

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2007～2011

課題番号：19101008

研究課題名（和文）拒食症の感受性遺伝子の網羅的同定と機能解析による発症カスケードの解明

研究課題名（英文）Genome-wide identification of genes for anorexia and their cascade analysis on disease development by functional study

研究代表者 猪子 英俊（INOKO HIDETOSHI）

東海大学・医学部・教授

研究者番号：10101932

研究成果の概要（和文）：摂食障害は90年代後半より若年層を中心に急増した精神疾患であり、治療法や予後予測法の確立が待ち望まれる。我々は、マイクロサテライトを用いたゲノムワイドな相関解析法により新たに見出した拒食症感受性遺伝子群について、その分子機能解明の鍵となる多数の相互作用を同定するとともに、83アミノ酸から成る領域等、創薬ターゲットとして有望な機能ドメインを特定した。

研究成果の概要（英文）：An eating disorder is a mental disorder which sharply increased since the late 1990s for people of young age. Its treatment strategies or prognostic methods, however, have yet to be established. In the study described here, we first identified susceptible genes of the disease, based on our genome-wide association analysis with microsatellite markers. To the identified susceptible genes, we applied our high-sensitivity yeast two-hybrid method, followed by immunoprecipitation analysis in mammalian cells. Through these analyses, we found dozens of disease-related interactors, identities of which suggest molecular function of the susceptible genes. We further analyzed one of the susceptible genes by protein-protein interaction assays in details and identified an 83 amino-acid region which is important for both molecular interactions and cellular localization and is, therefore, a good candidate as a drug development target.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	18,000,000	5,400,000	23,400,000
2008年度	16,600,000	4,980,000	21,580,000
2009年度	16,600,000	4,980,000	21,580,000
2010年度	16,600,000	4,980,000	21,580,000
2011年度	16,500,000	4,950,000	21,450,000
総計	84,300,000	25,290,000	109,590,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：摂食障害・マイクロサテライト・相関解析・ネットワーク解析

1. 研究開始当初の背景

摂食障害は、90年代後半より急増した、予後不良の例も存在する深刻な精神疾患であ

る。従来は母子関係が主要因とされてきたが、近年の疫学的研究や、双生児を対象とした遺伝学的研究は、遺伝要因が摂食障害の形成に

大きな役割を果たすことを示している。従って、摂食障害の遺伝要因の解明と、見出された遺伝要因を基盤とする病態の解明は、疾患の治療・予防方策を構築する上での重要な課題であった。

2. 研究の目的

我々が開発した 3 万個のマイクロサテライトを用いたゲノムワイドな相関解析法によって同定した 15 個の拒食症感受性領域を基盤として、疾患感受性遺伝子を同定する。さらに、それらの機能・ネットワーク解析、疾患モデル動物作成などを通じて疾患カスケードを追求し、発症の分子機構を解明すると共に、低分子リガンドデザインなどケミカルゲノミクスによる機能評価を通じて、拒食症の治療・予防方策の基盤を構築する。

3. 研究の方法

多型の相関解析に加えて、リシーケンシングを行い、強い遺伝的効果を持つ疾患感受性多型を明らかにする。見出された感受性遺伝子の機能・ネットワーク解析は、新たに構築した酵母ツーハイブリッド法を軸とし、疾患モデル作成には、ENU 変異精子バンクを活用する。

4. 研究成果

(1) 摂食障害感受性遺伝子の遺伝学的解析
独自のマイクロサテライト遺伝相関解析の結果同定された候補領域を対象とした詳細な SNP 解析、及び、リシーケンシングによって、4 個の感受性遺伝子についての詳細な多型情報を得るとともに、新たに 1 個の感受性遺伝子を見出した。これらのうち 4 遺伝子については、脳・神経系での機能がある程度予測されているものであり、各々、シナプス小胞開口放出、神経系におけるエンドサイトーシス、神経系における細胞接着、及び、神経細胞の保護に関与する遺伝子であり、また、他の 1 個は、脳において高い発現を示す細胞死関連因子であった。いずれの遺伝子も、それらの脳・神経系での機能による摂食障害発症への関与が容易に想定されるものであった。また、我々の結果は、元来マイクロサテライトマーカーの利点として予想されていた、強い遺伝的効果を持つ低頻度の多型を検出する上での高い有効性を検証した点でも重要である。

(2) 健常人における摂食障害感受性多型の効果

摂食障害と相関する遺伝的多型が、一般的な健常人の体質等の表現型に効果を及ぼす可能性を検討する目的で、健常女子学生を対象とした解析を行った。その結果、テストケースとして解析した 1 多型が、体型的にはい

わゆる「やせ」と関連を持ち、また、心理学的に「新規性追求」の得点が低い傾向にあることが判明した。この結果は、摂食障害の遺伝要因が健常人の表現型に検出可能な影響を及ぼしている可能性を示すものである。

(3) 摂食障害感受性遺伝子のマウス変異体の作成と解析

同定した摂食障害感受性遺伝子の個体における機能の解明、疾患との関連の検証、疾患モデル動物作成を目的として ENU 変異精子バンクのスクリーニングを行い、疾患感受性 2 個について、計 4 個の点突然変異精子を同定し、うち シナプス小胞開口放出での機能が予測される遺伝子 S の 2 個については個体の作成に成功した。点突然変異は、とりわけ、精神疾患の解析に有効であるとの報告もある。他の 1 遺伝子のノックアウトマウスとともに行動観察・解析を行ったが、現在迄のところ、ホームケージ活動性解析において軽微な影響が見られた以外は、ストレス環境下での行動等に顕著な変化は観察されておらず、変異マウス同士の交配による複数変異遺伝子の導入を進めている。

(4) 摂食障害感受性遺伝子の酵母ツーハイブリッド解析

摂食障害感受性遺伝子産物の相互作用因子同定を目的として、摂食障害感受性 4 遺伝子に、独自に改良を加えた酵母ツーハイブリッド (Y2H) 法を適用した。この独自法は従来法の約 10 倍の検出力を示し、また、1 次コロニーの段階で Bait/Prey 依存性を容易に判定可能であるという利点がある。4 遺伝子中 2 遺伝子 (遺伝子 S、及び、エンドサイトーシスへの関与が示唆される遺伝子 N) では多数の陽性クローンが出現したが、残り 2 遺伝子では、Bait/Prey 両依存性を示す陽性クローンは得られなかった。S、N の 2 遺伝子については、各々、148、及び、73 個の相互作用候補因子が同定されたが、内 41 因子もが共通であった。従って、これら S、N 遺伝子の産物は、共通の因子との相互作用を通じて機能している可能性が示唆された。相互作用因子候補の多くは、脳・神経系で発現しており、特に、シナプス小胞開口放出・リサイクリングや神経情報伝達への関与が報告されている因子群が多数を占めるとともに、免疫系での機能が明らかにされている HLA Class2 等も含まれる。

(5) 哺乳類細胞における独自の相互作用解析法の確立

酵母ツーハイブリッド解析によって得られた相互作用因子候補を哺乳類細胞で解析する目的で、3 種類のタグを組み合わせたブルダウンアッセイ系を構築した (図 1)。こ

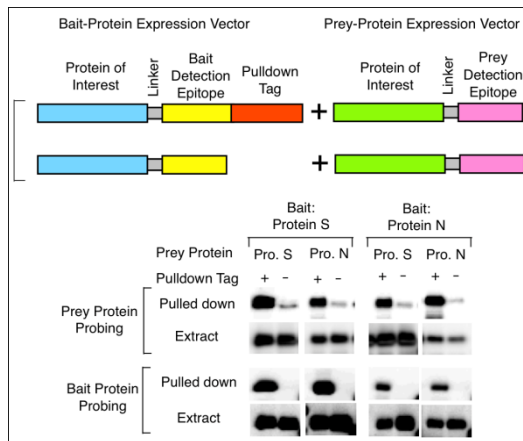


図1 哺乳類細胞におけるプルダウンアッセイ系
 図上部に示した2種の Bait-Protein Expression Vector の一方と、Prey-Protein Expression Vector をコトランスフェクションした後、調製した細胞抽出液のプルダウンを行い、Bait Protein、Prey Protein をウェスタンブロットによって検出した。2種の Bait-Protein Expression Vector は、Pulldown Tag の有無以外は同一の構造を持つ。図下左側は Protein S をプルダウンの Bait として用いた場合で、細胞抽出液 (Extract)、もしくは、プルダウン産物 (Pulled down) のウェスタンブロットの結果を示した。+/- Pulldown Tag の比較より、Protein S は Protein S 自身、及び、Protein N と相互作用することが明らかである。図下右側は Protein N をプルダウンの Bait として用いた場合で、Protein N がそれ自身、及び、Protein S と相互作用することを示している。

のアッセイ系では、プルダウンタグの有無のみが異なるサンプル対の比較による相互作用の厳密な評価が可能で、信頼性の高い相互作用検出が期待される。まず、このアッセイ系を、Y2H 解析により機能的に密接な関連が示唆されたタンパク S と N に適用した。図1にその結果を示したが、タンパク S と N は相互に結合すると共に、S 同士、及び、N 同士も相互作用することが明らかになった。従って、我々が同定した摂食障害感受性遺伝子の産物である S と N は、機能的に密接に関連するに止まらず、物理的にも相互作用するものと結論される。

(6) 哺乳類細胞での相互作用解析

上記の手法を、摂食障害感受性遺伝子 S と N の Y2H 相互作用因子候補、約 30 のに適用したところ、酵母ツーハイブリッド解析によって同定された因子の多くが哺乳類細胞においてもタンパク S、N の双方と相互作用することが明らかになった (図2)。従って、タンパク S と N は哺乳類細胞においても、シナプス小胞開口放出・リサイクリングに関与する諸因子 (STX、SNX 等)、神経伝達物質リセプター (GRIA3、GRIN2B)、及び、HLA Class2 タンパク (DRB1、DMA) 等と相互作用し得ることが示された。また、少なくともタンパク

S、タンパク N、及び、STX8 間の相互作用は試験管内での混合実験によっては再現されないことから、検出された結合は細胞内での相互作用を反映したものであると推察される。

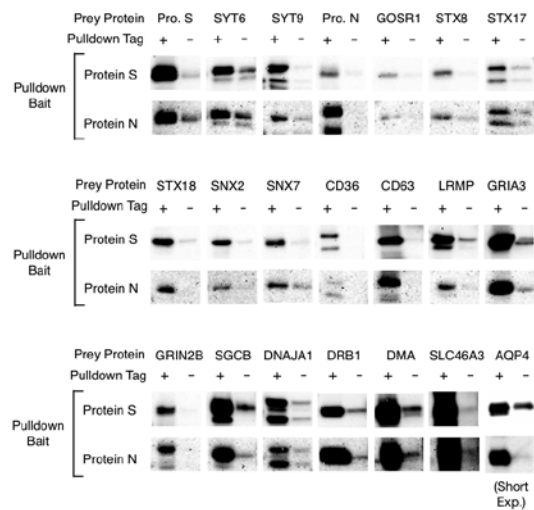


図2 相互作用因子候補の哺乳類細胞における相互作用
 相互作用因子候補の哺乳類細胞における相互作用タンパク S、N を含む 21 種類の Prey タンパクに対して、タンパク S、もしくは、タンパク N を Bait として用いたプルダウン相互作用解析を行った。図には示していないが、各々の Pulldown Tag +/- のサンプル対では、Bait タンパク、Prey タンパク共に、図1の実験同様、同程度の発現を示した。各サンプル対の比較より、これら相互作用因子候補の哺乳類細胞における相互作用を確認できる。

(7) 相互作用ドメインの同定

タンパク S を中心とした創薬ターゲットの抽出に向けて、タンパク S がそれ自身と相互作用するという我々の知見に基づき、この相互作用に必要な領域のマッピングを行った結果、少なくとも2個の相互作用領域を N 末 83 アミノ酸領域、及び、C 末側領域に見出した (図3)。N 末 83 アミノ酸領域はタンパク S に固有の構造であり、他のタンパクに類似した構造は見られない。他方、当該領域は、魚類、鳥類等のものも含むタンパク S オーソログ間で高度に保存されていることから、その機能の重要性が想像され、タンパク S の機能に効果を及ぼす薬剤を開発する上で、有効なターゲットとなり得る。さらに、N 末 83 アミノ酸領域と、我々が同定した各種相互作用因子との結合を検討したところ、この N 末領域のみで結合する因子 (タンパク S 自身、GRIA3 等)、及び、C 末側領域が必要な因子 (STX18、SNX7 等) が存在することが明らかになった。従って、C 末側領域が関与する相互作用の阻害は、タンパク S の機能の選択的な阻害に繋がると考えられる。

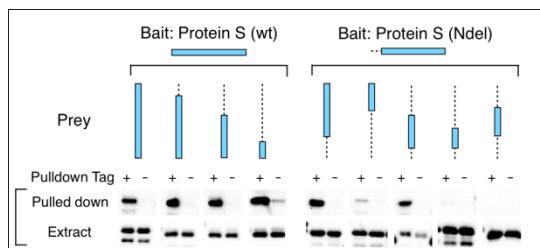


図3 Protein S の相互作用ドメインマッピング
 プルダウンには、Bait として野生型 Protein S (図左側)、もしくは、細胞内局在シグナルが存在する N 末の欠損変異体 (Ndel: 図右側) を用い、Prey としては種々の Protein S の欠損変異体を用いた。この実験により、少なくとも 2 個の独立の相互作用ドメインが、N 末側、及び、C 末側に検出された。N 末側相互作用ドメインは、N 末 83 アミノ酸領域内に存在する。C 末側では、C 末中央部分に加えてより N 末側、もしくは、より C 末側を持つペプチドが強い結合活性を示した。

(8) 創薬に向けて

タンパク S の N 末 83 アミノ酸領域は、タンパク質間相互作用のみならず、それ自身の細胞内局在にも必須である。従い、高い検出力を示した我々の相互作用アッセイを用いることによって、83 アミノ酸ペプチドを出発点とした系統的点突然変異体解析や、ペプチドスクリーニングによる詳細なマッピングを通じて、タンパク S の機能を阻害する小ペプチドの同定は容易に実現可能である。阻害小ペプチドの同定は、それそのものの薬効の検証へと向かう展開に加え、当該領域の 3 次元構造との組み合わせによる *in silico* 低分子薬剤デザインの出発点として重要である。他方 C 末領域は、タンパク S の機能に対するより選択的な人為的介入のターゲットとして有効であると考えられる。当該領域の変異体 (もしくは、小ペプチド) が、本研究で同定した多数の相互作用因子との結合に及ぼす効果を系統的に解析することによって、相互作用表面の機能的ファインマッピングと、それに基づく戦略的な薬剤ターゲット抽出への展開が展望される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 131 件)

1. Oka A, Mabuchi T, Ozawa A, Inoko H: Current understanding of human genetics and genetic analysis of psoriasis. *J Dermatol* 39: 231-241, 2012. (有査読)
2. Kulski JK, Shigenari A, Inoko H: Genetic variation and hitchhiking between structurally polymorphic Alu insertions and HLA-A, -B, and -C

alleles and other retroelements within the MHC class I region. *Tissue Antigens*. 78: 359-377, 2011. (有査読)

3. Taniguchi Y, Tanaka O, Sekiguchi M, Takekoshi S, Tsukamoto H, Kimura M, Imai K, Inoko H: Enforced expression of the transcription factor HOXD3 under the control of the Wnt1 regulatory element modulates cell adhesion properties in the developing mouse neural tube. *J Anat* 219: 589-600, 2011. (有査読)
4. Mitsunaga S, Okudaira Y, Kunii N, Cui T, Hosomichi K, Oka A, Suzuki Y, Homma Y, Sato S, Inoue I, Inoko H: Exact break point of a 50 kb deletion 8 kb centromeric of the HLA-A locus with HLA-A*24:02: the same deletion observed in other A*24 alleles and A*23:01 allele. *Immunogenetics* 63: 467-474, 2011. (有査読)
5. Mitsunaga S, Homma Y, Narita A, Kashiwase K, Okudaira Y, Shiina Y, Inoue I, Inoko H: Particular human leukocyte antigen alleles are associated with biochemical traits in the Japanese population. *Hum Immunol* 72: 566-570, 2011. (有査読)
6. Ando A, Shigenari A, Ota M, Sada M, Kawata H, Azuma F, Kojima-Shibata C, Nakajoh M, Suzuki K, Uenishi H, Kulski JK, Inoko H: SLA-DRB1 and -DQB1 genotyping by the PCR-SSOP-Luminex method. *Tissue Antigens*. 78: 49-55, 2011. (有査読)
7. Ohtsuka M, Miura H, Nakaoka H, Kimura M, Sato M, Inoko H. Targeted transgenesis through pronuclear injection of improved vectors into in vitro fertilized eggs. *Transgenic Res* 21: 225-226, 2011. (有査読)
8. Yonezawa T, Kurata R, Kimura M, Inoko H: Which CIDE are you on? Apoptosis and energy metabolism. *Mol Biosyst* 7: 91-110, 2011. (有査読)
9. Ohtsuka M, Ogiwara S, Miura H, Mizutani A, Warita T, Sato M, Imai K, Hozumi K, Sato T, Tanaka M, Kimura M, Inoko H: Pronuclear injection-based mouse targeted transgenesis for reproducible and highly efficient transgene expression. *Nucleic Acids Res* 38: e198, 2010. (有査読)
10. Kurata R, Nakaoka H, Tajima A, Hosomichi K, Shiina T, Meguro A,

- Mizuki N, Ohono S, Inoue I, Inoko H: TRIM39 and RNF39 are associated with Behçet's disease independently of HLA-B*51 and -A*26. *Biochem Biophys Res Commun* 401: 533-537, 2010. (有査読)
11. Mizuki N, Meguro A, Ota M, Ohno S, Shiota T, Kawagoe T, Ito N, Kera J, Okada E, Yatsu K, Song YW, Lee EB, Kitaichi N, Namba K, Horie Y, Takeno M, Sugita S, Mochizuki M, Bahram S, Ishigatsubo Y, Inoko H: Genome-wide association studies identify IL23R-IL12RB2 and IL10 as Behçet's disease susceptibility loci. *Nature Genet* 42: 703-706, 2010. (有査読)
 12. Ikewaki N, Yamao H, Kulski JK, Inoko H: Flow cytometric identification of CD93 expression on naive T lymphocytes (CD4(+)/CD45RA (+) cells) in human neonatal umbilical cord blood. *J Clin Immunol* 30: 723-733, 2010. (有査読)
 13. Kulski JK, Shigenari A, Shiina T, Inoko H: Polymorphic major histocompatibility complex class II Alu insertions at five loci and their association with HLA-DRB1 and -DQB1 in Japanese and Caucasians. *Tissue Antigens* 76: 35-47, 2010. (有査読)
 14. Yonezawa T, Kurata R, Hosomichi K, Kono A, Kimura M, Inoko H: Nutritional and hormonal regulation of uncoupling protein 2. *IUBMB Life* 61: 1123-1131, 2009. (有査読)
 15. Kikkawa EF, Tsuda TT, Sumiyama D, Naruse TK, Fukuda M, Kurita M, Wilson RP, LeMaho Y, Miller GD, Tsuda M, Murata K, Kulski JK, Inoko H: Trans-species polymorphism of the Mhc class II DRB-like gene in banded penguins (genus *Spheniscus*). *Immunogenetics* 61: 341-352, 2009. (有査読)
 16. Yonezawa T, Kurata R, Kimura M, Inoko H: PKC Delta and Epsilon in drug targeting and therapeutics. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences* 3: 96-101, 2009. (有査読)
 17. Ohtsuka M, Kimura M, Tanaka M, Inoko H: Recombinant DNA technologies for construction of precisely designed transgene constructs. *Curr Pharm Biotechnol* 10: 244-251, 2009. (有査読)
 18. Mano S, Endo TA, Oka A, Ozawa A, Gojobori T, Inoko H: Detecting linkage between a trait and a marker in a random mating population without pedigree record. *PLoS ONE* 4: e4956, 2009. (有査読)
 19. Kulski JK, Shigenari A, Shiina T, Hosomichi K, Yawata M, Inoko H: HLA-A allele associations with viral MER9-LTR nucleotide sequences at two distinct loci within the MHC alpha block. *Immunogenetics* 61: 257-270, 2009. (有査読)
 20. Kimura T, Kobayashi T, Munkhbat B, Oyungerel G, Bilegtsaikhan T, Anar D, Jambaldorj J, Munkhsaikhan S, Munkhtuvshin N, Hayashi H, Oka A, Inoue I, Inoko H: Genome-wide association analysis with selective genotyping identifies candidate loci for adult height at 8q21.13 and 15q22.33-q23 in Mongolians. *Hum Genet* 123: 655-660, 2008. (有査読)
 21. Hui J, Oka A, James A, Palmer LJ, Musk AW, Beilby J, Inoko H: A genome-wide association scan for asthma in a general Australian population. *Hum Genet* 123: 297-306, 2008. (有査読)
 22. Ikewaki N, Tamauchi H, Inoko H: Decrease in CD93 (ClqRp) expression in a human monocyte cell line (U937) treated with various apoptosis-inducing chemical substances. *Microbiol Immunol* 51: 1189-1200, 2007. (有査読)
 23. Ikewaki N, Fujii N, Onaka T, Ikewaki S, Inoko H: Immunological actions of Sophy β -Gllucan (β -1, 3-1, 6 Gulucan), currently available commercially as a health food supplement. *Microbiol Immunol* 51: 861-873, 2007. (有査読)
 24. Yatsu K, Mizuki N, Hirawa N, Oka A, Itoh N, Yamane T, Ogawa M, Shiwa T, Tabara Y, Ohno S, Soma M, Hata A, Nakao K, Ueshima H, Ogihara T, Tomoike H, Miki T, Kimura A, Mano S, Kulski JK, Umemura S, Inoko H: High-resolution mapping for essential hypertension using microsatellite markers. *Hypertension* 49: 446-452, 2007 (有査読)
 25. Bahram S, Inoko H: Microsatellite markers for genome-wide association studies. *Nature Reviews Genetics* 8: 164, 2007. (有査読)
 26. Watanabe A, Shiina T, Shimizu S, Hosomichi K, Yanagiya K, Kita YF, Kimura T, Soeda E, Torii R, Ogasawara K, Kulski JK, Inoko H: A BAC-based contig map of the cynomolgus macaque

(*Macaca fascicularis*) major histocompatibility complex genomic region. *Genomics* 89: 402-412, 2007. (有査読)

27. Kikuchi T, Naruse TK, Onizuka M, Li S, Kimura T, Oka A, Morishima Y, Kulski JK, Ichimiya S, Sato N, Inoko H: Mapping of susceptibility and protective loci for acute GVHD in unrelated HLA-matched bone marrow transplantation donors and recipients using 155 microsatellite markers on chromosome 22. *Immunogenetics* 59: 99-108, 2007. (有査読)
28. Ohtsuka M, Mizutani A, Kikuti YY, Kulski JK, Sato M, Kimura M, Tanaka M, Inoko H. One-step generation of recombinering constructs by asymmetric-end ligation and negative selection. *Anal Biochem* 360: 306-308, 2007. (有査読)

[学会発表] (計 40 件)

1. Oka A, Hayashi H, Ozawa A, Beck S, Inoko H: Genome-wide association studies using microsatellites identifies a new psoriasis susceptibility locus on chromosome 6. The 3rd Göttingen Workshop on Immunology and Immunogenetics, 2010/6/27-30, German Primate Center, ゲッティンゲン (ドイツ)
2. Inoko H: Genome-wide association studies define IL23R/IL12RB2 and IL10 as susceptibility loci for Behçet's Disease. The 3rd Göttingen Workshop on Immunology and Immunogenetics, 2010/6/27-30, German Primate Center, ゲッティンゲン (ドイツ)
3. Oka A, Hayashi H, Ozawa A, Beck S, Inoko H: Genome-wide association studies using microsatellites identifies a new psoriasis susceptibility locus on chromosome 6. 2010 HGM (Human Genome Meeting) Workshop, 2010/5/18-21, Le Corum, モンペリエ (フランス)
4. Inoko H: Identification of NFKBIL1 as a susceptible locus of rheumatoid arthritis by genome-wide association using microsatellites and its functional analysis in osteoclastogenesis. Symposium "Pathogenesis and epidemiology of Intraocular inflammation" The 10th Congress of International Ocular Inflammation Society, 2009/5/30-6/2

プラハ (チェコ共和国)

5. Shiina T, Inoko H: Comparative genome analysis of the MHC regions in primate species. Sattelite Symposium of the 22nd EFI meeting "Non-human Primate Immunogenetics" s, 2008/4/2-5 トゥールーズ (フランス)
6. Shiina T, Inoko H: Comparative genome analysis of the MHC regions in vertebrate species. 2007. Goettingen Workshop on Immunogenetics, 2007/2/26-28 German Primate Center, ゲッティンゲン (ドイツ)

[産業財産権]

○出願状況 (計 8 件)

1. 名称: 基板上での等温増幅反応による標的塩基配列の補足及び検出方法
発明者: 光永滋樹、清水佐良子、猪子英俊
権利者: 東海大学、ジェノダイブファーマ
種類: 特許
番号: 2007-283345
出願年月日: 2007 年 10 月 31 日
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://inoko.med.u-tokai.ac.jp/>
<http://www.jbirc.aist.go.jp/gdbs>

6. 研究組織
- (1) 研究代表者
猪子 英俊 (INOKO HIDETOSHI)
東海大学・医学部・教授
研究者番号: 10101932
- (2) 研究分担者
岡 晃 (OKA AKIRA)
東海大学・医学部・講師
研究者番号: 80384866 (H19)
遠藤 高帆 (ENDO TAKAHO)
独立行政法人理化学研究所・生命情報基盤研究部門・研究員
研究者番号: 40384862 (H19)
大塚 正人 (OHTSUKA MASATO)
東海大学・医学部・講師
研究者番号: 90372945 (H19)
良原 栄策 (EISAKU YOSHIHARA)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号: 70167063 (H19)
平山 令明 (HIRAYAMA NORIAKI)
東海大学・医学部・教授
研究者番号: 70238393 (H19)