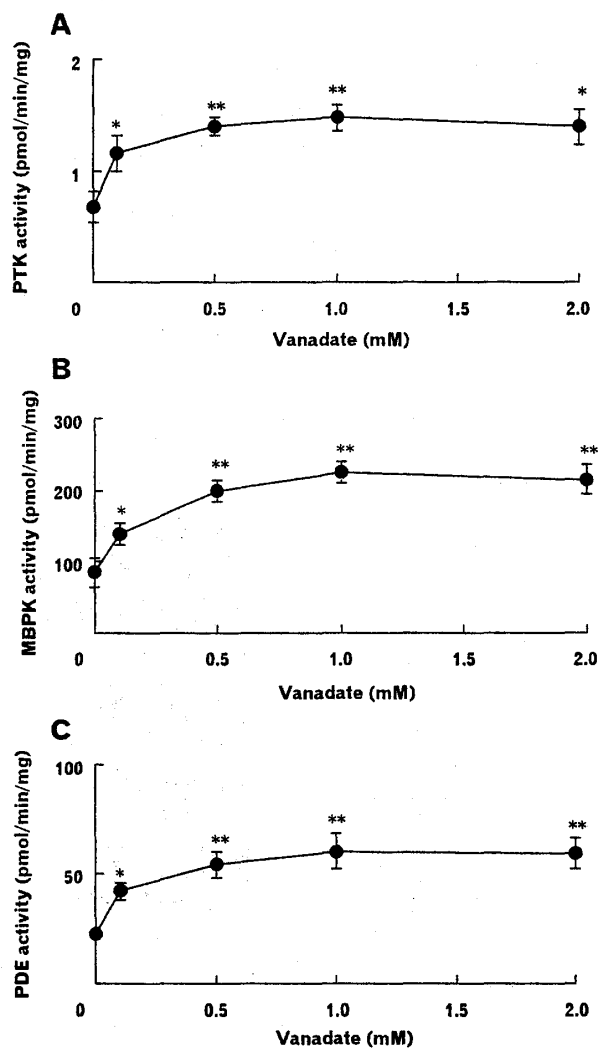


Fig.3-2. Dose-Response Curves for Stimulatory Effect of Vanadate on PTK, MBPK, or PDE Activity

The fat pads were incubated with vanadate at the indicated concentrations for 60 min, homogenized, and centrifuged. Enzymatic activities in the resultant particulate fractions were assayed using each substrate: (A) PTK activity against poly(Glu 4, Tyr 1)copolymer; (B) MBPK activity against MBP; (C) PDE activity against cAMP. Significant differences compared with groups without vanadate, * P < 0.05, ** p < 0.01.

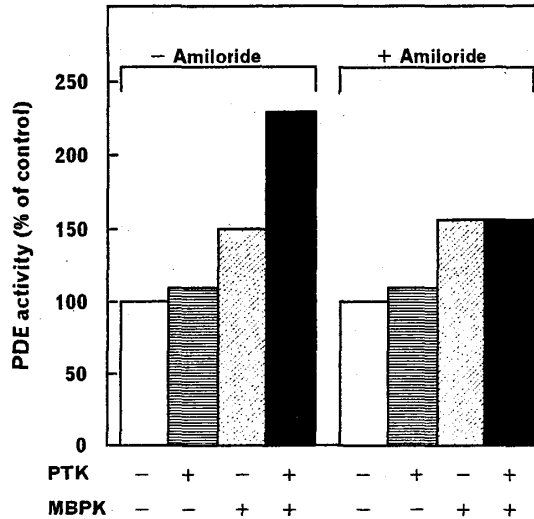


Fig. 3-3. Effects of PTK and / or MBPK on PDE Activity

Enzymes, which had been partially purified by chromatography on DEAE-Sephacel and phenyl-cellulofin columns, were preincubated with or without 2 mM amiloride for 5 min and assayed. Results are expressed as percentage of the control group without the PTK and MBPK.

で、HPLC で分子量を測定したところ凡そ130 kDa であったのでPDE3 型であることが確認された。^{44,45)}肝細胞での各種阻害剤を用いた実験結果 (Figs. 3-4, 3-5) に基づいて、酵素活

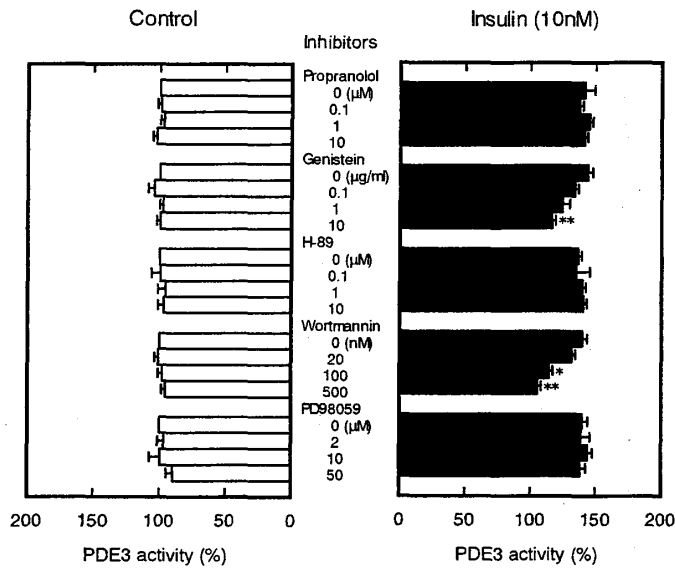


Fig. 3-4. Effects of Inhibitors on Stimulation of PDE 3 Activity in Rat Hepatocytes by Insulin

Hepatocytes were preincubated with inhibitors at the indicated concentrations for 15 min and further incubated with or without 10 nM insulin for 30 min. The particulate fractions separated were assayed for PDE 3 activity. Significant differences compared with each insulin-treated group without inhibitors, * p < 0.05, ** p < 0.01.

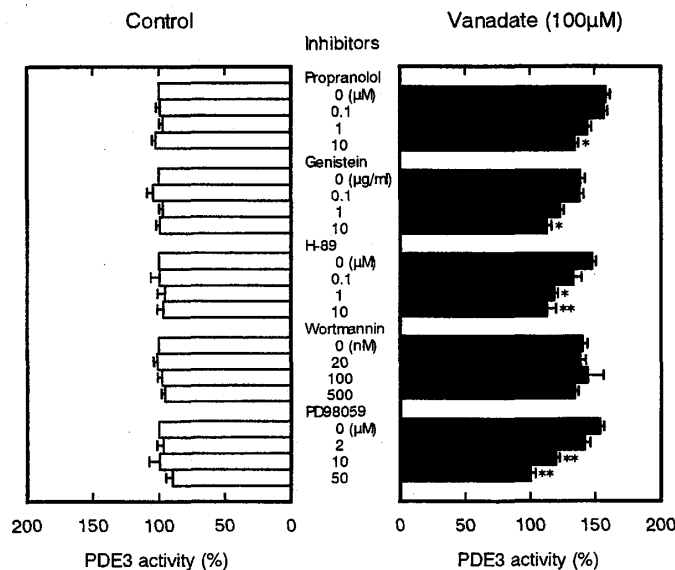


Fig. 3-5. Effects of Inhibitors on Stimulation of PDE 3 Activity in Hepatocytes by Vanadate

Hepatocytes were preincubated with inhibitors at the indicated concentrations for 15 min and further incubated with or without 100 μ M vanadate for 30 min. The particulate fraction separated was assayed for PDE 3 activity. Significant differences compared with each vanadate-treated group without inhibitors, * p < 0.05, ** p < 0.01.

性化プロフィールを調べたところ、インスリンは、インスリン受容体、IRS-1、PI3 kinase、最終的に Akt を介して PDE3 を活性化すること (Fig. 3-6)、一方、バナデートは、受容体型 tyrosine kinase や β 受容体を介して PKA を活性化し (Fig. 3-7)、最終的に MAPK が PDE3 を活性化するカスケードが想定された (Fig. 3-8)。またバナデートの作用は、インスリンの PDE3 活性化に相加的であった。これらは、部分精製した Akt や MAPK を直接 PDE3 に作用させるとその活性が酵素量に依存して上昇することからも確認された (Fig. 3-9)。バナデートがインスリン受容体を介して IRS-1 の hyperphosphorylation を起こすか否かについては議論が分かれていたが、100 μ M 濃度では IRS-1 のリン酸化は全く促進されないが、1mM の高濃度ではリン酸化が促進され、反応に用いる濃度に依存することが証明された (Fig. 3-10)。インスリンもまた MAPK を活性化するが、PDE3 の最大活性時には control レベルまで低下した。この理由を検討するため、MAPK の Western immunoblot 解析を行ったところインスリン処理15分で認められたリン酸化 MAPK のバンド (44 kDa よりわずかに高分子量) が30分では消失した (Fig. 3-11)。これは脱リン酸化酵素がインスリンによって活性化され、速やかにリン酸化 MAPK を脱リン酸化し、活性を低下させるためと報告されているがいまだ不明の点も多い。⁴⁶⁾肝細胞での特異的阻害剤の使用と各種リン酸化酵素活性の測定に基づいて Fig. 3-12 に示す様なインスリンとバナデートによる PDE3 の活性化カスケードの相違を証明した。⁴⁷⁾

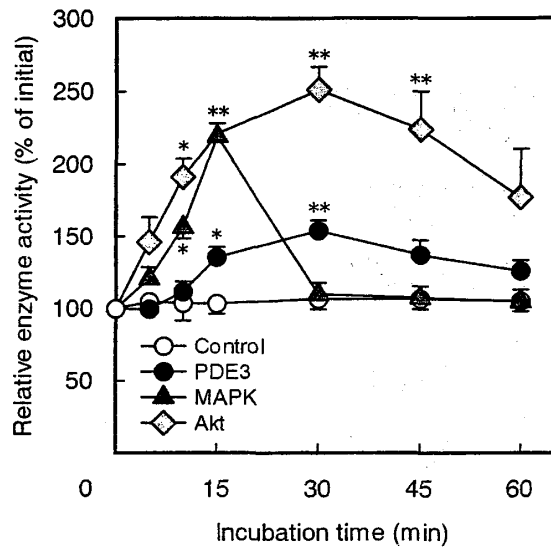


Fig. 3-6. Time Course of Effects of Insulin on PDE 3, MAPK, and Akt Activities

Hepatocytes were incubated with 10 nM insulin for up to 60 min. The PDE 3 activity in the particulate and MAPK and Akt activities in the cytosol were assayed using cAMP, a p 42/ p 44 MAP kinase enzyme assay system, and Akt substrate, respectively. Significant differences compared with the control group at each time, * p < 0.05, ** p < 0.01.

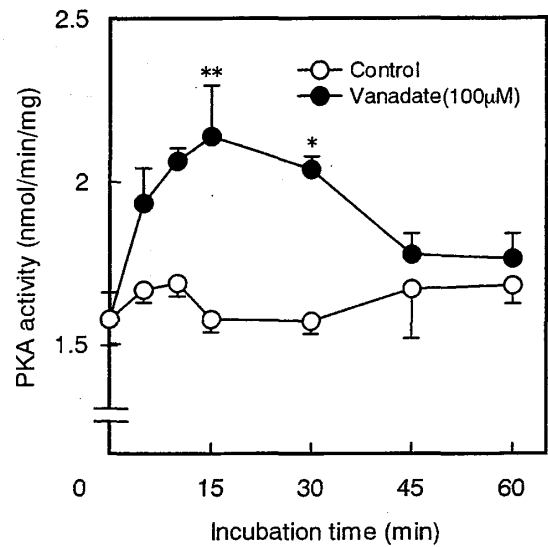


Fig. 3-7. Time Course of Stimulatory Effect of Vanadate on PKA activity

Hepatocytes were incubated with 100 μM vanadate for up to 60 min. The PKA activity in the cytosol separated was determined using a PKA assay kit. Significant differences compared with the control group at each time, * p < 0.05, ** p < 0.01.

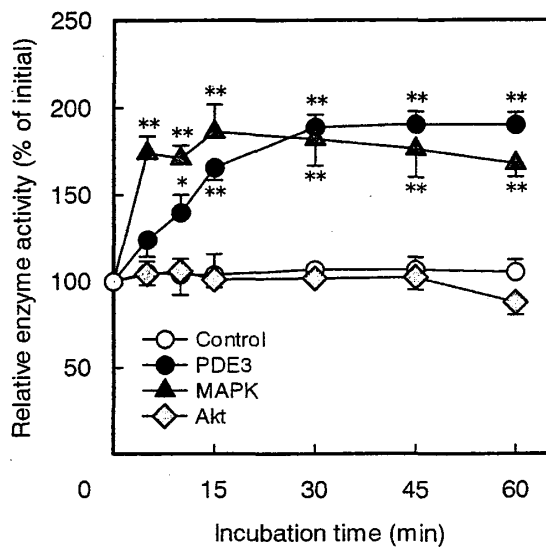


Fig. 3-8. Time Course of Effects of Vanadate on PDE 3, MAPK, and Akt Activities

Hepatocytes were incubated with 100 μM vanadate for up to 60 min. The PDE 3 activity in the particulate and MAPK and Akt activities in the cytosol were assayed. Significant differences compared with the control group at each time, * p < 0.05, ** p < 0.01.

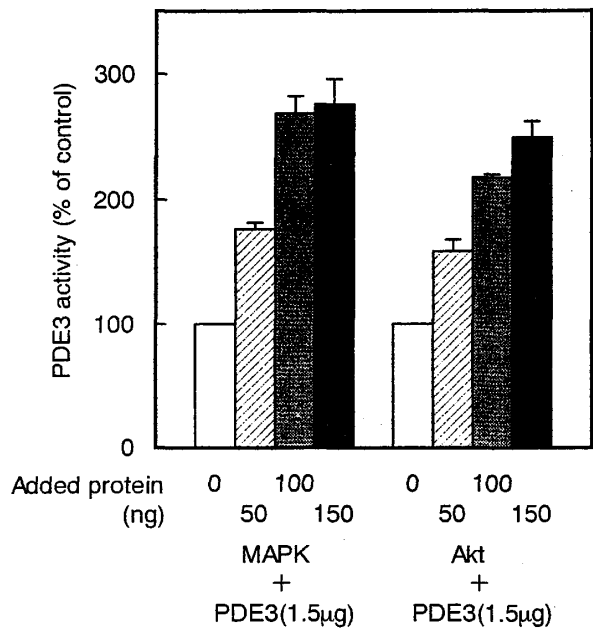


Fig. 3-9. Stimulation of PDE 3 Activity by MAPK or Akt

MAPK and Akt were partially purified by affinity chromatography on each antibody-Sepharose 4 B column. PDE 3, which had been partially purified by DEAE-Sephacel column chromatography, was preincubated with MAPK or Akt at the indicated concentrations for 5 min and assayed the activity.

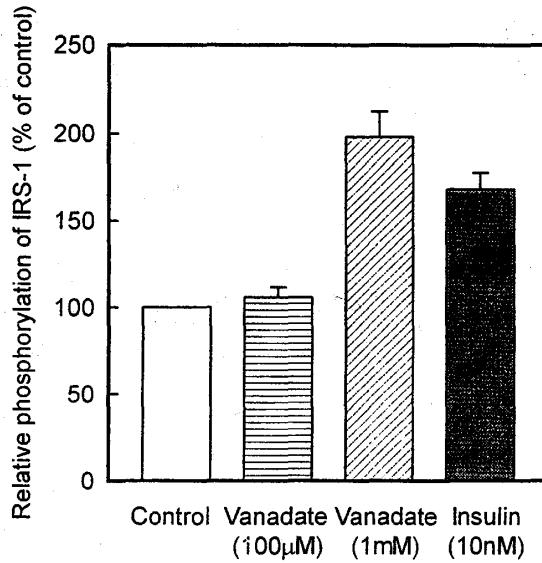


Fig. 3-10. Phosphorylation of IRS-1 in Hepatocytes by Vanadate or Insulin

Hepatocytes were incubated with 100 or 1000 μ M vanadate or 10 nM insulin for 10 min. The cells lysed in 1 % Triton X-100 were centrifuged to remove insoluble materials and subjected to SDS-PAGE followed by Western immunoblot analysis using anti-phosphotyrosine IgG. Band intensities were estimated with Lane Analyzer 2, and densitometry data were plotted as the percentage of the control.

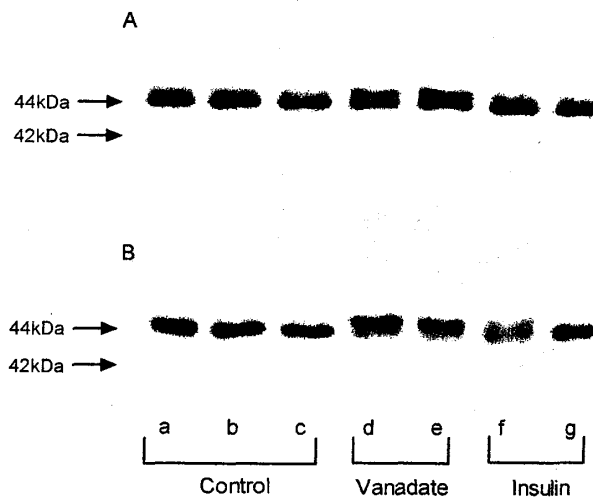


Fig. 3-11. Identification of Phosphorylated MAPKs

Hepatocytes were preincubated with 50 μ M PD 98059 (A) or KRBGA alone (B) for 15 min and further incubated with 100 μ M vanadate, 10 nM insulin, or neither one for 0-30 min. The cytosole separated was subjected to SDS-PAGE followed by Western immunoblot analysis using anti-MAPK IgG. (A) Without PD 98059, (B) With PD 98059; The control group was incubated for 0 (a), 15 (b), and 30 min (c). The 100 μ M vanadate-treated group was incubated for 15 (d) and 30 min (e). The 10 nM insulin-treated group was incubated for 15 (f) and 30 min (g). Approximate molecular masses are indicated on the left.

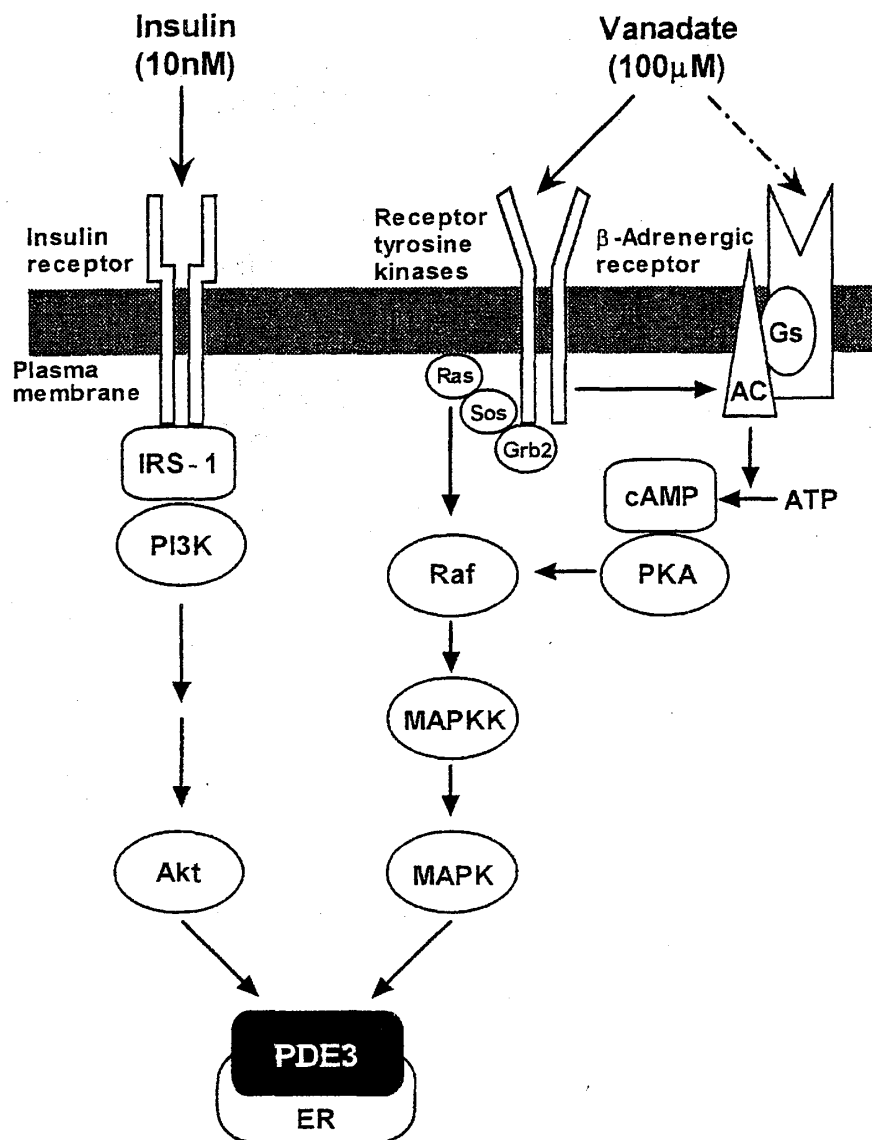


Fig. 3-12. Proposal Mechanisms of Activation of PDE 3 by Vanadate or Insulin

(4) バナデートの血液凝固阻止作用

バナデートは、ヘパリン類似作用として脂肪組織から LPL の分泌を促進した。²⁴⁾ヘパリンはまた強力な血液凝固阻害剤であることは一般に良く知られている。⁴⁸⁾そこでバナデートについて血液凝固阻止作用の有無について検討した。正常ヒト血しょうにカオリン、セファリン、CaCl₂を添加したときの凝固時間を基準とする Clotting time / control 値はバナデートによって濃度依存的に 2.5 - 5 倍延長した (Fig. 4-1)。⁴⁹⁾この作用は、ヘパリンと相加的であった (Table 4-1)。さらにバナデートは、ヘパリンと異なり血液凝固因子 Xa や thrombin の酵素活性を阻害したので作用機構は両者で異なることが示唆された。最近の研究でバナデートは、ウサギ血小板中の cAMP や cGMP の濃度を一過性に上昇させ、リン酸化酵素カスケードの活性化を介してその凝集を阻止し、血液凝固時間を延長する機構も見出している。バナデートは複数の機構によって抗凝固作用を示すと考えられる。

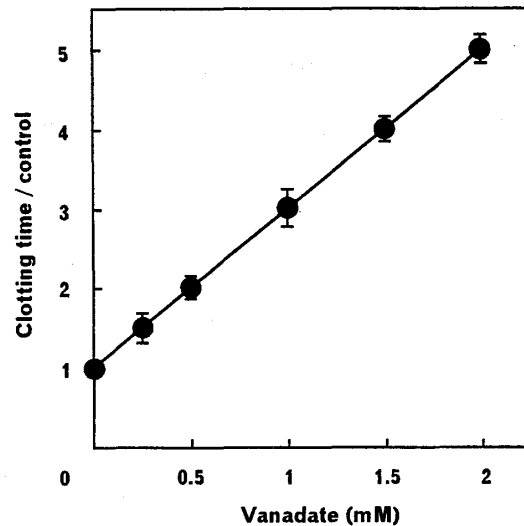


Fig. 4-1. Dose-Response Curve for Anticoagulant Action of Vanadate

Normal human plasma was preincubated at the indicated concentrations of vanadate in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.9, containing 50 mM NaCl at 37 °C for 15 min and further incubated with kaolin for 3 min. The determination of clotting time was started by the addition of CaCl₂-cephalin to the kaolin-treated mixture.

Table 4-1. Anticoagulant Action of Vanadate in the Presence or Absence of Heparin

	Clotting time / control	
	With heparin	Without heparin
Control	2.9 ± 0.1	1.0
Vanadate (1 mM)	5.7 ± 0.2	2.6 ± 0.1
Vanadate (2 mM)	8.4 ± 0.3	5.7 ± 0.2

The plasma was preincubated with vanadate at 37 °C for 15 min in the presence or absence of heparin (2.5 mU / ml), before the determination of clotting time.

終わりに

バナデートによる細胞内リン酸化酵素の活性化に関する研究を通じて、LPL やレプチンなど分泌タンパク質の細胞内調節機構の解明に有力な情報を提供すると共に薬物としての今後の発展の可能性を示唆した。

近年、わが国でもバナジウムのヒトへの応用が天然水を用いて試みられている。高速道路のサービスエリアで使用される天然水の味比べが新聞やテレビなどで報道されミネラル含量の違いに基づいて味の良し悪しが論じられている。山梨県環境科学研究所のスタッフによる各地の湧水、井戸水、河川水、水道水、名水などのバナジウム含量比較の報告によれば全般的に山梨県や静岡県の湧水でバナジウム含量が高く、特に河口湖畔の井戸水と富士吉田産のミネラルウォーターでは他地域の50倍以上高濃度であった。⁵⁰⁾これらはいずれも富士山伏流水であり、すでに天然水バナ・ウォーターとして市販され、糖尿病患者で愛用されつつある。

これまで長期にわたりバナジウムの研究を継続できたのは、本学の研究へのバックアップ、研究室のスタッフをはじめ大学院生や4年生諸君、また共同研究を行っていただいた大学、製薬メーカー、地場産業の多くの方々のご協力の賜物であったことを改めて感謝し厚くお礼申し上げたい。

REFERENCES

- 1) Kubota Y., Ueki H., Shoji S., *J. Biochem.*, **72**, 235 - 241 (1972) .
- 2) Ueki H., Nakata H., Funakoshi T., Shoji S., Kubota Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 2959 - 2967 (1979) .
- 3) Ueki H., Furuta K., Funakoshi T., Kubota Y., *J. Pharm. Dyn.*, **4**, 423 - 428 (1981) .
- 4) Ueki H., Furuta K., Funakoshi T., Matsunami Y., Kubota Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 1054 - 1058 (1982) .
- 5) Ueki H., Araki M., Nagayoshi A., Funakoshi T., Shoji S., Kubota Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 4144 - 4152 (1982) .
- 6) Ueki H., Nagayoshi A., Shono T., Funakoshi T., Shoji S., Kubota Y., *YAKUGAKU ZASSHI*, **103**, 538 - 543 (1983) .
- 7) Ueki H., Matsunami Y., Motoshima A., Funakoshi T., Shoji S., Kubota Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 4539 - 4544 (1984) .
- 8) Ueki H., Motoshima A., Funakoshi T., Shoji S., Kubota Y., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **8**, 344 - 351 (1985) .
- 9) 内藤周幸、東野俊夫ら、*医学の歩み*、**82**, 848 - 859 (1972) .
- 10) 東野俊夫、*臨床と研究*、**53**, 224 - 232 (1976) .
- 11) 植木 寛、原口文顕ら、*医学の歩み*、**123**, 265 - 267 (1982) .
- 12) Ueki H., Haraguchi F., Motoshima A., Funakoshi T., Shoji S., Kubota Y., *J. Biochem.*, **96**, 1419 - 1425 (1984) .
- 13) 田中 久、桜井 弘編 “生物無機化学”、広川書店 (1987) .
- 14) Cantley L.C.Jr., Josephson L., Warner R., Yanagisawa M., Lechene C., Guidotti G., *J. Biol. Chem.*, **252**, 7421 - 7423 (1977) .
- 15) Chasteen N.D., *Struct. Bonding*, **53**, 105 - 138 (1983) .
- 16) Li J., Elberg G., Crans D.C., Shechter Y., *Biochemistry*, **35**, 8314 - 8318 (1996) .
- 17) Heyliger C.E., Tahiliani A.G., McNeill J.H., *Science*, **227**, 1474 - 1476 (1985) .
- 18) Watanabe H., Nakai M., Komazawa K., Sakurai H., *J. Med. Chem.*, **37**, 876 - 877 (1994) .
- 19) Sakurai H., Fujii K., Watanabe H., Tamura H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **214**, 1095 - 1101 (1995) .
- 20) Cusi K., Cukier S., DeFronzo R.A., Torres M., Puchulu F.M., Redondo J.C., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **86**, 1410 - 1417 (2001) .
- 21) Nilsson-Ehle P., Garfinkel A.S., Schotz M.C., *Annu. Rev. Biochem.*, **49**, 667 - 693 (1980) .
- 22) Ashby P., Robinson D.S., *Biochem. J.*, **188**, 185 - 192 (1980) .

- 23) Sera M., Tanaka K., Morita T., Ueki H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **279**, 291 - 297 (1990) .
- 24) Ueki H., Sera M., Tanaka K., *Arch. Biochem. Biophys.*, **272**, 18 - 24 (1989) .
- 25) Levy E., Bendayan M., *Diabete Metab.*, **17**, 44 - 48 (1991) .
- 26) Braun J.E.A., Severson D.L., *Am. J. Physiol.*, **262**, E 663 - E 670 (1992) .
- 27) Morita T., Motoyashiki T., Tsuruzono Y., Kanagawa A., Tominaga N., Ueki H., *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 2242 - 244 (1992) .
- 28) Motoyashiki T., Morita T., Ueki H., *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 1412 - 1416 (1996) .
- 29) Motoyashiki T., Miyake M., Yoshida A., Morita T., Ueki H., *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 780 - 786 (1999) .
- 30) Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman J.M., *Nature*, **372**, 425 - 432 (1994) .
- 31) Pellemounter M.A., Cullen M.J., Baker M.B., Hecht R., Winters D., Boone T., Collins F., *Science*, **269**, 540 - 543 (1995) .
- 32) Barr V.A., Malide D., Zarnowski M.J., Taylor S.I., Cushman S.W., *Endocrinology*, **138**, 4463 - 4472 (1997) .
- 33) Donahoo W.T., Jensen D.R., Yost T.J., Eckel R.H., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **82**, 4139 - 4143 (1997) .
- 34) Rau H., Reaves B.J., O'Rahilly S., Whitehead J.P., *Endocrinology*, **140**, 1718 - 1723 (1999) .
- 35) Suenaga T., Hirano K., Yoshida A., Motoyashiki T., Morita T., Ueki H., *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 327 - 331 (2001) .
- 36) Yoshida A., Hirano K., Motoyashiki T., Morita T., Ueki H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **406**, 253 - 260 (2002) .
- 37) Coux O., Tanaka K., Goldberg A.L., *Annu. Rev. Biochem.*, **65**, 801 - 847 (1996) .
- 38) Hochstrasser M., *Annu. Rev. Genet.*, **30**, 405 - 439 (1996) .
- 39) Moldave K., *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Bio.*, **65**, 1 - 52 (2001) .
- 40) Ueki H., Okuhama R., Sera M., Inoue T., Tominaga N., Morita T., *Endocrinology*, **131**, 441 - 446 (1992) .
- 41) Ueki H., Mitsugi S., Kawashima Y., Motoyashiki T., Morita T., *Endocrinology*, **138**, 2784 - 2789 (1997) .
- 42) Wijkander J., Holst S.L., Rahn T., Resjö S., Casten I., Manganiello V., Berfrage P., Degerman E., *J. Biol. Chem.*, **272**, 21520 - 21526 (1996) .
- 43) Wijkander J., Landstrom T.R., Manganiello V., Berfrage P., Degerman E., *Endocrinology*, **139**, 219 - 227 (1998) .
- 44) 渡辺智康、修士論文 (1999) .

- 45) 佐藤洋文、渡辺智康、森田哲生、植木 寛 “第10回金属の関与する生体関連シンポジウム” 東京 (2000) .
- 46) Begum N., Song Y., Rienzie J., Ragolia L., *Am. J. Physiol.*, 275 , C 42 -C 49 (1998) .
- 47) 小原和久、吉田亜矢、森田哲生、植木 寛 “第12回金属の関与する生体関連シンポジウム” 京都 (2002) .
- 48) Rosenberg R.D., "Heparin", ed. By Witt I., Walter de Gruyter, Inc., Berlin, 1983 , pp 3 - 33 .
- 49) Funakoshi T., Shimada H., Kojima S., Shoji S., Kubota Y., Morita T., Tominaga N., Ueki H., *Chem. Pharm. Bull.*, 40 , 174 - 176 (1992) .
- 50) 橋田 力、“バナ・ウォーターで始まった糖尿病ゼロ革命”、東洋健康新書、1999 , pp 45 - 54 .