

氏 名	い はら ゆう 井 原 裕
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	論 医 博 第 1597 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Molecular Diversity and Functional Characterization of Voltage-Dependent Calcium Channels (CACN4) Expressed in Pancreatic β -Cells (膵 β 細胞に発現する電位依存性カルシウムチャネル (CACN4) の分子多様性と機能解析)
論文調査委員	(主 査) 教 授 野 間 昭 典 教 授 清 野 裕 教 授 千 葉 勉

論 文 内 容 の 要 旨

膵 β 細胞において電位依存性カルシウムチャネル (VDCC) はインスリン分泌を惹起するカルシウムイオンを細胞内に取り込むという重要な役割を果たしている。neuroendocrine/ β -cell 型 VDCC $\alpha 1$ サブユニットとしては、ヒト脳型、ヒト β 細胞型などがクローニングされているが、ラットの脳型はヒトと比較してそのC端で大きくアミノ酸配列が異なっている。そこで、インスリン分泌調節の分子機構を解明する一環として、ラットの膵 β 細胞型 VDCC $\alpha 1$ サブユニットのクローニングおよびその機能解析を試みた。

(1) ラット膵 β 細胞型 VDCC $\alpha 1$ サブユニットのクローニング

ラット膵 β 細胞由来細胞株である RINm5F より cDNA ライブラリーを作成し、ヒト CACN4 cDNA をプローブとしてスクリーニングを行い、C 端領域の異なるクローンを用い、2 種類の cDNA (rCACN4A, rCACN4B) を構築した。full length form (rCACN4A) は2203個のアミノ酸から構成され、ヒト CACN4 とは95%、ウサギ骨格筋、ラット大動脈の VDCC との相同性はそれぞれ67%、64%であった。細胞内領域には10個の protein kinase A によるリン酸化部位と1個の protein kinase C によるリン酸化部位が存在し、各種リン酸化酵素によりチャネル機能が調節されていることが示唆された。

(2) full length form (rCACN4A) と truncated form (rCACN4B) の比較

rCACN4B は1668個のアミノ酸より構成される。これは、rCACN4A のC端にある1つのエクソン上の2塩基 AG が splicing acceptor と認識されたため、イントロンが splice されるときに58bp 多く splice され、アミノ酸翻訳時に frame shift を起こした truncated form であった。そこで、この欠如する部分を挟むようにプライマーを合成しラット膵ラ氏島 cDNA を鋳型に用いて RT-PCR 法を施行した後、PCR 産物をサザンブロッティングに供した。rCACN4A, rCACN4B に共通な、或いは rCACN4A, rCACN4B にそれぞれ特異的なオリゴプローブを用いてハイブリダイゼーションを行った結果、rCACN4A と rCACN4B は共に正常ラット膵ラ氏島に発現していた。

(3) alternative splicing の存在

ラットとヒトではそのアミノ酸配列が大きく異なる領域が他に2カ所存在した。1つはrepeat I と repeat II の間の細胞内領域、2つめはrepeat IV の S3 と S4 の間の細胞外領域で、これらの部分を夾むようにプライマーを合成し、ラット腭ラ氏島の cDNA を鋳型に用いて RT-PCR 法を施行したところ、この部分には2種の大きさの異なる fragment が存在していた。ヒト CACN4 の遺伝子構造から想定すると、これらの部位では alternative splicing により大きさの異なる fragment ができあがるものと考えられた。

(4) 機能解析

rCACN4A 或いは rCACN4B を発現ベクター pCMV6b に導入し、リポフェクション法にて Chinese hamster ovary (CHO) 細胞に遺伝子導入し、これらを発現する細胞株を確立した。次に、VDCC の $\beta 2$ サブユニットをこれらの確立した細胞株に遺伝子導入し、 $\alpha 1$ 、 $\beta 2$ サブユニット共に発現する細胞株を確立した。この4種の細胞株の電気生理学的機能をパッチクランプ法にて検討した結果、遺伝子導入していない CHO 細胞、rCACN4A、rCACN4B のみが発現している CHO 細胞ではカルシウム電流は検出できなかったが、 $\beta 2$ サブユニットと共に発現した細胞株では、rCACN4A、rCACN4B 共にカルシウム電流を検出することができた。これに、L 型カルシウムチャネルのアゴニストである (±) Bay K8644 を負荷した場合、その電流量は rCACN4A、rCACN4B 共に増大していた。以上より、rCACN4A、rCACN4B 共に VDCC としての機能を有していることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

申請者はインスリン分泌調節の分子機構を解明する一環として、ラットの腭 β 細胞型 VDCC $\alpha 1$ サブユニットのクローニングおよびその機能解析を行った。クローニングの結果、ラット腭 β 細胞型 VDCC $\alpha 1$ サブユニットは、2203個のアミノ酸からなる full length form (rCACN4A) と alternative splicing を受け frame shift を起こしたために、そのC端の短くなった1668個のアミノ酸からなる truncated form (rCACN4B) の2種類存在していた。また細胞膜貫通領域 repeat I と repeat II の間の細胞内領域と、repeat IV の segment 3 と 4 の間の細胞外領域に alternative splicing を受ける部位も存在した。さらに、各 α サブユニット単独、あるいは β サブユニットと共に遺伝子導入した CHO 細胞を用いてパッチクランプ法を行った結果、rCACN4A、rCACN4B は β サブユニットと共に発現することにより、それぞれ VDCC としての機能を有していることが明らかとなった。

以上の研究は腭 β 細胞に発現する電位依存性カルシウムチャネルの遺伝子構造を解明し、その機能の理解に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は平成9年1月16日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。