

氏 名 (本籍)	黒 木 実 智 雄
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 1 6 2 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 12 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 条 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 専 攻	東 北 大 学 大 学 院 医 学 系 研 究 科 (博 士 課 程) 内 科 学 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Islet-type ryanodine receptor, a novel isoform generated from cardiac-type ryanodine recep- tor gene by alternative splicing. (腓ランゲルハンス島から分離した新しいリアノ ジン受容体の構造と発現)
	(主 査)
論 文 審 査 委 員	教 授 豊 田 隆 謙 教 授 白 土 邦 男 教 授 下 瀬 川 徹

論 文 内 容 要 旨

グルコース刺激による膵ランゲルハンス島（ α 島）からのインスリン分泌は、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を介して起こる。この Ca^{2+} 濃度の上昇には、細胞外からの Ca^{2+} 流入とともに、グルコース刺激によって生じたサイクリック ADP リボース（cADPR）による小胞体リアノジン受容体（RyR）からの Ca^{2+} 放出も大きく寄与していると考えられている。RyR はこれまでに骨格筋型、心筋型、脳型の 3 つのタイプが報告されているが、膵 α 島で発現している RyR については不明であった。本研究では、ラット膵 α 島で発現している RyR の構造を決定した。その結果、この RyR はこれまで知られていた 3 つのタイプとは異なる新しいタイプの RyR であった。この RyR は膵 α 島だけでなく大脳、小脳、下垂体、副腎、肺泡マクロファージなどの種々の組織・細胞でも発現していた。

1) ラットでは骨格筋型、心筋型、脳型のいずれの RyR の構造も報告されていない。そこで 3 種類の RyR の全構造が明らかになっているヒト、ウサギと部分構造が知られているマウスの RyR の構造をもとにプライマーを設計し、ラット膵 α 島 RNA を鋳型に 3 種類の RyR の増幅を試みたところ、心筋型が増幅された。そこで増幅された心筋型をプローブにラット膵 α 島 cDNA ライブラリーをスクリーニングしたところ、陽性クローンが得られた。得られた cDNA クローンをもとにラット膵 α 島で発現している RyR cDNA の全長を単離し、その構造を決定した。cDNA の全長は約 16.5kbp で 4,947 アミノ酸の蛋白質をコードしていた。

2) この蛋白質のアミノ酸配列をヒト、ウサギの 3 種類の RyR と比較すると、骨格筋型 RyR および脳型 RyR との相同性はそれぞれ 60% 台であったが、心筋型 RyR とは 97% と高い相同性が認められ、この RyR はラットの心筋型 RyR と推定された。ところが、このラット膵 α 島の RyR には、ヒト心筋型 RyR の 92 番目から 98 番目（ウサギ心筋型 RyR では 92 番目から 98 番目）の 7 アミノ酸残基、ヒト心筋型 RyR の 3564 番目から 3575 番目（ウサギ心筋型 RyR では 3565 番目から 3576 番目）の 12 アミノ酸残基に対応する 2 カ所の配列が存在していなかった。そこで、この 2 カ所の配列の欠落が膵 α 島という組織に特徴的な現象であるのかどうかを明らかにするため、ラット心臓の RNA を鋳型に RT-PCR によってこの配列の有無を検討した。ラット心臓で発現している心筋型 RyR にはヒト、ウサギと同様にこれら 2 カ所の配列が存在したことから、この 2 カ所の配列の有無は組織特異的なスプライシングによる可能性が考えられた。

3) そこで PCR 法によって当該部分の遺伝子の解析を行ったところ、膵 α 島の RyR で欠落していた 7 アミノ酸、12 アミノ酸をコードする 21 塩基、36 塩基のエキソンがいわゆる“心筋型 RyR 遺伝子”に存在することが明らかになった。従って膵 α 島の RyR は心筋型 RyR と同じ

“心筋型 RyR 遺伝子” から転写され、成熟型 mRNA の生成過程で 2 つのエキソン部分を選択的スプライシングによって除くことにより生ずる新しいタイプの RyR (ラ島型 RyR) であることが明らかとなった。

4) 次に RT-PCR により各組織におけるラ島型 RyR, 心筋型 RyR の発現を検討したところ、心筋、大動脈では心筋型 RyR が主に発現しているのに対し、腓ラ島だけでなく大脳、小脳、下垂体、副腎、肺胞マクロファージでもラ島型 RyR が主に発現していた。その他の組織・細胞の多くは両型が種々の比率で発現していた。

ラ島型 RyR で選択的スプライシングにより欠落していた 2 カ所のエクソンに対応する配列はヒト、ウサギの骨格筋型、脳型 RyR にも存在しなかった。また、ゲノム中に RyR 遺伝子が 1 種類しか存在しないショウジョウバエの RyR においてもこれら 2 カ所の配列は存在しないことから、この 2 カ所の配列は進化の過程で“心筋型 RyR 遺伝子” がエクソンとして獲得した心筋型に特徴的な配列であると考えられた。このように考えると“心筋型 RyR 遺伝子” は組織特異的な選択的スプライシングによって心筋型を特徴づける 2 カ所の配列を欠失させ、新しいタイプの RyR であるラ島型 RyR を生じ、心筋と大動脈以外の多くの組織・細胞での RyR に多様性をもたらしめていると考えられた。実際、cADPR による細胞内プールからの Ca^{2+} 放出は RyR によると考えられているが、cADPR に対する感受性や Ca^{2+} 放出の性質は用いる組織・細胞等により様々な報告があり必ずしも一定ではなかった。こうした意味で cADPR による Ca^{2+} 放出の生理的意義が最もよく理解されている腓ラ島で発現している RyR が“心筋型 RyR 遺伝子” 由来のラ島型 RyR であることはこのタイプの RyR の cADPR による Ca^{2+} 放出における重要性を示唆するものと考えられた。

審査結果の要旨

グルコース刺激による膵ランゲルハンス島（ラ島）からのインスリン分泌は、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を介して起こる。この Ca^{2+} 濃度の上昇には、グルコース刺激によってラ島内で増加したサイクリック ADP リボース（cADPR）による小胞体リアノジン受容体（RyR）からの Ca^{2+} 放出が大きく寄与していると考えられている。RyR はこれまでに骨格筋型、心筋型、脳型の 3 つのタイプが報告されているが、膵ラ島で発現している RyR については不明であった。

本研究で著者は、ラット膵ラ島で発現している RyR の構造を決定した。ラット膵ラ島で発現している RyR cDNA の全長は約 16.5 kbp で 4,947 アミノ酸の蛋白質をコードしていた。この RyR は心筋型 RyR と同じ“心筋型 RyR 遺伝子”から転写され、成熟型 mRNA の生成過程で 7 アミノ酸、12 アミノ酸をコードする 21 塩基、36 塩基の 2 つのエキソンを選択的スプライシングによって除くことにより生ずる新しいタイプの RyR（ラ島型 RyR）であることが示された。次に著者は各組織におけるラ島型 RyR、心筋型 RyR の発現を検討した。その結果、心筋、大動脈では心筋型 RyR が主に発現しているのに対し、ラ島型 RyR は膵ラ島だけでなく大脳、小脳、下垂体、副腎、肺胞マクロファージにおいても major に発現しており、またその他の組織・細胞の多くは両型が種々の比率で発現していることが明らかになった。

ラ島型 RyR で選択的スプライシングにより欠落していた 2 カ所の配列はヒト、ウサギの骨格筋型、脳型 RyR にも存在しておらず、またゲノム中に RyR 遺伝子が 1 種類しか存在しないショウジョウバエの RyR においてもこれら 2 カ所の配列は存在していないことから、これら 2 カ所の配列は進化の過程で“心筋型 RyR 遺伝子”がエキソンとして獲得した心筋型に特徴的な配列であると考えられた。従って“心筋型 RyR 遺伝子”は組織特異的な選択的スプライシングによって心筋型を特徴づける 2 カ所の配列を欠失させ、新しいタイプの RyR であるラ島型 RyR を生じ、多くの組織・細胞での RyR に多様性をもたらしていると考えられた。

本研究は著者が従来から取り組んできたラ島での cADPR の作用機構の研究に基づき、膵ラ島で発現している新しいタイプの RyR を分離し、その構造・発現を明らかにした点で独創的な研究である。また、本研究で見出された新しいラ島型 RyR は膵ラ島以外の他の組織・細胞においても発現していた。cADPR による小胞体 RyR からの Ca^{2+} 放出は、膵 β 細胞のインスリン分泌のみならず他の組織・細胞の様々な生理現象で重要な役割を担っていることから、本研究でのラ島型 RyR の発見は cADPR を介する生理現象の理解に 4 つの RyR サブタイプを考慮すべきことを提示した点で、その学術的意義が極めて大きい。以上の結果本論文は学位に値する。