

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 門脇 孝

平成25(2013)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 ----- 7

2. 脂肪細胞のエピゲノム解析

脇 裕典 ----- 11

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 ----- 15

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 ----- 18

III 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 21

IV 研究成果の刊行物・別刷 ----- 23

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。

今年度の研究において、(A)ヒトの皮下脂肪と内臓脂肪をトランスクリプトーム解析で比較すると、主成分分析にて両者は明確に分離され、2 型糖尿病全ゲノム解析の結果と照らしあわせると、皮下脂肪と内臓脂肪で発現に差がある疾患感受性遺伝子 CTBP1 を見出した。また、FAIRE-seq 技術を用いたエピゲノム解析を行い脂肪細胞に特異的な転写制御領域をゲノムワイドに同定し、新たな脂肪細胞分化制御因子として NFI ファミリーを同定して機能解析を進めるとともに、脂肪組織全体を用いてオープンクロマチン領域を同定する手法を確立した。(B)また、2 型糖尿病感受性遺伝子操作動物の作製・解析により、膵 β 細胞において、KCNQ1 は機能を亢進させた場合に耐糖能異常をきたすことを見出した。(C)さらに、大腸菌無細胞蛋白質合成系を利用して KCNQ1/KCNE 蛋白質を大量に共発現させ、穏和な界面活性剤での可溶化・精製作業を進めた。KCNQ1 の C 端細胞内ドメイン欠損コンストラクトの活用や、添加する脂質種の検討から、良好な蛋白質発現・精製条件を見出し、精製標品を用いて結晶化スクリーニングを進めた。

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 助教

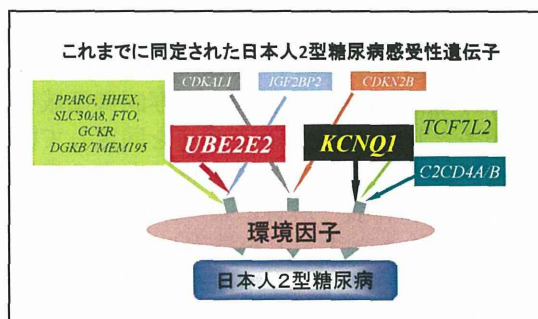
横山 茂之 独立行政法人理化学研究所  
生命分子システム基盤研究領域 領域長

### 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/Bを新たに見出した(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、

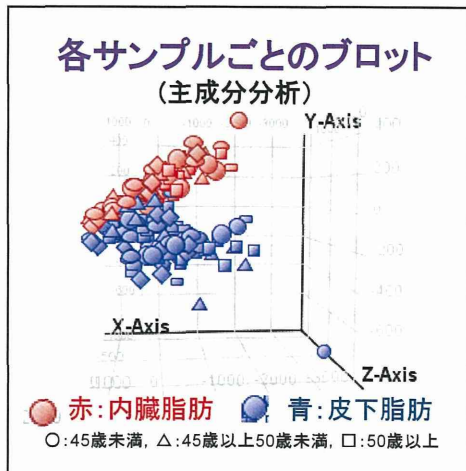
予想外の遺伝病の存在が明らかになった場合の予測される病態や予後，治療方針等につき，結果の開示に伴い本人および家族に医学的あるいは心理的問題を生じる可能性があり，遺伝カウンセリング等の体制をとっている。

### 【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。

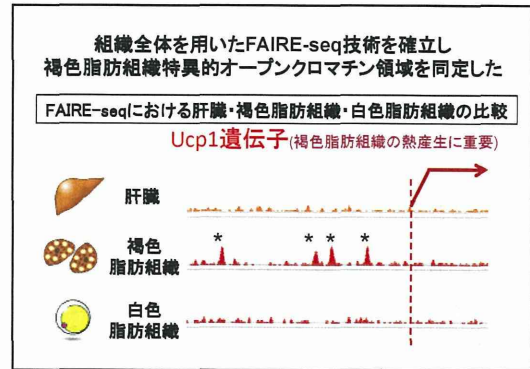
### C. 研究結果

(A) ヒトの皮下脂肪と内臓脂肪をトランスクリプトーム解析で比較すると，主成分分析にて両者は明確に分離された。

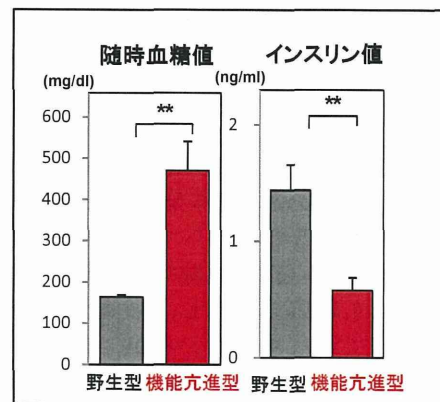


2型糖尿病全ゲノム解析の結果と照らしあわせると，皮下脂肪と内臓脂肪で発現に差がある疾患感受性遺伝子 CTBP1 を見出した。

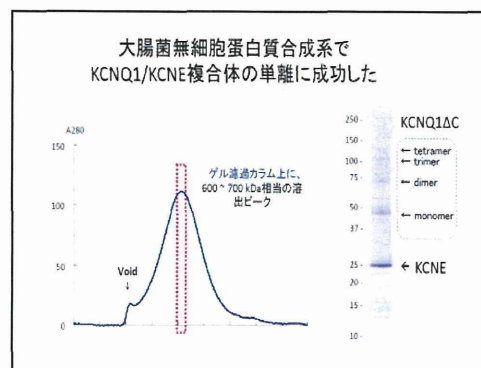
また，FAIRE-seq 技術を用いたエピゲノム解析を行い脂肪細胞に特異的な転写制御領域をゲノムワイドに同定し，新たな脂肪細胞分化制御因子として NFI ファミリーを同定し機能解析を進めるとともに，脂肪組織全体を用いてオープンクロマチン領域を同定する手法を確立した。



(B) 2型糖尿病感受性遺伝子操作動物の作製・解析により，膵β細胞において，KCNQ1 は機能を亢進させた場合に，耐糖能異常をきたすことを見出した。



(C) 大腸菌無細胞蛋白質合成系を利用して KCNQ1/KCNE 蛋白質を大量に共発現させ，穏和な界面活性剤での可溶化・精製作業を進めた。KCNQ1 の C 端細胞内ドメイン欠損コンストラクトの活用や，添加する脂質種の検討から，良好な蛋白質発現・精製条件を見出し，精製標品を用いて結晶化スクリーニングを進めた。



#### 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%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. Fujita H, Hara K, Shojima N, Horikoshi M, Iwata M, Hirota Y, Tobe K, Seino S, Kadowaki T: Variations with modest effects have an important role in the genetic background of type 2 diabetes and diabetes-related traits. **J Hum Genet.** 57:776-779, 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. **Human Molecular Genetics** 21:3042-3049, 2012
3. Iwata M, Maeda S, Kamura Y, Takano A, Kato H, Murakami S, Higuchi K, Takahashi A, Fujita H, Hara K, Kadowaki T, Tobe K: Genetic risk score constructed using 14 susceptibility alleles for type 2 diabetes is associated with the early onset of diabetes and may predict the future requirement of insulin injections among Japanese individuals. **Diabetes Care** 35:1763-1770, 2012
4. 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 CD44 in adipose tissue with type 2 diabetes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 109:7049-7054, 2012.
5. Ma R. C. W., Hu C., Tam C. H., Zhang

- R., Kwan P., Leung T. F., Thomas G. N., Go M. J., Hara K., Sim X., Ho J. S. K., Wang C., Li H., Lu L., Wang Y., Li J. W., Wang Y., Lam V. K. L., Wang J., Yu W., Kim Y., Ng D. P., Fujita H., Panoutsopoulou K., Day-Williams A., Lee H. M., Ng A. C. W., Fang Y., Kong A. P. S., Jiang F., Ma X., Hou X., Tang S., Lu J., Yamauchi T., Tsui S. K. W., Woo J. L. F., Leung P. C., Zhang X., Tang N. L. S., Sy H. Y., Liu J., Wong T.Y., Lee J. Y., Maeda S., Xu G., Cherny S. S., Chan T. F., Ng M. C. Y., Xiang K., Morris A. P., DIAGRAM Consortium, Keildson S., MuTHER Consortium, Hu R., Ji L., Lin X., Cho Y. S., Kadowaki T., Tai E. S., Zeggini E., McCarthy M. I., Hon K. L., Baum L., Tomlinson B., So W. Y., Bao Y., Chan J. C. N., Jia W.: Genome-wide association study in a Chinese population identifies a susceptibility locus for type 2 diabetes at 7q32 near *PAX4*  
**Diabetologia** 56:1291-1305, 2013
6. Nakamura A, Togashi Y, Orime K, Sato K, Shirakawa J, Ohsugi M, Kubota N, Kadowaki T, Terauchi Y: Control of beta cell function and proliferation in mice stimulated by small-molecule glucokinase activator under various conditions.  
**Diabetologia** 55:1745-1754, 2012
7. Saxena R, Saleheen D, Been LF, Garavito ML, Braun T, Bjornes A, Young R, Ho WK, Rasheed A, Frossard P, Sim X, Hassanali N, Radha V, Chidambaram M, Liju S, Rees SD, Peng-Keat Ng D, Wong TY, Yamauchi T, Hara K, Tanaka Y, Hirose H, McCarthy MI, Morris AP; DIAGRAM; MuTHER; AGEN, Basit A, Barnett AH, Katulanda P, Matthews D, Mohan V, Wander GS, Singh JR, Mehra NK, Ralhan S, Kamboh MI, Mulvihill JJ, Maegawa H, Tobe K, Maeda S, Cho YS, Tai ES, Kelly MA, Chambers JC, Kooner JS, Kadowaki T, Deloukas P, Rader DJ, Danesh J, Sanghera DK. : Genome-Wide Association Study Identifies a Novel Locus Contributing to Type 2 Diabetes Susceptibility in Sikhs of Punjabi Origin From India.  
**Diabetes** 62:1746-55, 2013
8. Shirakawa J, Tanami R, Togashi Y, Tajima K, Orime K, Kubota N, Kadowaki T, Goshima Y, Terauchi Y: Effects of liraglutide on  $\beta$ -cell-specific glucokinase-deficient neonatal mice.  
**Endocrinology** 153:3066-3075 , 2012
9. Shojima N, Hara K, Fujita H, Horikoshi M, Takahashi N, Takamoto I, Ohsugi M, Aburatani H, Noda M, Kubota N, Yamauchi T, Ueki K, Kadowaki T: Depletion of homeodomain-interacting protein kinase 3 impairs insulin secretion and glucose tolerance in mice.  
**Diabetologia** 55: 3318-3330, 2012
10. Waki H, Yamauchi T, Kadowaki T: The epigenome and its role in diabetes.  
**Curr. Diab. Rep.** 12:673-685, 2012
11. Wang G, Watanabe M, Imai Y, Hara K, Manabe I, Maemura K, Horikoshi M, Ozeki A, Itoh C, Sugiyama T, Kadowaki T, Yamazaki T, Nagai R. : Associations of variations in the MRF2/ARID5B gene with susceptibility to type 2 diabetes in the Japanese population.  
**J Hum Genet.** 57:727-733, 2012
12. Hara-Yokoyama M, Kukimoto-Niino M, Terasawa K, Harumiya S, Podyma-Inoue K A, Hino N, Sakamoto K, Itoh S, Hashii N, Hiruta Y, Kawasaki N, Mishima-Tsumagari C, Kaitsu Y, Matsumoto T, Wakiyama M, Shirouzu M, Kasama T, Takayanagi H, Utsunomiya-Tate N, Takatsu K, Katada T, Hirabayashi Y, Yokoyama S, Yanagishita M.: Tetrameric interaction of the ectoenzyme CD38 on the cell surface enables its catalytic and raft-Association activities.  
**Structure.** 20:1585-1595, 2012
13. Arai S, Saijo S, Suzuki K, Mizutani K, Kakinuma Y, Ishizuka-Katsura Y, Ohsawa N, Terada T, Shirouzu M,

Yokoyama S, Iwata S, Yamato I,  
Murata T.:Rotation mechanism of  
Enterococcus hirae V1-ATPase based  
on asymmetric crystal structures.  
**Nature**, 493:703-707,2013

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



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)  
分担研究報告書

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

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・同定されていたが、最近ゲノムワイド関連解(GWAS:genome-wide association study)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インスリン分泌低下型の2型糖尿病に関与していることが示唆されている。しかし欧米からの報告も含めて60を超える2型糖尿病感受性遺伝子が同定されているものの、感受性遺伝子の機能や、これらの感受性遺伝子の遺伝子型情報が実際に糖尿病の易罹患性診断に応用可能であるかどうかについては未知の部分が多いと考えられる。

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遺伝子型情報に基づく診断法の開発を目指す。

B. 研究方法

①糖尿病感受性遺伝子の遺伝子型情報に基づく診断法の開発:研究参加について書面による同意を得た2,632人の2型糖尿病患者と2050人の糖代謝正常者を対象者とした。欧米人を対象とした国際コンソーシアムであるMAGIC研究(the Meta-Analyses

of Glucose and Insulin-related traits Consortium)にて糖尿病関連形質と相関することが示された遺伝子多型のうち9個のSNP(single nucleotide polymorphism)(rs340874, rs4607517, rs2191349, rs7034200, rs10885122, rs174550, rs11605924, rs10830963 and rs35767)について TaqMan アッセイ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)でタイピングを行った。前述の対象者について空腹時血糖、空腹時インスリン値、HbA1c、インスリン抵抗性指標のHOMA-IR、インスリン分泌指標のHOMA-βについてSNPとの関連を検討した。

②発現解析による糖尿病感受性遺伝子の機能解析: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に、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胃癌に対する手術の際に内臓脂肪ならびに腹壁皮下脂肪1cm<sup>3</sup>程度を採取しRNeasyKit(QIAGEN)によってRNAを抽出しAffymetrixまたはAgilent社の遺伝子発現解析用アレイ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検定を行った。

(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

①糖尿病感受性遺伝子の遺伝子型情報に基づく診断法の開発: 検討した SNP の中で PROX1 遺伝子多型 (rs340874) ならびに FADS1 遺伝子多型 (rs174550) が有意に2型糖尿病と相関した(それぞれ  $P=0.0078$ , OR: 1.12 ならびに  $P=0.0071$ , OR: 1.12)。しかしながら9個のいずれも糖尿病関連形質とは有意な相関を示さなかった。にも関わらず、9個の SNP について欧米人でリスクアリルと報告されているリスクアリルの個数が多い対象者ほど2型糖尿病のリスクが有意に上昇していた ( $P=0.0017$ )。更に、空腹時血糖 ( $P=0.018$ )、HbA1c ( $P=0.013$ )、HOMA- $\beta$  ( $P=0.033$ )についてもリスクアリルの個数が多いほど血糖、HbA1c が高く、インスリン分泌指標の HOMA- $\beta$  が低いことが明らかになった。

②発現解析による糖尿病感受性遺伝子の機能解析: 皮下脂肪と内臓脂肪における遺伝子発現について主成分分析を行ったところ明確に分かれることから、皮下脂肪と内臓脂肪では発現プロファイルが異なっていることが示唆された。日本人を含む東アジア民族を対象とした GWAS によって2型糖尿病と強い関連が示された染色体4番短腕領域の遺伝子 (MAEA, CTBP1, SPON2) について皮下脂肪と内臓脂肪におけるそれぞれの遺伝子発現を検討したところ、CTBP1 遺伝子の発現は内臓脂肪で皮下脂肪に比べて有意に低下していた。これに対して近傍の MAEA ならびに SPON2 ではそのような差を認めなかった。

### D. 考察

2型糖尿病の発症リスクを上昇させる感受性遺伝子多型は、ひとつひとつでは効果が弱く頻度は高くても、解析対象のサンプルサイズを極めて大きくしないと統計学的に有意とならないことが多々認められる。今回、

個々の遺伝子多型と糖尿病・糖尿病関連形質とが有意に関連しなくとも、ある程度の数の遺伝子多型をまとめて解析することによって糖尿病・糖尿病関連形質とが有意に相関することが判明した。このことは関連解析で有意とならない弱い効果をもった遺伝子多型も糖尿病の発症に関与しているという最近の common disease の遺伝素因の捉え方と合致した結果であると考えられる。今後は、解析対象 SNP を更に増やした解析ならびに独立したサンプルによる再現性の確認によって、2型糖尿病の発症を多数の感受性遺伝子の遺伝子型によって予測するための方法の開発を目指したい。また、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。特に GWAS で2型糖尿病や糖尿病関連形質との相関が報告されている領域の遺伝子について、近傍の遺伝子発現レベルと関連する SNP の探索や (eQTL 解析)、皮下脂肪と内臓脂肪とで発現が明確に異なるものを探索し、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。

### 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: Takase S, Osuga JI, Fujita H, Hara K, Sekiya M, Igarashi M, Takanashi M, Takeuchi Y, Izumida Y, Ohta K, Kumagai

M, Nishi M, Kubota M, Masuda Y, Taira Y, Okazaki S, Iizuka Y, Yahagi N, Ohashi K, Yoshida H, Yanai H, Tada N, Gotoda T, Ishibashi S, Kadowaki T, Okazaki H. Apolipoprotein C-II Deficiency with No Rare Variant in the APOC2 Gene.

***J Atheroscler Thromb***,

publication online, 2013 Mar 7.

2: Saxena R, Saleheen D, Been LF, Garavito ML, Braun T, Bjornes A, Young R, Ho WK, Rasheed A, Frossard P, Sim X, Hassanali N, Radha V, Chidambaram M, Liju S, Rees SD, Ng DP, Wong TY, Yamauchi T, **Hara K**, Tanaka Y, Hirose H, McCarthy MI, Morris AP; DIAGRAM; MuTHER; AGEN, Basit A, Barnett AH, Katulanda P, Matthews D, Mohan V, Wander GS, Singh JR, Mehra NK, Ralhan S, Kamboh MI, Mulvihill JJ, Maegawa H, Tobe K, Maeda S, Cho YS, Tai ES, Kelly MA, Chambers JC, Kooner JS, Kadowaki T, Deloukas P, Rader DJ, Danesh J, Sanghera DK. Genome-wide association study identifies a novel locus contributing to type 2 diabetes susceptibility in sikhs of punjabi origin from India.

***Diabetes*** 2013 62(5):1746-55, 2013

3: Fujita H, **Hara K**, Shojima N, Horikoshi M, Iwata M, Hirota Y, Tobe K, Seino S, Kadowaki T. Variations with modest effects have an important role in the genetic background of type 2 diabetes and diabetes-related traits.

***J Hum Genet.*** 57(12):776-9, 2012

4: Wang G, Watanabe M, Imai Y, **Hara K**, Manabe I, Maemura K, Horikoshi M, Ozeki A, Itoh C, Sugiyama T, Kadowaki T, Yamazaki T, Nagai R. Associations of variations in the MRF2/ARID5B gene with susceptibility to type 2 diabetes in the Japanese population.

***J Hum Genet.*** 57(11):727-33, 2012

5: Li H, Gan W, Lu L, Dong X, Han X, Hu C, Yang Z, Sun L, Bao W, Li P, He M, Sun L, Wang Y, Zhu J, Ning Q, Tang Y, Zhang R, Wen J, Wang D, Zhu X, Guo K, Zuo X, Guo X, Yang H, Zhou X; DIAGRAM Consortium; **AGEN-T2D Consortium**, Zhang X, Qi L, Loos RJ, Hu FB, Wu T, Liu Y, Liu L, Yang Z, Hu R, Jia W, Ji L, Li Y, Lin X. A genome-wide association study identifies GRK5 and RASGRP1 as type 2 diabetes loci in Chinese Hans. ***Diabetes.*** 62(1):291-8, 2013

6: Xi B, Takeuchi F, Chandak GR, Kato N, Pan HW; **AGEN-T2D Consortium**, Zhou DH, Pan HY, Mi J. Common polymorphism near the MC4R gene is associated with type 2 diabetes: data from a meta-analysis of 123,373 individuals.

***Diabetologia*** 55(10):2660-6, 2012

7: Yamada T, **Hara K**, Kadowaki T. Association of adenovirus 36 infection with obesity and metabolic markers in humans: a meta-analysis of observational studies.

***PLoS One*** 7(7):e42031, 2012

8: Iwata M, Maeda S, Kamura Y, Takano A, Kato H, Murakami S, Higuchi K, Takahashi A, Fujita H, **Hara K**, Kadowaki T, Tobe K. Genetic risk score constructed using 14 susceptibility alleles for type 2 diabetes is associated with the early onset of diabetes and may predict the future requirement of insulin injections among Japanese individuals.

***Diabetes Care.*** 35(8):1763-70, 2012

9: 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

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, KCNQ1・PPAR $\gamma$  UBE2E2・C2CD4A/4Bや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

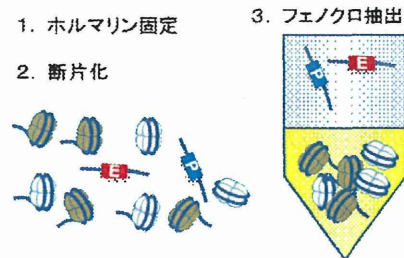


図1 FAIREによるオープンクロマチン領域の検出

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

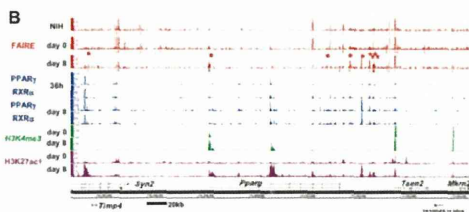


図2 FAIREによるオープンクロマチン領域の検出(文献1より)

ており, 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 $\alpha$ 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

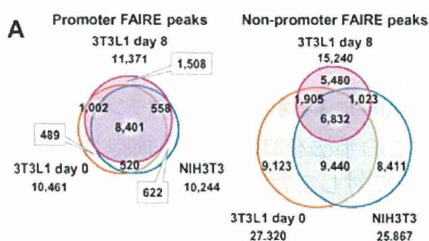


図3 プロモーターFAIREピーク(左)と非プロモーターFAIREピーク(右)の, 3T3-L1細胞の脂肪細胞分化前と後, NIH-3T3細胞における重なり。(文献1)

写制御領域を, 転写開始点下流のイントロンに複数同定した.

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 $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ 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NF1の結合モチーフが脂肪細胞特異的なオープンクロマチン領域に濃縮していた. NF1Aの過剰発現細胞では脂肪細胞分化誘導前からPPAR $\gamma$ やC/EBP $\alpha$ , 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NF1AやNF1B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

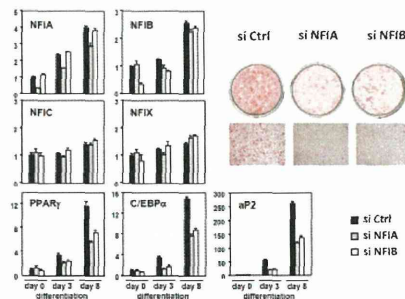


図4 3T3-L1細胞におけるNF1AとNF1BのノックダウンによりPPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ , aP2の誘導(左)と, 脂肪滴の蓄積(右)が抑制された。(文献1)

合わせることでその制御因子の 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 を行う系を確立した. マウスの脂肪組織のサンプルについて FAIRE 解析を施行した. 今後は更にエピゲノム解析手法を通し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. (文献1: Waki H, et al. PLoS Genet. 2011;7(10):e1002311.)

### 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、生理的状态および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

The epigenome and its role in diabetes.  
Waki H, Yamauchi T, Kadowaki T. Curr Diab Rep. 2012;12:673-685.

##### 2. 学会発表

The 64th Fujihara Seminar, International Symposium on Adiponectin Biology and Medicine

(2012.8.4-7, 苫小牧)(poster)

Global Mapping of Cell-Type-Specific Regulatory Elements Reveals the Regulatory Role of the NFI Family in Adipocyte Differentiation

Hironori Waki, Toshimasa Yamauchi, Masahiro Nakamura, Jing Yu, Ken-ichi

Wakabayashi, Tomohisa Aoyama, Lisa Hirose Yotsuya, Kazumi Take, Wei Sun, Masato Iwabu, Miki Okada-Iwabu, Takanori Fujita, Shuichi Tsutsumi, Kohjiro Ueki, Tatsuhiko Kodama, Juro Sakai, Hiroyuki Aburatani and Takashi Kadowaki

The Alfred Benzon Symposia, Adipose Tissue in Health and Disease (2012.8.27-8.30, Copenhagen)(poster)

Global Mapping of Cell-Type-Specific Regulatory Elements Reveals the Regulatory Role of the NFI Family in Adipocyte Differentiation

Hironori Waki, Toshimasa Yamauchi, Masahiro Nakamura, Jing Yu, Ken-ichi

Wakabayashi, Tomohisa Aoyama, Lisa Hirose Yotsuya, Kazumi Take, Wei Sun, Masato Iwabu, Miki Okada-Iwabu, Takanori Fujita, Shuichi Tsutsumi, Kohjiro Ueki, Tatsuhiko Kodama,

Juro Sakai, Hiroyuki Aburatani and Takashi Kadowaki

第49回日本臨床分子医学会学術集会(2012年4月13日~14日 京都)(口演発表)  
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による脂肪細胞分化制御因子NFIファミリーの同定

脇 裕典、中村 正裕、山内 敏正、若林 賢一、于 静、四谷 理沙、武 和巳、孫 威、岩部 真人、岡田 美紀、藤田 隆教、青山 倫久、堤 修一、植木 浩二郎、児玉 龍彦、酒井 寿郎、油谷 浩幸、門脇 孝

第85回日本内分泌学会学術総会(2012年4月19日~21日 名古屋)(ポスター発表)

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による脂肪細胞分化制御因子NFIファミリーの同定

脇 裕典、中村 正裕、山内 敏正、若林 賢一、于 静、四谷 理沙、武 和巳、孫 威、岩部 真人、岡田 美紀、藤田 隆教、青山 倫久、堤 修一、植木 浩二郎、児玉 龍彦、酒井 寿郎、油谷 浩幸、門脇 孝

日本エピジェネティクス研究会第6回年会(2012年5月14日~15日 東京)(ポスター発表)

脂肪細胞特異的制御領域のゲノムワイド解析と分化制御因子NFIファミリーの同定

脇 裕典、中村 正裕、山内 敏正、若林 賢一、于 静、四谷 理沙、武 和巳、孫 威、岩部 真人、岡田 美紀、藤田 隆教、青山 倫久、堤 修一、植木 浩二郎、児玉 龍彦、酒井 寿郎、油谷 浩幸、門脇 孝

第54回日本糖尿病学会年次学術集会(2012年5月18日(金) 横浜)(口演発表)

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と分化におけるNFIファミリーの役割

脇 裕典、中村 正裕、山内 敏正、若林 賢一、于 静、四谷 理沙、武 和巳、孫 威、岩部 真人、岡田 美紀、藤田 隆教、青山 倫久、堤 修一、植木 浩二郎、児玉 龍彦、酒井 寿郎、油谷 浩幸、門脇 孝

第30回日本肥満症治療学会学術集会(2012年6月30日(土) 東京)(口演発表)  
脂肪細胞特異的制御領域のゲノムワイド解析と分化制御因子 NFI ファミリーの同定  
脇 裕典、中村 正裕、山内 敏正、若林 賢一、于 静、四谷 理沙、武 和巳、孫 威、岩部 真人、岡田 美紀、藤田 隆教、青山 倫久、堤 修一、植木 浩二郎、児玉 龍彦、酒井 寿郎、油谷 浩幸、門脇 孝

第12回東京大学生命科学シンポジウム(2012年6月30日(土) 東京)(ポスター発表)  
脂肪細胞特異的制御領域のゲノムワイド解析と分化制御因子 NFI ファミリーの同定  
脇 裕典、中村 正裕、山内 敏正、若林 賢一、于 静、四谷 理沙、武 和巳、孫 威、岩部 真人、岡田 美紀、藤田 隆教、青山 倫久、堤 修一、植木 浩二郎、児玉 龍彦、酒井 寿郎、油谷 浩幸、門脇 孝

Diabetes Leading-edge Conference(2012年8月11日 千葉)(口演発表)  
脂肪細胞分化におけるクロマチン構造変化とエピゲノム制御の役割  
脇 裕典

第17回アディポサイエンス研究会(2012年8月25日 大阪)(口演発表)  
「脂肪細胞分化におけるクロマチン構造変化とエピゲノム制御の役割」  
脇 裕典

第33回日本肥満学会(2012年10月11日 京都)(口演発表)  
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による脂肪細胞分化制御因子 NFI の同定  
脇 裕典、中村 正裕、山内 敏正、若林 賢一、于 静、四谷 理沙、武 和巳、孫 威、岩部 真人、岡田 美紀、藤田 隆教、青山 倫久、堤 修一、植木 浩二郎、児玉 龍彦、酒井 寿郎、油谷 浩幸、門脇 孝

第33回日本肥満学会(2012年10月12日

京都)(口演発表)

シンポジウム8【Adiposcienceの新展開:肥満症の基礎研究】  
脂肪細胞分化におけるクロマチン構造変化とエピゲノム制御の役割  
脇 裕典、中村 正裕、山内 敏正、若林 賢一、于 静、四谷 理沙、武 和巳、孫 威、岩部 真人、岡田 美紀、藤田 隆教、青山 倫久、堤 修一、植木 浩二郎、児玉 龍彦、酒井 寿郎、油谷 浩幸、門脇 孝

第35回日本分子生物学会年会(2012年12月11日 福岡)(口演発表)  
ワークショップ:代謝と生活習慣病をつなぐエピジェネティクス制御機構 Epigenetic mechanism linking metabolism and life-style disease  
脂肪細胞分化におけるクロマチン構造変化とエピゲノム制御の役割  
脇 裕典

3. 総説

脇 裕典  
脂肪細胞分化特異的エンハンサーのゲノムワイド解析と分化におけるNFIの役割  
糖尿病学2012 35-43, 2012

脇 裕典

Keystone Symposia, Genetic and Molecular Basis of Obesity and Body Weight Regulation (J7), Pathogenesis of Diabetes (J8)に参加して  
「肥満研究」Vol. 18 No. 1, 61-65, 2012.

脇 裕典、山内敏正、門脇 孝. 白色脂肪細胞のエピジェネティクス. 医学のあゆみ 242(12) 褐色脂肪細胞と白色脂肪細胞 p918-923, 2012

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。これまでの検討において、TCF7L2 の機能低下型遺伝子操作マウスの作製・解析により、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。そこで今年度は、2 型糖尿病感受性遺伝子として KCNQ1 に着目し、KCNQ1 の機能亢進型遺伝子操作マウスを作製・解析した。その結果、膵β細胞において、KCNQ1 は機能を亢進させた場合に、耐糖能異常をきたすことを見出した。

#### 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。

これまでの検討において、TCF7L2の機能低下型遺伝子操作マウスの作製・解析により、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。

そこで今年度は、わが国において重要と考えられる2型糖尿病感受性遺伝子としてKCNQ1に着目し、KCNQ1の機能亢進型遺伝子操作マウスを作製・解析した。

#### B. 研究方法

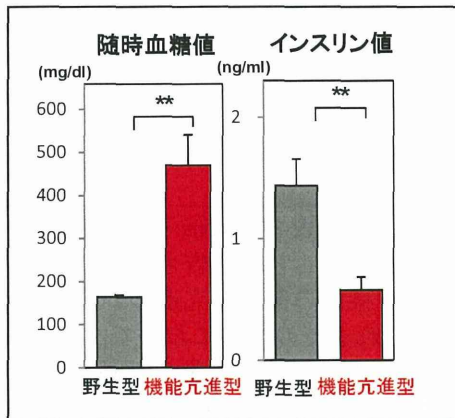
KCNQ1の機能亢進型変異体をRIPプロモーター (Rat Insulin Promoter) の下流につなぐコンストラクトを構築し、膵β細胞に機能亢進型KCNQ1を発現させたトランスジェニックマウスを作製し、表現型を解析した。

##### 【実験動物に対する動物愛護上の配慮】

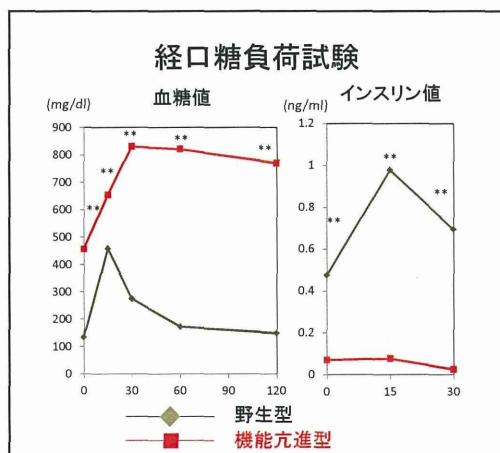
実験動物については「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」(昭和55年3月27日 総理府告示) を遵守して実験に利用し、実験動物の生活環境の保全と、実験に際してできる限り苦痛を与えないように努力した。

### C. 研究結果

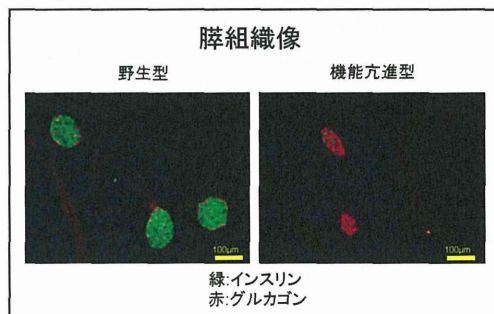
機能亢進型マウスは野生型マウスと比較して離乳時期より随時血糖値は高値を示した。また成体においては、耐糖能異常はさらに顕著となり、野生型マウスと比較して機能亢進型マウスでは、随時血糖値は高値を示し、インスリン値は低値であった。



経口糖負荷試験を行うと、機能亢進型マウスは野生型マウス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。



さらに、機能亢進型マウスは膵組織像での膵β細胞面積の減少を呈した。



### 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。Tcf7l2はWntシグナルの一翼を担う転写因子であるが、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。我々はこれまでの検討により、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見出した。

また、2008年にKCNQ1は2型糖尿病感受性遺伝子の1つとして同定され、日本人にとって重要な遺伝子であると考えられるが、2型糖尿病の発症機序は未だ不明である。KCNQ1は電位依存性カリウムチャンネルであり、心筋のほかに、膵島においても発現している。今年度の検討結果から、膵β細胞において、KCNQ1は機能を亢進させた場合に、インスリン分泌低下を伴う耐糖能異常をきたすことを見出した。KCNQ1の機能亢進は、膵β細胞の脱分極抑制ないしは再分極促進を介することで、インスリン分泌低下をもたらす可能性が考えられた。

### E. 結論

in vivoで膵β細胞におけるKCNQ1は、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

72st Scientific Sessions of the American Diabetes Association (Philadelphia, USA, 2012. 06)

Iseki Takamoto, Naoto Kubota, Katsuyoshi Kumagai, Atsushi Obata, Tetsuya Kubota, Kohjiro Ueki, Takashi Kadowaki:

Role of Tcf7l2-mediated pathway in pancreatic beta cell in vivo.

第55回日本糖尿病学会年次学術集会（2012年5月 横浜）

高本偉碩，窪田直人，熊谷勝義，小畑淳史，桜井賛孝，窪田哲也，北村忠弘，植木浩二郎，門脇孝：

2型糖尿病感受性遺伝子Tcf712が膵β細胞で担う役割の解明

和文総説

高本偉碩： Wntシグナルと膵内分泌細胞分化．内分泌・糖尿病・代謝内科 36(3) 204-210, 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
無し
2. 実用新案登録  
無し

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）  
分担研究報告書

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 の共発現条件とタンパク質安定性を探索し、無細胞合成系での KCNQ1/KCNE 複合体の安定発現条件を見出した。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24年度は、平成23年度に確立した大腸菌無細胞タンパク質合成技術を利用したKCNQ1ファミリータンパク質調製方法について、立体構造解析の為の結晶化スクリーニングに十分な高収量と高純度を目指した種々の条件検討を行った。

B. 研究方法

多数回膜貫通型膜タンパク質である KCNQ1ファミリータンパク質（ $\alpha$ サブユニット）と、 $\alpha$ サブユニットとの複合体形成により活性制御を担うKCNEタンパク質（ $\beta$ サブユニット）の試料調製には、平成23年度に確立した、界面活性剤/脂質共存透析法による大腸菌無細胞タンパク質合成技術を利用した。本方法では、膜タンパク質をリポソームの脂質二重膜内に発現させることができる。発現量を指標に、リポソームを構成する脂質種や発現温度などの諸条件の最

適化を進めた。精製では、まず $\alpha/\beta$ サブユニットを発現させたプロテオリポソームの可溶化について、可溶化遠心上清への回収率、イオン交換カラム精製やゲル濾過カラム精製時の挙動等を指標に、界面活性剤種やpH、 $\alpha/\beta$ サブユニットのコンストラクトなど諸条件の最適化を行った。次に、アフィニティカラム精製について、精製度と精製レジジンへの吸着・溶出時の挙動を主な指標として、精製に用いるアフィニティカラムと $\alpha/\beta$ サブユニットへ連結する精製用タグの種類を選定した。ゲル濾過カラム精製には、ヘテロ多量体を形成する $\alpha/\beta$ サブユニット複合体に見合う分画サイズと分離能を発揮するシリカ系担体のカラムを用いた。精製標品の同定と $\alpha$ サブユニットの断片化箇所検索には、N末端配列解析（エドマン法）と質量分析（MALDI-TOF MS法）を利用し、この結果を基に、断片化箇所を除去した $\alpha$ サブユニット変異体を作製した。

C. 研究結果

大腸菌無細胞タンパク質合成技術を利用した試料調製では、添加するリポソームの脂質組成を、標準条件のホスファチジルコリンから天然脂質抽出物に変更したことで、顕著な発現量増加に成功した（図1）。