

日本人の糖尿病における  
グルコキナーゼ遺伝子異常の解析

佐 倉 宏

日本人の糖尿病における  
グルコキナーゼ遺伝子異常の解析

佐倉 宏

## 目次

序章	研究の背景	1
第一節	糖尿病の概観	2
第二節	グルコキナーゼの性質	4
第三節	日本人の糖尿病とグルコキナーゼ	7
第四節	グルコキナーゼ遺伝子とアイソフォーム	7
第一章	ヒトグルコキナーゼ遺伝子のクローニング	9
第一節	ヒトゲノムライブラリーのスクリーニング	10
第二節	ヒトグルコキナーゼ遺伝子の構造	12
第三節	結果の小括と考察	13
第二章	エクソンおよびエクソン周辺の変異	14
第一節	PCR-SSCP法	16
第二節	遺伝子異常の頻度	19
第三節	結果の小括と考察	22
第三章	転写制御領域の変異	23
第一節	ヒトとラットの遺伝子転写開始部位の上流の塩基配列の比較	25
第二節	糖尿病患者における変異の同定	27
第三節	結果の小括と考察	31
第四章	患者臨床像の解析	32
第一節	発症者の臨床像	33
第二節	家族の遺伝子異常の同定と経口糖負荷試験	34
第三節	クランプ試験	36
第四節	結果の小括と考察	39
第五章	考察	40
第一節	MODYとグルコキナーゼ異常	41
第二節	変異グルコキナーゼの酵素活性	43
第三節	グルコキナーゼ異常の臨床像	44
第四節	グルコキナーゼ異常の頻度	45
第五節	今後の課題	46
結論		48
謝辞		49
引用文献		50

## 序章 研究の背景

## 第一節 糖尿病の概観

糖尿病は生体内でのインスリンの効果が低下し、糖代謝をはじめとしたさまざまな代謝異常がおこる疾患である。患者数は日本人だけでも20人に1人、つまり500万人以上も人が罹患していると推定されている。糖尿病状態が長く続くと網膜・腎臓・神経などに特有の毛細血管障害を生じるほか、同年齢の対照の人に比べて動脈硬化の進展の速度が早くなることや感染症・癌の発生の頻度が高くなることが知られている。このことは、患者本人の損失になるばかりか社会的見地から見ても大きな人的・経済的損失をもたらす結果になるので、糖尿病の成因の解明と治療法の確立は現在非常に重要な課題となっている。

糖尿病は大きくインスリン依存性糖尿病 (IDDM: insulin-dependent diabetes mellitus) とインスリン非依存性糖尿病 (NIDDM: non-insulin-dependent diabetes mellitus) とに分けられている。前者は免疫学的機序により膵臓ランゲルハンス島β細胞が破壊されてインスリン分泌の絶対的低下がおきた病態であり、小児期に多く発症する。後者はインスリン分泌の相対的低下とインスリン作用の低下の両者に加わって主に成人になってから発症する病態であり、日本人の糖尿病の約95%を占めている。遺伝子が共通な一卵性双生児を用いて糖尿病の発症の一致率を調べた研究の結果、片方に糖尿病の発症を見たときにもう片方にも糖尿病がおこる割合は、発症時期に差があることも考慮に入ればインスリン依存性糖尿病では約45%、インスリン非依存性糖尿病では約83%であった。一方、二卵性双生児における一致率はインスリン依存性糖尿病では0%、インスリン非依存性糖尿病では約40%であり、一卵性双生児における発症の一致率より有意に低かった<sup>1)</sup>。この結果は糖尿病の発症には遺伝因子が関与しており、特にインスリン非依存性糖尿病における遺伝因子の関与の程度が大きいことを示している。もちろん、糖尿病はこの遺伝因子だけではなく発症せず、肥満、過食、ストレス、運動不足、ウイルスといった外的・環境因子が加わって初めて発症するのであるが、双生児の研究から遺伝因子が糖尿病発症に極めて重要な役割を果たしていることがよく理解される。この遺伝因子とは、突き詰めて考えるならば何らかの遺伝子の異常ということになるであろうが、残念ながら最近までに実際に同定された糖尿病の原因となりうる遺伝子はほとんどないと言ってよい。わずかにインスリン<sup>24)</sup>とインスリン受容体<sup>27)</sup>の遺伝子異常によっておこる糖尿病が少数知られているだけである。より多数の患者の原因となって

いる遺伝子異常がいくつか存在するはずであり、それらをひとつひとつと解明していく必要がある。

糖尿病の発症因子を遺伝子レベルで解明する前段階としてまず、糖尿病の病態を分子レベルで概観しておく必要がある。糖尿病の病態は大きく膵臓ランゲルハンス島β細胞からのインスリンの分泌の低下と、筋肉、肝臓、脂肪組織などのインスリンの標的臓器におけるインスリン作用の低下とに分けることができる。Fig. 1はインスリンとグルコースを中心として糖代謝をごく簡単に模式図に表わしたもののだが、糖尿病の原因となる異常のほとんどはこの図のどこかのステップにあると考えて大きな誤りはないであろう。

体内の臓器の機能や種々の代謝ステップには普通かなりの余力があり、遺伝的に部分的な機能の欠陥があっても病的な症状はほとんど表にでないが、Fig. 1の糖代謝機構に関しては余力がほとんどないようである。それは、進化の歴史においてヒトを含めた動物は飢餓状態にあることの方が普通であり、生命保持に必要な血液中のグルコースを異化作用によって産生する必要はあっても、同化作用によってグルコースを体内に蓄積する働きのあるインスリンはあまり必要としなかったためだと思われる。機能に余力がないということはFig. 1のどのステップの軽い異常でも糖尿病は発症しようということであり、現代という飽食の時代において糖尿病の患者が多数存在している事実がうまく説明できる。

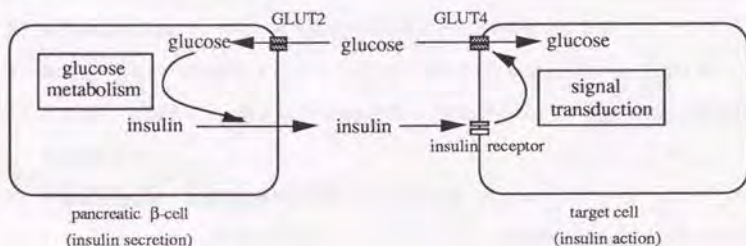


Fig. 1 Insulin Secretion and Action

In pancreatic β-cell, glucose is transported into the cell through GLUT2 (glucose transporter type 2), and the metabolic products of glucose induce insulin secretion. In target cells such as muscle and fat tissue, insulin binds to insulin receptor and translocates GLUT4 (glucose transporter type 4) to the cell surface through signal transduction mechanism. Any abnormalities in these pathways can be candidates to cause diabetes mellitus.

Fig. 1の中で分子レベルまで解明されているものはまだ少数であるが、その中でグルコース代謝に関与しているグルコキナーゼ (glucokinase) が重要な働きをしていることが最近明らかになってきている。そこで、本論文においてはグルコキナーゼに焦点を当てて、この酵素が糖尿病、中でもインスリン非依存性糖尿病の原因としてどのように関与しているか考察していきたい。

## 第二節 グルコキナーゼの性質

グルコキナーゼ (ATP:D-glucose 6-phosphotransferase, EC 2.7.1.2) はグルコースをリン酸化してグルコース 6リン酸に変換する解糖系の第一段階に位置する酵素である。この活性を持つ酵素はヘキソキナーゼ (hexokinase) と総称され、ホスホフルクトキナーゼ (phosphofruktokinase)、ピルビン酸キナーゼ (pyruvate kinase) と並んで解糖系の中で律速段階を構成している重要な酵素である。グルコキナーゼはヘキソキナーゼの一亜型であり、ヘキソキナーゼ type IVとも呼ばれる。この酵素は他のヘキソキナーゼ (type I-III) と異なり、次のような臓器分布、構造上の特徴、酵素的特性を有している<sup>8,9)</sup>。

- 1) 膵臓ランゲルハンス島β細胞と肝臓にのみ酵素活性が認められる。
- 2) 分子量は約 50 kD で、他のヘキソキナーゼのおよそ半分の大きさである。
- 3) 他のヘキソキナーゼと異なり、グルコース 6リン酸による product inhibitionを受けない。
- 4) グルコースに対する Km 値が 10 - 15 mM と高く、生理的グルコース濃度の範囲で活性が大きく変化する。
- 5) グルコースに対する基質特異性が他のヘキソキナーゼに比べて高い。

このような性質は、グルコキナーゼがグルコースセンサーとして機能する可能性を示している。つまり、グルコキナーゼは糖代謝を考える上で重要な臓器に発現しており、膵臓ランゲルハンス島β細胞におけるグルコース利用の反応速度や Km 値がグルコキナーゼの反応速度や Km 値とよく一致し、グルコース以外のヘキソキナーゼはほとんどインスリン刺激活性を持たず、またグルコキナーゼの阻害剤である D-mannoheptulose、alloxan、ninhydrin はインスリン分泌も抑制することなどをよく説明しうるのである<sup>10)</sup>。

なお、ラットの膵臓ランゲルハンス島においてはグルコキナーゼは可溶性蛋白質の約0.02%を占めていると見積られており、肝臓においては胎児期には発現していないが生後15日位から発現して生後30日で成体と同じレベルの可溶性蛋白質の約0.1%に達すると推定されている<sup>11)</sup>。

膵臓ランゲルハンス島β細胞はグルコース濃度に応じてインスリンを分泌する。また、肝臓はグルコースやインスリン濃度に応じて糖利用、糖新生を行う。この機構をグルコキナーゼを中心にして描くと Fig. 2 のようになる。膵β細胞ではグルコースは受動的グルコース輸送体 (GLUT2) を通して細胞内に入り、解糖系、TCA cycle、ミトコンドリア電子伝達系を経て代謝される。その結果、ATP/ADP 比が増大し、ATP 感受性カリウムチャンネルが抑制されて細胞膜が脱分極をおこし、続いて電位依存性カルシウムチャンネルが開き、細胞内カルシウム濃度が上昇して最終的にインスリン分泌が促進される<sup>12)</sup>。

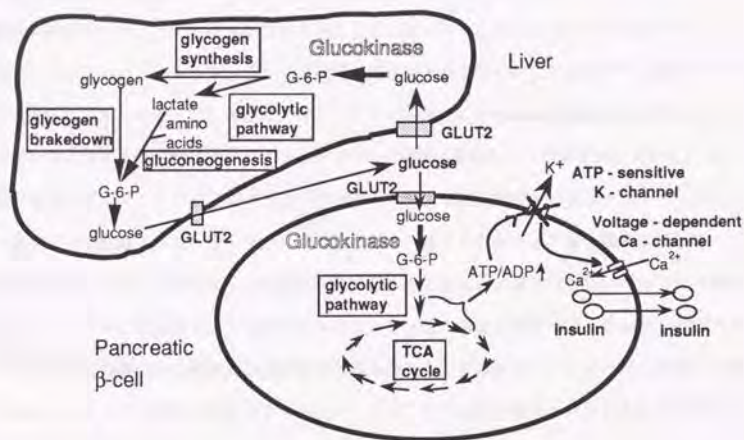


Fig. 2 Function of Glucokinase

Glucokinase is expressed in pancreatic β-cells and liver. Glucokinase phosphorylates glucose to produce glucose-6-phosphate as the first step of the glycolytic pathway. It is the key enzyme for insulin secretion in pancreatic β-cells and glucose utilization in the liver.



膵β細胞のグルコキナーゼ活性が低下するとグルコース刺激からインスリン分泌までの伝達が行われにくくなるので、同じ量のインスリンが分泌されるためには理論的には高濃度のグルコースが必要になる。また、肝臓においては主としてグルコースがグリコーゲンとして蓄積される過程でグルコキナーゼは働いている。したがって、グルコキナーゼ活性が低下するとグリコーゲンへの転換効率が悪くなり、食後の高血糖の原因になりうると考えられる。Matschinsky はグルコキナーゼ活性が15%低下すれば血糖は上昇するだろうと予想している<sup>9)</sup>。以上のような理由で、グルコキナーゼのなんらかの異常は糖尿病の原因となりうるのである。解糖系の酵素では、ホスホフルクトキナーゼ (phosphofructokinase) やピルビン酸キナーゼ (pyruvate kinase) も律速段階を構成している重要な酵素であるので、その異常で糖尿病が発症する可能性は充分考えられる。グルコース代謝の第一歩であるグルコース輸送体 (膵β細胞および肝臓では GLUT 2) については輸送速度が非常に速いので Fig. 2 の流れの中では律速段階とはなりえず、その異常によって糖尿病がおこる可能性は低いと考えられている<sup>8,13)</sup>。

最近、酵母のヘキソキナーゼB遺伝子を導入したトランスジェニックマウスが作製され、グルコキナーゼのグルコースセンサーとしての役割が個体レベルで明らかにされた<sup>14,15)</sup>。酵母ヘキソキナーゼBはグルコキナーゼと同様にグルコース6リン酸による product inhibition を受けないが、グルコースに対する親和性はヘキソキナーゼI-IIIと同様に高いという性質を持っている。この遺伝子をラットインスリンIIプロモーターに接続して膵β細胞に特異的に発現するトランスジェニックマウスが作製された。そのマウスから分離された膵ランゲルハンス島を種々のグルコース濃度の存在下に培養してインスリンの分泌状態を調べたところ、3-9 mMの低いグルコース濃度ではコントロールに比べておよそ2倍のインスリン分泌量の増加を認めたが、15 mMの濃度ではコントロールとの間で全く分泌量に差が認められなかった。これはグルコキナーゼと類似した性質の酵母ヘキソキナーゼBの発現によりグルコースセンサー機能が変化したことを示す成績であり、非常に興味深い。

### 第三節 日本人の糖尿病とグルコキナーゼ

前節で述べたように、インスリン非依存性糖尿病の基本病態として、膵 $\beta$ 細胞でのインスリン分泌不全（特にグルコース反応性の低下）と末梢組織でのインスリンの作用の低下が挙げられるが、このどちらがより本質的であるのかは議論の分かれるところである。アメリカの Pima Indian は糖尿病を高率に発症する種族として知られているが、その Pima Indian を解析した研究からは、インスリン作用の低下（インスリン抵抗性）が最初におこって耐糖能異常が生じ、そこにインスリン分泌低下が加わって糖尿病が発症するという two-step model が提唱された<sup>16)</sup>。しかし、日本人のインスリン非依存性糖尿病では、むしろインスリン分泌低下の方がより本質的であると考えられている<sup>17,18)</sup>。グルコキナーゼは前節で述べたように膵 $\beta$ 細胞でグルコースセンサーとして働いていると考えられるので、その異常がおきればインスリンの分泌異常がおきることが予想される。したがって、日本人においては欧米人以上にグルコキナーゼが糖尿病の原因の候補遺伝子 (candidate gene) として注目されるのである。

### 第四節 グルコキナーゼ遺伝子とアイソフォーム

グルコキナーゼの cDNA は、グルコキナーゼに対する抗体を用いて 1987年に初めてラットの肝臓から単離された<sup>19)</sup>。引き続いて、ラットの膵 $\beta$ 細胞と脳下垂体からグルコキナーゼの cDNA、およびゲノム DNA が相次いでクローニングされた<sup>20,21)</sup>。その結果、膵 $\beta$ 細胞のグルコキナーゼの mRNA は肝臓のグルコキナーゼの mRNA よりおよそ 200 bp 長いことがわかったが、この違いは N 末端の配列の相違に基づいていた。ゲノム構造を調べた結果、ラットの膵 $\beta$ 細胞と肝臓のグルコキナーゼ遺伝子は両方とも 10 個のエクソンから構成され、第 2 エクソンから第 10 エクソンまでは共通であるが第 1 エクソンについては膵 $\beta$ 細胞と肝臓では異なるプロモーターを利用していることが判明した。肝臓の第 1 エクソンは第 2～10 エクソンに比較的近接して存在していたが、膵 $\beta$ 細胞の第 1 エクソンは他のエクソンの 12 kb 以上も上流に位置していた。このように alternative splicing によって肝臓と膵 $\beta$ 細胞とでは異なるアイソフォームが生成されるわ

けであるが、この両者をサイトメガロウイルスのプロモーターに接続して NIH3T3 細胞で発現させたところ Km や Vmax などの酵素活性には差が認められないことがわかった<sup>21)</sup>。この結果は肝臓および膵β細胞のグルコキナーゼ活性を直接調べた結果とよく一致している<sup>11)</sup>。

膵β細胞と肝臓とはグルコキナーゼの発現の制御機構は全く異なっている。膵β細胞のグルコキナーゼの発現は主にグルコース濃度により調節されており、肝臓のグルコキナーゼの発現は主にインスリンによって調節されている<sup>23-25)</sup>。膵β細胞と肝臓のグルコキナーゼ遺伝子がそれぞれ異なった第1エクソンを持つということはその上流に存在する転写制御領域も互いに異なっていると考えられるので、両者の発現調節機構の相違を説明するのに都合がよい結果となっている<sup>26,27)</sup>。

以上はラットの遺伝子で明らかにされた知見である。ヒトの遺伝子構造についてはまだ知られていないので、第一章に述べるようにまずそのクローニングを試みた。

## 第一章 ヒトグルコキナーゼ遺伝子のクローニング

ヒトのグルコキナーゼ遺伝子の異常を見つける第一歩としてヒトグルコキナーゼ遺伝子のゲノム構造と塩基配列を決定する必要がある。序章で述べたように、ラットにおいては膵臓ランゲルハンス島 $\beta$ 細胞型と肝臓型のグルコキナーゼ両方のcDNAおよびゲノム構造がすでに知られていた<sup>26,27)</sup>。一般にグルコキナーゼのように生体にとって重要な遺伝子の塩基配列やゲノム構造は動物種を越えて保存されている。そこで、まずラットのグルコキナーゼ遺伝子の一部をpolymerase chain reaction (PCR) 法を用いて増幅し、これをプローブとして用いてヒトゲノムライブラリーをスクリーニングしてグルコキナーゼ遺伝子を単離することとした。なおラットの遺伝子において $\beta$ 細胞型グルコキナーゼ遺伝子の第1エクソンだけは残りのエクソンと離れて存在していたので、スクリーニング用のプローブとしては $\beta$ 細胞型の第1エクソンおよび $\beta$ 細胞型と肝臓型に共通な第2エクソンの二つを用いることとした。

## 第一節 ヒトゲノムライブラリーのスクリーニング

### 実験方法

#### プローブの作製

$\beta$ 細胞型の第1エクソンを増幅するためのPCRプライマーについては、

Upstream (Sense) primer      5'-CATTACTCAAAGCCATC-3'

Downstream (Antisense) primer      5'-AAATAGTCCAGGCTTCTC-3'

$\beta$ 細胞型と肝臓型に共通な第2エクソンを増幅するためのPCRプライマーについては、

Upstream (Sense) primer      5'-TCGAGCAGATCCTGGCAGAG-3'

Downstream (Antisense) primer      5'-CTGAGCCTTCTGGGTGG-3'

のオリゴヌクレオチド対をDNA合成機 (Applied Biosystems 社 392 DNA/RNA Synthesizer) を用いて作製した。PCRのtemplateとして用いるラットDNAは肝臓より抽出し通常のプロトコルを用いて精製した。PCRの条件は、94℃1分、60℃1分、72℃1分、35サイクルとした。

増幅されたPCR産物はポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離し、目的の大きさのバンド (305 および 162 base pair) をゲルから切り出して精製した。約50 ngのDNAをrandom prime label法 (Amersham社より購入したキットを使用) でラベルしてプローブとした。

### スクリーニング

ヒトグルコキナーゼ遺伝子を単離するために用いたλファージのゲノムライブラリーは Clontech 社より購入した (Cat. No. ML1030j)。14 cm x 10 cm の角型シャーレ1枚あたりにファージ  $5 \times 10^6$  pfu ずつ計10枚 ( $5 \times 10^5$  pfu) 撒き、ニトロセルロースフィルターに移して、型通り hybridization を行った。hybridization 液の組成は

5 x Denhardt's solution
5 x SSPE
30 % formamide
0.5 % SDS
100 µg / ml salmon sperm DNA (denatured)

であり、ラベルしたプローブを入れた後、42 °C で12時間 incubation を行った。フィルターは  $2 \times$  SSC にて30分、 $0.5 \times$  SSC にて1時間 wash し、オートラジオグラフィーを行った。positive シグナルが認められた場合、さらに2回同様のスクリーニング操作を繰り返してクローンを単離した。

また、得られたクローンに cDNA のどの領域が含まれているかの概略を知るために下記の二種類のオリゴヌクレオチドを合成してクローンとの hybridization を行った。

肝臓型のN末端	5'-CCTCAGCAGGCAGGAGCATC-3'
C末端	5'-CATGGAGCCTGGGTGCTGTG-3'

### 実験結果

プローブを PCR 法にて作製した結果、β細胞型第1エクソンでは305 bp、第2エクソンでは162 bp と予想どおりの長さの DNA 産物が得られた。このプローブを用いてヒトゲノムライブラリーの  $5 \times 10^5$  個のファージをスクリーニングした結果、β細胞型第1エクソンをプローブとして用いたときは HGK-β の1個のクローンが単離され、第2エクソンをプローブとして用いたときは HGK-A ~ HGK-M の13個のクローンが単離できた。肝臓型のヒトグルコキナーゼ遺伝子蛋白質をコードしている部分の cDNA のN末端、またC末端部分に対応するオリゴヌクレオチドを使用して hybridization を行った結果、HGK-K、HGK-M の2個のクローンの中にヒトグルコキナーゼ遺伝子の全エクソンを含むほぼ全長が含まれることがわかった。

## 第二節 ヒトグルコキナーゼ遺伝子の構造

### 実験方法

上記のスクリーニングで得られたクローンのインサート DNA を電気泳動後切り出してプラスミドベクターに移し、Dideoxy chain termination 法を用いて塩基配列を決定した。なお、本章のプロトコルは Maniatis 編の *Molecular Cloning* (Cold Spring Harbor Laboratory Press) の方法に従って行った。

### 実験結果

ヒトグルコキナーゼ遺伝子の構造は Fig. 3 に示す通りであった。基本的には  $\beta$  細胞型も肝臓型も 10 個のエクソンから成り立っていること、 $\beta$  細胞型第 1 エクソンだけは他のエクソンと離れて 5' 側に位置しているがその他のエクソンは 10 kb 以内の範囲に存在していることなど、ラットと極めて類似した構造を持っていた。また、cDNA 上でイントロンが介在する位置についてもラットとヒトでは全く同一であった。ただし、Fig. 3 において IV で示したエクソンは、肝臓型の第 1 エクソンと第 2 エクソンの間に存在するもので、ラットにおいては同定されておらず、ヒトの肝臓型のごく一部でのみ発現が確認されているエクソンであった。

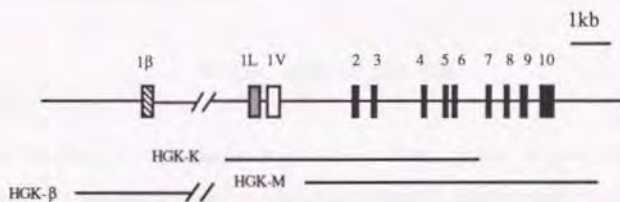


Fig. 3 Structure of the Human Glucokinase Gene

Boxes indicate location of each exon : hatched box,  $\beta$ -cell specific exon 1; shaded box, liver-specific exon 1; open box, liver-specific exon 1 variant.

Bottom lines indicate inserts of clones isolated from the bacteriophage  $\lambda$  library.

エクソン部分の塩基配列はヒトとラットとで約95%保たれていた。また、エクソン-イントロン境界部分の塩基配列の配列はTable 1に示す通りであった。エクソンとイントロンの境界部分の配列はいわゆるGT/AGルールが保たれていたが、その他のイントロン部分ではラットとヒトとの間で塩基配列はあまり保存されていなかった。

Table 1 Identification of Exon-Intron Boundaries of the Human Glucokinase Gene

	Exon	Intron	Exon	
1β	AAGGAGAAG/	gtatctcgc-----		
1L	TTGACTCTG/	gtaagggtc-----	acetctccag/	CCAGACTCT 1V
IV	AACTCCCAG/	gtcagatgg-----	ccctgtgcag/	GTAGAGCAG 2
2	AAGGCTCAG/	gtaccatat-----	gtgcctttag/	AAGTCGGGG 3
3	GCTGAGATG/	gtgagtagc-----	catcttccag/	CTCTTCGAC 4
4	ATCGATAAG/	gtgggccgg-----	ctccccacag/	GGCATCCTT 5
5	CGGAGAGGG/	gtgaggggg-----	ttctcgccag/	GACTTTGAA 6
6	TGATCGTGG/	gtaagggct-----	ccacccccag/	GCACGGGCT 7
7	TCAGCAGCT/	gtaaggatg-----	ctatgtccag/	GTATGAGAA 8
8	GGTGGAGAG/	gtgtgcgga-----	cgccccgcag/	CGACACACG 9
9	GCACCCAG/	gtgagcccq-----	ttctgcccag/	CTTCAAGGA 10

### 第三節 結果の小括と考察

ヒトのグルコキナーゼの遺伝子構造はラットときわめて類似していた。すなわち、基本的には10個のエクソンから構成され、第1エクソンだけがβ細胞型と肝臓型に分かれていた。エクソン部分についてはラットとヒトとの間で約95%の塩基配列が保存されていた。以上の塩基配列をもとにして次章以下糖尿病患者のグルコキナーゼ遺伝子変異の検索を行った。



## 第二章 エクソンおよびエクソン周辺の変異

前章で明らかにしたヒトグルコキナーゼ遺伝子の塩基配列をもとにして、糖尿病患者の中に実際にグルコキナーゼ遺伝子の変異が認められるかどうか検討した。遺伝子変異をスクリーニングする方法としては、Single-Stranded Conformational Polymorphisms (SSCP) 法を用いた。これは、グルコキナーゼ遺伝子のすべてのエクソンおよびそれに隣接しているイントロンをPCR法を用いて増幅し、次に増幅したDNAを変性した後にポリアクリルアミドゲル電気泳動して易動度の差で変異の有無を同定する方法である。

PCR-SSCP法は1989年に日本で開発されており<sup>28,29</sup>、遺伝子変異を非常に高感度で検出することができる。この方法の開発によりそれまで多くの時間と労力をかけて一例一例塩基配列していったものが、迅速にしかも多数の検体を同時にスクリーニングすることが可能となり、種々の遺伝子変異の検出速度が飛躍的に向上した。著者自身PCR-SSCP法を用いてこれまでに、既知のインスリン遺伝子の変異が全例検出できることを確認し<sup>30</sup>、実際にインスリン受容体<sup>31</sup>・グルコーストランスポーター遺伝子 (GLUT4)<sup>32</sup>において新たな変異の同定に成功している。

序章に述べたように、グルコキナーゼ遺伝子異常が日本人の糖尿病に存在する可能性はあるものの、実際にどの程度の頻度で存在するのかあらかじめ予測するのは不可能である。そこで今回のグルコキナーゼ遺伝子の解析にあたっては、できるだけ遺伝子異常の可能性のありそうな症例を選んで解析することにした。インスリン異常症<sup>2,40</sup>や一部のインスリン受容体異常症のように重要な生物活性を有している遺伝子に異常がある場合、糖尿病の発症は優性遺伝形式をとることが多い。序章にも述べたように、特に糖尿病の場合は遺伝子異常の程度が軽度であっても他の疾患に比べて発症しやすいと考えられる。また、遺伝子異常が重大なものであればあるほど若年でも発症するのではないかと推測される。そこで、今回の解析に当たっては、家族内の集積性が強く比較的若年で発症した症例を中心に選択した。また、インスリン依存性糖尿病は若年で発症することが多いが、遺伝的因子の発症への関与の度合はインスリン非依存性糖尿病よりはかなり少なく、また日本人では症例の絶対数も少ないので、今回はインスリン非依存性糖尿病の症例を解析対象とすることにした。

## 第一節 PCR-SSCP 法

### 実験方法

#### 対象患者

上に述べたように、遺伝子異常のある確率の高いと予想される次のような患者を解析対象とした (Table 2)。グループ 1 は、東京大学附属病院第三内科と朝日生命糖尿病研究所に通院中の約 5000 人のカルテを調べ、診断時年齢が 40 才以下、かつ発端者以外に 2 人以上の家族歴を有する患者であり、グループ 2、3、4 は全国の小児科施設にお願いして集めた 25 才以下の若い時期に発症した患者を家族歴に応じて分類したもので合計 209 人である。グループ 4 については定義上は、Tattersall と Fajans が提唱した maturity-onset diabetes of the young (MODY)<sup>33)</sup> と呼べる症例であると考えられる。もちろん、各症例の糖尿病の発症時期や家族歴を正確に把握することは困難なので、実際の分布は表とは違うと思われる。また、対照としては、糖尿病家族歴がなく 75 g 経口糖負荷試験 (OGTT; oral glucose tolerance test) が正常型を示した 49 人の健常人を用いた。

Table 2 Subjects Examined in This Study

Group No.	Age of onset	No. of family members with DM	No. of families
1	26 - 40	$\geq 2$	131
2	$\leq 25$	0	15
3	$\leq 25$	$\geq 1$	41
4	$\leq 25$	$\geq 3$ generation	22
			209

The subjects were recruited mainly from the Institute for Diabetes Care and Research, Asahi Life Foundation, and from several pediatric clinics throughout Japan. The 46 control subjects ranged from 18 to 60 yrs of age, showed normal patterns in 75g OGTT test and had a negative family history.

#### DNA の単離

患者の同意のもとに末梢血 10 ml を EDTA 採血し、そのうち 1 ml から blood PCR キット (Quiagen 社) を用いてゲノム DNA を単離・精製した。残りの血液は冷凍保存した。得られた DNA の内 2  $\mu$ g を制限酵素 Hind III で消化し、gene clean キット (Quiagen 社) で精製後、50 ng/ml の濃度になるように精製水に溶解した。

### PCR プライマー

各エクソンを増幅するためのプライマー配列を Table 3 に示すようにエクソン近傍のイントロン内に適宜選んだ。エクソンのごく近傍のイントロン部分は経験上 PCR がかかりにくいことやプライマーのすぐ近傍の塩基配列は決定しにくいことから、プライマーはエクソン-イントロン境界部位から 20 - 50 bp 離れた位置に作製した。

Table 3 Sequence of PCR Primers Pairs Used to Amplify Exons of the Human Glucokinase Gene

Exon	Upstream (Sense) primer	Downstream (Antisense) primer	Fragment size (bp)
1 $\beta$	AACCCCAAACCAGCCCGAGG	CACTCCCAGATGCCCAATGG	228
1L	CCTCAGCAGGCAGGAGCATC	TGCTCTCCCAGTGCAAAGTC	151
1V	CCATGTCCAGGCCAGTGGCC	AAGGGAGGTGGGAGGGGCTG	253
2	CAGCCCGACTGCTCCCATCC	TGCTTCTGGATGAGGAGCCG	232
3	TGTGGGTGTCCTGAGGCTG	TGAGATCCTGCATGGCCTTG	249
4	CCCCATGCCAGATGGTCACC	CTCCCTCATCTGCCTTCTG	196
5	TAGCAGCCACGAGGCCTATC	CCAAGGAGAAAGGCAGGCAG	202
6	TTCTCCTTGGCTTCCAGCAC	CAGGGAGCCTCAGCAGTCTG	193
7	AGTGCAGCTCTCGCTGACAG	CATCTGCCGCTGCACCAGAG	285
8	TGCCTGCTGATGTAATGGTC	TGAGACCAAGTCTGCAGTGC	263
9	ACTGTCCGAGCGACACTCAG	CTTGGAGCTTGGGAACCGCA	367
10	GTGGAGGATGAGGTGGGAGG	GCACGTGTGGGAGCACTTC	278

All primer sequences are shown in the 5'→3' orientation. Exon 1 $\beta$ , 1L, and 1V denote  $\beta$ -cell specific exon 1, liver-specific exon 1, and variant exon between exon 1L and 2, respectively.

### PCR-SSCP 法

まず、Table 3 に記載したプライマー対を下記のような方法で 5' 末端をラベルした。

10 x kination buffer	0.4 $\mu$ l
upstream primer	1.0 $\mu$ l
downstream primer	1.0 $\mu$ l
$\gamma$ - <sup>32</sup> P ATP	1.1 $\mu$ l
polynucleotide kinase	0.5 $\mu$ l
total	4.0 $\mu$ l

37℃で30分 incubation したのち、さらに次のような溶液を加えて攪拌した。

H <sub>2</sub> O	60.5 μl
10 x PCR buffer	10.0 μl
4 dNTP (2 mM each)	5.0 μl
Taq polymerase	0.5 μl
total	80.0 μl

あらかじめ患者の DNA サンプルを 1 μl ずつ入れておいた 0.5 ml microcentrifuge tube に、上記の反応で得られた 80 μl の溶液から 4 μl ずつを分注して加えていった。最後にミネラルオイルを 10 μl ずつ加えた。

PCR 反応は 94℃ 5分、55℃ 1分、72℃ 1分を 30 サイクル行った。ただし、第 8 エクソンと第 9 エクソンについては annealing の温度を 55℃ ではなく 60℃ で行った。

PCR 反応終了後 formamide dye 45 μl を加え、そのうち 1 μl を 80℃ に暖めて変性させて、5% アクリルアミドゲル (1:49) 電気泳動を行った。このとき、ゲルに 10% グリセロールを加えたものと加えないもの、および室温と 4℃ の条件を組み合わせた計 4 通りの方法で泳動した。泳動後ゲルを乾燥させ、1 2 時間程度オートラジオグラフィーを行った。

#### 実験結果

以上の方法を用いて 209 人の患者のすべてのエクソンについてスクリーニングを行った。Fig. 4 は SSCP 法によって電気泳動の易動度の違いが同定できた代表例である。PCR-SSCP 法を実験方法で述べた 4 条件すべてを用いて電気泳動した結果、Fig. 4 で示した条件で最も明瞭に易動度の違いが同定できたのであるが、他の 1~2 条件でもそれらの同定は可能であった。なお、Fig. 4A 右側の矢印で示したバンドを除いてはみな正常者のバンドと同じ位置にもバンドがあるが、これは対立遺伝子の片方のみに変異のあるヘテロ (heterozygous) 変異であることを示している。Fig. 4A 右側の矢印で示したバンドについては正常コントロールの位置にはバンドがないので、対立遺伝子の両方に変異がおきているホモ (homozygous) 変異であることを示している。

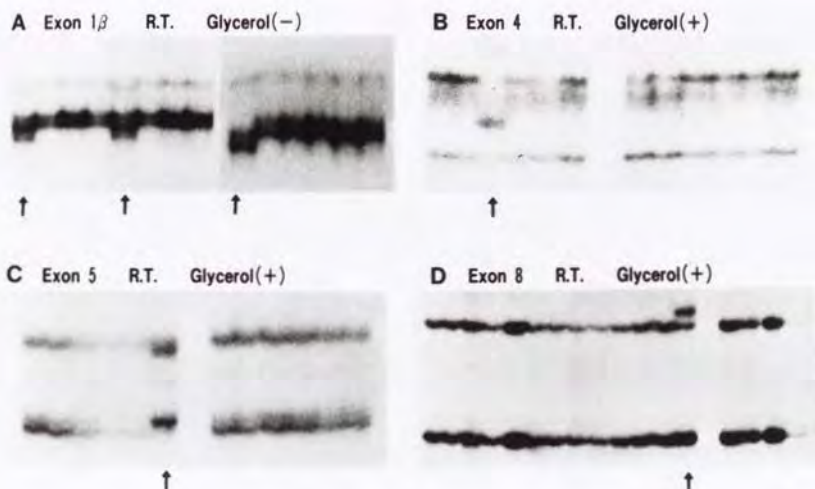


Fig. 4 Examples of Mobility Shifts of DNA Fragments due to Single Base Substitutions  
The samples were amplified by PCR with primer pairs of each exon listed in Table 3, and subjected to electrophoresis in non-denaturing polyacrylamide gels without glycerol (A), or containing 10% glycerol (B, C, D) at room temperature (R.T.). Arrows indicate shifted bands.

## 第二節 遺伝子異常の頻度

### 実験方法

#### シーケンス

PCR-SSCP法により易動度の差を認めたエクソンについては PUC 119 プラスミドベクター (TaKaRa) に subcloning して塩基配列の決定を行った。

#### 統計処理

糖尿病患者と正常人コントロールとの頻度の差は  $\chi^2$  検定を用いて行った。

### 実験結果

SSCP法で検出できた易動度の異なるPCR産物についてはすべて塩基配列を決定して実際の変異の同定を行った。Table 4はその結果をまとめたものである。

$\beta$ 細胞特異的第1エクソンについては、209人中21人において翻訳開始部位の84 bp上流に(C→G)変異が同定された。そのうち20人についてはヘテロ変異であったが、1人についてはホモ変異であった。正常人コントロールについては46人中4人に同じ変異が認められた。統計学的に糖尿病患者と正常人コントロールの間には頻度の有意差は認められなかった(5.3% vs 4.3%,  $\chi^2=0.0099$ ,  $df=1$ ,  $P=0.92$ )。

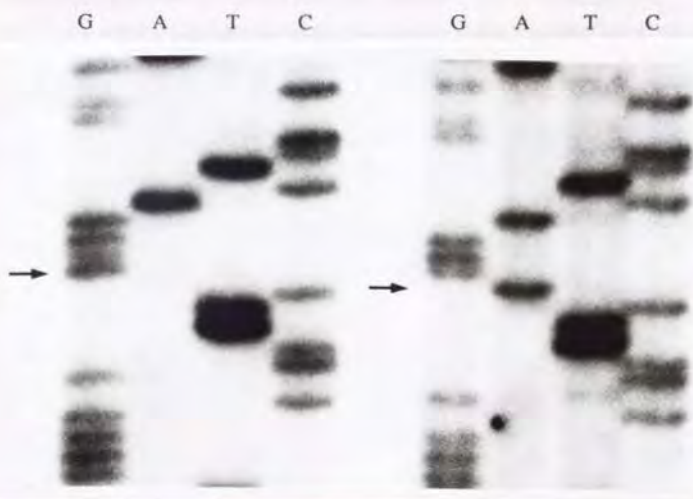
肝臓特異的第1エクソンの3'端下流12 bpには二人の患者で(A→T)変異が見つかり、第3エクソンの3'端下流19 bpには一人の患者で(G→A)変異が見つかった。また、第5エクソンでは3'端下流29 bpに(G→T)変異が五人、第8エクソンでは5'端上流10 bpに(C→T)変異が一人の患者に同定された。しかし、肝臓特異的第1エクソン、第3、5、8エクソン近辺に見いだされた変異はみなエクソンからやや離れたイントロン内に位置したものであり、グルコキナーゼの構造変異はおこさないものと考えられた。第4エクソンに三人の糖尿病患者で発見された変異はエクソン内にあったが、アミノ酸の変化をきたさない変異(silent mutation)であった。

Table 4 Summary of Mutations and Sequence Variations in the Glucokinase Gene Identified among 209 Japanese NIDDM Subjects

Nucleotide position	Sequence	No. of patients	allele frequency
exon 1 $\beta$ , 84 bp upstream of the translation initiation site	CGG <u>C</u> GGA → CGGGGGA	21	5.3% (control 4.3%)
exon 1L, 12 bp downstream from 3' end	CAC <u>A</u> CCA → CACT <u>T</u> CCA	2	0.5%
exon 3, 19 bp downstream from 3' end	GCCG <u>G</u> GG → GCC <u>A</u> GGG	1	0.2%
exon 4, at the codon 145	CC <u>C</u> (Pro) → CC <u>G</u> (Pro)	3	0.7% (silent mutation)
exon 5, 29 bp downstream from 3' end	GGG <u>G</u> GCT → GGG <u>T</u> GCT	5	1.2%
exon 7, at the codon 261	<u>G</u> GG (Gly) → <u>A</u> GG (Arg)	1	0.2% (missense mutation)
exon 8, 10 bp upstream from 5' end	GCC <u>C</u> TAT → GCC <u>T</u> TAT	1	0.2%

実際にアミノ酸の変化も伴う変異としては Table 2 のグループ 2 に属する若年発症のインスリン非依存性糖尿病の患者に認められた 1 例だけであった。この患者においては Fig. 5 に示すように N 末端から数えて 261 番目のアミノ酸にグリシン (GGG) からアルギニン (AGG) への変異 (missense mutation) が対立遺伝子の一方に認められた。なお、100 人の糖尿病のない人の DNA を SSCP にて解析をしたが、この変異は認められなかった。

患者およびその家族の臨床像については第四章に述べる。



	Phe <sup>260</sup>	Gly <sup>261</sup>	Asp <sup>262</sup>	Ser <sup>263</sup>	
Normal:	5'- TTC	<u>G</u> GG	GAC	TCC	- 3'
	3'- AAG	<u>C</u> CC	CTG	AGG	- 5'
Mutant:	5'- TTC	<u>A</u> GG	GAC	TCC	- 3'
	3'- AAG	<u>T</u> CC	CTG	AGG	- 5'
	Phe <sup>260</sup>	Arg <sup>261</sup>	Asp <sup>262</sup>	Ser <sup>263</sup>	

Fig. 5 Sequences of Exon 7 in the Region of Codon 261

Arrows indicate the position of the mutation identified in the patient. Normal (left) and mutant (right) alleles. Primer sequences to amplify exon 7 were identical to those in Table 3.



### 第三節 結果の小括と考察

比較的若年発症したインスリン非依存性糖尿病の患者209人のグルコキナーゼ遺伝子のすべてのエクソンをPCR-SSCP法によってスクリーニングした結果、数種類の変異を同定することができた。 $\beta$ 細胞特異的第1エクソンに認められた変異は解析した患者の5.3%とかなり高率に認められたが、対照として用いた正常者においても統計上の有意差なく認められたのでこの変異は糖尿病の原因とはなっていないと考えられた。肝臓特異的第1エクソン、第3、5、8エクソン近辺のイントロンに見いだされた変異もおそらくは糖尿病の原因とはならないと考えられるが、例えば第5エクソンの3'端下流29bpの位置に見いだされた(GGGGGCT→GGGTGCT)変異についてはsplicing donor site (-(G)/GT-)となりうる塩基配列を生じているので、これらの変異が本当に糖尿病の原因にならないかどうかはさらに研究が必要であろう。今回の解析の中でグルコキナーゼの酵素活性に変化がきたと思われる変異は、第7エクソン中の261番目のアミノ酸がグリシンからアルギニンに変異していた1例だけであった。この変異は健常人100人の中には認められず、また第五章で述べるように、この変異により酵素活性が失われることが示されているので、意味のある変異であると考えられた。単純に計算すればグルコキナーゼ遺伝子異常の頻度はインスリン非依存性糖尿病の0.5%ということになる。PCR-SSCP法はもちろんすべての変異を同定できるとは限らないし、PCRに用いたプライマーを含む領域にDNAの欠損がある場合はそれを同定するのは不可能である。しかしながら、SSCPの電気泳動を4つの条件できちんとしている点、過去の経験からのSSCP法の感度は非常に良いと考えられる点、第五章にも述べるがグルコキナーゼ異常症が認められやすいと考えられる若年発症のしかも家族歴の強いインスリン非依存性糖尿病の患者を中心に解析を行っている点などを考慮にいれると、頻度を低く見積り過ぎていることはないと考えられる。また、本章ではエクソンのスクリーニングを行ったが、遺伝子転写制御領域に異常がおきてグルコキナーゼの発現が低下して糖尿病になる可能性も考える必要がある。この点については第三章に述べる。

... (faint text) ...

### 第三章 転写制御領域の変異

... (faint text) ...

... (faint text) ...

... (faint text) ...

前章の結果、グルコキナーゼのエクソン部分の変異による糖尿病の頻度は日本人では高くはないことがわかった。しかし、蛋白質の構造に変化が起ころなくとも発現レベルが下がることによって酵素活性が低下する可能性がある。蛋白質の発現が低下する原因としては、遺伝子転写レベル、蛋白質への翻訳レベル、蛋白質の安定性、さらには蛋白質に対する阻害物質の産生等が考えられるが、その中でも遺伝子転写レベルの低下が最も蛋白質の発現に対する影響が大きいと思われる。実際に遺伝子転写制御機構の異常によっておこる疾患の存在もいくつか知られている<sup>34,35</sup>。

転写制御機構については主に転写開始部位の上流に存在する転写制御領域に転写制御蛋白質が結合し、それが引き金となって遺伝子の転写が始まると考えられている。現在、多くの遺伝子で転写制御領域や転写制御蛋白質を同定する研究が行われているが、高等生物ではそれらが明確に理解されている例は少ない。グルコキナーゼもその例外ではなくわずかにラットの $\beta$ 細胞型の転写制御領域が転写開始部位の上流 300 bp 以内のところにほぼ含まれているらしいことがわかっていただけである<sup>37</sup>。しかしながら、転写制御領域として重要な部位については動物種を越えて保存されていると思われるので<sup>38</sup>、本研究においてはまず、ラットとヒトのグルコキナーゼ遺伝子の転写開始部位の上流の塩基配列を比較し、塩基配列が高度に保存されている領域について何らかの異常が糖尿病患者で見つかるかどうか検討した。もし明らかに糖尿病を引き起こすような異常が見つければ、その部位は逆に遺伝子転写を考える上で重要な場所であると言える。

第1章の結果から明らかなように、グルコキナーゼ遺伝子の第1エクソンは $\beta$ 細胞型と肝臓型に分かれているので、転写制御領域もそれぞれの遺伝子の上流に存在するはずである。 $\beta$ 細胞型グルコキナーゼはグルコースにより、また肝臓型のグルコキナーゼはインスリンによって転写活性が制御されている事実は、転写制御領域がそれぞれ異なっていることの反映である。おそらくそれぞれの転写制御領域には、グルコースとインスリンによって誘導される転写制御蛋白質が結合する部位があるに違いない。

そこで本章においては、膵 $\beta$ 細胞型と肝臓型の両方について遺伝子変異の解析を行うことにした。

## 第一節 ヒトとラットの遺伝子転写開始部位の上流の塩基配列の比較

### 実験方法

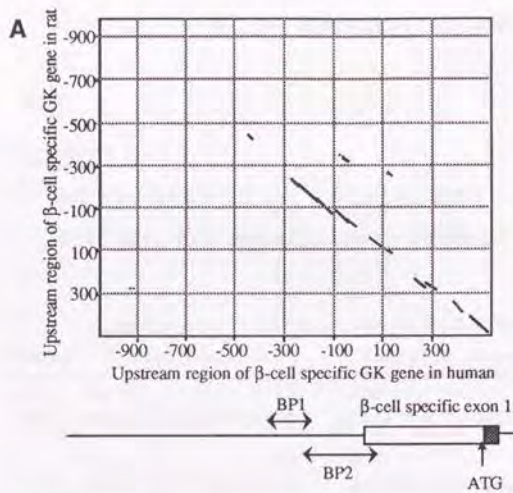
第一章でクローニングして得られたヒト $\beta$ 細胞特異型第1エクソンおよび肝臓特異型第1エクソンの転写開始部分周辺の塩基配列を決定し、ラットの当該部分の塩基配列<sup>22,25)</sup>と比較した。塩基配列の比較には Mac Vector の alignment program (window size = 50, minimum percent score = 50) を用いた。

### 実験結果

ヒトとラットのグルコキナーゼ遺伝子の転写開始部位の周辺の塩基配列の比較を行った結果、Fig. 6 に示されるような類似性が明らかとなった。すなわち、 $\beta$ 細胞型第1エクソンの上流においては、転写開始部位の上流 280 bp までの領域がヒトとラットの間でよく保存されていた。この領域はラットにおいて CAT アッセイ法などで転写制御領域として同定されていた領域とほぼ一致しており、動物間の塩基配列を比較する方法が妥当であることを示している<sup>27,28)</sup>。

一方、肝臓特異型第1エクソンの上流においては転写開始部位の上流 140 bp までの領域と970 bp 上流から 570 bp 上流までの間の2ヶ所によく保存された領域が存在していた。肝臓に発現しているグルコキナーゼについてはその転写制御領域が調べられていないので、今回同定した領域が真に重要な働きのある領域かどうかは定かではないが、上に述べたように動物種を越えて保存されているこの領域が転写制御に重要な領域と思われる。

以上の結果を基にして、糖尿病患者のグルコキナーゼ遺伝子転写制御領域の塩基配列に変化が生じているかどうか検討した。



Rat and human glucokinase

promoter sequences in pancreatic

$\beta$ -cells ( $\beta$ GK) and liver (LGK)

were compared using the

alignment program of the Mac

Vector (window size=50,

minimum percent score=50).

In  $\beta$ GK (A), sequence homology

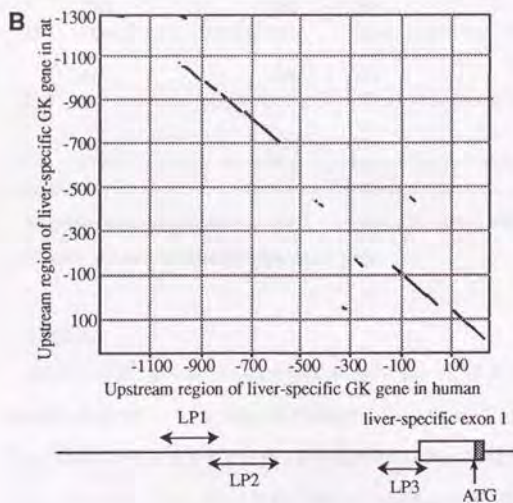
was identified in the region from

-280 to -1. The regions amplified

by PCR (BP1; -396 to -166, and

BP2; -224 to +66) are indicated

by arrows.



In the LGK (B), sequence

homology was observed in two

regions (-970 to -570, -140 to

-1).

Three arrows (LP1; -1011 to -781,

LP2; -819 to -551 and LP3; -147

to +51) indicate the regions for

PCR-SSCP analysis.

Fig. 6 Comparison of the Upstream Sequences from the First Exon of the Glucokinase Gene between Rat and Human and Regions Amplified by PCR for SSCP

## 第二節 糖尿病患者における変異の同定

### 実験方法

#### PCR用プライマー

ヒトとラットの転写開始部位上流にある塩基配列が保存されていた領域について適当なプライマー配列を選択して 200-300 bp ごとに DNA が増幅するようにした (Fig. 6, Table 5)。

Table 5 Sequences of PCR Primer Pairs for SSCP Analysis in the Promoter Regions

Region	Upstream (Sense) primer	Downstream (Antisense) primer	Fragment size (bp)
BP1	-396 TCTCTGGAGAGTTTACAGCC	-166 TCAATCGCCTTGTCACACTACAGTGAC	-190 231
	-224 TCTGAACAGGTGGCAAAGGC	+66 ATCCTAGCCTGCTTCCCTGGGGCTC	+41 290
LP1	-1011 TCAGCCTTCTTGAGAAGT	-781 AGAGATGGCCTCATCAGATC	-800 231
	-819 TCAGTGGCCTGTCACATGAG	-551 CATGACTCCAGGCTCTGGC	-570 269
LP3	-147 ATGTTACAGAGTGTGGCCG	+51 TGGATGGAGAGCTGCCTGAG	+32 198

All primer sequences are shown in the 5'→3' orientation. BP1-2 and LP 1-3 denote  $\beta$ -cell specific promoter and liver-specific promoter, respectively.

#### 対象患者

基本的には第二章の解析に用いた患者を対象にしたが、さらに数を増やして合計 240 人の比較的若年発症のインスリン非依存性糖尿病患者について検討した。また正常人コントロールとしては、18才から60才までの75g 経口糖負荷試験の結果が正常で糖尿病家族歴の認められない46人を用いた。なお、遺伝子解析に当たっては前章と同様に患者に説明の上同意を得て行った。

#### PCR-SSCP 法と塩基配列の決定

第二章第一、二節の方法の項に述べた通りに行った。

### 実験結果

240人の糖尿病患者と46人の正常人コントロールで検討した結果、Fig. 7のようなSSCPパターンの変化が認められた。第二章と同様にヘテロ変異とホモ変異の両者が見いだされた。

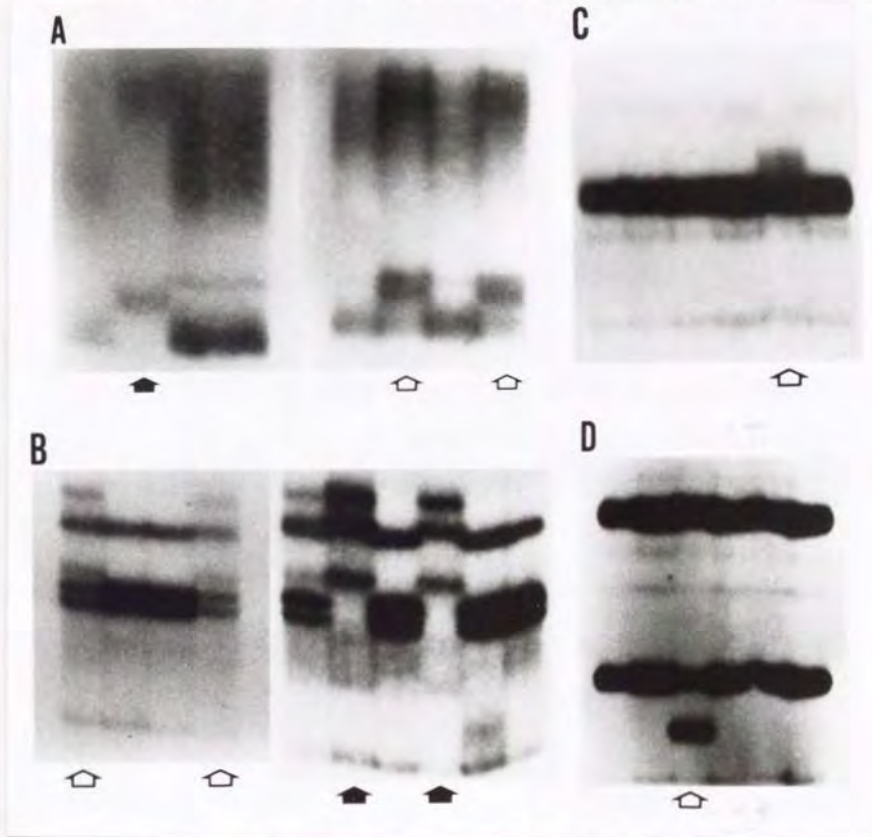


Fig. 7 Mobility Shifted Bands Detected by PCR-SSCP in the Glucokinase Promoter

The samples were amplified by PCR with primer pairs of each region (A: BP1, B: BP2, C: LP2, and D: LP3) listed in Table 5, and subjected to electrophoresis in non-denaturing polyacrylamide gels (5%) with glycerol (10%) at room temperature (B) or 4 °C (A, C, and D). Closed and open arrows indicate homozygous and heterozygous variation, respectively.

見いだされたすべての変異について塩基配列を決定したところ Table 6 のような結果になった。

Table 6 Sequence Variations of Glucokinase Promoter in 240 Japanese NIDDM and 46 Control Subjects

Region	Nucleotide position	Sequence	No. of patients		Allele frequency	
			control (n=46)	NIDDM (n=240)	control (n=46)	NIDDM (n=240)
BP1	-282	TCA $\overline{C}$ GGG $\rightarrow$ TCA $\overline{T}$ GGG	5 (10.9%) (homozygote 1)	23 (9.6%) (homozygote 1)	6.5%	5.0%
BP1&BP2	-194	GCT $\overline{A}$ GCG $\rightarrow$ GCT $\overline{G}$ GCG				
BP2	-30	GGA $\overline{C}$ CAC $\rightarrow$ GGA $\overline{A}$ CAC	17 (37.0%) (homozygote 1)	87 (36.3%) (homozygote 6)	19.6%	19.4%
LP2	-603	GAT $\overline{G}$ TCA $\rightarrow$ GAT $\overline{T}$ TCA	2 (4.3%)	1 (0.4%)	2.2%	0.2%
LP3	-120	GTG $\overline{C}$ CCC $\rightarrow$ GTG $\overline{T}$ CCC	1 (2.2%)	0 (0.0%)	1.1%	0%

No statistical difference was found between NIDDM and control subjects.

$\beta$ 細胞特異的第1エクソンの上流 282 bp と 194 bp に見いだされた変異は完全に連鎖していた。また、興味深いことにこれらの変異は第二章の翻訳開始部位の上流 84 bp (転写開始部位の下流 403 bp) の変異とも完全に連鎖していた。 $\beta$ 細胞特異的第1エクソンの上流にはその他に転写開始部位の 30 bp 上流にも変異が見いだされた。以上は頻度も多く、変異というよりもむしろ「多型性」と呼ぶべきものであろう。また、ヘテロ変異だけではなくホモ変異も認められた。一方、肝臓特異的第1エクソンの上流については 603 bp 上流と 120 bp 上流の二種類の変異が見いだされたが、いずれも頻度は低かった。120 bp 上流の変異については糖尿病患者には見いだせず、正常人コントロール1人だけに認められた。以上の五種類の変異が糖尿病の原因になっているかどうか調べるために、まず糖尿病患者と正常人コントロールの間に頻度の差があるかどうか検討したが、Table 6 に示されるように頻度の差は全く認められなかった。

また、変異の有無によって糖負荷試験の成績に差が生ずるかどうかが検討した結果、Table 7 で示されるような成績を得た。



Table 7 Comparison of 75g Oral Glucose Tolerance Test between Subjects with Normal and Variant Sequence in  $\beta$  cell-specific Promoter

A. Control subjects

	Plasma glucose (mg/dl)				Insulin ( $\mu$ U/ml)				$\Delta$ IRI / $\Delta$ ABS(30min)
	Time (min)				Time (min)				
	0	30	60	120	0	30	60	120	
Normal allele (n=25)	87.0 $\pm$ 6.9	126.8 $\pm$ 23.0	102.3 $\pm$ 21.6	92.6 $\pm$ 16.0	5.1 $\pm$ 1.7	37.0 $\pm$ 20.1	28.6 $\pm$ 18.4	21.6 $\pm$ 10.3	0.89 $\pm$ 0.57
-282 and -194 substitution (n=5)	88.0 $\pm$ 4.1	131.8 $\pm$ 15.2	104.3 $\pm$ 30.2	91.5 $\pm$ 13.9	5.0 $\pm$ 1.8	41.8 $\pm$ 14.1	28.8 $\pm$ 8.8	20.0 $\pm$ 7.4	1.02 $\pm$ 0.63
-30 substitution (n=16)	87.3 $\pm$ 8.9	121.5 $\pm$ 25.4	101.4 $\pm$ 20.6	93.4 $\pm$ 13.5	5.2 $\pm$ 1.5	32.8 $\pm$ 14.2	26.8 $\pm$ 13.8	17.5 $\pm$ 10.0	1.08 $\pm$ 0.90

B. NIDDM subjects

	Plasma glucose (mg/dl)				Insulin ( $\mu$ U/ml)				$\Delta$ IRI / $\Delta$ ABS(30min)
	Time (min)				Time (min)				
	0	30	60	120	0	30	60	120	
Normal allele (n=39)	152.3 $\pm$ 46.6	252.5 $\pm$ 61.0	305.3 $\pm$ 69.3	290.7 $\pm$ 106.2	6.1 $\pm$ 3.3	14.7 $\pm$ 7.9	19.6 $\pm$ 13.1	21.9 $\pm$ 13.3	0.09 $\pm$ 0.07
-282 and -194 substitution (n=5)	151.0 $\pm$ 65.4	253.0 $\pm$ 106.8	304.8 $\pm$ 132.6	319.8 $\pm$ 168.0	9.3 $\pm$ 7.5	19.6 $\pm$ 10.5	23.3 $\pm$ 10.3	27.8 $\pm$ 14.6	0.11 $\pm$ 0.10
-30 substitution (n=22)	151.5 $\pm$ 41.0	240.1 $\pm$ 51.2	293.5 $\pm$ 68.3	278.9 $\pm$ 108.0	6.0 $\pm$ 2.7	15.3 $\pm$ 11.0	21.7 $\pm$ 19.2	20.7 $\pm$ 13.1	0.14 $\pm$ 0.14

The results were expressed as means  $\pm$  SD. No statistical difference was found between subjects with and without variations.

すなわち、 $\beta$ 細胞特異的第1エクソンの上流に見いだされた変異についてはヘテロ変異であってもホモ変異であっても、また、糖尿病患者においても正常人コントロールであっても、糖負荷試験時の血糖値や血中インスリンレベルやインスリンの初期分泌反応の指標である insulinogenic index ( $\Delta$ IRI /  $\Delta$ ABS<sub>30min</sub>)<sup>17)</sup>に全く差が認められなかった。また、肝臓特異的第1エクソンに変異がある人については数が少ないため統計的処理は行えなかったが、変異のない人との間で糖負荷試験の成績が異なっている証拠は認められなかった。

### 第三節 結果の小括と考察

$\beta$ 細胞型第1エクソンの上流においては、転写開始部位の上流 280 bp までの領域がヒトとラットの間でよく保存されていた。また、肝臓特異型第1エクソンの上流においては転写開始部位の上流 140 bp までの領域と970 bp 上流から 570 bp 上流までの間の2ヶ所によく保存された領域が存在していることが明らかになった。

$\beta$ 細胞型第1エクソンについては 282 bp、194 bp、30 bp 上流の三種類、肝臓特異型第1エクソンについては 603 bp、120 bp 上流の二種類の変異が見いだされたが、糖尿病患者と正常人コントロールの間で頻度の差は認められなかった。また、経口糖負荷試験を行った結果、変異を持つ人と変異を持たない人との間に血糖値や血中インスリンレベルの差も認められなかったため、今回見いだされた変異は糖尿病の原因とはなっていないと考えられた。なお、 $\beta$ 細胞型第1エクソンの 282 bp と 194 bp 上流の変異は、少し離れて存在する翻訳開始部位の上流 84 bp (転写開始部位の下流 403 bp) の変異とも完全に連鎖してハプロタイプを形成しており、遺伝学的に興味深い知見と考えられた。

$\beta$ 細胞特異的第1エクソンの上流の転写制御領域の解析はラットではある程度行われており、UPEs (upstream promoter elements) や Pals (palindromic elements) などと呼ばれる塩基配列の重要性が示されているが、今回見いだされた転写開始部位の 282 bp、194 bp、30 bp 上流はこれらの塩基配列には含まれていない<sup>26,27)</sup>。

本章の最初に述べたように、 $\beta$ 細胞型グルコキナーゼは主にグルコースによって発現が制御され、肝臓型グルコキナーゼは少なくともインスリンによって発現が制御されていることが知られている。 $\beta$ 細胞も肝臓も序章に述べたように糖代謝の中心的役割を担っている臓器であるので、今回は見いだしえなかったが、転写制御領域の異常で糖尿病が生じている例が今後見いだされる可能性は充分にあると思われる。

遺伝子転写制御領域については重要な塩基配列が近い将来明らかにされると思われるので、その時点でもう一度糖尿病患者に変異がないかどうか再検討する必要がある。無論、転写制御領域に結合する転写因子の異常の可能性も今後考慮に入れる必要がある。

患者の病歴、検査結果、治療経過を詳細に検討し、その病態を明らかにし、その治療方針を決定し、その経過を監視する。この過程を「患者臨床像の解析」と呼ぶ。

#### 第四章 患者臨床像の解析

患者の病歴、検査結果、治療経過を詳細に検討し、その病態を明らかにし、その治療方針を決定し、その経過を監視する。この過程を「患者臨床像の解析」と呼ぶ。

患者の病歴、検査結果、治療経過を詳細に検討し、その病態を明らかにし、その治療方針を決定し、その経過を監視する。この過程を「患者臨床像の解析」と呼ぶ。

項目	内容
病歴	発症時期、経過、既往歴、家族歴
検査結果	血液検査、尿検査、X線検査、超音波検査
治療経過	投薬治療、手術治療、経過観察
病態	病態の診断、病態の分類、病態の病機
治療方針	治療の目的、治療の方法、治療の時期
経過監視	経過観察の方法、経過観察の時期、経過観察の結果

本章においては、第二章で同定されたグルコキナーゼ遺伝子の第7エクソンの261番目のアミノ酸がグリシンからアルギニンに変異していた患者およびその家族の臨床像について述べる。

### 第一節 発端者の臨床像

発端者は10才の女兒で、他の疾患で通院中、偶然に随時血糖179 mg/dl、尿糖陽性が発見された。発育は正常であり、知能も正常であった。体型は肥満はなくむしろ痩せ型だった。糖尿病発見時の空腹時血糖は145 mg/dlであったが、食事療法と運動療法のみで空腹時血糖は~110 mg/dlと改善を認め、現在定期的に外来で経過観察中である(Table 8)。なお、グルコキナーゼ異常症が同定された時点においては糖尿病の家族歴は認められないとのことだったので、第二章においてはこの症例は家族歴のない25才以下発症のグループ2に分類されていた。

病歴を改めて聴取したところ、発端者の母親が2回の妊娠時にいずれも尿糖陽性を指摘されていたことが判明した。しかしながら妊娠経過は順調で、巨大児の分娩や流産の既往は認められず、尿糖も出産後は陰性となったため現在までなんの治療も受けていない。また、経過を通じて母親の血糖値は全く不明であった。

Table 8 発端者の臨床像のまとめ

K. O.	1982年生まれ(10才)、女兒
既往歴	出生時 身長47 cm、体重2500 g
家族歴	母親が妊娠時、尿糖指摘
現病歴	4才頃より耳下腺炎を繰り返すとの主訴で1991年(9才)埼玉県立小児医療センター受診。尿糖(+)、随時血糖179 mg/dl 指摘。
現症	身長130.7 cm (mean 134 cm)、体重22.7 kg (mean 27.5 kg)、肥満度-17.5%、その他の身体・知能所見に異常なし
検査所見	FBS 145 mg/dl、FRA 315 $\mu$ mol/l、HbA1c 6.3%
経過	食事療法、運動療法にて空腹時血糖 ~110 mg/dl に改善し、外来で経過観察中

## 第二節 家族の遺伝子異常の同定と経口糖負荷試験

今回見いだされたようなグルコキナーゼ遺伝子の点変異は常染色体優性遺伝するだろうと予想される。そこで、発端者の主治医および家族にグルコキナーゼ異常症についての説明を充分に行った後、同意を得て家系分析を行った。

### 検査方法

#### OGTT (Oral Glucose Tolerance Test)

発端者・父・母・兄に75gのグルコース（発端者には1.75g/kg体重）を服用させて0分、30分、60分、90分、120分、180分後に採血し、血糖とIRI (immuno reactive insulin) を測定した。

#### 遺伝子解析

家族の末梢血からDNAを単離して、グルコキナーゼ遺伝子第7エクソンの変異の有無を第二章に述べたSSCP法を用いてスクリーニングし、ついで塩基配列の決定を行った。

### 検査結果

経口糖負荷試験の成績はTable 9のようになった。

Table 9 OGTT Patterns of Family Members

	0	30	60	90	120	180	$\Delta$ IRI/ $\Delta$ BS	FBS (Max)	HbA1c
1 Father 48 yr 163cm, 50kg	100								5.1
2 Mother 45 yr 150cm, 34kg	113 7.0	208 36.0	251 70.0		251 70.0		0.24	140	6.1
3 Brother 16 yr 167cm, 50kg	141 10.8	264 87.6	286 105.8	295 213.4	226 80.3	167 41.9	0.62	141	6.7
4 Proband 10 yr 131cm, 23kg	109 3.8	229 32.5	232 46.9	200 35.2	208 38.4	103 5.0	0.31	144	6.3

upper position of each column: blood glucose [BS] (mg / dl), lower position of each column: immuno reactive insulin [IRI] ( $\mu$ U / ml),  $\Delta$ IRI /  $\Delta$ BS means  $(IRI_{30}-IRI_0) / (BS_{30}-BS_0)$

家族に OGTT を行ったところ、発端者の母・兄も糖尿病パターンを呈していることが明らかになった。詳しい病歴調査で、母親は上に述べたように妊娠時尿糖陽性を指摘されたことがあったが、兄は今回まで何の異常も指摘されていなかった。なお、家族は皆、痩せ型の体形であり肥満はない。インスリンの初期分泌反応を反映する Insulinogenic index ( $\Delta IRI / \Delta BS$ )<sup>17)</sup> の正常値は成人では 0.5 以上、小児では 1.0 以上であるので、三人とも正常値の半分程度に低下していた。

次に家族の末梢血の DNA を解析したところ、Fig. 8 に見られるように SSCP のパターンから発端者の母・兄にも発端者と同じ変異があることがわかり、さらに塩基配列を決定した結果、同じ遺伝子変異のあることが実際に確認された。

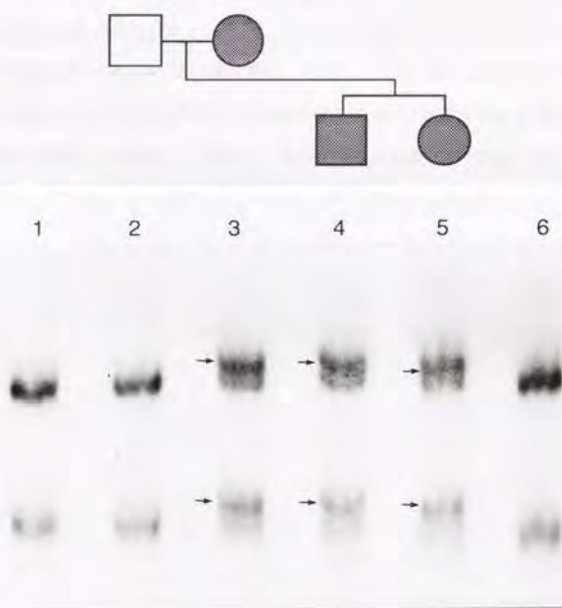


Fig. 8 PCR-SSCP Analysis of Exon 7 of the Glucokinase Gene in the Family Members

Lanes 5, 2, 3, and 4 correspond to the proband, her father, her mother, and her brother, respectively.

Lanes 1 and 6 correspond to NIDDM patients having no mutation in exon 7. The arrows indicate variant bands. Closed box or circles indicate NIDDM. Samples were separated on a 5% polyacrylamide gel (49:1, acrylamide: bis) without glycerol at room temperature.

### 第三節 クランプ試験

第二節の結果より、グルコキナーゼ異常があるとインスリンの初期分泌が低下することがわかった。これは、おそらく膵ランゲルハンス島 $\beta$ 細胞でのグルコキナーゼの機能低下を反映したものと考えられる。一方、グルコキナーゼは肝臓にも発現しており、第7エクソンの異常があれば当然肝臓にも変異を持ったグルコキナーゼが発現していることになる。そこでグルコキナーゼ異常症の患者の肝臓の評価を行うために以下の検査を行った。

#### 検査方法

##### Glucose Clamp Test with OGTT

今回、大阪大学第一内科のグループが開発した Clamp Study with Oral Glucose Load と呼ばれる方法<sup>39)</sup>で、筋肉および肝臓でのグルコースの取り込みについて検討を行った (Fig. 9)。まず、発症者の母親に人工膵島 (日機装社) を装着し、血中インスリン濃度が  $150 \mu\text{U}/\text{ml}$  になるように一定の割合でインスリンを注入し続けて内因性のインスリン分泌を抑制した。そして同時に、血糖値が  $95 \text{ mg}/\text{dl}$  になるように体外から点滴でグルコースを調節しながら注入した。約2時間経過して定常状態に達したところで、体重  $1 \text{ kg}$  当たり  $0.5 \text{ g}$  のグルコースを経口投与した。そうすると、血中グルコース濃度を一定に保つためには、体外からのグルコース注入率は Fig. 9 に示すように減少する必要がある。約3時間血糖値が一定のまま経過するようにグルコース注入量を調節し続け、経口投与されたグルコースの影響がなくなって点滴からのグルコース注入量が経口糖負荷前と同じレベルになったところで検査を終了した。

前半の経口糖負荷前の部分については、よく行われている hyperinsulinemic euglycemic glucose clamp test そのものであり、この時のグルコース注入率は末梢臓器、主として筋肉でのグルコースの利用率を示している。後半については経口投与されたグルコースは消化管から吸収されて、門脈を経由して肝臓に達する。グルコースは肝臓である程度吸収されるが、吸収されなかった分画は末梢臓器に達する。そして血糖を一定に保つためには末梢臓器に流出した量に相当するグルコースを点滴からの注入分から減少させなければならないことになる。つまり、点滴からのグルコースの注入の減少分が肝臓で吸収されなかったグルコース量と一致する。言い換えれば、肝臓で取り込まれたグルコース量は経口投与した量から点滴のグルコース注入の減少分を差し引いた値

として計算される。なお、一般のインスリン非依存性糖尿病の患者12人に同様の検査を行い、クランプ試験のコントロールとした。

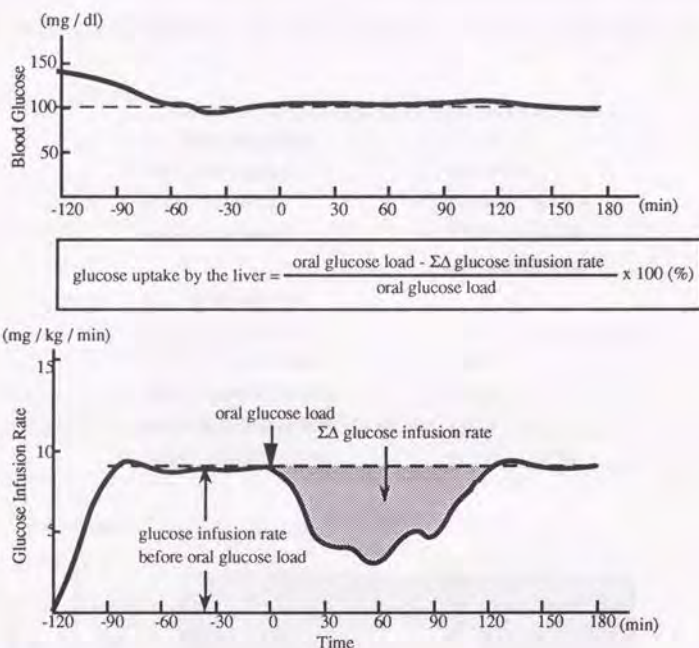


Fig. 9 Euglycemic Hyperinsulinemic Clamp Test Combined with Oral Glucose Load

The concentration of plasma insulin was maintained at the level of about 150  $\mu\text{U}/\text{ml}$  to suppress the endogenous insulin completely. Glucose was infused exogenously to maintain a fixed level of glucose concentration (95 mg/dl). Glucose was then added orally, and exogenous glucose infusion rate was adjusted to keep euglycemia.

#### 検査結果

発端者の母親の成績を Table 10、Fig. 10 に示す。グルコース負荷前の glucose infusion rate は正常範囲であり、末梢組織、主に骨格筋でのグルコース利用率（インスリン感受性）は正常範囲で



あった。経口グルコース量 17 g 負荷後の glucose infusion rate の減少の積算量は 16.8 g だったので、この差の 0.2 g、すなわち経口負荷量の 1.06 % のグルコースが肝臓で取り込まれたことになる。これは、コントロールとして行ったインスリン非依存性糖尿病の患者と比較して著明な低値であり、本症例において肝臓でのグルコースの取り込みが低下していることが明らかになった。

Table 10 Results of Clamp Study with Oral Glucose Load

○ euglycemic clamp	
fixed plasma glucose	95 mg / dl
insulin infusion rate	2.24 mU / kg / min
glucose infusion rate	9.3 mg / kg / min*
	*within normal range
○ oral glucose load	
glucose volume loaded	17.0 g (0.5 g / kg weight)
$\Sigma\Delta$ glucose infusion rate	16.8 g
glucose uptake by the liver	0.2 g
percentage of glucose uptake by the liver	1.06 %
(control NIDDM patients)	19.9 % $\pm$ 5.9 %)

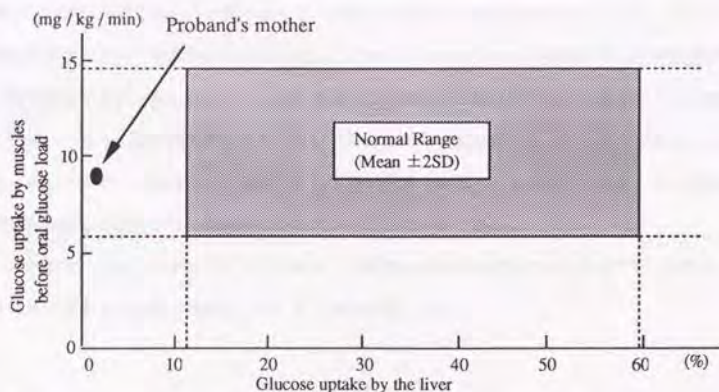


Fig. 10 Glucose Uptake by Muscles and the Liver

Although glucose uptake by muscles was normal (9.3 mg / kg / min; normal range 10.5  $\pm$  4.4 mg / kg / min, mean  $\pm$  2SD), glucose uptake by splanchnic tissues was markedly decreased (1.18 %; normal range 35.8  $\pm$  24.0 %, mean  $\pm$  2SD).

#### 第四節 結果の小括と考察

209人のインスリン非依存性糖尿病の人をスクリーニングして発見されたグルコキナーゼ異常症の患者とその家族についての臨床像の解析を行った。遺伝子解析の結果、発端者の兄と母も第7エクソンの点変異 (point mutation) により261番目のアミノ酸がグリシンからアルギニンへ変異していることがわかった。三人とも経口糖負荷試験で糖尿病型を呈していたので、今回発見された変異が本家系の糖尿病の原因になっており、常染色体優性遺伝していると推測された。経口糖負荷試験時のインスリンの初期分泌反応は正常人の約半分に低下しており、膵臓ランゲルハンス島 $\beta$ 細胞でのグルコースセンサー機能の低下によるものと考えられた。また発端者の母親にクランプ試験を行った結果、筋肉におけるグルコース利用率は正常に保たれていたものの、肝臓におけるグルコースの取り込みは著しく低下していた。したがって、グルコキナーゼが発現している $\beta$ 細胞と肝臓の両方に機能障害がおきていることが明らかになった。現段階では、患者の糖尿病の発症に $\beta$ 細胞と肝臓のどちらの異常がより強く関与しているかは不明である。

今回発見された家族は、いずれも無治療にもかかわらず空腹時血糖の上昇は軽度にとどまり、糖尿病性合併症はおきていなかった。今回のスクリーニングを行う前は、発端者は糖尿病の家族歴がない群に分類されていた程であった。母親は妊娠時に尿糖を指摘されていたが、兄については家族調査で初めて糖尿病が見つかった。したがってグルコキナーゼ異常症は比較的軽微な状態で経過するのかもしれない。しかしながらこの家族は皆痩せ型であり、若年のうちに発症している。つまり、環境因子がほとんどないにもかかわらず糖尿病になっているのである。この事実はグルコキナーゼ異常症は遺伝因子として強い異常であることを意味しており、もし環境因子が加わればより程度の重い糖尿病になるのかもしれないのである。

ごく最近、フランスを中心にグルコキナーゼ異常症が何例か発見されており<sup>40,43)</sup>、本章までに得られた日本人の成績と比較しつつ、第五章で考察したい。

## 第五章 考察

## 第一節 MODY とグルコキナーゼ異常

インスリン非依存性糖尿病の遺伝因子の解析は非常に困難である。その理由として、インスリン非依存性糖尿病自身が heterogenous な疾患概念でその原因遺伝子が単一ではないこと、患者の両親がともに糖尿病であるなど複数の遺伝因子が関与する例が多いこと、環境因子が発症に大きく関与しておりかならずしも疾患発症の浸透率が高くないこと、発症年齢が中年以降のことが多いこと、などが挙げられる。「糖尿病は遺伝学の悪夢」といわれる所以でもある。こうした疾患の原因遺伝子を突き止めていくには次の二つの方法が考えられる。

1) 単一遺伝子の変異が原因で患者が多発している家系を選び、連鎖解析法 (linkage analysis) を用いて原因遺伝子に迫っていく。現在、多型性などを利用して染色体上に数多くの遺伝子マーカーが知られており、そのうちある遺伝子マーカーと疾患が連鎖していれば、そのマーカー遺伝子の周辺に責任遺伝子が存在することになる (positional cloning)。

2) 疾患の原因となりそうな候補遺伝子 (candidate gene) の周辺に新たな遺伝子マーカーを見つけ、そのような候補遺伝子と注目している疾患が連鎖しているかどうか調べる。もし連鎖が確認されれば、候補遺伝子そのものかその近辺に疾患の原因遺伝子が存在していることになる。

Tattersall と Fajans が MODY (maturity-onset diabetes of the young) と呼ぶように提唱した一群の糖尿病<sup>33,44,47)</sup>は、以前から linkage analysis の対象となりうるだろうと考えられ注目されてきた。MODY はインスリン非依存性糖尿病の亜型であり、25才未満で診断され、3世代以上に発症を認め、優性遺伝する疾患と定義されている。したがって、MODY は一般の糖尿病から区別するのが比較的容易であり、単一遺伝子の異常による疾患である可能性が強いのである。1991年、Bell らは linkage analysis を用いて、ある MODY の1家系の責任遺伝子座が第20染色体長腕上の ADA (adenosine deaminase) 遺伝子の近傍に存在することを見いだした<sup>48)</sup>。しかしながら、そこから真の原因遺伝子を同定するまでには多大な労力を要するのが普通であり、現在まで原因遺伝子本体は同定されていない。ところが、ヒトグルコキナーゼの cDNA<sup>49,50)</sup> やゲノム遺伝子<sup>51,52)</sup> がクローニングされ、1992年に遺伝子近傍に存在する多型性に富む繰り返し配列 (CA repeat) を遺伝子マーカーにしてフランス人の MODY の家系の連鎖解析が行われた結果、16家系中14家系で第7染色体短腕 (7p13) 上のグルコキナーゼ遺伝子座と糖尿病との間の強い連

鎖が証明されたのだった<sup>53)</sup>。その後まもなく、その中の1家系において第7エクソンの279番目のグルタミン酸に(GAG→TAG)という点変異がおきて終止コドンが生じていることが示された(nonsense mutation)<sup>60)</sup>。その後、著者らと時期を同じくしてフランスのMODY家系を中心に次々とグルコキナーゼ遺伝子異常症が報告された<sup>41,43,54,57)</sup>。現在までに報告された異常をまとめるとFig. 11のようになる。変異は蛋白質翻訳領域(coding region)のほぼ全長にわたって見られるが、第5、7、8エクソンに比較的多い傾向にある。また、missense mutationやnonsense mutationの他に、deletionやsplicing donor/acceptor部位の異常も報告されている。なお、今回著者らが日本人の糖尿病の患者で同定した変異と同じ変異がフランス人のMODYの家系の中からも発見されている<sup>41)</sup>。

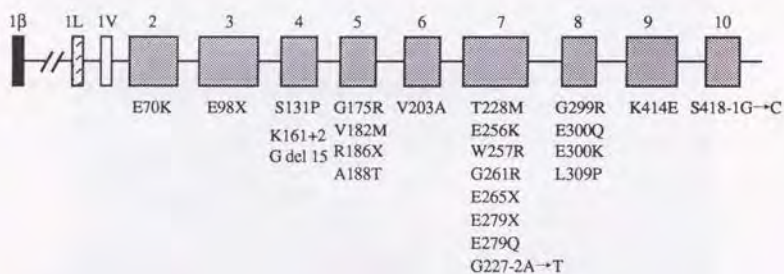


Fig. 11 Structure of the Human Glucokinase Gene and Localization of Mutations Identified in Patients with NIDDM

The single-letter abbreviations for amino acids are used. "X" indicates a nonsense mutation. The splicing mutations are as follows: K161+2G del 15 is a 15 bp deletion that removes the T of GT in the splice donor site of intron 4 and the following 14 bp resulting in a GG; G227-2A→T is a mutation of the splice acceptor site in intron 6 from AG→TG; and S418-1G→C is a mutation of the splice acceptor site in intron 9 from AG→AC. (文献57より引用)

## 第二節 変異グルコキナーゼの酵素活性

グルコキナーゼ遺伝子に nonsense mutation が認められた場合は活性のある酵素蛋白質は合成されないと予想される。しかし、missense mutation の場合に酵素活性の低下を伴っているかどうかは検討を要する。

イーストのヘキソキナーゼBの立体構造から類推すると、ヒトのグルコキナーゼの立体構造は Fig. 12 のようになる<sup>4)</sup>。すなわち酵素は大きく二つの領域 (large domain と small domain) に分けられ、両者が溝 (cleft) をはさんで折り畳まれた形をしており、その cleft にグルコース結合部位や酵素活性部位があると予想されている。グルコースが結合すると、両者がさらに折り畳まれて蛋白質全体の conformation が大きく変化すると考えられている。

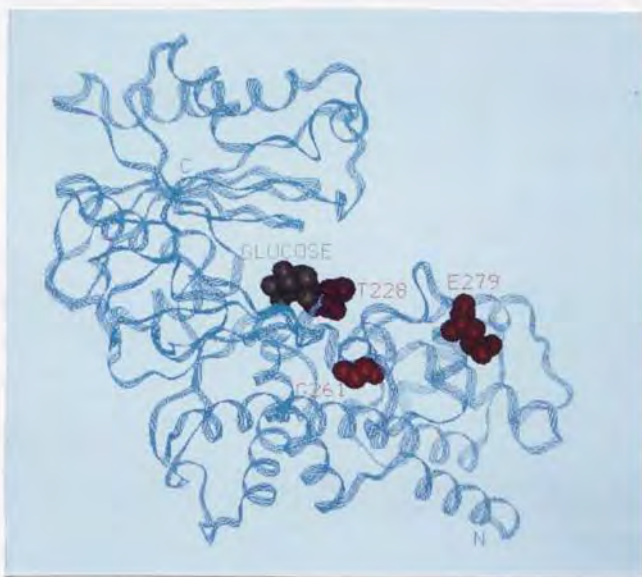


Fig. 12 Model for Human Glucokinase

A ribbon drawing of the  $\alpha$ -carbon backbone of glucokinase is shown in blue. The glucose molecule is shown in green, and the amino acids in which missense mutations (228, 261, 279) have been identified are indicated in red. (文献 4 1 より引用)

Bell および Pilkis のグループは *in vitro* mutagenesis 法で変異を導入したグルコキナーゼ遺伝子を大腸菌内で合成させ、現在までに発見された変異グルコキナーゼについて酵素活性を測定している<sup>56,57)</sup>。その結果、上記の cleft あるいはそこに連なっている部位に異常があると酵素活性の著しい低下が認められることが明らかにされた。261番のアミノ酸がグリシンからアルギニンに変化した場合は  $V_{max}$  は正常な酵素の0.5%以下に低下していた。一方、活性部位からは離れているが上記の conformation の変化を強く受ける部位の異常では、 $V_{max}$  の軽度の低下とグルコースに対する親和性の低下が認められた。以上の結果から nonsense mutation だけではなく missense mutation においても酵素活性が実際に著しく低下していることがわかった。グルコキナーゼ異常症が優性遺伝を示す理由としては、正常なグルコキナーゼの量が半減したために生体中での酵素量が不足する "gene dosage effect" によるものと考えられる。この他に優性遺伝形式をとる理由としては "dominant negative mutation" や "gain of function" などの可能性も考えられるが、現在のところ直接的な証拠はない。

### 第三節 グルコキナーゼ異常の臨床像

著者らの症例は糖尿病の程度は軽いものの、膵 $\beta$ 細胞と肝臓の両方でグルコキナーゼの作用の低下が観察され、おそらく両者の影響で患者は糖尿病になっているものと考えられた。他の家系の臨床像について文献的に考察し、著者らの症例と比較してみる。

現在までに報告されたグルコキナーゼ異常症の患者の臨床的な特徴としては、空腹時血糖がせいぜい 120-160 mg/dl と耐糖能異常が軽度であることと比較的若年で発症（しばしば思春期前）することが挙げられているが、これらの特徴は著者らの症例にも共通であった。一見成人発症 (late-onset) の表現型をとる家系にもグルコキナーゼ遺伝子異常は発見されているが<sup>54,55)</sup>、同一の遺伝子異常が MODY の家系にも同定されており、おそらくは耐糖能異常が軽度なために比較的老年まで糖尿病が発見されずに経過していた可能性が強い<sup>58,59)</sup>。また、多くの患者は食事療法や経口糖尿病薬だけで治療されているが、早期にインスリン治療が必要となり合併症が進行するような症例もわずかだが含まれている。こうした重症度の差はグルコキナーゼ以外の環境因子や他

の遺伝因子の影響によるものと思われる。

フランス人の9症例に hyperglycemic clamp study を行ってインスリン分泌能を調べた成績では euglycemia (88 mg/dl) では内因性のインスリンの分泌が抑制されているものの hyperglycemia の状態では比較的インスリン分泌能は保たれていた<sup>60)</sup>。つまり、インスリン分泌を引き起こすためのグルコース濃度の域値 (set point) が高い、言い換えるとグルコースセンサー機能が低下していることが示され、これはグルコキナーゼの機能を考慮にいれると妥当な結果であると思われた。また、グルコース負荷に対するインスリンの初期分泌は軽度低下しており、著者らの経口糖負荷試験の成績と同様な結果であった。

本症例における検討では、膵ランゲルハンス島β細胞での異常とともに肝臓におけるグルコースの取り込みの低下を見いだしたが、特に肝臓における検討は本研究が初めてのものである。肝臓でのグルコキナーゼの機能の低下が糖尿病の発症にどのような影響を及ぼすかは、今後さらに検討する必要がある。

#### 第四節 グルコキナーゼ異常の頻度

今回の研究において日本人のインスリン非依存性糖尿病全体に占めるグルコキナーゼ異常の頻度は0.5%以下と思われた。この頻度については低く見積り過ぎてはいないものとする。その理由としては、4つの条件で電気泳動する PCR-SSCP 法を用いれば既にインスリン<sup>30)</sup>、インスリン受容体<sup>31)</sup>、グルコーストランスポーター<sup>32)</sup>の遺伝子で明らかにしているように95%以上の確率で遺伝子変異の同定が可能なことと、結果的にみてグルコキナーゼ異常症の臨床像に比較的一致した患者を中心にスクリーニングしたからである。

今回解析した症例の中には定義上 MODY に分類できる症例も22例含まれていたが、その中からは1例もグルコキナーゼ異常が見いだせなかった。一方、典型的なフランスの MODY の家系では50-60%にグルコキナーゼ異常が見られると報告されている<sup>43)</sup>。この相違は人種差によるものかもしれない。あるいはフランスでは典型的な MODY の家系を優先して解析しているのと同様に頻度が多く見えるのかもしれない。他の報告をみても Caucasian のインスリン非依存性糖尿病



多発家系12例にはグルコキナーゼ遺伝子との連鎖は見られなかった<sup>63</sup>、アメリカ黒人の糖尿病60人の中にもグルコキナーゼ異常症は見つからなかった<sup>62</sup>。

ところで、一般に見られるインスリン非依存性糖尿病とグルコキナーゼ遺伝子3'下流の遺伝子多型性は連鎖している、という報告が日本人を含めてなされている<sup>63,64</sup>。もしこの説が正しいとすれば、かなりの数のインスリン非依存性糖尿病の患者でグルコキナーゼ遺伝子そのものかごく近傍に疾患の原因となるような異常が存在するということになる。今回の研究においてはすべての遺伝子転写制御領域をスクリーニングしたとは限らないし、cDNAの下流にあるmRNAの安定性に関与している領域については解析していない。今後さらに検討していく必要があると思われる。

#### 第五節 今後の課題

以上のように、グルコキナーゼ遺伝子異常はインスリン非依存性糖尿病の病因として新しい局面を切り開いたが<sup>65</sup>、今後に残された課題も多い。箇条書きにして挙げると、

1) 全く同じ遺伝子異常が、ある家系では若年発症し別の家系では一見 late-onset となるような例がある<sup>54,55</sup>。単に診断法に問題があるだけかもしれないが<sup>58,59</sup>、遺伝子型と表現型が一致しない理由として環境因子など他の factor についても検討する必要がある。

2) グルコキナーゼ異常によりなぜ糖尿病が発症するのかより詳細なメカニズムの解明が待たれる。そのためにはより多くの臨床例の解析が必要な上に、例えば変異グルコキナーゼを膵β細胞、肝臓の一方または双方に過剰発現させたトランスジェニックマウスや、グルコキナーゼ遺伝子の膵β細胞型、肝臓型的一方又は両方を knock out して欠損させたマウスを作成する必要がある。

3) ストレプトゾトシン糖尿病ラットにおいては肝臓でのグルコキナーゼの発現が低下しているが<sup>66</sup>、このラットでは遺伝子異常や遺伝子転写レベルの異常ではなく、むしろそれ以降の過程が酵素発現の低下に大きく関与している。したがって、今後は遺伝子転写・翻訳以降の調節機構にも目を向けて、糖尿病状態におけるグルコースセンサーとしてのグルコキナーゼの機能変化を

検討していく必要があろう<sup>67)</sup>。一例を挙げれば、グルコキナーゼに結合する蛋白質が最近発見されているが、この蛋白質はグルコキナーゼ活性の翻訳後の調節に大きな役割を果たしているらしく興味を持たれている<sup>68,70)</sup>。

最後に今後のこの分野の発展を展望してみると、グルコキナーゼ活性を亢進させるような薬剤が開発されればグルコキナーゼ異常症はもちろん一般のインスリン非依存性糖尿病の治療薬としても有望であると思われる。また、将来はグルコキナーゼ異常症に対する遺伝子治療の可能性も考えられる日が来るかもしれない。

また、解糖系の酵素であるグルコキナーゼの重要性が証明されたことにより、グルコキナーゼ以降の代謝経路の異常による $\beta$ 細胞の異常やインスリン非依存性糖尿病がおこる可能性も充分に考えられる。この意味で最近、母系遺伝を示す糖尿病の中に、酸化的リン酸化、ATP産生にかかわるミトコンドリア遺伝子異常が発見されたという報告は注目される<sup>71,72)</sup>。

糖尿病の遺伝因子の研究はまだ始まったばかりである。今後、原因遺伝子が次々に発見されて病態がより深く理解され、かつより本質的な治療法が確立されることを願って結びの言葉としたい。

## 結 論

1. 家系内に糖尿病が多発している比較的若年発症のインスリン非依存性糖尿病の患者計200人以上のグルコキナーゼ遺伝子変異をPCR-SSCP法でスクリーニングした。遺伝子転写制御領域を含めて、グルコキナーゼ遺伝子全体にわたり数種類のSSCPパターンの変化が見いだされたが、1例を除いて残りのすべてはアミノ酸変化の伴わない変異や多型性であった。したがって、グルコキナーゼの変異は日本人のインスリン非依存性糖尿病の原因としては稀であると考えられた。
2. 9才で発見された女兒のインスリン非依存性糖尿病の患者において、グルコキナーゼ遺伝子第7エクソンの261番目のアミノ酸がグリシンからアルギニンへ変異していることが同定された。家系分析の結果、発端者の兄と母にも同じ異常が同定され、経口糖負荷試験にて三人とも糖尿病型を呈していることが確認された。同じ遺伝子変異はフランスのMODYの一家系にも見いだされ酵素活性がほぼ消失することが報告されており、また正常人には認められなかったため、この変異が本症例およびその家族の糖尿病の原因であると推測された。
3. グルコース刺激に対するインスリン初期分泌は軽度低下していた。発端者の母親にクランプ試験を行ったところ、末梢組織でのグルコース利用率は正常であったが、肝臓でのグルコースの取り込みは著しく減少していた。したがって、グルコキナーゼ異常症による糖尿病の発症機序には、膵臓ランゲルハンス島 $\beta$ 細胞におけるインスリン分泌の低下と肝臓におけるグルコースの取り込みの低下がともに関与していると考えられた。

## 謝 辞

本論文の作成にあたり、懇切なる御指導ならびに御鞭撻を賜りました東京大学医学部第三内科 矢崎義雄教授に謹んで御礼申し上げます。

また、研究にあたり励ましと貴重な意見を賜りました糖尿病財団理事長 小坂樹徳先生、朝日生命糖尿病研究所 赤沼安夫所長、羽倉稜子副所長、自治医科大学内分泌代謝科 葛谷健教授、岩本安彦助教授、自治医科大学大宮医療センター所長 金澤康徳教授、神戸大学第二内科 春日雅人教授、に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたっては、東京大学第三内科 門脇孝先生の御指導を終始仰いだたことを記し、深く感謝申し上げます。

その他、本研究の遂行にあたりましては以下の先生方と共同で行いました。

クランプ試験： 大阪大学第一内科 鎌田武信教授、河盛隆造先生、森島豊彦先生、  
久保田稔先生、池田雅彦先生、柴雄一先生

患者解析： 埼玉県立小児医療センター 甲田直也先生、福嶋義光先生

遺伝子クローニング： 東京大学第三内科（現神戸大学第二内科）上野博久先生

SSCP 法と塩基配列： 東京大学第三内科 江藤一弘先生、  
朝日生命糖尿病研究所 下川耕太郎先生、門脇弘子先生

また、本論文執筆にあたりましては、東京大学第三内科 安田和基先生、早川貴樹先生に協力していただきました。

その他、今回の研究のために患者さんの検体を送っていただきました全国の先生方に深く御礼申し上げます。

## 引用文献

- 1) 葛谷健, 青木伸, 一色玄, 奥山牧夫, 柿崎正栄, 門脇孝, 陣内富男, 日比逸郎, 堀野正治, 松田文子, 宮村敬: 日本人における双生児糖尿病の調査成績. 糖尿病. 30: 1047-1063, 1987
- 2) Tager H, Given B, Baldwin D, Mako M, Markese J, Rubenstein A, Olefsky J, Kobayashi M, Kolterman O, and Poucher R: A structurally abnormal insulin causing human diabetes. *Nature*. 281: 122-125, 1979
- 3) Sakura H, Iwamoto Y, Sakamoto Y, Kuzuya T, and Hirata H: Structurally abnormal insulin in a diabetic patient. Characterization of the mutant insulin A3 (Val<sup>1</sup>→Leu) isolated from the pancreas. *J Clin Invest*. 78: 1666-1672, 1986
- 4) Iwamoto Y, Sakura H, Ishii Y, Yamamoto R, Kumakura S, Sakamoto Y, Matsuda A, and Kuzuya T: A new case of abnormal insulinemia with diabetes. Reduced insulin values determined by radioreceptor assay. *Diabetes*. 35: 1237-1242, 1986
- 5) Kadowaki T, Bevins CL, Cama A, Ojamaa K, Marcus SB, Kadowaki H, Beitz L, McKeon C, and Taylor SI: Two mutant alleles of the insulin receptor gene in a patient with extreme insulin resistance. *Science*. 240: 787-790, 1988
- 6) Odawara M, Kadowaki T, Yamamoto R, Shibasaki Y, Tobe K, Accili D, Bevins C, Mikami Y, Matsuura N, Akanuma Y, Takaku F, Taylor SI, and Kasuga M: Human diabetes associated with a mutation in the tyrosine kinase domain of the insulin receptor. *Science*. 245: 66-68, 1989
- 7) Taylor SI, Kadowaki T, Kadowaki H, Accili D, Cama A, and McKeon C: Mutations in insulin-receptor gene in insulin-resistant patients. *Diabetes Care*. 13: 257-279, 1990
- 8) Matschinsky FM: Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes. *Diabetes*. 39: 647-652, 1990
- 9) Meglasson MD and Matschinsky FM: New perspectives on pancreatic islet glucokinase. *Am J Physiol*. 246: E1-E13, 1984
- 10) Meglasson MD and Matschinsky FM: Pancreatic islet glucose metabolism and regulation of insulin secretion. *Diabetes Metab Rev*. 2: 163-214, 1986
- 11) Iynedjian PB, Mobius G, Seitz HJ, Wollheim CB, and Renold AE: Tissue-specific expression of glucokinase: identification of the gene product in liver and pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83: 1998-2001, 1986
- 12) Ashcroft FM and Ashcroft SHJ: Mechanism of insulin secretion, in *Insulin*. Ashcroft FM and Ashcroft SHJ, Editor. 1992, IRL Press: Oxford.

- 13) Matschinsky FM and Ellerman JE: Metabolism of glucose in the islets of Langerhans. *J Biol Chem.* 243: 2730-2736, 1968
- 14) Epstein PN, Boschero AC, Atwater I, Cai X, and Overbeek PA: Expression of yeast hexokinase in pancreatic beta cells of transgenic mice reduces blood glucose, enhances insulin secretion, and decreases diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89: 12038-12042, 1992
- 15) Mueckler M: Glucokinase, glucose sensing, and diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90: 784-785, 1993
- 16) Saad MF, Knowler WC, Pettitt DJ, Nelson RG, Charles MA, and Bennett PH: A two-step model for development of non-insulin-dependent diabetes. *Am J Med.* 90: 229-235, 1991
- 17) Kosaka K, Hagura R, and Kuzuya T: Insulin response in equivocal and definite diabetes with special reference to subjects who had mild glucose tolerance but later developed definite diabetes. *Diabetologia.* 26: 944-952, 1977
- 18) Kadowaki T, Miyake Y, Hagura R, Akanuma Y, Kajinuma H, Kuzuya N, Takaku F, and Kosaka K: Risk factors for worsening to diabetes in subjects with impaired glucose tolerance. *Diabetologia.* 26: 44-49, 1984
- 19) Iynedjian PB, Ucla C, and Mach B: Molecular cloning of glucokinase cDNA. Developmental and dietary regulation of glucokinase mRNA in rat liver. *J Biol Chem.* 262: 6032-6038, 1987
- 20) Hughes SD, Quade C, Milburn JL, Cassidy L, and Newgard CB: Expression of normal and novel glucokinase mRNAs in anterior pituitary and islet cells. *J Biol Chem.* 266: 4521-4530, 1991
- 21) Liang Y, Jetton TL, Zimmerman EC, Najafi H, Matschinsky FM, and Magnuson MA: Effects of alternate RNA splicing on glucokinase isoform activities in the pancreatic islet, liver, and pituitary. *J Biol Chem.* 266: 6999-7007, 1991
- 22) Magnuson MA and Shelton KD: An alternate promoter in the glucokinase gene is active in the pancreatic beta cell. *J Biol Chem.* 264: 15936-15942, 1989
- 23) Iynedjian PB, Gjinovci A, and Renold AE: Stimulation by insulin of glucokinase gene transcription in liver of diabetic rats. *J Biol Chem.* 263: 740-744, 1988
- 24) Iynedjian PB, Jotterand D, Nouspikel T, Asfari M, and Pilot PR: Transcriptional induction of glucokinase gene by insulin in cultured liver cells and its repression by the glucagon-cAMP system. *J Biol Chem.* 264: 21824-21829, 1989
- 25) Magnuson MA, Andreone TL, Printz RL, Koch S, and Granner DK: Rat glucokinase gene: structure and regulation by insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86: 4838-4842, 1989
- 26) Magnuson MA: Glucokinase gene structure. Functional implications of molecular genetic studies. *Diabetes.* 39: 523-527, 1990

- 27) Magnuson MA: Tissue-specific regulation of glucokinase gene expression. *J Cell Biochem.* 48: 115-121, 1992
- 28) Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, and Hayashi K: Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics.* 5: 874-879, 1989
- 29) Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, and Sekiya T: Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86: 2766-2770, 1989
- 30) Kishimoto M, Sakura H, Hayashi K, Akanuma Y, Yazaki Y, Kasuga M, and Kadowaki T: Detection of mutations in the human insulin gene by single strand conformation polymorphisms. *J Clin Endocrinol Metab.* 74: 1027-1031, 1992
- 31) Kim H, Kadowaki H, Sakura H, Odawara M, Momomura K, Takahashi Y, Miyazaki Y, Ohtani T, Akanuma Y, Yazaki Y, Kasuga M, Taylor SI, and Kadowaki T: Detection of mutations in the insulin receptor gene in patients with insulin resistance by analysis of single-stranded conformational polymorphisms. *Diabetologia.* 35: 261-266, 1992
- 32) Muraoka A, Sakura H, Kim K, Kishimoto M, Akanuma Y, Buse JB, Yasuda K, Seino S, Bell GI, Yazaki Y, Kasuga M, and Kadowaki T: Polymorphism in exon 4a of the human GLUT4/ muscle-fat facilitative glucose transporter gene detected by SSCP. *Nucleic Acids Res.* 19: 4313, 1991
- 33) Tattersall RB and Fajans SS: A difference between the inheritance of classical juvenile-onset type diabetes of young people. *Diabetes.* 24: 44-53, 1975
- 34) Myers RM, Tilly K, and Maniatis T: Fine structure genetic analysis of a beta-globin promoter. *Science.* 232: 613-618, 1986
- 35) Sakai T, Ohtani N, McGee TL, Robbins PD, and Dryja TP: Oncogenic germ-line mutations in Sp1 and ATF sites in the human retinoblastoma gene. *Nature.* 353: 83-86, 1991
- 36) Cooper DN: Regulatory mutations and human genetic disease. *Ann Med.* 24: 427-437, 1992
- 37) Shelton KD, Franklin AJ, Khour A, Beechem J, and Magnuson MA: Multiple elements in the upstream glucokinase promoter contribute to transcription in insulinoma cells. *Mol Cell Biol.* 12: 4578-4589, 1992
- 38) Magnuson MA and Jetton TL: Evolutionary conservation of elements in the upstream glucokinase promoter. *Biochem Soc Trans.* 21: 160-163, 1993
- 39) Kawamori R, Kubota M, Ikeda M, Matsuhisa M, Kubota M, Morishima T, and Kamada T: Quantitative determination of hepatic glucose uptake using an innovative approach: effect of strict glycemic regulation and exercise in diabetic subjects. *J Nutr Sci Vitaminol Tokyo.* S35-S42, 1991

- 40) Vionnet N, Stoffel M, Takeda J, Yasuda K, Bell GI, Zouali H, Lesage S, Velho G, Iris F, Passa P, Froguel P, and Cohen D: Nonsense mutation in the glucokinase gene causes early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature*. 356: 721-722, 1992
- 41) Stoffel M, Froguel P, Takeda J, Zouali H, Vionnet N, Nishi S, Weber IT, Harrison RW, Pilkis SJ, Lesage S, Vaxillaire M, Velho G, Sun F, Iris F, Passa P, Cohen D, and Bell GI: Human glucokinase gene: isolation, characterization, and identification of two missense mutations linked to early-onset non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89: 7698-7702, 1992
- 42) Hattersley AT, Turner RC, Permutt MA, Patel P, Tanizawa Y, Chiu KC, O'Rahilly S, Watkins PJ, and Wainscoat JS: Linkage of type 2 diabetes to the glucokinase gene. *Lancet*. 339: 1307-1310, 1992
- 43) Froguel P, Zouali H, Vionnet N, Velho G, Vaxillaire M, Sun F, Lesage S, Stoffel M, Takeda J, Passa P, Permutt MA, Beckmann JS, Bell GI, and Cohen D: Familial hyperglycemia due to mutations in glucokinase. Definition of a subtype of diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 328: 697-702, 1993
- 44) Tattersall RB: Mild familial diabetes with dominant inheritance. *Q J Med*. 43: 339-357, 1974
- 45) Fajans SS: MODY - a model for understanding the pathogenesis and natural history of type II diabetes. *Horm Metab Res*. 19: 591-599, 1987
- 46) Fajans SS: Maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Diabetes Metab Rev*. 5: 579-606, 1989
- 47) Fajans SS: Scope and heterogeneous nature of MODY [published errata appear in *Diabetes Care* 1990 Mar;13(3) and 1990 Aug;13(8):910]. *Diabetes Care*. 13: 49-64, 1990
- 48) Bell GI, Xiang KS, Newman MV, Wu SH, Wright LG, Fajans SS, Spielman RS, and Cox NJ: Gene for non-insulin-dependent diabetes mellitus (maturity-onset diabetes of the young subtype) is linked to DNA polymorphism on human chromosome 20q. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88: 1484-1488, 1991
- 49) Koranyi LI, Tanizawa Y, Welling CM, Rabin DU, and Permutt MA: Human islet glucokinase gene. Isolation and sequence analysis of full-length cDNA. *Diabetes*. 41: 807-811, 1992
- 50) Nishi S, Stoffel M, Xiang K, Shows TB, Bell GI, and Takeda J: Human pancreatic beta-cell glucokinase: cDNA sequence and localization of the polymorphic gene to chromosome 7, band p 13. *Diabetologia*. 35: 743-747, 1992
- 51) Tanizawa Y, Koranyi LI, Welling CM, and Permutt MA: Human liver glucokinase gene: cloning and sequence determination of two alternatively spliced cDNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88: 7294-7297, 1991



- 52) Tanizawa Y, Matsutani A, Chiu KC, and Permutt MA: Human glucokinase gene: isolation, structural characterization, and identification of a microsatellite repeat polymorphism. *Mol Endocrinol.* 6: 1070-1081, 1992
- 53) Froguel P, Vaxillaire M, Sun F, Velho G, Zouali H, Butel MO, Lesage S, Vionnet N, Clement K, Fougereousse F, Tanizawa Y, Weissenbach, Beckmann JS, Lathrop GM, Passa P, Permutt MA, and Cohen D: Close linkage of glucokinase locus on chromosome 7p to early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus [published erratum appears in *Nature* 1992 Jun 18;357(6379):607]. *Nature.* 356: 162-164, 1992
- 54) Stoffel M, Patel P, Lo YMD, Hattersley AT, Lucassen AM, Page R, Bell GI, Turner RC, and Wainscoat JS: Missense glucokinase mutation in maturity-onset diabetes of the young and mutation screening in late-onset diabetes. *Nature Genet.* 2: 153-156, 1992
- 55) Katagiri H, Asano T, Ishihara H, Inukai K, Anai M, Miyazaki J, Tsukuda K, Kikuchi M, Yazaki Y, and Oka Y: Nonsense mutation of glucokinase gene in late-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet.* 340: 1316-1317, 1992
- 56) Gidh JM, Takeda J, Xu LZ, Lange AJ, Vionnet N, Stoffel M, Froguel P, Velho G, Sun F, Cohen D, Patel P, Lo YMD, Hattersley AT, Luthman H, Wedell A, Charles RS, Harrison RW, Weber IT, Bell GI, and Pilkis SJ: Glucokinase mutations associated with non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus have decreased enzymatic activity: implications for structure/function relationships. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90: 1932-1936, 1993
- 57) Takeda J, Gidh JM, Xu LZ, Froguel P, Velho G, Vaxillaire M, Cohen D, Shimada F, Makino H, Nishi S, Stoffel M, Vionnet N, Charles RS, Harrison RW, Weber IT, Bell GI, and Pilkis SJ: Structure/function studies of human  $\beta$ -cell glucokinase. *J Biol Chem.* 268: 15200-15204, 1993
- 58) Chiu KC, Tanizawa Y, and Permutt MA: Non-sense mutation of glucokinase gene [letter]. *Lancet.* 341: 385-386, 1993
- 59) Froguel P and Velho G: Non-sense mutation of glucokinase gene [letter]. *Lancet.* 341: 385, 1993
- 60) Velho G, Froguel P, Clement K, Pueyo ME, Rakotoambinina B, Zouali H, Passa P, Cohen D, and Robert JJ: Primary pancreatic beta-cell secretory defect caused by mutations in glucokinase gene in kindreds of maturity onset diabetes of the young. *Lancet.* 340: 444-448, 1992
- 61) Cook JT, Hattersley AT, Christopher P, Bown E, Barrow B, Patel P, Shaw JA, Cookson WO, Permutt MA, and Turner RC: Linkage analysis of glucokinase gene with NIDDM in Caucasian pedigrees. *Diabetes.* 41: 1496-1500, 1992
- 62) Chiu KC, Tanizawa Y, and Permutt MA: Glucokinase gene variants in the common form of NIDDM. *Diabetes.* 42: 579-582, 1993

- 63) Chiu KC, Province MA, and Permutt MA: Glucokinase gene is genetic marker for NIDDM in American blacks. *Diabetes*. 41: 843-849, 1992
- 64) Noda K, Matsutani A, Tanizawa Y, Neuman R, Kaneko T, Permutt MA, and Kaku K: Polymorphic microsatellite repeat markers at the glucokinase gene locus are positively associated with NIDDM in Japanese. *Diabetes*. 42: 1147-1152, 1993
- 65) Permutt MA, Chiu KC, and Tanizawa Y: Glucokinase and NIDDM. A candidate gene that paid off. *Diabetes*. 41: 1367-1372, 1992
- 66) Zahner D and Malaisse WJ: Kinetic behavior of liver glucokinase in diabetes. I. Alteration in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetes Res*. 14: 101-108, 1990
- 67) Liang Y, Najafi H, Smith RM, Zimmerman EC, Magnuson MA, Tal M, and Matschinsky FM: Concordant glucose induction of glucokinase, glucose usage, and glucose-stimulated insulin release in pancreatic islets maintained in organ culture. *Diabetes*. 41: 792-806, 1992
- 68) Van SE: A protein from rat liver confers to glucokinase the property of being antagonistically regulated by fructose 6-phosphate and fructose 1-phosphate. *Eur J Biochem*. 179: 179-184, 1989
- 69) Vandercammen A and Van SE: The mechanism by which rat liver glucokinase is inhibited by the regulatory protein. *Eur J Biochem*. 191: 483-489, 1990
- 70) Vandercammen A and Van SE: Competitive inhibition of liver glucokinase by its regulatory protein. *Eur J Biochem*. 200: 545-551, 1991
- 71) Ballinger SW, Shoffner JM, Hedaya HV, Trounce I, Polak MA, Koontz DA, and Wallace DC: Maternally transmitted diabetes and deafness associated with a 10.4 kb mitochondrial DNA deletion. *Nature Genet*. 1: 11-15, 1992
- 72) van den Ouweland JMW, Lemkes HHPJ, Ruitenbeek W, Sandkuijl LA, de Vijlder MF, Struyvenberg PAA, van de Kamp JJP, and Maassen JA: Mutation in mitochondrial tRNA<sup>LEU(UUR)</sup> gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness. *Nature Genet*. 1: 368-371, 1992
- 73) Kadowaki H, Tobe K, Mori Y, Sakura H, Sakuta R, Nonaka I, Hagura R, Yazaki Y, Akanuma Y, and Kadowaki T: Mitochondrial gene mutation and insulin-deficient type of diabetes mellitus. *Lancet*. 341: 893-894, 1993

## 論文目録

本研究の内容は以下の論文に発表した。

- 1) Sakura H, Eto K, Kadowaki H, Shimokawa K, Ueno H, Koda N, Fukushima Y, Akanuma Y, Yazaki Y, and Kadowaki T: Structure of the human glucokinase gene and identification of missense mutation in a Japanese patient with early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 75: 1571-1573, 1992
- 2) Sakura H, Kawamori R, Kubota M, Morishima T, Kamada T, Akanuma Y, Yazaki Y, and Kadowaki T: Glucokinase mutation and impaired glucose uptake by liver. *Lancet.* 341: 1532-1533, 1993
- 3) Eto K, Sakura H, Shimokawa K, Kadowaki H, Hagura R, Akanuma Y, Yazaki Y, and Kadowaki T: Sequence variations of the glucokinase gene in Japanese subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes.* 42: 1133-1137, 1993



