



Title	Two patients with insulin resistance due to decreased levels of insulin receptor mRNA
Author(s)	今野, 英一
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37874
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 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	いまのえいいち 今野英一
博士の専攻分野 の名称	博士（医学）
学位記番号	第 9871 号
学位授与年月日	平成 3 年 8 月 8 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Two patients with insulin resistance due to decreased levels of insulin receptor mRNA (インスリンレセプター mRNA レベルの低下によりインスリン抵 抗性を示した 2 症例における分子生物学的検討)
論文審査委員	(主査) 教授 鎌田 武信 (副査) 教授 三木 直正 教授 荻原 俊男

論文内容の要旨

〔目的〕

黒色表皮腫と高度のインスリン抵抗性を示した 2 例の患者のインスリンレセプター遺伝子について、DNA の塩基配列決定を含む種々の分子生物学的検討を行うことにより、両症例の病因を解明するとともに、インスリンレセプター遺伝子の発現メカニズム解明を試みた。

〔方法〕

症例 1（11 才男児）、症例 2（14 才女性）の末梢血 B リンパ球を Epstein-Barr virus で transform した後、以下の検討に供した。

- 1) インスリン結合の測定： 125 I 標識インスリンを用いて、培養リンパ球に対するインスリン結合を測定した。
- 2) Southern blot: genomic DNA を制限酵素 EcoRI, SacI 又は RsaI で切断し、ヒトインスリンレセプター cDNA から作製した、構造遺伝子全体をカバーする 4 種類の DNA 断片、① 1-1011, ② 1011-1926, ③ 1599-2961, ④ 2742-4341 のいずれかを probe として使用して hybridization を施行した。
- 3) polymerase chain reaction (PCR) 法による genomic DNA の増幅と direct sequencing: 患者インスリンレセプター遺伝子の各 2 2 個の exon を、各 exon に近接する intron 部を primer とし、Taq polymerase を使用して PCR 法により増幅した。次いで上記 PCR 産物を鋳型として、一方のみの primer を添加することにより、一本鎖 DNA を選択的に増幅した後、dideoxy 法で direct seq-

〔総括〕

uencingを行なった。

- 4) RNase A protection assay: インスリンレセプター cDNA の断片 (2013-2854) を, T7 RNA polymerase と (α - 32 P) UTP を使用して標識 antisense RNA を作製し, 患者 RNA と hybridize させた。一本鎖 RNA を RNase によって分解させた後, 二本鎖 RNA をポリアクリルアミドゲル電気泳動で検出した。
- 5) PCR による cDNA の増幅と対立遺伝子特異的オリゴハイブリッド形成法: 患者 RNA から一本鎖 cDNA を合成し, この cDNA を鋳型として PCR を施行後, ナイロン膜へ transfer した。direct sequencing により決定した DNA 塩基配列の結果に基づき, 症例 1 に対しては 1689-1707 (1698 位が A または G), 症例 2 に対しては 1677-1695 (1686 位が C または T) の各 2 種類の oligonucleotide を 32 P で標識し, これを probe として hybridization を施行し, 完全にマッチしたシグナルのみを得るような条件で washing を行った。

〔成績〕

- 1) インスリン結合: 培養リンパ球に対するインスリン結合は, 症例 1 において正常の 10% 未満に著しく低下し, 症例 2 においては正常下限の約 30% に低下していた。
- 2) インスリンレセプター遺伝子の構造: 両症例ともに制限酵素断片長多型を認めることより, genome 上にインスリンレセプター遺伝子の 2 つの異なった allele を持つと考えられた。また, 両症例ともに既に健常者で認められているバンドパターンのみを認め, 大きな deletion, insertion などの遺伝子再編成の存在は認められなかった。
- 3) インスリンレセプター遺伝子の塩基配列: 両症例において, アミノ酸配列に変化を来す塩基配列の変異を認めず, 従ってインスリンレセプターの全アミノ酸配列は正常であった。
- 4) インスリンレセプター mRNA レベル: 症例 1 においてインスリンレセプター mRNA レベルは著減していたが, 症例 2 においては正常範囲内であった。
- 5) 各 allele (父及び母由来) のインスリンレセプター mRNA レベルの比率: 症例 1 は 1698 位が G 及び A (Ala⁵²³), 症例 2 は 1686 位が C 及び T (Asp⁵¹⁹) の heterozygote であることを利用して, 各 allele 由来のインスリンレセプター mRNA レベルの比率を検討した。その結果, 症例 1 において両 allele 由来のインスリンレセプター mRNA は, 共に極めて低いレベルながらほぼ同等に発現していた。一方, 症例 2 においては T¹⁶⁸⁶-allele 由来の mRNA レベルは, C¹⁶⁸⁶-allele 由来の mRNA レベルの 1/10 以下に低下していた。

また, RNA 合成阻害剤の actinomycin D (5 μ g/ml) を添加し, 両 allele 由来 mRNA の発現比率の時間経過を検討したところ, 両症例ともに 2 つの allele 由来のインスリンレセプター mRNA はほぼ同一の速度で分解していた。即ち, 特に症例 2 における T¹⁶⁸⁶-allele 由来 mRNA の低下は, mRNA 合成の低下 (転写効率の低下, splicing の異常など) によるものと考えられた。

インスリン結合の低下した2例のインスリン抵抗性患者のインスリンレセプター遺伝子を解析した。その結果、両症例ともにインスリンレセプターのアミノ酸一次構造は正常であったが、インスリンレセプター mRNA レベルの低下が認められた。従って蛋白コード領域以外に変異が存在し、その結果インスリン結合が低下していると考えられた。

論文審査の結果の要旨

〔要 旨〕

インスリン抵抗性は、インスリン非依存型糖尿病の重要な特質の一つである。インスリンレセプターは、インスリン作用の最初のステップでありインスリン抵抗性の発症に重要であり、遺伝子レベルでの検討が望まれる。

本論文は、インスリンレセプターに遺伝的異常があると考えられる2例の著明なインスリン抵抗性患者のインスリンレセプター遺伝子について、DNAの塩基配列決定、mRNAレベルを含む分子生物学的検討を行い、両症例ともにアミノ酸コード領域以外の異常によりインスリンレセプター mRNA レベルが低下し、その事が両症例のインスリン抵抗性の主因となっていることを明らかにしたものであり、学位論文としての意義は大きい。