

論文内容要旨

研究目的

我々は、膵β細胞においてグルコース刺激によりCD38を介して上昇したサイクリックADPリボース(cADPR)がミクロソームからのCa²⁺放出を引き起こすことを示した。(The CD38-cADPR signaling system)。また、cADPRがミクロソームのRyR上のFKBP12.6に結合することによりRyRからのFKBP12.6の解離が起こり、Ca²⁺放出が引き起こされることを示し、FKBP12.6がインスリン分泌における細胞内プールからのCa²⁺動員に必須の役割を果たしていることを示した。しかしFKBP12.6の遺伝子構造や染色体座位に関しては現在のところ全く知られていない。本研究では、それらを初めて明らかにした。

研究結果

ヒトFKBP12.6遺伝子の単離と構造決定—ヒトゲノムライブラリーをFKBP12.6遺伝子断片をプローブとしてスクリーニングし2つのオーバーラップするクローンを単離した。これらのクローンは約20kbpの範囲をカバーしヒトFKBP12.6遺伝子の全長を含んでいた。FKBP12.6遺伝子とFKBP12.6 cDNAの塩基配列とを比較した結果、ヒトFKBP12.6は全長約16kbpで4つのexonと3つのintronで構成されており全てのexon-intron境界部位はGT/AGruleを満たしていた。exon 1は5'非翻訳領域と翻訳開始メチオニン及びFKBP 12.6蛋白質のN端側をコードしており、exon 2-4はFKBP 12.6蛋白質のC端側と3'非翻訳領域をコードしていた。stop codonとpolyA signalはexon 4に存在した。次にホモログであるFKBP12との遺伝子構造の比較を行った。両遺伝子の蛋白質コード域はともに4つのexonに分かれており、その領域におけるintron挿入部位は完全に保存されていた。しかし全体構造は異なっており、FKBP 12には3'非翻訳領域で構成されるexon 5が存在した。

ヒトFKBP 12.6及びFKBP 12遺伝子の染色体座位の決定—Fluorescence in situ hybridization法により両遺伝子の染色体座位を決定した。FKBP 12.6遺伝子をプローブとして用いると、全てのシグナルは第2染色体上に認められそのうちの96%が2p21-23に存在しFKBP 12.6は2p21-23にマッピングされた。一方FKBP 12の遺伝子をプローブとして用いた際には、全てのシグナルは第20染色体上に認められそのうち91%が20p13に存在しFKBP 12は20p13にマッピングされた。このように、両遺伝子はその蛋白質コード域の高い相同性にもかかわらず全く別の染色体上に位置することが明らかとなった。

ヒトFKBP 12.6及びFKBP 12遺伝子の転写開始点の決定—両遺伝子の転写開始点はヒト膵臓

由来 poly (A)⁺ RNA を用いた primer extension 法により決定した。FKBP12.6 では 11 本の主要なバンドが認められたが、このうち翻訳開始点から 130base 上流のバンドの信号強度が最も強く、またこの部位は cap site の consensus を満たすことから主要な転写開始点と考えられた。FKBP 12 では翻訳開始点から 69, 70base 上流に主要なバンドを認めたが、明らかとなっている cDNA の 5' 末端が 69base 上流であることから翻訳開始点から 70base 上流の部位が主要な転写開始点と考えられた。このように両遺伝子の転写開始点は複数存在したが、この結果は TATAbox を持たない他の多く house keeping gene と共通するものであった。

ヒト FKBP 12.6 及び FKBP 12 遺伝子の 5' 上流域の解析—両遺伝子の転写開始点の上流約 1.7kbp の塩基配列を決定した。両遺伝子間では塩基配列の明らかな相同性は認められなかった。しかし両遺伝子とも転写開始点は、多くの Sp 1 結合部位が存在する CpG island に位置していた。

糖尿病発症と FKBP 12.6—我々はグルコース刺激によるインスリン分泌において The CD38-cADPR signaling system を提唱したが、最近になりこの系の異常 (CD38 遺伝子の missense mutation, 抗 CD38 自己抗体の存在) がインスリン非依存性糖尿病患者の中で明らかになっている。従って、この系の中で cADPR 結合蛋白質として重要な役割を担う FKBP 12.6 の遺伝子異常が、インスリン分泌の低下を引き起こす可能性も考えられる。今後、糖尿病発症の一因として FKBP12.6 遺伝子異常の検索が期待される。

審査結果の要旨

膵β細胞のグルコース刺激によるインスリン分泌の新しい細胞内情報伝達系 The CD38-cyclic ADP-ribose (cADPR) signaling system はグルコース代謝により上昇した細胞内 ATP が cADPR 代謝酵素である CD38 の酵素活性を変化させて細胞内 cADPR 濃度の上昇をもたらす、これがミクロソームのリアノジン型受容体 (RyR) から Ca^{2+} 放出を引き起こす。FK506-binding protein12.6 (FKBP12.6) は immunomodulator FK506 の細胞内標的の一つとして認識されてきたが、最近に至り cADPR 結合蛋白質であることが明らかにされた。cADPR による RyR からの Ca^{2+} 放出は、cADPR がミクロソームの RyR に結合している FKBP12.6 に結合すると FKBP12.6 が RyR から解離し、 Ca^{2+} 放出が引き起こされると考えられている。このように FKBP12.6 はインスリン分泌における細胞内プールからの Ca^{2+} 動員に重要な役割を果たしているが、FKBP12.6 の遺伝子構造や染色体座位は全く不明であった。

本研究の意義は、ヒト FKBP12.6 遺伝子を単離しその遺伝子構造と染色体座位を初めて明らかにしたことである。FKBP12.6 は The CD38-cADPR signaling system の中で cADPR 結合蛋白質として重要な役割を担うので FKBP12.6 の遺伝子異常は、インスリン分泌の低下を引き起こす可能性が考えられる。実際、最近になり CD38 遺伝子の missense mutation や、グルコース刺激によるインスリン分泌の低下をもたらす抗 CD38 自己抗体が、インスリン非依存性糖尿病 (NIDDM) 患者に存在することが明らかになっている。本研究によってヒト FKBP12.6 遺伝子の蛋白質コード域や 5'-flanking region の遺伝子異常の検索が可能になった。このことは、多因子の遺伝的要因が関与すると考えられる NIDDM 発症の原因検索に新しい可能性をもたらした。

以上、本研究はグルコース刺激によるインスリン分泌の新しい細胞内情報伝達系の一員である FKBP12.6 のヒト遺伝子を単離しその遺伝子構造と染色体座位を決定したもので、学位論文に値するのみならず生物学ならびに臨床医学上の意義も大きいものと考えられた。