

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 18 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 堀川 幸男

平成 19 年 (2007) 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	8
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	13
IV. 研究成果の刊行物・別刷	15

【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 助教授

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予備軍を含めて 1620 万人、実に 40 歳以上の約 4 人に 1 人に達しており、そのほとんどを占めるのは 2 型糖尿病である。2 型糖尿病に起因する動脈硬化疾患の医療費が 65 歳以上の高齢者にかかる医療費 15 兆円の三分の一を占めている事を鑑みると、そ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、新規糖尿病治療剤、予防剤の開発に繋がるため、高齢化社会を迎えつつある我が国において急務である。主任研究者は、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。培養細胞を用いた基礎研究データより ID3424 の過剰発現が糖尿病治療に有効である可能性を考え、今年度は正常或いは種々の糖尿病モデル動物にアデノウイルスを用いて過剰発現させ糖尿病病態への影響や治療効果を検定する。また 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ることが判明し、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。そこで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 型糖尿病の新規治療剤のリードを獲得する。一方予防医学的観点より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、複数の疾患感受性遺伝子ハプロタイプをパネル化した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 の臓器別機能の同定

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、筋細胞株 C2C12）を用いて、遺伝子レベルおよび蛋白レベルでのインスリン分泌・作用解析をおこなう。同時に単離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。

カルパイン 10、ID3424 発現レベル改変個体での作用

研究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、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。また既に作成済みの ID3424 ノックアウトマウスを用いて、糖尿病関連の解析を進めていく。

ID3424 新規発現調節薬の探索と実験動物での検討

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

ることより、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、「糖尿病モデル動物」に獲得化合物を投与して、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

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。多遺伝子型疾患である糖尿病のような生活習慣病では遺伝子-遺伝子、さらに遺伝子-環境相互作用の数理統計学的解析が必要不可欠となる。これらの解析には同時に多数の遺伝子多型を簡便にかつ正確にハンドリングできるソフトウェアが要求されるのでこれを開発する。

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で作成されている。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

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の低下と血清インスリン濃度の低下を認めた。今年度はインスリン分泌細胞株にそれぞれを過剰発現させたところブドウ糖高濃度下でインスリン分泌は有意に増加した。そしてこれにはインスリン遺伝子の発現レベル、インスリン含量、細胞内カルシウム濃度、ATP 濃度などは関連していなかった。一方 shRNA を用いて両遺伝子の内因性発現を抑制したところインスリン分泌は減少した。

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、ID3424 の高発現が、糖尿病治療に繋がる可能性も明らかになったため、レポーターシステムを放線菌ケミカルライブラリースクリーニング系に供して現在までに約 15 個の候補化合物を獲得し、現在クロマトにて精製中である。

糖尿病モデル動物の治療

既に作成した ID3424 のノックアウトマウスでは高インスリン血症、肝、筋肉でのインスリン抵抗性が主たる糖尿病病態要因であることを明らかにした。そこで、糖尿病肥満モデル動物 ob/ob マウスに ID3424 を過剰発現させ、高インスリン血症や耐糖能が改善することを実証した。同時に不活化

ID3424 では糖関連データが改善しないことも明らかにした。

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 3 個のミスセンス変異を含む、マイナーアليل 10%以上の多型 20 個を含む多型 81 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理統計学的に処理し、高感度 iSNP ハプロタイプ糖尿病感受性診断ツールの開発を試みた。

先ず、我々は独自にプログラムを開発した (software hermes 1.5)。このプログラムにより遺伝子多型データプロセッシングに要する時間は大幅に短縮された (数日から数分へ)。このプログラムはタックマンでタイピングされた生データを入力し、LDMAX, HAPLOVIEW などの連鎖不平衡解析汎用プログラムへの入力ファイルや、遺伝子-遺伝子相互作用解析の汎用プログラム MDR の入力ファイルをミスタイピングデータの程度により 3 段階に出力できる解析システムである。実際にカンパイン 10 関連分子に既知の 2 型糖尿病感受性遺伝子多型を加えて遺伝子-遺伝子相互作用解析を施行したところ、アディポネクチン、ポタシウム ATP チャンネル、カルパイン 10、ID3424 の相互作用に有意に再現性のある遺伝子多型の組み合わせを獲得できた。

D 考察

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、糖尿病治療の重要な分子標的である事を明らかにした。そして ID3424 の過剰発現が現実に糖尿病治療に有効であることを糖尿病肥満モデルマウス ob/ob の治療により実証できた。さらに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・治療剤の候補化合物を約 15 個獲得している。「カルパイン 10 異常型糖尿病 (NIDDM1)」という新しい疾患概念を確立すると共に新規糖尿病治療戦略の開発を目指した本アプローチは、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。また本研究で獲得されたカルパイン 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た高感度糖尿病感受性診断ツール開発のためには、遺伝子-遺伝子あるいは遺伝子-環境相互作用を包括的に捉え解析できるソフトウェアが必要であることは言うまでもなく、現在我々は MDR に代わる組み合わせ探索ソフトを開発中である。

E. 結論

主任研究者は、世界で初めて 2 型糖尿病遺伝子カルパイン 10 (NIDDM1) を発見することに成功した後、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たが、本研究ではもっとも頻度高く相互作用が認められた ID3424 に先ず注目した。研究者らは、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制御する薬剤が、2 型糖尿病の予防剤、或いはより

精度の高い治療剤である可能性を考えた。そして ID3424 の過剰発現が糖尿病治療に有効であることを糖尿病肥満モデルマウスの治療により実証した。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にした。このレポーターシステムを用いて獲得した約 15 個の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・治療剤の獲得が可能となる。また本研究で獲得されたカルパイン 10 関連分子の大量遺伝子マーカーを用いたタンパク質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高感度糖尿病感受性診断ツールの開発のため、遺伝統計解析ソフトウェアを開発した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yokoi N, Kanamori M, Horikawa Y, Takeda J, Sanke T, Furuta H, Nanjo K, Mori H, Kasuga M, Hara K, Kadowaki T, Tanizawa Y, Oka Y, Iwami Y, Ohgawara H, Yamada Y, Seino Y, Yano H, Cox NJ, and Seino S

Association Studies of Variants in the Genes Involved in Pancreatic β -Cell Function in Type 2 Diabetes in Japanese
Diabetes 55: 2379-86, 2006

Horikawa Y.

Type 2 diabetes susceptibility gene-calpain 10
Endocr. J 53: 567-76, 2006

2. 学会発表

村松 学、堀川幸男、武田 純

膝島特異性とリンクした網膜症遺伝子の探索
第 12 回日本糖尿病眼学会

2006年3月11日 東京

山田教弘、堀川幸男、織田直久、志原伸幸、飯塚勝美、武田 純、岸 章治

2型糖尿病患者を用いたHIF-1・遺伝子多型の同定と関連解析

第12回日本糖尿病眼学会

2006年3月11日 東京

織田直久、稲垣一道、今村繁夫、関口佐保子、糸井智子、松本 崇、小野保長、石渡陽子、堀田恵子、永田睦子、柿澤弘章、早川伸樹、鈴木敦詞、堀川幸男、伊藤光泰

レプチン／アディポネクチン比の適正值の検討

第49回日本糖尿病学会年次学術集会

2006年5月25日 東京

村松 学、堀川幸男、塩谷真由美、諏訪哲也、武田 純

舘島特異的発現遺伝子の同定

第49回日本糖尿病学会年次学術集会

2006年5月25日 東京

志原伸幸、飯塚勝美、武田 純、堀川幸男
舘島・細胞におけるカルパイン10の役割：舘島特異的カルパイン10トランスジェニックマウスを用いた解析

第49回日本糖尿病学会年次学術集会

2006年5月25日 東京

大谷健一、堀川幸男、清水弘行、森 昌朋
カルパインはインスリン分泌に影響する

第49回日本糖尿病学会年次学術集会

2006年5月26日 東京

塩谷真由美、堀川幸男、武田 純

糖尿病発症におけるSHP遺伝子変異の検討

第49回日本糖尿病学会年次学術集会

2006年5月26日 東京

飯塚勝美、堀川幸男、武田 純、Uyeda Kosaku

糖尿病関連病態におけるChREBPの寄与

第49回日本糖尿病学会年次学術集会

2006年5月26日 東京

今村繁夫、織田直久、下村敦司、千田隆夫、稲垣一道、関口佐保子、糸井智子、松本 崇、小野保長、安田啓子、堀田恵子、永田睦子、柿澤弘章、早川伸樹、鈴木敦詞、堀川幸男、伊藤光泰

インスリン遺伝子A-2T変異のAt-T20細胞での検討

第49回日本糖尿病学会年次学術集会

2006年5月26日 東京

佐久間博也、堀川幸男、諏訪哲也、宗 友厚、武田 純

Cab45によるインスリン分泌促進作用

第49回日本糖尿病学会年次学術集会

2006年5月27日 東京

堀川幸男

2型糖尿病と遺伝素因

第7回 阪神メタボリズム研究会

2006年6月15日 尼崎

堀川幸男

糖尿病遺伝子研究の新規展開

中日協力糖尿病センター設立記念講演

2006年6月27日 鎮江

堀川幸男
日本の糖尿病治療の現状
中日協力糖尿病センター設立記念講演
2006年6月28日 鎮江

堀川幸男
2型糖尿病の遺伝素因
-日本人と糖尿病体質-
第144回 飛騨臨床医学会
2006年7月7日、高山

堀川幸男
日本人と糖尿病体質
第9回 西尾張地区糖尿病研究会
2006年7月27日、名古屋

堀川幸男
インクレチンを基軸とした糖尿病治療の新規
展開
-evolving diabetes and hypertension medical
treatment-
2006年11月8日、岐阜

堀川幸男
タンパク質相互作用基点による2型糖尿病遺
伝子パズルの解明
第9回ゲノム創薬フォーラムシンポジウム
2006年11月13日、東京

堀川 幸男
タンパク質相互作用基点による2型糖尿病遺
伝素因パズルの解明
岐阜大学先創薬研究センター研究会
2007年2月20日、岐阜

堀川 幸男

カルパイン 10 関連分子を用いた 2 型糖尿病新
規治療法の開発
ヒトゲノム・再生医療等研究費成果発表会
2007年2月21日、東京

堀川 幸男
インクレチンの日本人糖尿病治療への展開
消化管ホルモンとインスリン分泌セミナー
2007年2月24日、岐阜

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

「糖尿病予防剤又は治療剤、又は該疾患に係
わる方法」について特許申請予定

【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

前年度、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してきた。これによりpreyとして同定されたタンパク質が、更にどのような蛋白質ネットワークを形成しているか検討するため、これらの蛋白質をbaitとし複合体を形成するタンパク質を芋づる式に同定し、カルパイン10を中心とする蛋白質相互作用ネットワークを俯瞰することを試みた。

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という直接疾患と関連するタンパク質が同定されて

いる。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。その分子メカニズムを明らかにするため、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も明らかになった。今年度は、この複合体形成をの制御機構を詳細に検討するため、試験管内に相互作用を再構成し検討したところ、この複合体の形成がインスリンの代謝に依存していることを明らかにした。

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。しかし、今回の蛋白質ネットワーク解析の結果、世界に先駆け、カルパイン10が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するとともに、その制御はインスリンの代謝にも依存しており、カルパイン10は糖代謝とインスリン代謝を通して、血糖値の恒常性に関与する中心分子であることが明らかになってきた。

E. 結論

今回のカルパイン10を中心とした蛋白質

相互作用ネットワーク解析と、試験管内相互作用再構成的系の実験により、カルパイン10の分子機能と糖尿病発症メカニズムが次第に明らかとなってきた。また、これにより得られた新規相互作用をターゲットとした化合物のスクリーニングを展開し、糖尿病治療薬の開発を目指すとともに、得られた化合物を利用したケミカルバイオロジーを展開し、化合物による遺伝子・蛋白質の制御を行い、糖尿病発症の分子理解を深化させる。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

論文発表

Kitajima TS, Sakuno T, Ishiguro K, Iemura S, Natsume T, Kawashima SA, Watanabe Y.

Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin.

Nature. 441(7089):46-52. ,2006

Terasawa K, Yoshimatsu K, Iemura S, Natsume T, Tanaka K, Minami Y.

Cdc37 interacts with the glycine-rich loop of Hsp90 client kinases.

Mol Cell Biol. 26(9):3378-89. ,2006

Yamada M, Ohnishi J, Ohkawara B, Iemura S, Satoh K, Hyodo-Miura J, Kawachi K, Natsume T, Shibuya H.

NARF, an Nemo-like Kinase (NLK)-associated Ring Finger Protein Regulates the Ubiquitylation and Degradation of T Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor (TCF/LEF).

J Biol Chem. 281(30):20749-60. ,2006

Sato S, Fukasawa M, Yamakawa Y, Natsume T,

Suzuki T, Shoji I, Aizaki H, Miyamura T, Nishijima M.
Proteomic profiling of lipid droplet proteins in hepatoma cell lines expressing hepatitis C virus core protein.

J Biochem (Tokyo). 139(5):921-30. ,2006

Polouliakh N, Natsume T, Harada H, Fujibuchi W, Horton P.

Comparative genomic analysis of transcription regulation elements involved in human map kinase g-protein coupling pathway.

J Bioinform Comput Biol. 4(2):469-82. ,2006

Hyodo-Miura J, Yamamoto TS, Hyodo AC, Iemura S, Kusakabe M, Nishida E, Natsume T, Ueno N. XGAP, an ArfGAP, is required for polarized localization of PAR proteins and cell polarity in *Xenopus* gastrulation.

Dev Cell. 11(1):69-79. ,2006

Hamazaki J, Iemura S, Natsume T, Yashiroda H, Tanaka K, Murata S.

A novel proteasome interacting protein recruits the deubiquitinating enzyme UCH37 to 26S proteasomes.

Embo J 25(19):4524-36. ,2006

Kajino T, Ren H, Iemura S, Natsume T, Stefansson B, Brautigan DL, Matsumoto K, Ninomiya-Tsuji J. Protein phosphatase 6 down-regulates TAK1 kinase activation in the IL-1 signaling pathway.

J Biol Chem 281(52):39891-6. ,2006

Hirano Y, Hayashi H, Iemura S, Hendil KB, Niwa S, Kishimoto T, Kasahara M, Natsume T, Tanaka

K, Murata S.

Cooperation of Multiple Chaperones Required for the Assembly of Mammalian 20S Proteasomes.

Mol Cell 24(6):977-84 ,2006

学会発表

夏目 徹 (2006)

ケミカルバイオロジー：大規模タンパク質ネットワーク解析からの展開.

第30回 阿蘇シンポジウム

夏目 徹 (2006)

ケミカルバイオロジー：大規模タンパク質ネットワーク解析からの展開.

第65回 日本癌学会学術総会

夏目 徹 (2006)

パスウェイ・ネットワークの絶対定量による動態解析.

文部科学省科学研究費補助金 特定領域「ゲノム」4領域 2006年度合同班会議

夏目 徹 (2006)

ケミカルバイオロジー：大規模タンパク質ネットワーク解析からの展開.

第23回 Combinatorial Chemistry 研究会

夏目 徹 (2006)

ケミカルバイオロジー：大規模タンパク質ネットワーク解析からの展開

日本学術振興会ゲノムテクノロジー

第164回委員会シンポジウム

夏目 徹 (2006)

「化合物等を活用した生物システム制御基盤

技術開発」プロジェクトの概要
JBIC2006 プロジェクト研究成果報告会

分とする抗腫瘍剤
出願番号：特願 2007-010790
出願人：産総研
出願日：2007/01/19

夏目 徹 (2006)
ケミカルバイオロジープロジェクト：大規模
タンパク質ネットワーク解析から創薬へ。
ゲノム創薬フォーラム 第9回シンポジウム

実用新案登録
なし
その他
なし

夏目 徹 (2006)
ケミカルバイオロジープロジェクト：大規模
タンパク質ネットワーク解析からの展開
第6回 ケモゲノミクス研究会。

夏目 徹 (2006)
パスウェイ・ネットワークの絶対定量による
動態解析。
文部科学省科学研究費補助金 特定領域「生
命システム情報」2006年度域個別班会議。

夏目 徹 (2006)
ケミカルバイオロジープロジェクト：大規模
タンパク質ネットワーク解析からの展開。
第3回びわこバイオ国際セミナー。

夏目 徹 (2006)
Systemic Analysis of Protein Interaction Networks
using Human Full-Length cDNA ?
7th Joint Conference of the American Association
for Cancer Research and the Japanese Cancer
Association

H. 知的財産権の出願・登録状況
特許取得

発明者：夏目 徹、新家一男
名称：新規ピエリシジン誘導体又はその
塩、その製造方法及び該誘導体を有効成

【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-calcipain 10	Endoc J	53	567-576	2006
Kitajima TS, <u>Natsume T</u> 他	Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin	Nature	441	46-52	2006
Terasawa K, <u>Natsume T</u> 他	Cdc37 interacts with the glycine-rich loop of Hsp90 client kinases	Mol Cell Biol	26	3378-3389	2006
Yokoi N, <u>Horikawa Y</u> , 他	Association Studies of Variants in the Genes Involved in Pancreatic β -Cell Function in Type 2 Diabetes in Japanese	Diabetes	55	2379-2386	2006
Yamada M <u>Natsume T</u> 他	NARF, an Nemo-like Kinase (NLK)-associated Ring Finger Protein Regulates the Ubiquitylation and Degradation of T Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor (TCF/LEF).	J Biol Chem	281	20749-20760	2006
Sato S <u>Natsume T</u> 他	Proteomic profiling of lipid droplet proteins in hepatoma cell lines expressing hepatitis C virus core protein	J Biochem (Tokyo)	139	921-930	2006
Polouliakh N, <u>Natsume T</u> 他	Comparative genomic analysis of transcription regulation elements involved in human map kinase g-protein coupling pathway	J Bioinform Comput Biol	4	469-482	2006
Hyodo-Miura J, <u>Natsume T</u> 他	XGAP, an ArfGAP, is required for polarized localization of PAR proteins and cell polarity in Xenopus gastrulation	Dev Cell	11	69-79	2006
Hamazaki J, <u>Natsume T</u> 他	A novel proteasome interacting protein recruits the deubiquitinating enzyme UCH37 to 26S proteasomes	EMBO J	25	4524-4536	2006
Kajino T, <u>Natsume T</u> 他	Protein phosphatase 6 down-regulates TAK1 kinase activation in the IL-1 signaling pathway	J Biol Chem	281	39891-39896	2006
Hirano Y, <u>Natsume T</u> 他	Cooperation of Multiple Chaperones Required for the Assembly of Mammalian 20S Proteasomes	Mol Cell	24	977-984	2006

【IV】研究成果の刊行物・別刷

REVIEW

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

YUKIO HORIKAWA

Department of Diabetes and Endocrinology, Gifu University School of Medicine, Gifu; the Laboratory of Medical Genomics, Biosignal Genome Resource Center, Institute for Molecular and Cellular Regulation, Gunma University, Gunma; Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST), Japan Science and Technology Corporation (JST), Kawaguchi, Japan

Key words: Calpain 10, SNP, Haplotype Type 2 diabetes mellitus, *NIDDM1*

(Endocrine Journal 53: 567–576, 2006)

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

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

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 Ameri-

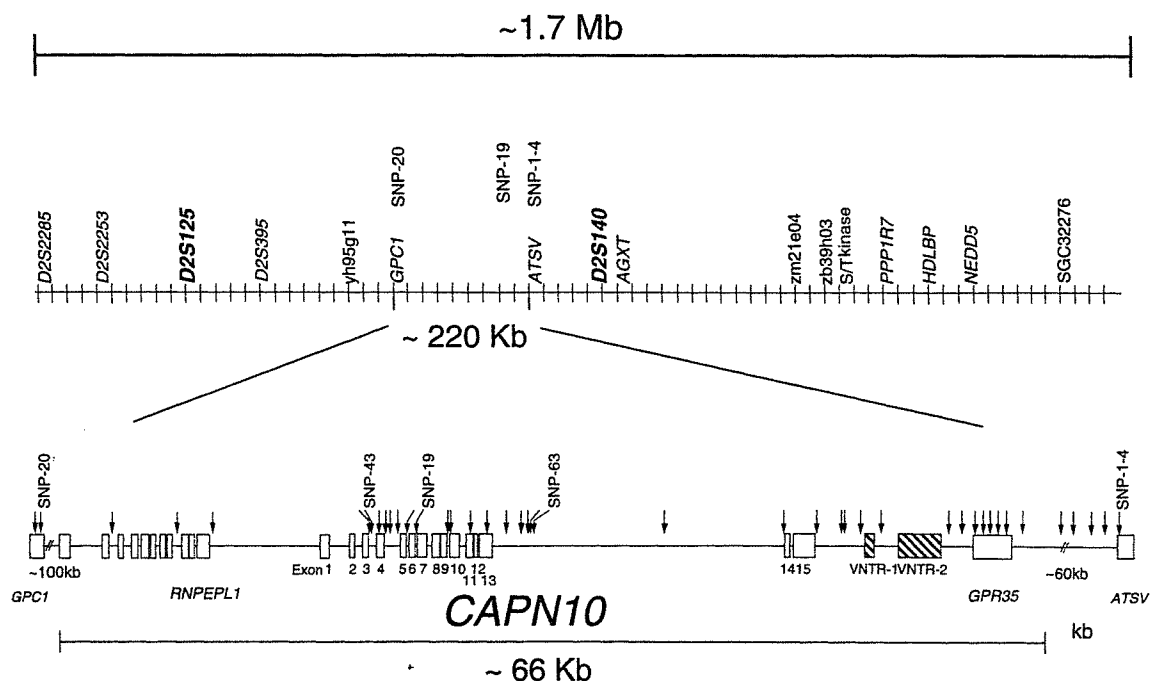


Fig. 1. The guide map of identification of *NIDDM1* SNPs are numbered in the order in which they were identified. Genes and ESTs were found on screening the GenBank database with the indicated STS. The locations of the SNPs typed in 110 patients and the 112 random samples are shown by arrows.

can 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.

Genetic analysis of *NIDDM1* in various populations

An analysis of *NIDDM1* including SNP-44, which is located near SNP-43 and affects transcriptional activity, in British and Irish whites found a significant association of SNP-44 with type 2 diabetes. SNP-44 showed significant LD transmission singly and was in complete LD with the missense mutation T504A. Thus, proteins with mutations or altered transcription expression levels contribute to the development of type 2 diabetes in this population [6]. A recent meta-analysis with additional genotyping in 4213 individuals (2056 type 2 diabetes patients and 2157 healthy individuals) found the O.R. of the development of diabetes to be 1.17 (95% C.I., 1.02 to 1.34) for SNP-44 with 80% statistical power [7]. Another large-scale meta-analysis involving 2288 type 2 diabetes patients and 3041 healthy individuals found O.R. of 1.19 (95% C.I., 1.07 to 1.33) for SNP-43 alone [8]. Racial differences were reported in the association of three SNPs (SNP-43, -19, and -63) with the incidence of diabetes [9–16]. An analysis in Japanese found no significant association between diabetes and these haplotype combinations [17]. In addition, a case-control association analysis in nearly 1000 patients and controls found that the minor allele of SNP-19 and the 121 haplotype was associated with reduced risk in Japanese diabetes patients aged 50 years or over [18]. Unfortunately, most of the original studies included in the these meta-analyses were based on genotyping only SNP-43, SNP-19, and SNP-63, without consideration of LD blocks specific to each ethnic group. Thus, the frequencies of the haplotypes in each population remain to be carefully assessed. For example, the pattern of LD in *CAPN10* was evaluated by calculation of r^2 both

in Japanese and in Mexican Americans from the genotype data using 17 SNPs for all possible pairs with 96 control subjects (Fig. 2A & B). The distribution of LD was similar in the two populations, and at least four major SNP subgroups with minor differences were present. Since more SNPs are found in tight linkage with each other in Japanese than in Mexican Americans (Fig. 2B), Japanese may have higher LD in this locus.

To clarify the ancestral role of these high-risk haplotypes in the development of diabetes, a genotyping survey was undertaken in human individuals from various populations and other primates. The presence of positive natural selection at the calpain-10 locus that cannot be explained by genetic drift has previously been established [19]. Comparison of human individuals from various populations with primates revealed that the 111-haplotype was likely to carry the ancestral allele in all populations, while the 112-haplotype was selectively favored in African populations, and the 121- and 221-haplotypes were selected in populations outside Africa in the process of racial migration toward Europe, Asia, and America. In addition, the survey showed that the four major haplotypes (111-, 112-, 121-, and 221-) occur in Native Americans, an ancestral population of Mexican Americans, and that recent admixture between populations was not a factor [19].

Haplotypes with minor allele SNP-44 have almost no other polymorphisms, suggesting recent and rapid positive selection of these haplotypes. According to the common disease common variant hypothesis, major alleles can be disease susceptibility alleles, represented by PPAR γ (Pro12Ala) for type 2 diabetes [20]; minor alleles as susceptibility alleles are represented by ApoE ($\epsilon 4 < \epsilon 3$) for coronary artery diseases [21] or Alzheimer's disease [22] and the calpain-10 gene (SNP-44 C<T) for type 2 diabetes [6, 7]. For the latter two genes, the major allele may have originally been beneficial by reducing the risk of common metabolic syndromes but become detrimental relatively recently.

Summary statistics in various populations for polymorphisms on the 33465 base pairs in the *NIDDM1* region including calpain-10 and *GPR35* show a higher frequency of mutation at the calpain-10 locus than at the *GPR35* locus. In addition, sliding window analysis reveal a high frequency of polymorphisms in intron 13 of calpain-10 that cannot be fully characterized by the neutral hypothesis. Simulation analysis indicates that this locus cannot be explained with a simple two-allele