

201107012A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

(創薬バイオマーカー探索研究事業)

糖尿病の新規バイオマーカーに基づく診断法と
蛋白質構造解析に立脚した新規治療法の開発

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 門脇 孝

平成24(2012)年 5月

目 次

I 総括研究報告

糖尿病の新規バイオマーカーに基づく診断法と蛋白質構造解析に立脚した新規 治療法の開発：研究総括 門脇 孝	1
--	---

II 分担研究報告

1. ヒト組織を活用したトランスクリプトーム解析 原 一雄	6
2. 脂肪細胞のエピゲノム解析 脇 裕典	9
3. 2型糖尿病感受性遺伝子操作動物の作製・解析 窪田 直人, 高本 偉碩	12
4. KCNQ1 ファミリー蛋白質の結晶構造解析に関する研究 横山 茂之	14

III 研究成果の刊行に関する一覧表	16
--------------------------	----

IV 研究成果の刊行物・別刷	20
----------------------	----

厚生労働科学研究費補助金（創薬バイオマーカー探索研究事業）
総括研究報告書

糖尿病の新規バイオマーカーに基づく診断法と
蛋白質構造解析に立脚した新規治療法の開発

研究代表者 門脇 孝 東京大学医学部附属病院 糖尿病・代謝内科 教授

研究要旨

日本人 2 型糖尿病感受性遺伝子として TCF7L2, KCNQ1 が確認・同定され、さらに最近我々はゲノムワイド関連解析により UBE2E2 と C2CD4A/4B を新たに見出した。TCF7L2 は欧米人においても重要な 2 型糖尿病感受性遺伝子として認識されており、インスリン分泌に関連することが報告されている。KCNQ1 はわが国の 2 型糖尿病の遺伝素因の 10 数%を説明し、UBE2E2 は日本人・東アジア人に特有のものでインスリン分泌に関連する。しかしこれまで同定された 10 余の遺伝子の発現や機能の低下・亢進のいずれが糖尿病発症の原因となるのかほとんど解明されていない。そこで、①テーラーメイド医療の実用化に向けた 2 型糖尿病感受性遺伝子の発現・機能異常の解明と新規バイオマーカーに基づく診断法の開発、②2 型糖尿病感受性遺伝子がコードする蛋白質の構造解析に立脚した創薬シーズの探索と新規治療法の開発を目指し、(A) ヒト組織を活用したトランスクリプトーム解析・エピゲノム解析、(B) 遺伝子操作動物を用いた機能解析、(C) 蛋白質の結晶構造解析を実施した。

今年度の研究結果から、(A) 皮下脂肪と内臓脂肪で発現レベルが異なる遺伝子を多数見出し、主成分分析では皮下脂肪と内臓脂肪は明確に分離されることを確認した。また、Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements (FAIRE)-seq 解析とヒストンや転写因子に対するクロマチン免疫沈降 (ChIP)-seq を施行し、脂肪細胞特異的な転写制御領域を同定した。(B) また、TCF7L2 に着目して、TCF7L2 の機能低下型遺伝子操作マウスを製作・解析した。その結果、TCF7L2 は膵β細胞量の制御を通じてインスリン分泌に重要な役割を果たしていることを見出した。(C) さらに、KCNQ1 に着目し、立体構造解析のアプローチで糖尿病発症との関わりを調べるために、各種の細胞・無細胞発現系で KCNQ1/KCNEs 共発現とタンパク質安定性を探索し、無細胞合成系での KCNQ1/KCNE 複合体の安定発現を見出し、比較的高純度の標品を得た。

今後ともこれら多面的な研究アプローチを有機的に推進することで、糖尿病の新規バイオマーカーに基づく診断法と蛋白質構造解析に立脚した新規治療法の開発を目指す。

【研究分担者】

原 一雄 東京大学医学部附属病院統合的
分子代謝疾患科学講座 特任准教授

脇 裕典 東京大学医学部附属病院 糖尿
病・代謝内科 脂肪細胞機能制御学 特任
准教授

窪田 直人 東京大学医学部附属病院 糖
尿病・代謝内科 特任准教授

高本 偉碩 東京大学医学部附属病院 糖
尿病・代謝内科 特任助教

横山 茂之 独立行政法人理化学研究所
生命分子システム基盤研究領域 領域長

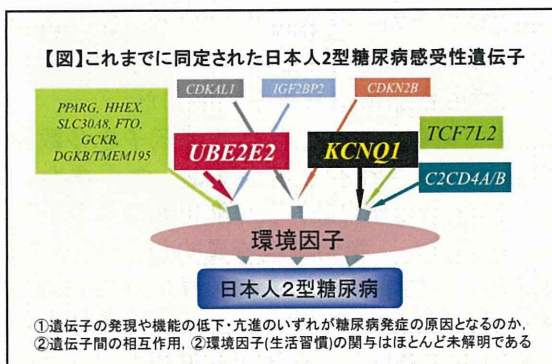
A. 研究目的

わが国では糖尿病とその合併症が増加し
続けており、活力ある高齢化社会の実現の
ためには、遺伝素因をはじめとする体質に
立脚した効果的なテーラーメイドの糖尿病

の予防法・治療法を開発することが喫緊の課題となっている。

日本人の2型糖尿病感受性遺伝子として、電位依存性カリウムチャネルKCNQ1や転写因子TCF7L2が同定・確認され、さらに最近我々はユビキチン結合酵素UBE2E2と核蛋白質 C2CD4A/4B を新たに発見した(Nat. Genet, 2010)。特にKCNQ1はわが国の2型糖尿病の遺伝素因の10数%を説明し、チャネル機能に加えてnon-coding RNAを介したエピゲノム制御に関与する可能性もある。また、UBE2E2は日本人を含めた東アジア人に特有の2型糖尿病感受性遺伝子でインスリン分泌に関連する。

しかし、これまでに同定された10余の2型糖尿病感受性遺伝子の発現や機能の低下・亢進のいずれが糖尿病発症の原因となるのかほとんど解明されていない【図】。



そこで本研究は、①テーラーメイド医療の実用化に向けた2型糖尿病感受性遺伝子の発現・機能異常の解明と新規バイオマーカーに基づく診断法の開発、②2型糖尿病感受性遺伝子がコードする蛋白質の構造解析に立脚した創薬シーズの探索と新規治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

(A) ヒト組織を活用したトランスクリプトーム解析・エピゲノム解析、(B) 遺伝子操作動物を用いた機能解析、(C) 蛋白質の結晶構造解析という多面的な研究方法をとった。詳細は分担研究報告書を参照されたい。

【研究対象者に対する人権擁護上の配慮、不利益・危険性の排除や説明と同意への対応状況】

「ヒトゲノム・遺伝子解析研究のための倫理指針」「疫学研究に関する倫理指針」「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、書面による本研究への同意が得られた者のみを対象として研究を遂行する。更に指針の策定を受けて本学に設置された倫理審査委員会の承認を得て、研究計画書に従い研究を実施した。

具体的な配慮の項目としては以下の通りである。

(1) 研究で使用される試料に関して：既に提供されているDNA等の試料は、遺伝子解析研究での利用を明示した上で同意が文書で得られているもののみを研究対象としており問題はない。本研究で新規に提供される試料は、全て指針に従って採取される。

(2) 個人情報の保護に関して：本研究で提供される試料はすべて、個人識別情報(カルテ番号、名前、住所等)を管理する個人識別情報管理者により匿名化される。連結可能のための対応表は、個人識別情報管理者のもとで厳重に管理され、個人の情報を処理するコンピューターは他の一切のコンピューターと切り離され、個人識別情報管理者によって保管される。更に、個人識別情報管理者以外は、連結可能匿名化番号と個人識別情報との連結が不可能なようにする。当院では研究分担者の原一雄により個人情報匿名化システムが確立している(J. Hum. Genet. 48:327, 2003)

(3) 予測される試料提供者に対する危険や不利益に関して：試料提供は主として前腕の静脈からの採血によっており身体的危険はほとんどないといつてよい。また提供された試料は解析に先立って速やかに匿名化されるので、試料等提供者の尊厳と人権は十分に保護されていると考えられる。また、本研究は多因子病としての2型糖尿病の感受性遺伝子を対象としており、単一遺伝子病の様に必ずしも遺伝カウンセリングが必要となるケースは少ないと思われるが、予想外の遺伝病の存在が明らかになった場合の予測される病態や予後、治療方針等につき、結果の開示に伴い本人および家族に医学的あるいは心理的問題を生じる可能性があり、遺伝カウンセリング等の体制をとつ

ている。

【実験動物に対する動物愛護上の配慮】

実験動物については「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」（昭和55年3月27日 総理府告示）を遵守して実験に利用し、実験動物の生活環境の保全と、実験に際してできる限り苦痛を与えないように努力した。

C. 研究結果

(A) 皮下脂肪と内臓脂肪で発現レベルが異なる遺伝子を多数見出し、主成分分析では皮下脂肪と内臓脂肪は明確に分離されることを確認した。2型糖尿病・メタボリックシンドロームの病態形成にとって、内臓脂肪の果たすユニークな役割が示唆された。

また、Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements (FAIRE)-seq 解析とヒストンや転写因子に対するクロマチン免疫沈降 (ChIP)-seq を施行し、脂肪細胞特異的な転写制御領域を同定した。脂肪細胞特異的 FAIRE 領域の DNA 配列のモチーフ解析により、分化制御因子の unbiased な解析と新規制御因子の同定を行った。

(B) TCF7L2 に着目して、TCF7L2 の機能低下型遺伝子操作マウスを作製・解析した。その結果、TCF7L2 は膵β細胞量の制御を通じてインスリン分泌に重要な役割を果たしていることを見出した。

(C) KCNQ1 に着目し、立体構造解析のアプローチで糖尿病発症との関わりを調べるために、各種の細胞・無細胞発現系で KCNQ1/KCNEs 共発現とタンパク質安定性を探索し、無細胞合成系での KCNQ1/KCNE 複合体の安定発現を見出し、比較的高純度の標品を得た。

D. 考察

わが国では糖尿病とその合併症が増加し続け、平成19年国民健康・栄養調査によれば糖尿病が強く疑われる人と予備群が計2210万人にのぼる。糖尿病の克服は活力ある高齢化社会の実現に向けて、厚生労働行政上極めて重要な課題である。日本人は欧米人に比べて肥満の頻度は低いにもかかわらず糖尿病の頻度が同程度であることから、

日本人は糖尿病になりやすい様々な遺伝素因を有すると考えられ、テーラーメイド医療の実用化が待望される疾患である。本研究により日本人の2型糖尿病感受性遺伝子の発現・機能異常の解明、2型糖尿病感受性遺伝子の相互作用を含めた生理的・病態生理的役割の解明、テーラーメイド医療の実用化に向けた新規バイオマーカーに基づく診断法の開発、効率的な1次予防のためのハイリスク者スクリーニング法の開発が期待される。さらに、KCNQ1は人口寄与危険度からわが国の2型糖尿病の遺伝素因の10数%を説明するのみならず、致死性不整脈をきたすLong QT症候群等の他領域の難治性疾患にも幅広く関与し、創薬ターゲット分子として注目されているが、未だその結晶構造は不明である。本研究によりKCNQ1チャネルの結晶構造が解明されることで、幅広い疾患領域での構造解析に立脚した新規治療薬の創薬シーズの探索に貢献することが予想される。

E. 結論

本研究においては、(A) ヒト組織におけるトランスクリプトーム解析、2型糖尿病感受性遺伝子領域における FAIRE-seq 技術を用いたエピゲノム解析、(B) 2型糖尿病感受性遺伝子に関する遺伝子操作動物の作製・解析、(C) 2型糖尿病感受性遺伝子がコードする重要な蛋白質の合成・精製と結晶化を有機的に推進することで、糖尿病の新規バイオマーカーに基づく診断法と蛋白質構造解析に立脚した新規治療法の開発を目指す。

F. 健康危険情報

非該当

G. 研究発表

1: Waki H., Nakamura M, Yamauchi T, Wakabayashi K, Yu J, Hirose-Yotsuya L, Take K, Sun W, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Fujita T, Aoyama T, Tsutsumi S, Ueki K, Kodama T, Sakai J, Aburatani H, Kadowaki T. Global mapping of cell type-specific open chromatin by FAIRE-seq reve

- als the regulatory role of the NFI family in adipocyte differentiation. *PLoS Genet.* 2011;7(10):e1002311.
- 2: Kukimoto-Niino M, Yoshikawa S, Takagi T, Ohsawa N, Tomabechei Y, Terada T, Shirouzu M, Suzuki A, Lee S, Yamauchi T, Okada-Iwabu M, Iwabu M, Kadowaki T, Minokoshi Y, Yokoyama S. Crystal structure of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase in complex with the inhibitor STO-609. *J Biol Chem.* 2011;286(25):22570-9.
- 3: Cho YS, Chen CH, Hu C, Long J, Hee Ong RT, Sim X, Takeuchi F, Wu Y, Go MJ, Yamauchi T, Chang YC, Kwak SH, Ma RC, Yamamoto K, Adair LS, Aung T, Cai Q, Chang LC, Chen YT, Gao Y, Hu FB, Kim H L, Kim S, Kim YJ, Lee JJ, Lee NR, Li Y, Liu JJ, Lu W, Nakamura J, Nakashima E, Ng DP, Tay WT, Tsai FJ, Wong TY, Yokota M, Zheng W, Zhang R, Wang C, So WY, Ohnaka K, Ikegami H, Hara K, Cho YM, Cho NH, Chang TJ, Bao Y, Hedman AK, Morris AP, McCarthy MI; DIAGRAM Consortium; MuTHER Consortium, Takayanagi R, Park KS, Jia W, Chuang LM, Chan JC, Maeda S, Kadowaki T, Lee JY, Wu JY, Teo YY, Tai ES, Shu XO, Mohlke KL, Kato N, Han BG, Seielstad M. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies eight new loci for type 2 diabetes in east Asians. *Nat Genet.* 2011, in press
- 4: Ohshige T, Iwata M, Omori S, Tanaka Y, Hirose H, Kaku K, Maegawa H, Watada H, Kashiwagi A, Kawamori R, Tobe K, Kadowaki T, Nakamura Y, Maeda S. Association of new Loci identified in European genome-wide association studies with susceptibility to type 2 diabetes in the Japanese. *PLoS One.* 2011;6(10):e26911.
- 5: Handa N, Takagi T, Saijo S, Kishishita S, Takaya D, Toyama M, Terada T, Shirouzu M, Suzuki A, Lee S, Yamauchi T, Okada-Iwabu M, Iwabu M, Kadowaki T, Minokoshi Y, Yokoyama S. Structural basis for compound C inhibition of the human AMP-activated protein kinase $\alpha 2$ subunit kinase domain. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2011;67(Pt 5):480-7.
- 6: Ueki K, Kadowaki T. The other sweet face of XBP-1. *Nat Med.* 2011;17(3):246-8.
- 7: Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin receptor signaling: a new layer to the current model. *Cell Metab.* 2011;13(2):123-4.
- 8: Endo Y, Suzuki M, Yamada H, Horita S, Kunimi M, Yamazaki O, Shirai A, Nakamura M, Iso-O N, Li Y, Hara M, Tsukamoto K, Moriyama N, Kudo A, Kawakami H, Yamauchi T, Kubota N, Kadowaki T, Kumeh H, Enomoto Y, Homma Y, Seki G, Fujita T. Thiazolidinediones enhance sodium-coupled bicarbonate absorption from renal proximal tubules via PPAR γ -dependent nongenomic signaling. *Cell Metab.* 2011;13(5):550-61.
- 9: Mutoh M, Teraoka N, Takasu S, Takahashi M, Onuma K, Yamamoto M, Kubota N, Takamoto I, Kadowaki T, Sugimura T, Wakabayashi K. Loss of adiponectin promotes intestinal carcinogenesis in Min and wild-type mice. *Gastroenterology.* 2011;140(7):2000-8.
- 10: Misu H, Takamura T, Takayama H, Hayashi H, Matsuzawa-Nagata N, Kurita S, Ishikura K, Ando H, Takeshita Y, Ota T, Sakurai M, Yamashita T, Mizukoshi E, Yamashita T, Honda M, Miyamoto K, Kubota T, Kubota N, Kadowaki T, Kim HJ, Lee IK, Minokoshi Y, Saito Y, Takahashi K, Yamada Y, Takakura N, Kaneko S. A liver-derived secretory protein, selenoprotein P, causes insulin resistance. *Cell Metab.* 2010;12(5):483-95. PubMed PMID: 21035759.
- 11: Kurokawa J, Nagano H, Ohara O, Kubota N, Kadowaki T, Arai S, Miyazaki T. Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM)

M) is required for obesity-associated recruitment of inflammatory macrophages into adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(29):12072-7.

12: Kubota T, Kubota N, Kumagai H, Yamaguchi S, Kozono H, Takahashi T, Inoue M, Itoh S, Takamoto I, Sasako T, Kumagai K, Kawai T, Hashimoto S, Kobayashi T, Sato M, Tokuyama K, Nishimura S, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Yamazaki T, Ezaki O, Kawamura K, Masuda H, Mori M, Sugi K, Oike Y, Shimokawa H, Yanagihara N, Tsutsui M, Terauchi Y, Tobe K, Nagai R, Kamata K, Inoue K, Kodama T, Ueki K, Kadowaki T. Impaired insulin signaling in endothelial cells reduces insulin-induced glucose uptake by skeletal muscle. *Cell Metab.* 2011;13(3):294-307.

13: Awazawa M, Ueki K, Inabe K, Yamauchi T, Kubota N, Kaneko K, Kobayashi M, Iwane A, Sasako T, Okazaki Y, Ohsugi M, Takamoto I, Yamashita S, Asahara H, Akira S, Kasuga M, Kadowaki T. Adiponectin enhances insulin sensitivity by increasing hepatic IRS-2 expression via a macrophage-derived IL-6-dependent pathway. *Cell Metab.* 2011;13(4):401-12.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し

ヒト組織を活用したトランスクリプトーム解析

研究分担者 原 一雄 東京大学医学部附属病院 統合的分子代謝疾患科学講座

研究要旨 内臓脂肪が糖尿病の発症を促進する分子メカニズムを解明するために、内臓脂肪のヒト皮下脂肪と内臓脂肪のペアを収集しトランスクリプトーム解析にて比較した。皮下脂肪と内臓脂肪で発現レベルが異なる遺伝子を多数見出し、主成分分析では皮下脂肪と内臓脂肪は明確に分離されることを確認した。メタボリックシンドロームの病態形成にとって、内臓脂肪の果たすユニークな役割が示唆された。

A. 研究目的

日本人2型糖尿病感受性遺伝子としてTCF7L2, KCNQ1が確認・同定され、さらに最近我々はゲノムワイド関連解析によりUBE2E2とC2CD4A/4Bを新たに見出した。KCNQ1はわが国の2型糖尿病の遺伝素因の10数%を説明し、UBE2E2は日本人・東アジア人に特有のものでインスリン分泌に関連する。しかしこれまで同定された10余の遺伝子の発現や機能の低下・亢進のいずれが糖尿病発症の原因となるのかほとんど解明されていない。そこで本研究は多面的なアプローチにより、テーラーメイド医療の実用化に向けた2型糖尿病感受性遺伝子の発現・機能異常の解明と新規バイオマーカーに基づく診断法の開発を目指す。

B. 研究方法

皮下脂肪については付属病院形成外科で脂肪吸引術〔東京大学医学部附属病院諸規定（平成6年6月1日最終改正）に基づく医療〕施行予定の患者で、本研究に対する同意を文書で得ることができた者を対象とする。脂肪吸引術によって採取された脂肪組織の一部（50ml）を本研究に利用する。術前検査時に通常の検査項目とは別に全血10mlを採取し5mlを血中アディポカイン値の測定に、5mlをゲノムDNAの抽出に利用する。内臓脂肪については付属病院大腸肛門外科または胃食道外科における消化器癌摘出術の際に、癌組織と一塊となって正常部分も摘出されるが、その正常組織に含まれ

る内臓脂肪を本研究に供する。その際に同時に腹壁の皮下脂肪1cm³程度も同意を得た上で採取し今回の研究に利用した。上記によって収集された組織から、RNeasyKit(QIAGEN社)によってRNAを抽出しAffymetrix社のDNA Chipによって遺伝子発現を網羅的に解析した。内臓脂肪と皮下脂肪で遺伝子発現が異なっている遺伝子について、t検定やGene Set Enrichment Analysis (GSEA)などによる解析を行った。

また、前年度に得られた2型糖尿病関連の約50万個の一塩基多型(SNP)遺伝子型をもとに、公共のデータベースである1000 Genomes Projectから得られた高密度遺伝子多型の情報を利用してゲノムワイドに2型糖尿病の関連解析を行った。

（本研究については倫理委員会の承認をうけ、対象者の文書による同意を得て実施しており倫理面の問題は無い）

C. 研究結果

これまでヒト皮下脂肪300例、内臓脂肪200例を収集した。脂肪組織におけるレプチン遺伝子発現は年齢・性別で調整した後にBMIとは正の相関を、アディポネクチン遺伝子発現とは負の相関を認め、前年度までに得られた皮下脂肪・内臓脂肪のセットにおいても同様の傾向を認め再現性についても確認された。皮下脂肪と内臓脂肪における遺伝子発現は主成分分析によって明確に分かれることから、遺伝子発現解析によってそのサンプルが皮下脂肪か内臓脂肪で

あるかが判別可能であり，こちらも前年度までに得られたセットにおける結果と合致しており再現性について確認された．皮下脂肪と内臓脂肪で発現レベルが5倍以上， p 値で 10^{-5} 未満と有意に異なっている遺伝子が複数認められた．内臓脂肪と皮下脂肪で遺伝子発現が異なっている遺伝子についてパスウェイ解析やGene Set Enrichment Analysis (GSEA)などによる解析を行ったところ，炎症に関わる遺伝子のセットにおいて，内臓脂肪で皮下脂肪に比して発現レベルが高いものが多く含まれているという結果を得た．更に内臓脂肪で皮下脂肪に比して発現レベルが高い遺伝子の発現レベルは，そのサンプルが由来する個体のインスリン抵抗性と関連する傾向にあった．

また，これまで報告されている領域とは異なる領域に由来はわからなかった複数の遺伝子領域を，1000 Genomes Projectの情報を取り入れた高密度関連解析によって新たに検出した．

D. 考察

皮下脂肪と内臓脂肪は遺伝子発現レベルで明確に異なるプロファイルをもつことが改めて確認され，メタボリックシンドロームの病態形成にとって，内臓脂肪の果たすユニークな役割が示唆された．今後は皮下脂肪と内臓脂肪とで発現が明確に異なる遺伝子のSNPについて遺伝子型を決定して，遺伝子発現レベルと関連するSNPを探索し(eQTL解析)，内臓脂肪蓄積からインスリン抵抗性・メタボリックシンドロームを来しやすい遺伝素因を解明していく予定である．

E. 結論

本研究で，ヒト組織を利用した発現解析と高密度遺伝子多型情報を利用した関連解析の有用性が示された．今後更にサンプルを増やした解析を進めることで，2型糖尿病遺伝素因の解明と遺伝素因を標的とした創薬に道を開くものと期待される．

F. 健康危険情報

非該当

G. 研究発表

論文発表

1: Kodama K, Horikoshi M, Toda K, Yamada S, Hara K, Irie J, Sirota M, Morgan AA, Chen R, Ohtsu H, Maeda S, Kadowaki T, Butte AJ. Expression-based genome-wide association study links the receptor CD44 in adipose tissue with type 2 diabetes.

Proc Natl Acad Sci U S A. 109(18):7049-54, 2012

2: Imamura M, Maeda S, Yamauchi T, Hara K, Yasuda K, Morizono T, Takahashi A, Horikoshi M, Nakamura M, Fujita H, Tsunoda T, Kubo M, Watada H, Maegawa H, Okada-Iwabu M, Iwabu M, Shojima N, Ohshige T, Omori S, Iwata M, Hirose H, Kaku K, Ito C, Tanaka Y, Tobe K, Kashiwagi A, Kawamori R, Kasuga M, Kamatani N; Diabetes Genetics Replication and Meta-analysis (DIAGRAM) Consortium, Nakamura Y, Kadowaki T. A single-nucleotide polymorphism in ANK1 is associated with susceptibility to type 2 diabetes in Japanese populations.

Hum Mol Genet. 2012 Apr 6. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22456796.

3: Cho YS, Chen CH, Hu C, Long J, Ong RT, Sim X, Takeuchi F, Wu Y, Go MJ, Yamauchi T, Chang YC, Kwak SH, Ma RC, Yamamoto K, Adair LS, Aung T, Cai Q, Chang LC, Chen YT, Gao Y, Hu FB, Kim HL, Kim S, Kim YJ, Lee JJ, Lee NR, Li Y, Liu JJ, Lu W, Nakamura J, Nakashima E, Ng DP, Tay WT, Tsai FJ, Wong TY, Yokota M, Zheng W, Zhang R, Wang C, So WY, Ohnaka K, Ikegami H, Hara K, Cho YM, Cho NH, Chang TJ, Bao Y, Hedman ÅK, Morris AP, McCarthy MI; DIAGRAM Consortium; MuTHER Consortium, Takayanagi R, Park KS, Jia W, Chuang LM, Chan JC, Maeda S, Kadowaki T, Lee JY, Wu JY, Teo YY, Tai

ES, Shu XO, Mohlke KL, Kato N, Han BG, Seielstad M. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies eight new loci for type 2 diabetes in east Asians. *Nat Genet.* 44(1):67-72, 2011

4: Ogawa N, Imai Y, Takahashi Y, Nawata K, Hara K, Nishimura H, Kato M, Takeda N, Kohro T, Morita H, Taketani T, Morota T, Yamazaki T, Goto J, Tsuji S, Takamoto S, Nagai R, Hirata Y. Evaluating Japanese patients with the Marfan syndrome using high-throughput microarray-based mutational analysis of fibrillin-1 gene. *Am J Cardiol.* 108(12):1801-7, 2011

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し

脂肪細胞のエピゲノム解析

研究分担者 脇 裕典 東京大学医学部附属病院 糖尿病・代謝内科 脂肪細胞機能制御学

研究要旨

全身の糖脂質代謝および2型糖尿病の発症に重要な役割を果たす脂肪細胞のゲノム上の遺伝子転写制御領域を同定するため、Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements (FAIRE)-seq解析とヒストンや転写因子に対するクロマチン免疫沈降(ChIP)-seqを施行した。脂肪細胞特異的な転写制御領域を同定し、特に転写開始点から遠位のエンハンサーの重要な役割を果たすことを示した。脂肪細胞特異的 FAIRE 領域の DNA 配列のモチーフ解析により、分化制御因子の unbiased な解析と新規制御因子の同定を行った。エピゲノム解析手法を用いることで、生理的状態および2型糖尿病における遺伝子転写制御のメカニズムとその異常の解明が期待される。

A. 研究目的

2型糖尿病感受性遺伝子としてTCF7L2, KCN Q1・PPAR γ UBE2E2・C2CD4A/4Bなどが同定されてきた。しかしこれまで同定された遺伝子の発現や機能の制御がどのように生じるのか、またその制御がどのように糖尿病発症の原因となるのか解明は十分になされていない。多面的かつ独創的なアプローチにより新規バイオマーカーに基づく診断法の開発と新規治療薬の開発を目指して、分担者の脇はエピゲノム解析を通して本研究の目的の達成に貢献する。平成23年度は特に本研究の標的臓器である脂肪細胞のエピゲノム解析の系を主として培養細胞系を用いて確立した。

B. 研究方法

ゲノムDNAはヒストン8量体を1.65回転してヌクレオソームを構成し、それらが複雑に折りたたまれてクロマチン構造を作っている。遺伝子の発現の制御においてヒストン・DNAの修飾やクロマチン構造のダイナミックな変化が必須であり、分化・細胞特異的な転写制御や病態にともなう制御異常に重要な役割を果たすことが示唆されている。エンハンサーなどの制御領域を全ゲノム上で同定する手法として我々はFAIRE-seq法の系を確立した。FAIREはホルマリン固定されたゲノムDNAをソニケーションで断片化し、フェノールクロロホルム抽出をする

ことにより、ヌクレオソーム(ヒストン)・フリーのゲノムDNA領域を同定する手法である(図1)。この手法を3T3-L1脂肪細胞およびその前駆細胞に対して行うことにより得られた脂肪細胞特異的なオープンクロマチン領域のDNAの配列を次世代シーケンサーで読み取ることにより、ゲノム上の転写制御領域を網羅的にマ

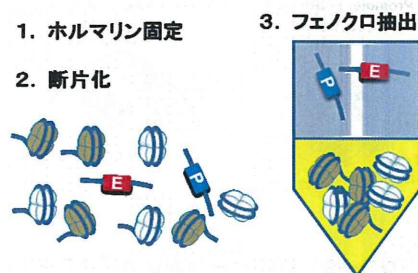


図1 FAIREによるオープンクロマチン領域の検出

ップした。またヒストン修飾領域や転写因子の結合領域についてはクロマチン免疫沈降法(ChIP)を施行し次世代シーケンサーで同様にマップした(ChIP-seq)。ゲノム上の制御領域とヒストン修飾との関連、遺伝子との位置関係、遺伝子の実際の転写との関連を検討するとともに、領域のDNA配列に濃縮される転写因子の結合モチーフなどのバイオインフォーマティクス的手法を用いた。

C. 研究結果

脂肪細胞分化においてFAIRE-seqを行い、エンハンサーなどゲノム上の制御領域となりうるオープンクロマチン領域を全ゲノム領域にマッピングした(図2)。非プロモーターFAIRE領域はプロモーターFAIRE領域と比較して分化や細胞種により非常にダイナミックに変化し

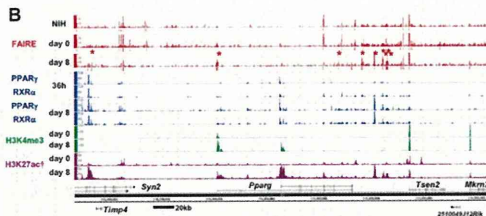


図2 FAIREによるオープンクロマチン領域の検出(文献1より)であり、分化・細胞特異的な転写制御に「遠位」エンハンサーが果たす重要な役割が示唆された(図3)。これらの領域はコンベンショナルなレポーター解析の対象となる近位プロモーターには10%以下しか存在せず、大部分の分化・細胞特異的なオープンクロマチン領域はイントロンや遺伝子間など多様な領域に存在していた。C/EBP α やAdipoR2遺伝子領域を含め、これまで脂肪細胞分化により転写制御を受けるものの既存の方法では検出できなかった転写制御領域を、転写開始点下流のイントロンに

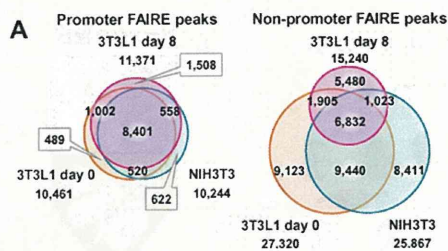


図3 プロモーターFAIREピーク(左)と非プロモーターFAIREピーク(右)の、3T3-L1細胞の脂肪細胞分化前と後、NIH-3T3細胞における重なり。(文献1)

複数同定した。

一方脂肪細胞特異的なオープンクロマチン領域のDNA配列のモチーフ解析では、脂肪既知因子であるPPAR γ 、C/EBP α やZfp423などの結合モチーフが上位を占める中、これまで脂肪細胞分化でその機能が知られていない転写因子NFIの結合モチーフが脂肪細胞特異的オープンクロマチン領域に濃縮していた。NFIAの過剰発現細胞では脂肪細胞分化誘導前からPPAR γ やC/EBP α 、下流のaP2の著明な発現上昇、および

顕微鏡下での脂肪滴蓄積を認めた。一方NFIAやNFIBのノックダウンでは脂肪細胞分化が有意に抑制されることから生理的な役割を果たすことが示された。

D. 考察

次世代シーケンサーを用いたFAIRE-seqは、遺伝子の転写調節において重要な役割を果たすゲノム上の遠位エンハンサーを網羅的に解析できるとともに、モチーフ解析と組み合わせることによりその制御因子の

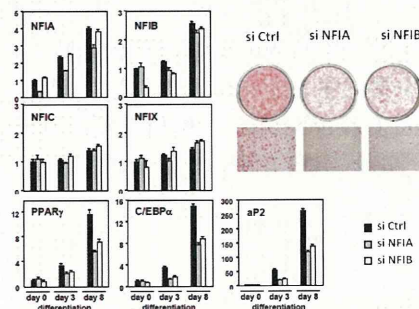


図4 3T3-L1細胞におけるNFIAとNFIBのノックダウンによりPPAR γ 、C/EBP α 、aP2の誘導(左)と、脂肪滴の蓄積(右)が抑制された。(文献1)

unbiasedな解析と新規転写調節因子の同定に有効であることを示した。現在、培養脂肪細胞に加えて、個体の脂肪組織や肝臓などの臓器からFAIREを行う系を確立しつつある。これによりヒトおよびマウスの臓器のサンプルについても同様の解析を行うことが可能となる。今後はこれらの臓器におけるエピゲノム手法を用いて生理的および病態の条件下における遺伝子転写制御とその異常を明らかにしていく予定である。

E. 結論

本研究で、FAIRE-seqを用いた脂肪細胞の転写制御領域のゲノムワイド解析の有用性が示された。今後は脂肪組織、膵臓などの臓器におけるFAIRE-seqを施行し、生理的状態および2型糖尿病における遺伝子転写制御のメカニズムとその異常の解明が期待される。

F. 健康危険情報

非該当

G. 研究発表

1. 論文発表

1: Waki H, Nakamura M, Yamauchi T, Wakab

ayashi K, Yu J, Hirose-Yotsuya L, Take K, Sun W, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Fujita T, Aoyama T, Tsutsumi S, Ueki K, Kodama T, Sakai J, Aburatani H, Kadowaki T. Global mapping of cell type-specific open chromatin by FAIRE-seq reveals the regulatory role of the NFI family in adipocyte differentiation. *PLoS Genet.* 2011;7(10):e1002311.

2: Villanueva CJ, Waki H, Godio C, Nielsen R, Chou WL, Vargas L, Wroblewski K, Schmedt C, Chao LC, Boyadjian R, Mandrup S, Hevener A, Saez E and Tontonoz P: TLE3 is a dual-function transcriptional coregulator of adipogenesis. *Cell Metab.* 2011; 56: 413-427

2. 学会発表

Waki H, Nakamura M, Yamauchi T, Wakabayashi K, Yu J, Hirose-Yotsuya L, Take K, Sun W, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Fujita T, Aoyama T, Tsutsumi S, Ueki K, Kodama T, Sakai J, Aburatani H, Kadowaki T. Global Mapping of Cell-Type-Specific Open Chromatin by FAIRE-seq Reveals the Regulatory Role of the NFI Family in Adipocyte Differentiation. *Keystone Symposia, Genetic and Molecular Basis of Obesity and Body Weight Regulation (J7)*, 2012

Waki H, Nakamura M, Yamauchi T, Wakabayashi K, Yu J, Hirose-Yotsuya L, Take K, Sun W, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Fujita T, Aoyama T, Tsutsumi S, Ueki K, Kodama T, Sakai J, Aburatani H, Kadowaki T. Global Mapping of Cell-Type-Specific Open Chromatin by FAIRE-seq Reveals the Regulatory Role of the NFI Family in Adipocyte Differentiation. *Nuclear receptors EMBO Conference Series (3rd)*, 2012

脇 裕典, 山内 敏正, 中村 正裕, 若林 賢一, 于 静, 武 和巳, 岩部 真人, 岡田 美紀, 藤田 隆教, 廣瀬 理沙, 堤 修一, 児玉 龍彦, 油谷 浩幸, 酒井 寿郎, 門脇 孝.

FAIRE-seqによる脂肪細胞特異的オープンクロマチン領域のゲノムワイド解析 第54回日本糖尿病学会年次学術集会, 2011年5月

3. 総説

脇 裕典, 中村 正裕, 山内 敏正, 門脇 孝. 脂肪細胞分化のエピゲノム制御 最新医学社 最新医学 メタボリックシンドロームII (後篇) -メタボリックシンドロームの基礎- 66 1344-1358, 2011

脇 裕典, 山内 敏正, 門脇 孝. 脂肪細胞と転写因子ネットワーク研究: 最近の展開—次世代シーケンサーが切り開くエピゲノム・転写因子研究. 医歯薬出版 医学のあゆみ エネルギー代謝転写因子ネットワークと生活習慣病 237(6) p655-660, 2011

脇 裕典, 山内 敏正, 門脇 孝. 脂肪細胞分化と骨代謝 医薬ジャーナル社 Clinical Calcium 21(5) p63-68, 2011

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し

2型糖尿病感受性遺伝子操作動物の作製・解析

研究分担者 窪田 直人 高本 偉碩

東京大学医学部附属病院 糖尿病・代謝内科

研究要旨 日本人 2 型糖尿病感受性遺伝子として TCF7L2, KCNQ1, UBE2E2 など 10 余の遺伝子が同定され、一部は臨床データを用いた解析からインスリン分泌と関連することが報告されている。しかしこれまで同定された多くの疾患感受性遺伝子の発現や機能の低下・亢進のいずれが糖尿病発症の原因となるのかほとんど解明されていない。そこで本研究では、2 型糖尿病感受性遺伝子として TCF7L2 に着目し、TCF7L2 の機能低下型遺伝子操作マウスを作製・解析した。TCF7L2 は膵β細胞量の制御を通じてインスリン分泌に重要な役割を果たしていることを見出した。

A. 研究目的

わが国では糖尿病とその合併症が増加し続けており、活力ある高齢化社会の実現のためには、遺伝素因をはじめとする体質に立脚した効果的なテーラーメイドの糖尿病の予防法・治療法を開発することが喫緊の課題となっている。

日本人の2型糖尿病感受性遺伝子として、電位依存性カリウムチャンネルKCNQ1や転写因子TCF7L2が同定・確認され、さらに最近我々はユビキチン結合酵素UBE2E2と核蛋白質 C2CD4A/4B を新たに発見した (Nat. Genet, 2010)。特にKCNQ1はわが国の2型糖尿病の遺伝素因の10数%を説明し、チャンネル機能に加えてnon-coding RNAを介したエピゲノム制御に関与する可能性もある。また、UBE2E2は日本人を含めた東アジア人に特有の2型糖尿病感受性遺伝子でインスリン分泌に関連する。

しかし、これまでに同定された10余の2型糖尿病感受性遺伝子の発現や機能の低下・亢進のいずれが糖尿病発症の原因となるのかほとんど解明されていない。

そこで本研究では、2 型糖尿病感受性遺伝子として TCF7L2 に着目し、TCF7L2 の機能低下型遺伝子操作マウスを作製・解析した。

B. 研究方法

Tcf7l2 の dominant negative 型 変異 (DN-Tcf) をRIPプロモーター (Rat Insulin Promoter) の下流につなぐコンストラクトを構築しトランスジェニックマウス (RIP-DNTcf-Tg; 以下Tgと略記) を作成した。樹立した 6 ラインのTgのうち、膵島におけるDN-Tcfの発現量が内因性のTcf7l2の発現量の10倍以上あることが確認できた独立した3ラインを選抜・検討した。

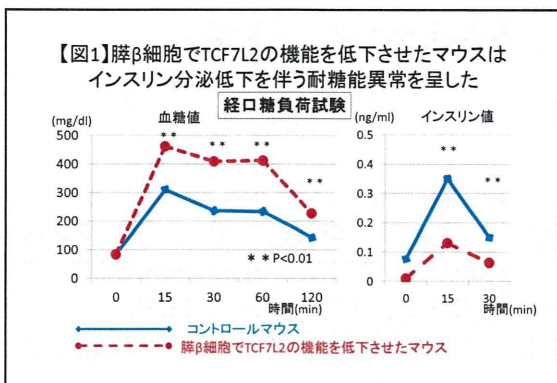
【実験動物に対する動物愛護上の配慮】

実験動物については「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」（昭和 55 年 3 月 27 日 総理府告示）を遵守して実験に利用し、実験動物の生活環境の保全と、実験に際してできる限り苦痛を与えないように努力した。

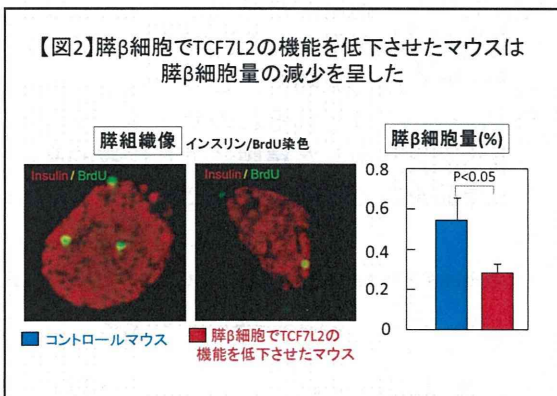
C. 研究結果

3 ラインにおいて Tg 群は野生型 (Wt) 群と比較して体重は同程度であったが、随時血糖値は高値を示した。またインスリン感受性は同程度であったが、経口糖負荷試験ならびに腹腔内糖負荷試験を行うと、Tg 群は Wt 群と比較してインスリン分泌低下を伴う耐糖能異常を呈した【図 1】。膵β細胞に対するインクレチン作用を評価するために腹腔内糖負荷試験時に GLP-1 受容体作動薬で

ある exendin-4 を投与すると, Wt 群と同様に Tg 群においてもインスリン分泌増加を伴う耐糖能改善効果を認めた。



単離膵島実験において Tg 群の膵島は Wt 群と比較してグルコース応答性インスリン分泌量は少なかったが, インスリン含量で補正したインスリン分泌率は両群で同等であった。さらに, Tg 群は膵組織像での膵β細胞面積の減少と膵臓インスリン含量の減少を呈した【図2】。膵島において, インスリン遺伝子の発現量の低下に加えて, インスリンの転写や膵β細胞の成熟に重要な MafA の発現低下を認めた。



D. 考察

2006年, Tcf7l2は2型糖尿病感受性遺伝子の1つとして同定され, その結果は日本人においても追試されている (Diabetologia 50:747, 2007 / Nat Genet. 42:864, 2010). Tcf7l2はWntシグナルの一翼を担う転写因子であり, 細胞の癌化や諸臓器の発生・分化に重要な役割を果たすことが知られていた

が, 糖代謝との関連に注目した検討は皆無であったため, この発見は驚きをもって迎えられた。しかしながら, 2型糖尿病の発症機序がTcf7l2の機能亢進によるものなのか, 機能低下によるものなのかは, 未だ議論があり明確な結論に達していない。

本研究は, Tcf7l2の機能を膵β細胞で低下させた場合に, 耐糖能異常をきたすことを明らかとした。今後はその分子メカニズムの詳細を明らかにしたい。

E. 結論

in vivoで膵β細胞におけるTcf7l2は膵β細胞量の制御を通じて, 個体としてのインスリン分泌能に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

非該当

G. 研究発表

学会発表

第54回日本糖尿病学会年次学術集会
(2011年5月 札幌)

高本偉碩, 窪田直人, 中屋恵三, 熊谷勝義, 小畑淳史, 勝山修行, 窪田哲也, 北村忠弘, 植木浩二郎, 門脇孝: 「膵β細胞のTcf7l2は膵β細胞量維持に重要な役割を果たしている」

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

KCNQ1ファミリー蛋白質の結晶構造解析に関する研究

研究分担者 横山 茂之（独）理化学研究所 生命分子システム基盤研究領域長

研究要旨 日本人2型糖尿病感受性遺伝子として同定された遺伝子のうちKCNQ1について、立体構造解析のアプローチで糖尿病発症との関わりを調べるために、各種の細胞・無細胞発現系でKCNQ1/KCNEs共発現とタンパク質安定性を探索し、無細胞合成系でのKCNQ1/KCNE複合体の安定発現を見出した。本複合体の精製条件を検討し、比較的高純度の標品を得た。更に精製度および安定性を高めることで、結晶化や結晶構造解析に進められる可能性が高まった。

A. 研究目的

日本人2型糖尿病感受性遺伝子として同定された10余の遺伝子の発現や機能の低下・亢進のいずれが糖尿病発症の原因となるのかは、ほとんど解明されていない。多面的かつ独創的なアプローチにより新規バイオマーカーに基づく診断法の開発と新規治療薬の開発を目指し、分担者の横山はこれらに関わるタンパク質群の立体構造解析から創薬を試みる。平成23年度は、種々の細胞および無細胞発現系から最適発現系を選択し、結晶化するための安定化条件を探索した。

B. 研究方法

タンパク質立体構造解析のためには大量の高純度タンパク質試料を安定に調製する必要がある。2型糖尿病感受性因子であるKCNQ1およびそれと複合体を形成するβサブユニット（KCNEs: KCNE1, KCNE2, KCNE3, KCNE4, KCNE5）を、動物培養細胞および無細胞タンパク質合成系にてそれぞれ共発現させ、複合体形成および大量発現の有無を確認した。無細胞発現系には、疎水性領域が多い膜タンパク質に最適化された、脂質と界面活性剤を共存させリポソムの形成と膜タンパク質の合成・膜への組込を共役させる方法を適用した。発現系構築にあたり、複合体精製に都合の良いFLAGタグ/ポリヒスチジンタグ・プロテアーゼ認識部位をN末端およびC末端に連結した。発現系選択後は、合成条件の最適化、大量合成および各々

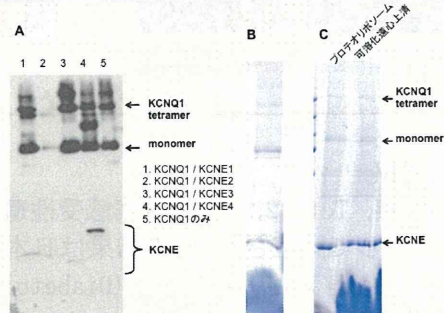
のタグを利用したアフィニティ精製、ゲル濾過精製を行った。

（市販のマウス遺伝子クローンおよび培養細胞を使用したため倫理面の問題は無い。）

C. 研究結果

HEK細胞を利用した発現系では、共発現させたKCNQ1/KCNEsをそれぞれ温和な界面活性剤で複合体として可溶化できる条件を見出し、生細胞系の中では比較的良好な発現を示した。また、大腸菌無細胞タンパク質合成技術を利用した発現系ではそれ以上に良好な発現が得られた。KCNQ1/KCNEs複合体の共合成に成功し、このうち一部の複合体についてはそれぞれのサブユニットの精製タグを利用した精製により比較的高純度の標品を得るまでに至った（下図）。

大腸菌無細胞タンパク質合成技術を利用したマウスKCNQ/KCNE複合体の調製



A: 界面活性剤法・微量スケールでのKCNQ1 / KCNE1-4複合体調製確認（抗FLAG抗体によるWB）。
B: 界面活性剤法・中量スケールでのKCNQ1 / KCNE複合体精製確認（CBB染色）。
C: 脂質・界面活性剤法（リポソーム法）・中量スケールでのKCNQ1 / KCNE複合体プロテオリポソーム調製と界面活性剤による可溶化確認（CBB染色）。

D. 考察

KCNQ1のような膜貫通タンパク質は、精製のために可溶化されると不安定になるケースが多々あり、本来のパートナーと複合体にすることで安定化することが期待された。本研究では、5種の β サブユニットとの発現・安定性を比較し、KCNQ1/KCNE複合体の安定性を示すことが出来た。本複合体の結晶構造解析を進めることで、KCNQ1の糖尿病発症への関わり方を解明する糸口となることが期待される。また、残りの複合体についても、更に発現・複合体形成条件の探索を進めたいと考えている。

E. 結論

本研究で、大腸菌無細胞タンパク質合成系にてKCNQ1/KCNE複合体の安定発現、精製が可能であることが示された。今後大量調製と結晶構造解析を進めることで、KCNQ1の糖尿病発症への関わり方を解明する糸口となることが期待される。

F. 健康危険情報

非該当

G. 研究発表

1. 論文発表

Crystal structure of the eukaryotic light-driven proton-pumping rhodopsin, *Acetabularia* rhodopsin II, from marine alga. Wada, T., Shimono, K., Kikukawa, T., Hato, M., Shinya, N., Kim, S. Y., Kimura-Someya, T., Shirouzu, M., Tamogami, J., Miyauchi, S., Jung, K. H., Kamo, N. and Yokoyama, S., *J. Mol. Biol.*, 411, 986-998 (2011)

Photochemistry of *Acetabularia* rhodopsin II from a marine plant, *Acetabularia acetabulum*. Kikukawa, T., Shimono, K., Tamogami, J., Miyauchi, S., Kim, S., Kimura-Someya, T., Shirouzu, M., Jung, K.H., Yokoyama, S. and Kamo, N., *Biochemistry*, 50 (41), 8888-8898 (2011).

2. 学会発表

無細胞系で合成したカサノリ由来ロドプシンIの高分解能結晶構造. 古瀬宗則, 白水美香子, 保坂俊彰, 染谷友美, 羽藤正勝, 下野和実, 加茂直樹, 横山茂之. 第34回日本分子生物学会年会 (2011)

3. 総説

海藻カサノリ由来ロドプシンARIIの結晶構造. 和田崇, 染谷友美, 白水美香子, 横山茂之. *SPRING-8利用者情報*, 17 (1), (2011)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む.)

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kodama K, Horikoshi M, Toda K, Yamada S, Hara K, Irie J, Sirota M, Morgan AJ, Chen R, Ohtsuka H, Maeda S, Kadowaki T, Butte AJ	Expression-based genome-wide association study links the receptor CD44 in adipose tissue with type 2 diabetes	Proc Natl Acad Sci U S A.	109(18)	7049-54	2012
Imamura M, Maeda S, Yamauchi T, Hara K, Yasuda K, Morizono T, Takahashi A, Horikoshi M, Nakamura M, Fujita H, Tsunoda T, Kubo M, Wata da H, Maegawa H, Okada-Iwabu M, Iwabu M, Shojima N, Ohshige T, Omori S, Iwata M, Hirose H, Kaku K, Ito C, Tanaka Y, Tobe K, Kashiwagi A, Kawamori R, Kasuga M, Kamatani N; Diabetes Genetics Replication and Meta-analysis (DIAGRAM) Consortium, Nakamura Y, Kadowaki T.	A single-nucleotide polymorphism in ANK1 is associated with susceptibility to type 2 diabetes in Japanese populations.	Hum Mol Genet	PubMed PMID: 22456796		2012

<p>Cho YS, Chen C H, Hu C, Long J, Ong RT, Sim X, Takeuchi F, Wu Y, Go MJ, Yam auchi T, Chang YC, Kwak SH, Ma RC, Yamamoto K, Adair LS, Aung T, Cai Q, Chan g LC, Chen YT, Gao Y, Hu FB, K imHL, Kim S, Ki m YJ, Lee JJ, L ee NR, Li Y, Liu JJ, Lu W, Nakam ura J, Nakashim a E, NgDP, Tay W T, Tsai FJ, Won g TY, Yokota M, Zheng W, Zhang R, Wang C, So WY, Ohnaka K, I kegami H, Hara K, Cho YM, Cho NH, Chang TJ, B ao Y, Hedman Å K, Morris AP, M cCarthy MI; DIA GRAM Consortiu m; MuTHER Conso rtium, Takayana gi R, Park KS, Jia W, Chuang L M, Chan JC, Maed a S, Kadowaki T, Lee JY, Wu J Y, Teo YY, Tai ES, Shu XO, Moh lke KL, Kato N, Han BG, Seielst ad M</p>	<p>Meta-analysis of genome-wide association studies identifies eight new loci for type 2 diabetes in east Asians.</p>	<p>Nat Genet</p>	<p>44(1)</p>	<p>67-72</p>	<p>2011</p>
---	---	------------------	--------------	--------------	-------------

Ogawa N, Imai Y, Takahashi Y, Nawata K, Harada N, Kohro T, Morita H, Taketani T, Morota T, Yamazaki T, Goto J, Tsuji S, Takamoto S, Nagai R, Hirata Y	Evaluating Japanese patients with the Malerfan syndrome using high-throughput microarray-based mutational analysis of fibrinogen-like 1 gene	Am J Cardio	108(12)	1801-7	2011
Waki H, Nakamura M, Yamauchi T, Wakabayashi K, Yu J, Hirose Yotsuya L, Takeuchi K, Sun W, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Fujita T, Aoyama T, Tsutsumi S, Ueki K, Kodama T, Sakai J, Aburatani H, Kadowaki T.	Global mapping of cell type-specific open chromatin by FAIRE-seq reveals the regulatory role of the NF-Y family in adipocyte differentiation.	PLoS Genet.	7(10)	e1002311	2011
Villanueva CJ, Waki H, Godio C, Nielsen R, Chou WL, Vargas L, Wroblewski K, Schmedt C, Chao LC, Boyadjian R, Mandrup S, Hevener A, Saez E and Tontonoz P	TLE3 is a dual-function transcriptional coregulator of adipogenesis.	Cell Metab.	56	413-427	2011
Wada, T., Shimonono, K., Kikukawa, T., Hato, M., Shinya, N., Kim, S. Y., Kimura-Someya, T., Shirouzu, M., Tamogami, J., Miyauchi, S., Jung, K. H., Kamo, N. and Yokoyama, S.	Crystal structure of the eukaryotic light-driven proton-pumping rhodopsin, Acetabularia rhodopsin I, from marine alga.	J. Mol. Bio	411	986-998	2011