

一塩基多型による2型糖尿病発症メカニズムの研究

熊本大学大学院 生命科学研究部 分子生理学教室
魏 范研

1. はじめに

緒言

近年、生活環境の著しい変化に伴い、2型糖尿病患者はアジア圏において急増している。日本においても糖尿病患者数が約1千万以上に上り、その9割が2型糖尿病である。2型糖尿病は、患者のみならず、社会にも大きな負担を強いることから、原因解明及び予防・治療法の確立が一刻も早く望まれる。

背景

一般的に疾患の発症には環境的な要因及び遺伝子的な要因が含まれる。2型糖尿病においては、長期にわたるストレスや高脂肪食などのような環境因子の負荷が2型糖尿病を誘発することが知られている。一方、最近の遺伝子解析技術の急速な発展により、2型糖尿病の発症における遺伝的要因が徐々に明らかになって来た。2007年に行われた全ゲノム相関解析により、Cdkal1(Cdk5 regulatory subunit associated protein 1-like 1)遺伝子に存在する特異的な一塩基多型(SNPs)が2型糖尿病の発症と有意に相関するという研究結果がScience誌及びNature Genetics誌に同時に掲載され、2型糖尿病発症に関わる原因遺伝子研究のマイルストーンとなった(参考文献1-4)。その後世界中で行われた検証試験の結果によって、Cdkal1遺伝子はもっとも信頼性の高い2型糖尿病の原因遺伝子の一つであることが明らかになった。

2型糖尿病発症に関わるCdkal1遺伝子のSNPsはCdkal1遺伝子の第5イントロンに存在する。発症と相関する危険型SNPを持つ人は、発症と相関しない非危険型SNPを持つ人と比べ、2型糖尿病の発症危険性は最大で約2倍に上る。また、危険型SNPはインスリンの分泌低下と有意に相関し、インスリン抵抗性とは関連がなかった。これらの疫学的な結果から、Cdkal1遺伝子のイントロンに存在する危険型SNPsは、インスリン分泌の低下を介して2型糖尿病を引き起こすと考えられた。

申請者は先行研究でCdkal1遺伝子の機能を明らかにした。Cdkal1はリジンに対応するtRNAの内、アンチコドンの配列がUUUであるtRNA^{Lys}(UUU)の37番アデニンをチオメチル化する酵素である(参考文献5)。チオメチル化が欠損した細胞では、リジンにおける誤翻訳が生じたことから、tRNA^{Lys}(UUU)のチオメチル化はtRNA^{Lys}(UUU)とリジンコドン(AAA, AAG)の正確な翻訳に必要であることが明らかになった。さらに、申請者は、Cdkal1の膵β細胞特異的な欠損マウス(Cdkal1 KOマウス)を作製し、その表現型を解析した(参考文献6)。Cdkal1 KOマウスの膵β細胞においてリジンの取り込みが低下し、プロインスリンのプロセッシングが障害されていた。Cdkal1 KOマウスのβ細胞において異常なプロインスリンが蓄積した結果、小胞体ストレスが亢進していた。以上の分子メカニズムにより、Cdkal1 KOマウスは野生型マウスと比べてインスリン分泌能が有意に低下し、糖負荷試験時の血糖値が有意に高かった。また、Cdkal1 KOマウスに高脂肪食を与え、環境ストレス負荷時の表現型を検討した。その結果、Cdkal1 KOマウスにおいて膵β細胞内の小胞体ストレスがさらに亢進し、インスリン分泌能が著しく障害されたことがわかった。これらのことから、Cdkal1はインスリンの正確な翻訳を介してβ細胞の正常な機能維持に重要であることが分かった。

目的

Cdkal1 KOマウスの解析結果から、Cdkal1遺伝子の危険型SNPを有する人においても同様な分子メカニズムによって2型糖尿病が発症すると推測された。しかし、エクソン領域に存在する遺伝子変異とは異なり、一般的にイントロンに存在するSNPがどのような分子メカニズムでその遺伝子発現を制御し、また病

気の進行にどのように関わるかは予測できない。Cdkal1のSNPについても危険型Cdkal1のSNPを有する人においてCdkal1遺伝子の発現量が低下しているか否かは全く解明されていない。本研究は、Cdkal1遺伝子のイントロンSNPによるCdkal1遺伝子発現制御機構及びインスリン分泌への関与の解明を目的として行った。

2. 方法

遺伝子解析—ヒト末梢血からのDNA及びRNA精製は、QIAamp DNA blood mini kit及びQIAamp RNA blood mini kitを使用し、プロトコールに従った。Cdkal1遺伝子及びCdkal1のスプライシングバリエントの遺伝子発現は、Taqman gene expression assayを用いて定量PCR法により検討した。

糖負荷試験—前夜9以後食事を控えたボランティアに75グラムブドウ糖が含まれているテスト液(トレーランG、味の素)を飲んでもらい、30分後に末梢血を採取し、血糖値及びインスリン濃度を測定した。インスリン分泌能(Corrected insulin response)は、 $\text{Insulin} / (\text{Glucose} \times (\text{Glucose} - 70))$ を用いて算出した。

tRNAチオメチル化の検出—末梢血RNA中に存在するtRNA^{Lys}(UUU)のチオメチル化の検出は申請者が新たに開発したPCRを用いた検出法を用いた(投稿中)。非危険型SNPを持つ検体の修飾率と危険型SNPを持つ検体の修飾率を比較した。

細胞培養等—HEK293細胞あるいはHeLa細胞はDMEM培地に10%FBSを加えた培地を用いて培養した。ヒト胎児由来の繊維芽細胞はMEM培地に10%FBSを加えた培地を用いて培養した。ヒトiPS細胞は、ヒト繊維芽細胞にOct3/4, SOX2, KLF4及びc-MYCを含むセンダイウィルス(DNAVEC)を加え、推奨されたプロトコールに従い作製した。Cdkal1あるいはCdkal1のスプライシングバリエントに対するsiRNAはそれぞれAmbionまたはInvitrogenから購入した。siRNAはRNAiMAXを用いて細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション72時間後、トータルRNAはTrizol(Invitrogen)を用いて精製した。Cdkal1の発現量はウェスタンブロット法を用いて検討した。

3. 結果

危険型SNPはCdkal1の特異的なスプライシングバリエントの発現量低下と相関する

ボランティア100人の末梢血からDNA、RNAを精製し、Cdkal1遺伝子型及びCdkal1のmRNA(NM_017774)の発現量をまず検討した。その結果、危険型SNP及び非危険型SNPはCdkal1遺伝子の発現量に対して影響を与えなかった。Cdkal1遺伝子は幾つかのスプライシングバリエントを持つことが知られている。これらのスプライシングは比較的短いため、これまでに注目されていなかった。そこで、Cdkal1スプライシングバリエントの発現量をさらに検討した。その結果、ある特異的なCdkal1スプライシングバリエント(以下Cdkal1-SpV)の発現量が危険型SNPを持つ人において劇的に減少したことが明らかになった。末梢血以外の組織でも危険型SNPがCdkal1-SpVの減少と相関するかどうかを検討するために、異なるヒト由来のヒト繊維芽細胞を数種類培養し、DNA及びRNAを抽出し発現量を検討した。その結果、ヒト繊維芽細胞でも危険型SNPがCdkal1-SpVの発現量低下と相関した。

Cdkal1-SpVの発現量低下はインスリン分泌能低下と相関する

Cdkal1-SpVの発現量低下はインスリン分泌能の低下と相関するかどうかを検討するために、ヒトにおいて糖負荷試験を行った。インスリン分泌能をCdkal1-SpVの発現量に対してプロットし、相関を検討した結果、Cdkal1-SpVの発現量が低いほど、インスリン分泌能が低いという有意な相関が得られた。

Cdkal1-SpVの発現量低下がtRNA^{Lys}(UUU)のチオメチル化低下と相関する

Cdkal1-SpVの発現量低下がCdkal1の酵素活性、即ちtRNA^{Lys}(UUU)のチオメチル化に影響を及ぼす可能性がある。そこで、末梢血のRNAに存在するtRNA^{Lys}(UUU)のチオメチル化を新たに開発したPCR法を用いた検出法で検討した。その結果、Cdkal1-SpVの発現量が低下した危険型SNPを持つ人において、tRNA^{Lys}(UUU)のチオメチル化が有意に低下したことが分かった。

Cdkal1-SpVはCdkal1のタンパク発現量を制御する

ヒトの検体で行った実験結果から、Cdkal1-SpVの発現量がCdkal1の活性を制御する可能性が示唆された。Cdkal1-SpVは比較的短いmRNAで翻訳産物が酵素活性を持つことができない。一方、危険型SNPを持つ人において全長型のCdkal1(NM_017774)mRNAの発現量が低下していなかった。これらのことから、Cdkal1-SpVがCdkal1のmRNAではなくCdkal1のタンパク量を調節している可能性が考えられる。そこで、ヒト繊維芽細胞の細胞抽出液で全長型のCdkal1タンパク発現量を検討した。その結果、危険型SNPを持つ繊維芽細胞において全長型のCdkal1のタンパク量が著しく低下した。

Cdkal1-SpVが直接Cdkal1のタンパク量を制御することを検討するために、HEK293細胞にCdkal1-SpVを特異的にターゲットするsiRNAをトランスフェクションして、Cdkal1-SpVの発現量を抑制した時のCdkal1の発現量を検討した。その結果、Cdkal1-SpVの発現量を低下させると、Cdkal1のタンパク発現量が低下した。さらに、Cdkal1-SpVの発現量が低下している危険型SNPを持つヒト繊維芽細胞にCdkal1-SpVをトランスフェクションし、Cdkal1-SpVを補ったところ、Cdkal1のタンパク発現量が回復した。

ヒトiPS細胞の作製

Cdkal1-SpVが低下している危険型SNP、またはCdkal1-SpVが正常に発現している非危険型SNPを有する繊維芽細胞からiPSを誘導するために、Oct3/4, SOX2, KLF4及びc-MYCを含むセンダイウィルスをそれぞれの細胞に導入し、iPS細胞を樹立した。

4. 考察

以上の研究結果から、2型糖尿病の発症と関連するCdkal1遺伝子の第5イントロンに存在する一塩基多型(SNP)は、全長型のCdkal1ではなく、スプライシングバリエントであるCdkal1-SpVの発現量を劇的に減少させる事が明らかになった。SNPがどのような分子機構を介してCdkal1遺伝子のスプライシングに作用するかは不明である。スプライシングバリエントが第4エクソンで終了しているから、第5イントロンに存在するSNPはスプライシングの際に形成される巨大なスプライソームによる一つ前のイントロンを正確にスプイスするのに重要であると推測される。

Cdkal1-SpVの発現量低下が全長型のCdkal1のmRNAレベルではなく、タンパク発現量を低下させた結果、tRNA^{Lys}(UUU)のチオメチル化が低下した。一方、Cdkal1-SpVは全長型Cdkal1mRNAと比べて極めて短く、酵素活性に重要なドメインを有しない。このことは、Cdkal1-SpVの翻訳産物あるいはCdkal1-SpVのRNA自体がCdkal1の安定性に寄与していることを示唆している。

ヒトでの研究結果及び以前のCdkal1 KOマウスの解析結果を総合すると、危険型SNPを有する人における2型糖尿病の発症分子メカニズムが次のように推測される。危険型SNPを有する人では、Cdkal1-SpVの発現量が低下した結果、Cdkal1タンパク量が低下し、tRNA^{Lys}(UUU)のチオメチル化が低下する。その結果、インスリンの翻訳が障害され、インスリン分泌量が低下する。そして、インスリンの恒常的な不足により糖代謝が障害され、2型糖尿病が発症する。今後作製したヒトiPSを用いて上記のメカニズムをさらに詳細に検討する予定である。

5. 発表論文、参考文献

参考文献1 Steinthorsdottir, V. et al. (2007) Nat. Genet. 39, 770-775

参考文献2 Diabetes Genetics Initiative of Broad Institute of Harvard and MIT et al. (2007) Science 316, 1331-1336

参考文献3 Scott, L.J. et al. (2007) Science 316, 1341-1345

参考文献4 Zeggini, E. et al. (2007) Science 316, 1336-1341

参考文献5 Arragain, S. et al. (2010) J. Biol. Chem. 285, 28425-28433

参考文献6 Wei, F.Y. et al. (2011) J. Clin. Invest. 121, 3598-3608