

# Big Plasma Glucagon

——血中グルカゴンの多様性——

大工原 恭 坪 内 博 仁\*

鹿児島大学歯学部 口腔生化学講座

\*鹿児島大学医学部 第二内科学講座

グルカゴンの発見の歴史は古い。1921年に Banting および Best (1923年, ノーベル賞受賞) がインスリンを発見<sup>(注1)</sup>した2年後の1923年に, Murlin ら<sup>1)</sup>らすでにイヌの膵臓の抽出物に血糖を上昇させる作用のあることを報告し, Kimball および Murlin<sup>2)</sup>は, これを hyperglycemic-glycogenolytic factor, あるいはグルカゴン (glucagon; glucose-driving の意) と命名した。しかしながら, 当時グルカゴンは, 生命の維持にインスリン程必要なものとは考えられず, インスリンの研究は急速な進歩を見せたのに反し, グルカゴンについてはむしろ膵臓からインスリンを抽出する際の爽雑物として厄介物扱いされ, 1953年によろやく Staub ら<sup>3)</sup>がブタのグルカゴンの結晶化に成功し, 1957年に Bromer らが<sup>4)</sup>, そのアミノ酸組成を明らかにした。

もう1つの問題点は定量法にあった。一般にホルモンの血中濃度は極めて低いため, その定量は難しい。グルカゴンの定量も, ラジオイムノアッセイ (radio-immunoassay, RIA) が開発されるまでは, 生物学的定量法 (bioassay) が用いられていたが, その感度や特異性が低く, 得られた値の信頼性は乏しかった。グルカゴンの RIA は, Berson および Yalow (1977年ノーベル賞受賞) がインスリンの RIA の開発に成功した同じ1959年に, Unger ら<sup>5,6)</sup>が発表している。従ってグルカゴンの RIA は, インスリンのそれとはほぼ同じ歴史を持つにもかかわらず, 種々の問題が続出して, 未だに解決されていない点も多い。それらの1つは, 膵臓以外の臓器から分泌されるグルカゴン (膵外グルカゴン) の存在であり, また血中には分子量の異なる多

種のグルカゴン, あるいはグルカゴン様物質が存在すること (血中グルカゴンの heterogeneity と呼ばれる) である。

膵外グルカゴンの存在に関する初めての報告は, 1948年の Sutherland および DeDuve<sup>7)</sup>によるものであるが, 後述するように, 現在は胃を含む消化器, あるいはその他の臓器にグルカゴンの存在することが確認されている。一方, 1974年に Valverde ら<sup>8)</sup>は, 血中のグルカゴンを RIA で測定すると, 膵臓のグルカゴンよりはるかに分子量の大きい (グロブリンに匹敵する) ものがあると報告し, これを Big plasma glucagon (BPG) と命名した。その後血中にはこの BPG 以外にも分子量の異なる多種のグルカゴン様物質が存在すること, またこれらが種々の病態で変動することも明らかにされている<sup>9,10)</sup>。

このように, グルカゴンは分泌臓器, 血中に存在する形共に多様であって, インスリンを合成, 分泌する B ( $\beta$ ) 細胞が現在膵臓以外には認められず, また血中の存在形もほぼ均一であることに比べて明らかな相違があり, この点がグルカゴン研究の発展を遅らせて来たことは否めないが, またそれだけに興味深い研究課題でもある。本稿は, この BPG を中心に, 我々が得た最近の結果も含めて解説的に概説したい。なおグルカゴンについては, その作用機序, 生理的意義, 分泌調節, あるいは臨床応用など現在広範囲な研究が進められているが, これらについては他に秀れた成書, 総説が出されているので, それにゆずる<sup>11-16)</sup>。

Big Plasma Glucagon — The Heterogeneity of Immunoreactive Glucagon in Plasma.

Yasushi DAIKUHARA and Hirohito TSUBOUCHI\*

Department of Biochemistry, Kagoshima University Dental School and \*The Second Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Kagoshima University.

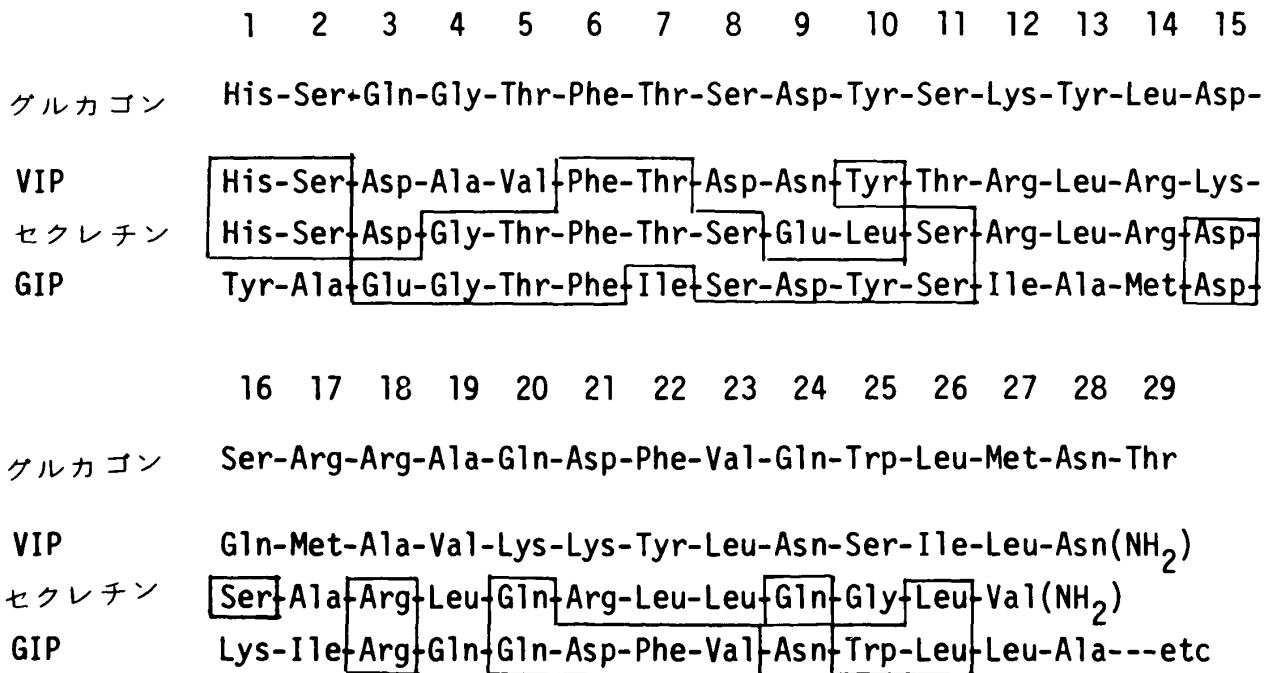


図1 膵グルカゴンおよび構造類似の消化管ホルモンのアミノ酸配列\*。

実線で囲んだ部分はグルカゴンと同じアミノ酸を持つ部位を示す。

VIP=Vasoactive intestinal peptide. GIP=Gastric inhibitory

peptide. \*Bodanszky らの報告<sup>17)</sup>より、グルカゴンを中心に一部書き換えた。

### グルカゴンの物理化学、および免疫学的性質

本題に入る前に、グルカゴンの性質と命名法のあらましを述べておく。

グルカゴンは、通常膵臓のランゲルハンス島に存在する A ( $\alpha$ ) 細胞で合成、分泌されているものと理解されている。そのアミノ酸配列が最初に明らかにされたのは、ブタの膵グルカゴンであるが<sup>4)</sup>、図1に示すように、合計29個のアミノ酸が直鎖を形成するポリペプチドであって、N末端にヒスチジン、C末端にスレオニンをも有し、中間に4個のアミノ基（グルタミン、アスパラギン）がある。従って、分子量は、3485（通常は3500と称する）となる。その後、ヒトを含むいくつかの哺乳動物の膵グルカゴンのアミノ酸配列が明らかにされたが、それらはすべてブタのものと同であった<sup>18)(註2)</sup>。このように、グルカゴンの構造に動物の種差のないことは、生理作用を発現するためにその特異的な構造が必要であることを示すものと考えられており、<sup>19)</sup> インスリンが、動物によってアミノ酸の組成や配列に差のあることと著しい対照をなすものである。また、

このアミノ酸配列に従って化学的に合成されたグルカゴンは<sup>20)</sup>、天然のものと生物学的活性も同一である<sup>21)</sup>。

グルカゴンの種々の生物学的活性が、その分子構造のどの部位に対応するかという問題は、合成ペプチドを用いた広範囲な研究が進められ、現在はN末端、1番目のヒスチジンと、18ないし19番目以降のC末端側のアミノ酸配列が重要とされている（詳細は Assan らの報告<sup>22)</sup>を参照されたい）。このことから、生物活性に重要なC末端側を認識する抗グルカゴン抗体を特異抗体（C端抗体）、さほど重要でないN末端側を認識するものを非特異抗体（N端抗体）と呼び、これらの抗体を用いてグルカゴンを免疫学的にRIAで測定した場合、それぞれ、C-GLI（C-glucagon-like immunoreactivity の略）、N-GLIと表現することがある。今日では、グルカゴンの定量をRIAで行なうのが一般であるが、前述したように動物の臓器、血中には多様なグルカゴン、あるいはグルカゴン様物質が存在しているため、これらを抗体との交差性を指標として、表1のように分類しようとする試みがある<sup>23,24)</sup>。また Conlon は<sup>25,26)</sup>、特異抗体（グルカゴンのC端側、アミノ酸番

表1 グルカゴン、グルカゴン様免疫物質の分類<sup>24)</sup>

total glucagon-like immunoreactivity (Total GLI) 全グルカゴン様免疫活性 (非特異的グルカゴン抗血清で測定されるもの)	glucagon immunoreactivity (GI) グルカゴン免疫活性 (特異的グルカゴン抗血清で測定されるもの)	{ pancreatic GI (膵 GI) gut GI (消化管 GI) salivary GI (唾液腺 GI)
	glucagon-like immunoreactivity (GLI) (total GLI から GI を差引いた活性)	

号24~29を認識するもの), 非特異抗体 (同様に N 端側ないし中央部, 2~23番を認識するもの) の両方に反応する物質を, その起源臓器のいかんにかかわらず immunoreactive glucagon (IRG)<sup>(注3)</sup> とし, 非特異抗体のみに反応するものを glucagon-like immunoreactivity (GLI) と呼び, さらに分子量の判明している場合は IRG<sup>3500</sup> のように, その数字を肩につける命名法を提唱している。このように, RIA で測定されるグルカゴンは, 研究者によって表現が異なり混乱をまねく原因ともなっているが, 本稿では出来るだけこの Conlon の命名法に従って記述を進める。

いずれにしても, RIA で測定されるグルカゴンの値

は, たとえそれが特異抗体を用いたものであっても, あくまでその抗体によって認識されるアミノ酸配列があるという意味であり, それが生物学的な活性を持つ真のグルカゴンであるか否かは, 別に生物学的定量法により詳細に検討する必要があることを付記しておく。

Big plasma glucagon

正常のヒト血漿をセファデックス, あるいはバイオゲル P-10, P-30などのゲル濾過担体を用いて分画し, 各画分をグルカゴンの特異抗体を用いて測定すると, 分子量3500の部分 (IRG<sup>3500</sup>, true glucagonとも

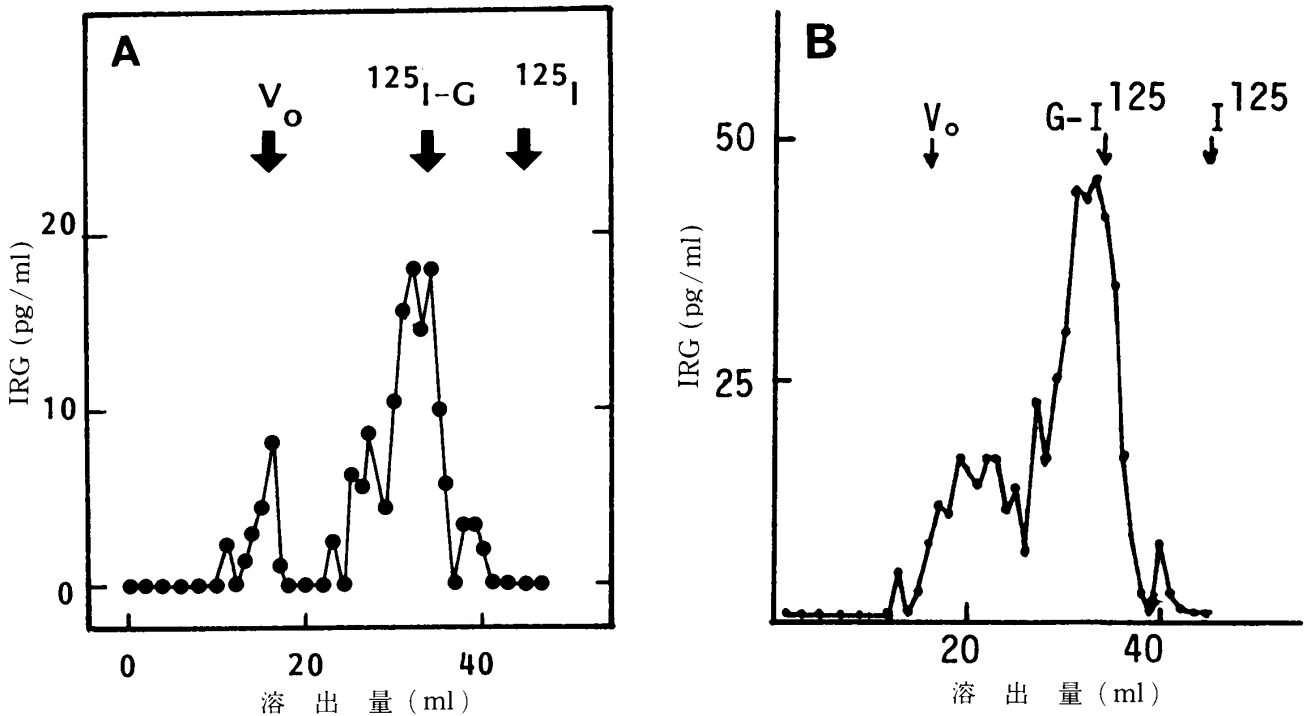


図2 ヒトの正常 (A, 左図), および肝硬変 (B, 右図) 血漿のバイオゲル P-10ゲル濾過クロマトグラム。溶出液は, 0.25%ウシ血清アルブミン, 10mM EDTA, 500 U/mlアプロチニン, 0.01% NaN<sub>3</sub>を含む50mMリン酸ナトリウム緩衝溶液 (pH 7.4)を用いた。V<sub>0</sub>, <sup>125</sup>I-G, <sup>125</sup>Iはそれぞれブルーデキストラン, <sup>125</sup>I-グルカゴン, <sup>125</sup>Iの溶出部位を示す。

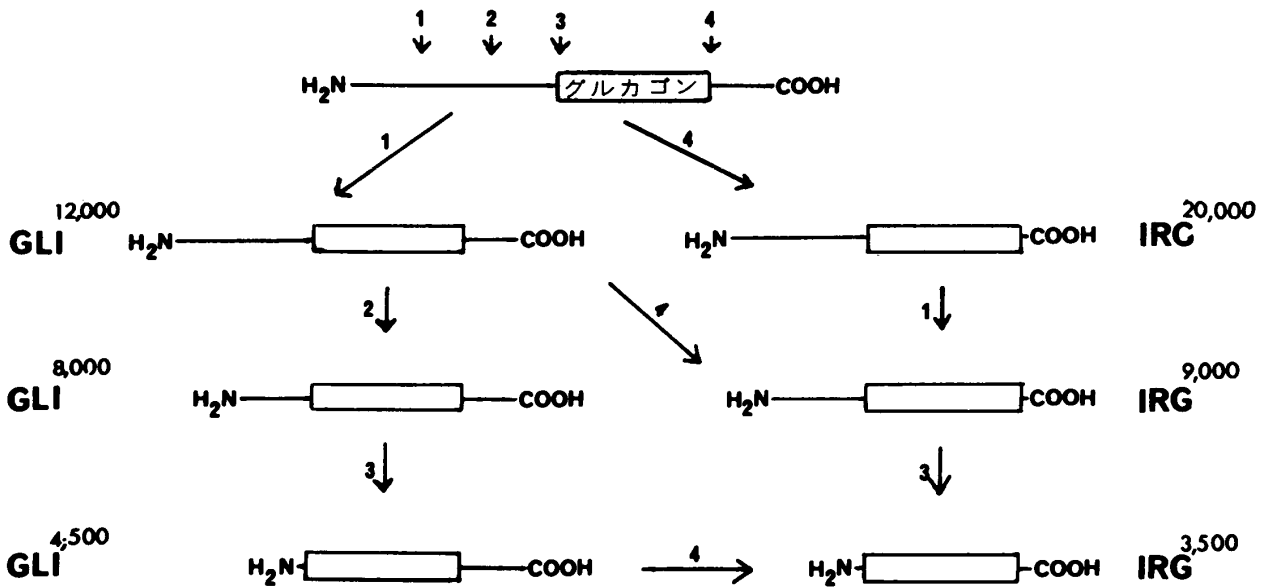


図3 血中に存在する種々のIRGおよびGLIの成因に関する仮説<sup>26)</sup>

呼ばれる)のほかに、グロブリンの画分に相当する部分にもグルカゴンが検出される(図2A参照)。Valverdeらは<sup>8)</sup>、この画分をBig plasma glucagon (BPG)と命名したが、分子量は20,000以上と推定されるので、IRG<sup>20,000</sup>と表わすことがある。その後Jaspanらは<sup>10,27)</sup>このほかにIRG<sup>9000</sup>、IRG<sup>2000</sup>なども血中に存在することを認め、種差や病態によってその割合が変化することを報告している。このような血中グルカゴンのheterogeneityの成因について、Conlonは図3のような仮説を提唱した<sup>26)</sup>すなわち、細胞内で生合成されたグルカゴンの前駆体(プログルカゴン)が、いくつかのプロテアーゼにより加水分解されて分子量3500のグルカゴンになる過程で、まずC端側の余分のペプチドが切断されれば(図3の"4"の位置)、グルカゴンのC末端を認識する特異抗体で検出されるIRGが出来る。反対にN端側から1, 2, 3の位置で順に切断される場合には、C端側のペプチドが残り、これがグルカゴンの特異抗体(C端抗体)で認識される部分をマスクするため、特異抗体では検出されず、非特異抗体(N端抗体)のみで検出されるGLIが形成されるというものである。この仮説を本稿の主題であるBPG(IRG<sup>>20,000</sup>)にあてはめてみると、BPGを8M尿素-1M酢酸で処理しても分子量は変わらないが、トリプシンで部分消化するとIRG<sup>3500</sup>に変化すること<sup>8)</sup>からも一応裏付けられる。しかしながら、プログルカゴンの分子量は18,000~19,000程度とされており<sup>29)</sup>、一方BPGの分子量は通常20,000以上と考えられ(後述するように

我々が得た結果では400,000以上とも考えられる)しているため、BPGの前駆体をプログルカゴンに求めるのは、いささか無理があるように思われる。また種々の病態でBPGの量が変動すること、あるいはBPGの生理的意義などについても、その成因と共に未だ全く不明と言って良い。

我々は、グルカゴンの糖代謝に及ぼす影響について研究を進める一環として、種々の病態における血中グルカゴンのheterogeneityを検索した結果、肝硬変などの肝障害時にBPGの量が増加することを見出した<sup>22)</sup>(図2B, 表2)。このようなBPGの増加は、例えば

表2 肝硬変症における血漿IRGの変動とその画分

例数	Total IRG	画 分		
		BPG	IRG <sup>3500</sup>	
(pg/ml 血漿)				
健常対照	5	86 ± 5	21 ± 11	46 ± 13
肝硬変	16	358 ± 58**	184 ± 41*	217 ± 36**

数値は平均値±標準誤差。\*P<0.05, \*\*P<0.02

四塩化炭素を投与して肝障害を起したラット血漿においても認められる(後述図7参照)。このBPGの分子量については、これまで18,000~20,000と言われているが、正確な測定はなされていない。そこで次に我々は、このBPGの分子量を明らかにするため、種々

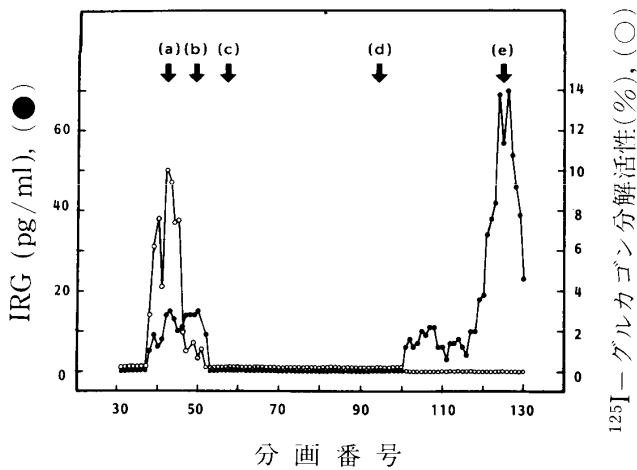


図4 ヒト肝性脳症患者血漿のバイオゲルP-300によるゲル濾過クロマトグラム。

カラム容積: 1.6×85cm。溶出液は図2に示したものを、1管当り1.5 ml ずつ分画した。<sup>125</sup>I-グルカゴンの分解活性は、表3に記した方法で行なった。(a): ブルーデキストラン(分子量200万), (b): カタラーゼ(分子量24万), (c) アルドラゼ(分子量158,000), (d): チトクロームC(分子量13,500), (e): <sup>125</sup>I-グルカゴン(分子量3,500)の溶出部位を示す。

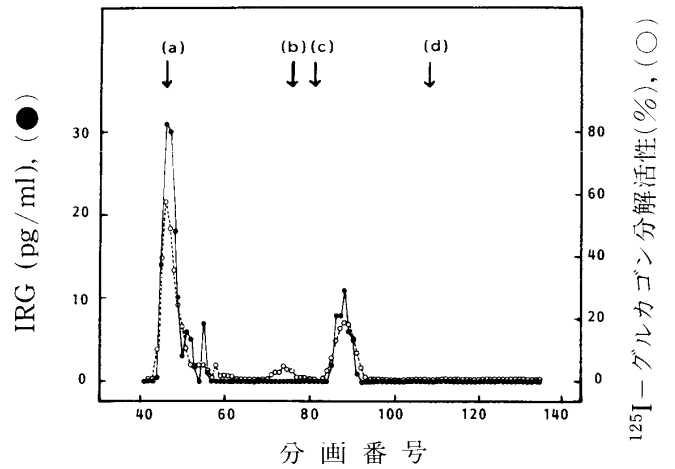


図5 ラット肝臓細胞質画分のバイオゲルA-1.5mによるゲル濾過溶出クロマトグラム。

カラム容量: 1.6×85cm。溶出液は図2と同様、分画容積は図4と同様である。(a): ブルーデキストラン, (b): フェリチン(分子量46万), (c): カララーゼ, (d): チトクロームCの溶出部位を示す。フェリチン以外の分子量は図4に記した。

表3 ラット肝臓細胞内画分におけるグルカゴン分解活性

細胞内画分	<sup>125</sup> I-グルカゴン分解活性* (%)
全ホモジネート	100
核	3.9 ± 0.4**
ミトコンドリア + リソゾーム	4.9 ± 0.4
ミクロゾーム	2.5 ± 0.4
細胞質	67.6 ± 3.4

\*分解活性は、グルカゴンのRIAと同様の条件(図2に記した溶出液と同じ組成に抗体を加え、4℃で3日間)で反応させた後、トリクロル酢酸上清画分の<sup>125</sup>I放射活性を測定した。

\*\*正常ラット(8匹)肝臓の活性を単位重量当りで表わし、その全ホモジネートの活性を100%とした時の平均値 ± 標準誤差。

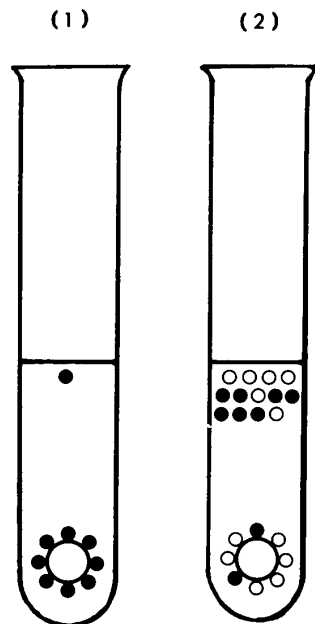


図6 ラジオイムノアッセイ(RIA)の原理(説明図)。

微量の<sup>125</sup>Iでラベルされたホルモン(●)は大部分が抗体(大きい白丸)に結合し、沈殿する(1)。これに<sup>125</sup>Iでラベルされていない未知の試料(○)を加えると、抗体に結合出来ない放射活性(●)が上清に多く残る(2)。

のゲル濾過担体を用いて BPG の分画を試みたが、驚くべきことにバイオゲル P-300 を用いてもその大部分は排出限外（分子量40万以上）に存在し（図4）、バイオゲル A-1.5 m を用いてようやく分画することが出来た（図は、後述するラット血漿の図7とほぼ同一なので省略する）。

一方我々は、グルカゴンの体内での分解過程を追求するため、ラット肝臓ホモジネート各画分のグルカゴン分解活性を測定し、100,000×gの上清画分（主として細胞質成分）に強い活性あることを見出した（表3）。さらにこの上清画分をバイオゲル A-1.5 m でゲル濾過すると、分解活性は図5のように分画されるが、同時にグルカゴンを RIA で測定すると、分解活性とほぼ一致して IRG が検出されることを認めた。この事実は現在用いられているグルカゴンの RIA では、たとえ特異抗体を用いたとしても、真の IRG の値のほかに、グルカゴンの分解活性が誤差として加えられる場合のあることを示すものである。

### グルカゴンのラジオイムノアッセイ (RIA)

本論を進める前に、ここでグルカゴンの RIA についてその概略を述べておく必要がある。

グルカゴンの RIA は、原理的には Berson および Yalow<sup>30)</sup> が開発したインスリンの RIA と同じであって、一定量の抗体に<sup>125</sup>I でラベルされた抗原（ここではグルカゴン）を加えると、大部分の抗原は抗体に結合し巨大分子となって沈殿する。ここに、ラベルされていない未知量のグルカゴンを含む試料を加えると、抗体に比べて抗原の量が多いため、抗体に結合しない抗原がそのまま上清に残る。そこで抗体に結合し沈殿となった抗原のみを適当な方法で除くと、未知のグルカゴンの量に応じた放射活性が上清に残るので、これを測定すれば IRG の量が算出出来るというものである（図6参照）<sup>(注4)</sup>

この定量過程での1つの問題点は、抗原（グルカゴン）と抗体が完全に結合するために比較的長時間を要することであり、通常は4℃で3日間静置するが、一方ではこの間に試料（血漿）中に含まれるタンパク分解酵素（プラスミンなど）により抗原が分解される可能性がある。この分解は、1つの測定系に含まれるグルカゴンの量が pg ( $10^{-12}$  g) のレベル（モル数では、fmole,  $10^{-15}$  mole のレベル）であるだけに、極くわずかであってもその影響は大きい。しかも、グルカゴンが分解された場合、その分解産物は抗体との結合能力

を失って上清に残るため、それだけ多くの放射活性が上清に存在することになり、結果として実際より高い IRG として検出されることになる。この分解によって生ずる血漿グルカゴン値の誤差については、早くから Unger らのグループによって指摘され、多価タンパク分解酵素阻害剤であるアプロチニン<sup>(注5)</sup> を測定系に加えることにより、この分解がほぼ完全に抑制されることを報告した<sup>31)</sup>。今日では、RIA の測定系はもちろん、採血、ゲル濾過による分画の際にもアプロチニンを加えておくのが通例である。このようなグルカゴンの RIA の実際については、多くの文献<sup>6,32-37)</sup> が出されているので参照されたい。

なお前述したように、グルカゴンの抗体は特異抗体と非特異抗体に分類されるが、これらの多くは研究者がそれぞれ自家製で調製しているため独自の名称がつけられており、混乱の原因の1つとなっている。ちなみに特異抗体の主なものをあげても、30K, K 40, K 47, G58, GC-5, OAL<sup>(注6)</sup> など多種の抗体がこれまで報告されており、厳密にはそれぞれ特異性や抗原との結合能が異なるため、得られる結果が研究者によって異なる原因の1つとなっている。現在最も一般的に用いられているものは、Unger らが開発した30K であるが、我々はこの30K が胆汁酸と交差反応性を有していることを明らかにし、肝硬変症など血漿胆汁酸の多い試料では真の IRG 値を示さないことを報告した<sup>38,39)</sup> 現在我々はこのような胆汁酸による妨害の少ない特異抗体として大塚アッセイ研究所が開発した OAL-123 を使用していることを付記しておく。

### BPG とグルカゴン分解活性との関連

肝臓が障害された場合、肝細胞から種々の酵素（例えば GPT, GOT など）が血中に遊出することは良く知られており、臨床検査にも広く応用されている。このような肝由来の血漿酵素の中には、当然タンパク分解酵素も含まれていると考えられ、これがグルカゴンを RIA で測定する過程で<sup>125</sup>I-グルカゴンを分解し、IRG の値として検出される可能性がある。このことは、先に示した図5の結果からも推察される。

そこで、四塩化炭素投与ラット血漿から BPG をゲル濾過により集め、これに種々のタンパク分解酵素阻害剤を加えてその影響を検討した（表4）。なおここで用いた阻害剤の名称およびその作用の概略を表5に参考として掲げる。その結果、SH-タンパク分解酵素阻害剤として知られる PCMB は、グルカゴンの分解活性

表4 ヒトおよびラットのBPG画分に対するタンパク分解酵素阻害剤の影響

タンパク分解 酵素阻害剤 (濃度)	四塩化炭素処理ラット BPG*		肝硬変症ヒト BPG**	
	IRG (pg/ml)	<sup>125</sup> I-グルカゴン 分解活性*** (%)	IRG (pg/ml)	<sup>125</sup> I-グルカゴン 分解活性*** (%)
なし (対照)	372(100)	46.0(100)	32(100)	15.7(100)
ペプスタチン(1.5 $\mu$ M)	399(107)	46.5(101)	31( 97)	16.9(102)
PMSF ( 1 mM)	326( 88)	43.3( 94)	25( 78)	12.1( 77)
NEM ( 1 mM)	242( 65)	31.9( 70)	34(106)	13.1( 83)
PCMB ( 1 mM)	126( 34)	9.2( 20)	38(119)	5.9( 38)
ロイペプチン(10 $\mu$ M)	211( 57)	34.7( 76)	18( 56)	6.3( 40)

\*四塩化炭素投与によって肝障害を起したラット血漿から、バイオゲル P-30により BPG 画分を集めた。  
 \*\*ヒト肝硬変患者 (5人) の血漿から、バイオゲル P-150により BPG 画分を集めた。  
 \*\*\*グルカゴンの分解活性の測定法は表3と同様である。  
 カッコ内の数字は対照を100とした場合のパーセント。

表5 タンパク分解酵素の阻害剤

阻害剤の名称 (略号)	阻害されるタンパク 分解酵素の性質	阻害される主な 酵素名
ペプスタチン, Pepstatin	酸性タンパク分解酵素	レニン, ペプシン, カテプシン D
Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)	セリタンパク分解酵素	キモトリプシン, プラスミン スブチリシン, エラスターゼ, カテプシン G
N-Ethylmaleimide (NEM)	SH タンパク分解酵素	パパイン, カテプシン B, L, H
p-Chloromercuribenzoate (PCMB)	SH タンパク分解酵素	パパイン カテプシン B, L, H
ロイペプチン, Leupeptin	SH タンパク分解酵素 セリタンパク分解酵素	パパイン, カテプシン B, L カリクレイン, プラスミン トリプシン

表6 ラット肝細胞質画分のグルカゴン分解活性に対する種々のタンパク分解酵素阻害剤の影響\*

タンパク分解 酵素阻害剤	<sup>125</sup> I-グルカゴン 分解活性	
なし (対照)	62.9%	(100)**
ペプスタチン	62.9	(100)
PMSF	60.3	( 95)
NEM	37.9	( 60)
PCMB	6.1	( 10)
ロイペプチン	57.2	( 90)

\*実験条件は表4と同じである。

\*\*カッコ内の数字は対照を100とした時のパーセント。

を強く阻害するが、この PCMB をグルカゴンの RIA 測定系に加えると、IRG の値もほぼ平行して減少した。このほか NEM やロイペプチンの場合も、グルカゴン分解活性の阻害程度と IRG の低下率が大略一致した。反対に、ペプスタチンや PMSF などは、いずれの値にも影響を与えなかった (表4)。また、四塩化炭素投与ラットの血漿を、バイオゲル A-1.5 m で分画したところ、IRG 値と分解活性はほぼ完全に一致した (図7)。

前述したように、グルカゴンの分解活性はラット肝臓の細胞質画分に強い。そこで次にこの細胞質画分での分解活性に対する種々の阻害剤の影響を検討したところ、表6のようにラット BPG の場合 (表4) と同様の阻害傾向を示した。これらのことから、四塩化炭素障害ラット血漿で見られる BPG は、肝臓の細胞質

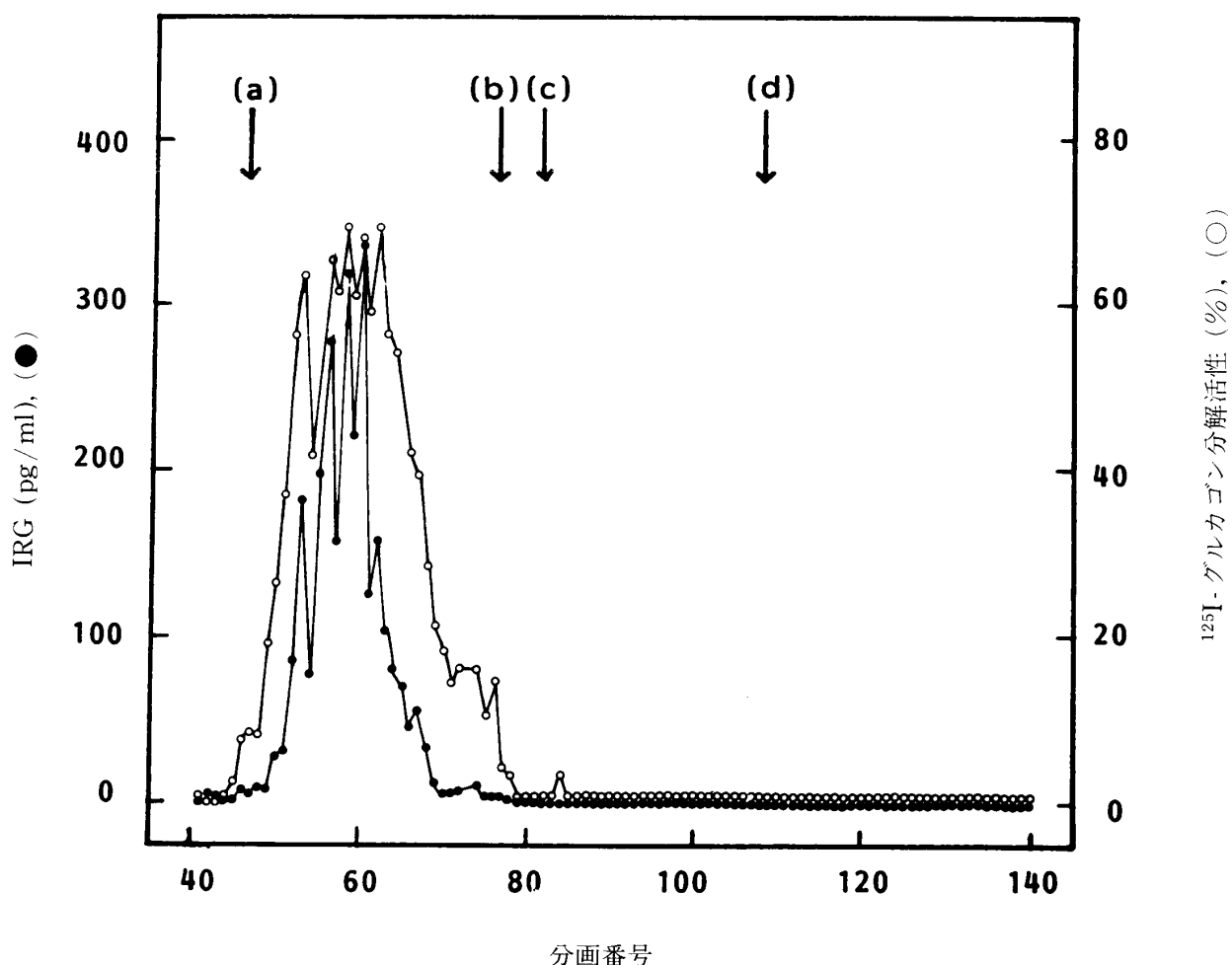


図7 四塩化炭素投与ラット血漿のバイオゲル A-1.5 m によるゲル漏過クロマトグラム。溶出条件は図5と同じである。

から血中に遊出したタンパク分解酵素に起因する値が相当量含まれているものと考えられる。

同様の実験を肝硬変患者より集めた BPG 画分についても行なった。その結果、ロイペプチンについては IRG 値、グルカゴン分解活性の両者がほぼ平行して低下したが、他の阻害剤については、ラットの場合と異なる傾向を示した(表4)。これは恐らくラットとヒトの動物種差、および四塩化炭素障害(急性肝障害)と肝硬変(慢性肝障害)の血漿中に含まれるタンパク分解酵素の種類が異なるためと考えられるが、今後なお検討を要する点である。

以上述べて来たように、これまで BPG として知られて来た血中の IRG<sup>>20,000</sup> は、血中に存在するタンパク分解酵素を誤って検出して来た可能性が強い。いわゆる BPG 値のうち、どの程度の割合がタンパク分解酵素に由来するのかは今後なお検討する必要があるが、ラットの BPG を集めて濃縮し、ラット肝初代培養細

胞系を用いてその生物学的活性を調べたところ、検出限界以下であったこと(未発表データ)、またゲル濾過のクロマトグラフで IRG 値と分解活性のピークがほぼ完全に一致したこと(図5, 7)などから、我々は BPG のうちの大部分がタンパク分解酵素に由来するものと考えている。なお、この分解酵素の分子量は、ラット血漿のものでは80~100万(図7)、肝細胞質のものは150万以上(図5)と推定され、従来知られてきたタンパク分解酵素のそれより相当大きい(通常20万程度である)、これは酵素タンパク自体の会合(association)によるものと思われる。事実、タンパク分子を解離させる目的で塩濃度を上げ、さらに SH 試薬であるジチオスレイトールを加えてゲル濾過を行なうと、肝細胞質の分解活性は分子量約50万程度の位置に移動した(図8, 図5と比較されたい)。この点については、さらに電気泳動などの手法により検討を加える予定である。



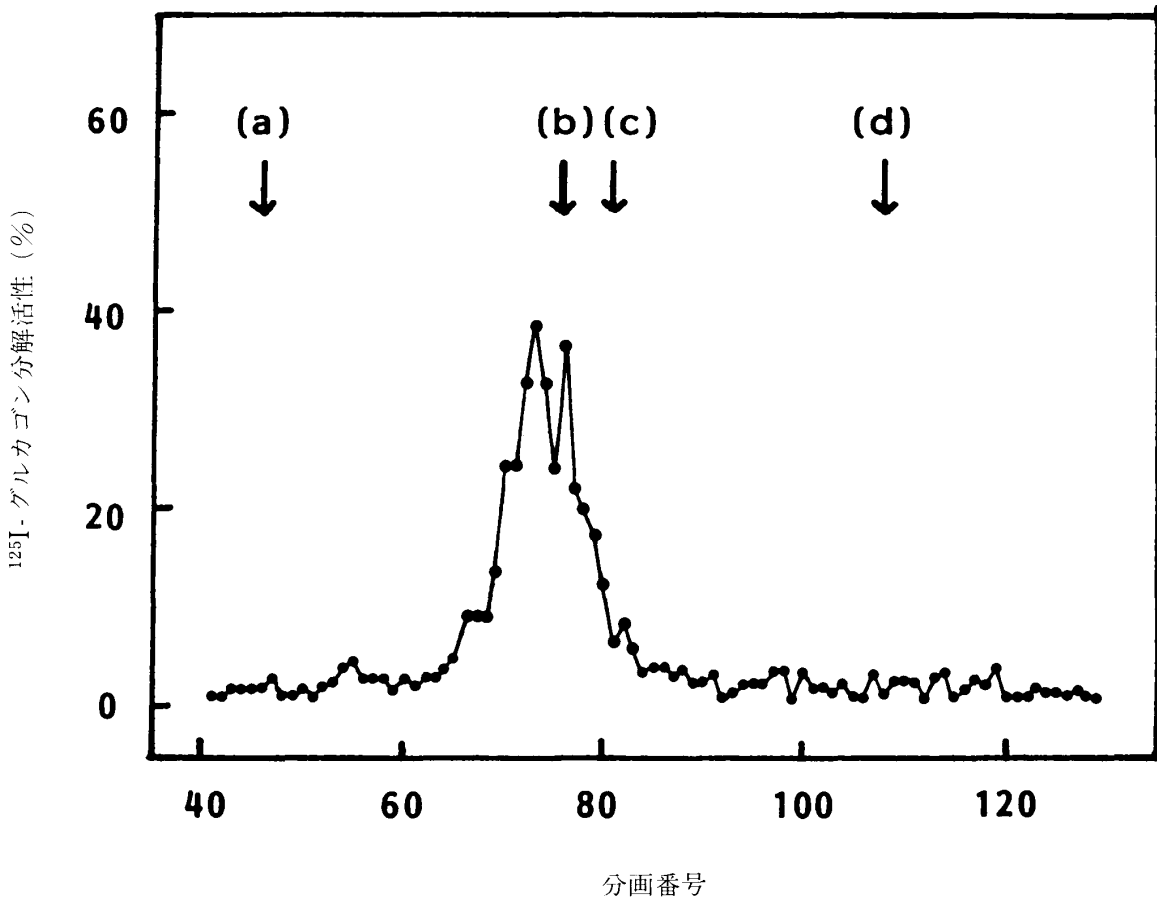


図8 ラット肝臓細胞質画分のバイオゲルA-1.5 mによるゲル濾過クロマトグラム。実験条件は図5と同じであるが、溶出液は、1 mM ジチオスレイトールおよび0.2 M NaClを含むリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) を用いた。

### 膵外グルカゴン

最後に、膵臓以外から分泌されているグルカゴンについて述べておきたい。

初めにも記したように、膵外グルカゴンの存在は、Sutherland および DeDuve<sup>7)</sup> によって最初に報告され、その後同じ Sutherland のグループにより消化管にグルカゴン、あるいはこれに酷似した物質が存在することが確認された<sup>40)</sup>。研究の当初は、これらの測定も生物学的定量法によって行われて来たが、その後グルカゴンのRIAが開発され、血中の微量のグルカゴンも測定出来るようになると、イヌの膵臓を摘出して血中のIRGが零にならないこと、さらにこのイヌをインスリンによる治療をせずに放置すると、経日的に血中IRGが増加することなどから<sup>41,42)</sup>、消化管のグルカ

ゴンも血中に分泌されていることが明らかとなった。

このような消化管グルカゴンの存在する主な部位は、例えばイヌでは胃底部であるが<sup>43)</sup>、動物種によってその分布、含有量共に大きな差が見られる。現在では、消化管グルカゴンは特異抗体に反応するIRG(表1の分類ではGI)のほか、非特異抗体に反応するGLIも存在することが知られており、その分布もかなり詳細に調べられている<sup>44)</sup>。このうち、ブタの下部消化管から抽出精製されたGLI-1と呼ばれるものは、アミノ酸100コからなるポリペプチド(分子量11,625)であることが明らかにされ、グリセンチン(glicentin: gli = GLI, centin = アミノ酸100コ)と命名されたが、そのアミノ酸配列の中にグルカゴンの全構造(アミノ酸29コ)を含むことから、消化管グルカゴンの前駆体と考えられている<sup>45,46)</sup>。最近、このグリセンチンの構造は、

発見者らの手により、アミノ酸の数は69コと訂正されたが<sup>47)</sup>、グルカゴンの構造をその分子中に含むことは再確認され、さらに弱いながらもグルカゴン様の生物学的活性(約1/100)を持つと報告されている<sup>48)</sup>。また、膵臓は、発生学的には消化管から分化したと考えられており、現在知られているいくつかの消化管ホルモンの化学構造は、グルカゴンのそれと極めて類似していることも明らかにされている<sup>17)</sup>(図1)。

さて、膵外グルカゴンは初め消化管のみに存在すると考えられたが、その後膵臓を含む消化管のすべてを摘出したラットの血中に、なおIRGが検出されることから<sup>49)</sup>、消化管以外にも膵外グルカゴンの存在が推定された。その1つが唾液腺である。ラットの唾液腺にグルカゴン(又はグルカゴン様物質)が存在することを初めて報告したのはSilvermanおよびDunbar<sup>50)</sup>であるが、その後Lawrenceら<sup>51,52)</sup>により、特異抗体である30 K抗体に反応するIRGの存在することが確認されている。彼らの報告によれば、マウスやラットなどの齧歯類顎下腺に含量が多く、ヒトやウサギには少ない(表7)。また舌下腺や耳下腺には認められなかつ

表7 各種動物顎下腺のIRG含量<sup>52)</sup>

	IRG含量 (ng/g 湿重量)
マウス	7,000
ラット	5,000
ヒト	20
ウサギ	10
イヌ	痕跡

た<sup>52)</sup>。一方Dunbarら<sup>53)</sup>によれば、ラットの顎下腺のほか耳下腺にも顎下腺の約 $\frac{1}{3}$ 量(重量比)が存在したという。このような差は、恐らく抽出法の相違に由来するものと考えられる。このほか、腎臓にも少量ではあるがIRGが認められたとする報告もある<sup>53)</sup>。また最近Tanakaらは<sup>54)</sup>、蛍光抗体法によりラットの動脈壁にもグルカゴン様物質が存在することを発見し、これが30 K抗体にも反応することから、膵外グルカゴンの1つの源と考えている。我々は、比較的含有量が大いと考えられるこの動脈壁のグルカゴンを抽出を試みるべく現在準備中である。

このように膵外グルカゴンおよびグルカゴン様物質の起原臓器は数多く発見され、またそれぞれに多種のIRG, GLIが含まれているが、これらのIRG, GLIが

実際に生物学的活性を持つか否かについては、現在全く不明である。またこれら膵外グルカゴンの生理的意義、分泌の調節機構などについても、今後これから研究を進めなければならない未開拓の分野であり、興味のない研究課題と言えよう。

## 謝 辞

本文に記した著者らの研究に対し、終始暖い御助言と御鞭達を下された本学医学部第2内科学講座橋本修治教授に深く感謝する。本文に記した研究の経費の一部は、文部省科学研究費補助金(No.548308, 57480218 および57770494)によるものである。

- 注1 インスリン発見の歴史については、レンシャルらの著書<sup>55)</sup>に詳しく述べられている。
- 注2 哺乳動物以外のもものでは、アミノ酸配列の異なるものがいくつか見出されている。
- 注3 表1の分類に従ってグルカゴンを区別する場合、IRGという表現は、免疫学的測定法で測定されたグルカゴンであることを意味し、特異抗体あるいは非特異抗体で測定されたかを特に規定する必要のない場合、および両者の総称として用いられている。従って、Conlonの分類とは異なる意味であることに注意されたい。
- 注4 図6およびその説明はRIAの原理を述べたものであり、グルカゴンのRIAの実際は、これと多少異なる点がある。詳細は文献<sup>34-37)</sup>を参照されたい。
- 注5 Aprotinin. ウシ肺より抽出されたタンパク分解酵素阻害剤。商品名はトラジロール(Trasylol<sup>®</sup>): FBA Pharmaceuticals (New York), 又はアンタゴサン(Antagosan<sup>®</sup>): ヘキスト。
- 注6 それぞれの抗体の文献は、煩雑をさけるため省略したが、例えば文献34, 37などを参考にされたい。

## 文 献

- 1) Murlin, J. R., Clough, H. D., Gibbs, C. B. F. and Stabes, A. M.: Aqueous extracts of pancreas. I. Influence on carbohydrate metabolism of depancreatized animals. *J. Biol. Chem.*, 56, 253-296, 1923.
- 2) Kimball, C. P. and Murlin, J. R.: Aqueous extracts of pancreas. III. Some precipitation

- reactions of insulin. *J. Biol. Chem.*, 58,337–346, 1924.
- 3) Staub, A., Sinn, L. G. and Behrens, O. K. : Purification and characterization of hyperglycemic-glycogenolytic factor (HGF). *Science*, 117, 628–629, 1953.
  - 4) Bromer, W. W., Sinn, L. G., Staub, A. and Behrens, O. K. : The amino acid sequence of glucagon. *Diabetes*, 6, 234–237, 1957.
  - 5) Unger, R. H., Eisentraut, A. M., McCall, M. S., Keller, S., Lanz, H. C. and Madison, L. L. : Glucagon antibodies and their use for immunoassay of glucagon. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 102, 621–623, 1959.
  - 6) Unger, R. H. : Diabetes and the alpha cell (The Banting memorial lecture 1975). *Diabetes* 25, 136–151, 1976.
  - 7) Sutherland, E. W. and DeDube, C. : Origin and distribution of the hyperglycemic-glycogenolytic factor of the pancreas. *J. Biol. Chem.*, 175, 663–674, 1948.
  - 8) Valverde, L., Villanueva, M. L., Lozano, I. and Marco, J. : Presence of glucagon immunoreactivity in the globulin fraction of human plasma ("Big Plasma Glucagon"). *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 39, 1090–1098, 1974.
  - 9) Valverde, L., Dobbs, R. and Unger, R. H. : Heterogeneity of plasma glucagon immunoreactivity in normal, depancreatized, and alloxan-diabetic dogs. *Metabolism*, 24, 1021–1028, 1975.
  - 10) Jaspan, J. B., Kuku, S. F., Locker, J. D., Huen, A. H. J., Emmanouel, D. S., Katz, A. I. and Rubenstein, A. H. : Heterogeneity of plasma glucagon in man. *Metabolism*, 25 suppl. 1, 1397–1401, 1976.
  - 11) Unger, R. H. (editor) : Glucagon symposium. *Metabolism*, 25 suppl. 1, 1303–1533, 1976.
  - 12) Foá, P. P., Bajaj, J. S. and Foá, N. L. (editors) : Glucagon; its role in physiology and clinical medicine. Springer-Verlag, New York, 1977.
  - 13) Felig, P., Sherwin, R. S., Soman, V., Wahren, J., Hendler, R., Sacca, L., Eigler, N., Goldberg, D. and Walesky, M. : Hormonal interactions in the regulation of blood glucose. *Recent Prog. Horm. Res.*, 35, 501–532, 1979.
  - 14) 阿部正和, 奥野巍一 : グルカゴン—基礎と臨床—医歯薬出版, 東京, 1980.
  - 15) Unger, R. H. and Orci, L. (editors) : Glucagon. Physiology, pathophysiology and morphology of the pancreatic A-cells. Elsevier, New York, 1981.
  - 16) Picazo, J. (editor) : Glucagon in gastroenterology and hepatology. MTP Press, Lancaster, 1982.
  - 17) Bodanszky, M., Klausner, Y. S. and Said, S. I. : Biological activities of synthetic peptides corresponding to fragments of and to the entire sequence of the vasoactive intestinal peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 70, 382–384, 1973.
  - 18) Thomsen, J., Kristiansen, K. and Brunfeldt, K. : The amino acid sequence of human glucagon. *FEBS Lett.*, 21, 315–319, 1972.
  - 19) Bromer, W. W., Boucher, M. E., Patterson, J. M., Pekar, A. H. and Frank, B. H. : Glucagon structure and function. I. Purification and properties of bovine glucagon and monodesamidoglucagon. *J. Biol. Chem.*, 247, 2581–2585, 1972.
  - 20) Wunsch, E. : Die Totalsynthese des Pankreas-Hormons Glucagon. *Z. Naturforsch.*, 22 b, 1269–1276, 1967.
  - 21) Weinges, K. F., Wunsch, E., Biro, G., Kettl, H. and Mitzuno, M. : The immunological reactivity and biological activity of synthetic glucagon. *Diabetologia*, 5, 97–100, 1969.
  - 22) Assan, R. and Slusher, N. : Structure/function and structure/immunoreactivity relationships of the glucagon molecule and related synthetic peptides. *Diabetes*, 21, 843–855, 1972.
  - 23) Report of the Nomenclature Committee. *Metabolism*, 25 suppl. 1, pp. ix, 1976.
  - 24) 島健二 : 膵外性グルカゴンの分類および分布. グルカゴン—基礎と臨床—(阿部正和, 奥野巍一編) 医歯薬出版, 東京, pp. 274–277, 1980.
  - 25) Conlon, J. M. : The glucagon-like polypeptides—order out of chaos. *Diabetologia*, 18, 85–88, 1980.
  - 26) Conlon, J. M. : Molecular forms of the glucagon-like polypeptides (IRG and GLI) in tissues and plasma. In *Glucagon. Physiology, pathophysiology, and morphology of the pancreatic A-cells* (Unger, R. H., editor), Elsevier, New York, pp. 55–75,

- 1981.
- 27) Jaspan, J. B., Polonsky, K. S. and Rubenstein, A. H. : The heterogeneity of immunoreactive glucagon in plasma : clinical implications. *ibid.*, pp. 78-96, 1981.
- 28) Tager, H. S. : Biosynthesis of glucagon. *ibid.*, pp. 39-54, 1981.
- 29) 上別府篤行, 坪内博仁, 藤崎邦夫, 田中景一, 橋本修治 : Heterogeneity からみた肝性脳症における Glucagon の動態. *日消誌*, 77, 126, 1980.
- 30) Yalow, R. S. and Berson, S. A. : Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. Clin. Invest.*, 39, 1157-1175, 1960.
- 31) Eisentraut, A. M., Whissen, N. and Unger, R. H. : Incubation damage in the radioimmunoassay for human plasma glucagon and its prevention with "Trasyolol". *Amer. J. Med. Sci.*, 235, 137-142, 1968.
- 32) 島健二 : Glucagon. *日本臨牀*, 27, 337-341, 1969.
- 33) Weir, G. C., Turner, R. C. and Martin, D. B. : Glucagon radioimmunoassay using 30 K : interference by plasma. *Horm. Metab. Res.*, 5, 241-244, 1973.
- 34) Imagawa, K., Nishino, T., Shin, S., Uehata, S., Hashimura, E., Yanaihara, C. and Yanaihara, N. : Production of anti-glucagon sera with a C-terminal fragment of pancreatic glucagon. *Endocrinol. Japon.*, 26, 123-131, 1979.
- 35) Harris, V., Faloona, G. R. and Unger, R. H. : Glucagon. In *Methods of Hormone Radioimmunoassay*, Second ed. (Jaffe, B. M. and Behrman, H. R., editors). Academic Press, New York, pp. 643-656, 1979.
- 36) Von Schenck, H. and Nilsson, O. R. : Radioimmunoassay of extracted glucagon compared with three non-extraction assays. *Clin. Chim. Acta*, 109, 183-191, 1981.
- 37) Nishino, T., Kodaira, T., Shin, S., Imagawa, K., Shima, K., Kumahara, Y., Yanaihara, C. and Yanaihara, N. : Glucagon radioimmunoassay with use of antiserum to glucagon C-terminal fragment. *Clin. Chem.*, 27, 1690-1697, 1981.
- 38) 坪内博仁, 上別府篤行, 藤崎邦夫, 永浜重遠, 窪菌修, 橋本修治 : 肝硬変症における高グルカゴン血症—肝機能不全及び門脈—下大静脈短絡との関係. *日消誌* 78, 2193, 1981.
- 39) 坪内博仁, 上別府篤行, 藤崎邦夫, 橋本修治, 小平司, 今川健一. : 肝硬変症における高グルカゴン血症. *日消誌*, 79, 123, 1982.
- 40) Makman, M. H. and Sutherland E. W., Jr. : Use of liver adenyl cyclase for assay of glucagon in human gastro-intestinal tract and pancreas. *Endocrinology*, 75, 127-134, 1964.
- 41) Matsuyama, T. and Foá, P. P. : Plasma glucose, insulin, pancreatic and enteroglucagon levels in normal and depancreatized dogs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 147, 97-102, 1974.
- 42) Vranic, M., Pek, S. and Kawamori, R. : Increased "glucagon immunoreactivity" in plasma of totally depancreatized dogs. *Diabetes*, 23, 905-912, 1974.
- 43) Unger R. H., Ketterer, H. and Eisentraut, A. M. : Distribution of immunoassayable glucagon in gastrointestinal tissues. *Metablism*, 15, 865-867, 1966.
- 44) Matsuyama, T., Tanaka, R., Shima, K., Nonaka, K., Tarui, S., Nishimura, M. and Foá, P. P. : Plasma immunoreactive glucagon in depancreatized animals. In *Glucagon : its role in physiology and clinical medicine* (Foá, P. P., Bajaj, J.S. and Foá, N. L., editors), Springer-Verlag, New York, pp. 113-127, 1977.
- 45) Sundby, F., Jacobsen, H. and Moody, A. J. : Purification and characterization of a protein from porcine gut with glucagon-like immunoreactivity. *Horm. Metab. Res.*, 8, 366-371, 1976.
- 46) Jacobsen, H., Demandt, A., Moody, A. J. and Sundby, F. : Sequence analysis of porcine gut GLI. *Biochim. Biophys. Acta*, 493, 452-459, 1977.
- 47) Thim, L. and Moody, A. J. : The primary structure of porcine glicentin (proglucagon). *Regulatory Peptides*, 2, 139-150, 1981.
- 48) Thieded, H. I. D., Holst, J. J., Dich, J., Moody, A. and Sundby, F. : Effect of highly purified porcine gut glucagon-like immunoreactivity (glicentin) on glucose release from isolated rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 675, 163-170, 1981.
- 49) Penhos, J. C., Ezequiel, M., Lepp, A. and Ra-

- mey, E. R. : Plasma immunoreactive insulin and immunoreactive glucagon (IRG) after evisceration with and without a functional liver. *Diabetes*, 24, 637–640, 1975.
- 50) Silverman, H. and Dunbar, J. C. : The submaxillary gland as a possible source of glucagon. *Bull. Sinai Hosp. Detroit*, 22, 192–193, 1974.
- 51) Lawrence, A. M., Tan, S., Hojvat, T. S. and Kirsteins, L. : Salivary gland hyperglycemic factor. An extrapancreatic source of glucagon-like material. *Science*, 195, 70–72, 1977.
- 52) Hojvat, S., Kirsteins, L., Kislá, J., Poloyan, V. and Lawrence, A. M. : Immunoreactive glucagon in the salivary glands of man and animal. In *Glucagon : its role in physiology and clinical medicine* (Foá, P. P., Bajaj, J. S. and Foá, N. L. editors), Springer-Verlag, New York, pp. 143–155, 1977.
- 53) Dunbar, J. C., Silverman, H., Kirman, E. and Foá, P. P. : Role of the submaxillary gland and of the kidney in the hyperglucagonemia of eviscerated rats. *ibid*, pp. 157–166, 1977.
- 54) Tanaka, J., Shiosaka, S. and Tohyama, M. : Vascular walls as an extrapancreatic source of pancreatic glucagon-like immunoreactivity. *Life Sci.* 投稿中 (私信)
- 55) レンシャル, G., ヘテニー, G., フィーズビー, W. (二宮陸雄訳) : *インシュリン物語*, 岩波書店, 東京, 1970.