

③電気泳動による判定

PCR産物を2%アガロースゲルにアプライし100Vで30分間泳動し、エチジウムブロマイド(EtBr)に20分浸漬後、泳動像を撮影した。アガロースゲルはUltra Pure Agarose (Invitrogen)を1×TAE溶液を溶媒に作成し、泳動槽はMupidミニゲル泳動槽(コスモバイオ株式会社)を用いた。

IFRGについてのプライマーはforward primer(wild allele用)、forward primer(KO allele用)、reverse primerの3本が設定されており、KO allele用のforward primerはIFRG遺伝子をノックアウトするために組み込まれたネオマイシン耐性遺伝子カセット内に設定してある。したがって、IFRG KOマウスのPCR産物のサイズは、wild typeのものよりネオマイシン耐性遺伝子のサイズ分大きくなり、両者の判別ができる。wild typeは810bp、KOは1100bp、hetero KOはその双方のサイズのバンドが確認できる。

MIP·IFRG遺伝子はトランスジーンであり、大元のプラスミドに組み込む際にhGH(human Growth Hormone)遺伝子と一緒にMIP·IFRG·hGHの順に組み込まれている。したがって、MIP·IFRG遺伝子の検定は、プライマーをMIP·IFRG結合部およびIFRG·hGH結合部それぞれを挟む形で設定し、その双方のバンドが確認できたものをMIP·IFRG遺伝子を有すると判断した。PCR産物のサイズはMIP·IFRG結合部が687bp、IFRG·hGH結合部が372bpである。

また、MIP·IFRG遺伝子中のIFRGはcDNAであり、IFRG KO判定用のプライマーはIFRG遺伝子のイントロン上に設定されているため、このプライマーがMIP·IFRG遺伝子の配列と結合し非特異的の反応を起

すことはない。

【EMCV-D 感染実験】

作成した膵β細胞特異的Tyk2発現マウスおよび、比較対照として、IFRG wild type(+/+)マウス、IFRG KO(-/-)マウス、IFRG hetero KO(+/-)マウス、MIP·IFRG (hetero)を有するIFRG hetero KOマウスを用いてEMCV-Dを用いた感染実験を行った。今回の実験に使用したマウスの遺伝子型を表2に示した。

【EMCV-D 接種】

-80℃凍結保存されたウイルス液を滅菌PBSで希釈し、6~12週齢のマウスに 1.0×10^3 PFU/mouseとなるように、腹腔内接種を行った。注射器は29GマイJECTター(テルモ株式会社)を用いた。EMCV-Dはカリガリ大学故J.W.Yoon教授、米国NIH、Notkins博士から分与されたものである。

【血糖値測定】

感染後0日、3日、5日、7日、10日、14日の2週間、血糖値のモニターを行った。尾静脈から採血し、非絶食条件下の全血随時血糖値を測定した。測定機器はグルテストPRO R(三和化学株式会社)を用いた。糖尿病判定閾値は250mg/dlに設定した。

C. 研究結果

膵β細胞特異的IFRG発現マウスのEMCV誘発糖尿病感受性

EMCV誘発糖尿病の感受性においてIFRG遺伝子の膵β細胞での発現が重要なのか否かを検討するため、作成したC57BL/6J背景の膵β細胞特異的IFRG発現マウスにEMCV-Dを接種し、糖尿病を誘発させ、感染後0、3、5、7、10、14日目の随時血糖値を測定した。比較対照として、IFRG wild

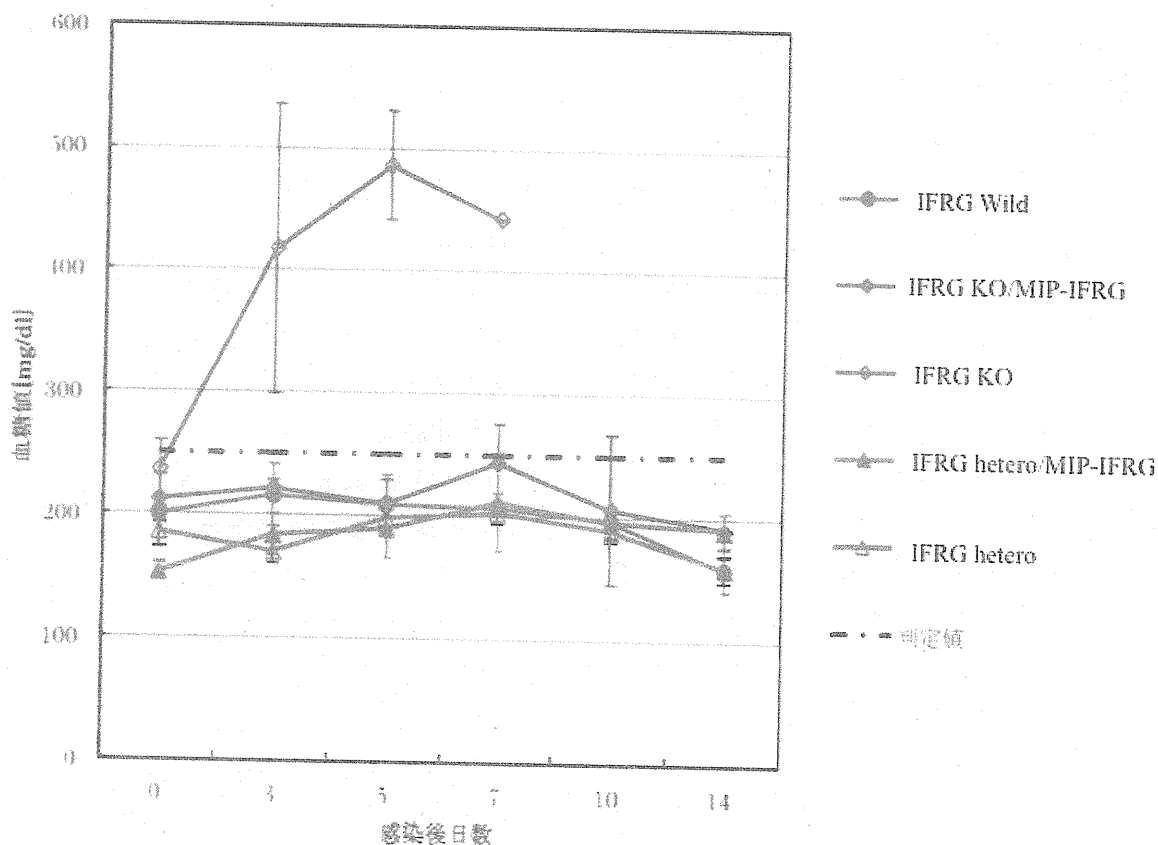
type マウス、IFRG KO マウス、IFRG hetero KO マウス、MIP-IFRG (hetero)を有する IFRG hetero KO マウスに対しても同様に EMCV-D 接種および血糖測定を行った。結果を遺伝子型ごとの平均値 (図) と遺伝子型別の個々の値 (図) についてそれぞれグラフ化して示した。また、遺伝子型ごとの生存率を求めグラフ化した。

EMCV-D 感染後の遺伝子型ごとの平均値をグラフ化したものである。Y 軸誤差は $SE=SD/\sqrt{n-1}$ を用いた。またマウス同士の闘争により瀕死状態となった個体は除外した。

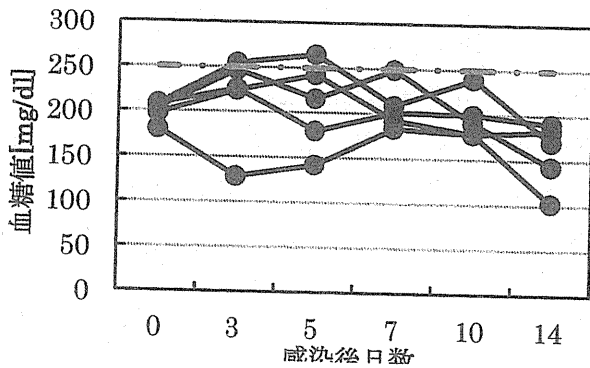
糖尿病判定閾値 250mg/dl を一点鎖線で示した。凡例の n 数の表示は感染後 0 日目のものである。

EMCV-D 感染後の遺伝子型別の各個体の随時血糖値

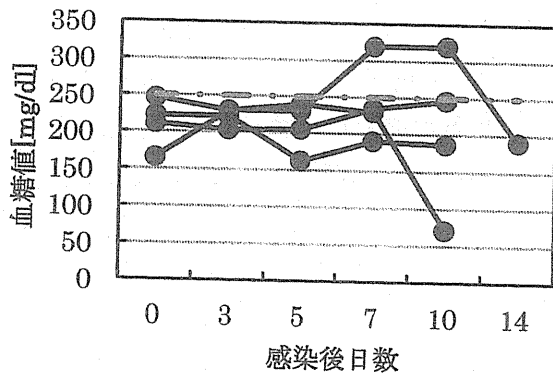
EMCV-D 感染後の遺伝子型別の各個体の随時血糖値をグラフ化したものである。糖尿病判定閾値 250mg/dl を赤一点鎖線で示した。



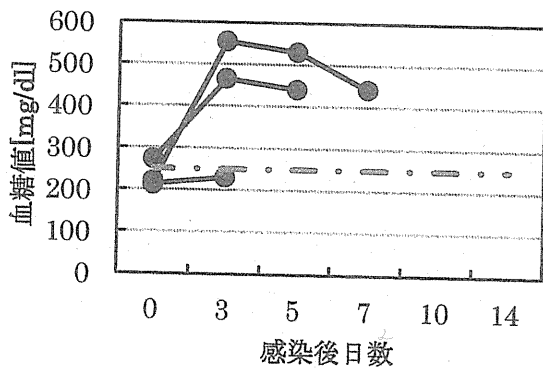
(A) IFRG^{+/+} (n=5)



(B) IFRG^{-/-} / MIP-IFRG^{+/+} (n=4)



(C) IFRG^{-/-} (n=3)



平均血糖値では、MIP-IFRG 遺伝子を有していない IFRGKO マウスのみに明らかな血糖値の上昇がみられ、7 日目で 3 頭とも死亡した。ただ、その内の 1 頭は感染後 3 日目～5 日目の間に血糖の上昇を呈することなく死亡した。その他 4 つの遺伝子型につ

いては、感染後 14 日間平均血糖値に大きな変動は認められなかった。MIP-IFRG 遺伝子を有した IFRG KO マウスすなわち膵β細胞特異的 IFRG 発現マウスについては、4 頭中 1 頭が 7 日目に高血糖を呈した。残りの 3 頭は高血糖を呈さなかったのだが、感染から 14 日目にかけて明らかな体重減少が見られ、3 頭とも 14 日目に死亡した。wild type マウスについては、5 日目 250mg/dl を超える血糖値を呈した個体が 1 頭存在したが、その上昇もわずかで他に高血糖を呈する個体も存在しなかった。IFRG hetero KO マウスは、MIP-IFRG 遺伝子の有無に関係なく、wild type マウスとほぼ同じような血糖値の推移を見せ、MIP-IFRG2 遺伝子を有した IFRG hetero KO マウスのうち 1 頭だけ高血糖を呈した個体が存在した。wild type マウスと MIP-IFRG 遺伝子を有した IFRG hetero KO マウスは感染後 14 日目まで死亡した個体は存在しなかった。MIP-IFRG 遺伝子を有さない IFRG hetero KO マウスは 11 頭のうち 10 日目と 14 日目で死亡した個体が 1 頭ずつ存在した。

D. 考察

臨床免疫学研究室のこれまでの研究によりウイルス誘発糖尿病の感受性遺伝子であることが濃厚となっている IFRG 遺伝子であるが、そのウイルスに対する感染防御の機構、いかに IFRG 遺伝子がマウス体内でウイルス誘発糖尿病の発症を抑えているのかはまだ明らかになっていない。本研究では、IFRG 遺伝子によるウイルス感染防御機構解明の第 1 歩として、膵β細胞における IFRG 遺伝子の発現に焦点を当てて実験、検討を行った。

EMCV誘発糖尿病抵抗性のC57BL/6J系統のマウスであるが、IFRG遺伝子をノックアウトすることでその抵抗性を失うことが分かっている。このIFRGKOマウスにMIP-IFRG遺伝子を持たせ、膵β細胞でのみIFRGを発現するマウスを作成し、感染実験を行うことにより、膵β細胞におけるIFRG遺伝子発現の重要性を検討した。

結果、IFRGKOマウスにMIP-IFRG遺伝子を持たせた膵β細胞特異的Tyk2発現マウスは4頭中1頭が高血糖を呈したが、残りの3頭は全く血糖の上昇を示さなかった。その1頭は7日目、10日目と320mg/dlを超す高血糖を呈したが、14日目には250mg/dl以下に回復した。逆に、残りの3頭は高血糖を呈さなかったものの、感染後徐々に体重の減少が見られ、14日目には3頭とも死亡した。比較対照のMIP-IFRG遺伝子を有さないIFRGKOマウスは、3頭中2頭が450mg/dlを超す顕著な高血糖を呈し、その後7日目、10日目にそれぞれ死亡した。残りの1頭は高血糖を呈さぬまま、5日目に死亡した。この個体については、おそらくEMCV-Dにより高血糖が誘発される前に感染症により死亡したと考えられる。以上の2群の結果を比較してみると、MIP-IFRG遺伝子を有するIFRGKOマウス4頭のうち1頭しか高血糖を呈していないのに対し、MIP-IFRG遺伝子を有さないIFRGKOマウスは3頭中2頭が高血糖を呈しており、両群の高血糖の程度には明らかな差が認められる。n数が少ないため断定的なことは言えないが、この結果から膵β細胞におけるIFRG遺伝子の発現の有無がウイルス誘発糖尿病の感受性に影響を与えている可能性が示唆された。すなわち、

膵β細胞におけるIFRG遺伝子の発現が、ウイルス誘発糖尿病の発症を抑制している可能性が推測された。また、生存数を見るとMIP-IFRG遺伝子を有さないIFRGKOマウスは3頭中3頭が死亡、MIP-IFRG遺伝子を有するIFRGKOマウスも4頭中3頭が死亡している。この結果から、IFRG遺伝子はEMCVに対する感染防御において、膵島での糖尿病の抑制だけでなく、EMCVによる脳炎や心筋炎を抑制することによって、マウスが死に至るのを防いでいるという可能性も考えられる。しかし今回の実験はn数が少なく、これらの見解はまだ推測の段階でしかない。この実験系でさらにn数を増やし、検討を続ける必要がある。また、この実験では、MIP-IFRG遺伝子に対してPCRによる検定しか行っていない。つまり、ゲノム上にMIP-IFRG遺伝子が存在するということを確認しただけで、実際にMIPが機能しIFRGが膵β細胞でのみ発現しているのかは確認できていない。MIP-IFRG遺伝子はトランスジーンであるため、ゲノム上のどこに組み込まれているのか分からず、組み込まれた場所によっては、IFRGが発現しない場合や膵β細胞以外で発現する場合も考えられる。したがって、この実験系においてMIP-IFRG遺伝子由来のIFRGの発現の確認をすることは必須だと言える。今後、real-time PCRやwestern blot、免疫染色などの方法を用いて、膵β細胞でのIFRG mRNAおよびIFRGタンパクの発現を確認する必要がある。

また、wild typeマウス、IFRG hetero KOマウス、MIP-IFRG遺伝子を有するTyk2 hetero KOマウスに対しても感染実験を行

ったが、wild type マウスはこれまでの報告通り、高血糖を呈することなく、死亡した個体も存在しなかった。IFRG hetero KO マウスも高血糖を呈した個体は 1 頭も存在せず、観測終盤の 10 日目、14 日目に 1 頭ずつ死亡した個体が存在した。MIP-IFRG 遺伝子を有する IFRG hetero KO マウスについては、高血糖を呈した個体が 1 頭存在したが、死亡した個体は存在しなかった。以上のように、IFRG hetero KO マウス系においては MIP-IFRG 遺伝子の有無によるウイルス糖尿病感受性および生存率への影響はほとんどなく、wild type マウスと同じような経過をたどった。n 数をさらに増やして検討を行えば、これらの間にも差が現れてくるかもしれない。IFRG hetero KO マウスは、理論上 wild type マウスの半量の

内在性 Tyk2 遺伝子を有しており、その半量の IFRG 遺伝子が機能することで、糖尿病の発症と感染症による死亡を防いでいると考えられる。

E. 結論

本研究において、IFRG KO 膵β細胞特異的 IFRG 発現マウスは EMCV 誘発糖尿病に対して明らかな抵抗性が認められ、IFRG の膵β細胞での発現の重要性が示唆された。

マウスの頭数を増やし、データの信憑性を高めることと、実際に膵β細胞において mRNA やタンパクレベルでの IFRG の発現があるのかを確認する必要がある。

2. ヒト劇症1型糖尿病感受性遺伝子変異の探索と意義に関する研究

分担者 栗崎宏憲：九州大学大学院医学研究院保健学部門検査技術科学分野病態情報学・助教

要旨

ヒト劇症1型糖尿病のウイルス原因説を解明する目的で、遺伝的感受性要因を明らかにする目的で、インターフェロン受容体関連シグナル分子であるIRFG(interferon receptor related gene) 遺伝子多型と劇症1型糖尿病、1型糖尿病、健常対照を対象にプロモーター部位の多型解析を行った。その結果、プロモーター領域、Exon1, Exon2の3つの非翻訳領域のうち、プロモーター領域とExon1にそれぞれ3カ所の1塩基置換を認めた。プロモーター領域では4071G/A, 4072T/A, 4897A/Cを認め、Exon1では5001A/G, 5062G/A, 5063G/Aを認めた。今後、この遺伝子多型が劇症1型糖尿病患者の感受性に関与しているのかを、1型糖尿病患者、2型糖尿病患者、健常者対照者と比較することにより検討する予定である。

A. はじめに

1型糖尿病は膵β細胞の破壊によるインスリンの絶対的不足を示す病態である。さらに、1型糖尿病は自己免疫性か否かによって、1A型と1B型に分類される。1A型は自己免疫性であるとされ、1B型は非自己免疫性の特発性糖尿病であるとされる。1B型ではさらに、亜型として劇症型が存在する。急激な発症様式を示す劇症1型糖尿病患者では約70%の症例に、発熱、上気道炎などの風邪症状を伴うことから、ウイルス感染が糖尿病発症の原因であることが示唆されている。しかしそのメカニズムあるいは感受性遺伝子は不明である。

さて、IFNはウイルス感染防御の主要な因子である。IFN α レセプターの下流に存

在するINFRRG遺伝子はIFN α の産生によって活性化され、抗ウイルスタンパクを産生する。このようにT INFRRGは抗ウイルス作用に関与している。

そこで本研究では、ウイルス感染と関連の認められた、ヒト1型糖尿病患者のINFRRGプロモーター領域、Exon1およびExon2の遺伝子変異、多型の有無を検索し、その意義を検討した。対象は、ウイルス先行感染を認めた1型糖尿病患者末梢血液検体22例の末梢血液検体である。

B. 方法

血液検体収集

大分大学付属病院, 岡田内科クリニック, 九州大学病院心療内科, 九州大学病院第一および第二内科, 早良病院, 新小倉病院, 内科阿部病院, 福岡市立こども病院, 松山赤十字病院, 南昌江内科クリニック, 山口赤十字病院(以上, 五十音順)において1型糖尿病患者の末梢静脈血採血を依頼し, 血液検体を収集した。

血液検体到着後, 血清分離剤入り採血管中の血液を2,500rpmで20分間遠心し, 2

本の2mlアシストチューブに均等に分注した。また, 全血は転倒混和後, 0.5mlアシストチューブに420 μ l分注し, 残りを2本の2mlアシストチューブに均等に分注した。これら血清と全血の検体は-30 $^{\circ}$ C下で保存した。収集した患者の血液検体のうち, 1型糖尿病の発症が急性または劇症型であり, 1型糖尿病発症前にウイルス感染の先行が認められた患者22名(男性11名, 女性11名)の検体を選択し, DNA抽出を行った。このとき選択した患者の情報を表に示す。

表 IFRG 遺伝子解析の対象とした患者の情報

患者番号	年齢	性別	発症様式	家族歴	備考
1	49	M	劇症	なし	
2	47	F	急性	なし	
3	61	F	劇症	長男と次男(1型糖尿病)	
4	31	F	急性	なし	
5	36	F	急性	なし	
6	40	F	劇症	なし	
7	59	F	劇症	なし	
8	9	M	急性	なし	
9	10	M	急性	なし	
10	43	M	急性	なし	
11	52	M	急性	なし	
12	53	M	劇症	なし	
13	34	F	急性	なし	
14	24	F	急性	なし	
15	62	F	劇症	なし	
16	35	M	急性	なし	
17	25	M	急性	なし	
18	30	M	急性	なし	
19	48	F	急性	不明	
20	40	F	急性	なし	
21	24	M	急性	なし	
22	27	M	急性	母(甲状腺疾患)	

DNA 抽出

全血から DNA を抽出した。

- ① 1.5ml マイクロチューブに Protease (EDB) を 30 μ l, 全血を 200 μ l, Lysis Buffer (LDB) を 250 μ l 分注した。なお, EDB および LDB は核酸抽出キット (Quick Gene DNA whole blood kits Cat. No. DB-S FUJIFILM 社製) に含まれたものを使用した。
- ② Vortex MIX で 15 秒混和し, 12,000rpm, 10 秒間遠心した。
- ③ 56°C で 2 分間加温した。
- ④ 99.9% エタノールを 250 μ l 加えた。
- ⑤ 再び Vortex MIX で 15 秒混和し, 12,000rpm, 10 秒間遠心した。
- ⑥ 自動核酸抽出システム QuickGene-800 (FUJIFILM 社製) 上のカートリッジへ, 完成したライセート (全量 730 μ l) を添加し稼動させて DNA の抽出を行った。
- ⑦ 抽出した DNA 濃度は, RNA/DNA Calculator (Gene Quant pro) を用いて, 230nm, 260nm, 280nm で吸光度を測定し, 確認した。

プロモーター領域の仮定

ヒト INFRRG 遺伝子のプロモーター領

域はまだ完全には解明されていない。また, プロモーター領域は mRNA 転写開始点の上流 1kb の領域に存在することが多いと考えられている。そこで mRNA 転写開始点データベース (DBTSS) を用いてヒト INFRRG 遺伝子の mRNA の転写開始点を予測したところ, いくつかの候補点が予測された。この転写開始予測点のうち, 5' 側から上流 1kb の地点から, Exon1 の開始点までをプロモーター領域だと仮定した。

PCR の条件

PCR Thermal Cycler Dice (TaKaRa) を使用して PCR を行った。

以下に反応液の内容を示した。なお, 用いた試薬は 10 \times buffer (TOYOBO), 反応液の酵素は TaKaRa LA Taq[®] である。PCR のプロトコルは図 2 に示し, 使用した primer の塩基配列は表に示した。PCR 終了後には 2% Agarose Gel と泳動槽として Mupid-2X Submarine electrophoresis System (ADVANCE) を使用し, 100V, 30 分間の電気泳動を行った。その際, PCR 産物 4 μ l と 10 \times Loading Buffer 1 μ l を混和し, ゲルに注入した。また, マーカーは Stable 1kb DNA Ladder (GENOSYS, SIGMA) を使用した。

primer の塩基配列

目的部位	5' -3' 塩基配列 (Forward)	5' -3' 塩基配列 (Reverse)
プロモーター	GCCAGACCCCATCTCTACAAA	GGGAAGACAAGCTCGAACC

Exon1 の PCR の条件

以下の表 3 に反応液の内容を示した。なお, 用いた試薬は 10 \times buffer (TOYOBO), 反応液の酵素は rTaq DNA Polymerase (TOYOBO) である。PCR のプロト

コルは図に示し, 使用した primer の塩基配列は表 4 に示した。PCR 終了後には 2% Agarose Gel と泳動槽として Mupid-2X Submarine electrophoresis System (ADVANCE) を使用し, 100V, 30 分間

の電気泳動を行った。その際、PCR 産物 4 μ l と 10 \times Loading Buffer 1 μ l を混和し、ゲルに注入した。また、マーカーは Stable 100bp DNA Ladder (GENOSYS, SIGMA) を使用した。

反応液

試薬	量 [μ l]
10 \times buffer	2
2.5mM dNTP	1.6
25mM MgCl ₂	1.2
5U/ μ l rTaq	0.2
10ng/ μ l DNA	3
10 μ M Primer (F)	0.4
10 μ M Primer (R)	0.4
蒸留滅菌水	up to 20
Total	20

Hold	94 $^{\circ}$ C	5min
Cycle	94 $^{\circ}$ C	15sec
	62 $^{\circ}$ C	30sec
	72 $^{\circ}$ C	1min
Hold	72 $^{\circ}$ C	7min
	4 $^{\circ}$ C	30sec
	25 $^{\circ}$ C	store

Ex1 PCR プロトコル

primer の塩基配列

目的部位	5' -3' 塩基配列 (Forward)	5' -3' 塩基配列 (Reverse)
Ex1	AATCGCGGCTGAGTGACGAATG	GACCCAGACCCAGCTTTGAAGA

Exon2 の PCR 条件

以下に反応液の内容を示した。なお、用いた試薬は 10 \times buffer (TOYOBO), 反応液の酵素は rTaq DNA Polymerase (TOYOBO) である。PCR のプロトコルは図 4 に示し、使用した primer の塩基配列は表 6 に示した。PCR 終了後には 2% Agarose Gel と泳動槽として Mupid-2X Submarine

electrophoresis System (ADVANCE) を使用し、100V, 30 分間の電気泳動を行った。その際、PCR 産物 4 μ l と 10 \times Loading Buffer 1 μ l を混和し、ゲルに注入した。また、マーカーは Stable 100bp DNA Ladder (GENOSYS, SIGMA) を使用した。

反応液

試薬	量 [μ l]	Hold	94°C	5min
10×buffer	2	Cycle	94°C	15sec
2.5mM dNTP	1.6		56°C	30sec
25mM MgCl ₂	1.2		72°C	1min
5U/ μ l rTaq	0.2	Hold	72°C	7min
10ng/ μ l DNA	3		4°C	30sec
10 μ M Primer(F)	0.4		25°C	store
10 μ M Primer(R)	0.4	Ex2 PCR プロトコル		
蒸留滅菌水	up to 20			
Total	20			

primer の塩基配列

目的部位	5' -3' 塩基配列 (Forward)	5' -3' 塩基配列 (Reverse)
Ex2	CTGGACATAAACTCTCCTAGGC	GACCATCTTGACCAACATGGTG

PCR 産物の精製

QIA quick[®] PCR Purification Kit(QIAGEN)を使用して, PCR 産物の精製を行った.

- ①1.5ml マイクロチューブに PCR 産物を 15 μ l, Buffer PB を 75 μ l 分注した.
- ②全量をカラムへ移し, 12,000rpm, 1 分間遠心した.
- ③カラムを通った Buffer を捨て, Buffer PE をカラムへ 750 μ l 加え, 12,000rpm, 1 分間遠心した.
- ④再びカラムを通った Buffer を捨て, 12,000rpm, 1 分間遠心した.
- ⑤1.5ml マイクロチューブにカラムをセットし, Buffer EB を 30 μ l 分注し, 1 分間静置した後, 12,000rpm, 1 分間遠心した.
- ⑥カラムを通った DNA を -30°C に保存した.

遺伝子配列の決定

精製して得られた PCR 産物濃度を吸光度計 NanoDrop[®](ナノドロップ) ND-1000 にて確認した. 滅菌蒸留水を用いて精製して得られた PCR 産物を約 10ng/ μ l に調整し, シークエンス用反応液を作製した(表 7 参照). また, 反応液には 5× Sequencing buffer (Applied Biosystems) を使用し, 酵素は Big Dye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を使用した. なお, シークエンスはジデオキシ法である. 図にシークエンスのプロトコルを示した.

プロモーター領域のシーケンス

増幅範囲が約 1.3kb と大きかったこと、さらに 4051-4070 および 4897-4909 にそれぞれ poly-A 配列が存在することを考慮して、以下のようにシーケンス用のプライマー (1.6pM) を設定した (表)。

表 シーケンス用 primer の塩基配列

Primer No.	5' -3' 塩基配列	Primer の向き	解析部位
seq primer1	TGGAGTTTCGCTCTTGC GC	R	3736-3900
seq primer2	GCCAGACCCCATCTCTAC AAA (PCR 用の primer と同一のものを使用した)	F	3901-4050
seq primer3	CGTGCTGTGGAATTGGGT CA	R	4071-4500
seq primer4	GCGGGATGTCCAAGCTGC TA	F	4501-4897

4910-5000 の領域については 2.6.2 Ex1 のシーケンスの項で述べるように、Ex1 のシーケンスと同時に解析している。表に示した 4 種類の primer でシーケンス解析を行ったところ 3ヶ所の SNP が確認できた。そこで確かに SNP が存在することを逆側の primer を設定して確かめようとしたが、図 6 にも示したようにそれぞれの SNP が poly-A 配列の非常に近くに存在していたため、逆側の primer から変異を確認することはできなかった。そこで両方向から変異を確認することは断念し、SNP の確認できた検体についてはもう 1 度同じ primer を使用して、あるいは同じ向きからでも新たな primer を設定して同じようにシーケンス解析を行い、再現性が得られた場合には確かに SNP の存在が確認できると考えた。4071G/A, 4072T/A の 2ヶ所の SNP は新たに設定した seq primer5 (図 7 中に示している) を使用して、4897A/C の SNP は再び同じ primer (seq primer4) を使用して再現性を見て、確実に SNP が存在していることを確認した。

gccaga

3721 ccccatctct acaaaaattt aaaatttagc
cacaaaattt aaaaattaac aacaaaaggg

3781 ccgggtgcgg tggtcacgc ctgtaatccc
agcgctttgg gaggttgat cacgaggtca
3841 ggagttcgag accagcctgg ccaagatggt
gaaatcccat ctctactaaa aatacaaaaa
3901 ttagccgggc gtggtggcgg gcgcctgttg
tcccagctac ccaggaggct gaggcaggag
3961 aatcgcttga atccgggagt ctgaggttgc
agtgagccga gatcgagca ttgcaactca
4021 gcctggggca caagagcgaa actccatctt
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa gtggaagatg
4081 aggaagtga tcagacatca aggatgagcg
gatgacttaa taggcttctt tgctaagact
4141 tggctggca ggtgaaagac aaagtcgagg
agtggttatg gtgtggcaca gaagaagggt
4201 cagaggacgg tctttgttac ctcttcatgc
ctgagtttct tcctctgtga aatggggata
4261 ataagagccg ccatacaggg aattgctgct
aggatcaaat gagataatgt atgtgaaacg
4321 ctctggctgt aggtctctca gcaaatgggc
acgacttgcg gagggggat ttgaattcac
4381 gtctggcggg atgtccaagc tgctaccctg
accgctaggg agcttcagag gacagggctg
4441 caggtgatca ggaagaggac tggggcaggt
ggcgaggaa tgcctcccag gaggtaagga
4501 gggggaattc tagtcagcag gatggagtcg
gccaggtaga aacgagggaa aggagacagg
4561 accgatgga acggggaagc caaagggcag
ggcgtcggag ggttgaatgg tggccgggtgc
4621 agctttgaac accgaggtga ggacatgcag
ctgtgtccta ggtcaggac cgtacacgcc
4681 tgacccaatt ccacagcagc gaggggaact
ccaggatccg gccgcgttgc ccacacactt
4741 cgctctcct cccgcctctc gcaagcccct
ccccgtctc cgtccaccga gtgccagcca
4801 atagcagaag cgacagcgca tctgggtgcc
gactcagcca atcgcgctg agtgacgaat
4861 gagccccagg accaatgaga gtgccgccac
catggcaaaa aaaaaaaaaa ccaatggtga
4921 cgagcagga gaacagagca gctgccaatg
ggcgtgtgcg tttcaggcgg ccaatgggag
4981 gagcgtctc ggcgggggac aagcagtagc
taccgcggg agcggggagg ggtccgggtt
5041 cgagcttgtg ttccc

図 ヒト INFRG 遺伝子におけるプロモーター領域 (仮定) の塩基配列

プロモーター増幅の PCR の際に用いた primer () 部位, シーケンス用 primer () 部位, 変異を確認するために新たに設定したシーケンス用 seq primer5 () 部位, poly-A 配列の部位 (), Exon1 の部位の一部 (), SNP の部位を赤字で、それぞれ示している。

Exon1 のシーケンス

PCR の際に用いたものと同じ Reverse プライマーで 3' 側からシーケンス解析を行ったところ 3ヶ所の SNP が確認できた。そこで Forward プライマーで 5' 側から変異を確認しようとしたところ、poly-A 配列以降のシーケンスが困難だった。そこで新たにシーケンス用のプライマーを設定し、3' 側からシーケンス解析を行った(図 7)。なお、この際にプロモーター領域の 1 部(4910-5000)も同時に解析している。

```
atcgcggctg agtgaagaat
4861 gagccccagg accaatgaga gtgccgccac
catggcaaaa aaaaaaaaaat ccaatggtga
4921 cgagcagga gaacagagca gctgccaatg
ggcgtgtgcg ttcaggcgg ccaatgggag
4981 gaggcgtctc ggcgggggac aagcagtagc
taccgcggg agcggggagg ggtccgggtt
5041 cgagcttgtg ttccccgga agggtagtc
tggacgcggg cgcggaagga gcgcggccgg
5101 aggtcctcag gaagaagccg cggggactgg
ctgcgcttga caggctgcac ttgatggga
5161 gcacctggtg cctcgggact gtccegatgc
ccggtgggtg cacatcccag ttcccgcctg
5221 tgccggccgg gtttagaggt tttgggggga
ggacatgggg gcgtgcagcc ttcccagttg
5281 caaacttcac tccgaccctg tcttcaaagc
tgggtctggg tc
```

図 ヒト INFRRG 遺伝子における Exon1 の塩基配列

Exon1 増幅の PCR の際に用いた primer () 部位、新たに設定したシーケンス用 primer () 部位、poly-A 配列の部位 (), Exon1 の部位 (), SNP の部位を赤文字で、それぞれ示している。

Exon2 のシーケンス

PCR の際に用いたものと同じ Forward プライマーでシーケンス解析を行ったところ遺伝子変異が見つからなかったため、5' 側からのみの解析を行った。

エタノール/EDTA/酢酸ナトリウム精製

- ①シーケンス反応済み溶液 10 μ l に滅菌蒸留水 10 μ l, 3M 酢酸ナトリウム 2 μ l, 125mM EDTA 2 μ l, 100% エタノール 50 μ l を加えて遮光して室温に 15 分間静置した。
- ②25°C, 15,000rpm, 20 分間遠心した。
- ③上清を除いて、70%エタノールを 60 μ l 加えて、25°C, 15,000rpm, 5 分間遠心した。

④上清を除き、室温で遮光して風乾した。

⑤教育支援センターに依頼し、塩基配列の決定を行った。

遺伝子変異、多型の確認

機能シーケンス編集ツール BioEdit を利用し、遺伝子変異、多型の有無を確認した。

C. 研究結果

を認めた(図). また表に SNP の認められた 1 型糖尿病患者を示す.

シーケンス結果

プロモーター領域, Exon1, Exon2 の 3 つの非翻訳領域のうち, プロモーター領域と Exon1 にそれぞれ 3 ヲ所の 1 塩基置換を認めた. プロモーター領域では 4071G/A, 4072T/A, 4897A/C を認め(図 6), Exon1 では 5001A/G, 5062G/A, 5063G/A

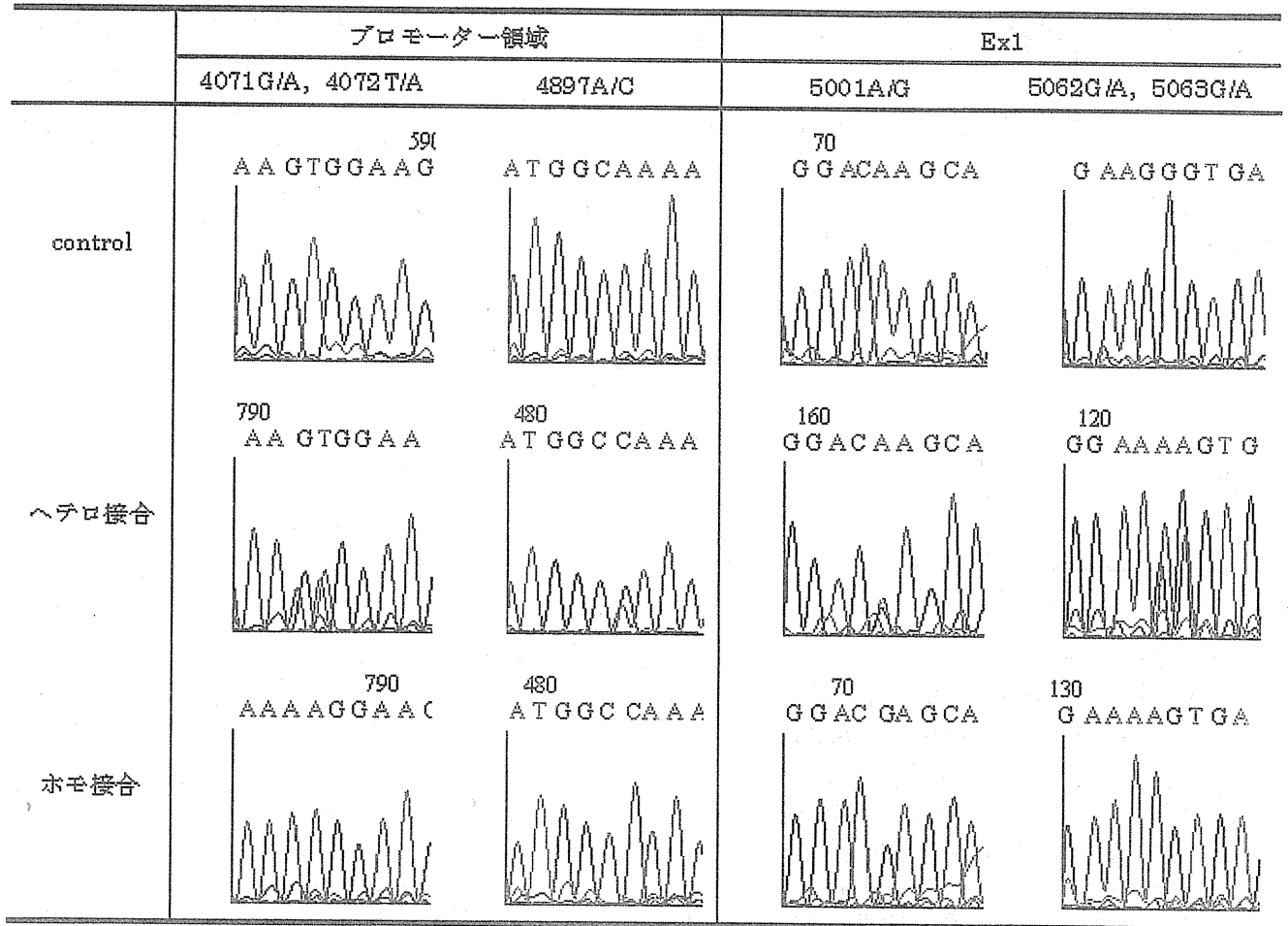


図 プロモーター領域および Exon1 の遺伝子変異

表 SNP が認められた 1 型糖尿病患者および高 IgE 血症患者

患者番号	プロモーター領域の SNP の有無			Exon1 の SNP の有無		
	4071G/A	4072T/A	4897A/C	5001A/G	5062G/A	5063G/A
1						
2	ヘテロ	ヘテロ		ヘテロ	ヘテロ	ヘテロ
3	ヘテロ	ヘテロ		ヘテロ	ヘテロ	ヘテロ
4						
5			ヘテロ			
6			ヘテロ			
7			ホモ			
8	ホモ	ホモ		ホモ	ホモ	ホモ
9						
10	ヘテロ	ヘテロ		ヘテロ	ヘテロ	ヘテロ
11	ヘテロ	ヘテロ	ヘテロ	ヘテロ	ヘテロ	ヘテロ
12			ヘテロ			
13	ヘテロ	ヘテロ		ヘテロ	ヘテロ	ヘテロ
14			ヘテロ			
15			ホモ			
16	ヘテロ	ヘテロ		ヘテロ	ヘテロ	ヘテロ
17						
18						
19						
20			ヘテロ			
21						
22			ホモ			

今回検出した 6 ヶ所の SNP のうち、5 ヶ所の SNP (プロモーター領域の 4071G/A および 4072T/A と Exon1 の 5001A/G, 5062G/A, 5063G/A) は 23 検体すべてで同じ変異の形式をとり、同一のハプロタイプ上にあることが示唆された。この変異 (以下、変異 1) の頻度はヘテロ接合で 26.1% (6/23 名)、ホモ接合で 4.4% (1/23 名) だった。またプロモーター領域における 4897A/C の変異 (以下、変異 2) の頻度はヘテロ接合で

26.1% (6/23 名)、ホモ接合で 13% (3/23 名) だった。変異 1 と変異 2 の両方が認められた患者は患者 11 の 1 名のみだった。また、いずれかの変異を有する患者は 65.2% (15/23 名) と極めて高率だった。今回検出された 6 ヶ所の SNP はいずれも、以前に報告されている Exon6 の 19043C/T および Exon8 の 20597G/T とは、相関を示さなかった。

D. 考察

ヒト INFRRG 遺伝子における非翻訳領域(プロモーター領域, Exon1, Exon2)のうち, プロモーター領域と Exon1 でそれぞれ3カ所の SNP を検出した. 変異 1(同一のハプロタイプ上に乗っている, プロモーター領域の 4071G/A および 4072T/A と Exon1 の 5001A/G, 5062G/A, 5063G/A)の頻度はヘテロ接合で 26.1% (6/23 名), ホモ接合で 4.4% (1/23 名) だった. また変異 2(プロモーター領域における 4897A/C)の頻度はヘテロ接合で 26.1% (6/23 名), ホモ接合で 13% (3/23 名) だった. いずれかの変異を有する患者は 65.2% (15/23 名) と極めて高率に検出できた. 以上のことから, これらの変異はウイルス誘発性 1 型糖尿病の疾患感受性マーカー因子である可能性が高いと考えられ, 多型マーカーとして疾患の発症に関連する遺伝子を検出するために有用である. ただし, SNP が検出された患者は, 年齢, 性別, 家族歴には相関性が認められなかった. また, 今回は急性または劇症型の 1 型糖尿病という条件だけで対象とする血液検体を選択し, 年齢や性別などの条件は考慮していない. 今後も 1 型糖尿病患者の血液検体の収集を続け, より多数の標本で検討し, 各条件別で SNP の頻度を比較しなければならない. さらに, 1 型糖尿病患者と健常者コントロールにおいて SNP の発生頻度を比較すれば, INFRRG 遺伝子の機能障害の臨床的な意義を明らかにすることができる. したがって, 多数の血液検体を対象とした, ウイルス性 1 型糖尿病感受性の遺伝子同定につながることを期待できる.

今回の SNP の検出は, 簡便でかつ迅速に結果を得られるダイレクトシーケンス法によって行っている. しかし, ダイレクトシーケンス法による SNP の検出はスクリーニングの 1 つに過ぎず, SNP の有無や部位を裏付けるためには RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 法を行うことも有用である. RFLP 法では, 目的の変異を含む領域を PCR 増幅後に制限酵素処理をし, 切断された断片の鎖長の長さの違いを確認する. したがって, プロモーター領域, Ex1 に SNP があるならば, SNP を含む遺伝子断片を対象とする制限酵素で切断することができる. もし仮に, 対応した制限酵素が存在せず, RFLP 法を行うことができない場合, ミスマッチプライマー法という選択もある. これは, 1~2 個のミスマッチ塩基を設定したプライマーで PCR を行い, 意図的に制限酵素に対応する領域を作成する方法である. ミスマッチプライマーを用いれば, RFLP 法ができない場合でも目的の SNP に対応した制限酵素を見つけられる可能性もある. それでももし制限酵素を見つけられないならば, RFLP 法を断念しな

ければならない. 塩基置換を検出できる PCR 法には, RFLP 法の他に PNA クランピング・アリル特異的 PCR がある. PNA はペプチド結合を有し, DNA や RNA に似た構造を成す分子である. PNA にはリン酸部位の電化が存在しないため, DNA 鎖と強力に結合する. よって, 野生型 DNA 鎖に相補的な PNA とプライマーを共存させた状態では, PNA が DNA 鎖と結合して野生型 DNA を増幅することができない. しかし, 変異型では PNA は DNA 鎖に結合することができず, プライマーが DNA 鎖に結合して塩基置換を含む領域以降を増幅することになる. 野生型 DNA 鎖の増幅は PNA によって抑制されるため, ヘテロ接合でも SNP の検出は可能である. PNA クランピング・アリル特異的 PCR 法は感度が高い上に特異的なので, SNP の検出には有用である.

プロモーター領域および Exon1 における SNP 群が確実に存在していれば, その SNP が INFRRG を介した IFN シグナル伝達障害に関与しているかどうかを評価する必要がある. 本研究で SNP を検出したプロモーター領域, Exon1, Exon2 は INFRRG 遺伝子の非翻訳領域である. よって, SNP によるアミノ酸の変化は認められず, INFRRG 遺伝子の機能が変化している可能性は低い. しかし, タンパクの構造や INFRRG 遺伝子の発現などに変化が認められる可能性があり, 一概に変化していないとはいえない. そこでプロモーター領域に検出した SNP が与える INFRRG 遺伝子への影響を次の 2 点について考察する. 第一に, 今回プロモーターだと仮定した領域について, プロモーター配列解析データベース (TRANSFAC) を用いて転写因子結合配列を予測したところ, 次の予測が得られた. 本研究でプロモーター領域に検出された 3ヶ所の SNP を含む配列は, いずれも FOXD3 と呼ばれる転写因子に認識され, 結合する可能性がある. この FOXD3 と呼ばれる転写因子は DNA 結合モチーフであるフォークヘッドドメインを有している. したがって, この部位に変異が存在すると DNA 結合能が低下し, 転写が抑制される可能性がある. 第二に, 本研究でプロモーター領域に検出された 3ヶ所の SNP はいずれも poly-A 配列の非常に近傍に存在している. poly-A 配列は遺伝子の mRNA に安定性を与える役割がある. したがって, この部位に変異が存在すると mRNA の安定性が失われるか, あるいは弱まることによって, INFRRG 遺伝子の構造が変化する可能性がある. これらの可能性を検討するためには, INFRRG 遺伝子の発現を確認しなければならない. つまり, IFN α やウイルスの刺激によって本来産生されるべき PKR, IFN γ などの抗ウイルス作用性のタンパクの産生レベルが, どのように変化するか評価する必要がある. その方法の 1 つとして, 組み換え DNA を用いた方法がある. SNP

を含む遺伝子断片をプラスミド DNA に組み換え、INFRG 遺伝子を発現させる。そして、その際に産生されたタンパクの分子量を SDS-PAGE やウエスタンブロットなどで測定することで、タンパクの活性の程度を評価することができる。また、患者の白血球を enterovirus などのウイルスで刺激し、産生された抗ウイルス作用性タンパクによってウイルス増殖の抑制が可能かどうか確認する方法もある。もし、INFRG 遺伝子の機能障害による IFNシグナル伝達障害があるならば、PKR や IFN γ の濃度は健常者よりも低く、ウイルス増殖抑制能が低下することが予想される。このように、INFRG 遺伝子発現への影響やタンパク質の量的異常または機能異常を解析し、1 型糖尿病との関連を検討することが今後の課題である。

E. 結論

感冒症状が先行した急性または劇症 1 型糖尿病

患者で INFRG 遺伝子の非翻訳領域であるプロモーターおよび Exon1 において、65.2% (15/23 名) という高頻度で SNP を検出した。INFRG 遺伝子の機能障害の臨床的な意義を明らかにするために、1 型糖尿病患者と 2 型糖尿病患者および健常者コントロールにおいて SNP の発生頻度を比較しなければならない。また、SNP の存在を確認し、多数の検体検査につなげるために RFLP 法やミスマッチ PCR 法、あるいは PNA クランピング・アリル特異的 PCR 法を行う必要がある。さらに、INFRG 遺伝子発現への影響やタンパク質の量的異常または機能異常を解析し、1 型糖尿病との関連を検討する必要がある。

3. IFRGシグナル経路に関する研究

分担者 下田和哉：宮崎大学医学部内科学講座消化器血液学分野・教授

要旨

Interferon (IFN)の抗ウイルス作用は IFRG の欠損により部分的な障害をうけるが十分量の IFN が存在するときには障害されない。IFRG の pseudokinase 領域は kinase 領域を抑制しており、pseudokinase 領域に変異を導入すると IFRG の恒常的活性化が生じ、下流の Signal Transducers and Activator of Transcription (STAT)の恒常的活性化、細胞の自律増殖、サイトカインへの反応性亢進が生じる。

A. 研究目的

Interferon (IFN)レセプターと会合する JAK キナーゼである IFRG は、その欠損マウスの解析から IFN- α による B 細胞の細胞抑制のシグナル伝達に必須である。一方、IFN の抗 vesicostomatitis virus (VSV)ウイルス作用は、Tyk2 の欠損により部分的な障害をうけるものの、十分量の IFN が存在するときには障害されない。VSV ウイルスに加え、Encephalomyocarditis virus (EMCV)ウイルス、Herpes Simplex virus (HSV)ウイルスを用い、IFN による抗ウイルス作用における Tyk2 の役割を明らかにする。

IFRG の活性化は IFN- α 刺激により一過性に生じ、その後速やかに脱リン酸化される。IFRG の欠損は、IFN- α による細胞増殖抑制、抗ウイルス作用に影響を与えるが、逆に IFRG の恒常的活性化が IFN- α の作用に与える影響を検討し、IFRG の生物学的役割を明らかにする。

B. 方法

野生型マウス、および IFRG 欠損マウスより embryonic fibroblasts (EF 細胞)を分離し、10% FBS 加 DMEM 培地で培養した。EF 細胞の抗ウイルス活性は、ウイルスによる細胞溶解の抑制効果により測定した。96 穴プレートを用い 8×10^4 個/穴の EF 細胞を、種々の濃度の IFN- α 、あるいは IFN- β と共に培養した。48 時間後細胞を洗浄し、EMCV、あるいは VSV を感染させた。Crystal violet 染色を行い 540 nm の波長を用いて、生存細胞を測定した。

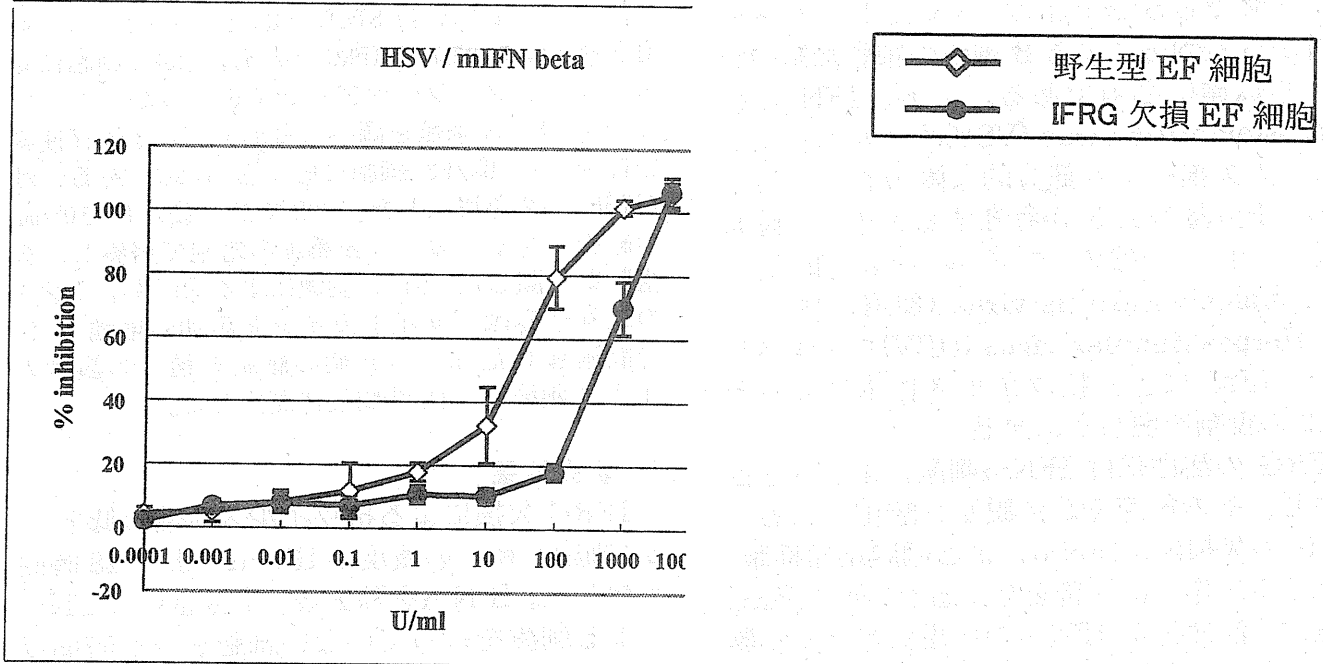
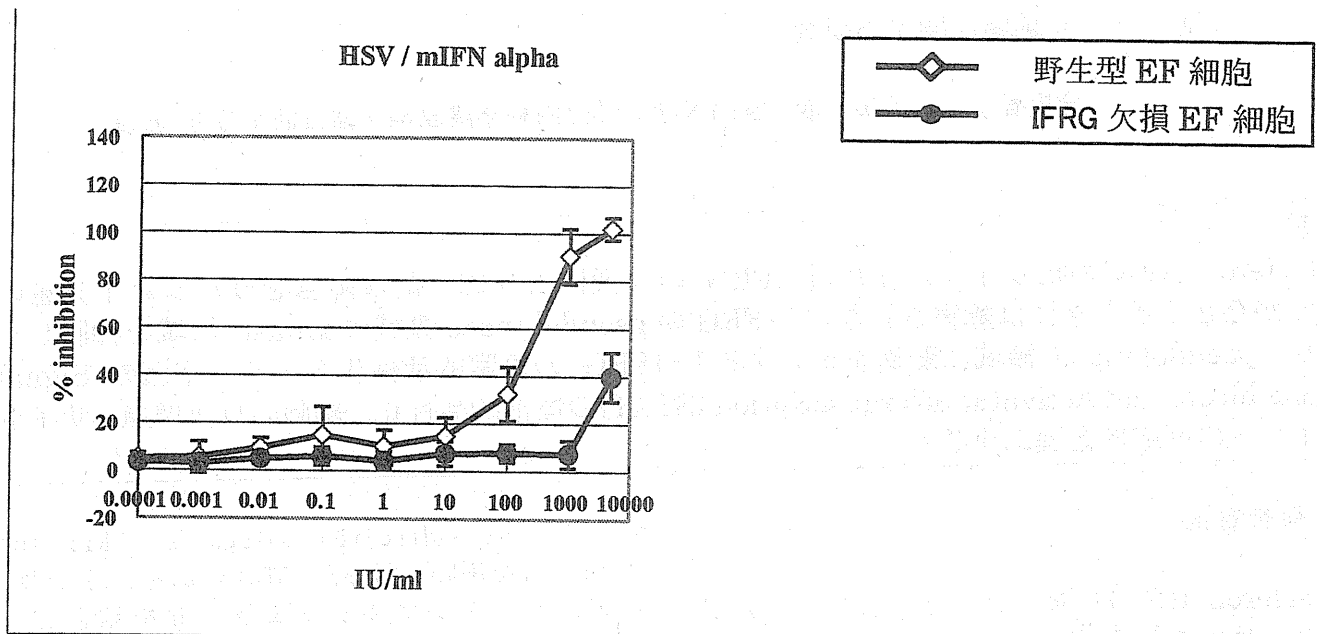
IFRG の 678 番目のアミノ酸であるバリンをフェニルアラニンへ置換する変異の導入 (V678F IFRG は、CGTGATGGCGTCTGTTTCCGCGGCCCTGAA オリゴプライ

マーと site-directed mutagenesis kit (BD Clontech)を用いて行った。STAT3、あるいは STAT5 のプロモーターにルシフェラーゼを結合した STAT3-LUC、あるいは STAT5-LUC を、ベクターのみ、野生型 IFRG、V678F IFRG とともに 293T 細胞に導入し、ルシフェラーゼアッセイを行った。

IL-3 非依存性増殖を調べる目的で、IL-3 依存性細胞株である Ba/F3 細胞に野生型 IFRG、あるいは V678F Tyk2 を導入した。PBS で洗浄後、 1×10^6 /mL の細胞をサイトカイン非添加の培地で培養し、細胞数を計測した。IL-3 刺激による ^3H -サイミジンの取り込みは、サイトカイン非添加の培地で 16 時間培養した 5×10^3 個の細胞を種々の濃度の IL-3 で刺激し、12 時間後に測定した。

C. 研究結果

1) IFRG 欠損による抗ウイルス活性の低下 EF 細胞を種々の濃度の IFN- α により 48 時間刺激した。IFN- α を除去後、十分量の (IFN- α による刺激を行っていない細胞を 24 時間以内に 100%細胞変性させる量) EMCV ウイルス、あるいは HSV ウイルスを感染させた。高濃度の IFN- α 、あるいは IFN- β により刺激すると、IFRG が欠損していても EF 細胞に細胞変性はみられなかった。しかし、IFN- α 、または IFN- β の濃度が低い場合、IFRG が欠損した EF 細胞では野生型 EF 細胞と比べ、細胞変性がみられた。



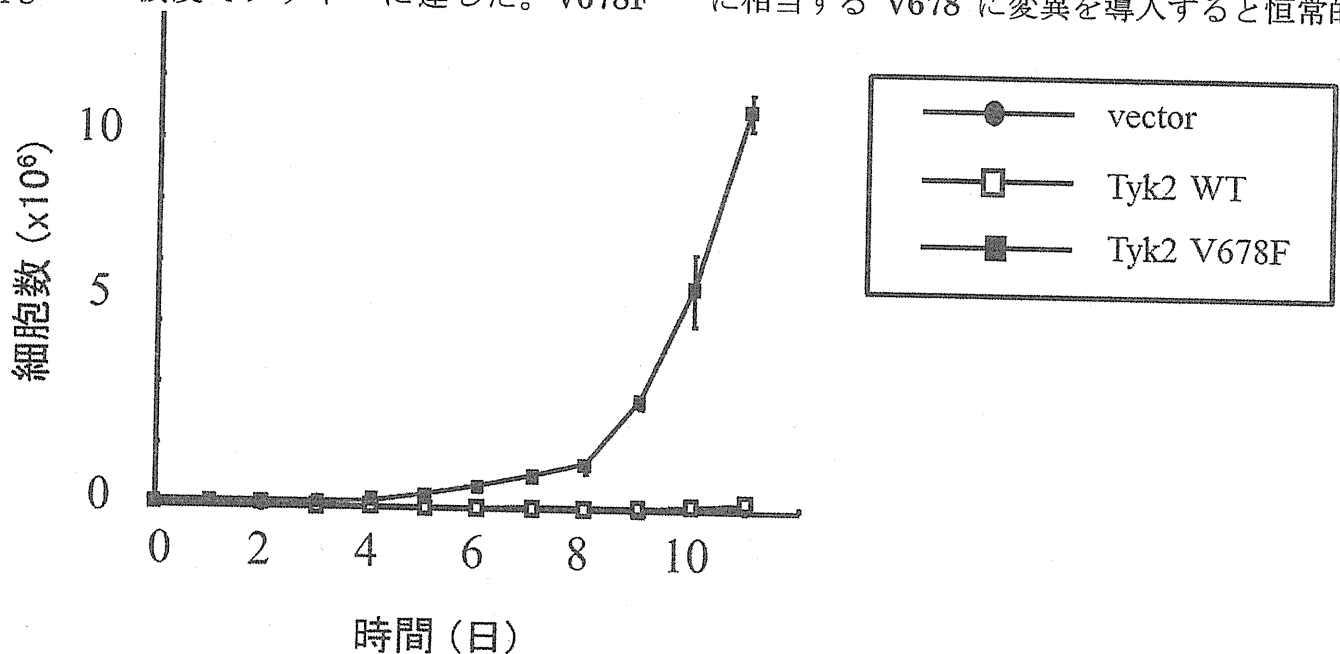
2) IFRG の恒常的活性化により STAT が活性化され、細胞の自律増殖が生じる
 骨髄増殖性腫瘍では JAK の 617 番目のアミノ酸であるバリン(V)のフェニルアラニン(F)への変異(V617F)が高頻度に生じており、その結果 JAK2 の恒常的活性化が生じるようになる。JAK2 と Tyk2 の遺伝子配列を比較すると、JAK2 の 617 番目のアミノ酸であるバリンは T IFRG でも保存されており、678 番目のアミノ酸に相当する。JAK2 の場合、V617 は kinase 領域の活性化を抑制していると想定される pseudokinase 領域に存在する。そのため、IFRG V678 も同様に kinase 領域を抑制

している可能性を想定し、IFRG V678 をフェニルアラニンに置換した V678F 変異体を作成した。JAK キナーゼの主要な基質は STAT であるため、V678F IFRG の機能を評価するために、STAT の転写活性を検討した。野生型の Tyk2 を 293T 細胞に導入すると STAT3, STAT5 は活性化される。V678F IFRG は、STAT3, STAT5 の活性化を野生型 Tyk2 にくらべ約 2 倍に亢進した。次に IL3 依存性細胞株である Ba/F3 細胞にベクターのみ、野生型 IFRG、V678F IFRG を導入した。IL-3 を培地から除去し 16 時間静置した。V678F IFRG を導入した Ba/F3 細胞は、サイトカイン刺激がない状態でもリン酸

化が生じていた。IFN α/β 刺激時には Tyk2 とともに JAK2 もリン酸化されるが、V678F IFRG を導入した Ba/F3 細胞では JAK2 の自発的リン酸化は観察されなかった。JAK キナーゼの主要な基質は STAT であるため、V678F IFRG を導入した Ba/F3 細胞における STAT5 の自発的リン酸化を検討した。野生型 v を導入した Ba/F3 細胞では STAT5 の自発的リン酸化は観察されないが、V678F IFRG を導入した Ba/F3 細胞では IL-3 非存在下でも STAT5 が自発的にリン酸化されていた。

V678F IFRG を発現する Ba/F3 細胞は、IFRG とその下流に位置する STAT5 の自発的活性化が生じていた。そこで、この細胞株の増殖に及ぼす V678F IFRG の影響を検討した。IL-3 を培地から除去すると、ベクターのみを導入した Ba/F3 細胞、あるいは野生型 IFRG を導入した Ba/F3 細胞は増殖しなかった。ところが、V678F IFRG を発現する Ba/F3 細胞は、サイトカイン非存在下でも自律増殖を示した。

次に、V678F IFRG を発現する Ba/F3 細胞では、サイトカインへの反応性が亢進しているかを検討した。ベクターのみ、野生型 IFRG、あるいは V678F IFRG を導入した Ba/F3 細胞のいずれも IL-3 へ容量依存的に反応し、10 pg/ml の濃度でプラトーに達した。V678F



IFRG を発現する Ba/F3 細胞は、ごく少量ではあるものの IL-3 非存在下でも ³H-サイミ

ジンの取り込みを示し、Ba/F3 細胞、あるいは野生型 IFRG を発現する Ba/F3 細胞に比較してより強い IL-3 への反応性を示した。

D. 考察

IFN- α/β のシグナルは IFRG、JAK1 を介して、IFN- γ のシグナルは JAK1、JAK2 を介して伝達される。VSV を用いて、IFN の抗ウイルス作用は IFRG の欠損により部分的な障害をうけることを以前に報告したが、今回、EMCV ウイルス、HSV ウイルスを用い、IFN の抗ウイルス作用は IFRG の欠損により部分的な障害をうけるが十分量の IFN が存在するときには障害されないことを明らかにした。さらに IFRG の役割を明確にする目的で、恒常的活性化 IFRG 変異体を構築した。骨髓増殖性腫瘍において高頻度に観察される JAK2 V617 に相当する IFRG V678 に変異を導入すると、JAK キナーゼの下流に位置する主要な基質である STAT3、STAT5 の活性化が約 2 倍に亢進した。さらに、IFRG V678F を導入した IL-3 依存性細胞株 Ba/F3 は、サイトカイン非存在下での STAT5 のリン酸化、細胞増殖、サイト Vector の反応性亢進がみられた。JAK2 \ IFRG Wild kinase domain の活性化を抑制して IFRG V678F 定される pseudokinase 領域に存在し、kinase 領域を抑制していると想定されているが、IFRG も pseudokinase 領域に相当する V678 に変異を導入すると恒常的

活性化が生じたため、JAK2 と同様に pseudokinase 領域が kinase domain を抑制

している可能性が示された。Tyk2 の恒常的活性化により細胞が自律増殖を示すことを明らかにしたが、次に、IFRG の恒常的活性化が抗ウイルス活性に及ぼす影響の検討を行って、IFRG の生物学的作用を明らかにする必要がある。

E. 結論

IFN の抗ウイルス作用は IFRG の欠損によ

り部分的な障害をうけるが十分量の IFN が存在するときには障害されない。IFRG の pseudokinase 領域は kinase 領域を抑制しており、pseudokinase 領域に変異を導入すると IFRG の恒常的活性化が生じ、下流の STAT の恒常的活性化、細胞の自律増殖、サイトカインへの反応性亢進が生じる。