

OLETFにおけるNIDDM原因遺伝子のポジショナルキャンディデートクローニング

● 山田 宜永

京都大学大学院農学研究科

〈研究の目的と進め方〉

インスリン非依存型糖尿病（NIDDM）の発症機構の解明、治療薬の開発のために、NIDDM発症に関与する原因遺伝子を同定していく必要がある。本研究では、ヒトNIDDMのモデル動物であるOtuka Long Evans Tokushima Fatty（OLETF）ラットにおけるNIDDM原因遺伝子を同定することを目的とする。

そのための進め方として、最初に、OLETFラットにおけるNIDDMの発症に対して、主効果およびエピスタシス効果をもつ原因遺伝子を、Quantitative trait locus（QTL）解析によりマッピングする。それらのQTLについて、コンジェニックラットを作製し、NIDDM表現型の解析を行うことで、当該QTLが実際に主効果およびエピスタシス効果をもつか否かの確認を行う。確認されたQTLについて、ヒトゲノムへのシフトアプローチにより、そのゲノム領域に機能の点で有望な候補と考えられる遺伝子が存在すると考えられる場合、当該遺伝子におけるラットゲノムへのマッピング、変異の有無、および発現レベルの解析を行うことで、ポジショナルキャンディデートを同定する。また、コンジェニックとF344ラットとの間のバッククロス交雑群およびサブコンジェニックラットからの新規組み換え個体を用いてQTLゲノム領域の限局を行い、ラットゲノムプロジェクトの成果を取り入れることで、その限局されたQTLゲノム領域内に位置する遺伝子を明らかにした後、機能検索および網羅的な発現レベル解析により候補と考えられる遺伝子を選出し、変異の有無の解析を行うことで、ポジショナルキャンディデートを同定する。さらに、ポジショナルキャンディデートの変異の機能解析、およびコンジェニックとF344ラットとの間のバッククロス交雑群およびサブコンジェニックラットからの新規組み換え個体を用いたQTLとポジショナルキャンディデートの変異との共分離解析を行うことにより、原因遺伝子としての可能性を検討する。

〈研究開始時の研究計画〉

OLETFとF344ラットとの間のF2インタークロス交雑群を作製し、その雄個体（約30週齢）について、マイクロサテライトマーカーのタイピングと空腹時血糖値、OGTTでえられる食後血糖値、 β 細胞数・機能、インスリン値というNIDDM表現型のタイピングを行う。さらに肥満はNIDDM発症に密接な関係をもっていることから、上記雄個体について、体重、副腎丸脂肪量、腸間膜脂肪量、後腹膜脂肪量、腰部皮下脂肪量、筋肉内脂肪量という肥満表現型のタイピングを行う。

マイクロサテライトマーカータイピングデータについて、MAPMAKER/EXPプログラムを利用した連鎖解析を行い、ラット染色体上でのマーカーの連鎖地図を作製する。

マーカー連鎖地図とNIDDM表現型のタイピングデータの両方を利用して、MAPMAKER/QTLプログラムおよびMapQTLプログラムによるQTL解析を行い、NIDDM発症に対して、主効果を発揮する原因遺伝子をラット染色

体上にマッピングする。

マーカー連鎖地図とNIDDM表現型のタイピングデータの両方を利用して、Epistacyプログラムおよび2つのマーカー効果を取り込んだ2元配置分散分析によるエピスタシス解析を行い、NIDDM発症に対して、エピスタシス効果を発揮する原因遺伝子をラット染色体上にマッピングする。

マーカー連鎖地図と肥満表現型のタイピングデータの両方を利用して、MAPMAKER/QTLプログラムおよびMapQTLプログラムによるQTL解析を行い、肥満発症に対して、主効果を発揮する原因遺伝子をラット染色体上にマッピングする。

NIDDMおよび肥満発症に対して、主効果を発揮する原因遺伝子のマッピング位置の比較により、肥満を介することでNIDDM発症に効果を発揮する原因遺伝子を明らかにする。

NIDDM発症に対して主効果を発揮する原因遺伝子の効果と肥満の効果を取り込んだ分散分析を行い、肥満と相互作用することでNIDDM発症に効果を発揮する原因遺伝子を明らかにする。

明らかにされた原因遺伝子におけるQTLのゲノム領域のみがドナーOLETFラットのゲノム由来であり、残りのバックランドゲノムはコントロールとしてのレシピエントF344ラット由来であるコンジェニックラットを、スピードコンジェニック法に従って、OLETFをF344へN5世代まで連続的に戻し交雑し、マーカータイピングによりベスト雄個体を選抜すること、最終的にドナーOLETFゲノム領域をホモ化することにより作製した。

2つのコンジェニックラットを交雑することで、エピスタシス効果がみられた2つのQTLゲノム領域がともにOLETF由来であるダブルコンジェニックラットを作製する。

コンジェニックラットの雄個体を30週齢まで飼育した後、NIDDMおよび肥満表現型のタイピングを行うことで、主効果をもつ原因遺伝子の確認を行う。

ダブルコンジェニックラットの雄個体を30週齢まで飼育した後、NIDDMおよび肥満表現型のタイピングを行うことで、エピスタシス効果をもつ原因遺伝子の確認を行う。

確認されたQTLについてのゲノム領域を、ラットヒト比較染色体地図に基づき、それに相当するヒトゲノムを明らかにする。ヒトゲノムプロジェクトの成果を取り入れることで、当該ゲノム領域に存在しておりかつ機能の点で有望な候補と考えられる遺伝子を明らかにする。

明らかにされた候補と考えられる遺伝子をラット染色体上へRHマッピングし、QTLゲノム領域に位置しているか否かを解析する。

明らかにされた候補と考えられる遺伝子のOLETFおよびF344におけるcDNA配列をPCRダイレクトシーケンス法により決定し、変異の有無を解析する。

明らかにされた候補と考えられる遺伝子のOLETFおよびF344における発現レベルをCompetitive RT-PCR法によ

り、解析する。

上記の機能、マッピング、変異の有無、発現レベルの情報を考え合わせることで、NIDDM原因遺伝子のポジショナルキャンディデートを同定する。

QTLゲノム領域内で組み換えが生じている新規組み換え雄個体を、コンジェニックとF344ラットとの間のバッククロス交雑群およびサブコンジェニックラット系より作製し、30週齢時でのNIDDM表現型および肥満表現型のタイピングを行うことで、QTLゲノム領域の限局を行う。

ラットゲノムプロジェクトの成果を取り入れることで、その限局されたQTLゲノム領域内に位置する遺伝子を明らかにし、機能の点で、および発現レベルの点で、有望な候補と考えられる遺伝子を明らかにする。発現レベル解析については、QTLゲノム領域内に位置する遺伝子を網羅的にマイクロアレイ上に貼り付け、OLETFとF344における発現レベルを解析することにより実行する。

明らかにされた候補と考えられる遺伝子のOLETFおよびF344におけるゲノム配列をPCRダイレクトシーケンス法により決定し、変異の有無を解析する。

上記の機能、発現レベルに加えて、変異の有無の情報を考え合わせることで、NIDDM原因遺伝子のポジショナルキャンディデートを同定する。

QTLゲノム領域内で組み換えが生じているコンジェニックとF344ラットとの間のバッククロス交雑群およびサブコンジェニックラット系からの新規組み換え雄個体を用いることで、NIDDMおよび肥満形質が単純なメンデル遺伝様式に従って分離しており、当該QTLを単一遺伝子変異として取り扱うことができるということを明らかにする。

上記のような、QTLゲノム領域内で組み換えが生じている新規組み換え雄個体を用いた、QTLとポジショナルキャンディデートの変異との共分離解析を行い、ポジショナルキャンディデートが原因遺伝子であるとする可能性を検討する。

F344以外のラット近交系をコントロールとした、ポジショナルキャンディデートでの変異と発現レベル解析により、えられた変異と発現レベルの変化がOLETF特異的であるか否かを確かめることで、ポジショナルキャンディデートが原因遺伝子であるとする可能性を検討する。

OLETF特異的な発現レベルの変化を説明しようと考えられるOLETF特異的多型についての機能解析を行い、ポジショナルキャンディデートの原因遺伝子としての可能性を検討する。そのために、まず最初に、OLETFとF344由来の細胞の初代培養系を用いたrun-onアッセイにより転写活性に差異がみられるか調べる。次に、培養細胞株あるいは初代培養系を用いたレポーターアッセイによる転写活性の解析およびゲルシフトアッセイによる多型領域への転写因子結合能の解析を行う。さらに、OLETFとF344の間のmRNA安定性の差異についても検討する。

〈研究期間の成果〉

OLETFとF344ラットとの間のF2インタークロス交雑群の~200個体を作製し、その雄個体(約30週齢)について、382個のマイクロサテライトマーカーのタイピングを行った。また、空腹時血糖値、OGTTでえられる食後30分後・60分後・90分後・120分後・AUCの血糖値、膵切除後の β 細胞増殖能・血糖値・インスリン値というNIDDM表現型のタイピングを行った。さらに、上記雄個体について、体重ならびに副腎丸脂肪、腸間膜脂肪、後腹膜脂肪、腰部皮下脂肪、筋肉内脂肪の絶対量および

adiposity indexという肥満表現型のタイピングを行った。(8)

382個のマイクロサテライトマーカータイピングデータを利用することで、1,413cMというゲノム長のラットマーカー連鎖地図を作製した。(8)

マーカー連鎖地図とNIDDM表現型のタイピングデータの両方を利用して、MAPMAKER/QTLプログラムによるQTL解析を行ったところ、NIDDM発症に対して、主効果を発揮する11個の原因遺伝子(Nidd1-11/of)がラット1、5、7、8、9、11、12、14、16、17番染色体上にマッピングされた。(8)

マーカー連鎖地図とNIDDM表現型のタイピングデータの両方を利用して、MapQTLプログラムによるQTL解析を行ったところ、Nidd1-11/ofに加えて新たにNIDDM発症に対して主効果を発揮する3個の原因遺伝子(Nidd12-14/of)がラット1、5、7、8、9、11、12、14、16、17番染色体上にマッピングされた。(8)

マーカー連鎖地図とNIDDM表現型のタイピングデータの両方を利用して、エピスタシス解析を行った結果、NIDDM発症に対して、エピスタシス効果を発揮する9個の原因遺伝子がラット1、5、7、13、14、15、17、19番染色体上にマッピングされた。これらの9個のうち、7、14番染色体上に存在している3個のQTLゲノム領域(Nidd1、2、10/of)はエピスタシス効果とともに主効果にも関わっていることが明らかにされた。(2,3)

空腹時血糖値、OGTTにおける食後血糖値、 β 細胞数・機能、インスリン値というパラメータはNIDDM発症に至るまでの異なる分子機構を表現するものと考えられる。マッピングされた計20個の主効果・エピスタシス効果をもつNIDDM QTLゲノム領域のうち、11個は空腹時血糖値に、12個は食後血糖値に、1個は β 細胞数・機能に、そして1個はインスリン値に効果を示し、異なる発症機構に関与する原因遺伝子が存在することが明らかにされた。(2,3,4,8,10)

これらのQTLでは、OLETFアリルが相加的あるいは優性的にNIDDM発症のために機能を発揮するという遺伝様式を示すものに加えて、超優性の遺伝様式でNIDDM発症に影響するものも存在した。(2,3,8,10)

マーカー連鎖地図と肥満表現型のタイピングデータの両方を利用して、MAPMAKER/QTLプログラムおよびMapQTLプログラムによるQTL解析を行ったところ、肥満発症に対して、主効果を発揮する原因遺伝子をラット染色体上にマッピングした。(1)

NIDDMおよび肥満発症に対して、主効果を発揮する原因遺伝子のマッピング位置の比較の結果、2個のQTLゲノム領域(Nidd6、11/of)は肥満を介することでNIDDM発症に効果を発揮することが明らかにされた。(5,6,8)

NIDDM発症に対して主効果を発揮する原因遺伝子の効果と肥満の効果を取り込んだ分散分析を行った結果、6個のQTLゲノム領域(Nidd1、2、8、9、10、12/of)は肥満と相互作用することでNIDDM発症に効果を発揮することが明らかにされた。また、6個のQTLゲノム領域(Nidd3、4、5、7、13、14/of)は肥満との密接な関連性がなく、独立した機構でNIDDM発症に関わっていると考えられた。(8)

14番染色体上に位置するNidd2/ofは、他のQTLと比べ、このQTLによって説明される遺伝分散の割合が大きい点(つまりNIDDM発症に対し大きな効果を持っている点)、主効果を有するとともに3つのQTLとの組み合わせでそれぞれエピスタシス効果を発揮できる点、肥満因子

と相互作用しNIDDM発症に影響を及ぼす点で興味深いものであった。(2,3,8)

スピードコンジュニク法に従って、OLETFをF344へN5世代まで連続的に戻し交雑し、マーカータイピングによりベスト雄個体を選抜すること、最終的にドナーOLETFゲノム領域をホモ化することにより、明らかにされた14個の原因遺伝子(Nidd1-14/of)におけるQTLのゲノム領域のみがドナーOLETFラットのゲノム由来であり、残りのバックグランドゲノムはコントロールとしてのレシピエントF344ラット由来であるコンジュニクラットが作製された。(7,9)

2つのコンジュニクラットを交雑することで、エピスタシス効果がみられたNidd1/ofとNidd2/of、あるいはNidd1/ofとNidd10/ofという2つのQTLゲノム領域がともにOLETF由来であるダブルコンジュニクラットを作製した。

作製されたコンジュニクラットの雄個体を30週齢まで飼育した後、NIDDMおよび肥満表現型のタイピングを行った結果、Nidd1、2、8、10/of QTLおよびNidd6/of QTLにおける4個および1個の原因遺伝子のみがOLETFアレルが劣性様式でNIDDMおよび肥満に影響する主効果をもつと確認された。それ以外の9個のQTLについては、効果が確認されなかった。(7)

作製されたダブルコンジュニクラットの雄個体を30週齢まで飼育した後、NIDDMおよび肥満表現型のタイピングを行った結果、Nidd1/ofとNidd2/of、あるいはNidd1/ofとNidd10/ofとの間にみられたエピスタシス効果は確認されなかった。

確認された5個のQTLについてのゲノム領域を、ラットーヒト比較染色体地図に基づき、それに相当するヒトゲノムを明らかにし、ヒトゲノムプロジェクトの成果を取り入れることで、当該ゲノム領域に存在しておりかつ機能の点で有望な候補と考えられる遺伝子を検討したところ、Hnf4g、Nkx6a、Pnlip、Capn10とNeurod1、CckarがそれぞれNidd1、2、6、8、10/ofの有望な候補になると考えられた。(4,12,14)

明らかにされた6個の候補と考えられる遺伝子をラット染色体上へRHマッピングしたところ、Nkx6a、Pnlip、CckarはそれぞれNidd2、6、10/of QTLゲノム領域に位置していた。しかし、それら以外の3個の遺伝子は当該ゲノム領域にマッピングされなかった。(12)

Nidd10/ofの候補と考えられるCckarについては、遺伝子の欠失が報告されていることから、原因遺伝子になりうると推定された。(4)

Nidd2、6/ofの候補と考えられるNkx6a、Pnlip遺伝子のOLETFおよびF344におけるcDNA配列をPCRダイレクトシーケンス法により決定したが、OLETFにおける変異は検出されなかった。また、Nidd8/ofの候補と考えられるCapn10遺伝子では、protease domainにある195番目のグリシン(F344とLETOラット)がOLETFではセリンになるという変異が検出された。(12)

Nidd6/ofの候補と考えられるPnlip遺伝子のOLETFおよびF344の膵臓における発現レベルをCompetitive RT-PCR法により解析した結果、OLETFにおいて約3倍程度の増加がみられることを明らかにした。一方、Nidd1、2/ofの候補と考えられるHnf4g、Nkx6a遺伝子については、OLETFとF344との間に発現レベルの差は検出されなかった。また、Capn10遺伝子では、心臓、膵臓、肝臓、骨格筋において既知アイソフォームのうちType Aのみが検出され、OLETFとF344との間に発現レベルの差は認められなかった。(4,12)

上記の機能、マッピング、変異の有無、発現レベルの情報を考え合わせることで、Nidd6/ofに相当しており、腸管からの脂肪吸収に関わるPnlip遺伝子はNIDDM原因遺伝子のポジショナルキャンディデートになりうると考えられた。

Nidd6および2/ofのゲノム領域内で組み換えが生じている(コンジュニク×F344)×コンジュニクのバッククロス交雑群からの雄選抜個体12匹およびサブコンジュニク11系統からの雄個体を作製し、30週齢時でのNIDDMおよび肥満表現型のタイピングを行ったところ、Nidd6/ofについては、D1Rat90とD1Rat225の間の2.3cMの領域にQTLゲノム領域が限局された。Nidd2/ofについては、D14Rat1とD14Rat3の間の1.2cMの領域にファインマッピングされた。(14)

ラットゲノムプロジェクトの成果を取り入れることで、その限局されたQTLゲノム領域内に位置する遺伝子を明らかにし、機能の点で有望な候補と考えられる遺伝子を検索した結果、Nidd6/ofについては、腸管からの脂肪吸収に関わるPnlip遺伝子が、Nidd2/ofでは、糖新生に関与しているPgc1遺伝子が、下記の発現レベル解析の結果とも考え合わせると、有望な候補となると考えられた。(14)

Nidd2、6/of QTLゲノム領域内に位置する遺伝子を網羅的にマイクロアレイ上に貼り付け、OLETFとF344の膵臓・肝臓・脂肪組織・筋肉組織における発現レベルを解析したところ、PnlipおよびPgc1は膵および4種類のすべての組織において、F344に比べOLETFで発現レベルが増加していることが明らかにされた。さらに、マクロアレイ解析に加えて、Competitive RT-PCR法でもこれらの結果が確認された。(14)

Nidd2、6/ofの候補と考えられるPgc1、Pnlip遺伝子のOLETFおよびF344におけるゲノム配列をPCRダイレクトシーケンス法により決定した。Pnlipでは、~9.8kbの5'上流隣接領域、~13.1kbのエクソン/イントロン領域および~3.6kbの3'下流隣接領域でのOLETFとF344の間でのシーケンスデータより、多型の解析を行った結果、転写開始点の上流~3.4kbの位置に、F344アレルに比べOLETFアレルにおいてサイズが長いVNTR多型が検出された。Pgc1でもコード領域には変異はみられないものの、イントロン領域に多くのSNP多型が存在していることが明らかにされた。(14)

上記の機能、発現レベルに加えて、変異の有無の情報を考え合わせることで、Pgc1、Pnlip遺伝子はNIDDM原因遺伝子(Nidd2、6/of)のポジショナルキャンディデートになりうると考えられた。(14)

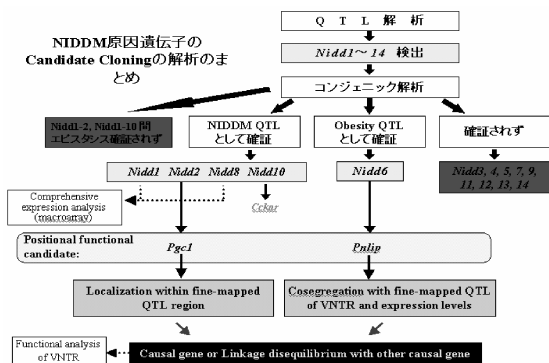
QTLゲノム領域内で組み換えが生じているコンジュニクとF344ラットとの間のバッククロス交雑群およびサブコンジュニクラット系からの新規組み換え雄個体を用いることで、NIDDMおよび肥満形質が単純なメンデル遺伝様式に従って分離しており、当該QTLを単一遺伝子変異として取り扱うことができるということが明らかにされた。

上記のような、QTLゲノム領域内で組み換えが生じている新規組み換え雄個体を用いることで、Nidd2および6/of QTLは、それぞれのポジショナルキャンディデートであるPgc1遺伝子およびPnlip遺伝子のSNP多型およびVNTR多型と共分離していることが明らかにされた。(14)

Nidd6/of QTLで、OLETFとは異なるアレルを有することがQTL解析により判明しているBNとLETOラットについて、Pnlip遺伝子の変異および発現レベル解析を行ったところ、BNとLETOでのVNTR多型はOLETFより短くF344と同じサイズであり、OLETF特異的な変異であるこ

とが、さらに膵臓における発現レベルの増加もOLETF特異的であることが、明らかにされた。

これらの結果より、PnlipおよびPgcl遺伝子がNidd6/ofおよびNidd2/of QTLの原因遺伝子であるかもしれないという状況証拠が得られた。



〈国内外での成果の位置づけ〉

QTLの遺伝子としての同定という点で本研究の成果は先駆的な役割を示すものと考えられる。

Capn10とApm1遺伝子では、本研究でのPgclと同様なイントロン上の変異 (SNP多型) によりその発現レベルが変化し、糖尿病発症につながるらしいことが推測されている。また、Ins1遺伝子では、プロモーター領域に本研究でのPnlipと同様なVNTR多型が存在し、それが骨格筋、脂肪組織および膵臓での発現レベルに影響を及ぼすことで糖尿病発症につながっているらしいとの報告がなされているが、Ⅱ型糖尿病については、いまだこのような例は発見されていないことから、本研究の成果は意義あるものと考えられる。

Nidd2/ofゲノム領域のみでそのヒト相同領域にNIDDM発症関連遺伝子が存在することが報告されている。ヒトNIDDM遺伝子の染色体領域の解明が進展しており、Nidd1、6、8、10/ofゲノム領域でも同様なことがあると考えられることから、本研究の成果は最終的にヒト研究につながるものと考えられる。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

QTLおよびエピスタシス解析で検出されたゲノム領域におけるQTLの主効果およびエピスタシス効果の存在がコンジュニク解析により確認されないケースが多くみられた。QTLおよびエピスタシス解析は、統計学的な確率論に基づくものであるということ、血糖値というend phenotypeではなくimmediate phenotypeの解析、および肥満条件下でのphenotype解析がなされなかったことに起因すると考えられる。

Nidd1、8/ofについては、機能の点で候補と考えられた遺伝子の解析において陽性結果を得ることができなかった。必ずしも機能の点で候補と考えられない予測遺伝子も含めた網羅的な発現レベル解析により、発現レベルの点で候補と考えられる遺伝子の解析が必要になると考えられた。

OLETFでみられる発現レベルの変化を説明しようと考えられる変異の同定に手間取ったために、原因遺伝子同定のための最終的なキープポイントとなる、その変異についての機能を解析することができなかった。

〈今後の課題〉

Pnlip遺伝子のOLETF特異的な発現レベルの増加を説明しようと考えられるVNTR変異についての機能解析を行

い、当該遺伝子の原因遺伝子としての可能性を検討する。そのために、上記のVNTR変異がOLETF特異的な発現レベルの増加の原因となるhypermorph変異であるか否かを検討するために、まず最初に、OLETFとF344の膵臓房細胞の初代培養系を用いたrun-onアッセイにより転写活性に差異がみられるか調べる。次に、266-6、AR4-2J細胞あるいは膵臓房細胞の初代培養系を用いたレポーターアッセイによる転写活性の解析およびゲルシフトアッセイによるVNTR領域への転写因子結合能の解析を行う。さらに、OLETFとF344の間のmRNA安定性の差異についても検討する。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文

1. 0111121737

Ogino, T., Wei, S., Wei, K., Moralejo, D.H., Kose, H., Mizuno, A., Shima, K., Sasaki, Y., Yamada, T., and Matsumoto K., Genetic evidence for obesity loci involved in the regulation of body fat distribution in obese type 2 diabetes rat, OLETF, Genomics, 70, 19-25 (2000) .

2. 0111121741

Narita, A., Miyake, T., Taniguchi, Y., Yamada, T., Matsumoto, K., and Sasaki, Y., Dissociation of epistatic effects involved in fasting and postprandial hyperglycemia, Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol., 107, 79-88 (2000) .

3. 0111121744

Yamada, T., Miyake, T., Sugiura, K., Narita, A., Wei, K., Wei, S., Moralejo, D.H., Ogino, T., Gaillard, C., Sasaki, Y., and Matsumoto, K., Identification of epistatic interactions involved in non-insulin-dependent diabetes mellitus in the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat, Exp. Anim., 50, 115-123 (2001) .

4. 0111121747

Moralejo, D.H., Ogino, T., Kose, H., Yamada, T., and Matsumoto, K., Genetic verification of the role of CCK-AR in pancreatic proliferation and blood glucose and insulin regulation using a congenic rat carrying CCK-AR null allele, Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol., 109, 259-274 (2001) .

5. 0111121750

Umezumi, Y., Tanomura, H., Miyake, T., Taniguchi, Y., Manabe, N., Yamada, T., and Sasaki, Y., Detection of rat model useful for genetic analysis of intramuscular fat accumulation, J. Anim. Genet., 29, 3-10 (2001) .

6. 0111121753

Tanomura, H., Miyake, T., Taniguchi, Y., Manabe, N., Kose, H., Matsumoto, K., Yamada, T., and Sasaki, Y., Detection of a quantitative trait locus for intramuscular fat accumulation using the OLETF rat, J. Vet. Med. Sci., 64, 45-50 (2002) .

7. 0305121640

Kose, H., Moralejo, D.H., Ogino, T., Mizuno, A., Yamada, T., and Matsumoto, K., Examination of OLETF-derived non-insulin-dependent diabetes mellitus QTL by construction of a series of congenic rats, Mamm. Genome, 13, 558-562 (2002) .

8. 0305121655

Yamada, T., Miyake, T., Taniguchi, Y., Muramatsu, Y., Kose, H., Matsumoto, K., and Sasaki, Y., Genetic dissection of non-insulin-dependent diabetes mellitus in the OLETF

- rat, *Animal Frontier Sciences*, 295-302 (2003) .
9. 0403261814
Tanomura, H., Taniguchi, Y., Muramatsu, Y., Kose, H., Miyake, T., Matsumoto, K., Yamada, T., and Sasaki, Y., A congenic strain (F344.OLETF-Imfm) displays the existence of intramuscular fat accumulation QTL on rat chromosome 1, *Exp. Anim.*, 52, 303-308 (2003) .
10. 0403261821
Ogino, T., Moralejo, D.H., Kose, H., Yamada, T., and Matsumoto, K., Serum leptin concentration is linked to chromosome 2 and 6 in the OLETF rat, an animal model of type 2 diabetes with mild obesity, *Mamm. Genome*, 14, 239-244 (2003) .
11. 0403261827
Yamada, T., Taniguchi, Y., Miyake, T., and Sasaki, Y., Aspects and prospects of QTL analysis for marbling gene, *J. Anim. Genet.*, 30, 21-28 (2003) .
12. 0404021328
Muramatsu, Y., Taniguchi, Y., Kose, H., Matsumoto, K., Yamada, T., and Sasaki, Y., *Capn10*, a candidate gene responsible for type 2 diabetes mellitus in the OLETF rat, *IUBMB Life*, 55, 533-537 (2003) .
13. 0501121159
Miyake, T., Yamada, T., and Sasaki, Y., Current and future subjects for QTL analysis methods in livestock, *J. Anim. Genet.*, 32, 43-52 (2004) .
14.
Muramatsu, Y., Yamada, T., Taniguchi, Y., Ogino, T., Kose, H., Matsumoto, K., and Sasaki, Y., *Pnlip* encoding pancreatic lipase is possible candidate for obesity QTL in the OLETF rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 331, 1270-1276 (2005) .