

Title	Structure/functional studies of hepatocyte nuclear factor-1 α , a diabetes associated transcription factor
Author(s)	楊, 勤
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43139
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	楊 勤 <small>よう きん</small>
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 16667 号
学位授与年月日	平成14年3月8日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Structure/functional studies of hepatocyte nuclear factor-1 α , a diabetes associated transcription factor (糖尿病発症遺伝子 HNF-1 α 変異体の機能解析)
論文審査委員	(主査) 教授 松澤 佑次 (副査) 教授 宮崎 純一 教授 荻原 俊男

論文内容の要旨

【目的】

MODY (maturity-onset diabetes of the young) は、常染色体優性遺伝形式を示し、通常25才以下の若年で発症する糖尿病であると定義されている。近年の研究で膵 β 細胞や肝細胞に発現する転写因子である Hepatocyte nuclear factor-1 α (HNF-1 α) の遺伝子異常が MODY の 1 亜型である MODY3 の原因であることが明らかになった。しかし、その後の検討で、HNF-1 α 遺伝子変異は若年発症のみならず、中高年で発症した糖尿病患者にも存在していることが判明した。HNF-1 α 遺伝子変異を有する患者において発症年齢に多様性が存在している理由は不明である。本研究では遺伝子異常と表現型の関係を明らかにするために、日本人で同定された HNF-1 α 変異体の機能解析を行った。

【方法ならびに成績】

1. HNF 変異体の作製

糖尿病患者で見いだされた HNF-1 α 遺伝子変異である L12H (二量体形成領域の変異)、G191D・R263C (DNA 結合領域の変異)、P291fsinsC・P379fsdelCT・L584L585fsinsTC (転写活性領域の変異) を mutagenesis により導入した 6 種類の変異体 HNF-1 α 発現ベクターを作製した。L12H-、P291fsinsC-、P379fsdelCT-、L584L585fsinsTC 変異を有する患者は15才以下の若年で発症していたが、G191D・R263C変異を持つ患者は中高年で発症していた。

2. HNF 変異体の細胞内局在の検討

MIN6 細胞に遺伝子導入後、免疫染色にて細胞内局在について検討した。Wild type (WT)-、L12H-および G191D-HNF-1 α は核に限局して存在していた。一方、R263C-、P291fsinsC-、P379fsdelCT-、L584L585fsinsTC-HNF-1 α の発現は核と細胞質に認められ、これらの変異体では細胞内局在が変化していることが示された。

3. DNA 結合能の検討

Transthyretin (TTR) 遺伝子のプロモーター領域には HNF-1 α の結合配列が存在する。この配列を用いたゲルシフトにより、変異体の DNA 結合能を検討したところ、P291fsinsC-、P379fsdelCT- HNF-1 α の結合は WT と同程度に保たれていたが、他の変異体の結合能は限弱していた。特に L12H-、R263C-、L584L585fsinsTC- HNF-1 α の結合能はほぼ消失していた。

4. 転写活性の検討

Hela 細胞および膵β細胞株である MIN6 細胞に遺伝子導入後、リポーター遺伝子を用いて転写活性について検討した。Hela 細胞における L12H-、G191D-、R263C-、P291fsinsC-、P379fsdelCT-、L584S585fsinsTC- HNF-1α の転写活性はそれぞれ14%、88%、11%、2.0%、36%、3.7%と WT に比していずれも減弱していた。

MIN6 細胞を用いた検討では、L12H-、G191D-、R263C-、P291fsinsC-、P379fsdelCT-、L584L585fsinsTC- HNF-1α 変異体の転写活性はそれぞれ51%、98%、97%、0%、48%、16%であった。P291fsinsC- HNF-1α は量依存的に内因性 HNF-1α の活性を抑制し、dominant negative 作用を有することが判明したが、他の変異体においては dominant negative 作用は認めず、haploinsufficient mutation であると考えられた。

【総括】

MODY 患者で同定された HNF-1α 変異体の機能解析を行ったところ、変異体 HNF の細胞内局在・DNA 結合能・転写活性は種々の程度に障害されていた。機能解析の結果、変異体 HNF-1α には、haploinsufficient mutation と dominant negative mutation が存在することが判明した。若年で発症する HNF-1α 遺伝子異常を有する患者の変異体の転写活性は強く障害されており、変異体 HNF-1α の転写活性が糖尿病発症年齢に関連している可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

MODY (maturity-onset diabetes of the young) は、常染色体優性遺伝形式を示す糖尿病であり、転写因子である hepatocyte nuclear factor-1α (HNF-1α) は MODY3 の原因遺伝子である。

本研究は日本人で同定された6種類の HNF-1α 遺伝子変異 (L12H、G191D、R263C、P291fsinsC、P379fsdelCT、L584S585fsinsTC) の機能解析について検討を行ったものである。変異体の DNA 結合能は L12H、G191D、R263C、L584S585fsinsTC において、また細胞内局在については R263C、P291fsinsC、P379fsdelCT、L584S585fsinsTC において障害されていた。HeLa 細胞を用いた転写活性の検討では、6種類の HNF-1α 遺伝子変異体の転写活性はいずれも低下していた。一方、膵β細胞株である MIN6 細胞を用いた検討では、L12H、P291fsinsC、P379fsdelCT、L584S585fsinsTC 変異体の転写活性は障害されていたが、G191D、R263C 変異体の活性は保たれていた。MIN6 細胞での転写活性が障害されていた4種類の変異体を有する糖尿病患者はいずれも発症年齢が早く、インスリンまたは経口剤で治療を受けていた。一方、G191D、R263C の変異を持つ患者は発症年齢が遅く、食事療法のみでコントロールされていた。以上の結果より、MIN6 のようなインスリン分泌能を有する膵β細胞株における変異体 HNF-1α の転写活性の異常は HNF-1α 異常型糖尿病の発症年齢や治療法といった臨床像と関連している可能性が示された。

本論文は、変異体 HNF-1α の機能解析と HNF-1α 異常型糖尿病の臨床像の関連について重要な示唆を与える研究であり、学位の授与に値すると考えられる。