

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3月31日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380084

研究課題名（和文）連鎖解析法により同定された食事性高コレステロール血症原因遺伝子の機能解明

研究課題名（英文）Study on the function of the responsible gene for diet induced hypercholesterolemia identified by linkage analysis

研究代表者

今泉 勝己（IMAIZUMI KASTUMI）

九州大学・農学研究院・学術特任教員

研究者番号：90037466

研究成果の概要（和文）：

食事性高コレステロール濃度を決定する遺伝子は雄では14番、雌では5番染色体上に存在する。以下それぞれ別々に解析した。

① 雄（染色体14番）における解析

染色体14番の連鎖解析により既にSMEK2を同定した。前年度はこの機能未知の遺伝子について、コンジェニック系統Ex.BN-Dihc2ラットを用いて、ラット全遺伝子を網羅したDNAチップによりトランスクリプトーム解析を行った結果、本遺伝子の制御による系が発見されたのでその解析を行った。

(1) コンジェニック系統Ex.BN-Dihc2ラットを用いた表現型の解析1

血清コレステロール濃度と肝臓トリアシルグリセロール量との関係

肝臓トリアシルグリセロールの合成不全が、高コレステロール血症を引き起こす。従って、Ex.BN-Dihc2ラットでも同様に起こっており、脂肪酸合成低下に起因したトリアシルグリセロール合成不全はSMEK2によっていると考えられた。

② 雌（染色体5番）における解析

染色体5番にある領域は雌の血清コレステロール濃度を規定していると考えられる。しかし現時点では25MBpとかなりの距離があり約245の遺伝子までに限局した。

研究成果の概要（英文）：

The responsible genes for dietary induced hypercholesterolemia separately exist on 14th and 5th chromosomes of rats. The gene on the 14th chromosome is SMEK2. SMEK2 affects on the triacylglycerol synthesis in the liver according to the data from a congenic strain of Ex.BN-Dihc2 rats and transcriptome analysis applied on the two strains. The number of candidate gene(s) on the 5th chromosome is still 245 genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
2010年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2011年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

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：栄養化学

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化症への危険を予知させる有用なバイオマーカーである血清コレステロール濃度の上昇には個人差があり、それには様々な遺伝子の変異が関係している。申請者は、SD 系ラットから交雑により単離され、コレステロールを摂取させると速やかに血清コレステロール濃度が上昇する外因性高コレステロール血症(ExHC)ラットを維持している。このラットの高コレステロール血症は肝臓から分泌される超低密度リポタンパク質(VLDL)の異化がより遅いことに基づいていることを見いだした(図 1)。

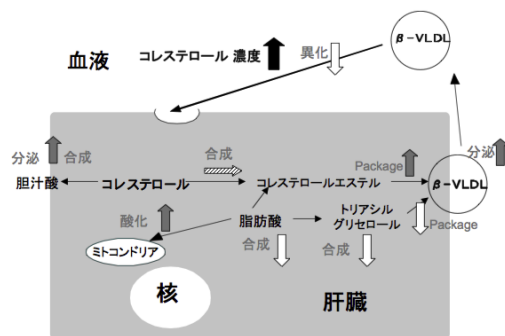


図1.ExHCラットの肝臓での脂質代謝

そして、この異化速度の減少は、肝臓で合成される VLDL のトリアシルグリセロール含量が少なく異化され難い組成であることに原因があった。さらに、このラットに Differential Display (DD)法の適用を試みた結果、肝臓での脂肪酸合成酵素(FAS)の mRNA 濃度およびその活性の低下が観察された(M.Sato, K. Imaizumi et al. 2000, Application of Random Arbitrary Primed Polymerase Chain Reaction Differential Display Method to Isolate Genes of Cholesterol Metabolism-Related Proteins from Rat Liver, Biosci. Biotech. Biochem., 64:1058-1060)。従って、本酵素やこの酵素の発現に関連するタンパク質の遺伝子ならびにこれらの遺伝子の転写調節領域に変異があると考えたが、解析の結果、変異は発見されなかった。そのため、さらに上位で FAS 遺伝子発現を制御しているタンパク質の変異の解析が必要となる。さらに、ExHC ラットは食事からのコレステロールに対して高応答することから、コレステロール吸収に関わるタンパク質の遺伝子解析も必要である。つまり、コレステロール代謝に関わるタンパク質の遺伝子の変異解析を網羅的に行う必要がある。そこで 2002 年にラットのゲノム全配列決定のプロジェクトにより発表されたマイクロサテライトマーカーを用いて、ラットゲノム全体を網羅的に解析する方法である、他系統との交雑により作出した F2 世

代を連鎖解析により、食事による血清コレステロール濃度を上昇させる領域として染色体 5 番および 14 番の領域に可能性があることが明らかになった(図 2、この図での結果は雌雄混合の結果である)。

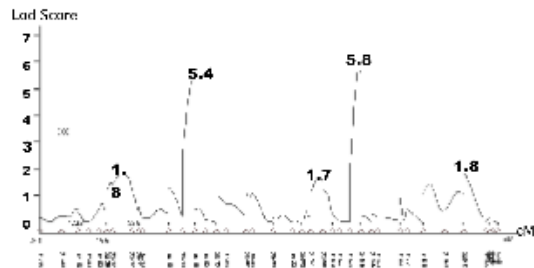


図2.F2世代ラットの連鎖解析結果

この解析の詳細では性により血清コレステロール値を決定している領域が分離しており、連鎖解析手法を用いた遺伝子同定結果においては非常にまれな結果であった。雄においての 14 番の領域には RGD1309450_predicted の遺伝子の coding region に mRNA が短くなる変異が存在し、この遺伝子はヒトおよびマウスで発現している SMEK2 と相同性が高い。しかし、この遺伝子に関する報告は少なく、homology の高い SMEK1 は MEK/ERK 系により制御され、肝臓トリアシルグリセロール量を調節していると報告されている (1.Tsai, J, et al. 2007 MEK-ERK inhibition corrects the defect in VLDL assembly in HepG2 cells: Potential role of ERK in VLDL-apoB100 particle assembly Arterioscler Thromb Vasc Biol. 27: 211-218, 2.Mendoza, M. C., et al. 2005. Loss of SMEK, a novel conserved protein, suppresses mek1 null cell polarity, chemotaxis, and gene expression defects. Mol Cell Biol. 25: 7839-785) のみで、詳細な遺伝子の機能は不明である。さらに、雌において血清コレステロール量を制御する領域は染色体 5 番に存在し、ホモコンジェニック系統で、約 55Mbp までに限局化しているが、未だに遺伝子同定にはいたっていない

2. 研究の目的

(1) 雄での解析-SMEK2 の機能と血清コレステロール濃度およびその他の表現型との関係

・SMEK2 の機能は肝臓のトリアシルグリセロール代謝と密接に関わっていると考えられる。さらに ExHC ラットでは図 1 において、トリアシルグリセロール代謝の不全が血清コレステロール濃度上昇にかかわっていることを明らかにしている。従ってトリアシルグリセロール代謝を指標とし、培養細胞において SMEK2 過発現および欠損実験を行い、SMEK2 と肝臓内トリアシルグリセロー

ル代謝およびコレステロール代謝について明らかにする。

・連鎖解析の過程で作出したコンジェニック系統 Ex.BN-Dihc2 ラットは ExHC ラットの染色体 14 番の標的座(Dihc2 領域)が BN 系統の染色体 14 の同座位と置き換わっている系統である。従って、血清コレステロール濃度は BN ラットと同様な値となっていることを報告した。この系統は現在も維持しており、この系統と ExHC および BN ラットを比較しコレステロールの摂取と SMEK2 との関係を明らかにする。なお、ExHC ラットでの栄養素に対する特異的な応答、他の表現型には、(i)食事脂肪の種類により血清コレステロール濃度が違う応答を示す、

(2) 雌での解析-エストロゲンと血清コレステロール濃度との関係

・染色体 5 番にある領域は雌の血清コレステロール濃度を規定していると考えられる。しかし現時点では 25MBp とかなりの距離があり約 350 の遺伝子が存在する。雌での血清コレステロール濃度に関する連鎖解析の報告例はない。前年度に引き続き解析する。

3. 研究の方法

① 雄 (染色体 14 番) における解析

染色体 14 番の連鎖解析により既に SMEK2 を同定した。前年度はこの機能未知の遺伝子について、コンジェニック系統 Ex.BN-Dihc2 ラットを用いて、ラット全遺伝子を網羅した DNA チップによりトランスクリプトーム解析を行った。

② 雌 (染色体 5 番) における解析

Dihc1 領域における原因遺伝子を同定するため、ExHC ラットの Dihc1 領域に BN ラットの遺伝子をホモで導入した系統を交配によって作製した。この系統では、Dihc1 領域における原因遺伝子が BN ラットのものに組み換わることで、コレステロールを摂取しても血清コレステロール濃度の上昇が抑えられる。この表現型の変化を利用して、Dihc1 領域内の一部分を BN ラットの遺伝子に組み換えたラットを作製し、コレステロール摂取後の血清コレステロール濃度を比較することで、コレステロール濃度の規定に関わっている領域を検証した。

4. 研究成果

食事性高コレステロール濃度を決定する遺伝子は雄では 14 番、雌では 5 番染色体上に存在する。以下それぞれ別々に解析した。

① 雄 (染色体 14 番) における解析

染色体 14 番の連鎖解析により既に SMEK2 を同定した。前年度はこの機能未知の遺伝子について、コンジェニック系統 Ex.BN-Dihc2 ラットを用いて、ラット全遺伝子を網羅した DNA チップによりトラン

スクリプトーム解析を行った結果、本遺伝子の制御による系が発見されたのでその解析を行った。

(1) コンジェニック系統 Ex.BN-Dihc2 ラットを用いた表現型の解析 1

血清コレステロール濃度と肝臓トリアシルグリセロール量との関係

肝臓トリアシルグリセロールの合成不全が、高コレステロール血症を引き起こす。従って、Ex.BN-Dihc2 ラットでも同様に起こっており、脂肪酸合成低下に起因したトリアシルグリセロール合成不全は SMEK2 によっていると考えられた。

② 雌 (染色体 5 番) における解析

染色体 5 番にある領域は雌の血清コレステロール濃度を規定していると考えられる。しかし現時点では 25MBp とかなりの距離があり約 245 の遺伝子までに限局した。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

1. 壽山智也、田中愛健、河野道生、朝比奈誠、城内文吾、佐藤匡央、病態モデル動物における白色脂肪組織重量を規定する遺伝子の同定、第 48 回化学関連支部合同九州大会、2011. 07. 09 (北九州)
2. 佐藤匡央、ラットにおける連鎖解析法を用いた新規コレステロール代謝遺伝子の探索、第 65 回日本栄養・食糧学会大会、2011. 05. 15 (東京)
3. Tanaka Y, Kawano M, Nakashima S, Sakamoto M, Asahina M, Imaizumi K, Sato M., Analysis of female-specific gene for responsiveness to dietary cholesterol in rats., The XVIIIth International Workshop on Genetic Systems in the Rat, 2010. 12. 01 (京都)
4. 河野 通生, 中島 早和子, 春山 和佳, 朝比奈 誠, 今泉 勝己, 佐藤 匡央, ラット血清 apoA-I 濃度を規定する遺伝子の同定, 第 47 回化学関連支部合同九州大会, 2010. 07. 10 (北九州)
5. M. Asahina, W. Haruyama, M. Sato, K. Imaizumi, M. Kawano, S. Nakashima, A genetic locus that regulates serum apo A-I levels on rat chromosome 3, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2010 Scientific Sessions, 2010. 04. 09 (米国 サンフランシスコ)
6. 田中愛健, 坂本麻衣, 河野通生, 中島早和子, 朝比奈誠, 佐藤匡央, 今泉勝己, 連鎖解析を用いた食事性高コレステロール

血症原因遺伝子の探索, 日本農芸化学会西日本、中四国、関西支部、日本栄養食糧学会九州・沖縄支部、及び日本食品科学工学会西日本支部合同大会, 2009. 10. 31. (那覇)

7. 田中愛健、中島早和子、坂本麻衣、佐藤匡央、今泉勝己, 病態モデル動物を用いた食事性高コレステロール血症原因遺伝子の探索, 第 46 回化学関連支部合同九州大会, 2009. 07. 11. (北九州)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他] なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今泉勝己 (IMAIZUMI KATSUMI)

九州大学・大学院農学研究院・学術特任教員

研究者番号 : 90037466

(2) 研究分担者

佐藤匡央 (SATO MASAO)

九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号 : 90294906

(3) 連携研究者

なし