

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10日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22510216

研究課題名（和文） ナノビーズ技術を駆使した2型糖尿病感受性 SNP 結合因子の単離同定と機能解析

研究課題名（英文） Identification and functional analysis of the allele-specific DNA-binding factors that recognize type 2 diabetes susceptibility SNPs using nanobeads technology

研究代表者

平本 正樹 (HIRAMOTO MASAKI)

独立行政法人国立国際医療研究センター・代謝疾患研究部・室長

研究者番号：70297828

研究成果の概要（和文）：

2型糖尿病に関連する重要な遺伝因子 *KCNQ1* は、ゲノム上の一塩基の違い（SNP）が2型糖尿病発症リスクを高める。本研究では、ナノビーズ技術を用いることによって、*KCNQ1* 遺伝子の SNP 領域において、アレル特異的に DNA に結合する因子が同定され、遺伝子発現制御に関与していることが示された。つまり、ゲノム上の一塩基の違いが DNA-タンパク質間の親和性を変え、その制御下にある遺伝子の発現を変えることにより、糖尿病発症に繋がる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *KCNQ1* gene locus confer susceptibility to type 2 diabetes. In this study, we identified the proteins that bind this locus in allele-specific manner using nanobeads technology, and showed that the identified proteins can participate in the regulation of gene expressions. This means that SNPs in *KCNQ1* gene modulate the affinity of the locus for DNA-binding proteins, which possibly change gene expressions and consequently increase risk of type 2 diabetes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム医科学

キーワード：2型糖尿病、一塩基多型、ナノビーズ

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省による平成 19 年の国民健康・栄養調査によると、糖尿病が強く疑われる人は約 890 万人、糖尿病の可能性が否定できない人を合わせると約 2,210 万人と推計された。糖尿病人口は世界的に増加しており、2025 年には 3 億 8000 万人に達するという試算もある。

糖尿病は遺伝因子と環境因子との相互作用によって発症・進展する。当研究所の安田（連携研究者）らは、ゲノムワイド関連解析（GWAS）により、2 型糖尿病に関連する新規遺伝因子として *KCNQ1* を同定し、世界に先駆けて報告した（Yasuda K et al. Nat Genet. 2008; Unoki H et al. Nat Genet. 2008）。この 2 型糖尿病関連遺伝因子は、日本人だけでなく、人種を越えて欧米人でも、2 型糖尿病との関連が認められる。しかし、2 型糖尿病に関連する一塩基多型（SNP）は *KCNQ1* 遺伝子のイントロンに集中しており、疾患感受性を亢進するメカニズムは明らかとなっていない。タンパク質コード領域ではないことから、糖尿病発症への寄与が、*KCNQ1* タンパク質の量的または質的变化によるのか、近傍に存在する遺伝子（*CDKN1C*, *SLC22A18* など）の発現変化によるのか、あるいは他のメカニズムによるのか、などについても明らかにされていない。

GWAS により報告された疾患関連 SNP は、イントロンや遺伝子間領域に存在することが多く、その機能的意義が直接証明された例はほとんどない。一方、近年のゲノム科学の進歩により、タンパク質コード領域以外のゲノム領域も、転写されたり、様々なタンパク質との相互作用を介したりして、幅広い生物学的機能をもつことが示唆されつつある。しかし現状では、特に後者のゲノム-タンパク質間の相互作用を効率的に解析する技術がないことから、疾患関連 SNP 解析の進展は思わしくなく、新たな解析手法の確立が望まれている。

これまでに平本（研究代表者）らは、生体

における様々な相互作用（DNA-タンパク質、タンパク質-タンパク質、低分子-タンパク質など）を利用した機能性因子の単離・同定を目的として、アフィニティーナノビーズ（以降、ナノビーズ）の開発を行ってきた。この新規ナノビーズは、表面が無孔性で適度な親水性を持つことから、非特異的な結合が少なく、精製効率が非常に高い（Wada T et al. Methods Enzymol. 1995; Hiramoto M et al. Methods Enzymol. 2002）。そこで、これまで培ってきた新規ナノビーズの技術を、ゲノム機能の解析に応用することを着想し、本研究では、重要な 2 型糖尿病関連遺伝因子 *KCNQ1* について、モデルケースとして解析する。

2. 研究の目的

本研究では、*KCNQ1* 遺伝子のイントロンに集中する 2 型糖尿病関連 SNP と、疾患感受性とを結ぶ代謝病態鍵分子を同定し、2 型糖尿病発症との関連を分子レベルで解明する。

まずナノビーズを使用して、*KCNQ1* 遺伝子の SNP を含むヒトゲノム領域に結合する、新規因子（以降、KSBFs: *KCNQ1* SNP Binding Factors）を単離・同定する。転写制御因子、microRNA 関連因子、エピジェネティクス関連因子などの単離・同定が想定される。

臨床データから、*KCNQ1* 遺伝子の SNP は、膵β細胞機能の障害を介して、糖尿病発症リスクを上げると考えられている。そこで次に、同定した KSBFs の膵β細胞における機能解析、およびモデル動物を用いた機能解析を行うことにより、同定した KSBFs の中から、代謝病態鍵分子を特定する。さらに、代謝病態鍵分子の機能解析を分子レベルで行うことにより、2 型糖尿病発症との関連性について明らかにするところまでを、本研究の目的とする。

将来的には、同定した代謝病態鍵分子をターゲットとした、糖尿病の予防・診断・治療法の開発を目指す。また、その他の遺伝子で報告されている 2 型糖尿病関連 SNP へと応用展開し、2 型糖尿病の遺伝因子、およびその

環境因子との関わりについて、包括的な理解を目指す。

3. 研究の方法

(1) SNP 領域固定化ナノビーズの作製

KCNQ1 遺伝子において、2 型糖尿病関連 SNP が集中している領域について、約 600 bp の 2 本鎖 DNA を PCR により調製し、ナノビーズに固定化した。また、SNP を含む 19 base の短いオリゴヌクレオチドを合成し、アニーリングとタンデムライゲーションにより 600 bp 程度の反復配列を調製し、ナノビーズに固定化した。いずれの場合も、SNP については、リスクアリルとノンリスクアリルをそれぞれ用意した。

(2) SNP 領域結合因子の単離・同定

細胞はラット膵β細胞株 INS-1 を用い、細胞抽出液は、Dignam 法に基づき、核抽出液を調製した。SNP 領域固定化ナノビーズを用いて、INS-1 核抽出液から精製を行い、結合因子を SDS-PAGE で分離した後、銀染色で検出した。精製ステップでは、結合・洗浄などの条件検討を行い、アリル間（リスクアリルとノンリスクアリル）で結合に差異のある因子について、マスマスペクトル解析により同定した。

(3) 結合実験 1 : *in vitro* での結合

同定した KSBFs については、INS-1 細胞から調製した RNA を元に cDNA をクローニングし、*in vitro* 転写翻訳系を用いて [³⁵S] 標識した組換えタンパク質を調製した。標識タンパク質と SNP 領域固定化ナノビーズとを用い、同定した因子の SNP 領域結合実験を行った。結合実験には、リスクアリルとノンリスクアリルとをそれぞれ固定化したナノビーズとともに、DNA を固定化していないナノビーズをコントロールとして用いた。

(4) 結合実験 2 : クロマチン免疫沈降

同定した KSBFs について、細胞内でのアリル特異的な結合を確認するため、クロマチン免疫沈降実験を行った。抗体での検出を容易にするために、KSBFs の発現ベクターを作製し、KSBF5, KSBF6, KSBF7 には、それぞれ Myc,

FLAG, HA タグを付加した。この解析には、種々のヒト由来細胞株を用い、各細胞における *KCNQ1* 遺伝子の 2 型糖尿病関連 SNP については、シーケンスにより塩基を決定した。リスクアリルのみ、ノンリスクアリルのみ、あるいは両方のアリルを有する種々のヒト由来細胞株に対して、KSBFs の発現ベクターをトランスフェクションし、抗 Myc 抗体によるクロマチン免疫沈降を行い、*KCNQ1* 遺伝子の SNP 領域の共沈・濃縮については、リアルタイム PCR を用いて解析した。

また、発現ベクターによる強制発現を行わず、KSBF7 に対する特異的抗体を用いることにより、内在性の KSBFs についても同様の実験を行った。

(5) 機能解析 1 : レポーターアッセイ

SNP 領域を転写制御領域とするルシフェラーゼレポーターベクターを作製した。SNP についてはリスクアリルとノンリスクアリルをそれぞれ用意し、SNP 領域としては順向きと逆向き (*KCNQ1* 遺伝子と同方向と逆方向) の両方を用意することにより、計 4 種のレポーターベクターを作製した。これらレポーターベクターを、KSBFs の発現ベクターと共に HEK293T 細胞にトランスフェクションし、共発現させることにより、KSBFs の、SNP 領域を介する転写制御への関与について解析した。転写活性は、細胞抽出液中のルシフェラーゼ活性を測定した。

(6) 機能解析 2 : 遺伝子発現解析

siRNA を用いて、同定した KSBFs のノックダウンを行い、内在性の *KCNQ1* 遺伝子および *KCNQ1* 近傍遺伝子の発現に対する影響を、リアルタイム PCR を用いて解析した。この解析には、リスクアリルのみ、ノンリスクアリルのみ、あるいは両方のアリルを有する種々のヒト由来細胞株を用いた。各細胞が有する SNP と、各細胞における上記遺伝子発現変化との相関について、検討を行った。

また、同様の実験について、DNA マイクロアレイを用いて解析することにより、*KCNQ1* 近傍遺伝子だけでなく、網羅的な解析も行った。

4. 研究成果

(1) SNP 領域結合因子の単離・同定

SNP を含む約 600 bp の 2 本鎖 DNA を固定化したナノビーズでは、アリル間（リスクアリルとノンリスクアリル）での結合因子の差異は検出できなかった。そこで、SNP を含む 19 base の反復配列を固定化したナノビーズを用いることにより、アリル間での結合因子の差異が検出できた。5 つの SNP について試みた結果、その内 2 つの SNP (rs2237892, rs2074196) において、再現性の高い結合因子 KSBFs が得られた。これらはいずれも、リスクアリルに対してよりも、ノンリスクアリルに対しての結合が強いことが示された。7 つの因子についてマスペクトル解析を行った結果、5 つの因子を同定できた (KSBF3-7)。

最初に試みた「SNP を含む約 600 bp」では、結合する因子が多く、アリル間での結合因子の差異を検出するのは困難であったが、「SNP を含む 19 base の反復配列」を用いることにより、アリル間での結合因子の差異を検出することができた。これは、対象領域を絞ることにより結合因子の種類が減少し、対象領域の反復により検出感度が上昇したためと考えられる。

(2) SNP 領域結合因子の結合確認

[³⁵S]標識した組換え KSBFs と、SNP 領域固定化ナノビーズとを用いた結合実験の結果、KSBF3 は rs2237892 領域に結合することが確認されたが、アリル間での結合の差異は小さいことが示された。rs2074196 領域に対して、KSBF4 は単独で結合すること、KSBF5-7 は三量体として結合することが確認された。またこれらはいずれも、リスクアリルに対してよりも、ノンリスクアリルに対しての結合が強いことが示された。

また、KSBF5-7 強制発現下でのクロマチン免疫沈降では、ノンリスクアリルを有する細胞 (QGP-1, SUIT-2, KP-4, KP-3) において、rs2074196 領域の共沈・濃縮が確認されたが、リスクアリルのみを有する細胞 (AsPC-1, Capan-1) では、確認されなかった。内在性の KSBF7 に対するクロマチン免疫沈降でも、

ノンリスクアリルを有する細胞 (KP-2, KP-3) においてのみ、rs2074196 領域の共沈・濃縮が確認された。

(3) 機能解析 1 : レポーターアッセイ

rs2074196 領域を制御領域とした 4 種のレポーターベクターでは、いずれも転写活性が検出され、アリル間あるいは向きの間（順向きと逆向き）での活性の違いも示された。KSBF4 を共発現した場合は、いずれのレポーターベクターでも転写活性は抑制傾向を示したが、アリル間で顕著な差はなかった。KSBF5-7 を共発現した場合は、ノンリスクアリル・順向きのレポーターベクターにおいて、転写活性が顕著に増加したが、リスクアリル・順向きのレポーターベクターでは顕著な変化はなかった。また、KSBF5-7 を共発現した場合でも、レポーターベクターが逆向きの場合は、アリル間で顕著な差は示されなかった。

以上の結果を考え合わせると、KSBF5-7 は、rs2074196 領域のノンリスクアリルに三量体として結合し、ある遺伝子の発現促進に関与しているが、リスクアリルでは、KSBF5-7 が結合できないため、その遺伝子の発現が抑制される可能性が示唆された。そこで次に、この制御下にある遺伝子の同定が重要となる。

(4) 機能解析 2 : 遺伝子発現解析

種々のヒト由来細胞株において、KSBFs をノックダウンし、各細胞株が有する SNP と、内在性の *KCNQ1* およびその近傍遺伝子の発現変化との相関を解析した。(つまり、KSBFs をノックダウンすることにより、種々の遺伝子発現変化が引き起こされることが予想されるが、ノンリスクアリルを有する細胞でのみ発現が抑制される遺伝子が、この SNP 領域と KSBFs とによって制御される遺伝子の候補と考えられる。) KSBFs のノックダウンにより、*KCNQ1* 近傍遺伝子の発現量にも変化が検出された。しかし、各細胞株が有する SNP と、近傍遺伝子の発現変化には、相関を見出すことが出来なかった。

そこで、*KCNQ1* 近傍遺伝子に限らず、DNA マイクロアレイを用いた網羅的な解析を行うことによって、制御下にある候補遺伝子が

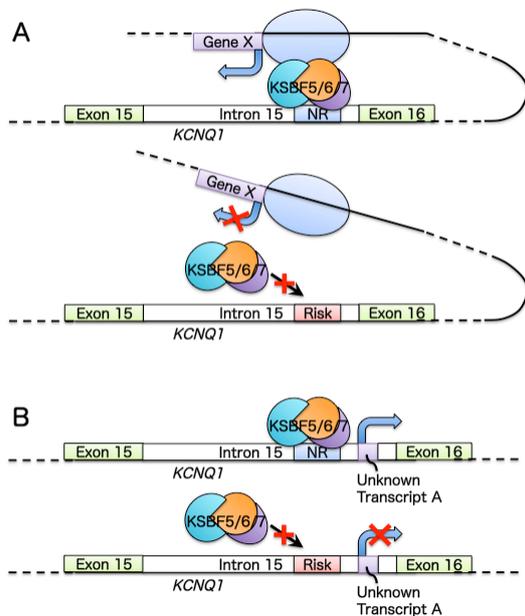
いくつか得られた。現在は、この候補遺伝子について、リアルタイム PCR などを用いた確認作業を行っている。

(5) まとめ

KCNQ1 遺伝子の、2 型糖尿病関連 SNP を含むヒトゲノム領域に結合する、新規因子 KSBFs を同定することができた。現在、この SNP 領域と SNP 領域結合因子 KSBFs とによって、発現が制御される遺伝子について解析中である。今後、この制御下にある遺伝子と 2 型糖尿病発症との関連について解析を進めることにより、代謝病態および 2 型糖尿病発症に関する新規メカニズムの解明につながると考えられる。

また、平成 24 年度に公開された ENCODE プロジェクトの結果から、これまでに解析を行った 5 つの SNP 領域以外で、遺伝子発現制御に関与する可能性が高いと予想される SNP 領域が見出された。そのため現在、追加解析を行っているが、これまでに同定された結合因子以外にも、アレル間で結合に差異のある因子が同定される可能性があり、より包括的な理解に繋がると思われる。

モデル (仮説)



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)

[学会発表] (計 3 件)

- ①. Hiramoto M, Udagawa H, Watanabe A, Kawaguchi M, Nishimura W, Nammo T, Yasuda K. Type 2 Diabetes-Associated SNPs within *KCNQ1* Gene Modulate the Affinity of the Locus for DNA-Binding Factors. 73rd Scientific Sessions, American Diabetes Association. June 24, 2013 (Chicago, IL, USA).
- ②. 平本正樹, 宇田川陽秀, 渡邊淳, 上増増喬, 川口美穂, 石橋奈緒子, 南茂隆生, 西村渉, 安田和基. *KCNQ1* 遺伝子イントロンの SNP 領域においてアレル特異的に結合する因子の単離・同定・解析. 第55回日本糖尿病学会年次学術集会 2012年5月18日 (横浜).
- ③. 平本正樹, 宇田川陽秀, 渡邊淳, 上増増喬, 川口美穂, 南茂隆生, 西村渉, 安田和基. *KCNQ1* 遺伝子イントロンにおける 2 型糖尿病感受性 SNP の機能解析. 日本人類遺伝学会第 56 回大会 2011 年 11 月 11 日 (千葉).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平本 正樹 (HIRAMOTO MASAKI)

独立行政法人国立国際医療研究センター・代謝疾患研究部・室長

研究者番号：70297828

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

安田 和基 (YASUDA KAZUKI)

独立行政法人国立国際医療研究センター・代謝疾患研究部・部長

研究者番号：80311611

宇田川 陽秀 (UDAGAWA HARUHIDE)

独立行政法人国立国際医療研究センター・代謝疾患研究部・研究員

研究者番号：50533882