

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： 19591080  
 研究課題名 (和文)  
 レンチウイルスベクターを用いた 2 型糖尿病候補遺伝子 *ENDOGL1* の機能解析  
 研究課題名 (英文)  
 Functional analysis of the *ENDOGL1* gene as a candidate disease susceptibility gene for T2D by lentivirus vector.  
 研究代表者  
 板倉 光夫 (ITAKURA MITSUO)  
 徳島大学・疾患ゲノム研究センター・教授  
 研究者番号： 60134227

## 研究成果の概要：

多遺伝子性疾患の疾患感受性座位を探索する遺伝統計学手法として、患者/健常者を対象とした関連解析、および連鎖不平衡解析が多く用いられる。我々は、異なる人種で疾患感受性が報告されている候補座位に対し『遺伝子領域に配置した等間隔・高アレル頻度 SNPs をマーカーとして用いる 2 段階絞り込み関連解析法』を独自に開発し、日本人の 2 型糖尿病 (T2D) の疾患感受性遺伝子を探索し、遺伝統計学的に 3 番染色体上に新規疾患感受性候補遺伝子 (*ENDOGL1*) を見出だした。糖尿病発症に係わる機序を探索した結果、1) *ENDOGL1* 遺伝子は膵β細胞に高発現し糖尿病の病態で発現が増加すること、2) *ENDOGL1* タンパクはミトコンドリアに局在すること、3) 200 mg の量ポリクローナル抗体精製に成功したこと、4) DNA/RNA nuclease ファミリーの *Endo G* 遺伝子 (アポトーシス刺激により DNA の断片化を引き起こす) と約 40% のホモロジーを持つ本遺伝子の発現が、アポトーシス誘導時に増加すること、さらに、5) ER ストレスにより本遺伝子の発現量が増加することを見出だした。作製した抗体を用いて糖代謝、アポトーシスに及ぼす影響を継続して検討中である。

## 交付額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2007 年度 | 2,500,000 | 750,000   | 3,250,000 |
| 2008 年度 | 1,100,000 | 330,000   | 1,430,000 |
| 年度      |           |           |           |
| 年度      |           |           |           |
| 年度      |           |           |           |
| 総計      | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：2 型糖尿病, 疾患感受性候補遺伝子, *ENDOGL1* 遺伝子, ミトコンドリア, 遺伝子発現量, ポリクローナル抗体, アポトーシス, ER ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病は「ありふれた病気」の代表的疾患で、多くの患者や予備群に対し効率よく診断と治療を行うために、疾患感受性遺伝子の同定が必須である。糖尿病の疾患感受性遺伝子の同定は、ヒトゲノム配列と多型情報を用いることで、検出力が飛躍的に向上した。特に、「単一ヌクレオチド多型 (SNP)」を用いる関連解析は、疾患感受性候補遺伝子の同定に有効である。我々は、これまで、「等間隔・高アレル頻度 SNPs を用いる 2 段階絞り込み関連解析法」を独自に開発し、複数人種の連鎖解析結果を基に関連解析を推進してきた。そして、3 番染色体短腕の候補領域 (3p24.3-22.1) に対する日本人 T2D 患者/健常対照者 (約 1,900 名) を対象とした関連解析、およびファイナマッピングの結果、P 値が多重検定をクリアする有意 SNPs ( $P < 0.00004$ ) を含む連鎖不平衡ブロック内に、新規の T2D 疾患感受性候補遺伝子として *ENDOGL1* 遺伝子を同定した。*ENDOGL1* 遺伝子の機能は未知であるが、豚島で発現が高く、糖尿病モデルマウス (*db*) の豚島細胞、筋肉組織においてその発現が変動するので、糖および脂質代謝に関与する可能性が大きく、本遺伝子の機能を解析をする重要性が高いと判断し、本研究をスタートした。

## 2. 研究の目的

我々は、日本人 T2D 患者/健常対照者を対象に、糖尿病の疾患感受性候補座位の 1 つである 3 番染色体短腕の網羅的関連解析の結果、糖尿病の疾患感受性候補遺伝子として機能未知の *ENDOGL1* 遺伝子を独自に見出した。本研究では、遺伝統計学的に抽出・同定された *ENDOGL1* 遺伝子が、糖尿病発症および脂質代謝に及ぼす影響を解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) *ENDOGL1* 遺伝子発現量の検討

ヒト組織 (脂肪・肝臓・骨格筋・心筋・脳・膵β細胞・胃・小腸・腎臓・肺の 10 種類)、T2D モデルマウスの *db/db* マウスおよび野生型マウスの組織 (脂肪・肝臓・骨格筋・心筋・脳・膵β細胞・腎臓・肺の 8 種類)、および胎生 7-17 日齢のマウス

(C57BL6) より、total RNA を調製し mRNA 発現レベルを検討する。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。

### (2) *ENDOGL1* 蛋白の細胞内局在の検討

*ENDOGL1* cDNA の 3' 末端に EGFP、FLAG 配列をインフレームで連結した発現ベクターを構築し、融合蛋白を作製後、3 種の細胞株 (NIH3T3, 293T, HEK293) に一過性に発現させる。発現細胞については、細胞内小器官特異的な蛍光発色プローブ (ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体、リソゾーム) などを用いて、EGFP 発現蛋白とオーバーラップする小器官特異的なプローブを調べ、細胞内局在部位を確認する。同時に、一過性に発現させた 293T 細胞を、比重遠心法により、細胞質、核、ミクロソーム、およびミトコンドリアに分画し、抗 FLAG 抗体 (1:10,000) および細胞内小器官特異的マーカー蛋白質に対する抗体 (1:500) を用いたウェスタンブロッティング法 (WB) で解析する。必要に応じて、細胞内小器官分画法 (Klip 法を用いた細胞内膜画分の分画) を行い、組織内蛋白の発現様式を検討する。

### (3) *ENDOGL1* 蛋白を用いた機能解析の検討

*ENDOGL1* 遺伝子には既存の抗体が存在しないため、大腸菌による His タグ融合蛋白発現系 (pET ベクター) でマウス *ENDOGL1* 全長に対するポリクローナル抗体を作製する。具体的には、His-tag-mEndog11 全長融合蛋白を BL21 (DE3) 大腸菌に発現・抽出し、ニッケルカラム (His-Bind® Resin, Novagen) を用いて精製した蛋白を、抗 His-tag 抗体を用いた WB で解析する。精製蛋白を兎に 6 回以上免疫後、全採血をプロテイン A カラムを用いて精製する。

### (4) *ENDOGL1* 遺伝子のアポトーシスによる影響の検討

*ENDOGL1* 遺伝子のアポトーシスによる影響を、*ENDOG* 遺伝子をコントロールとして解析する。HeLaS3 細胞を用いて、2 種類の誘導剤 (スタウロsporin; STS とシクロヘキシミド; CYC) によりアポトーシスを誘導した後、*ENDOGL1* 遺伝子が *ENDOG* 遺伝子と同様の

アポトーシスを誘導するか否かを検討する。又、高血糖状態下で、*ENDOGL1*遺伝子の発現増加が認められた事から、小胞体(ER)ストレス誘導剤(テュニカマイシン)で刺激後の*ENDOGL1*遺伝子の発現誘導、およびアポトーシス誘導の有無を検討する。

#### (5) レンチウイルスベクターを用いた高発現系を用いた*ENDOGL1*遺伝子の機能解析

レンチウイルスベクターを用いた発現系は、膵β細胞、膵島細胞などの低分裂細胞への高発現および発現抑制を検討するために適した系である。レンチウイルスベクター(pCS-CDF-CG-PRE)を用いた遺伝子導入実験で、*ENDOGL1*遺伝子の糖および脂質代謝に及ぼす影響を解析する。コンストラクトは、プラスミドベクター(pCS-CDF-CG-PRE)の5' LTRと3' LTR間に、標的遺伝子を挿入しプラスミドDNAを精製する。

高発現条件下で、糖代謝に及ぼす影響を、2-deoxy-D-[3H]glucoseを指標とした糖の取り込み量およびインスリン分泌能を指標とした系で検討する。脂質代謝に及ぼす影響は、3T3L1細胞の分化マーカー(PPAR $\gamma$ )の発現量定量、グリセロール3リン酸脱水素酵素活性、脂肪細胞の分化に及ぼす影響を検討する。さらに、糖尿病モデル動物の各種組織、膵β細胞株(MIN6など)での特異性、アポトーシス誘導時の*ENDOGL1*タンパクの細胞内挙動、機能の相違の有無について検討する。

#### 4. 研究成果

3番染色体の糖尿病の疾患感受性候補座位に対する日本人T2D患者/健常対照者群を対象とした関連解析の結果から、疾患感受性候補遺伝子として独自に見出した*ENDOGL1*遺伝子の、糖尿病発症に関わる機序を検討した。研究期間で以下の知見を得た。

- (1) ヒトおよびマウス*ENDOGL1* mRNAの発現量をリアルタイムRT-PCR法で解析し結果、*ENDOGL1*の発現量は、脳、膵島で野生型マウスと比べて有意に高く、特に糖尿病状態マウスの膵島で有意な増加が認められた。
- (2) *ENDOGL1*-EGFP、*ENDOGL1*-FLAG融合蛋白を一過性に発現させ、蛍光シグナルを観察した。さらに、細胞内局在マーカー蛋白に対する特異的抗体を用いて、免疫組織染色およびWB法で細胞内局在を検討した。その結

果、*ENDOGL1*タンパクはミトコンドリアに局在することが確認された。

(3) 兔皮下への6回の抗原感作後、血清のELISAスクリーニングで抗体価はプラトーに達し、全採血をプロテインAカラムを用いて精製した。その結果、200 mg量の抗体を精製することが出来た。*mEndog11*を発現させた293FT細胞および無発現細胞より抽出した蛋白を用いて、精製抗体のWB解析の結果、抗体の特異性(41 kDa)を確認した。

(4) *ENDOGL1*遺伝子は、DNA/RNA nucleaseファミリーのEndonuclease G(アポトーシス刺激によりDNAの断片化を引き起こす)と、ヒト、マウスで35%以上のホモロジーを持つ。そこで、2種類のアポトーシス誘導剤、(STS, CYC)添加後、2-7時間(STS)、24-48時間(CYC)培養し、アポトーシス誘導時の*hENDOGL1*および*hENDOG*の発現量を検討した。CYC添加24時間後の*hENDOGL1*の発現量は、3-5倍と増加を認めた(*hENDOG*の発現量には変動は認められなかった)。一方、STS添加後の両遺伝子の発現量は、濃度依存的に減少した。さらに、低グルコース培養下、tunicamycin添加培養後のMIN6細胞では、ERストレスマーカーCHOPの誘導とともに、*mEndog11*の発現量は有意に増加することを確認した(*mENDOG*の発現量には変動は認められなかった)。

(5) レンチウイルスベクターを用いた発現系では、高タイタークローンが得られなかった。そこで、HeLaS3細胞にエレクトロポレーション法にて*ENDOGL1*遺伝子を導入した安定株5クローン(高蛋白および低蛋白発現クローン)について、作製した抗体を用いて糖・脂質代謝、アポトーシスに及ぼす影響を検討中である。

#### 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 13 件)

1. Yasuda K, Itakura M 他 45 名, 43 番目: Variants in *KCNQ1* are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus. *Nat. Genet.* 40:1092-1097, 2008 (査読有)

2. Kunika K, Itakura M 他 9 名, 11 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)
  3. Miyawaki K, Inoue H, Itakura M 他 7 名, 10 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.* 82:33-41, 2008 (査読有)
  4. Keshavarz P, Inoue H, Itakura M 他 3 名, 6 番目: Single nucleotide polymorphisms in genes encoding LKB1 (STK11), TORC2 (CRTC2) and AMPK alpha2-subunit (PRKAA2) and risk of type 2 diabetes. *Mol. Genet. Metab.* 9:200-209, 2008 (査読有)
  5. Yamaguchi Y, Itakura M 他 13 名, 15 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)
  6. Tanahashi T, Itakura M 他 10 名, 12 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)
  7. Kobayashi S, Itakura M 他 23 名, 22 番目: Association of STAT4 with susceptibility to rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in the Japanese population. *Arthritis. Rheum.* 58:1940-1946, 2008 (査読有)
  8. Kondoh K, Itakura M 他 6 名, 4 番目: Altered cellular immunity in transgenic mice with T cell-specific expression of human D4-guanine diphosphate-dissociation inhibitor (D4-GDI). *Int. Immunol.* 20:1299-1311, 2008 (査読有)
  9. 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)
  10. Osabe D, Itakura M 他 10 名, 13 番目: Evaluation of sample size effect on the identification of haplotype blocks. *BMC Bioinformatics* 14:200-210, 2007 (査読有)
  11. Moritani M, Itakura M 他 16 名, 18 番目: Genetic association of single nucleotide polymorphisms in endonuclease G-like 1 gene with type 2 diabetes in a Japanese population. *Diabetologia* 50:1218-1227, 2007 (査読有)
  12. Sakamoto Y, Inoue H, Itakura M 他 10 名, 13 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)
  13. Takata Y, Inoue H, Itakura M 他 11 名, 14 番目: Genetic association between the PRKCH gene encoding protein kinase Ceta isozyme and rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Arthritis Rheum.* 56:30-42, 2007 (査読有)
- [学会発表] (計 6 件)
1. 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
  2. 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
  3. 越智正昭, レジスチン SNP-420 G/G 型の頻度は若年発症の 2 型糖尿病ほど高い, 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. 国香清, 日本人 4,392 名による TCF7L2 と

KIAA1598 遺伝子多型の関連解析, 第 52 回  
日本人類遺伝学会, 2007 年 9 月 13 日, 京  
王プラザホテル

6. 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: 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: 6 0 1 3 4 2 2 7

### (2) 研究分担者 (INOUE HIROSHI)

氏名: 井上 寛  
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・准教授  
研究者番号: 2 0 2 9 4 6 3 9

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: 5 0 3 0 1 3 1 2

### (3) 連携研究者

該当者なし