

論文の内容の要旨

論文題目 インスリン受容体ファミリーの機能ドメインにおける
遺伝子変異と表現型の関連についての研究

高倉 美菜香

インスリン受容体 (INSR)、IGF-1 受容体 (IGF1R) は同じ蛋白質ファミリーに属し、*INSR* 遺伝子変異により重症のインスリン抵抗性をきたし、*IGF1R* 遺伝子変異によって胎児発育遅延および出生後発育遅滞を認める。*INSR* 遺伝子の変異について明確な遺伝子型-表現型相関 (genotype-phenotype correlation) は示されていない。一方、*INSR* 遺伝子以外の遺伝子において、変異によるタンパク質立体構造への影響と臨床的重症度の相関 (structure-phenotype correlations) について複数の報告があり、*in silico* の構造解析の手法が変異の疾患発症に与える影響を考察する上で有用であることが示されている。我々は最近、高度のインスリン抵抗性を惹起する *INSR* 遺伝子について、fibronectin type III ドメイン (FnIII) に存在する変異に関する *in silico* の立体構造解析および機能解析を行い、最重症臨床病型の変異はより重度の低い変異と比較して、ドメイン構造の不安定化をもたらすことが予測されると報告した (structure-phenotype correlation)。一方、同遺伝子において FnIII ドメイン以外では structure-phenotype correlation は認められるのか、さらに同じインスリン受容体ファミリーである *IGF1R* 遺伝子では structure-phenotype correlation は存在するのかは不明であった。

そこで本研究では当施設で報告したものを含めて、オンラインデータベースに登録されているインスリン受容体異常症 A 型の原因となる *INSR* 遺伝子のチロシンキナーゼドメインに存在する 13 か所のアミノ酸残基で報告されたミスセンス変異を対象として、*in silico* の蛋白質立体構造解析を行った。さらに、一般集団で認められた同遺伝子のチロシンキナーゼドメインに存在するバリエーション 4 個についても蛋白質立体構造解析を行い、蛋白質立体構造への影響と臨床的重症度の関連について検討した。また、*INSR* 遺伝子と同じタンパク質ファミリーに属する *IGF1R* 遺伝子の疾患原因変異 4 個についても、*in silico* 蛋白質立体構造解析および培養細胞を用いた機能解析を行った。また一般集団で認められた同遺伝子に存在するバリエーション 3 個についても蛋白質立体構造解析を行い、特に *INSR/IGF1R* 両遺伝子の機能上重要なドメインに着目して蛋白質立体構造への影響と表現型の関連について検討を行った。

INSR のチロシンキナーゼドメインは不活性状態では、activation-loop と呼ばれる可動ループが ATP 結合部位と活性部位を塞ぎ、kinase の活性を妨げている。インスリン結合により、2 つのチロシンキナーゼドメインは相互にトランスリン酸化し、activation-loop に存在する 3 つの Tyr 残基 (Tyr1185, Tyr1189, Tyr1190) がリン酸化される。活性型の立体構造では、3 つの Tyr 残基がリン酸化された activation-loop は、ATP 結合部位及び活性部位からはずれ、ATP 及び基質が活性部位に結合できるようになっている。*INSR* 遺伝子チロシンキナーゼドメインに存在するインスリン受容体異常症 A 型の原因として報告された 13 か所のアミノ酸残基でのミスセンス

変異について (1) ATP 結合への影響、(2) 活性部位への影響、(3) 活性化 (自己リン酸化) への影響、(4) β -subunit 内のダイマー形成への影響、(5) ドメイン構造そのものの安定性への影響などを調べるために構造解析を行った。ATP 結合部位周辺の変異として G1035V、A1055V が存在し、立体構造解析では、いずれの変異も ATP 結合ポケットに存在し、これらの変異は、ATP との steric clash が推察され、その結果、チロシンキナーゼドメインの ATP 結合能を損なうと予測された。活性部位 (catalytic base) 周辺の変異として、H1157R、A1161T、A1162E、N1164T が存在し、いずれの変異も活性部位である Asp1159 を含む catalytic loop と呼ばれるループに存在する。いずれも活性部位 Asp1159 あるいは周辺のアミノ酸残基に影響を及ぼし、活性の発現に必要な立体構造や水分子を含めた水素結合ネットワークを壊すことが推察された。これらの変異は、直接活性部位に影響を及ぼし、その結果、酵素活性を損なうと予測された。自己リン酸化において特に重要な領域として、リン酸化される 3 つの Tyr 残基 (Tyr1185, Tyr1189, Tyr1190) を含む activation loop、自己リン酸化される Tyr の隣 (P+1) を支えるループ構造である P+1 loop や、これらのループ構造を支える役割を持つ APE モチーフなどが存在する。これらの領域に存在する変異として、activation loop に存在する M1180I、P+1 loop に存在する R1201Q、R1201W、APE モチーフに存在する P1205L、E1206D が挙げられる。いずれの変異も周囲の構造と steric clash を引き起こすか、相互作用消失をもたらし、自己リン酸化や活性型への構造変化に影響を及ぼすと思われる。ダイマー形成への影響が推察される変異として、ダイマーインタフェースに存在する A1075D が挙げられる。またチロシンキナーゼドメインの機能に直接影響せず、構造そのものを不安定化する変異として、W1220L、G1146R が存在し、これらの変異は、水素結合や疎水性相互作用の欠失および立体障害により、チロシンキナーゼドメインの構造を不安定化すると思われる。一方、一般集団において認められたインスリン受容体遺伝子チロシンキナーゼドメインのミスセンスバリエーション (アレル頻度 0.1%以上) として、S1033F、L1065V、R1128H、S1221A が存在したが、この内、機能に重要な部位に存在するものは S1033F のみであった。同バリエーションは ATP 結合部位に存在したが、変異体に関する構造解析では ATP 及び周辺構造との立体構造障害は見られなかった。これ以外の 3 つのバリエーションに関しても、変異による立体構造障害がみられないか、または周囲の構造の安定性を局所的に現象させるにとどまることが予測され、インスリン受容体異常症 A 型の変異のようにチロシンキナーゼドメインの機能の発現に重要な部位に影響を与えたり、あるいはドメインの構造を大きく不安定化する可能性は低いと考えられた。

同様に、IGF1R 遺伝子チロシンキナーゼドメインに存在する IGF1R 異常症の原因変異 4 個について、同受容体への機能的影響を調べるために構造解析を行った。4 例の変異のうち 3 例 (E1050K、D1135E、G1155A) は、チロシンキナーゼドメインの機能の発現に寄与する部位で起こっている変異である。Glu1050 は kinase 活性に必要とされる β 3- α C の salt bridge を形成する残基である。Asp1135 は kinase の触媒部位そのものであり、Gly1155 は活性化の際に構造変化を起こす activation loop の中でも重要とされる DFG モチーフの Gly である。R1256S の Arg1256 は、リン酸化の際、構造を支えるために必要な APE モチーフの Glu1182 と salt bridge

を形成する残基である。いずれの変異も IGF1R のチロシンキナーゼドメインの kinase の機能の発現に重要な部位に影響することが推察された。E1050K、D1135E、G1155A については培養細胞で変異体を作成し、IGF-1 刺激で野生型と比較し、自己リン酸化の減弱を認めた。一方、一般集団で認められた *IGF1R* 遺伝子チロシンキナーゼドメインのミスセンスバリエント（アレル頻度 0.1%以上）として T1000I、V1195L、R1246H が存在した。これらのバリエントは、IGF-1 受容体異常症の原因変異とは異なり、いずれもチロシンキナーゼドメインの機能に重要な部位（ATP 結合部位、活性部位（catalytic base）、活性化（自己リン酸化）に重要な領域など）には存在せず、*in silico* の構造解析におけるアミノ酸置換によっても機能の発現に重要な部位やドメインの構造全体への影響は認めなかった。このことから IGF-1 受容体異常症の原因変異のようにチロシンキナーゼドメインの機能の発現に重要な部位に影響を及ぼしたり、またはドメインの構造を大きく不安定化する可能性は低いと考えられた。

変異体モデルによる構造解析では、*INSR* 遺伝子チロシンキナーゼに存在する 13 か所のアミノ酸残基で報告されたミスセンス変異は、機能の発現に重要な部位に影響を及ぼす変異（11 個）と、ダイマーインタフェースに影響を及ぼす変異（1 個）、機能に直接影響せず構造そのものを不安定化する変異（2 個）が推察された。また、*IGF1R* 遺伝子チロシンキナーゼに存在する 4 個のミスセンス変異では、いずれも機能の発現に重要な部位に影響を及ぼす変異であることが推察された。さらに、このうち 3 個のミスセンス変異について、変異型の cDNA を用いてトランスフェクションを行い、COS-7 細胞に発現させて細胞溶解物についてウエスタンブロットを施行したところ、IGF1R の自己リン酸化の減弱を認め、これらの変異が同受容体の蛋白質機能障害をもたらす要因となることが示され、*INSR* 遺伝子および *IGF1R* 遺伝子のチロシンキナーゼドメインにおける structure-phenotype correlation の存在が示唆された。

近年登場した次世代シーケンサーを用いた解析により、様々な遺伝子において非常に多くのバリエントが同定されている。これらのバリエントのうち、臨床現場で活用するために疾患発症の原因となる変異を見出すことは容易ではなく、多くのバリエントは依然として疾患発症との関連性が不明である。本研究で解明したインスリン受容体ファミリーにおける変異によるタンパク質立体構造への影響と臨床的重症度の相関（structure-phenotype correlation）について、同様の手法を他のタンパク質の解析に応用することによって、機能的影響が未知のバリエントに関する精度の高いアノテーション付けを行うことができる可能性がある。

また今回 *INSR/IGF1R* 遺伝子変異による蛋白質立体構造への影響と臨床的重症度の相関が示され、受容体異常症の早期診断および発症メカニズム解明に有用な知見が得られた。