

氏名・(本籍)	今 村 武 史 (京都府)		
学位の種類	博士 (医学)		
学位記番号	博士第153号		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
学位授与年月日	平成6年3月24日		
学位論文題目	インスリン受容体チロシンキナーゼ部位における点突然変異 (Glu <sup>1179</sup> →Asp <sup>1179</sup> ) によるインスリン抵抗性		
	審査委員	主査 教授	大久保 岩 男
		副査 教授	北 里 宏
		副査 教授	繁 田 幸 男

## 論 文 内 容 要 旨

### [研究の目的]

A型インスリン受容体異常性の1症例について、インスリン受容体遺伝子、および受容体機能の異常を検索し、インスリン抵抗性の機序を解明する。

### [方 法]

患者家族の末梢血より白血球分画を取り出し、EBウイルスによるcell line (以下、トランスフォームリンパ球と略す) の構築を行った。インスリン結合能は、トランスフォームリンパ球と<sup>125</sup>I-インスリンを4℃、16時間ふ置して測定した。また、この細胞をlactoperoxidase法を用いて、Na<sup>125</sup>Iによるsurface labelを行い、免疫沈降後、電気遊動 (7.5% SDS-PAGE) によって解析した。トランスフォームリンパ球からのtotal RNAの抽出はAcid Guanidine Phenol Chloroform法を用いた。Northern blottingは1%アガロースゲルで電気遊動後、nylonmembraneへ電氣的にblotし、hybridizationはformamideは用いず65℃で行い、10% dextran sulfateを用いた。また、患者家族の血液よりgenomic DNAを抽出精製し、これを鋳型にしてインスリン受容体遺伝子の22個のエクソンをpolymerase chain reaction (以下、PCRと略す) 法を用いて増幅した。PCR産物は、<sup>32</sup>P-ATPにて末端標識したprimerを用いてdirect sequenceを行った。インスリン受容体cDNAをpBluescript vectorに組み込み、mutagenic oligonucleotide (5'-GGCACCGGACTCCCTGAAG-3')を用いてKunkel法によるsite directed mutagenesisを行った。作製した変異cDNAを発現ベクターpGEM3SVHIRに組み込み、DEAE-dextran法を用いたtransfectionによって、COS7細胞に変異インスリン受容体を一過性に発現させた。Transfection 72時間後にCOS7細胞を1% Triton溶液で可溶化し、インスリン受容体をWheat germ agglutinin (WGA) カラムを用いて部分精製した。これを各濃度のインスリンと4℃、16時間ふ置した後、<sup>32</sup>P-ATPと4℃10分間反応させ、インスリン受容体を自己リン酸化させた。反応停止後、免疫沈降させ、SDS-PAGEにて解析した。

### [結 果]

患者トランスフォームリンパ球でのインスリン結合は、正常に比し15-33%に低下しており、Scatchard解析により細胞膜表面受容体数の減少が示唆された。又、surface labeling studyでは、インス

リン受容体  $\alpha$ -subunit に一致するバンドのシグナルは、患者細胞では正常の約25%に低下しており、膜表面受容体数の減少が認められた。Northern blotにて認められた患者症例のインスリン受容体 mRNA量は、 $\beta$ -actinで補正するとほぼ正常であった。すなわち、受容体蛋白の生合成から膜挿入までの過程に障害があると考えられた。患者インスリン受容体遺伝子の解析では、kinase domain内のコドン1179に、Glu(GAG)→Asp(GAC) のヘテロ接合体の missense mutation を認めた。同様の結果は母親にも認められ、母親から proband に遺伝したものと考えられた。Mutant 受容体を発現させた COS7 細胞のインスリン結合能は、DNA量で補正して、正常に比し31%に低下していた。インスリン親和性は正常であったことより、膜表面受容体数の低下によるものと考えられた。又、mutant 受容体の自己磷酸化能には著明な低下が認められた。

#### [考 察]

インスリン受容体遺伝子 Asp<sup>1179</sup> mutation が本症例のインスリン抵抗性の原因であることが明らかとなり、その機序として、インスリン受容体自己磷酸化能の低下、および、膜表面受容体数の減少の関与が認められた。受容体数減少の機序については以下のように考えられた。つまり、heterozygote の mutation では、受容体として3種類が存在する。仮に、wild type の  $\beta$  subunit を  $\beta$ 、mutant type を  $\beta'$  とすると、ホモ接合体の2種類 ( $\alpha_2\beta_2$ 、 $\alpha_2\beta'_2$ ) と、ヘテロ接合体の1種類 ( $\alpha_2\beta\beta'$ ) が存在することになる。このうち、mutant の  $\beta'$  を含む受容体は、生合成から膜挿入までの過程に何等かの異常があり膜表面に発現されないとした場合、1/4を占める正常のホモ接合体 ( $\alpha_2\beta_2$ ) のみが膜に発現されることになる。この割合は、患者とランスフォームリンパ球における解析結果とも合致している。

#### [結 論]

インスリン受容体遺伝子の Asp<sup>1179</sup> mutation は、 $\beta$ -subunit の kinase domain に位置するが、インスリン受容体自己磷酸化能の低下のみならず、細胞膜表面受容体数の低下をもたらし、インスリン抵抗性の原因となることが明らかとなった。

### 学位論文審査の結果の要旨

本研究は、A型インスリン受容体異常症の1家系について、そのインスリン抵抗性の機序を解析するためインスリン受容体遺伝子の構造解析を行い、更に、同定された変異をインスリン受容体cDNA上に作成し、これをCOS7細胞に発現させて、変異インスリン受容体の機能解析を試みたものである。得られた結果は以下の通りである。

- 1) 患者本人、及び、母親のインスリン受容体遺伝子のチロシンキナーゼ部位に、ヘテロ接合体のミスセンス変異 Glu<sup>1179</sup>→Asp<sup>1179</sup>(GAG→GAC) が認められた。
- 2) この変異が、インスリン受容体自己磷酸化能の低下、細胞膜表面インスリン受容体数減少の原因であった。
- 3) インスリン受容体数減少の機序は、プロセプター生合成以降における変異受容体タンパク質の degradation の亢進によるものと推察された。
- 4) 変異インスリン受容体は膜表面に発現されず、患者細胞では膜表面受容体数減少がインスリン抵抗性の主たる原因であると考えられた。

以上より、インスリン受容体遺伝子の点突然変異Glu<sup>1179</sup>→Asp<sup>1179</sup>はチロシキナーゼ部位に位置するが、患者におけるインスリン抵抗性の主たる原因は、受容体数減少の原因である変異受容体の degradation 亢進は、これまでの  $\beta$ -subunit の変異には報告されていない機序であった。

本研究は、インスリン受容体異常症のインスリン抵抗性の機序を明らかにしたものであるとして興味深いものであり、博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。