

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：若手研究(B)

研究期間：2010 ~ 2012

課題番号：22780118

研究課題名（和文）

高脂肪食摂取下で脂肪肝感受性を決定する遺伝子の同定：染色体部分置換マウスを用いて

研究課題名（英文） Searching for fatty liver susceptible genes under high-fat diet: by using congenic mice.

研究代表者

小林 美里 (KOBAYASHI MISATO)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：20456586

研究成果の概要（和文）：

高脂肪食に応答して脂肪肝感受性を示すモデルマウス(SMXA-5)において同定された第12番染色体の脂肪肝感受性遺伝子座F11sa (fatty liver 1 in SMXA)の責任遺伝子を探索した。マウス第12番染色体に存在する脂肪肝原因遺伝子の候補遺伝子が、肝臓内のトリグリセリド合成を負に制御することを見出し、この遺伝子が肝臓での脂質代謝に関与する新たな分子である可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

We previously mapped the fatty liver susceptible locus (f11sa) on mouse chromosome 12 by using SMXA-5, a mouse model for fatty liver induced by a high-fat diet feeding. We searched a responsible gene causing the fatty liver. In this study, we found that one candidate gene suppress the triglyceride synthesis in hepatocytes. This result suggests that the candidate gene coding protein is a new molecule regulating hepatic lipid metabolism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

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：高脂肪食、脂質代謝、トリグリセリド、脂肪肝、責任遺伝子

1. 研究開始当初の背景

近年の生活習慣の変化によって、脂肪肝の患者数が増加している。脂肪肝の中には予後の悪い肝硬変、肝ガンに進展する非アルコール性脂肪性肝炎が潜在し、脂肪肝の予防・治療の重要性が高まっている。しかし、その原因遺伝子およびメカニズムの詳細は未だ明

らかにされていない。現在までに我々は、マウス第12番染色体上に脂肪肝感受性遺伝子座 *F11sa* (*Fatty liver 1 in smxa*) を検出している (*J Lipid Res.* 48:2039, 2007)。そして、脂肪肝への関与が報告されていない1つの *F11sa* 候補遺伝子 (gene A) を選抜に成功していた。

2. 研究の目的

本研究では、栄養学的因子と遺伝学的手法とを組み合わせたアプローチにより、新規マウス系統を用いた高脂肪食摂取下で脂肪肝の感受性を決定する新たな遺伝子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

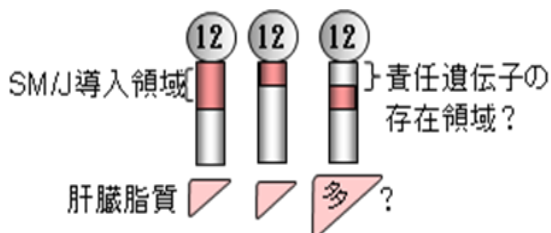
高脂肪食誘導性脂肪肝の感受性遺伝子座 *F11sa* の責任遺伝子の候補遺伝子として見出した gene A に注目して、この遺伝子が *F11sa* の責任遺伝子であるかを確認するとともに、信頼性の高い *F11sa* の責任遺伝子の同定を行うために、以下の3つのアプローチで実験を行った。

① A/J とコンソミック間の候補遺伝子 (gene A) の塩基配列の比較

脂肪肝感受性を決定する責任遺伝子は、第12番染色体上に存在する遺伝子の中で、A/J とコンソミックとの間で塩基配列が異なる遺伝子であることが必須条件である。まず、A/J マウスとコンソミックの gene A の塩基配列を決定して、アミノ酸置換やスプライシング異常の有無、転写調節に関わる上流領域の変異の有無について明かにした。

② 染色体部分置換 (コンジュニック) マウスの脂肪肝判定による責任遺伝子の位置的絞り込み

第12番染色体 (長さ約 120 Mbp、存在遺伝子は約 700) での *F11sa* の責任遺伝子の存在位置を絞り込むために、染色体の一部のみを SM/J に置換したコンジュニックマウスを作出することとした。そして、それらの高脂肪食摂取下での脂肪肝発症の有無の判定 (表現型解析) により責任遺伝子の存在領域を絞り込みを行った。



③ 培養肝細胞での候補遺伝子の脂質代謝における機能の解析 (in vitroでの同定)

哺乳類での機能が不明な gene A の肝臓脂質代謝における機能を明らかにするために、培養肝細胞株を用いた。この遺伝子は、発現量が高い場合に肝臓脂質の蓄積を抑制すると推定された。肝細胞株において gene A を siRNA を用いてノックダウンして、細胞中に脂質蓄積が起こるかを調べた。また、高脂肪食摂取下で肝臓脂質蓄積量が A/J に比べて低値を示すコンソミックの gene A (正常な機能を有すると考えられる) の cDNA を肝細胞株で過剰発現させ、細胞中の脂質含量が低下するかを調査した。



4. 研究成果

① A/J とコンソミック間の候補遺伝子 (gene A) の塩基配列の比較

A/Jとコンソミック間の候補遺伝子の塩基配列の比較を行った結果、A/Jの5'上流領域に約100 bpの欠失変異を見出した。また、アミノ酸変異を伴う塩基置換もエキソンの2か所で確認した。このことから、これらの変異のいずれかあるいは両者が候補遺伝子の発現量を制御している可能性が示された。候補遺伝子の遺伝子発現、タンパク質発現分布を確認したところ、肝臓のみならず腎臓においても高い発現量が示されるとともに、A/Jとコンソミック間での発現量に差が見られたことから、この遺伝子は組織特異的な発現量の低下を示す遺伝子ではないことが示された。

② 染色体部分置換 (コンジュニック) マウスの脂肪肝判定による責任遺伝子の位置的絞り込み

コンソミックマウスの背景系統 A/J マウスへの戻し交配を行うことにより、第12番染

色体のそれぞれ異なる領域を有するコンジェニック系統を5系統作製することに成功した。研究期間内では、このうちのセントロメア側約28 Mbと35 Mbを有する2つのコンジェニックマウスの脂肪肝形質の解析を行うことが出来た。その結果、作出した2つの系統では脂肪肝形質の有意な変化が見られなかったことから、主要な脂肪肝の責任遺伝子はセントロメア側35 Mbよりテロメア側の領域に存在することが示唆された。

③培養肝細胞での候補遺伝子の脂質代謝における機能の解析 (*in vitro*での同定)

コンソミックマウスの肝臓の網羅的な遺伝子発現量解析から見出した1つの候補遺伝子に注目して、この候補遺伝子が脂肪肝の形成に及ぼす影響を*in vitro* (培養細胞系)での機能解析を中心に研究を行った。

候補遺伝子をマウス肝ガン細胞株に恒久的に過剰発現させた過剰発現細胞株を樹立した。この恒久過剰発現株では、肝臓での脂肪酸合成に関わる転写因子SREBP-1cの遺伝子発現量が低下し、トリグリセリド合成においてもグリセロール骨格へアシル脂肪酸を転移させるDGATの遺伝子発現量が低下した。

また、siRNAによって候補遺伝子をノックダウンしたところ、過剰発現によって低下した遺伝子の中で逆に増加する傾向を示す複数の遺伝子が観察された。

本研究により、脂肪肝原因遺伝子の候補遺伝子が、肝臓内のトリグリセリド合成を負に制御することを見出し、この遺伝子が肝臓での脂質代謝に関与する新たな分子である可能性を示した。

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3件)

- ①Ohno T, Hata K, Baba T, Io F, **Kobavashi M**, Horio F, Nishimura M.
Establishment of consomic strains derived from A/J and SM/J mice for genetic analysis of complex traits.
Mamm.Genome 査読有 23:764-769 (2012)
doi: 10.1007/s00335-012-9435-x.

- ②Babaya N, Fujisawa T, Nojima K, Itoi-Babaya M, Yamaji K, Yamada K, **Kobavashi M**, Ueda H, Hiromine Y, Noso S, Ikegami H.
Direct evidence for susceptibility genes for type 2 diabetes on mouse chromosomes 11 and 14. *Diabetologia* 査読有 53:1362-1371 (2010)
doi: 10.1007/s00125-010-1737-5.

- ③ **Kobavashi M**, Ohno T, Hada N, Fujiyoshi M, Kuga M, Nishimura M, Murai A, Horio F.
Genetic analysis of abdominal fat distribution in SM/J and A/J mice.
J Lipid Res. 査読有 51:3463-3469 (2010)
doi: 10.1194/jlr.M009563.

[学会発表] (計4件)

- ①都築佳奈、**小林美里**他
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、東北大学)2013 年 3 月 24-27 日
- ②都築佳奈、**小林美里**他
マウスにおける脂肪肝感受性遺伝子の候補遺伝子が脂質代謝に及ぼす影響
第 64 回 日本栄養・食糧学会中部支部大会 (平成 24 年 12 月 15 日、名古屋大学)
- ③**小林美里**他
マウス第 12 番染色体上の脂肪肝感受性に関与する遺伝子の探索
日本農芸化学会 2012 年度大会 2012 年 3 月 23-25 日 (京都、京都女子大)
- ④**小林美里**他
高脂肪食性脂肪肝の感受性遺伝子座 (*F11sa*) 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 (平成 22 年 5 月、徳島)

[図書] (計 1 件)

- ①**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
最新臨床糖尿病学(上) 日本臨床 202-206 (2012) 分担執筆

〔その他〕

ホームページ情報

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~anutr/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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