Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

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（きしもとみやこ）　（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：ＮＩＤＤＭ）との関連においては、1988年にインスリン受容体（ＩＲ）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、ＩＲ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ＮＩＤＤＭ患者についてゲノムＤＮＡの解析を行い、ＩＲ catalytic loop 部位の一塩基置換（Arg^{1131}→Gln）を検出し、さらに chinese hamster ovary（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。75ｇ－ＯＧＴＴでの空腹時血糖は119mg／dl、最高血糖220mg／dlと耐糖能異常は軽度であり、ＨｂＡ１ｃ7.0％、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92μU／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ＩＲ抗体共に陰性でありＩＲ異常が疑われたため、ＰＣＲ－ＳＳＣＰ（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、ＩＲ遺伝子エクソン19内に Arg^{1131}（ＣＧＧ）→Ｇｌｎ（ＣＡＧ）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ＩＲｃＤＮＡ（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^{125}I－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-^{3}H]-D-glucose の取り込み、[^{3}H]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

^{125}I－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、[^{3}H]標識チミジンの取り込み、2－deoxy－[2，6－^{3}H]－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。[^{35}S]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 Arg^{1131}→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。ＩＲのArg[1131]はこのcatalytic loopを構成するモチーフの最初のＡｒｇに相当するアミノ酸である。近年ｃＡＭＰ - 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Arg[1131]はkinase活性の保持に関与していると考えられている。一方、ＩＲ Ala[1135]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：ＮＩＤＤＭ）との関連においては1988年にインスリン受容体（ＩＲ）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、ＩＲ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ＮＩＤＤＭ患者についての遺伝子解析により、インスリン受容体（ＩＲ）遺伝子exon19内Arg[1131]（ＣＧＧ）→Gln（ＣＡＧ）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ＩＲｃＤＮＡ（Ullrich型）において作成したArg[1131]（ＣＧＧ）→Gln（ＣＡＧ）をコードする変異ＩＲ（R1131Q）と野生型ＩＲのそれぞれをＣＨＯ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、^{125}Ｉ－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。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(Ｍｏ)抗フォスフォチロシン(ＰＹ)抗体による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Ｍｏ抗ＰＹ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Ｍｏ抗ＰＹ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、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、［^{3}H］標識チミジンの取り組み、2-deoxy-［2，6 - ^{3}H］-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についての検討では、R1131Q変異においていずれも障害が認められた。［^{35}Ｓ］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ＩＲ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 Arg^{1131}→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ＩＲ 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。