

細胞内局在よりみた転写因子遺伝子異常に  
よる MODY の発症機序

(課題番号 13671201)

平成 13 年度～平成 14 年度科学研究費補助金

(基盤研究 (C))

研究成果報告書



平成 15 年 10 月

研究代表者 尾形真規子

(東京女子医科大学医学部・助手)



「はしがき」

MODY1 は HNF4 $\alpha$  遺伝子変異により生じ、インスリン分泌の低下を示す。しかし、ノックアウトマウスは産まれる事ができず、そのヘテロノックアウトマウスは糖代謝異常を示さない。このため動物を用いた検討は不可能であり、HNF4 $\alpha$  遺伝子変異による糖尿病の発症機序には不明な点が多い。また蛋白の細胞内局在によって、その蛋白の機能が変わることが報告されている。MODY 1 発症の原因遺伝子である HNF4 $\alpha$  蛋白の細胞内局在の変化を決定する HNF4 $\alpha$  遺伝子の部位および役割について、前年度に引き続き、更に検討した。

#### 研究組織

研究代表者 : 尾形真規子 (東京女子医科大学医学部助手)  
研究分担者 : 淡路健雄 (東京女子医科大学医学部講師)  
研究分担者 : 岩崎直子 (東京女子医科大学医学部講師)

#### 交付決定額 (配分額)

(金額単位: 千円)

|          | 直接経費    | 間接経費 | 合計      |
|----------|---------|------|---------|
| 平成 13 年度 | 2 5 0 0 | 0    | 2 5 0 0 |
| 平成 14 年度 | 5 0 0   | 0    | 5 0 0   |
| 総計       | 3 0 0 0 | 0    | 3 0 0 0 |

## 研究発表

### (1) 学会誌等

Makiko Ogata, Takeo Awaji, Naoko Iwasaki, Miyazaki Syunnichi,  
Yasuhiko Iwamoto : Nuclear transcription of SHP and visualization of  
interaction with HNF-4 $\alpha$  in living cells *Biochemical & Biophysical  
Research Communication* 292,8, 2002

### (2) 口頭発表

尾形真規子

第44回日本糖尿病学会年次学術集会 2001年4月16日

MODY 1(HNF4 $\alpha$ )遺伝子変異と転写抑制因子 SHP との関係：細胞内局在  
による検討 糖尿病44巻2001 Supple. 28

第45回日本糖尿病学会年次学術集会 2002年5月17日

シンポジウム6：インスリン分泌の分子機構

インスリン分泌反を調節する転写因子 HNF4 $\alpha$ とその抑制因子 SHP との  
関係—細胞内局在よりみた二因子の関係— 糖尿病45巻 Supple. 18

第99回日本内科学会講演会 2002年4月

MODY 1(HNF4 $\alpha$ )遺伝子変異による糖尿病発症機序の検討：転写抑制因  
子 SHP との関連 日本内科学会雑誌 第91巻 329

## 「研究成果」

核小体局在に関与すると思われる 332~338 アミノ酸の前後を含めた、329~341 番アミノ酸配列のそれぞれについて、単一アミノ酸置換の変異 HNF4 $\alpha$ に、蛍光色素 EGFP を融合した遺伝子を作製した。また 324 ~335 番、337~341 番アミノ酸配列をコードする遺伝子を欠失した変異 HNF4 $\alpha$ と EGFP とを融合した遺伝子を作製した。これら EGFP を融合した遺伝子を、COS7 に導入し、蛍光顕微鏡にて観察した。その結果 329~341 番の単一アミノ酸の変異 HNF4 $\alpha$ 蛋白は全て、また 337~341 番のアミノ酸の抜けた HNF4 $\alpha$ 蛋白も、核内に局在し核小体が抜けた、wild HNF4 $\alpha$ 蛋白とほぼ同様の細胞内局在を認めた。324~335 番アミノ酸を欠失した HNF4 $\alpha$ 蛋白は核内に局在したが、SHP との共発現時と同様に一部細胞質にも局在した。HNF4 $\alpha$  蛋白の 332~338 番アミノ酸は HNF4 $\alpha$ 蛋白の細胞内局在にとって重要な役割をしていると考えられるが、単一のアミノ酸置換では蛋白の局在に変化は生じなかった。また 324 から 335 アミノ酸のかけた HNF4 $\alpha$ 蛋白の局在は変化しなかった。337~341 番アミノ酸を欠失した HNF4 $\alpha$ 蛋白は核内に局在し、一部細胞質にも局在したが、核小体には局在しなかった。341 番以降のアミノ酸配列の存在も HNF4 $\alpha$  蛋白の核小体への細胞内局在に関与していると考えられた。337~341 番アミノ酸の欠失した HNF4 $\alpha$ 蛋白は SHP と共発現したものと同様に、一部細胞質への局在が認められた。332 から 341 アミノ酸配列のうち、337 から 341 アミノ酸は、他の核内に局在する蛋白との結合に関与する可能性があると考えられた。

一方その抑制因子 SHP は若年発症の肥満の原因遺伝子であることが報告されている。その発症機序は HNF4 $\alpha$  蛋白の転写活性を抑制し、インスリン分泌能に影響することを介していると考えられている。HNF4 $\alpha$  と SHP の関係を細胞内局在により検討した。HNF4 $\alpha$  と SHP の遺伝子に蛍光色素 ECFP/EYFP 遺伝子を融合させ、培養細胞に遺伝子導入し、その細胞内局在を検討した。また HNF4 $\alpha$ -ECFP と SHP-EYFP、HNF4 $\alpha$ -EYFP と SHP-ECFP を共発現させた。更に SHP-EYFP と HNF4 $\alpha$ を導入する遺伝子の総量は同じで、共発現させる比率を(1:300,1:100,1:30,1:10,1:3,1:1)に変化させ、その割り合いによる細胞内局在の核内への変化率を求め、また対象として、HNF4 $\alpha$ -EYFP のみを遺伝子

導入した細胞も作製し、SHP と HNF4 $\alpha$  の結合比を検討した。その結果 HNF4 $\alpha$  を持たない COS7 細胞に SHP を遺伝子導入すると、SHP は細胞質に局在し、一方 HNF4 $\alpha$  を遺伝子導入すると、HNF4 $\alpha$  は核内に局在する。SHP と HNF4 $\alpha$  を共発現させると、SHP は核内に移行し、FRET を起こしていた。SHP-EYFP と HNF4 $\alpha$  を遺伝子導入し、細胞全体の蛍光と、核内に局在した蛍光の割合は、その比率が 3:1,1:1 で導入した細胞の核内の蛍光は、HNF4 $\alpha$ EYFP のみを遺伝子導入したものと有意差が無く、また 10:1 以上 SHP を含む割合で導入したものと有意に核内への局在が認められた。これらの結果より、SHP 蛋白は単独では細胞質内に局在し、HNF4 $\alpha$  蛋白に少なくとも二個以上が結合し、細胞質から細胞内へ移行する事が示唆された。今後も MODY の原因遺伝子を発現することにより、動物実験では明らかにできない糖尿病の発症機転を継続して検討して行く予定である。