

学位論文題名

Replacements of leucine 87 in human insulin
receptor alter affinity for insulin.(ヒトインスリン受容体コドン87ロイシンの
インスリン結合における役割に関する研究)

学位論文内容の要旨

ヒトインスリン受容体cDNAがクローニングされて以来、type Aインスリン抵抗性糖尿病、Leprechaunism、Rabson-Mendenhall 症候群などの遺伝性のインスリン抵抗性糖尿病において数多くの突然変異が報告され、それによりインスリン受容体の構造と機能も次第に解明されつつある。しかし、未だインスリンと受容体との共結晶が得られておらず、正確な受容体細胞外ドメインの3次元構造が解明されていない。それゆえ、インスリン受容体のインスリン結合部位に関しては、部位特異的変異導入法、photoaffinity labeling study、インスリンとインスリン様成長因子(IGF)-1受容体とのキメラ受容体の構築、さらには上記の遺伝性のインスリン抵抗性糖尿病のインスリン受容体遺伝子解析によるところが大きい。

今回、我々はインスリン受容体遺伝子の異常により、極度のインスリン抵抗性を示す Leprechaunismの1例においてインスリン受容体遺伝子の解析を行い、その遺伝子異常を同定すると共に、その異常部位のアミノ酸を部位特異的変異導入法により他のアミノ酸に置換し、インスリン作用に及ぼす影響に関して比較検討し、その部位のインスリン受容体における役割について新たな知見を得た。

症例は、入院時6カ月の女児で、現在、歳6カ月。主訴は高血糖、特異顔貌。在胎39週1日、体重1552g、身長44cm、正常分娩にて出生す。出生後耳介低位、眼球突出などの特異顔貌、多毛、陰核肥大、皮下脂肪の低下を認めた。さらに、出生時より低血糖を認め、その後哺乳後の高血糖、空腹時の低血糖があることから糖代謝の異常が疑われ、生後6カ月の時点で精査目的にて当科に入院となった。患児は第2子であるが、家族歴には特記すべきことない。また、両親には糖尿病を疑わせる既往歴は現在のところない。両親は血族結婚ではない。経口ブドウ糖負荷試験では血糖は基礎値の45mg/dlから200mg/dlと高血糖が認められ、IRI値も185IU/mlから2490IU/mlと高インスリン血症が認められた。さらに、インスリン0.1U/kgの負荷試験では血糖は基礎値の51mg/dlより最低44mg/dlまでの低下しか認められず、インスリン抵抗性を示唆する所見が得られた。

方法は、患児およびその家族のEB virusにより芽球化したリンパ芽球を用いて、¹²⁵I-インスリン結合アッセイを施行し、上記のリンパ芽球よりgenomic DNAを抽出し、Southern hybridizationを施行した。さらに、リンパ芽球よりtotal RNAを抽出した後、mRNAに精製し、cDNAを構築した。その後、PCR-直接シーケンス法により塩基配列を決定した。

同定したミスセンス変異の病的意義を確認するために、正常型インスリン受容体(Leu87IR)及び変異型インスリン受容体(Pro87IR)の発現ベクターを構築し、ネオマイシン耐性遺伝子を含む発現ベクターであるpHSVneoとともにNIH3T3細胞に遺伝子導入し、恒常的にインスリン受容体を発現しているクローンを得た。さらに、変異型インスリン受容体

(Pro87IR)の細胞内輸送とインスリン結合能に関して検討するため、pulse chase study、Cell surface biotinylation、¹²⁵I-インスリン結合アッセイを施行した。コドン87のインスリン受容体における機能を検討するため、PCRを用いた部位特異的変異導入法により、コドン87番目をそれぞれAla, Ileに置換した発現ベクター(Ala87IR, Ile87IR)を構築し、Pro87IRの場合と同様にNIH3T3細胞へ遺伝子導入し、恒常的に変異インスリン受容体を発現しているクローンをえて、細胞内輸送、インスリン結合能について検討した。

結果は、患児のリンパ芽球ではインスリン受容体の数、結合親和性の両者における低下が認められ、さらに母においても受容体数の低下が認められた。インスリン受容体遺伝子解析の結果、母由来のgenomic DNA上でexon4からexon6を含む領域で1.3kbの欠失が認められ、それにより母由来のmRNA上でframeshiftがおこり、exon6のcodon360にTAAの終止codonが生じていた。さらに父由来のalleleでは、479番目の塩基がTからCに置換し、それにより87番目のアミノ酸がLeuからProに置換するmissense mutationが同定された。変異受容体(Pro87IR)のpulse-chase studyでは、Pro87IRのproreceptorの半減期はLeu87IRよりも長く、 α , β サブユニットへの切断に障害を及ぼしていると考えられ、proreceptorのdimer化において若干の障害を受けることが認められた。しかし、cell surface biotinylationでは、Pro87IRはLeu87IR同様に α および β サブユニットとして認められ、Pro87IRは、細胞内輸送に若干の影響を与えるが、膜表面まで輸送され主に受容体数を減少させる突然変異ではないと考えられた。さらに、変異インスリン受容体のScatchard plot解析では、Pro87IRのインスリン結合親和性はLeu87IRの約15%に低下しており、Pro87IRのインスリン結合親和性の低下を示す結果が得られた。PCRを用いた部位特異的変異導入法によるコドン87の機能解析では、Ile87IRおよびAla87IRはともにLeu87IRと同様に細胞膜表面に存在しうることが確認された。また、各変異型インスリン受容体のScatchard plot解析により、Ala87IRのインスリン結合親和性は、Leu87IRの約15%に低下しているが、Ile87IRのインスリン結合親和性は、正常型のLeu87IRの約4倍に増加していた。

インスリン受容体におけるインスリン結合部位は、現在のところ受容体の細胞外ドメインがまだ結晶化されていないため正確には明らかにされていないが、Exon2によりコードされている α サブユニットのN末端(residue1-119)と、Exon6および7にコードされている α サブユニットのC末端(residue311-428)が結合ドメインであろうといわれている。今まで報告されている部位特異的変異導入法によるとコドン85, 86, 88番目のアミノ酸は、直接インスリン結合には関わっていないとされ、コドン89番目のPhenylalanine(Phe)が直接インスリンに結合する残基の一つであると報告されている。今回、解析したコドン87番目のアミノ酸であるLeuも、推定上のインスリン結合部位に含まれており、さらに、Leu自身がヒトIGF-1受容体、*Drosophila*上皮成長因子受容体、c-erb-B2受容体でも保存されていることから、インスリン結合に重要な役割を演じている可能性が考えられた。今回のLeprechaunismの一例においては87番目のアミノ酸がLeuからProに置換されることにより、インスリン結合親和性が低下していたが、これのみでは同部位がインスリン結合に関し重要であるとは言えない。なぜならば、Proは、しばしばpolypeptideの β -turnに見い出され、polypeptideを曲げる性質を持ち、87番目のアミノ酸にProが導入されることにより、同部位が直接にインスリン結合に関わっていなくても、真の結合部位に影響を与え親和性を低下させるからである。今回のLeuのAlaへの置換による結合親和性の著しい低下は87番目のアミノ酸における側鎖の重要性を示唆し、さらにIleへの置換による結合親和性の増加は、87番目においては、 β もしくは γ -branchの側鎖が重要であり、しかも同部位においては、Leuの γ -branchよりもむしろIleの β -branchの側鎖の方が適していることを示唆している。以上から、コドン87番目のLeuは、インスリン結合に重要な役割を果たし、インスリンが直接結合する部位である可能性が考えられた。今後、インスリン受容体とインスリンとの共結晶が得られ、正確な結合部位が明らかにされることが待たれる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 邦 彦

副 査 教 授 西 信 三

副 査 教 授 柿 沼 光 明

学 位 論 文 題 名

Replacements of leucine 87 in human insulin
receptor alter affinity for insulin.

(ヒトインスリン受容体コドン87ロイシンの
インスリン結合における役割に関する研究)

ヒトインスリン受容体cDNAがクローニングされて以来、遺伝性のインスリン抵抗性糖尿病において数多くの突然変異が報告され、インスリン受容体の構造と機能が次第に解明されつつある。しかし、未だ正確な受容体細胞外ドメインの3次元構造が解明されておらず、受容体におけるインスリン結合部位に関しては、不明な点が多い。本研究は、インスリン受容体遺伝子異常症であるLeprechaunismの1例にインスリン受容体遺伝子の異常を同定し、異常部位のアミノ酸を部位特異的変異導入法により他のアミノ酸に置換し、受容体におけるインスリン結合部位との関連について解析したものである。

症例は低出生体重児であり臨床上Leprechaunismに特徴的な所見を有しており、インスリン抵抗性が認められた。患児のリンパ芽球ではインスリン受容体の数、結合親和性の両者における低下が認められ、さらに母においても受容体数の低下が認められた。インスリン受容体遺伝子解析の結果、母由来のgenomic DNA上でexon4からexon6を含む領域で1.3kbの欠失が認められ、exon 6のcodon356にTAAの終止codonが生じ、父由来のalleleでは、87番目のアミノ酸がLeuからProに置換するミスセンス変異が同定された。同定したミスセンス変異の病的意義を確認するために、正常型インスリン受容体(以下、Leu87 IR)及び変異型インスリン受容体(以下、Pro87IR)の発現ベクターを構築し、ネオマイシン耐性遺伝子を含む発現ベクターとともにNIH3T3細胞に遺伝子導入し、Pro87IRの細胞内動態とインスリン結合能に関して検討した。

Pulse-chase studyでproreceptorの細胞内動態を見ると、Pro87IRのproreceptor

はdimer化と α , β サブユニットへの切断に若干の障害を受けることが認められた。しかし、cell surface biotinylationでみた受容体の膜発現検索では、Pro87IRは膜表面まで輸送されることが示された。Scatchard plot解析によるインスリン結合親和性の検討ではPro87IRはLeu87IRの約15%に低下していた。次いで、コドン87のインスリン受容体における機能を検討するため、PCRを用いた部位特異的変異導入法により、コドン87番目をそれぞれAla, Ileに置換した発現ベクターを構築し、NIH3T3細胞へ遺伝子導入し、前述と同様の検討を行った。その結果、Ala87IRのインスリン結合親和性は、正常型のLeu87IRの約15%に低下していたが、Ile87IRのインスリン結合親和性は約4倍に増加していることを認めた。インスリン受容体におけるインスリン結合部位に関しては、Exon2によりコードされてる α サブユニットのN末端と、Exon6および7にコードされている α サブユニットのC末端が結合ドメインであろうといわれている。コドン87番目のアミノ酸であるLeuは、推定上のインスリン結合部位に含まれており、さらに、ヒトIGF-1受容体、*Drosophila*上皮成長因子受容体でもこの部分は保存されていることから、インスリン結合に重要な役割を演じている可能性が考えられた。またLeuのAlaへの置換による結合親和性の著しい低下は87番目のアミノ酸における側鎖の重要性を示唆し、さらにIleへの置換による結合親和性の増加は、87番目においては、 β もしくは γ -branchの側鎖が重要であり、さらに同部位においては、Leuの γ -branchよりもむしろIleの β -branchの側鎖の方が適していることを示唆し、コドン87番目のLeuはインスリンが直接結合する部位である可能性が高い。審査に当たって、副査の柿沼教授から変異蛋白の示す幾つかの生化学的機能と変異の関係、人工的に変異導入した細胞の増殖機能とくに発ガンとの関係について、副査の西教授から母親の変異とaffinityについて、結晶化による構造解析の限界、2つの異なるmutantを細胞導入した実験の有無、主査の小林教授から他の既知のmutantと今回のmutantから導き出せる結論について、細胞内processingにおけるmutant等について質問があった。何れの質問に対しても、申請者は自己の実験結果や文献を引用し、また豊富な知識に基づいて明解に解答した。審査員一同は、これらのインスリン受容体コドン87Leuがインスリン結合に重要な役割を果たしていることを明らかにした成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。