

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25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009 ~ 2011

課題番号：21380079

研究課題名（和文）

新規マウス系統を用いた、高脂肪食誘発型糖尿病の原因遺伝子とその関連遺伝子群の解析
研究課題名（英文） Identification of the diabetogenic gene and its related genes of high fat diet-induced diabetes by using novel mouse model.

研究代表者

堀尾 文彦 (HORIO FUMIHIKO)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：20165591

研究成果の概要（和文）：

本研究では、独自に開発した2型糖尿病マウスである SMXA-5 系統を用いて、このマウスが保有する第2番染色体に存在する高脂肪食誘発性糖尿病の原因遺伝子を同定することを目的とした。

この第2番染色体上の糖尿病遺伝子 (*T2dm2sa*) を保有する染色体断片を正常マウス (SM/J 系統) に組み込んだ糖尿病コンジェニック系統を作出して、この遺伝子の糖尿病発症作用を確認しながら、糖尿病遺伝子の存在する領域を狭めていった。そして、その狭められた領域内に存在する遺伝子の中から、候補遺伝子の選抜を進めた。

実際には、マウス・ゲノム・データベースを活用して、限局した第2番染色体の5Mb領域内に存在する遺伝子から糖尿病に関与する可能性がある遺伝子群を抽出した。それらの遺伝子について SMXA-5 と SM/J マウスの塩基配列を比較し、翻訳領域の塩基配列において両系統間でアミノ酸置換が起こる変異のある遺伝子を選抜した。この結果、*Rapgef4* (Rap guanine nucleotide exchange factor4) を候補遺伝子として選抜した。糖尿病コンジェニック系統と SM/J 系統で各組織での *Rapgef4* mRNA レベルを測定した結果、両系統間でレベルに差は見られなかった。よって、*Rapgef4* の両系統間での変異がこの遺伝子の機能に変化をもたらし、糖尿病発症作用を発現していることの証明を進めることを計画している。

研究成果の概要（英文）：

SMXA-5 mouse is a novel animal model for type 2 diabetes induced by high fat diet-feeding. We have mapped the diabetic QTL (quantitative trait locus: *T2dm2sa*) on chromosome 2 of SMXA-5 mouse. The aim of this study is to choose the candidate gene for this diabetogenic gene and identify it as a causative gene. Simultaneously, the controlled genes by the isolated gene, which contribute to the development of diabetes, were screened.

The chromosomal region which this diabetogenic gene exists was narrowed to 5Mb region of chromosome 2 by the phenotypic analyses of several diabetic congenic strains. As a candidate gene, *Rapgef4* was chosen. In the exon of *Rapgef4* of SMXA-5 mouse, we observed a mutation causing the amino acid substitution. Further study is needed to clarify that this mutation of *rapgef4* caused the development of diabetes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2011年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：栄養生化学

1. 研究開始当初の背景

SMXA-5は、SM/JとA/J系統から作出されたSMXA-リコンビナントインブレット(RI)系統の一系統である。我々は、SMXA-RI系統群を用いた糖尿病遺伝子座解析(Diabetes, 52:180,2003)、SMXA-5の糖尿形質(Biosci.Biotechnol.Biochem.68: 226, 2004)、SMXA-5の糖尿病遺伝子座(*T2dm2sa*)とコンジェニック系統確立(Diabetologia,49: 486, 2006、化学と生物,46: 710,2008)、SM/Jに存在する糖尿病遺伝子座(Physiol. Genomics,35:65,2008)に関する研究を推進してきた。続いて、*T2dm2sa*に関する糖尿病コンジェニック系統(SM.A-*T2dm2sa*系統)を作出し、約60遺伝子領域にまで*T2dm2sa*の存在領域を絞り込んだ。このコンジェニック系統は、高脂肪食摂取により顕著な耐糖能(糖を代謝する能力)障害、高インスリン血症を示し、糖尿病遺伝子の同定とそれが関与する遺伝子群の解析とを可能にする独自の研究材料である。

2. 研究の目的

2型糖尿病(以後、糖尿病と略す)は、複数の遺伝因子と食事、運動などの環境因子とが相互に作用し合って発症し、その病因・病態は一様でない。本研究では、独自に作出したマウス系統を用いて、高脂肪食によって誘発される糖尿病の原因遺伝子を同定すること

を目的とし、この同定した遺伝子に関連して変動する遺伝子群のプロファイルを作成して高脂肪食誘発型糖尿病の病態を明らかにする。

3. 研究の方法

1) 高脂肪食誘発型糖尿病遺伝子の候補遺伝子の特定

今までに作出したコンジェニック系統(SM.A-*T2dm2sa*系統)からさらに狭小化したSMXA-5由来領域を有するサブコンジェニック系統を作出して、糖尿病遺伝子を10~15遺伝子領域内に絞り込み、それらの塩基配列や発現レベルをサブコンジェニックとSM/J系統間で比較して候補遺伝子を特定する。

2) 特定した候補遺伝子の糖尿病遺伝子としての同定

培養細胞を用いて、特定した遺伝子を過剰発現あるいは発現抑制して、その糖尿病発症作用を確証する。そして、糖尿病サブコンジェニック系統に正常な候補遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作出して糖尿病治癒を確認し、遺伝子同定とする。

3) 同定した糖尿病遺伝子に関連して発現変動する遺伝子群の解析による糖尿病病態の解明

高脂肪食摂取した糖尿病コンジェニック系統(SM.A-*T2dm2sa*系統)とSM/J(対照系統)の各組織を用いてDNAマイクロアレイ解

析を行い、同定した糖尿病遺伝子に関連して発現変動する遺伝子群を抽出し、高脂肪食誘発型糖尿病の病態を遺伝子発現レベルで明らかにする。

4. 研究成果

1) 高脂肪食誘発型糖尿病遺伝子の候補遺伝子の特定

サブコンジェニック系統を作出して糖尿病遺伝子の存在領域を約20遺伝子にまで狭めた。マウス・ゲノム・データベースを活用して、限局した第2番染色体領域内に存在する遺伝子から糖尿病に関与する可能性がある遺伝子を抽出した。それらの遺伝子についてSMXA-5とSM/Jマウスの塩基配列を比較し、翻訳領域の塩基配列において両系統間でアミノ酸置換が起こる変異のある遺伝子を選抜した。この結果、Rapgef4 (Rap guanine nucleotide exchange factor4)を候補遺伝子として選抜した。

2) 特定した候補遺伝子の糖尿病遺伝子としての同定

糖尿病コンジェニック系統とSM/J系統で各組織でのRapgef4 mRNAレベルを測定した結果、両系統間でレベルに差は見られなかった。よって、Rapgef4の両系統間での変異が、この遺伝子の機能に変化をもたらして、糖尿病を発症させる可能性が推定される。Rapgef4はインスリン作用に関与していることが推定されることから、マウス株化脂肪細胞にRapgef4のsiRNAを導入してこの遺伝子を発現抑制した場合のインスリン作用の変化の検討を進めている。

3) 同定した糖尿病遺伝子に関連して発現変動する遺伝子群の解析による糖尿病病態の解明

糖尿病遺伝子(T2dm2sa)を保有する糖尿病コンジェニック系統では糖尿病遺伝子の作用により、対照系統(SM/J系統)に比べ

て、肝臓では脂肪酸合成系遺伝子(SREBP1, Fatty acid synthase, Acetyl CoA carboxylase)の発現が上昇し、脂肪組織では炎症性アディポカインであるMCP-1の発現が上昇していることが判明した。これらの発現変化はインスリン感受性を低下させる作用があり、糖尿病発症へと導くことが推定された。

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7件)

- (1) Kobayashi, M., Hada, N., Hoshino, H., Ozawa, T., Umeshita, K., Nishimura, M., Murai, A., Ohno, T. and Horio, F.: Confirmation of diabetes-related quantitative trait loci derived from SM/J and A/J mice by using congenic strains fed a high-carbohydrate or high-fat diet. J.Nutr.Sci.Vitaminol. 55,257-263(2009) (査読有)
- (2) Tanaka, S., Mizorogi, T., Nishijima, K., Kuwahara, S., Tsujio, M., Aoyama, H., Taguchi, C., Kobayashi, M., Horio, F. and Ohno, T.: Body and major organ weights of A/J-Chr 11(SM) consomic mice. Exp.Anim., 58,357-361(2009) (査読有)
- (3) Yamauchi, R., Kobayashi, M., Matsuda, Y., Ojika, M., Shigeoka, S., Yamamoto, Y., Tou, Y., Inoue, T., Katagiri, T., Murai, A. and Horio, F.: Coffee and caffeine ameliorate hyperglycemia, fatty liver, and inflammatory adipocytokine expression in spontaneously diabetic KK-Ay mice. J.Agric.Food Chem. 58,5597-5603(2010) (査読有)
- (4) Kobayashi, M., Ohno, T., Hada, N., Fujiyoshi, M., Kuga, M., Nishimura, M., Murai, A. and Horio, F.: Genetic analysis of abdominal fat

distribution in SM/J and A/J mice.

J.Lipid Res. 51,3463-3469(2010) (査読有)

(5) Matsuda, Y., Kobayashi, M., Yamauchi, R., Ojika, M., Hiramitsu, M., Inoue, T.,...Katagiri, T., Murai A., and Horio, F. : Coffee and caffeine improve insulin sensitivity and glucose tolerance in C57BL/6J mice fed a high-fat diet.

Biosci.Biotechnol.Biochem.,75(12),2309-2315(2011) (査読有)

(6) Ohno, T., Hata, K., Baba, T., Io, F., Kobayashi, M., Horio, F. and Nishimura, M. : Establishment of consomic strains derived from A/J and SM/J mice for genetic analysis of complex traits. Mamm.Genome, 23,764-769(2012) (査読有)

(7) 小林美里、堀尾文彦:

2型糖尿病動物モデルを用いた糖尿病発症因子解析の最新動向

日本臨床、70(Suppl 3), 202-206 (2012) (査読無)

[学会発表] (計8件)

(1) 小林美里、田口千恵、立石壮志、村井篤嗣、大野民生、堀尾文彦

マウス12番染色体に存在する脂肪肝感受性遺伝子座の解析

日本糖尿病・肥満動物学会(大阪)2010.1.22

(2) 小林美里、田口千恵、立石壮志、村井篤嗣、大野民生、堀尾文彦

マウス第12番染色体に存在する脂肪肝感受性遺伝子の遺伝子発現解析による探索

日本農芸化学会2010年度大会(東京)2010.3.28

(3) 小林美里、田口千恵、立石壮志、大野民生、村井篤嗣、堀尾文彦

高脂肪食性脂肪肝の感受性遺伝子座(FI1sa)の肥満・糖代謝に対する作用:コンソミックマウスでの解析

第64回日本栄養・食糧学会大会(徳島)2010.5

(4) 立石壮志、小林美里、都築佳奈、大野民生、村井篤嗣、堀尾文彦

SMXA-5マウスが有する脂肪肝感受性遺伝子座(FI1sa)の候補遺伝子の検討

日本農芸化学会2011年度大会(京都)2011.3

(5) 小林美里、立石壮志、都築佳奈、大野民生、村井篤嗣、堀尾文彦

マウス第12番染色体上に存在する脂肪肝感受性遺伝子座の候補遺伝子の解析

第65回日本栄養・食糧学会大会(東京)2011.5

(6) 立石壮志、小林美里、都築佳奈、大野民生、村井篤嗣、堀尾文彦

SMXA-5マウスの脂肪肝感受性遺伝子座の候補遺伝子

2011年度日本農芸化学会関西支部・中部支部合同大会(京都)2011.10

(7) 小林美里、立石壮志、都築佳奈、大野民生、村井篤嗣、堀尾文彦

マウス第12番染色体上の脂肪肝感受性に関する遺伝子の探索

日本農芸化学会2012年度大会(京都)2012.3.23

(8) 都築佳奈、小林美里、鈴木京、大野民生、村井篤嗣、堀尾文彦

脂肪肝感受性を規定する候補遺伝子の肝細胞脂質代謝に対する作用の解析

日本農芸化学会2013年度大会(仙台)2012.3.26

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等
<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~anutr/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀尾文彦 (HORIO FUMIHIKO)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号：20165591

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

大野 民生 (OHNO TAMIO)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：90293620

池上 博司 (IKEGAMI HIROSHI)
近畿大学・医学部・教授
研究者番号：20221062

村井 篤嗣 (MURAI ATSUSHI)
名古屋大学・大学院生命農学研究科
・准教授
研究者番号：10313975

小林 美里 (KOBAYASHI MISATO)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教
研究者番号：20456586