

1 遺伝子 Q310X 変異は糖尿病発症と関連していることが考えられた。

F.研究発表

1. 論文発表

・下村裕子、三家登喜夫、英 肇、西野雅之、中川貴之、島尻佳典、久保一紀、南條輝志男：2型糖尿病における転写因子異常-ISL-1 遺伝子異常の検索—分子糖尿病学 Vol.10:31-35,1999

2. 学会報告

・下村裕子、久保一紀、英 肇、三家登喜夫、南條輝志男：糖尿病の成因としての転写因子異常：2型糖尿病患者に認められた ISL-1 遺伝子変異(Q310X). 第 42 回日本糖尿病学会年次学術集会 1999年5月13,14,15日(横浜)

・角田圭子、別所寛人、三家登喜夫、南條輝志男  
Suntaxin 1A 遺伝子の構造と日本人 NIDDM 患者における遺伝子変異の検索. 第 42 回日本糖尿病学会年次学術集会 1999年5月13,14,15日(横浜)

G.知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案特許

なし

3. その他

なし

厚生科学研究費補助金 (ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業)  
分担報告書

インスリン分泌に関する研究  
-新規ミトコンドリア ABC 蛋白遺伝子の単離と機能解析-

分担研究者：清野 進 (千葉大学大学院医学研究科・教授)

研究要旨：わが国の 2 型糖尿病は、膵β細胞からのグルコース濃度に応じた適正インスリン分泌量の不足が特徴である。ミトコンドリアは重要な役割を演じ、インスリン分泌機序のなかでミトコンドリア(Mt)機能の低下や Mt 遺伝子異常は、糖尿病を発症することが報告されている。Mt は主要なエネルギー産生部位であり、その酸素を利用する ATP 産生の結果、必然的に活性酸素種を副産物として発生することが知られている。この活性酸素種は、遊離鉄の共存により Fenton 反応を介して反応性の高いヒドロキシラジカルを発生させ、Mt 内部の脂質、蛋白質、DNA などに損傷を与えることが示されている。実際に Mt に鉄蓄積が認められる中枢神経系の疾患がいくつか報告されており、Mt における鉄蓄積と Mt 機能低下との因果関係が注目されている。ATM1 は *S.cerevisiae* の Mt に存在する ABC (ATP-binding cassette) 蛋白で、鉄代謝に関与することが報告されている。ABC 蛋白は種をこえて保存されているものが多く、その機能異常は多くの疾患や薬剤耐性などを引き起こすことから臨床的にも注目されている。そこで今回我々は ATM1 に着目し、そのヒトホモログ cDNA および遺伝子の単離と機能解析を行った。得られた ATM1 のヒトホモログを MTABC3 と命名した。MTABC3 は half type ABC 蛋白であり、Mt に局在すること、*S.cerevisiae* において ATM1 の機能を相補することから鉄代謝に関与していると考えられること、ヒト MTABC3 遺伝子は全長約 11kb で 19 個のエクソンを含み第 2 染色体 q36 に位置すること明らかにした。ATM1 遺伝子の異常は Mt 機能異常を惹起して糖尿病の発症に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

インスリン分泌と深い関連を有するエネルギー産生小器官である Mt の ABC 蛋白遺伝子の単離と機能解析を行うことを目的とする。

B. 研究方法

1. Mt 内膜に存在し、鉄代謝に関与していることが既に示されている *S.cerevisiae* の ATM1 遺伝子の塩基配列をもとにヒト EST database を検索し、類似性の高い EST45597 (肝臓由来) を得た。この EST45597 の塩基配列をもとに probe を作成し、ヒト肝臓 cDNA library をスクリーニングした結果、新規の ABC 蛋白をコードする cDNA を単離した。MTABC3 の組織発現はノザン法により検討した。MTABC3 の細胞内局在を明らかにする目的で 1. CHO cell に FLAG-tag を付加した MTABC3 cDNA を安定発現させた細胞株を樹立し、この細胞株を用いて細胞分画を調整し Immunoblot 法で検討した。2. Confocal laser microscopy による解析を行った。MTABC3 の機能は、ATM1 と同様の機能を持つ可能性が高いと考えられたため、ATM1 機能の部分欠損株

である *atm1-1 mutant cell* に対してヒト MTABC3 を形質導入することでその機能が代償されるか否かによって推測した。さらに ABC 蛋白の機能障害は種々の疾患の原因となることが明らかとなっており、MTABC3 遺伝子は糖尿病と関連している可能性がある。そこでヒト MTABC3 遺伝子の構造を決定するために、ヒト genomic library のスクリーニングを行い、エクソン-イントロン構造を決定した。さらに、ヒト MTABC3 遺伝子の染色体上の局在を FISH 法及び Radiation Hybrid mapping を用いて決定した。

2. 本研究には、材料として商業ベースで得られるヒト DNA ライブラリーを使用しているが、それ以外のヒト材料および実験動物は用いていない。従って倫理面への配慮は特に必要ないと判断する。

C. 研究結果

MTABC3 は 842 個のアミノ酸で構成され、N 端側に 8 個の膜貫通部からなる膜貫通領域と C 端側に 1 つの NBF を有することからいわゆる half type の ABC 蛋白であることを明らかにした。MTABC3

mRNA は検討した全ての組織、細胞株に発現を認め、MTABC3 の細胞内局在は、Immunoblot 法で Mt 蛋白のマーカである cytochrome coxydase subunit IV と一致した。さらに、Confocal laser microscopy を用いた検討においても、Mt 蛋白のマーカである MitoTracker Red CMXRos と完全に一致し、Mt に存在することが確認された。*S.cerevisiae* ATM1 機能の部分欠損株である YM13-1c(atm1-1 mutant cell) は、YPD medium で culture すると Mt への鉄蓄積、Mt DNA の損傷、Mt 呼吸能の消失が生じることが報告されている。同細胞株に MTABC3 を形質導入することでこれらの形質は代償され、MTABC3 は、ATM1 同様に鉄代謝に関与していることを明らかにした。ヒト MTABC3 遺伝子は全長約 11kb で 19 個のエクソンと 18 個のイントロンにより構成されていること明らかにし、各エクソン-イントロン境界の塩基配列を決定した。さらにヒト MTABC3 遺伝子は FISH 法で第 2 染色体 q36 に、Radiation Hybridization 法で D2S1297 と SHGC-32531 の間に存在することを明らかにした。

#### D. 考察

Mt 機能異常や Mt 遺伝子異常は糖尿病の原因となることが報告されている。MTABC3 は Mt に存在するヒトの新規 ABC 蛋白であり、MTABC3 の機能異常は Mt への鉄蓄積とそれに伴う酸化ストレスを引き起こし Mt DNA の損傷とその機能障害を生じることが示した。したがって MTABC3 の機能障害は、ATP 産生の低下とそれによるインスリン分泌障害が生じる可能性が示唆された。今後糖尿病患者において遺伝子変異の有無を検索する予定である。MTABC3 は half type の ABC transporter でありヘテロ複合体として機能する可能性が高いと考えられるが、そのパートナーとなる分子の同定、MTABC3 の ATP や ADP 結合特性、リン酸化による活性調節機構等についても現在検討中である。

#### E. 結論

新規ヒトミトコンドリア ABC 蛋白である MTABC3 を単離し、同蛋白が鉄代謝に関与しさらに糖尿病の一因であるミトコンドリア DNA の損傷およびミトコンドリア機能の障害に関連している可能性を示唆した。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1. Mitsuhashi, N., Miki, T., Senbongi, H., Yokoi, N., Yano, H., Miyazaki, M., Nakajima, N., Iwanaga, T.,

Yokoyama, Y., Shibata, T. and Seino, S. MTABC3, a novel mitochondrial ABC protein involved in iron homeostasis. *J. Biol. Chem.* (in press)

2. Nishimura, M., Miki, T., Yashima, R., Yokoi, N., Sato, Y. and Seino, S. Angiopoietin-3, a novel member of the angiopoietin family. *FEBS lett.* 448:254-256, 1999

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）  
分担研究報告書

代謝疾患関連遺伝子変異と自律神経活動の関連について

分担研究者 清野 裕 京都大学大学院医学研究科臨床生体統御医学講座教授

研究要旨

$\beta 3$  アドレナリン受容体 ( $\beta 3AR$ ) 変異(Trp64Arg)および脱共役蛋白 (UCP1) 変異(AtoG-3826)と自律神経活動との関連について検討した。(1)男子大学生 290 名 (18 歳~22 歳) を対象とした。(2)遺伝子変異を PCR-RFLP 法にて検索した。(3)自律神経機能の評価には、心拍変動パワースペクトル解析を用いた。Trp64Arg の頻度は 13%、AtoG-3826 の頻度は 47%であった。 $\beta 3AR$  変異保有群で自律神経活動全般を反映する TOTAL が安静時に有意に低下した。さらに $\beta 3AR$  変異保有群を UCP1 遺伝子変異により分類したところ、ホモ変異群でのみ、熱産生との関連が強い VLO が有意に低下した。 $\beta 3AR$  遺伝子正常群ではすべての指標で差は認めなかった。以上のことより $\beta 3AR$  変異と UCP1 変異は相加的に交感神経活動を介して肥満を惹起する可能性が示された。

A.研究目的

ヒトゲノム情報の集積や個体レベルでの遺伝子検索システムの進歩により、糖尿病や肥満症などの代謝疾患についても多くの遺伝子異常や多型が報告されている。さらに近年自律神経活動と代謝レベルが密接に関連しており、交感神経活動の機能障害を介してエネルギー消費能力の低下が発生し、その結果糖尿病や肥満症を惹起するとの説が提唱されている。現時点においては、それぞれの遺伝子多型が代謝疾患へ及ぼす影響の強度やこれらの相互作用について具体的に定量化した研究は非常に少ない。そこで現在代謝疾患を有さない若年健常者を対象に、自律神経活動を定量的に解析するシステムである心拍変動パワースペクトル解析法を用いて、比較的日本人に多い 2 種の遺伝子多型である、 $\beta 3$  アドレナリン受容体 ( $\beta 3AR$ ) 変異(Trp64Arg)および脱共役蛋白 (UCP1) 変異(AtoG-3826)と自律神経活動レベルの関連を検討する。

B.研究方法

- (1) 早期の異常を把握するため男子大学生 290 名 (18 歳~22 歳、現在特に疾病を有さないもの) を対象に採血を行い血糖、血漿 IRI の測定および白血球ゲノム DNA の分離をおこなった。また身長、体重の測定および糖尿病、肥満の家族歴を調査した。
- (2)  $\beta 3AR$  遺伝子変異(Trp64Arg)を制限酵素 MvaI、UCP1 遺伝子変異(AtoG-3826)を制限酵素 BclI を用いた PCR-RFLP 法にて検索した。

- (3) 自律神経活動の評価には、安静臥位時および起立時の心電図各 (10 分間) をモニターし、心拍変動パワースペクトル解析を行い以下の指標を検討した (0.007-0.035Hz:VLO、0.035-0.150Hz:LO、0.150-0.500Hz:HI、0.007-0.500Hz:TOTAL、VLO+LO/HI:SNS index、HI/TOTAL:PNS index)。

(倫理面への配慮)

本研究の研究対象者は、本学学生を中心とした約 300 名の健常ボランティア (18~24 歳) であり、研究内容、方法および得られた情報は、代謝疾患関連の研究のみに使用し、他施設へのサンプルの譲渡は本人の承諾無しには行わないこと、結果の発表に際し個人の特定期間内には行わないこと、研究の終了後には廃棄することを説明し、承諾書に署名の後に採血、心電図のサンプリング等を行った。本研究においては、5ml 程度の採血、身長、体重、心電図の測定と肥満、糖尿病の家族歴のみであり、危険を伴わない方法のみを使用している。

C.研究結果

Trp64Arg アリルの出現頻度は 13%、AtoG-3826 アリルの出現頻度は 47%であった。各遺伝子変異と血糖、血漿 IRI 値、身長、体重および糖尿病、肥満の家族歴の保有頻度に有意な差を認めなかった。しかし、心拍変動パワースペクトル解析では $\beta 3AR$  遺伝子変異保有群で自律神経活動全般を反映する TOTAL が安静時に有意に低下し(1354.9  $\pm$

185.2 vs 2520.0 ± 426.0 ms<sup>2</sup>) 起立によりその低下が解消することが認められた。さらにβ3AR 遺伝子変異保有群において UCP1 遺伝子変異により分類したところ、UCP1 ホモ変異群では野生型に比して、特異的に熱産生と関連していると報告されている VLO が有意に低下していた (180.0±18.7 vs 478.6 ± 85.5 ms<sup>2</sup>)。正常群では起立にともない交感神経活動の指標である SNS がホモ変異群に対し有意に高値を示し (25.4 ± 2.98 vs 8.92 ± 3.84)、副交感神経活動の指標である PNS が有意に低値を示した (0.04±0.01vs 0.18±0.07)。

#### D. 考察

β3AR 遺伝子変異は単独で安静時の自律神経活動低下の原因となりうること、β3AR 遺伝子変異に UCP1 遺伝子変異が加わった場合には安静時および起立時の自律神経活動が低下することが明らかになった。

#### E. 結論

β3AR 遺伝子変異と UCP1 遺伝子変異は多因子の一環として自律神経活動を低下させ肥満を惹起する可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

N. Shihara, Y. Seino et. Al. : The association between Trp64Arg polymorphism of the β3-adrenergic receptor and autonomic nervous activity. J. Clin. Endocrinol. Metab. 84(5): 1623-1627 1999

##### 2. 学会発表

なし

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）  
分担研究報告書

Hepatocyte nuclear factor (HNF)-3 $\beta$ 遺伝子のクローニングと  
糖尿病患者の遺伝子スクリーニングによる変異の同定

分担研究者： 武田 純 群馬大学生体調節研究所 教授

5種類の既知の MODY (MODY1-5) は HNF カスケードの転写または標的因子をコードする。これらの原因遺伝子はさらに上流の因子 HNF-3 $\beta$ によって転写調節されるので、HNF-3 $\beta$ 遺伝子は重要な糖尿病候補遺伝子である。本研究では、HNF-3 $\beta$ cDNA と同遺伝子のクローニングおよび2型糖尿病患者を対象として遺伝子スクリーニングを行なった。その結果、MODY 症例と成人発症例においてそれぞれ1種類と2種類のミスセンス変異を同定した。さらに、第1イントロンにおいてマイクロサテライトを見出したので、これを用いて糖尿病発症との関連解析を行なった。

#### A. 研究目的

MODY (maturity-onset diabetes of the young) は常染色体優性遺伝の若年発症2型糖尿病である。やせ型でインスリン分泌不全を一義的病態とするので、MODY は日本人糖尿病の遺伝素因の解明のための魅力的なモデル疾患である。現在までに5種類の原因遺伝子が同定されているが、これらはすべて HNF (hepatocyte nuclear factor) 転写調節カスケードに属する因子をコードしていた。MODY の臨床像は一般の成人2型糖尿病と類似するので、未知の MODY 遺伝子のみならず主たる2型糖尿病遺伝子もこのカスケードに属する可能性が強く示唆された。そこで本研究では、既知 MODY 遺伝子上流転写調節因子であるヒト HNF-3 $\beta$  の cDNA クローニングと同遺伝子の2型糖尿病発症における分子遺伝学的解析を試みた。

#### B. 研究方法

##### (1) cDNA と遺伝子のクローニング

マウス cDNA 配列を用いて dbEST をスクリーニングして対応するヒト EST を得た。この EST をプローブとしてヒト cDNA および PAC ゲノムライブラリーをスクリーニングし、得られた DNA クローンを直接シーケンスすることによって一次構造を決定した。染色体マッピングは、Stanford G3 パネルを用いて RH マッピングを行なった。

##### (2) 患者遺伝子の変異スクリーニングとタイピング

45人の MODY 症例と112人の成人発症の2型糖尿病症例を対象とした。96人の非糖尿病患者をコントロールとした。これらの症例とコン

トロール者には研究の目的を説明し、DNA 抽出の承諾を得たもののみを採用している。第1イントロンのマイクロサテライトを用いて、糖尿病患者とコントロールを PCR 遺伝子タイピングし、糖尿病発症との関連解析を行なった。

##### (3) 変異蛋白の機能解析

成人2型糖尿病症例で見い出された2種類のミスセンス変異を野生型に導入し、発現ベクターにサブクローンしたのちルシフェラーゼレポーターアッセイに供した。アッセイには、HeLa 細胞と HNF-3 $\beta$  結合部位を有する transthyretin (TTR) と HNF-1 $\alpha$  遺伝子プロモーターおよび結合コンセンサス配列を TK プロモーターに連結したものをを用いた。

#### C. 研究結果

##### (1) ヒト HNF-3 $\beta$ cDNA と遺伝子

1,959 bp の HNF-3 $\beta$ cDNA を単離した。この cDNA は 475 アミノ酸残基からなる蛋白をコードし、ラット、マウス、カエル、ゼブラフィッシュとそれぞれ 96.4%, 97.8%, 74.4%, 67.6% の配列の一致をみた。HNF-3 $\beta$  遺伝子は 4.5 kb の長さであり、2つのエクソンから構成された。

##### (2) マイクロサテライトと遺伝子タイピング

第1イントロンには (TCC) $n$  のマイクロサテライトが存在し、64人のタイピングの結果、日本人における heterozygosity は 0.61 であった。このマーカーを用いて糖尿病患者とコントロールを遺伝子タイピングし、疾患発症との関連解析を行なった。10 アリルを認めたが、どのアリルも有意の関連を示さなかった。

##### (3) 若年発症と成人発症の2型糖尿病症例の直接

## 遺伝子スクリーニング

68 人の MODY 症例のスクリーニングの結果、1 種類のミスセンス変異 (A328V) とアミノ酸の置換を伴わない 3 種類の多型性 (Ala-97, Gly-279, Gln-396) を認めた。A328V は 96 人のコントロールでは認められなかったが、家族のタイピングと臨床所見の収集ができなかったため、その意義は不明である。3 種類の多型性に関しては、コントロールとの間に出現頻度に有意差は認めなかった。

一方、成人発症型のスクリーニングでは、上記の多型性に加えて 2 種類のミスセンス変異 (A86T, G114E) を同定した。両変異共にコントロール群で認められなかったため、疾患発症に何らかの働きをしているものと推定された。特に、A86T は 2 症例において見い出され、各々の家族内において疾患発症の表現型と一致する。A-86 は転写活性ドメインに位置し、主を超えて保存されている残基である。

### (4) 変異蛋白の機能解析

G114E と A86T の 2 種類の変異を HeLa 細胞に発現させ、TK、HNF-1 $\alpha$  と TTR プロモーターの調節能をルシフェラーゼアッセイを用いて検討した。G114E 変異は野生型と有意の差異を示さなかった。一方、A86T 変異はいずれのプロモーターにおいても野生型に比して有意の機能低下を示したので、疾患発症に關与する可能性が示唆された。

## D. 考察

HNF-3 $\beta$  は HNF カスケードの上流に位置する転写因子であるので、糖尿病遺伝子の有力な候補である。今回のヒト HNF-3 $\beta$  のクローニング、遺伝子タイピングによる関連解析および遺伝子直接スクリーニングの結果、HNF-3 $\beta$  変異は日本人の若年発症と成人発症の両タイプの主たる成因である可能性は低いと結論された。しかし、MODY のタイプ別頻度は日本人と欧米人では大きく異なるので、欧米人 MODY における同様の検討は重要であろう。さらに成人型では、最近フィンランド人についての罹患同胞対解析の結果 HNF-3 $\beta$  の遺伝子座位において有意の連鎖が認められているので、本研究では成人発症型についても同様に遺伝子の直接解析を施行した。その結果、2 種類のミスセンス変異を同定した。特に、A86T は家系調査と機能解析により疾患発症との関連が強く示唆された。しかし、日本人におけるその出現頻度は低い。さらに解析症例数を増やすことによって特異的な病態を探ることが重要であろう。その結果、HNF-3 $\beta$

のインスリン合成・分泌における意義の理解を深めることができよう。さらに、ここから得られる知見は、HNF カスケードに關連する新たな候補遺伝子の獲得にも有用である。

## E. 結論

HNF-3 $\beta$  における A86T 変異は日本人の 2 型糖尿病において、低頻度の原因遺伝子である可能性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

S. Yamada, Q. Zhu, Y. Aihara, H. Onda, Z. Zhang, L. Yu, L. Jin, Y-J. Si, H. Nishigori, H. Tomura, I. Inoue, A. Morikawa, K. Yamagata, T. Hanafusa, Y. Matsuzawa and J. Takeda.

Cloning of cDNA and the gene encoding human hepatocyte nuclear factor (HNF)-3 $\beta$  and mutation screening in Japanese subjects with maturity-onset diabetes of the young.

Diabetologia 43: 121-124, 2000.

Yang, Q., Yamagata, K., Yamamoto, K., Miyagawa, J., Takeda, J., Iwasaki, N., Iwahashi, H., Yoshiuchi, I., Namba, M., Miyazaki, J., Hanafusa, T. and Matsuzawa, Y.

Structure/function studies of hepatocyte nuclear factor-1 $\alpha$ , a diabetes-associated transcription factor.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 266: 196-202, 1999.

Q. Zhu, K. Yamagata, L. Yu, H. Tomura, S. Yamada, Q. Yang, Y. Tsukahara, I. Yoshiuchi, M. Moriwaki, K. Okita, W. Liu, S. Sumi, M. Namba, J. Miyagawa, J. Takeda, T. Hanafusa and Y. Matsuzawa.

Identification of missense mutations in the hepatocyte nuclear factor-3 $\beta$  gene in Japanese subjects with late-onset type 2 diabetes mellitus.

submitted.

武田 純 (1999)

HNF 異常型糖尿病

医学のあゆみ 188: 419-422

武田 純 (1999)

遺伝子異常と糖尿病

J. Jpn. Med. Sch. 66: 329-331

武田 純 (1999)

若年発症のインスリン非依存型糖尿病(MODY)の発症遺伝子

「Annual Review 内分泌、代謝 1999」

pp. 23-27, 中外医学社、東京

戸村秀明、武田 純 (1999)  
糖尿病発症における転写因子の役割  
組織培養工学 25: 28-31

西郡秀和、戸村秀明、武田 純 (2000)  
HNF 転写因子カスケードの異常による糖尿病、  
MODY3 と MODY5 の多様な臨床像を中心に  
内分泌糖尿病科 10: 161-167

G. 知的所有権の取得状況  
特記すべきものなし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）  
分担研究報告書

HNF 異常型糖尿病の確立とそれを基盤とした日本人糖尿病遺伝子の同定に関する大規模研究

研究者

花房俊昭 大阪大学大学院分子制御内科学  
山縣和也 大阪大学大学院分子制御内科学

研究要旨

変異体 HNF-1 $\alpha$ の残存転写活性が HNF-1 $\alpha$ 異常型糖尿病の病態に関与している可能性が示された。また、HNF-1 $\alpha$ の変異によるインスリン遺伝子の転写障害が HNF-1 $\alpha$ 異常型糖尿病におけるインスリン分泌不全に関与していると考えられた。

A. 研究目的

我々は、転写因子である hepatocyte nuclear factor-1  $\alpha$  (HNF-1 $\alpha$ ), HNF-1  $\beta$ , HNF-4  $\alpha$ の遺伝子異常が、インスリン分泌不全型糖尿病(MODY)の原因であることを明らかにし、「HNF 異常型糖尿病」という成因に基づいた新しい概念を提唱した。昨年度の研究結果により、膵 $\beta$ 細胞からのインスリン分泌不全が HNF 異常型糖尿病の本質であることを明らかにした。本年度においては、HNF-1 $\alpha$ 異常型糖尿病の病態・発症機構を更に明らかにする目的で以下の検討を行った。

B. 研究方法

- (1) 変異体 HNF1 $\alpha$  (L12H, G191D, R263C, P291fsinsC, P379fsdelCT, L584S585fsinsTC)の機能 (DNA 結合能・細胞内局在・転写因子活性)について膵 $\beta$ 細胞株(MIN6)を用いて解析し、病態との関連について検討した。
- (2) 正常 HNF-1  $\alpha$ 、HNF-1  $\beta$ および変異体 HNF-1  $\alpha$  (L12H, P291fsinsC, P379fsdelCTL および 584S585fsinsTC) cDNA をインスリンリポーター遺伝子と共に CHO細胞に遺伝子導入し、HNFによるインスリン遺伝子の転写活性を検討した。

C. 研究結果

- (1) 変異体 HNF-1  $\alpha$ の DNA 結合能、細胞内局在は種々の程度に障害されていたが、病態との関連は認められなかった。一方、20歳以前に発症し、経口血糖降下剤もしくはインスリンによる治療を受けていた患者で同定された HNF-1  $\alpha$ 変異体(L12H, P291fsinsC, P379fsdelCT およ

び L584S585fsinsTC)の転写因子活性は著明に減弱していたが、中高年で発症し、食事療法でコントロールされていた糖尿病患者で同定された G191D および R263C HNF-1  $\alpha$ 変異体の MIN6 細胞における転写活性はほぼ正常であった。

- (2) HNF-1  $\alpha$ および HNF-1 $\beta$ はインスリン遺伝子の転写を約 30 倍増加させた。一方、変異体 HNF1 $\alpha$  (L12H, P291fsinsC, P379fsdelCT および L584S585fsinsTC)によるインスリン遺伝子転写活性は減弱していた。

D. 考察

膵 $\beta$ 細胞における HNF-1 $\alpha$ の残存転写活性が、糖尿病の発症年齢や重症度と相関する可能性が示された。また、インスリン遺伝子が HNF-1 $\alpha$ および HNF-1 $\beta$ の標的遺伝子の一つである可能性が示され、HNF の変異によるインスリン遺伝子の発現低下が HNF-1 $\alpha$ 異常型糖尿病の発症に関与している可能性が示された。

E. 結論

HNF-1  $\alpha$ 変異体の残存転写因子活性が、HNF-1  $\alpha$ 異常型糖尿病の病態に重要であると考えられた。また、その発症機構の一部には、インスリン遺伝子の発現低下が関与していると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Okita K, Yang Q, Yamagata K, Hangenfeldt KA, Miyagawa J, Kajimoto Y, Nakajima H, Namba M, Wollheim CB, Hanafusa T, Matsuzawa Y: Human insulin gene is a target gene of hepatocyte nuclear

factor-1 $\alpha$  (HNF-1 $\alpha$ ) and HNF-1 $\beta$ . Biochem. Biophys. Res. Commun. 263: 566-569, 1999

- (2) Yang Q, Yamagata K, Yamamoto K, Miyagawa J, Takeda J, Iwasaki N, Iwahashi H, Yoshiuchi I, Namba M, Miyazaki J, Hanafusa T, Matsuzawa Y: Structure/function studies of hepatocyte nuclear factor-1 $\alpha$ , a diabetes-associated transcription factor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 266: 196-202, 1999

## 2. 学会発表

- (1) 第33回糖尿病学の進歩(1999.2.26-27, 富山) MODY の遺伝子解析とその病態: 山縣和也、松澤佑次
- (2) 第36回日本臨床分子医学会総会(1999.4.23-24, 福岡) HNF 異常と糖尿病: 山縣和也、楊勤、吉内一正、山本浩司、岩橋博見、朱倩、難波光義、宮川潤一郎、花房俊昭、松澤佑次
- (3) 第36回日本糖尿病学会近畿地方会(1999.11.13, 京都) 2型糖尿病の原因遺伝子— $\beta$ 細胞転写因子からのアプローチ: 山縣和也、吉内一正、朱倩、楊勤、花房俊昭、松澤佑次
- (4) 6<sup>th</sup> Japan-China friendship symposium on diabetes mellitus (1999.11.19-20) MODY-up to date: K.Yamagata, Y. Matsuzawa

## G. 知的所有権の取得状況

シカゴ大学の Graeme I. Bell により、HNF に関連する patent が米国において申請中である。

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業「糖尿病」）  
分担研究報告書

自然高血圧発症ラット(SHR)におけるインスリン抵抗性原因遺伝子座位の解析

分担研究者 山田 信博 筑波大学臨床医学系内科教授

研究要旨：4番と12番染色体上にあるSHRのインスリン抵抗性原因遺伝子座位に存在する候補遺伝子の検討と、SHRで特異的に発現量に変化を生じているcDNAのスクリーニングを行った。その結果、米国NIH由来のSHRでは4番染色体の当該領域に位置するCd36遺伝子に変異が同定されたが、インスリン抵抗性を呈する日本のオリジナルのSHR(SHR/Izm)には同様な異常は認められず、SHRには遺伝子型と表現型の面から多様性があることが判明した。

A. 研究目的

糖尿病や高血圧症などの生活習慣病の発症に深く関わる「インスリン抵抗性」の原因遺伝子の同定を目標として、そのモデル動物である高血圧自然発症ラット(SHR)を用いた研究を続けた。平成11年度は、先に4番および12番染色体上に同定したSHRのインスリン抵抗性原因遺伝子座位に位置する候補遺伝子とcDNAのスクリーニングを行った。

B. 研究方法

SHRとそのコントロールであるWKYラットの脂肪細胞よりmRNAを単離し、cDNA subtraction法によりSHRでその発現に特異的な変化を生じる多数の既知および新規cDNAをクローニングした。それらのcDNAクローンの染色体上での局在をradiation hybrid panelを用いて決定し、4番および12番染色体の当該領域に位置する遺伝子のcDNAの塩基配列を調べ、SHRとWKY間、およびSHRの各strain間で比較した。また、経静脈的糖負荷試験を行なった。(倫理面への配慮)実験動物への処置(麻酔・採血・組織採取・屠殺)に当っては、動物に与える苦痛を最小限に抑えるべく、英国のAnimals Act 1986に準拠したHandbook of Laboratory Animal Management and Welfare (Oxford University Press 1994)に従って行われた。

C. 研究結果

SHRで特異的に発現に変化を生じているmRNAを上記方法にてスクリーニングし、800以上の独立したcDNAクローンが得られ、そのうち約60%が新規のクローンであった。Northern blot法による解析の結果、120のクローンに関して発現量の差異が確認できた。それらの内、既知のも

のとしては、stearoyl-CoA desaturase、fibronectin、Cd36/FATなどのcDNA断片を含む52クローンが得られ、新規のクローンとして68クローンが得られた。

Radiation hybrid mappingの結果、4番染色体の当該領域にはインターロイキン6(IL-6)、内皮由来一酸化窒素合成酵素(eNOS)、L型カルシウムチャンネル(Cchl-2a)、脂肪酸輸送担体(Cd36)遺伝子が、また12番染色体の当該領域には、インスリン受容体(INS-R)、インスリン受容体基質-3(IRS-3)遺伝子の局在が明らかとなった。Cd36遺伝子を除き、SHRとWKYラット間でcDNAの塩基配列に有意な差異は認められなかった。

Cd36遺伝子は、4番染色体の当該領域近傍に位置し、そのmRNAの発現量がCharles River社由来のSHRでは特異的に低下していることより、当初は原因遺伝子の有力な候補と考えられた。実際に、このSHR strainのCd36遺伝子にはmRNAのスプライシング異常につながる大きな欠失変異も認められた。しかし、Charles River社由来のSHRと同等、あるいはむしろより強いインスリン抵抗性を呈する日本のオリジナルのSHR strain(SHR/Izm)にはCd36遺伝子変異は認められず、4番染色体の当該領域の詳細な比較により、本変異は米国に供与されたSHRがNIHでの繁殖中に自然発生的に生じた欠失変異であり、SHRに見られるインスリン抵抗性の主要な原因ではないものと結論された。

糖負荷試験によるSHR/IzmとCharles River社由来のSHR(SHR/NCrj)との比較では、前者ではインスリン分泌不全による顕著な糖尿病パターンが特徴的であった。

染色体の局在の上から4番と12番染色体のインスリン抵抗性のQTLの原因とは明らかに異なる

るが、SHR で他に報告されている高血圧などの QTL 領域に位置する複数の新規 cDNA クローンが得られている。

#### D. 考察

世界的に現在、糖尿病や高血圧症などの多因子性疾患の原因遺伝子の解明が大きな課題となっており、またインスリン抵抗性の亢進がこれらの疾患発症とその結果生ずる虚血性心疾患発症への関与で特に危険因子重複症候群として注目されている。しかし現在迄の所、所謂 candidate gene approach を用いたこれらの多因子性疾患の原因遺伝子の探索は成功しておらず、新たな手法の導入が必要とされている。われわれは、QTL 解析により SHR の脂肪細胞におけるインスリン抵抗性の QTL を 4 番および 12 番染色体上に同定し、その後 cDNA subtraction と radiation hybrid mapping を中心とした解析により、Cd36 遺伝子が 4 番染色体 QTL の有力な原因候補遺伝子として浮上した。しかし、Cd36 遺伝子変異をもつ SHR/NCrj は変異をもたない SHR/Izm よりもむしろ糖の取り込みは有意に亢進し、血中インスリン値も低い傾向が見られ、この Cd36 遺伝子変異は SHR に見られるインスリン抵抗性の主要な原因ではないものと考えられた。恐らくは、4 番染色体の Cd36 遺伝子の近傍に SHR/NCrj と SHR/Izm に共通な別の原因遺伝子が存在していることが予想された。

糖負荷試験による結果では、Cd36 遺伝子変異をもつ SHR/NCrj は変異をもたない SHR/Izm よりも有意なインスリンの過分泌反応を示し、その差異は SHR/NCrj と SHR/Izm 間の遺伝的差異に起因するものと考えられる。Cd36 遺伝子変異はその有力な候補の一つであり、SHR/Izm と SHR/NCrj の交配に由来する F2 を対象とした QTL 解析を行うことにより、そのインスリン分泌過剰（あるいは不全）の原因遺伝子座位の特定が可能と考えられた。

他に報告されている QTL 領域に位置する幾つかの新規 cDNA クローンが得られているが、4 番と 12 番染色体の SHR のインスリン抵抗性の QTL 領域には、残念ながらまだ有力な新規 cDNA クローンは同定されていない。cDNA subtraction 法に代えて、現在 Gene chip を用いた大規模な発現 mRNA スクリーニングを行ってスピードアップをはかっている。

#### E. 結論

SHR には strain 間において、遺伝的にも表現型の上からも多様性が存在することが判明した。SHR の各 strain に共通して見られるインスリン抵

抗性の原因遺伝子の単離・同定には、各 strain に共通した遺伝子変異の探索が必要である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. T Gotoda, Y Iizuka, N Kato, J Osuga, M Bihoreau, T Murakami, Y Yamori, H Shimano, S Ishibashi, N Yamada. Absence of Cd36 mutation in the original spontaneously hypertensive rats with insulin resistance. *Nature Genet.* 22: 226-228, 1999.
2. R Tozawa, S Ishibashi, J Osuga, H Yagyu, T Oka, Z Chen, K Ohashi, S Perrey, F Shionoiri, N Yahagi, K Harada, T Gotoda, Y Yazaki, N Yamada. Embryonic lethality and defective neural tube closure in mice lacking squalene synthase. *J. Biol. Chem.* 274: 30843-30848, 1999.
3. H Shimano, N Yahagi, M Amemiya, AH Hasty, J Osuga, Y Tamura, F Shionoiri, Y Iizuka, K Ohashi, K Harada, T Gotoda, S Ishibashi, N Yamada. Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *J. Biol. Chem.* 274: 35832-35839, 1999.
4. T Gotoda, Y Iizuka, N Yamada. Genetic analysis of spontaneously hypertensive rats (SHR), an animal model of hypertension and insulin resistance. In *Common Disease - Genetic and Pathogenetic Aspects of Multifactorial Diseases* (H Imura, M Kasuga, K Nakao eds), Excerpta Medica, Elsevier, pp219-226, 1999.

##### 2. 学会発表

後藤田貴也、飯塚陽子、山田信博. Genetic analysis of spontaneously hypertensive rats (SHR), an animal model of hypertension and insulin resistance. 上原記念財団シンポジウム (Symposium on Common Disease) (東京、1999年7月) で発表。

#### G. 知的所有権の取得状況

なし