

200400054A

厚生労働科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

カルパイン 10 関連分子を用いた 2 型糖尿病遺伝子診断法と
新規治療法の開発に関する研究

平成 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 堀川 幸男

平成 17 年 (2005) 年 4 月

厚生労働科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

カルパイン 10 関連分子を用いた 2 型糖尿病遺伝子診断法と
新規治療法の開発に関する研究

平成 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 堀川 幸男

平成 17 年 (2005) 年 4 月

目次

I. 総括研究報告	-----	1
カルパイン 10 関連分子を用いた 2 型糖尿病遺伝子診断法と 新規治療法の開発に関する研究		
堀川 幸男		
II. 分担研究報告	-----	7
カルパイン 10 関連分子同定とその生理作用の解析		
夏目 徹		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	12
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	15

【1】 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総括研究報告書

カルパイン 10 関連分子を用いた 2 型糖尿病遺伝子診断法と新規治療法の開発に関する研究

主任研究者 堀川 幸男

群馬大学生体調節研究所助教授

研究要旨

2 型糖尿病遺伝子（カルパイン 10）の糖尿病病態における役割を明らかにすると共に、相互関連蛋白を同定し、治療精度を上げたり新薬開発のための貴重な分子標的を獲得する。本研究で獲得される相互関連分子の大量マーカーを獲得し、蛋白レベルで証明されている相互作用を遺伝子レベルに還元し感度の高い糖尿病感受性診断ツールも開発する。

分担研究者

夏目 徹

独立行政法人 産業技術総合研究所
生物情報解析研究センター
機能ゲノムグループ
タンパク質ネットワーク解析
チームリーダー

ID3424 はプロテアーゼの一種でありその異常はマウスで 2 型糖尿病を発症させることが報告されている。我々は、既にカルパイン発現調節薬が糖尿病治療において有効である可能性を細胞レベルで示している（特許：60/134,175）、ID3424 の既知の阻害剤や、この新規に発見されたタンパク質間の相互作用を促進又は抑制することにより、2 型糖尿病の根源的な予防剤、或いはより精度の高い治療剤を提供できる可能性を考えている。またこの相互作用を利用することにより、2 型糖尿病の新規予防剤・治療剤のスクリーニング方法も提供することができる。さらに本研究で獲得されるカルパイン 10 関連分子の大量マーカーを獲得し、蛋白レベルで証明されている相互作用を遺伝子レベルに還元し糖尿病感受性診断ツールを開発することにより、糖尿病病態におけるマルチプルヒット理論を実証し、複数の疾患感受性ハプロタイプをパネル化して、実際に診断キットを開発し実用化することが可能となる。

A. 研究目的

我が国の糖尿病患者数は 740 万人に達しておりそのほとんどを占める 2 型糖尿病の責任遺伝子を同定し、分子レベルで成因解明に取り組むことは、高齢化社会を迎えつつある我が国において急務である。申請者は、世界で初めて 2 型糖尿病遺伝子（NIDDM1）を発見することに成功した。病態が単純な遺伝様式を示さないこと、環境因子が関与すること、さらにカルパイン 10 が多くの組織で発現するプロセシング蛋白であることを考えると、標的基質や周辺因子が共役グループとして糖尿病発症に働くと考えカルパイン 10 関連分子を先ず包括的に網羅し、このプールから有力候補分子の選別を試み、現在まで 6 種類（ID 0514, 1312, 1337, 1345, 3424, 7705）の有力関連候補分子を獲得した。

B. 研究方法

1. カルパイン 10 の制御機構の解明と周辺関連分子の同定

カルパイン 10 の膵島特異的基質同定と、周辺関連分子を網羅すべくカルパイン 10 過剰発現単離膵島を我々独自の膵島マイクロアレイにて比較する。また得られた関連分子の発現変化を、反対にカルパイン siRNA を用いてカルパイン 10 の発現を低下させた細胞株で再検定する。以上の過程で得られた各々の関連分子は逐次インスリン産生細胞 (MIN6) で発現させて、そのグルコース応答性のインスリン分泌に及ぼす調節効果を解析する。

カルパイン 10 異常型実験動物の解析

申請者らは、カルパイン 10 欠損マウスの作成に成功しており、カルパイン 10 過剰マウスと欠損マウスを互いに種々の組み合わせで交配させ、種々の「カルパイン 10 異常型動物」を作成している。これらの動物について上記の過程で得られた「カルパイン 10 関連遺伝子グループ」と表現型の関連、および環境因子に対する応答性を検討する。

iSNP マーカーと表現型の関連解析

カルパイン異常型動物で観察された表現型を中心に、マイクロアレイで獲得した遺伝子マーカーとの関連解析を行う。ヒトゲノム計画は終了しているので、データベースサーチにより対応するヒト遺伝子を獲得し iSNP スクリーニングを行う。NIDDM1 遺伝子座の解析知見を参考として、イントロン領域を中心に検出感度の高い iSNP 収集を実施する。種々の複合 iSNP セットを LD ブロックにもとづいて迅速に構築し、デジタル化された表現型との関連を数理統計学的に処理し、カルパイン 10 関連病態の危険度を判定する高感度 iSNP ハプロタイプ診断ツールの開発を試みる。

倫理面への配慮

全ての実験はヘルシンキ宣言と3省庁合同指針を遵守して行われる。計画そのものは「群馬大学医学部ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理審査委員会」の承認を得て、DNA 試料、提供者の個人情報、臨床成績がそれぞれ番号化され連結可能匿名化の状態で保存されている。個人情報は研究に直接関わらない守秘義務を負う識別管理者が保有する。連結匿名化サンプルはプレート番号のみで表されるので2重匿名化となり、被験者のプライバシーは完全に保護される。

C. 研究結果

生活習慣病の代表格である2型糖尿病の責任遺伝子を同定し、分子レベルで成因解明に取り組むことは、高齢化社会を迎えつつある我が国において、大きな社会的ニーズであり医療経済上重要な意義を持つ。申請者は世界で初めて2型糖尿病遺伝子 (NIDDM1) を発見することに成功した。さらにカルパイン10 (NIDDM1) を微量サンプル用マイクロ流路を備えたナノスケール質量分析器に供することにより、ID3424などの有力候補関連分子を獲得している。ID3424はプロテアーゼの一種でありその異常はマウスで2型糖尿病を発症させることが報告されている。

先ずカルパイン 10 と ID3424 を脂肪細胞株に共発現させ局在を決定し、糖輸送体である GLUT4 と共局在していることを明らかにした。またカルパイン 10 の N 末端と ID3424 の C 末端が互いに結合することを明らかにした。そして IDE の部分領域 (デコイ) を培養細胞系に発現させ、GLUT4 膜移動が消失することも明らかにした。従ってカルパイン 10 或いは

ID3424 の過剰発現が糖尿病治療に有効である可能性を考え既にアデノウイルス系を立ち上げており、種々の糖尿病モデル動物に過剰発現させ、カルパイン 10 と ID3424 の制御関係、治療効果並びに周辺分子の網羅を進めている。さらにこの ID3424 のプロモーター部位を精査し、若年発症型糖尿病の原因遺伝子である転写因子が、特異的に ID3424 の発現レベルをあげ糖尿病治療の一つの標的分子であることも明らかにした。本年度はこのレポーターシステムを利用することにより、2 型糖尿病の新規予防剤・治療剤のスクリーニングも展開していく。

申請者は膵β細胞にカルパイン 10 を約 100 倍過剰発現しているトランスジェニックマウスを作成した。興味深いことにこのマウスは若年時の体重増加は正常マウスより大きいが、脂肪食負荷、あるいは老年時の体重増加は正常マウスより低値を示した。前年度申請者が報告したカルパイン 10 が脂肪酸負荷によるアポトーシスを促進している事実と合わせるとカルパイン 10 過剰発現マウス単離膵島では初期にはインスリン分泌が亢進しており体重増加過多を呈するが、脂肪食負荷あるいは老化によりアポトーシスが促進され最終的にインスリン分泌が正常マウスより低下するため体重増加減少を呈すると考えられた。

また遺伝子多型を用いた詳細な連鎖不平衡解析を展開し日本人特異の変異 (P200T) や糖尿病関連ハプロタイプ (1-2-1) を同定するなど、診断キット・新規治療薬開発のプラットフォームを確立しつつある。

D. 考察

昨年度はカルパイン 10 の発現抑制 RNA や、カルパイン 10 と ID3424 の相互結合部位をデ

コイとして培養細胞系に使用し、糖取り込みの低下が生じることを明らかにした。従ってカルパイン 10 と ID3424 の過剰発現が糖尿病治療に有効である可能性を考え既にアデノウイルス系を立ち上げているが、種々の糖尿病モデル動物に過剰発現させカルパイン 10 の制御関係並びに周辺分子の網羅を進めていく。さらにこの ID3424 のプロモーター部位を精査したところ、若年発症型糖尿病の原因遺伝子である転写因子が特異的に ID3424 の発現レベルをあげており、糖尿病治療の一つの分子標的であることも明らかとなった。今後このレポーターシステムを種々のライブラリースクリーニングに利用することにより、2 型糖尿病の新規予防剤・治療剤を獲得していく。先ず遺伝子治療への展開準備として GK ラット、肥満モデル動物 ob/ob マウスを用いて、カルパイン 10、ID3424 過剰発現によるインスリンクリアランスの是正による高インスリン血症の改善が耐糖能の改善にむすびつくかどうか、アデノウイルスの実験系を用いて解析を進めていく。

E. 結論

カルパイン10はインスリン分泌、作用両方に関与している事が細胞・個体レベルで実証された。ID3424 などの相互関連分子はその発現レベルの調節により新規分子標的になる可能性も示された。カルパイン10の他の関連分子の大量マーカーを獲得し、蛋白レベルで証明されている相互作用を遺伝子レベルに還元し感度の高い糖尿病感受性診断ツールも開発する本研究は糖尿病の遺伝子診断、新薬開発、さらには個人別医療をも視野に見据えた新規治療法の開発を可能にするものであることは疑いない。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Iwasaki N[†], Horikawa Y[†], Tsuchiya T[†], Kitamura Y, Nakamura T, Tanizawa Y, Oka Y, Hara K, Kadowaki T, Awata T, Honda M, Yamashita K, Oda N, Yu L, Yamada N, Ogata M, Kamatani N, Iwamoto Y, Hanis CL, del Bosque-Plata L, Hayes MG, Cox NJ, and Bell GI*

Genetic variants in the calpain-10 gene and the development of type2 diabetes in the Japanese population.

J Hum Genet 50: 92-98, 2005

Nishimura M, Miki T, Yokoi N, Horikawa Y, Yoshioka H, Takeda J, Ohara O, and Seino S*.

Construction of a multi-functional cDNA library specific for normal mouse pancreatic islets and its application to microarray

DNA Res 11: 315-323, 2004

Tanaka T, Horikawa Y*, Kawamoto T, Kabe N, Takeda J and Mikuni M.

Expression profile of mRNAs from rat hippocampus and it's application to microarray

Mol Brain Res 129: 20-32, 2004

Kawamoto T, Horikawa Y*, Tanaka T, Kabe N, Takeda J, and Mikuni M.

Genetic variations in the WFS1 gene in Japanese with type 2 diabetes and bipolar disorder

Mol Genet Metab 82: 238-245, 2004

Shihara N, Horikawa Y*, Onishi T, Ono M,

Kashimada K and Takeda J.

Identification of a *de novo* case of hepatocyte nuclear factor-1b deficiency with highly varied phenotypes.

Diabetologia 47: 1128-29, 2004

Johnson JD, Han Z, Otani K, Zhang Y, Wu H, Horikawa Y, Misler S, Bell GI and Polonsky KS*.

RyR2 and calpain-10 delineate a novel apoptosis pathway in pancreatic islets

J Biol Chem 279: 24794-802, 2004

Otani K, Han DH, Ford EL, Garcia-Roves PM, Ye H, Horikawa Y, Bell GI, Holloszy JO and Polonsky KS*.

Calpain system regulates muscle mass and glucose transporter GLUT4 turnover.

J Biol Chem 279: 20915-20, 2004

2. 学会発表

山田教弘、堀川幸男、武田 純、岸 章治: 増殖糖尿病網膜症と2型糖尿病におけるHIF1A 遺伝子多型の関連解析
第10回日本糖尿病眼学会総会 2004年3月13日

堀川幸男、武田 純: 2型糖尿病感受性遺伝子同定の新規戦略法と展開
第47回日本糖尿病学会年次学術集会 2004年5月13日

山田教弘、堀川幸男、武田 純、岸 章治: 2型糖尿病患者を用いたHIF1A 遺伝子多型の同定と関連解析
第47回日本糖尿病眼学会総会 2004年5月14日

王虹、堀川 幸男、武田 純

ラット隣島特異的に発現する遺伝子の網羅的
同定

第 47 回日本糖尿病学会年次学術集会 2004 年
5 月 15 日

塩谷真由美、宗 友厚、堀川 幸男、武田 純；
ミネラルコルチコイド合成・作用機構の分子
遺伝学的解析第 4 報—MR および sgk 遺伝子多
型

第 27 回日本高血圧学会総会
2004 年 10 月 7 日

堀川幸男

2 型糖尿病関連遺伝子同定戦略の現状と展開
生体調節研究所シンポジウム「生活習慣病の
分子医学」2005 年 2 月

堀川幸男

糖尿病網膜症の遺伝素因の同定
第 11 回日本糖尿病眼学会総会 2005 年 3 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

【II】 分担研究報告

糖尿病関連遺伝子のタンパク質ネットワーク解析

分担研究者 夏目 徹 独立行政法人 産業技術総合研究所
生物情報解析研究センター 機能ゲノムグループ
タンパク質ネットワーク解析チームリーダー

研究要旨

2型糖尿病遺伝子（カルパイン10）の機能解析と糖尿病病態解明のため、糖尿病関連遺伝子のタンパク質相互作用解析を行う。糖尿病関連遺伝子の細胞内でのタンパク質ネットワークをプロテオミクスの手法により、網羅的に俯瞰し、糖尿病の発症メカニズムを解明すると共に創薬のための貴重な分子標的を獲得し、感度の高い糖尿病感受性診断ツールも開発する。

A. 研究目的

ポストゲノム研究の時代を迎え、リストアップされたこれら全遺伝子がどのように関わり合い、そして働くのかという機能解析が、今後の急務である。人間社会と同じように、タンパク質も「一人では何も出来ず」、複雑な生体システムの中において単独で機能し目的を果たすことは少ない。また卑近な例に喩えれば、身の回りのボールペンのようなシンプルな文具から携帯電話パソコンに至るまで、全て複数のパーツから成り立っており、単一の素材から出来上がった「道具」を見つけるのが極めて困難であるように、タンパク質も複合体、あるいはネットワークを形成している。本研究では、プロテオミクスの手法を用いて、糖尿病関連遺伝子のタンパク質ネットワーク解析を包括的に俯瞰し、疾患の発症メカニズムと新規治療法の開発・ドラッグターゲットの発見を目指す。

B. 研究方法

糖尿病関連遺伝子であるカルパイン10をbaitとして培養細胞に遺伝子導入し、カルパイン10と相互作用し複合体を形成するタンパク質を、質量分析により一網打尽的に同定する。同定された、タンパク質がカルパイン10と細胞内で今日局在をするか等の検証研究も行う。

C. 研究結果

カルパイン10をbaitとしてHek293細胞に導入し、カルパイン10と相互作用するタンパク質の同定を試みたところ、ID3424など、直接疾患と関連することが示唆されるタンパク質が同定された。ID3424はプロテアーゼの一種であり、その異常はマウスで2型糖尿病を発症させることが報告されている。またKOマウスでは血糖値が上昇することが既に報告されている。カルパイン10とID3424を脂肪細胞株に共発現させ局在を決定したところ、両者とも糖輸送体であるGLUT4と共局在していることを明らかにした。

D. 考察

カルpain 10は申請者により、世界で初めて2型糖尿病遺伝子 (NIDDM1) として発見された。カルpainファミリーは10数のメンバーから構成される、カルシウム依存的なプロテアーゼである。これまでアルツハイマー病、筋萎縮症の関連などが示され、その詳細な機能解析に世界中の研究施設がしのぎを削っている。しかし、カルpainファミリーはタンパク質として非常に取り扱いにくく、基質特異性、制御メカニズムなどのタンパク質レベルでの研究ははかばかしくない。カルpain 10においても、これが実際にタンパク質分解活性を有するか、あるいは基質が何であるかは全く分かっていなかった。今回の研究によって、カルpain 10の基質とその制御分子の有力な候補が見出された。

E. 結論

今回同定された、カルpain 10相互作用タンパク質により、カルpain 10の細胞内機能と糖尿病発症メカニズム解明の道が開かれた。新規治療法の開発と創薬の新規標的が得られる。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ①. Bannai, H., Fukatsu, K., Mizutani, A., Natsume, T., Iemura, S. I., Ikegami, T., Inoue, T., and Mikoshiba, K. (2004). An RNA-interacting protein, SYNCRIP (hnRNP Q1/NSAP1) is a component of mRNA granule transported with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 mRNA in neuronal dendrites. *J Biol Chem* 279, 53427-34.
- ②. Buijs, J., and Natsume, T. (2004).

Combination Surface Plasmon Resonance with Mass Spectrometry: Identifying Binding Partners and Characterizing Interactions. In *Purifying Proteins for Proteomics*, R. J. Simpson, ed. (New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 567-578.

- ③. Higo, T., Hattori, M., Nakamura, T., Natsume, T., Michikawa, T., and Mikoshiba, K. (2004). Subtype-specific and ER-luminal-environment-dependent Regulation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Type 1 by ERp44. *Cell* 120: 85-98
- ④. Ishigaki, S., Hishikawa, N., Niwa, J. I., Iemura, S. I., Natsume, T., Hori, S., Kakizuka, A., Tanaka, K., and Sobue, G. (2004). Physical and functional interaction between dorfin and valosin-containing protein that are colocalized in ubiquitylated inclusions in neurodegenerative disorders. *J Biol Chem* 279, 51376-85.
- ⑤. Komatsu, M., Chiba, T., Tatsumi, K., Iemura, S., Tanida, I., Okazaki, N., Ueno, T., Kominami, E., Natsume, T., and Tanaka, K. (2004). A novel protein-conjugating system for Ufm1, a ubiquitin-fold modifier. *Embo J* 23, 1977-1986.
- ⑥. Nakayama, K., Nagahama, H., Minamishima, Y. A., Miyake, S., Ishida, N., Hatakeyama, S., Kitagawa, M., Iemura, S., Natsume, T., and Nakayama, K. I. (2004). Skp2-mediated degradation of p27 regulates progression into mitosis. *Dev Cell* 6, 661-672.
- ⑦. Oyama, M., Itagaki, C., Hata, H., Suzuki, Y., Izumi, T., Natsume, T., Isobe, T., and

- Sugano, S. (2004). Analysis of small human proteins reveals the translation of upstream open reading frames of mRNAs. *Genome Res* 14, 2048-2052.
- ⑧. Yanagida, M., Hayano, T., Yamauchi, Y., Shinkawa, T., Natsume, T., Isobe, T., and Takahashi, N. (2004). Human fibrillarin forms a sub-complex with splicing factor 2-associated p32, protein arginine methyltransferases, and tubulins alpha 3 and beta 1 that is independent of its association with preribosomal ribonucleoprotein complexes. *J Biol Chem* 279, 1607-1614.
2. 学会発表
- ①. Systematic Analysis of Protein Interactions Using Human Full Length cDNA. The 1st Pacific-Rim International Conference on Protein Science 2004/04/16
- ②. Systematic Analysis of Protein Interactions Using Human Full Length cDNA. the 3rd Scientific Leadership Series Symposium on Cutting Edge Solutions in Drug Discovery and Development 2004/05/18
- ③. タンパク質相互作用大規模解析 第2回日本ヒトプロテオーム学会 2004/05/19
- ④. 大規模タンパク質相互作用解析のためのインフォマティクス 医薬分子設計研究所シンポジウム 2004/06/15
- ⑤. "大規模タンパク質ネットワーク解析 (Systematic protein-protein interaction analysis)" *BioJapan* 2004 2004/09/28
- ⑥. Systematic Analysis of Protein Interactions Using Human Full Length cDNA
- ⑦. 日米技術協力事業「脳研究」分野情報交換セミナー 2004/09/30
- ⑧. タンパク質ネットワーク解析 JBI C 2 0 0 4 プロジェクト成果報告会 2004/10/4
- ⑨. Systematic Analysis of Protein Interactions Using Human Full Length cDNA Toxicogenomics International Forum 2004 2004/10/12
- ⑩. Systematic protein network analysis 第77回日本生化学会 2004/10/15
- ⑪. タンパク質相互作用ネットワークの大規模解析 (独) 日本学術振興会産学協力委員会地球環境・食料・資源のための植物バイオ第160委員会および奈良先端科学技術大学院大学 21世紀 COE プログラムフロンティアバイオサイエンスへの展開合同研究 プロテオミクス研究の最前線 2004/10/29
- ⑫. タンパク質相互作用ネットワーク解析ーヒト完全長 cDNA からの展開ー 第20回バイオテクノロジー懇談会 2004/11/12
- ⑬. Systematic Analysis of Protein Interactions Using Human Full Length cDNA. *Frontiers of Proteomics -Aims and Perspectives-* 2004/11/15
- ⑭. タンパク質相互作用ネットワークの大規模解析 "第22回医用高分子研究会講座最先端医用高分子のためのナノバイオエンジニアリング" 2004/11/30
- ⑮. 大規模タンパク質ネットワーク解析 "早稲田大学理工総研シンポジウム「ケモノジェノミクスとゲノム創薬」" 2004/12/6
- ⑯. 大規模タンパク質ネットワーク解析 "特定領域研究「統合ゲノム」第7回ワークショップ
- ⑰. 大規模タンパク質ネットワーク解析 微生物ゲノム研究のフロンティア" 2005/3/6
- ⑱. タンパク質相互作用ネットワークの大規模解析 日本癌学会カンファレンス「がん

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

【III】 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Buijs J, Natsume T 他	Combination Surface Plasmon Resonance with Mass Spectrometry: Identifying Binding Partners and Characterizing Interactions.	R. J. Simpson	Purifying Proteins for Proteomics	Cold Spring Harbor Laboratory	New York	2004	567-578

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Iwasaki N, Horikawa Y, 他	Genetic variants in the calpain-10 gene and the development of type2 diabetes in the Japanese population	J Hum Genet	50	92-98	2005
Nishimura M Horikawa Y, 他	Construction of a multi-functional cDNA library specific for normal mouse pancreatic islets and its application to microarray	DNA Res	11	315-323	2004
Tanaka T, Horikawa Y 他	Expression profile of mRNAs from rat hippocampus and it's application to microarray	Mol Brain Res	129	20-32	2004
Kawamoto T, Horikawa Y 他	Genetic variations in the WFS1 gene in Japanese with type 2 diabetes and bipolar disorder	Mol Genet Metab	82	238-245	2004
Shihara N, Horikawa Y 他	Identification of a <i>de novo</i> case of hepatocyte nuclear factor-1b deficiency with highly varied phenotypes	Diabetologia	47	1128-29	2004
Johnson JD Horikawa Y 他	RyR2 and calpain-10 delineate a novel apoptosis pathway in pancreatic islets	J Biol Chem	279	24794-802	2004
Otani K, Horikawa Y 他	Calpain system regulates muscle mass and glucose transporter GLUT4 turnover	J Biol Chem	279	20915-20	2004
Bannai H, Natsume T 他	An RNA-interacting protein, SYNCRIP (hnRNP Q1/NSAPI) is a component of mRNA granule transported with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 mRNA in neuronal dendrites.	J Biol Chem	279	53427-34	2004

Higo T, Natsume T 他	Subtype-specific and ER-luminal-environment-dependent Regulation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Type 1 by ERp44.	Cell	120	85-98	2004
Ishigaki S, Natsume T 他	Physical and functional interaction between dorfin and valosin-containing protein that are colocalized in ubiquitylated inclusions in neurodegenerative disorders.	J Biol Chem	279	51376-85	2004
Komatsu M, Natsume T 他	A novel protein-conjugating system for Ufm1, a ubiquitin-fold modifier	Embo J	23	1977-86	2004
Nakayama K, Natsume T 他	Skp2-mediated degradation of p27 regulates progression into mitosis	Dev Cell	6	661-672	2004
Oyama M, Natsume T 他	Analysis of small human proteins reveals the translation of upstream open reading frames of mRNAs	Genome Res	14	2048-2052	2004
Yanagida M, Natsume T 他	Human fibrillarin forms a sub-complex with splicing factor 2-associated p32, protein arginine methyltransferases, and tubulins alpha 3 and beta 1 that is independent of its association with preribosomal ribonucleoprotein	J Biol Chem	279	1607-1614	2004

【IV】 研究成果の刊行物・別刷

Observation

Identification of a new case of hepatocyte nuclear factor-1 β mutation with highly varied phenotypes

To the Editor: Mutations in the hepatocyte nuclear factor (HNF)-1 β gene cause a rare form of MODY5 [1]. The various phenotypic features found in patients are related to tissues that express HNF-1 β , including pancreas, kidney, liver and uterus. As the highest level of expression is in the kidney, a range of developmental abnormalities of the kidney, which may cause non-diabetic renal dysfunction, have been described [2, 3, 4, 5, 6]. Of these, multiple renal cysts are the commonest phenotypic feature. Recently, the apparently distinct hereditary diseases, familial hypoplastic glomerulocystic kidney disease and familial juvenile hyperuricaemic nephropathy (FJHN), were also found to be associated with HNF-1 β mutations [3, 4], although there are other established genetic loci for FJHN. Because HNF-1 β is expressed from the earliest stages in the development of Wolffian duct in the fetus, mutations may also be associated with hereditary urogenital dysplasia [5, 6]. Thus, it is important to accumulate knowledge from various cases to understand the broad spectrum of clinical features associated with HNF-1 β mutation. However, only 13 families with mutations have so far been described, regardless of the presence or absence of diabetes. Here, we present a new case of HNF-1 β mutation which has highly varied symptoms.

The affected subject is a 17-year-old woman. Four weeks after birth (full-term birthweight 2930 g) she was found to have renal insufficiency with a blood urea nitrogen level of 15.35 mmol/l and a serum creatinine level of 194.48 μ mol/l. Bilateral multiple renal cysts in normal-sized kidneys were found by ultrasonography. Peritoneal dialysis was initiated at the age of 4 months owing to rapid progress of renal dysfunction. High blood glucose was first noticed at the age of 6 years (insulinogenic index 0.20; HbA_{1c} 7–8%), which is the earliest onset reported to date, when she was admitted to hospital with bacterial meningitis. Autoimmune antibodies were all negative. At the age of 7 years, her left kidney was resected and renal transplantation from her mother was performed. Ultrasonography before the operation showed that she had small kidneys (left 6.2 cm long; right 6.0 cm long). The pathological findings from the resected kidney (weighing 76 g) have previously been reported [7]. Briefly, most of the cut surface of the kidney is occupied by the cortex; the papillae and medulla are small and atrophic. The cortex contained numerous cysts of various sizes, which consisted of a dilated Bowman's space

and collapsed glomerular tufts. Clusters of immature metanephric cells, which were often arranged in a circular pattern forming lumens, were scattered throughout the area. Since the transplanted kidney function is currently normal, renal transplantation is effective for treatment of the renal phenotypes.

After the operation, various doses of prednisolone, ciclosporin and mizoribin were used for immunosuppression. Two years after renal transplant, blood glucose levels were highly elevated and the patient was treated by intensive insulin therapy (48 units/day). Urinary C-peptide level at initiation was 1.92 nmol/l, suggesting that the diabetes became insulin dependent. There has been no obesity throughout the clinical course. There is no diabetic retinopathy or neuropathy at present. Because of early-onset diabetes and multiple renal cysts, which are characteristic of MODY5, all of the exons and flanking regions of the HNF-1 β gene were screened for mutations by direct sequencing, as described previously [1, 2], resulting in the identification of a novel heterozygous frameshift mutation, L95fsinsAGCT (insertion of AGCT at the codon 95 for Leu), which could generate a truncated 116 amino acid protein. Gene testing of both parents, who were shown to be non-diabetic by an oral glucose tolerance test, revealed no mutation in the corresponding site of the gene, indicating that this is in fact a new HNF-1 β mutation.

Based on the diagnosis of MODY5, other tissues expressing HNF-1 β were extensively examined. Magnetic resonance imaging (MRI) revealed bicornuate uterus. Vaginal aplasia was also observed. Since similar abnormalities have been observed in three other families with the mutations, genital malformations may be an important manifestation of MODY5. Liver dysfunction with increased levels of transaminase was noticed shortly after birth in the patient and continues to the present (aspartate aminotransferase 79 U/l, alanine aminotransferase 138 U/l), although the liver size was normal according to MRI. Also observed was HDL-dominant hypercholesterolaemia (total cholesterol 6.31 mmol/l, HDL cholesterol 3.15 mmol/l). However, although the liver expresses both HNF-1 β and a heterodimerising partner HNF-1 α , which was found to be essential for bile acid metabolism and cholesterol metabolism in the liver, this is the first case representing liver dysfunction and hypercholesterolaemia.

The patient also has unusual neurological symptoms of epilepsy and learning difficulty. Similar learning difficulty was previously described in another patient with a mutation in the gene [3]. While HNF-1 β is known to regulate regional specification of zebrafish brain, the significance in human brain development is unknown. The patient also presents the unusual feature of prognathism of mandibula, although HNF-1 β is not expressed in bone tissue. Interestingly, prognathism has previously been described in two families with different mutations in HNF-1 β [3], suggesting that HNF-1 β may regulate genes encoding possible secreted proteins involved in bone growth of the mandibula.

The patient presents highly varied clinical features, some of which are quite severe. To investigate the molecular mechanism by which the mutation might cause the various phenotypic

DOI 10.1007/s00125-004-1402-y

Received: 18 February 2004 / Accepted: 26 March 2004

Published online: 28 May 2004

© Springer-Verlag 2004