

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 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 堀川 幸男

平成 18 年 (2006) 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
糖尿病関連遺伝子のタンパク質ネットワーク解析		
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	-----	14

## 【I】 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

岐阜大学大学院医学系研究科 臨床教授  
岐阜大学医学部附属病院糖尿病代謝内科 副科長

研究要旨

世界で初めて同定された生活習慣病の代表格である 2 型糖尿病主働遺伝子 (NIDDM1) カルパイン 10 (CAPN10) をナノスケール質量分析器に供することにより関連分子を獲得後、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た感度の高い糖尿病感受性遺伝子診断キットの開発、さらには関連分子発現調節薬等の新薬開発を含め個人別医療を視野に見据えた新規治療法の開発を目指す。

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

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。先ずカルパイン 10 関連分子を先ず包括的に網羅し、6 種類 (ID 0514, 1312, 1337, 1345, 3424, 7705) の有力関連候補分子を獲得している。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たが(特許:60/134, 175)、カルパイン 10 と ID3424 タンパク質間の相互作用を制御する薬剤が、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になる可能性を考えている。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。従って反対にカルパイン 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アデノウィルス系を立ち上げ、正常或いは種々の糖尿病モデル動物に過剰発現させカルパイン 10 の制御機構並びに周辺分子の網羅を進める。先ずこの 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、糖尿病治療の一つの分子標的であることが明らかとなった。さらにこのレポーターシステムを化合物ライブラリースクリーニングに供することにより、2 型糖尿病の新規予防剤・治療剤を獲得する。一方予防医学的観点からは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、複数の疾患感受性ハプロタイプをパネル化して糖尿病感受性診断ツールを開発し実用化する。

## B. 研究方法

### ID3424 の新規基質および関連蛋白の同定

個々の臓器での ID3424 の役割を明確にするため、アデノウイルスを感染させた培養細胞（膵β細胞株 MIN6、肝細胞株 HepG2）を用いて、遺伝子レベルおよび蛋白レベルでの解析をおこなう。同時に申請者が単離している膵島および肝細胞を用いて、細胞株で得られた結果を検証する。

### アデノウイルスによるカルパイン 10、ID3424 過剰発現の個体での作用

申請者らは既に作成が容易で効率良く肝臓に外来遺伝子を発現できるアデノウイルス発現系を立ち上げている。アデノウイルスの感染量をコントロールすることにより、全身における ID3424 の機能評価が可能となるので、感染させたマウス、ラットを用いて、全身での耐糖能、インスリンクリアランスおよび周辺臓器のインスリン抵抗性の評価を行う。また、肥満患者においては、肝臓でのインスリンクリアランスが低下していることが知られているので、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すなわち高インスリン血症の改善が耐糖能の改善にむすびつく可能性も、上記のアデノウイルスの実験系を用いて解析する。

### ID3424 新規発現調節薬の探索と実験動物で

### の検討

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たが（特許：60/134,175）、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分子標的であることも明らかになったため、このレポーターシステムをケミカルライブラリースクリーニング系に供して新規 ID3424 発現調節化合物を獲得する。その後培養細胞系、「カルパイン 10 異常型動物」「糖尿病モデル動物」に投与して、種々の条件下でインスリン分泌、作用への効果を判定する。

### iSNP マーカーと表現型の関連解析

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、「カルパイン異常型動物」で観察された表現型を中心に、獲得関連分子との関連解析を行う。*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・岐阜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を保

存されている。個人情報に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

#### カルパイン 10、ID3424 の制御機構の解明

カルパイン 10 或いは ID3424 のアデノウィルス過剰発現マウスを作成し、空腹時あるいは随時血糖低下を認めた。そこで糖新生系の代表的酵素である、PEPCK, G6Pase のプロモーターを用いてレポーターコンストラクトを作成し、肝由来の腫瘍細胞にカルパイン 10 或いは ID3424 と共に過剰発現させてインスリン、グルココルチコイド存在下でのレポーター活性を測定し、糖新生系酵素のグルココルチコイドへの応答性の低下を明らかにした。

#### ID3424 新規発現調節薬の探索と実験動物での検討

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たが（特許：60/134,175）、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分子標的であることも明らかになったため、新規治療化合物を確保すべく、このレポーターシステムを供する放線菌ケミカルライブラリースクリーニング系を立ち上げた。さらに今後の候補化合物の薬効検定に供するための ID3424 のノックアウトマウスを既に獲得した。

#### iSNP マーカーと表現型の関連解析

*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 収集を実施した。既に ID3424 に関しては高密度マッピングを終了しマイナーアリル 10%以上の多型 20 個を含む多型 37 個を獲得し、種々の複合 iSNP セットを LD ブロックにもとづいて構築し数値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ている。

### D. 考察

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。先ずカルパイン 10 関連分子を包括的に網羅し、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たので（特許：60/134,175）、カルパイン 10 と ID3424 タンパク質間の相互作用を促進する薬剤が、2 型糖尿病の予防剤、或いはより精度の高い治療剤になりうる可能性を考えた。そしてカルパイン 10 或いは ID3424 のアデノウィルスを用いた過剰発現マウスを作成したところ、空腹時と随時の血糖の低下が認められた。精査により ID3424 と ID1345 との相互作用を通した糖新生系酵素のグルココルチコイドへの応答性の低下が明らかとなった。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、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用いて獲得しうる薬物候補化合物を精製し糖尿病モデル動物に投与することにより、2型糖尿病の新規予防剤・治療剤を獲得していく。また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、高感度糖尿病感受性診断ツール開発も引き続き目指す。

#### E. 結論

カルパイン 10 或いは ID3424 のアデノ過剰発現したマウスを作成したところ、空腹時あるいは随時血糖低下が認められ、ID3424 と ID1345 との相互作用を介する糖新生系酵素のグルココルチコイドへの応答性の低下が明らかとなった。また ID3424 遺伝子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分子標的であることも明らかになった。本年度糖尿病動物に過剰発現させ、糖尿病表現型への効果の検証を進めていく。また今後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・治療剤の候補を獲得できる。

「カルパイン 10 異常型糖尿病 (NIDDM1)」という新しい疾患概念をタンパク質相互作用解析を基点に確立すると共に新規糖尿病治療戦略の開発を目指す本アプローチは、世界的レベルで他の多因子遺伝疾患の解析戦略の良き規範となることは疑いない。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Horikawa Y\*

Type 2 diabetes susceptibility gene-calpain 10

**Endoc J** (Review) (in press)

Nakano Y, Furuta H\*, Doi A, Matsuno S, Nakagawa T, Shimomura H, Sakagashira S, Horikawa Y, Nishi M, Sasaki H, Sanke T and Nanjo K

A functional variant in the human betacellulin gene promoter is associated with type 2 diabetes

**Diabetes** 54: 3560-3566, 2005

Yamada N, Horikawa Y\*, Oda N, Iizuka K, Shihara N, Kishi S, and Takeda J

Genetic variation in the HIF-1 $\alpha$  gene is associated with type 2 diabetes in Japanese

**J Clin Endocrinol Metab** 90: 5841-47, 2005

Wang H, Horikawa Y\*, Jin L, Narita T, Yamada S, Shihara N, Tatemoto K, Muramatsu M, Mune T, and Takeda J.

Gene expression profile in rat pancreatic islet and RINm5F cells

**J Mol Endocrinol** 35: 1-12, 2005

##### 2. 学会発表

堀川幸男

2型糖尿病関連遺伝子同定戦略の現状と展開

第7回神戸糖尿病研究談話会

2005年 4月2日 神戸

土屋天文、清水弘行、岡田秀一、上原 豊、

根岸真由美、山田英二郎、大井晋介、有山泰代、Hai Yan、堀川幸男、Graeme Bell、森 昌朋

Calpain-10 遺伝子発現低下と関連する新たなハプロタイプの同定

第 47 回日本糖尿病学会年次学術集会 2005 年 5 月 13 日

岩崎直子、土屋天文、堀川幸男、本田正志、織田直久、尾形真規子、鎌谷直之、GraemeBell、岩本安彦

CAPN10 遺伝子多型の日本人 2 型糖尿病における意義—多数例による検討

第 47 回日本糖尿病学会年次学術集会 2005 年 5 月 13 日

塩谷真由美、堀川幸男、武田 純

糖尿病発症における SHP 遺伝子変異の意義に関する検討』

第 196 回日本内科学会東海地方会 2005 年 6 月 25 日

塩谷真由美、佐々木明彦、戸谷理英子、堀川幸男、武田 純

多嚢胞性卵胞を伴った MODY 3 の 1 例

第 72 回日本糖尿病学会中部地方会 2005 年 10 月 15 日

堀川幸男

2 型糖尿病遺伝子同定戦略の現状と展開—診断から新規治療まで

生物システム制御基盤技術開発プロジェクト検討会

バイオ産業情報化コンソーシアム 2005 年 11 月 8 日 東京

堀川幸男

生活習慣病の個人別医療

第 6 2 回大垣循環器懇話会 2005 年 1 1 月 9 日 大垣

堀川幸男

ゲノムサイエンスは我々に何をもたらすか  
「体質にもとづいた個人医療」

第 2 回上智大学生命科学シンポジウム 2005 年 1 1 月 1 2 日 東京

堀川幸男、夏目 徹

2 型糖尿病とカルパイン 10 関連分子

第 2 8 回日本分子生物学会年会シンポジウム  
2005 年 1 2 月 8 日 福岡

堀川幸男

創薬の課題と将来展望—2 型糖尿病を例として

化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発ワークショップ 2005 年 12 月 21 日 東京

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

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）  
分担研究報告書

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的手法により、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ドラッグターゲットとする。

A. 研究目的

ポストゲノム研究の重要課題の一つが、新規疾患関連遺伝子の同定である。この要請をうけ、大規模・絨毯爆撃的なゲノムワイドな疾患関連遺伝子の探索が行われている。しかし、その進捗ははかばかしくなく、大規模で高コストな戦略が果たして有効であるかという議論も始まりつつある。仮に新規疾患関連遺伝子が同定されたとしても、その遺伝子と疾患の発症メカニズム解明への明確な戦略がないことも新たな問題として浮かび上がってきた。そこで、本研究開発では連鎖解析で絞られた領域をターゲットとした SNPs 解析や、疾患の特徴を個別に考慮したトランスクリプトーム解析から、発見しやすい主働原因遺伝子を発見し、その遺伝子の産物であるタンパク質の相互作用ネットワークを捉えることを目的としている。何故なら、複雑な生体システムの中において全てのタンパク質は他の分子と相互作用し合い、ネットワークを形成し機能しているからである。本研究では、プロテオ

ミクス手法を用いて、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。これにより同定されたタンパク質がどのような蛋白質ネットワークを形成しているかを更に検討する。

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などの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のK0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。次いでID3424を bait として更にネットワーク解析をしたところ、ID3424とカルパイン10

は糖代謝のシグナルを核内に伝える、輸送システムとも複合体を形成していることが明らかとなった。

#### D. 考察

カルパイン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。カルパインファミリーは10数個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、筋萎縮症と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、カルパイン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。カルパイン10は糖代謝に関わるシグナル伝達と、その核内移行に関わる分子群の複合体として働いていることが明らかとなった。また、その複合体中でのカルパイン10の分子機能と基質候補が得られた。

#### E. 結論

今回のカルパイン10複合体タンパク質群の同定により、カルパイン10の細胞内機能と糖尿病発症メカニズム解明へ向けての詳細な情報が得られた。これにより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

Yoshida K, Yamaguchi T, Natsume T, Kufe D, Miki Y.  
JNK phosphorylation of 14-3-3 proteins regulates nuclear targeting of c-Abl in the apoptotic response

to DNA damage.

**Nat Cell Biol** 7:278-85, 2005

Kojima H, Sasaki T, Ishitani T, Iemura S, Zhao H, Kaneko S, Kunimoto H, Natsume T, Matsumoto K, Nakajima K.

STAT3 regulates Nemo-like kinase by mediating its interaction with IL-6-stimulated TGFbeta-activated kinase 1 for STAT3 Ser-727 phosphorylation.

**Proc Natl Acad Sci U S A** 102:4524-9, 2005

Matsuda N, Azuma K, Saijo M, Iemura S, Hioki Y, Natsume T, Chiba T, Tanaka K, Tanaka K.

DDB2, the xeroderma pigmentosum group E gene product, is directly ubiquitylated by Cullin 4A-based ubiquitin ligase complex.

**DNA Repair (Amst)**. 4:537-45, 2005

Moriguchi T, Urushiyama S, Hisamoto N, Iemura SI, Uchida S, Natsume T, Matsumoto K, Shibuya H.

WNK1 regulates phosphorylation of cation-chloride-coupled cotransporters via the STE20-related kinases, SPAK and OSR1.

**J Biol Chem** 280: 42685-42693, 2005

Hirano Y, Hendil KB, Yashiroda H, Iemura S, Nagane R, Hioki Y, Natsume T, Tanaka K, Murata S.

A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes.

**Nature** 437:1381-5, 2005

Hishiya A, Iemura S, Natsume T, Takayama S, Ikeda K, Watanabe K.

A novel ubiquitin-binding protein ZNF216

functioning in muscle atrophy.

**EMBO J** 25: 554-64, 2006

Honma M, Higuchi O, Shirakata M, Yasuda T, Shibuya H, Iemura S, Natsume T, Yamanashi Y. Dok-3 sequesters Grb2 and inhibits the Ras-Erk pathway downstream of protein-tyrosine kinases. **Genes Cells** 11:143-51, 2006

## 2. 学会発表

### 1. 夏目徹 (2005)

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 微生物ゲノム研究のフロンティア

### 2. 夏目徹 (2005)

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  
「がんゲノム研究の新戦略- オーダーメイド医療を目指して-」

### 3. 夏目徹 (2005)

タンパク質相互作用ネットワークの大規模解析.  
遺伝子機能プロテオミクスバイオインフォマティクス第2回公開シンポジウム

### 4. 夏目徹 (2005)

Systematic analysis of protein interaction networks using human full length cDNA.  
With European Symposium of The Protein Society.

### 5. 夏目徹 (2005)

Large-scale systematic analysis of protein interaction networks using human full length

cDNA.

Previous Seminars held at the Sanger Institute.

### 6. 夏目徹 (2005)

完全長ヒト cDNA を用いた大規模蛋白質ネットワーク解析.  
Amercham Biosciences Symposium 2005.

### 7. 夏目徹 (2005)

タンパク質相互作用ネットワークの大規模解析.  
2005 年度生理学研究所 研究会.

### 8. 夏目徹 (2005)

タンパク質相互作用ネットワーク解析の大規模解析.  
第5回日本蛋白質科学会年会.

### 9. 夏目徹 (2005)

タンパク質相互作用ネットワーク解析の大規模解析.  
The 3rd JHUPPO Conference.

### 10. 夏目徹 (2005)

Systematic Analysis of Protein Interaction Networks Using Human Full Length cDNA.  
The 17<sup>th</sup> Annual Meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology

### 11. 夏目徹 (2005)

タンパク質相互作用ネットワークの大規模解析  
第28回日本分子生物学会年会

### 12. 夏目徹 (2005)

Systematic Analysis of Protein Interaction

Networks Using Human Full Length cDNA.

International chemical congress of pacific basin societies.

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

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
<u>Horikawa Y,</u>	Type 2 diabetes susceptibility gene-calpain 10	<b>Endoc J</b>	50	92-98	2006
Hishiya A, <u>Natsume T</u> 他	A novel ubiquitin-binding protein ZNF216 functioning in muscle atrophy	<b>EMBO J</b>	25	554-64	2006
Honma M, <u>Natsume T</u> 他	Dok-3 sequesters Grb2 and inhibits the Ras-Erk pathway downstream of protein-tyrosine kinases	<b>Genes Cells</b>	11	143-51	2006
Nakano Y <u>Horikawa Y,</u> 他	A functional variant in the human betacellulin gene promoter is associated with type 2 diabetes	<b>Diabetes</b>	54	3560-3566	2005
Yamada N <u>Horikawa Y,</u> 他	Genetic variation in the HIF-1 $\alpha$ gene is associated with type 2 diabetes in Japanese	<b>J Clin Endocrinol Metab</b>	90	5841-47	2005
Wang H <u>Horikawa Y,</u> 他	Gene expression profile in rat pancreatic islet and RINm5F cells	<b>J Mol Endocrinol</b>	35	1-12	2005
Kojima H, <u>Natsume T</u> 他	STAT3 regulates Nemo-like kinase by mediating its interaction with IL-6-stimulated TGF{beta}-activated kinase 1 for STAT3 Ser-727 phosphorylation	<b>Proc Natl Acad Sci U S A</b>	102	4524-4529	2005
Matsuda N, <u>Natsume T</u> 他	DDB2, the xeroderma pigmentosum group E gene product, is directly ubiquitylated by Cullin 4A-based ubiquitin ligase complex	<b>DNA Repair</b>	4	537-45	2005
Yoshida K, <u>Natsume T</u> 他	JNK phosphorylation of 14-3-3 proteins regulates nuclear targeting of c-Abl in the apoptotic response to DNA damage	<b>Nat Cell Biol</b>	7	278-285	2005
Moriguchi T, <u>Natsume T</u> 他	WNK1 regulates phosphorylation of cation-chloride-coupled cotransporters via the STE20-related kinases, SPAK and OSR1	<b>J Biol Chem</b>	280	42685-42693	2005
Hirano Y, <u>Natsume T</u> 他	A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes	<b>Nature</b>	437	1381-5	2005

## 【IV】 研究成果の刊行物・別刷



Calpain-10 (*NIDDM1*) as a Susceptibility Gene for Common Type 2 Diabetes

Page heading: CALPAIN10 AND TYPE 2 DIABETES

Yukio Horikawa

*Department of Diabetes and Endocrinology, Gifu University School of Medicine, Gifu 501-1194, Japan; Laboratory of Medical Genomics, Biosignal Genome Resource Center, Institute for Molecular and Cellular Regulation, Gunma University, Maebashi 371-8512, Japan; Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST), Japan Science and Technology Corporation (JST), Kawaguchi 332-0012, Japan*

Correspondence to:

Yukio HORIKAWA, M.D., Ph.D.,

Department of Diabetes and Endocrinology

Gifu University School of Medicine

1-1 Yanagido,

Gifu-city, Gifu 501-1194, Japan

TEL; +81-58-230-6564,

FAX; +81-58-230-6566

E-mail: [yhorikaw@cc.gifu-u.ac.jp](mailto:yhorikaw@cc.gifu-u.ac.jp)

## Preface

It is assumed that susceptibility genes associated with lifestyle-related diseases including type 2 or non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) were positively selected for energy conservation but act adversely in modern conditions. These thrifty genes can be identified on the common disease common variant hypothesis, but detailed analysis of the genetic polymorphisms in many ethnic groups is required to clarify the molecular evolution of these susceptibility alleles. At present, single nucleotide polymorphisms (SNPs) represent the most useful data for genetic analyses of non-Mendelian polygenic lifestyle-related diseases, the common diseases including diabetes, hypertension, and obesity. Although many association studies have been conducted using single SNPs, they are problematical for several reasons, including ethnic differences within the study population, unknown environmental factors, misdiagnosed disease, and genetic mistyping. Haplotype analysis whereby several tag SNPs can be monitored simultaneously improves and complements the search. *NIDDM1* (calpain-10) is the first susceptibility gene for type 2 diabetes to be identified by this method.

## SNP and haplotype

When a single SNP is used in analysis, there are only two possible variants, but if multiple SNPs are used, there are  $2^n$  possible variants in haplotypes, somewhat less in the case of linkage disequilibrium (LD). In addition, determination of the degree of LD by LD coefficients (e.g.,  $D$ ,  $d^2$ ,  $r^2$ ) permits estimation of the physical map distance from a susceptibility gene, narrowing a disease locus to 10-100 kb. Thus, LD mapping of haplotypes is potentially more fruitful in screening susceptibility genes for common diseases. When marker SNPs and a putative disease susceptibility allele are located in the same LD

block, haplotype structure analysis is relevant for any variant regardless of its frequency. On the other hand, if the putative disease allele is not located in an LD block with the SNP markers, single SNP analysis may yet be more useful than analysis of the haplotype structure [1].

A meta-analysis assessed the collected data on single SNPs in a comprehensive manner to screen candidate polymorphisms for polygenic diseases, and found only 16% of the candidate polymorphisms to have a significant genetic association that could be replicated without heterogeneity or bias. However, the majority of these candidate polymorphisms were false-positive results, attributed later to insufficient sample size or first versus subsequent discrepancies [2]. LD analyses using single SNPs are clearly liable to type I errors, while simultaneous assay of several SNPs contained in haplotype reduces the confounding effects of ethnic differences within the study population, environmental factors, misdiagnosed disease, and genetic mistyping, greatly facilitating molecular-level genetic analysis of naturally selected thrifty genes.

#### Identification of type 2 diabetes susceptibility genes

Nearly 50% of Mexican Americans aged 35 years or older have diabetes mellitus or family history in first-degree relatives. A genome-wide linkage study with affected sib-pairs for type 2 diabetes genes in a Mexican American population localized a type 2 diabetes susceptibility gene (*NIDDM1*) to a 12-cM 1-*lod* support interval in the distal long arm of chromosome 2 near *D2S140* [3]. A physical map of the *NIDDM1* region was generated to identify the SNPs within the region by resequencing the expressed sequence tags (EST). SNPs were surveyed in eight patients of families with evidence of linkage at *NIDDM1* and in

two patients of families without such evidence. SNPs with minor allele frequency of more than 10% or showing a unique pattern were genotyped in a patient group of 110 Mexican Americans with type 2 diabetes and a control group of 112 randomly sampled subjects to compare allele and haplotype frequency distributions between the groups as described below. Haplotype structure was determined by the expectation maximization (EM) algorithm [4]. We then classified the patients into three subgroups for comparisons of association with the *NIDDM1* allele. The first patient subgroup included all 110 patients, the second subgroup included the 37 patients from families showing evidence of linkage at *NIDDM1*, and the third subgroup included the 20 patients from families showing evidence of linkage at both *NIDDM1* and *CYP19*, a marker located on the second peak of chromosome 15 [5] (Fig. 1).

Of these, no putative single SNP was significantly associated with increased risk of diabetes. However, when three SNPs were combined in a computed LD block, haplotypes composed of the three intron SNPs in the region of calpain-10, namely SNP-43, -19, and -63, showed a significant association with type 2 diabetes. Specifically, the 112/121-haplotype combination (1 = major allele, 2 = minor allele) was associated with increased risk of diabetes in our Mexican American group (O.R., 3.02; 95% C.I., 1.37 to 6.64). This combination also was associated significantly with diabetes in Finnish and German populations [5]. The identification of *NIDDM1* demonstrates the following: 1) several susceptibility alleles can be found in one gene; 2) some combinations of SNP increase risk of development of diabetes while other combinations decrease risk; 3) risk that cannot be associated with a single SNP can be identified by a haplotype including the SNP; and 4) SNPs in introns affect regulation of the transcription level of the gene.