

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380068

研究課題名(和文) 網羅的遺伝子変異検出法を活用したマウスの食餌性糖尿病および肥満遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of diabetogenic and obesity genes by using nucleotides sequence variations between SM/J and A/J mice.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、マウスSM/J系統とA/J系統を用いた遺伝解析により高脂肪食摂取下において糖尿病、肥満、脂肪肝を引き起こす遺伝子の存在領域(QTL)を両マウスのゲノムの10箇所にマップした。本研究では、次世代シーケンサーを用いたSM/JとA/J系統間の網羅的な遺伝子変異検出により、10箇所の領域内の候補遺伝子を選抜した結果、第12番染色体に脂肪肝感受性遺伝子としてlah1を選抜した。この遺伝子を肝細胞に過剰発現させると細胞内脂肪量を減少させ、この遺伝子が脂質代謝関連遺伝子の発現を変化させる機能を持つことを初めて示した。現在はlah1ノックアウトマウスを作製してその脂肪肝発症の確認を進めている。

研究成果の概要(英文)：We had mapped 10 quantitative traits loci (QTLs) for diabetes, obesity and fatty liver on chromosomes of SM/J and A/J mice under feeding a high-fat diet. In this study, we developed exome analyses of SM/J and A/J mice genomes by using next generation sequencer, and found out a lot of nucleotides mutations between these two strains exons. By using this mutation list, we extracted lah1 as a candidate gene for fatty liver on chromosome 12. The overexpression of lah1 gene in Hepa-1 cell (mouse hepatoma cell) caused the reduction of intracellular triglycerides, and changed the expressions of lipogenesis-related genes. We are establishing the lah1-knockout mouse for clarifying the incidence of fatty liver by depleting the lah1 expression, and then lah1 will be identified as a fatty liver gene.

研究分野：栄養生化学

キーワード：糖尿病遺伝子 肥満遺伝子 マウス 高脂肪食

1. 研究開始当初の背景

SM/J と A/J マウスから作出された組み換え近交(RI)系統群の糖尿病形質を調べて SM/J と A/J が糖尿病遺伝子を保有することを示し (Diabetes, 52:180 (2003))、RI 系統の SMXA-5 マウスを高脂肪食誘発型糖尿病モデルマウスとして開発した (Biosci. Biotechnol. Biochem., 68, 226 (2004))。科研費基盤研究(B)(平成 17-19 年度)の成果として、SMXA-5 と SM/J との交雑系を用いた高脂肪食摂取下での QTL 解析の結果、第 2 番染色体に糖尿病遺伝子の存在領域をマップした。この遺伝子の同定を進めるために、SMXA-5 のこのマップ領域を含む染色体断片(120Mb)を SM/J 系統に導入した糖尿病コンジェニックマウスの作成に成功した (Diabetologia, 49:486 (2006))。科研費基盤研究(B)(平成 21-23 年度)では、このコンジェニックマウスから 6 種類の系統を作出してその糖尿病の有無を調べて、糖尿病遺伝子の位置を 3.4Mb 領域 (約 50 個の遺伝子が存在)まで狭めた。この候補遺伝子を選ぶために、SM/J と A/J 間で発現レベルが異なる 3.4Mb 領域内の遺伝子を DNA マイクロアレイ解析により検出した。さらに、候補選抜のためには、この約 50 個の遺伝子について両系統間の変異を検出する必要があるが、この分析は従来法では極めて長期間を要し困難である。この分析期間を圧倒的に短縮する方法として、次世代シーケンサーを用いた全エクソン領域の変異検出法の採用を着想した。また、本研究にいたるまでの科研費研究での成果を利用して、SM/J と A/J の第 2 番以外の染色体に高脂肪食誘発性糖尿病、肥満および脂肪肝の遺伝子の存在領域をマップすることにも成功した (Physiol. Genomics, 35:65 (2008), J. Lipid Res., 51:3463(2010))。全エクソンの変異検出結果を利用すれば、これらの 10 箇所のマップ領域内の候補遺伝子を効率的に選抜できることを着想し、本研究の申請に至った。

2. 研究の目的

2 型糖尿病(以後、糖尿病)および肥満は、複数の遺伝因子と食事などの環境因子とが相互に作用して発症する。我々は、糖尿病・肥満を呈さないマウス SM/J 系統と A/J 系統とが複数の糖尿病および肥満遺伝子を潜在的に保有しており、これらが組み合わさることにより糖尿病、肥満が発症することを見出した。現在までに、高脂肪食摂取下において糖尿病あるいは肥満を支配する遺伝子の存在領域を QTL (Quantitative Trait Loci) 解析により両マウスのゲノムの 10 箇所にマップした。本研究では、次世代シーケンサーを用いた SM/J と A/J 系統間の網羅的な遺伝子変異検出により、各領域内の候補遺伝子を迅速かつ効率的に選抜した上で、それらの遺伝子の作用を検証し、糖尿病および肥満遺伝子を同定する。

3. 研究の方法

(1) SM/J と A/J 系統のエクソン領域の塩基配列解読と、両系統間の遺伝子変異の検出

両系統のそれぞれのゲノム DNA を専用機器 (Covaris) を用いて 150 ~ 180bp に断片化し、断片化 DNA の両端にアダプターを付加した後に、PCR にてフラグメント DNA ライブラリーを増幅する。得られた DNA ライブラリーから、エクソンキャプチャーキット (アジレント・テクノロジー Sure Select XT Mouse All Exon) を用いてエクソン部分から構成されるフラグメント DNA のみを選抜した。この選抜されたエクソン部分 DNA を PCR にてさらに増幅し、その DNA フラグメントの塩基配列を次世代シーケンサー (Life Technologies 社, 5500xl SOLiD; 名古屋大学遺伝子実験施設に設置) にて解読した。この解読作業によって得られた膨大な数量のフラグメント塩基配列をマウスのゲノムリファレンス配列に貼り付けて、同一塩基が解読された回数が多く信頼性の高い配列のみを抽出して、エクソン部分の配列を決定した。決定された両系統のエクソン部分の配列を比較し、両系統間の遺伝子変異を検出した。

(2) 両系統間の遺伝子変異の検出結果を利用した、糖尿病および肥満遺伝子の候補の選抜

両系統間で遺伝子変異(欠失、挿入、アミノ酸置換を伴う変異)が検出された遺伝子の内、10 箇所のマップ領域内に存在する遺伝子を抽出した。取り上げた遺伝子の変異については、キャピラリー DNA シーケンサーにて塩基配列解読を行って変異を再確認した。

(3) 両系統間で発現レベルの異なる遺伝子の検出結果を利用した、糖尿病および肥満遺伝子の候補の選抜

本研究の前年度までに、高脂肪食を摂取させた SM/J と A/J 系統の骨格筋、脂肪組織および肝臓を用いた DNA マイクロアレイ解析を行って、全染色体において、両系統間で発現レベルの異なる遺伝子を選抜した。この SM/J と A/J 系統間で発現レベルが異なる遺伝子の内、10 箇所のマップ領域内に存在する遺伝子を探索した。これらの取り上げた遺伝子の両系統間での発現レベルの違いについては、リアルタイム PCR 法により再確認した。

(4) 選抜した候補遺伝子の糖尿病遺伝子あるいは肥満遺伝子としての同定

【脂肪肝遺伝子の候補遺伝子】

脂肪細胞 (3T3-L1 細胞) を用いて、RNAi 法により候補遺伝子を発現抑制した場合と、候補遺伝子を細胞に導入して過剰発現させた場合とにおける、細胞内脂肪量の変化を検証して、候補遺伝子の脂肪蓄積作用を証明した。この細胞系での脂肪蓄積に対する作用が確認できた遺伝子について、そのノックアウトマウスを入手して、高脂肪食摂取下での肥満の促進あるいは抑制を確認することを進めた。

4. 研究成果

(1) SM/JとA/J系統のエキソン領域の塩基配列解読と、両系統間の遺伝子変異の検出

両系統のそれぞれのゲノムDNAを専用機器(Covaris)を用いて150~180bpに断片化し、そのDNAフラグメントの塩基配列を次世代シーケンサー(Life Technologies社, 5500x1 SOLiD)にて解読した。この解読作業によってエキソン部分の配列が決定され、両系統間の遺伝子変異を検出した。

(2) 両系統間の遺伝子変異の検出結果を利用した糖尿病および肥満遺伝子の候補の選抜

両系統間で遺伝子変異(欠失、挿入、アミノ酸置換を伴う変異)が検出された遺伝子の内、10箇所マップ領域内に存在する遺伝子を抽出した。第2番染色体の糖尿病遺伝子(*T2dm2sa* 遺伝子座)の候補遺伝子として *Rapgef4* を選抜した。

(3) 両系統間で発現レベルの異なる遺伝子の検出結果を利用した、糖尿病および肥満遺伝子の候補の選抜

全染色体において、両系統間で発現レベルの異なる遺伝子を選抜した。このSM/JとA/J系統間で発現レベルが異なる遺伝子の内、10箇所のマップ領域内に存在する遺伝子を抽出した。第12番染色体の脂肪肝遺伝子(*F11sa* 遺伝子座)の候補遺伝子として *lah1* を選抜した。

(4) *lah1* の肝脂肪の制御作用の検証

マウス肝癌細胞であるHepa-1細胞に、*lah1* 発現プラスミドを導入して *lah1* の恒常的過剰発現Hepa-1細胞を得た。この過剰発現株と、正常なHepa-1細胞とに、倍地中にオレイン酸を添加して細胞内トリグリセリド量を測定した結果、過剰発現株ではトリグリセリド含量が低下することを確認した。このことは、マウス個体での *lah1* 発現レベルと肝臓トリグリセリド含量の変化と一致するものであった。また、過剰発現株では脂肪酸合成系酵素の発現レベルが低下することも明らかとなった。

(5) *lah1* のノックアウトマウスの作製と、その脂肪肝発症の検討

lah1 ノックアウト受精卵を入手し、ノックアウトマウス個体の作製を進め、*lah1* 全身性ノックアウトマウスを作出した。現在、このマウスでの高脂肪食摂取下での脂肪肝発症の確証を進めている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

- (1) Kobayashi, M., Ohno, T., Ihara, K., Murai, A., Kumazawa, M., Hoshino, H., Iwanaga, K., Iwai, H., Hamana, Y., Ito, M., Ohno, K. and Horio, F.:

Searching for genomic region of high-fat diet-induced type 2 diabetes in mouse chromosome 2 by analysis of congenic

strains.

PLoS One, (査読有)9(5),e96271(2014)

- (2) 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、(査読無)70(増刊号3, Suppl 3),202-206(2012)
- (3) 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, (査読有)23, 764-769 (2012)

[学会発表](計5件)

- (1) 鈴木京、小林美里、大野民生、辻村絢子、村井篤嗣、堀尾文彦:
コンジェニックマウスを用いた食餌誘導性脂肪肝感受性遺伝子の存在領域の解析
日本農芸化学会 2015年度大会、2015.3.26、岡山大学(岡山県・岡山市)
- (2) 小林美里、大野民生、井原邦夫、村井篤嗣、浜名芳輝、伊藤美佳子、大野欽司、堀尾文彦:
高脂肪食誘導性2型糖尿病の感受性遺伝子座(*T2dm2sa*)のコンジェニックおよびエクソーム解析
第68回日本栄養・食糧学会大会、2014.6.1、酪農学園大学(北海道・江別市)
- (3) 鈴木京、小林美里、大野民生、辻村絢子、小田裕昭、村井篤嗣、堀尾文彦:
脂肪肝感受性遺伝子座(*F11sa*)の候補遺伝子の発現制御機構の解析とコンジェニックマウスによる責任遺伝子の探索
第68回日本栄養・食糧学会大会、2014.5.31、酪農学園大学(北海道・江別市)
- (4) 小林美里、立石壮志、鈴木京、大野民生、大野欽司、伊藤美佳子、村井篤嗣、堀尾文彦:
マウス第12番染色体の脂肪肝感受性遺伝子座に存在する遺伝子のエクソーム解析
第67回日本栄養・食糧学会大会、2013.5.26、名古屋大学(愛知県・名古屋市)
- (5) 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、2013.3.26、東北大学(宮城県・仙台市)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔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

無し

(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

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

大野 欽司 (OHNO, Kinji)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：80397455

井原 邦夫 (IHARA, Kunio)
名古屋大学・遺伝子実験施設・准教授
研究者番号：90223297