

生活習慣病関連遺伝子の研究

Studies on Susceptibility Genes for Lifestyle-related Diseases

(2008年3月31日受理)

土 直美 福井 瞳 堀田明日香 関 周司
Naomi Tsuchi Hitomi Fukui Asuka Horita Shuji Seki

Key words : β 3-アドレナリン受容体遺伝子, アルデヒド脱水素酵素遺伝子, 生活習慣病関連遺伝子, ADRB3多型
ALDH2多型, 遺伝的多型

要 約

本研究では、個人に合った健康的な栄養管理を学び、これを実践するための基礎として、肥満や2型糖尿病の感受性遺伝子の一つに上げられている β 3-アドレナリン受容体遺伝子多型(ADRB3正常型と変異型)とアルコール感受性に関係する遺伝子多型(アルデヒド脱水素酵素遺伝子ALDH2の正常型と変異型)について研究した。そして、これら生活習慣病に関わる遺伝子多型の検出・解析法を修得し、さらにこの研究を通して個人栄養の意義と重要性を学習した。

具体的には、中国学園大学倫理委員会の審査・承認を受け、学生自らの手で、非侵襲的に頬粘膜上皮からDNAを抽出・精製し、これを用いて β 3-アドレナリン受容体遺伝子およびアルデヒド脱水素酵素遺伝子多型の検出・解析をした。同じ手法で検出・解析可能な肥満関連遺伝子PPAR γ , ADRB2, UCP1等の遺伝的多型については検出方法の文献的検討にとどめた。このような実践的学習・研究は、生活習慣病の予防栄養や個別化栄養(テーラメイドまたはオーダーメイド栄養)の実践、教育、管理に役立つと考える。

序 文

生活習慣病は、生活習慣要因、環境要因および遺伝要因が互いに影響しあって発症する多因子疾患である。これら3つの発症要因の中で、遺伝要因の発症寄与度は約25%と言われている。多因子疾患の発症関連遺伝子は、発症の危険因子の一つに過ぎないことから感受性遺伝子とよばれている[1]。生活習慣病感受性遺伝子は生活習慣(食習慣、運動習慣、休養、嗜好など)とともに生活習慣病発症の個人差の源であり、生活習慣病の予防栄養の実践、教育、管理において常に考慮されなければならない因子である。しかるに、遺伝子について本から学ぶ知識は、具体的にイメージし難く、遺伝子は取っ付きにくい存在である。ところが、専門領域では生活習慣病関

連遺伝子の研究は急速に進んでおり、200余りの遺伝子多型の存在が示唆されている。その中の重要と思われるごく一部についてはすでに商業ベースでも検出されるまでになっている。なかでも、肥満(ひいては2型糖尿病)に関わる感受性遺伝子多型として、 β 3-アドレナリン受容体遺伝子(ADRB3)[2]、ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 γ 遺伝子(PPAR γ)[3]、 β 2-アドレナリン受容体遺伝子(ADRB2)[4]、脱共役タンパク質1遺伝子(UCP1)[5]多型などがある。また、アルコール感受性に関係するアルデヒド脱水素酵素遺伝子(ALDH2)[6-8]多型についても多くの報告がある。本研究では、このような現状にかんがみ、遺伝子多型の実践的研究を通して生活習慣病関連遺伝子に対する理解を深めることとした。

材料・方法

1. 調査対象者等

遺伝子解析は、中国学園大学・中国短期大学の学生および教職員12名の協力を得て実施した。なお本研究は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(文部科学省・厚生労働省・経済産業省)に規定されている研究であるので、これに従って実施するため、中国学園大学倫理委員会の審査・承認を受け、協力者の承諾を得て実施し、個人情報保護につとめた。

アルパッチテストは、中国学園大学・中国短期大学の学生・教職員および大学祭来訪者有志を対象に実施した。

2. 試薬等

DNA抽出キットISOHAIRおよび電気泳動用アガロースSはニッポンジーン株式会社から、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)用TaKaRa Taq™とDNAサイズマーカー100 bp DNA ladderはタカラバイオ株式会社から購入、使用した。制限酵素BstNIはNew England BioLabs Japan Inc.から購入した。プライマーDNAは、シグマアルドリッチジャパンに注文合成をした。電気泳動は、Mupid-2 plus(株式会社アドバンス)で、PCR装置は、Perkin Elmer社製GeneAmp PCR System 2400を使用した。アルパッチテストは少年写真新聞社(株)のアルコール体質判定セットを購入使用した。

3. 頬粘膜上皮細胞DNAの抽出・精製

DNAの抽出・精製はニッポンジーン株式会社製のDNA抽出キットISOHAIRを用い、同社の頬粘膜上皮からの抽出マニュアルに準じて実施した[9]。その概要は以下のとおりである。

頬の内側に綿棒をあて、回転させるようにして15秒ほどこすり、粘膜細胞を採取する。頬の細胞のついた綿棒を、DNA抽出液(リン酸緩衝生理食塩水(1xPBS)500 μ l)の入ったマイクロチューブに入れ、回転させるようにして攪拌し、細胞がバッファー中に溶解されるようにする。最後に綿棒の先端の部分をマイクロチューブの口の部分に回転させてこすりつけるようにして吸収したDNA抽出液を絞り、できるだけたくさんの細胞が入るようにするとともに抽出液が減らないようにする。遠心機で12,000rpm, 5min遠心沈澱してピペットマンで上清を除き、細胞を回収する。細胞をタッピングでほぐし、

抽出バッファー200 μ l, 酵素液(プロテインキナーゼK)10 μ l, 溶解液8 μ lを加えて混和し、55 $^{\circ}$ C, 20minインキュベートする。インキュベート後、タンパク質除去試薬(フェノール/クロロホルム:危険物注意-必ずプラスチック手袋をして扱う事)200 μ lを加えて、蓋をして、5min転倒混和する。遠心機で12,000rpm, 5min遠心し、水層(上の層)200 μ lをピペットマンで回収する。これにDNA沈殿用試薬(3M Sodium Acetate, pH 5.2)20 μ lとEthachinmate 2 μ lを加え、混和し、さらに99.9%エタノール400 μ lを加え、混和する。遠心機で12,000rpm, 15min遠心し、DNAを沈澱させる。上清をピペットマンで吸い取る。沈澱に70%エタノール500 μ lを静かに加えて沈澱を軽く洗い、12,000rpm, 2min遠心して、沈澱を吸わないようにピペットマンでエタノール溶液を除く。遠心管の蓋を開け5min静置し、エタノールを飛ばす。沈澱しているDNAにDNA溶解用試薬(TE緩衝液)20 μ lを加えて溶解する。

4. アガロースゲル電気泳動によるDNA断片の解析

アガロースSを電子レンジでTAE緩衝液(10mM Tris塩基, 酢酸, 1mM EDTA溶液, pH8.0)に溶解し、3%アガロースゲルを作成する。50~70 $^{\circ}$ Cに冷却したアガロース溶液50mlに、Ethidium bromide水溶液(10mg EtBr/ml)を5 μ l加え混和したのちゲルメーカーに流し込み、ゲルを作成する。電気泳動槽には、EtBrを終濃度1 μ g/mlになるように加えたTAE緩衝液を泳動液として加え、アガロースゲルをセットする。試料10 μ lに6x Loading buffer 2 μ lの比率に混和したのち、ゲルのウェルにロードして、100V, 20min泳動する。このときDNAサイズマーカー100 bp DNA ladderを同時に泳動する。泳動後、トランスイルミネーターで300nm紫外線照射、検出されたDNAバンドをポラロイドカメラで撮影し、DNA断片長多型を解析した。

5. β 3-アドレナリン受容体遺伝子多型(ADRB3正常型と変異型)の解析

β 3-アドレナリン受容体遺伝子多型の検出は、Widenらの方法[2]に準じて実施した。多型検出のため増幅する領域のプライマーの塩基配列は、上流プライマー(ADRB3FW)5'-cgcccaataccgccaacac-3' 下流プライマー(ADRB3RW)5'-ccaccaggaggtcccatcacc-3'で、注文合成し、使用した。

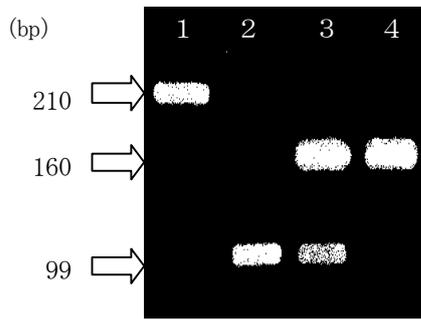


図2 PCRで増幅されるADRB3遺伝子断片とそのBstN1消化で得られるDNA断片のアガロースゲル電気泳動像の模式図。レーン1, PCRで増幅された遺伝子断片; レーン2, 正常型ホモのBstN1処理DNA断片; レーン3, 正常型/変異型ヘテロのBstN1処理DNA断片; レーン4, 変異型ホモのBstN1処理DNA断片。

増幅されるADRB3遺伝子断片を制限酵素BstN1で消化すると, 図示されているBstN1認識配列 `cctgg` または `ccagg` のところで切断される。ADRB3遺伝子の正常型では, 図1でアンダーラインで示されているDNA断片 (99bp断片) が検出されるようになる。変異型 (エネルギー節約型) では `cctgg` の網掛けした `t` が `c` に変異しているため, このサイトが制限酵素BstN1で切れなくなる。その結果, その下流の制限酵素サイトまでを加えたDNA断片 (160bp断片) が検出される。99bp断片より短いDNA断片も生じるが, これらはプライマーダイマー (primer dimmers) 等のバンドと重なり分別できないことが多いし, 正常型と変異型の区別には関与しない。図2はこれら主な制限酵素パターンを模式的に示したものである。変異に関係しているコドン `tgg` は β 3-アドレナリン受容体の64番目のアミノ酸Tryptophan (Trp) をコードしており, `t` が `c` に変異した変異型のコドン `cgg` はArginine (Arg) をコードする。すなわちこの多型は, Trp64Arg (W64R) で表わされる多型である。

本研究で実施した対象者12人のゲル電気泳動の解析結果を図3A, Bに示す。

6~12レーンでノイズ (extra-bandsの出現) が多いのはPCRのアニーリング温度がやや低すぎたため, プライマーの結合に厳密さが欠けたためと思われる。

12人中, 3, 10レーン以外の10人 (83%) が正常群 (Trp / Trp), 3, 10レーンの2人 (17%) が変異群 (Trp / Arg + Arg / Arg) という結果が得られた。今回は基礎実験に時間をとられ, 統計処理をするに十分な例数実施で

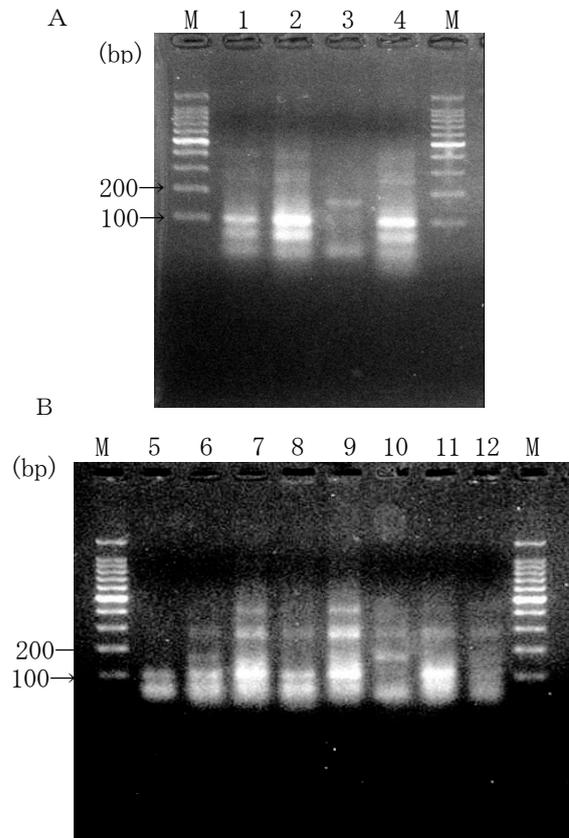


図3 A, B ADRB3多型検出。試料の作成, 電気泳動は方法で記載した如く実施。Mはマーカーの100 bp ladder。通し番号1~12はそれぞれ被験者。

きなかつた。

BMIとの対比では, 正常群9名中, BMIが標準 (18.5~25) の人は8名, 25以上の人は2名であった。変異群の中2名はBMIが標準 (18.5~25) であった。すなわち, ADRB3多型とBMIとの間には一定の関係は認められなかった。これまでの報告でもADRB3変異型と内臓肥満との関係は指摘されているが, ADRB3変異型と高BMIとの相関は認められていない[11, 12]。

ADRB3には, 先に述べたように, 正常型と変異型があり, 正常型は, 熱産生によるエネルギー消費を行うため肥満になりにくい傾向にある。変異型ヘテロTrp/Argおよび変異型ホモArg/Argは, 熱産生能 (エネルギー消費) が低下し, 節約遺伝子として働き, 腹部肥満やインスリン抵抗性を伴いやすく, 2型糖尿病早期発症に寄与しているらしいと報告されている[2, 11, 12]。ADRB3のTrp/ArgとArg/Argの変異型多型は, 日本人の約30%にあり, 変異型では基礎代謝が約200kcal低下していると報

告されている。

2. 肥満関連遺伝子PPAR γ , ADRB2およびUCP1の遺伝的多型検出方法

β 3-アドレナリン受容体遺伝子 (ADRB3) 多型の他に,
 β 2-アドレナリン受容体遺伝子 (ADRB2), ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 γ 遺伝子 (PPAR γ) および脱共役

タンパク質1 遺伝子 (UCP1) 多型の検出方法とそれらの主な性質についてまとめたものを表1に示す。これら遺伝的多型の検出方法は、基本的には上記ADRB3多型検出方法と同じなので、その詳細は省略し、表中のコメント欄に関連文献を記載することと定める。

表1. 肥満症関連遺伝子

遺伝子	SNP(s)	検出法	コメント
Beta-3-adrenergic receptor; ADRB3	Trp64Arg (W64R) tgg→cgg 正常型: TT型, 変異型: AA型/TA型	①PCR-RFLP, Primer set (forward primer: 5'-cgcccaataccgcccaacac-3', reverse primer: 5'-ccaccaggagtcctaccac-3'), MvaI (BstOI; BstNI; EcoRII): cctgg ②もWidenの方法 ③Primer set (forward primer: 5'-c caataccgccaacacaccagt-3', reverse primer: 5'-aggagtcctaccaggtc-3'), MvaI (BstOI; BstNI; EcoRII)	①E Widen et al. N Engl J Med 333, 348-352, 1995. 褐色脂肪細胞に最も多く存在する。熱産生と脂肪分解に関与する。Arg型が肥満と関係する。日本人の34%がこの型。白人は8%。200kcal (コンビニおにぎり1個ないし1個半; ご飯一杯=140g=235kcal) のエネルギーを節約。 ②Kim-Motoyama et al. Diabetologia 40, 469-472, 1997. Arg64変異は内臓脂肪肥満と関係がある。低triglyceride血症を示し、内臓脂肪分解低下を示す。 ③Sakane et al. Diabetologia 40, 200-204, 1997. 内臓脂肪肥満およびインスリン非依存性糖尿病のインスリン抵抗性と関係する。
Beta-2-adrenergic receptor; ADRB2	Gln27Glu (Q27E) caa→gaa,.. (Thr164, Arg16とGln27が野生型 (wild form))	①,②PCR-RFLP, Primer set (forward primer: 5'-GAATGAGGCTTCAGGCGTC-3', reverse primer: 5'-GGCCCATGACCAGATCAGCA-3'), 353bp fragment. Ita I: gcNgc (gcagc)-Boehringer ③PCR-RFLP Primer set (forward primer: 5'-ccgccgtgggtccgcc-3', reverse primer: 5'-ccatgaccagatcac-3'), 310 bp.	①Mori et al. BBRC258, 138-140, 1999. 278人の男性中, 249人の野生型Gln27 homozygotes, 28人のGln27/Glu27 heterozygotes, 1人Glu27 homozygotes. 肥満患者にGluアレル (対立遺伝子) を持った人が多かった。平均年齢調整BMIが高く, 皮下脂肪量が多かった。内臓脂肪量との相関はなかった。まとめると日本人男性でGln27Glu β 2AR変異を持つ人は, 皮下脂肪肥満を伴っている。 ②Large et al. J. Clin. Invest. 100, 3005-13, 1997. カテコールアミンは脂肪細胞における脂肪分解 (lipolysis) に関係する。140人の女性についての研究。Homozygotes for Gluは肥満傾向。Arg16Gly多型はobesityとは無関係。 ③Macho-Azcarate et al. Intern J Obesity 26, 1434-1441, 2002. Glu27Gluグループは運動によるlipolysisやfat oxidationの亢進が起こりにくい。 ④Ishiyama-Shigemoto et al. Diabetologia 42, 98-101, 1999. Glu27 alleleを持つ人は肥満になりやすい。高トリアシルグリセリド血症にもなりやすい。2型糖尿病にもなりやすいが肥満による2次的効果と考えられる。肥満でない人の86%がQ/Q27, 13%がQ/E27, 1%がE/E27。肥満の人の75%がQ/Q27, 24%がQ/E27, 3%がE/E27。男女差はほとんどない。すなわちQ/E27やE/E27が肥満になりやすい。
Un-coupling protein 1; UCP1	UCP1 5' 隣接領域-3826bp位置A-G点突然変異 正常型: AG型/AA型, 変異型: GG型	①,②,③PCR-RFLP, Primer set (forward (upstream) primer: 5'-cttggtagtgacaaagtat-3', reverse (downstream) primer: 5'-ccaaagggtcagattttctac-3'). PCR産物 470 bp. BclIサイトA型にはあるが, 変異型のG型には無い。	①Nagai et al. J Clin Endochr & Metab 88 (12) 5661-5667, 2003. 高脂質で誘導した交感神経刺激による食事誘発性熱産生 (TEM; thermic effect of a meal) は, AA+AGグループに比しGGアレルをもつグループで低かった。 ②Cassard-Doulcier et al. Int J Obes Relat Metab Disord 20, 278-279, 1996. 低下したUCP1と連関したTEM低下は, 体重調節に負の影響 (肥満の助長) を与える。UCP1遺伝子のGGアレルをもった子供は長期にわたる豊富な脂肪摂取をすると容易に肥満になることを示している。肥満になりやすいUCP1型 (変異型: GG型) を持った人は日本人の約25% (肥満女性の25%) (16%と書かれた論文もある) にある。変異型では約20%のエネルギー節約。一日の基礎代謝が約100kcal減少する。節約されたエネルギーは皮下脂肪としてたまりやすい。
Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma; PPARC2	Pro12Ala (P12A) Pro(ccg)→Ala(gc)	①PCR-RFLPによる検出。Primer (sense 5'-caagccagctcttctctgtg-3', antisense 5'-caggaacacagctatgaccagtg aaggaatcgtttccg-3' (cがmismatched nt.) MspIで切断。野生型 (Pro型) が, cのところで切断される。MspI (HapII, HpaII) 認識配列: ccgg)	①Frederiksen et al. J Clin Endochr & Metab 87, 3989-3992, 2002. オランダ人対象の研究で, PPAR γ のP12A変異でA/Aは, 血清脂質の低下, 拡張期血圧の低下, IRSに対する抵抗性を示した。 ②門脇孝 (Net Science Interview Mail H.19.2.22). アラニン型を持っているヒトは日本人では4%しかない。プロリン型が96%である。ところが欧米人の場合はアラニン型が20%で, プロリン型が80%。

3. アルデヒド脱水素酵素遺伝子多型 (ALDH2*1, ALDH2*2) の解析

上記の方法でPCR反応を行った場合に増幅されるALDH2遺伝子断片の塩基配列は図4の如くである。

```

-caaattacagggtcaactgctatgatgtgtttggagccca
-gtttaatgtcccagttgacgatactacacaaacctcgggt

```

```

gtcaccctttggtggctacaagatgtcggggagtggccggg
cagtgggaaccaccgatgttctacagcccctcaccggccc

```

```

agttgggcgagtacgggctgcaggcatacactgaagtgaaa
tcaaccgcctcatgcccgacgtccgtagtgattcacttt
ttcacttt

```

actgtgagtgtgg ←(コード鎖)

tgacactcacacc ←(鋳型鎖—相補鎖)

tgacactcacacc ←変異(M)型プライマー

図4 アルデヒド脱水素酵素遺伝子 (ALDH2) 正常 (N) 型増幅部位。コード鎖と鋳型鎖 (相補鎖) を並列して示してある。プライマー部位は囲い文字で、変異型プライマーも下段に示してある。変異塩基は網掛け文字 t で示してある。135bpの ALDH2遺伝子断片が増幅される。

本研究で実施した対象者12人のゲル電気泳動の解析結果を、図5 A, B, Cに示す。

被検者1人に対して2つのレーンがあり、左側 (N) が下流プライマーを正常型 (N) プライマー、右側 (M) が変異型 (M) プライマーを用い、上流プライマーは共通にして増幅されたDNA断片を示している。正常型ホモ (遺伝子型: ALDH2*1/ ALDH2*1) の場合はNのレーンにのみ、変異型ホモ (遺伝子型: ALDH2*2/ ALDH2*2) の場合はMレーンにのみ、ヘテロ (遺伝子型: ALDH2*1/ ALDH2*2) の場合はNレーンにもMレーンにも増幅されるバンドが検出されしかも両バンドの濃さがほぼ等しくなるはずである。プライマー3' 端1塩基の違いを検出する方法であるのでアニーリングの温度が大切で、いろいろと試した結果 65°Cを採用した。それでもいくらかリークする例がみられるので、NレーンにもMレーンにも増幅されるバンドが検出されしかも両バンドの濃さがほぼ等しい場合のみヘテロと判定した。このような基準で判定し、被験者1, 2, 6, 7, 8, 12は正常型ホモ (ALDH2*1/ ALDH2*1)、被験者5, 10は変異型ホ

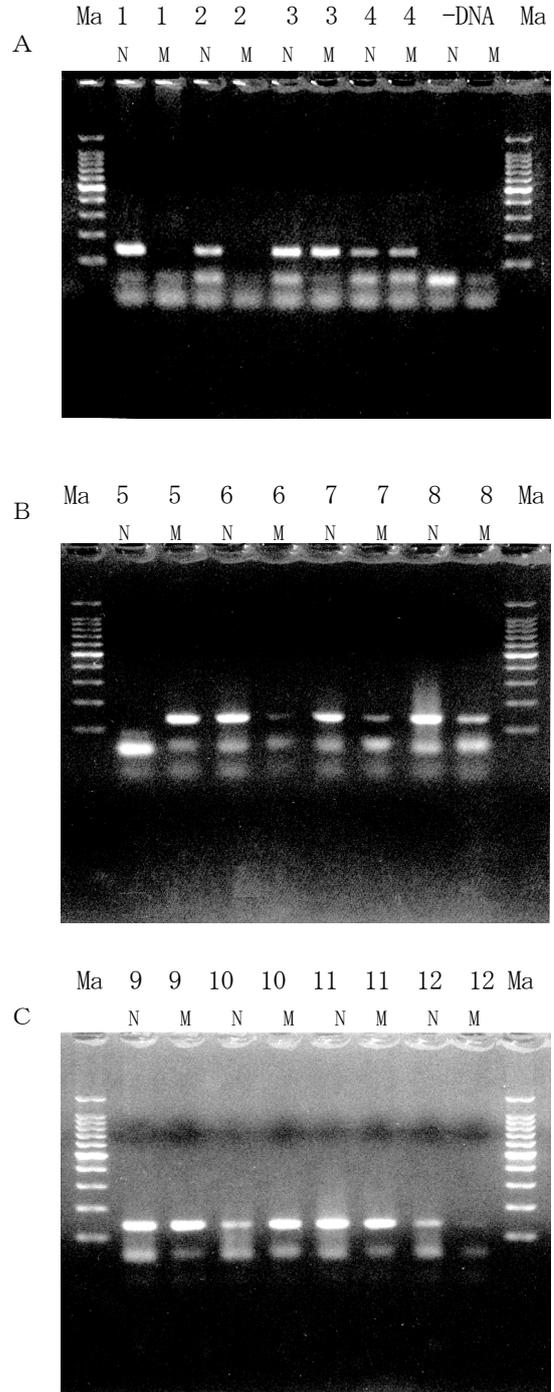


図5 A, B, C ALDH2遺伝子多型の検出。試料の作成、電気泳動は方法で記載した如く実施。Maは図3 A, Bのマーカー (M) と同じ100 bp ladder。通し番号1~12はそれぞれ被験者。上流プライマーは共通で、下流プライマーとして、Nは正常型プライマー、Mは変異型プライマーを用いてPCRを実施した試料を泳動したレーン。-DNAはTemplate DNA無しで、他は同じ条件でPCRを実施したレーンで、この電気泳動で強弱はあるが他のレーンでも共通に検出されている100bp未満のバンドはprimer dimersのようなALDH2遺伝子多型とは無関係なバンドであることを示している。

モ (ALDH2*2/ALDH2*2), 被験者 3, 4, 9, 11 はヘテロ (ALDH2*1/ALDH2*2) と判定した。

ALDH2の正常型, 変異型の違いは, ALDH2遺伝子の第12エクソンの114番目の塩基の違いによる。その塩基がG (グアニン) からA (アデニン) へ変異を起こすことにより (図4のコード鎖参照), 成熟タンパク質中の第487番目のアミノ酸がグルタミン酸 (コドンGAA) からリジン (コドンAAA) に置換される。

正常型のホモ (N/N) はアセトアルデヒドを分解する酵素活性が高いので, 酒が飲めるタイプといえる。変異型のホモ (M/M) はこの酵素活性が極めて低下しているため, アルデヒドが分解されにくくその影響が強くて殆ど飲めないタイプ, ヘテロ型 (N/M) は両方の遺伝子をもっているため, わずかに活性なアルデヒド脱水素酵素活性があるので分解速度が遅く, 飲む事はできるがすぐ顔に出るタイプといえる。

3. アルコールパッチテストによるアルコール感受性判定

アルコールパッチテストの結果は 過去2年間わたって同じ基準で実施してきた先輩ら (2005年度卒業生—井上尚子, 小池知子, 上森理恵, 松永香織; 2006年度卒業生—大林涼子, 村上祥子) のデータに, 私たちが実施した結果を加算して作成したものが図6である。

有効協力者310人中, 今回私たちが実施した有効協力者数は75人であった (図7)。ここで, 有効協力者数は, 同時に実施したアンケートで, 集計に必要な事項を全て記載して下さった人数を示す。白型体質170人 (55%), 赤型体質40人 (13%), 薄赤型体質100人 (32%) という結果が得られた。

図7は今回私たちが実施した集計結果を示したもので, 白型体質41人 (55%), 赤型体質13人 (17%), 薄赤

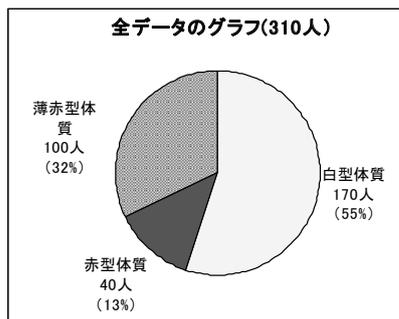


図6 これまで, 3年間にわたって同じ基準で実施してきたアルコールパッチテストの結果。

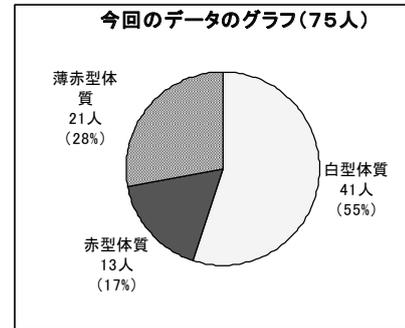


図7 今年度著者らがアルデヒド脱水素酵素遺伝子多型解析に合わせて実施したアルコールパッチテストの結果。

型体質21人 (28%) という結果が得られ, 先輩らの結果とほぼ同じであった。

12人の遺伝子提供者のアルデヒド脱水素酵素遺伝子多型とアルコールパッチテストの結果が, アルコール感受性という観点から一致したのは, 正常ホモ型で白型体質の人が5人 (42%), ヘテロ型で薄赤型体質の人が2人 (16%) であった。残り5人は, 変異ホモ型で薄赤型体質の人が2人, 正常ホモ型で薄赤型体質の人が1人, ヘテロ型で赤型体質の人が1人, ヘテロ型で白型体質の人が1人で一致しなかった。

アルコールパッチテストの結果とアルデヒド脱水素酵素遺伝子多型解析の結果の一部不一致がみられた理由の一つとして, アルコールパッチテストは皮膚のアルデヒド脱水素酵素活性をみており, かならずしもアルデヒドの分解を主に担っている肝臓のアルデヒド脱水素酵素活性を反映していないためと考えられ, 今後例数を増やして検討したい。

謝 辞

本研究を進めるにあたり, 関連領域のご指導, 倫理審査とご指導, アルコールパッチテストへの協力, 遺伝子解析への協力等々, 中国学園内外多くの方々にお世話になりました。記して深く御礼申し上げます。また, 生活習慣病関連遺伝子の文献的検討とアルコールパッチテストについては, 先輩 (2005年度卒業生—井上尚子, 小池知子, 上森理恵, 松永香織; 2006年度卒業生—大林涼子, 村上祥子) の指導によるところが多い。記して感謝いたします。

文 献

- 1) 高 早苗, 柳 進, 河田哲典, 山田英明, 関 周司:
「基礎栄養学」 三共出版(2005), pp. 177-193.
- 2) E. Widen, M. Lehto, T. Kanninen, J. Walston, A. R. Shuldiner and L.C. Groop: Association of a polymorphism in the beta3-adrenergic-receptor gene with features of the insulin resistance syndrome in finns. *N Engl J Med* (1995) 333, 348-352.
- 3) L. Frederiksen, K. Brødbæk, M. Fenger, T. Jørgensen, K. Borch-Johnsen, S. Madsbad and S. A. Urhammer: Studies of the Pro12Ala polymorphism of the PPAR- γ gene in the Danish MONICA Cohort: Homozygosity of the Ala allele confers a decreased risk of the insulin resistance syndrome. *J. Clin. Endocrinol. and Metab.* (2002) 87, 3989-3992.
- 4) V. Large, L. Hellström, S. Reynisdottir, F. Lönnqvist, P. Eriksson, L. Lannfelt, and P. Arner: Human beta-2 adrenoceptor gene polymorphisms are highly frequent in obesity and associate with altered adipocyte beta-2 adrenoceptor function. *J Clin Invest.* (1997) 100, 3005-13.
- 5) N. Nagai, N. Sakane, L. M. Ueno, T. Hamada and T. Moritani: The -3826 A→G variant of the uncoupling protein-1 gene diminishes postprandial thermogenesis after a high fat meal in healthy boys. *J. Clin. Endocrinol. and Metab.* (2003) 88, 5661-5667.
- 6) L. C. Hsu, K. Tani, T. Fujiyoshi, K. Kurachi and A. Yoshida: Cloning of cDNAs for human aldehyde dehydrogenases 1 and 2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1985) 82, 3771-3775.
- 7) L.C. Hsu, R.E. Bendel, and A. Yoshida: Genomic structure of the human mitochondrial aldehyde dehydrogenase gene. *Genomics* (1988) 2, 57-65.
- 8) Omin (Online Mendelian Inheritance in Man) +100650 Aldehyde dehydrogenase 2 family; ALDH2
- 9) ISOHAIRマニュアル(第5版) Code No. 319-03401 ニッポンジーン.
- 10) T. Takeshita, K. Morimoto, X.Q. Mao, T. Hashimoto and J. Furuyama: Characterization of the three genotypes of low Km aldehyde dehydrogenase in a Japanese population. *Human Genet.* (1994) 94, 217-223.
- 11) H. Kim-Motoyama, K. Yasuda, T. Yamaguchi, N. Yamada, T. Katakura, A.R. Shuldiner, Y. Akanuma, Y. Ohashi, Y. Yazaki, T. Kadowaki: A mutation of the β 3-adrenergic receptor is associated with visceral obesity but decreased serum triglyceride. *Diabetologia* (1997) 40: 469-472.
- 12) N. Sakane, T. Yoshida, T. Umekawa, M. Kondo, Y. Sakai, T. Takahashi: β 3-adrenergic-receptor polymorphism: a genetic marker for visceral fat obesity and the insulin resistance syndrome. *Diabetologia* (1997) 40: 200-204