

# インスリン製剤の変遷をたどる

## 第4回

# ヒトインスリンを目指して 半合成ヒトインスリン製剤の開発

●栗田 卓也 (埼玉医科大学内分泌・糖尿病内科)

ヒトインスリン製剤が登場する前に使用されていたインスリンは、もっぱら家畜であるブタやウシの膵臓から抽出していた。前回(第3回:2011年DITN 11月号)紹介したように、1970年代に発売された高純度のインスリン製剤でもアレルギーや抗体の産生はなくなり、ヒトの糖尿病にはヒトのインスリンを使うべきだという声は高まっていった。また、家畜からのインスリン抽出では、糖尿病患者の増加により早晚インスリンが足りなくなることも危惧されていた。しかしながら、ヒト膵臓から抽出するわけにもいかず、人工的に合成する方法がいろいろ試みられた。

### 化学合成によるヒトインスリン

サンガーが1956年にインスリンのアミノ酸配列とS-S結合の位置を決定すると(第2回:2011年DITN 9月号ミニコラム参照)、人工のインスリンを化学的に作り出そうとする研究が競って行われ、1960年代にアメリカ、ドイツ、中国ではほぼ同時に独立して最初の化学合成が報告された。インスリンは、アミノ酸がそれぞれ21個と30個のA鎖、B鎖と3個のS-S結合でできている。そのため、合成したA鎖とB鎖の混合物を空気酸化することにより作られた。しかし、アミノ酸がつながったペプチドの合成に多大の手間がかかるとともに、6個のSH基がいろいろな組み合わせで結合する可能性がある(図1)、インスリンの収量は2%程度と少なかった。そ

の後、ペプチド合成はメリーフィールドの固相法により画期的に効率的になり、S-S結合形成の効率も50%以上に向上したが、多数の合成過程が必要で費用がかかることもあり化学合成によるヒトインスリン製剤の作製は実用化には至らなかった。

### ブタインスリンからの半合成

次に試みられたのは、ブタインスリンを改変してヒトインスリンを作ることである。ウシインスリンがヒトインスリンと3個のアミノ酸が異なっているのに対して、ブタインスリンではB鎖C末端がヒトインスリンでのスレオニンからアラニンに置換しているのみであり、ヒトインスリンへの転換は比較的容易と考えられた。塩野義研究所の森原和之(図2)は、日本で単離された酵素アクロモバクタープロテアーゼにより、ブタインスリンのB鎖C末端のアラニンを特異的に取り除いた後、スレオニンを結合させることにより高い回収率でヒトインスリンを合成することに成功し(図3)、1979年のNature誌に発表した。しかし、その後製剤化されることはなかった。一方、デンマークのノボ社はトリプシンを用いたペプチド転移反応法により、ブタインスリンのB鎖C末端のアラニンをスレオニンに直接交換する方法を開発し、世界最初のヒトインスリン製剤(半合成ヒトインスリン製剤:図4)として1982年10月に発売を開始することになる。しかし、この手法では危惧されていた将来のイン

スリン不足を根本的には解消できない。半合成インスリン製剤の開発が成功した頃、熾烈な競争の末にヒトインスリン遺伝子もクローニングされた(ミニコラム参照)。結局、半合成ヒトインスリンは、その頃に台頭してきた遺伝子工学の最初の応用として出てきたヒトイ

ンスリン製剤にまもなく取って代わられることになる。

#### 参考書籍

- 丸山工作著、新インスリン物語、東京化学同人、1992。
- 葛谷健編、インスリン 分子メカニズムから臨床へ、講談社、1996。
- 葛谷健、糖尿病の歴史(連載)、雑誌「肥満と糖尿病」、丹水社。

## ミニコラム



### ヒトインスリン遺伝子のクローニング

ヒトインスリン遺伝子は長さが約1400塩基対、成熟mRNAにして400塩基対足らずの比較的小さな遺伝子である。最終的にその全塩基配列は1980年に決定されたが、それにいたる経緯は単純ではなかった。学問的な興味はもとより、遺伝子操作技術で作るヒトインスリンの将来の需要を見込んで、激しい競争がなされた。

まず、膵臓より抽出したメッセンジャーRNAよりのcDNA(相補鎖DNA)クローニングが試みられたが、膵臓のβ細胞含量が微量であること、また膵臓はRNA分解酵素が豊富であることより困難をきわめた。カリフォルニア大学サンフランシスコ校(UCSF)のウールリッヒ、ラッター、グッドマンらは、膵臓をコラゲナーゼ処理後に密度勾配遠心により膵島を濃縮し、また強力なRNA分解酵素阻害薬であるチオシアン酸 GuanidiniumによるRNA抽出法を開発することによりこれらの難

点を克服し、ラットインスリン遺伝子(cDNA)のクローニングに初めて成功した。やや遅れて、ハーバード大学のギルバート(塩基配列決定のマキシマムギルバート法で名高く1980年にノーベル化学賞をサンガーと同時に受賞;図5)らはラットインスリノーマ細胞よりRNAを抽出しcDNAクローニングに成功した。その後、両グループは得られたcDNAをプローブとしてゲノムライブラリーをスクリーニングすることによりラットインスリン遺伝子(2種類あり、インスリンI、インスリンIIと呼ばれる)のクローニングを行いその塩基配列を決定した。ヒトインスリン遺伝子については、やはりUCSFのベル(図6)、ラッター、グッドマンらがヒトインスリノーマ細胞からまずcDNAクローニングを単離し、その後ヒトゲノムライブラリーよりヒトインスリン遺伝子をクローニングし塩基配列を決定した(図7)。

▲ 図1  
インスリンの化学合成で生じる種々のS-S結合の例(一番上が正しい組み合わせ)

▲ 図3  
ブタインスリンからヒトインスリンへの酵素変換(Bu<sup>t</sup>:保護基)

▲ 図2  
森原和之(1926-)

▲ 図4  
半合成ヒトインスリン製剤

▲ 図5  
ウォルター・ギルバート(1932-)

▲ 図6  
グレン・ベル

▲ 図7  
1980年3月6日のNature誌に発表されたヒトインスリン遺伝子の塩基配列(3個のエクソンと2個のイントロンで構成されアミノ酸配列はエクソン2とエクソン3にコードされる)