

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目： 基盤研究 (C)

研究期間： 2007 年 ~ 2008 年

課題番号： 19591053

研究課題名 (和文)

QTL 解析で同定した候補領域のファインマッピングおよび候補遺伝子の機能解析

研究課題名 (英文)

Fine mapping of candidate regions identified by QTL analysis and functional analysis of candidate genes located within the QTL region.

研究代表者

森谷 真紀 (MORITANI MAKI)

徳島大学・疾患ゲノム研究センター・非常勤講師

研究者番号：50301312

研究成果の概要：

我国の2,000万人以上の糖尿病患者や予備群の診断と治療のために、糖尿病の疾患関連遺伝子の同定が急がれる。我々は、摂食抑制ホルモン受容体の変異体(*db*)の導入により、強制的に過食し重度の2型糖尿病(T2D)を来す系統と、遺伝的背景が異なる2系統の糖尿病非発症マウスとの交配系によって得られるF₂マウス集団を用いる独自のQTL解析法を確立した。これらのF₂集団を対象とした継続的なQTL研究において、T2Dや肥満に関連する形質(体重、内臓脂肪重量、血糖値など)に影響を及ぼす新規T2D疾患関連候補座位を複数見出した。また、高エネルギー摂取により病態形成に強く影響する座位を特定し、各QTLの作用をコンジェニックマウスを用いて生体レベルで評価した結果、体重、内臓脂肪重量に強い作用を認める2領域(4, 5番染色体)を特定した。複数ラインの“サブコンジェニックマウスを用いたファインマッピング”により、5番染色体の候補領域を5Mbに限局、領域内に存在する57候補遺伝子を特定し、病態の原因を明らかにする研究を継続中である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：2型糖尿病, QTL, *Lep^{db}*, サブコンジェニックマウス, 疾患関連遺伝子, 脂肪重量, 高脂肪食負荷, *misty* 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

ありふれた病気の代表的疾患である糖尿

病は、その発症と進展に複数の「遺伝因子」と「環境因子」が関与する。年々増加傾向を示す糖尿病患者や予備群の診断と治療のために、糖尿病の疾患関連遺伝子の同定が急務である。

我々は、以前より遺伝的背景が全く同一のクローン化されたマウスを用いて、糖尿病を自然発症する2型糖尿病モデルマウス(*db*マウス)を2系統の糖尿病非発症マウスと交配させてきた。他系統の遺伝的背景を混合することで、どのような遺伝子座位群(Loci)に存在する遺伝子型が、糖尿病の病態に関わる体重、内臓脂肪重量、血糖値などの量的形質(Quantitative Trait, QT)を修飾するかを明らかにする独自のQTL解析を確立し、QTL解析が疾患関連遺伝子座位を同定する強力な研究手段であることを明らかにしてきた。すなわち、(1)糖尿病における血糖値のように連続値をとる量的形質は、複数の座位群に相互に制御されること、(2)マウスゲノム塩基配列、マウス系統間で異なる単一ヌクレオチド多型(SNP)情報を用いることで、候補領域の絞り込みが可能であること、(3)量的形質を制御するQTLとその領域内に存在する複数の遺伝子の発現量の系統間における差を調べることで疾患関連遺伝子の絞り込みが可能であることを証明してきた。

通常の摂食量では機能しないが、過食状態(肥満状態)において初めて糖尿病の病態形成に強く作用する染色体座位をマウスゲノム上に14箇所(いずれもLod値4.3以上)特定し、QTL座位の作用の強い4座位について、候補領域のみが一方のマウスの背景遺伝子に置換されたコンジェニックマウスおよびQTL領域を部分的に保持するサブコンジェニックラインを複数維持してきた。4座位に対し、コンジェニックマウスの表現型を比較した結果、2座位については、表現型に有意な違いが認められなかったが、残りの2座位については、体重、血糖値、腸間膜脂肪重量の表現型について、QTL座位の単独作用が確認された。

これらの研究背景を基に、単独作用が確認された2座位に対し、糖尿病発症に係わる新しい疾患関連遺伝子を見出すために、本研究をスタートした。

2. 研究の目的

我々は、糖尿病を自然発症する2型糖尿病モデルマウス(*db*マウス)を糖尿病非発症マウスと交配させ、2系統の遺伝的背景を混合することで、どのような遺伝子座位群に存在する遺伝子型が、糖尿病の病態に関わる血糖値、体重、内臓脂肪重量等の量的形質を修飾するかを明らかにしてきた。本研究では、コンジェニックマウスで確実に単独効果が認められた2座位について、「サブコンジェニックマウス系統間の表現型比較結果からファインマッピングを行い、QTL領域を絞り込むとともに、糖尿病発症に係わる新しい疾患関連遺伝子を見出すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) サブコンジェニックマウスの繁殖

過食(高エネルギー、高脂肪食負荷)でT2Dの病態に強く寄与すると考えられる座位の内、特に肥満との関連が示唆された2つの候補座位領域に対しファインマッピングを実施し、各群のサブコンジェニックマウス系統(7-16種)を用いた解析で、候補領域の絞り込みを検討する。

コンジェニックマウス作製途中に派生する、ターゲット領域内の各マーカーを部分的に分断して保持するマウス個体が作製される。目的のQTL領域を分断して保持するサブコンジェニックマウス約300~500匹の産仔を作出し、当核QTL領域をヘテロで所有するマウスを選抜する。これらの産仔を種親マウスとして、交配・作出・遺伝子型判定を繰り返し個体数を増やし、交配に十分な雌雄マウスの匹数が確保できた段階で、対象領域をホモで有する個体を作製、複数のサブコンジェニックマウス間の表現型(体重、内臓脂肪重量、血糖値等)を比較し、各個体が保有する遺伝子型と表現型の相関を解析することにより、対象QTLの物理的領域を1Mb(約30遺伝子)まで限局する。

(2) サブコンジェニックマウス系統を用いた候補領域の特定およびハプロタイプ構造の決定

候補領域のa群)*db/db*産仔群によるマッピングにおいて、体重を指標にサブコンジェニックマウス系統を用いたマッピ

ングを実施し、高脂肪食負荷で、体重、肥満に作用する領域を特定する。

サブコンジェニック系統のゲノムマーカーSNPの前後配列をシーケンス解析し、各サブコンジェニック系統間のハプロタイプ構造を決定する。こうして絞り込んだ候補領域内に存在する遺伝子の塩基配列の中で、交配した系統間でアミノ酸配列の異なる遺伝子、異なるSNP多型およびサブコンジェニック系統マウスの臓器間でmRNAの発現量に差のある遺伝子を候補遺伝子とする。

(3) QTL 領域内にコードされる遺伝子の検討

各サブコンジェニック系統に対し、候補領域内にコードされた遺伝子の内、C57BL6とDBA2マウス系統間で多型を有する遺伝子で、ミスセンス変異UTR多型、およびイントロン多型を有する遺伝子を抽出する。脂肪・肝臓・骨格筋・心筋・脳・膵臓・胃・小腸・腎臓・精巣の各組織におけるmRNA発現レベルをコンジェニックマウス/対照マウスで比較し、双方間に明らかな発現量の差を認める遺伝子を選抜する。RNAの調製は、マウス30-50匹マウスから上記10組織を採取し、total RNAを調製する。発現量の測定系は、仮想遺伝子やスプライシング変異体に対応するため、複数のRT-PCR反応系を独自に設計する。

(4) *db*が野生型群でのマッピング

b群)野生型産仔群のマッピングにおいて、*db/db*産仔群での解析と同様に、体重を指標にサブコンジェニックマウス系統を用いたマッピングを実施し、高脂肪食負荷で、体重、肥満に作用する領域を特定する。領域が特定された場合は、(3)と同様に領域内の遺伝子の解析を行う。

(5) *misty* 遺伝子の解析

野生型産仔群のマッピングは、本領域内に存在する *db* マウスの毛色を決める *misty* 遺伝子が体重に影響を及ぼしている可能性が示唆される。そこで、7種のサブコンジェニックマウス系統を用いて、マイクロサテライトマーカーD4Mit255と *Lepr^{db}* 遺伝子の間に位置すると考えられ

る *misty* 遺伝子の本体を同定する解析を行う。具体的に、マウスデータベースを基に、毛色とD4Mit255のgenotyping結果から、D4Mit255と *Lepr* 遺伝子間で組換えを生じたマウスおよび組換えを生じていないマウスを対象に、候補領域内に存在するSNPsの内、交配に用いたC57BL6とDBA2系統間で多型を示すSNPsを抽出、genotypingを行う。最終的に、組換えを生じたマウス群で一致した多型を示すSNPを見出し、そのSNPの存在する遺伝子を見出す。

4. 研究成果

我々が、独自に見出した「高脂肪食負荷で体重、肥満重量などの糖尿病の病態に寄与すると考えられる2候補領域(A, B領域)に対し、各群のサブコンジェニックマウス系統(7-16種)を用いた解析で、a群) *db/db*産仔群およびb群)野生型群について、ファインマッピングを実施し、候補領域の絞り込みを検討した。研究期間で以下の知見を得た。

(1) A領域の原因遺伝子の候補領域を1-2 Mb程度迄限定する目的で、サブコンジェニックマウス系統によるマッピングを3回実施した。b群)では、高カロリー餌負荷時の体重増加に影響を与える候補領域として、約8 Mbの領域を特定した。一方、a群)では、合計3回のマッピングを実施したが、表現型(体重、脂肪重量、血糖値)が安定せず、マッピング結果に再現性が認められなかった。結果として、A領域についてはa群)での絞り込みを中止した。

(2) b群)野生型産仔群のマウスを用いて、高脂肪食負荷により肥満を誘導させたモデルでA領域の表現型効果を検討した。その結果、コンジェニックマウスで、体重、内臓脂肪重量、肝重量が対象群より有意に増加し、野生型での原因遺伝子の解析が可能である事が示された。さらに、体重を指標に7種のサブコンジェニックマウス系統を用いたマッピングの結果、高脂肪食負荷で、体重、肥満に作用する約3 Mbの領域を特定することができた。

上記約3 Mbの領域には、56遺伝子がコードされており、その内、C57BL6とDBA2マウス系統間で多型を有する遺伝子を調査した

結果、多型によってミスセンス変異を生じる6遺伝子、ナンセンス変異を生じる1遺伝子、スプライス部位に多型を有する1遺伝子、UTRに多型を有する11遺伝子、およびイントロンに多型を有する23遺伝子が明らかとなった。

(3) A領域のb群)野生型産仔群に対するその後の解析で、本領域内に存在するdbマウスの毛色を決めるmisty遺伝子が体重に影響を及ぼしている可能性が示唆された。そこで、7種のサブコンジェニックマウスで、*D4Mit174*と*Lep1*遺伝子間(20.5Mb)で組換えを生じたマウス(黒毛)、組換えを生じていないマウス(黒毛又は灰色毛)を対象に、misty遺伝子の本体を同定する解析を試みた。20.5 Mb内でC57BL6(B6/B6型)とDBA2(D2/D2型)系統間で多型を示す60 SNPsのgenotypingを行った結果、*D4Mit255*と*Lep1*遺伝子間の2.5Mbに絞ることができた。現在、positive controlでB6/B6型、negative controlでD2/D2型、さらに、組換えマウスでB6/B6型のgenotypeを示すSNP(misty遺伝子)の抽出を継続中である。

(4) B領域、a群) db/db産仔群の表現型効果は、体重(8週齢)で30%、腸間膜脂肪重量で40%増加しており、これらの形質を指標とすることで原因遺伝子のマッピングの可能性が示された。さらに、5種類のサブコンジェニックマウスを用いて体重、内臓脂肪重量を指標にファインマッピングを行った結果、約8Mbの領域に絞られ、この内、3Mb内にはほとんど遺伝子が存在しないため、約5Mbに絞られた。領域内には57遺伝子がコードされ、これらの内で、ミスセンス変異を生じる9遺伝子を中心に、mRNA発現レベルをコンジェニックマウス/対照マウスで比較し、双方間に明らかな発現量の差を認める遺伝子の解析を継続して解析中である。

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 11 件)

1. Suzuki T, Moritani M 他 10 名, 2 番目: Diabetic modifier QTLs in F₂ intercrosses carrying homozygous

transgene of TGF-beta. *Mamm. Genome* 19:15-25, 2008 (査読有)

2. Yamaguchi Y, Moritani M 他 13 名, 2 番目: Lack of association of genetic variation in chromosome region 15q14-22.1 with type 2 diabetes in a Japanese population. *BMC Med. Genet.* 9:22-33, 2008 (査読有)
3. Miyawaki K, Moritani M 他 8 名, 7 番目: Transgenic expression of a mutated cyclin-dependent kinase 4 (CDK4/R24C) in pancreatic beta-cells prevents progression of diabetes in db/db mice. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 8:33-41, 2008 (査読有)
4. Kunika K, Moritani M 他 9 名, 9 番目: Common coding variant in the TCF7L2 gene and study of the association with type 2 diabetes in Japanese subjects. *J. Hum. Genet.* 53:972-982, 2008 (査読有)
5. Tanahashi T, Moritani M 他 10 名, 7 番目: The association of genetic variants in Krüppel-like factor 11 and Type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabet Med.* 25:19-26, 2008 (査読有)
6. Moritani M, Itakura M 他 16 名, 1 番目: Genetic association of single nucleotide polymorphism in endonuclease G-like 1 gene with type 2 diabetes in a Japanese population. *Diabetologia* 50:1218-1227, 2007 (査読有)
7. Ochi M, Itakura M 他 14 名, 14 番目: The frequency of the G/G genotype of resistin single nucleotide polymorphism at -420 appears to be increased in younger onset type 2 diabetes. *Diabetes* 56:2834-2838, 2007 (査読有)
8. Miyatake K, Itakura M 他 6 名, 8 番目: PKC412 (CGP41251) modulates the proliferation and lipopolysaccharide-induced inflammatory responses of RAW 264.7 macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360:115-121, 2007 (査読有)
9. Iwata T, Itakura M 他 3 名, 4 番目: Parafibromin tumor suppressor enhances cell growth in the cells expressing SV40 large T antigen. *Oncogene* 26:6176-6183, 2007 (査読有)

10. Osabe D, Moritani M 他 11 名, 11 番目:
Evaluation of sample size effect on the
identification of haplotype blocks. *BMC
Bioinformatics* 14:200-210, 2007 (査読
有)
11. Sakamoto Y, Itakura M 他 11 名, 6 番目:
SNPs in the KCNJ11-ABCC8 gene locus are
associated with type 2 diabetes and
blood pressure levels in the Japanese
population. *J. Hum. Genet.* 52:781-793,
2007 (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

1. 田口純:分泌小胞輸送複合体 exocyst
complex のサブユニットである Sec8 分子
の脾臓 B 細胞の分化過程における機能の
解析, 第 38 回日本免疫学会総会・学術集
会, 2008 年 12 月 2 日, 国立京都国際会
館
2. 森谷真紀:3p24.3-22.1 領域における 2 型
糖尿病疾患感受性遺伝子の探索および機
能解析, 第 62 回国立病院総合医学会総
会, 2008 年 11 月 21 日, 東京国際フォー
ラム
3. 森谷真紀:3 番染色体短腕の関連解析探索
により見出した日本人 2 型糖尿病疾患感
受性 ENDOGL1 遺伝子の機能解析, 第 51 回
日本糖尿病学会年次学術集会, 2008 年 5
月 23 日, 東京国際フォーラム
4. 山口裕加:日本人 2 型糖尿病疾患感受性
候補遺伝子の網羅的関連解析および
ENDOGL1 遺伝子の機能解析, 第 30 回日本
分子生物学会, 2007 年 12 月 13 日, パシ
フィコ横浜
5. 森谷真紀:糖尿病モデルマウスの QTL 解
析とマウス系統間のハプロタイプ解析を
用いた疾患感受性遺伝子の同定, 第 50
回日本糖尿病学会, 2007 年 5 月 24 日, 仙
台サンプラザ

[図書] (計 1 件)

1. 板倉光夫, 医学書院, 新臨床内科学
第 9 版, 2009, 744-745

[その他]

<http://www.genome.tokushima-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

氏名: 森谷 真紀 (MORITANI MAKI)
所属研究機関・部局・職名:
徳島大学・疾患ゲノム研究センタ
ー・非常勤講師
研究者番号: 50301312

(2) 研究分担者

氏名: 板倉 光夫 (ITAKURA MITSUO)
所属研究機関・部局・職名:
徳島大学・疾患ゲノム研究センター・
教授
研究者番号: 60134227

氏名: 国香 清 (KUNIKA KIYOSHI)
所属研究機関・部局・職名:
徳島大学・疾患ゲノム研究センター
研究者番号: 30396254