



Substitution of glutamine for arginine 1131 : a newly-identified mutation in the catalytic loop of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor

岸本, 美也子

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1994-07-06

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1857

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001857>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	岸 本 美也子	（大阪府）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学位記番号	博ろ第1416号	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当	
学位授与の日付	平成6年7月6日	
学位論文題目	Substitution of Glutamine for Arginine 1131 : A Newly - identified Mutation in the Catalytic Loop of the Tyrosine Kinase Domain of the Human Insulin Receptor （インスリン抵抗性糖尿病の一例におけるインスリン受容体遺伝子変異の同定）	
審査委員	主査 教授 春日 雅 人	
	教授 西 塚 泰 美	教授 千 原 和 夫

論文内容の要旨

緒 言

糖尿病はその病態としてインスリン作用の相対的不足を特徴とする疾患であるが、その発症には遺伝的素因が関与すると考えられている。様々な候補遺伝子について糖尿病発症との関連について研究が進められてきた結果、いくつかの糖尿病原因遺伝子が明らかになり注目を集めている。なかでもインスリン非依存型糖尿病（non-insulin dependent diabetes mellitus : N I D D M）との関連においては、1988年にインスリン受容体（I R）の遺伝子の変異により起こるインスリン抵抗性糖尿病の存在が明らかにされて以来、I R遺伝子に変異を有する糖尿病症例が蓄積されている。今回我々は高度のインスリン抵抗性を示した日本人N I D D M患者についてゲノムDNAの解析を行い、I R catalytic loop 部位の一塩基置換（Arg¹¹³¹→Gln）を検出し、さらに chinese hamster ovary（C H O）細胞を用いた発現系での検討により同変異によりI R自己リン酸化以降のインスリン抵抗性が本変異によって惹起されたものであることを明らかにした。

症例及び方法

56才男性。55才時に会社の検診で初めて尿糖を指摘された。75 g - O G T Tでの空腹時血糖は119 mg/dl、最高血糖220mg/dlと耐糖能異常は軽度であり、H b A 1 c 7.0%、フルクトサミン258と正常範囲であったが、空腹時インスリン値は92 μU/mlと高値を示した。グルコースクランプテストでは糖利用率0.75mg/kg/min（正常6-10）と強度のインスリン抵抗性を示した。抗インスリン抗体、抗I R抗体共に陰性でありI R異常が疑われたため、P C R - S S C P（polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphisms）法及び直接塩基配列決定法により患者の遺伝子解析を行ったところ、I R遺伝子エクソン19内に Arg¹¹³¹（C G G）→G l n（C A G）のミスセンス変異をヘテロに検出した。

本患者にみられた糖尿病における、本変異の病因論的意義を明らかにする目的で、in vitro site-directed mutagenesis の手法を用いてヒトI R c D N A（Ullrich型）において作成したArg（C

GG)→Gln (CAG) をコードする変異 IR (R1131Q) 及び野生型 IR のそれぞれを CHO 細胞に過剰発現し、stable transformant を単離した。各細胞系において¹²⁵I-インスリン結合能、IR 自己リン酸化能、内因性基質のリン酸化能、及び phosphatidyl inositol 3-kinase 活性を検討した。また 2-deoxy-[2,6-³H]-D-glucose の取り込み、[³H]標識チミジンの取り込みにより bioactivity を測定した。更に、インスリンの internalization, degradation, IR の down-regulation を検討した。また、IR processing レベルの検討を行った。

結 果

¹²⁵I-インスリンに対しては野生型、R1131Q IR 共に同レベルの結合能を示した。CHO 細胞株を insulin で刺激後 IR β subunit に対するポリクローナル抗体で免疫沈降後モノクローナル抗フォスフォチロシン抗体 (PY20) による Western blotting に供し、IR の自己リン酸化能を検討したところ R1131Q 細胞株では著明な低下が認められた。同様に insulin で刺激した細胞株を PY20 で免疫沈降後同じ抗体により Western blotting を行ったところ、野生型 IR 細胞株では認められるチロシンリン酸化された IR の β subunit 及び IR substrate-I (IRS-I) の二つのバンドは R1131Q 細胞株ではほとんど検出されなかった。更に同様に処理した細胞株を PY20 で免疫沈降し沈降物中の phosphatidyl inositol-3-kinase 活性を測定したところ、野生株に比し R1131Q 細胞株では活性の低下が認められた。また、MAP kinase の基質である Myelin basic protein のリン酸化についても障害が示された。さらに、[³H]標識チミジンの取り込み、2-deoxy-[2, 6-³H]-D-glucose の取り込みについての検討では、R1131Q においてはいずれの活性も non-transfected CHO 細胞と同レベルにまで低下しており、インスリンの生物学的活性についても障害されていることが示された。IR の internalization, degradation 及び down-regulation については、R1131Q 変異においていずれも障害が認められた。 [³⁵S]メチオニンを用いた pulse-chase labeling により、本変異は IR の processing のレベルには影響を及ぼさない変異であることが明らかとなった。

考 察

以上、

- 1) PCR-SSCP 法及び直接塩基配列決定法等の分子生物学的手法を用い、強度のインスリン抵抗性を示す NIDDM 患者の IR 遺伝子の catalytic loop 部位に新たな変異 (R1131Q) を検出した。
- 2) CHO 細胞を用いた発現系での検討により、同変異により IR 自己リン酸化以降のシグナル伝達機構、生物学的活性及び IR の endocytosis が障害されていることが示され、本症例にみられたインスリン抵抗性は Arg¹¹³¹→Gln の一アミノ酸置換により惹起されたものであると考えられた。
- 3) また R1131Q における IR processing は野生型 IR と同レベルであったが、既報の 1135 番目の Ala から Glu への変異 (A1135E) (Cama et al. J. Biol. Chem. 268:8060-8069, 1993) は R1131Q 同様 IR catalytic loop 部位に位置するものの、IR の processing の障害が認められると報告されている。このように R1131Q と Q1135E の両変異では IR の processing に及ぼす影響に相違がみられ、この相違は両変異の location に関連するものであると考えられた。

アミノ酸配列の比較により serine/threonine kinases 及び IR を含む tyrosine kinases には

共通して保存されている二つの loop、即ち、Gly-rich loop と catalytic loop が存在し、catalytic loop は Arg-Asp-Leu - X - X - X - Asn のモチーフを有することが明らかになっている。I R の Arg¹¹³¹はこの catalytic loop を構成するモチーフの最初の A r g に相当するアミノ酸である。近年 c A M P - dependent kinase の結晶構造の解析が報告され、本酵素との analogy から推測されるとこの Arg¹¹³¹は kinase 活性の保持に関与していると考えられている。一方、I R Ala¹¹³⁵は上述のモチーフの 2 番目の X に相当し、このアミノ酸は tyrosine kinase family 内では conserve されているアミノ酸であるが、Arg、Asp、Leu とは異なり、対応する serine/threonine kinase family との間では保存されていない。

すなわち R1131Q 及び A1135E の両変異にはその location による機能の相違が考えられ、両変異は今後 catalytic loop 部位の構造上、機能上の重要性を考察する上で示唆に富む変異であると考えられた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

糖尿病はその病態としてインスリン作用の相対的不足を特徴とする疾患であるが、その発症には遺伝的素因が関与すると考えられている。様々な候補遺伝子について糖尿病発症との関連について研究が進められてきた結果、いくつかの糖尿病原因遺伝子が明らかになり注目を集めている。なかでもインスリン非依存型糖尿病 (non-insulin dependent diabetes mellitus : N I D D M) との関連においては1988年にインスリン受容体 (I R) 遺伝子の変異により起こるインスリン抵抗性糖尿病の存在が明らかにされて以来、I R 遺伝子に変異を有する糖尿病症例が蓄積されてきている。

今回我々は、著明なインスリン抵抗性を示す55才男性 N I D D M 患者についての遺伝子解析により、インスリン受容体 (I R) 遺伝子 exon19 内 Arg¹¹³¹ (C G G) → Gln (C A G) のミスセンス変異をヘテロに検出し、本患者の糖尿病の発症における本変異の病因論的意義を明らかにする目的で、site-directed mutagenesis の手法を用いてヒト I R c D N A (Ullrich 型) において作成した Arg¹¹³¹ (C G G) → Gln (C A G) をコードする変異 I R (R1131Q) と野生型 I R のそれぞれを C H O 細胞に過剰発現した stable transformant を単離しその機能について解析を行った。その結果、¹²⁵I - インスリンに対しては野生型、R1131Q 共に同レベルの結合能を示した。C H O 細胞株を insulin で刺激後 I R β subunit に対するポリクローナル抗体で免疫沈降後モノクローナル (M o) 抗フォスフォチロシン (P Y) 抗体による Western blotting に供し、I R の自己リン酸化能を検討したところ R1131Q 細胞株では著明な低下が認められた。同様に insulin で刺激した細胞株を M o 抗 P Y 抗体で免疫沈降後同じ抗体により Western blotting を行ったところ、野生型 I R 細胞株では認められるチロシンリン酸化された I R の β subunit 及び I R substrate-I (I R S - I) の二つのバンドは R1131Q 細胞株ではほとんど検出されなかった。更に同様に処理した細胞株を M o 抗 P Y 抗体で免疫沈降し、沈降物中の phosphatidyl inositol 3 - kinase 活性を測定したところ、野生株に比し R1131Q 細胞株では活性の低下が認められた。また、M A P kinase の基質である Myelin basic protein のリン酸化についても障害が示された。さらに、³H 標識チミジンの取り組み、2-deoxy-[2, 6 - ³H]-D-glucose の取り込みについての検討では、R1131Q においてはいずれの活性も non-transfected C H O 細胞と同レベルにまで低下しており、インスリンの生物学的活性についても障害されていることが示された。I R の internalization, degradation 及び down-regulation についての検討では、R1131Q 変異においていずれも障害が認められた。³⁵S メチオニンを用い

た pulse-chase labeling により、本変異は processing のレベルには影響を及ぼさない変異であることが明らかとなった。

以上、CHO細胞を用いた発現系での検討により、同変異により I R 自己リン酸化以降のシグナル伝達機構が障害されていることが示され、本症例にみられたインスリン抵抗性は Arg¹¹³¹→Gln の一アミノ酸置換により惹起されたものであると考えられた。また、R1131は I R β subunit の catalytic loop を構成する 7 アミノ酸の内のひとつであり、catalytic loop 部位の構造上機能上の重要性を考察する上で示唆に富む変異であると考えられた。

本研究は、糖尿病の成因について、そのインスリン受容体異常症の関与を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかったインスリン受容体 catalytic loop 部位について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。