



Title	ヒト異常インスリン遺伝子に関する研究： 〔SerB24〕インスリン遺伝子の同定とその塩基配列の 決定
Author(s)	羽田, 勝計
Citation	大阪大学, 1984, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34917
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていない ため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利 用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文につい てをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・（本籍）	はね 羽	だ 田	まさ 勝	かず 計
学 位 の 種 類	医	学	博	士
学 位 記 番 号	第	6	6	20 号
学位授与の日付	昭 和 59 年 10 月 8 日			
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当			
学 位 論 文 題 目	ヒト異常インスリン遺伝子に関する研究：〔Ser ^{B24} 〕インスリン 遺伝子の同定とその塩基配列の決定			
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 阿 部 裕			
	(副査) 教 授 近 藤 宗 平 教 授 垂 井 清 一 郎			

論 文 内 容 の 要 旨

（目 的）

1979 年、異常インスリンを持つ糖尿病患者が報告され、膵臓の一部より単離されたインスリンは、B 鎖24位或いは25位のphenylalanineがleucineに置換している事が認められた。この異常インスリンの発見は、糖尿病の成因を解明する上で非常に重要と考えられたが、完全なアミノ酸配列の決定には多量のインスリンが必要なため、第 1 例目も不完全な同定に留っていた。今回、私は、著明な高インスリン血症を呈し、第 1 例目とは異った異常インスリンの存在が疑れる糖尿病家系を経験し、その異常を同定する目的で患者インスリン遺伝子の分析を行った。

（方法ならびに成績）

症例は28才女性、16才時に糖尿病の診断を受けた。著明な空腹時高インスリン血症（ $111 \mu\text{U}/\text{ml}$ ）が存在したが、インスリン抵抗性は認められなかった。患者血清より単離したインスリンの生物活性は著明に低下しており、高速液体クロマトグラフィーでは、正常ヒトインスリン及び第 1 例目の異常インスリン（後に〔Leu^{B25}〕-インスリンと同定された）に比し、早期に溶出された。又、空腹時高インスリン血症は患者を含む3世代6名（男女共）の家族に認められ、常染色体優性遺伝が考えられた。この異常を同定するため、患者白血球より、proteinase K処理、phenol抽出にてDNAを単離し、以下の検索を行った。

1. 制限酵素を用いたDNA切断分析

インスリン分子中脊椎動物を通じ不変であるアミノ酸は22個あり、生物活性を低下させる異常はこれらのアミノ酸の異常によるものと考えられる。インスリン遺伝子上、これらのアミノ酸をcodeする部位

を認識する制限酵素は十数個存在するが、多くはDNAをかなり小さく切断するため、現在の方法では同定が困難である。この意味において、Rsa I, Pvu II, Mbo IIの三種の酵素がscreeningに適しているが、特にMbo IIの認識部位が生物活性に重要なB鎖24, 25位のphenylalanineのcodonの一部 (TCTTC)である事、及び第1例目の患者でもこの認識部位の欠如が認められた事から、まずこの酵素Mbo IIを使用した。患者及び正常者DNA30 μ gをMbo II 90Uと約16時間37 $^{\circ}$ Cでincubateした後、Mbo II 90Uを加えさらに8時間incubationを継続した。切断されたDNA断片を、phenol抽出、ethanol沈澱後、2.0% agarose gel電気泳動で分離し、その後Southernの方法を用いてnitrocellulose紙上に吸着固定した。次いでnick translationにより 32 PでlabelしたヒトインスリンcDNAとのhybridizationを行い、そのpatternをautoradiographyにて検討した。その結果患者DNAからは、正常者DNAでみられる1600, 580, 340bpの3本のbandに加え、920 bpのextra bandが得られた。これは、Mbo II認識部位の欠如を示しており、B鎖24, 25位のcodonの一部 (TCTTC) に異常のある事が推定された。又同時に、患者はheterozygoteであると考えられた。

2. インスリン遺伝子のcloningとその塩基配列の決定

前記の如く推定される異常を同定するため患者インスリン遺伝子のcloningを行った。制限酵素Eco RIを用いた患者DNAの切断分析では14kbのsingle bandが得られたため、この大きさのインスリン遺伝子を含むと考えられる12.3 ~ 16.5 kbのEco RI fragmentを患者DNAから electroelutionにて単離し、cloningに用いた。vectorとしてはbacteriophage λ gt \cdot WES \cdot λ Bを用いた。Eco RI処理とsucrose gradientにて単離したphage armと、前記患者DNA Eco RI fragmentをligase下に結合させた後、in vitro packaging法でrecombinant phageを作成した。 32 P-ヒトインスリンcDNAをprobeとして用い、plaque hybridization法にてscreeningした結果、約50万個のphage plaqueから最終的に4個のインスリン遺伝子を持つcloneが得られた。Mbo IIによる切断分析の結果、2個が正常、2個が異常と考えられた。各々をplasmid pBR 322にてsubcloningした後、塩基配列をMaxam-Gilbert法を用いて決定した。その結果B鎖24位phenylalanineのcodon TTCがTCC (serine)に突然変異を起している事が同定された。従って異常インスリンは、[Ser^{B24}]-インスリンであると判明した。尚、他のcoding regionの塩基配列は正常であった。

(総括)

1. 高インスリン血症を呈する糖尿病患者のインスリン遺伝子の検索を行い、制限酵素Mbo II認識部位 (Phe^{B24}Phe^{B25}に対応)の欠如を認めた。この酵素は異常インスリンのscreeningにも有用であると考えられた。
2. cloningの結果、同数の正常及び異常インスリン遺伝子が得られ、B鎖24位のTTCからTCCへの突然変異が同定された。その結果、異常インスリンは[Ser^{B24}]-インスリンと判明した。

以上の結果は、糖尿病の成因及びインスリンの構造と作用を解明する上で重要であると考えられる。

論文の審査結果の要旨

インスリン遺伝子の検索は、糖尿病の成因、インスリンの構造と作用を解明する上で重要である。

本論文では、著明な高インスリン血症を呈する糖尿病家系において、その異常同定のためインスリン遺伝子の分析、塩基配列の決定を行った結果、B鎖24位のフェニルアラニンがセリンに突然変異を起した異常インスリンである事が見出された。