

主論文の要約

生命農学研究科 応用分子生命科学専攻 応用遺伝・生理学講座 鈴木 京

論文題目

マウスを用いた脂肪肝感受性遺伝子座 *F11sa* の解析：候補遺伝子の探索とその機能解析

NAFLD (nonalcoholic fatty liver disease) は、肝臓に脂質が過剰に蓄積する単純性脂肪肝から、炎症を伴う NASH (nonalcoholic steatohepatitis) までを含む病態概念である。NAFLD は肥満や 2 型糖尿病、脂質異常症といった生活習慣病と関連が深く、環境要因と複数の遺伝的要因から発症する多因子疾患である。ヒトにおいても複数の遺伝的要因が報告されているが、遺伝的に不均一なヒトを対象とした NAFLD の遺伝的要因の解析には制約があるため、近交系統マウスを用いた遺伝解析が威力を発揮する。当研究室では、脂肪肝感受性遺伝子の同定を目的として、高脂肪食の摂取により重篤な脂肪肝を呈する SMXA-5 マウスの遺伝解析を進めてきた。SMXA-5 マウスは、両親系統である SM/J マウスと A/J マウスから作出された組み換え近交系統群の 1 系統であり、両親系統のゲノムをモザイク状に保有している。この SMXA-5 と SM/J との F2 交雑群を用いた QTL 解析により、第 12 番染色体上に脂肪肝感受性遺伝子座 *F11sa* (Fatty Liver 1 in SMXA) を検出した。*F11sa* の責任遺伝子が脂肪肝感受性遺伝子であると考えられたが、*F11sa* 領域内 (セントロメア～53.06 Mb) には 600 個以上の遺伝子が存在しており、全遺伝子を対象とした責任遺伝子の探索は困難であった。そこで本論文では、*F11sa* の責任遺伝子の探索を目的として、コンジェニックマウスを用いた *F11sa* の責任遺伝子存在領域の限局とその領域からの候補遺伝子の選抜 (第 1 章)、ならびに選抜した候補遺伝子の機能と発現制御機構の解析 (第 2 章) を行った。

第 1 章 コンジェニック系統を用いた *F11sa* の脂肪肝感受性遺伝子の探索

F11sa (第 12 番染色体のセントロメア～53.06 Mb 領域) の責任遺伝子が存在する領域を効率的に絞り込むために、A/J マウスを遺伝的背景として第 12 番染色体を部分的に SM/J の染色体で保有する R2 コンジェニックマウス (セントロメア～29.20 Mb 領域を SM/J アレルで保有)、ならびに R3 コンジェニックマウス (29.20～46.75 Mb 領域を SM/J アレルで保有) を作出し、脂肪肝形質を中心とする表現型解析を行った。

第 1 節では、A/J マウスを用いて、コンジェニックマウスの表現型解析に適した食餌条件を検討した。A/J マウスを CE-2 (市販飼育繁殖用固型飼料) 群、固型高脂肪食群 (固型 HFD 群)、粉末高脂肪食群 (粉末 HFD 群) の 3 群に分け、7 週間飼育した後に肝臓脂質蓄積量を比較した。固型 HFD 群と粉末 HFD 群の肝臓総脂質含量ならびに肝臓トリグリセリド含量 (以下、肝臓 TG 含量) は、CE-2 群と比較して有意な高値を示し、さらに固型 HFD 群は粉末 HFD 群よりも肝臓脂質蓄積が顕著であった。このことから、第 2 節でのコンジェニ

ックマウスの表現型解析は固型 HFD で 7 週間飼育の条件で行うこととした。

第 2 節では、A/J、A/J-12SM (A/J の第 12 番染色体のみを SM/J の染色体に置換したマウス)、R2、R3 を固型 HFD で 7 週間飼育して、肝臓脂質蓄積量を比較した。*Fllsa* は A/J アレルで脂質蓄積量が上昇するため、R2、R3 の肝臓脂質蓄積量は A/J と比較して低下すると予想された。結果として、肝臓総脂質含量は A/J と比較して A/J-12SM が有意な低値を示し、R2、R3 も A/J と比較して低値を示した。さらに、肝臓 TG 含量は、A/J と比較して A/J-12SM、R2、R3 が有意な低値を示した。A/J と比較して、R2、R3 の肝臓脂質が A/J-12SM のレベルまでは低下しなかったことから、*Fllsa* の責任遺伝子は複数存在していると考えられた。また、A/J と比較して R2 ならびに R3 の肝臓 TG 含量が有意な低値を示したことから、*Fllsa* の責任遺伝子は、R2 と R3 がそれぞれ SM/J アレルで保有している領域（セントロメア～29.20 Mb 領域：遺伝子数 370 個、ならびに 29.20～46.75 Mb 領域：遺伝子数 187 個）に少なくとも 1 つずつ存在することが示唆された。

第 3 節では、DNA マイクロアレイ解析（肝臓、精巣上体脂肪組織）、ならびにエクソーム解析により、限局した領域からの候補遺伝子の探索を行った。肝臓の DNA マイクロアレイ解析は、過去に 7 週間 HFD で飼育した A/J と A/J-12SM の肝臓を用いて行ったマイクロアレイデータを再解析し、限局した領域内において 2 群間で 1.68 倍以上あるいは 0.60 倍以下に発現変動した遺伝子を選抜した。第 2 節で表現型解析を行ったマウスの肝臓 TG 含量ならびに肝臓重量が、精巣上体脂肪組織重量と有意な逆相関を示したことから、肝臓に加えて精巣上体脂肪組織のマイクロアレイ解析も行った。精巣上体脂肪組織のマイクロアレイデータより、限局した領域内において 2 群間で 1.68 倍以上あるいは 0.60 倍以下に発現変動した遺伝子を選抜した。肝臓と精巣上体脂肪組織より選抜した遺伝子は、さらにコンジェニックマウスにおける遺伝子発現量を測定し、A/J-12SM とコンジェニックマウスが同様の発現パターンを示した遺伝子を *Fllsa* の候補遺伝子として選抜した。解析の結果、肝臓から *Iah1* と *Rrm2*、精巣上体脂肪組織から *Zfp125* と *Nrcam* を選抜した。さらに、過去に行った A/J と SM/J のエクソーム解析データを再解析したところ、限局した領域内において A/J と SM/J との間で 48 遺伝子にアミノ酸置換を伴う変異が存在しており、特に *Iah1* には 2 か所のアミノ酸置換 (S37A、G75E) が存在することが分かった。以上の DNA マイクロアレイ解析ならびにエクソーム解析の結果から総合的に判断して、*Iah1* 遺伝子が最も有力な候補遺伝子であると考えられた。

第 2 章 *Fllsa* の候補遺伝子 *Iah1* の機能解析と発現制御機構の解析

第 1 章において選抜した *Iah1* と脂肪肝との関連性を検討するために、第 1 節では、全身性 *Iah1* ノックアウトマウス (*Iah1*-KO) を作出し、表現型解析を行った。*Iah1* 野生型マウス (*Iah1*-WT)、*Iah1* ヘテロノックアウトマウス (*Iah1*-Hetero)、および *Iah1*-KO を固型 HFD で 12 週間飼育した結果、*Iah1*-WT と比較して *Iah1*-KO の肝臓総脂質含量ならびに肝臓 TG 含量が有意な高値を示し、*Iah1*-Hetero は *Iah1*-WT と *Iah1*-KO の中間値を示し

た。一方で、*Iah1*-WT と *Iah1*-KO の肝臓における既知の脂質代謝関連遺伝子の発現量を比較したが、2 群間で有意な差は見られなかった。そこで、12 週間 HFD で飼育した *Iah1*-WT と *Iah1*-KO の肝臓を用いてマイクロアレイ解析を行い、2 群間で 1.5 倍以上あるいは 0.67 倍以下に発現変動した糖・脂質代謝関連遺伝子を探索した。その結果、*Sik1*、*Onecut1*、*Msr1* が選抜されたが、この 3 遺伝子の肝臓における発現量は肝臓 TG 含量や肝臓総脂質含量と有意な相関を示さなかった。以上の結果から、*Iah1* は *in vivo* において糖・脂質代謝関連遺伝子 (*Sik1*、*Onecut1*、*Msr1*) の発現量を変動させ得るが、この 3 遺伝子の発現変動が肝臓脂質蓄積に及ぼす影響は弱いと推測された。一方で、酵母 *Iah1p* (*IAH1* gene product) がエステラーゼ活性を持つという報告から、マウス *IAH1* がエステラーゼ活性を介して肝臓脂質量をコントロールする可能性が考えられた。

全身性 *Iah1*-KO の解析では、*Iah1* が肝臓脂質蓄積に関与する可能性が示されたが、肝臓脂質蓄積に寄与する組織の特定には至らなかった。そこで、第 2 節では、肝臓特異的 *Iah1* ノックアウトマウス (肝臓 *Iah1*-KO) の表現型解析を行った。まだ十分な個体数は解析できていないものの、肝臓 *Iah1* 野生型マウス (肝臓 *Iah1*-WT) と肝臓 *Iah1*-KO を固型 HFD で 12 週間飼育して肝臓脂質蓄積量を比較した結果、肝臓 *Iah1*-KO が高値を示したものの、有意な差は見られなかった。この結果から、肝臓で発現している *Iah1* だけではなく、他組織の *Iah1* も肝臓脂質蓄積に寄与していることが示唆された。肝臓脂質蓄積に寄与する肝臓以外の組織としては、肝臓に次いで *Iah1* 発現量が高く、全身性 *Iah1*-KO において脂質代謝関連遺伝子の発現変動が見られた脂肪組織が候補の 1 つとして考えられた。ゆえに今後は、脂肪組織特異的な *Iah1* ノックアウトマウスを作出し、その表現型解析を行う必要がある。さらに、血中に分泌された *IAH1* タンパク質が肝臓に作用している可能性もあるため、マウスの血液中における *IAH1* タンパク質を定量する必要があると考えている。

肝臓における *Iah1* 発現量が低い 4 系統 (A/J、AKR、DBA/1、BALB/c) の *Iah1*-5' 上流領域には 119 bp の塩基欠失が存在していることが先行研究により明らかになっている (立石修論 2012)。この 119 bp の欠失と *Iah1* の発現低下との関連性を明らかにするために、第 3 節では 15 系統のマウスの *Iah1*-5' 上流領域 (転写開始点を +1 とした時の -860~+14 領域) のシーケンス解析、ならびに A/J、SM/J、C57BL/6J の *Iah1*-5' 上流領域のプロモーター活性の測定を行った。シーケンス解析の結果、*Iah1* 発現が低い 4 系統においては、*Iah1*-5' 上流領域に 119 bp の欠失だけでなく、422 bp の挿入、ならびに 17 bp の欠失が保存されていることが分かった。さらに、*Iah1* 発現量が低い系統と、*Iah1* 発現量が高い系統との間には 20 か所の SNPs が存在した。上記の変異と SNPs が *Iah1* 発現に与える影響を検討するために、A/J (変異有・*Iah1* 発現低)、SM/J (変異無・*Iah1* 発現高)、C57BL/6J (変異無・*Iah1* 発現高) の *Iah1*-5' 上流領域のプロモーター活性を比較した。119 bp の欠失と複数の SNPs を含む領域 (-314~+14 領域)、ならびに 3 つの変異と全ての SNPs を含む領域 (-860~+14 領域) のプロモーター活性を測定した結果、全ての変異と SNPs は今回の実験系においては *Iah1* プロモーター活性の低下に寄与しないことが示唆された。今後

は、-860~+14 領域のプロモーター活性の再現性をとること、ならびに転写開始点よりも下流の領域がプロモーター活性に及ぼす影響を検討することが必要である。

本研究の結果から、コンジェニック解析により限局した脂肪肝感受性遺伝子座 *Fllsa* 領域内の候補遺伝子 *Iah1* の発現レベルの恒常的な低下が脂肪肝感受性を高めることが示唆され、*Iah1* が *Fllsa* の有力な候補遺伝子であることが示された。今後、*Iah1*-KO マウスでの肝臓脂質蓄積に対する肝臓および肝外組織の関与とそのメカニズム、ならびに *Iah1* の発現制御機構を解明することが、新たな脂肪肝発症メカニズムの解明に繋がると考えられる。