

課題番号	LS100
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実施状況報告書(平成25年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	次世代オミックス研究分野の創造：ヒト tRNA 修飾の解析と2型糖尿病発症リスク
研究機関・ 部局・職名	熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
氏名	富澤 一仁

1. 当該年度の研究目的

本研究は、プロテオミクス、トランスクリプトーム、エピジェネティックに次ぐセントラルドクマを制御する次世代オミックス研究としてヒト tRNA 修飾の網羅的解析とその生理機能、ならびにその異常が原因で疾患を引き起こす分子機構を明らかにすることを全体の目的とする。

この目的を達成するために平成 22 年～24 年度は、以下に示すような研究成果を得た。

1. 2 型糖尿病危険因子 Cdkal1 の機能とアジア型 2 型糖尿病発症機構を解明した。
2. ミトコンドリア tRNA 修飾酵素を同定し、その生理機能を明らかにした。
3. ミトコンドリア脳筋症と関連のある遺伝子 Mto1 の生理機能を明らかにした。
4. tRNA 修飾を簡便・迅速・高感度に検出する技術の開発に成功した。

平成 25 年度は、上記のこれまでの研究成果を踏まえて、以下のことを目的とした研究を実施した。

1. ミトコンドリア tRNA 修飾異常と疾患発症

Cdk5rap1 の発現が様々な癌の予後関与していることが明らかになった。そこで胃がんならびに乳がん患者から採取した組織のミトコンドリア tRNA 修飾について解析を行った。また Cdk5rap1 がどのように癌の予後に関与しているのか、その分子機構の解明を目指した研究を実施した。とくに癌の悪性度と tRNA 修飾の関連性に関する研究を実施した。

2. ミトコンドリア脳筋症の分子メカニズムの解明

Mto1 欠損マウスが胎生致死であったため、Cre/lox システムを用いた Mto1 欠損マウス、並びに Mto1 欠損 ES 細胞を作製し、これら細胞やマウスの表現型解析を実施することにより、ミトコンドリア脳筋症の分子機構の解明に挑んだ。ミトコンドリア脳筋症患者の血液を用いて、ミトコンドリア tRNA 修飾について解析を行った。

3. ヒト血液標本を用いた tRNA 修飾の網羅的解析

24 年度に開発した tRNA 修飾を簡便に検出する技術を用いて、Cdkal1 遺伝子に 2 型糖尿病に関するリスクアレルを保有しているヒトと非リスクアレルを保有しているヒトやミトコンドリア脳筋症患者の血液標本から tRNA 修飾について網羅的な解析を行った。tRNA 修飾が 2 型糖尿病のバイオマーカー、予後予測マーカーもしくは治療薬感受性マーカーになるか検討した。

2. 研究の実施状況

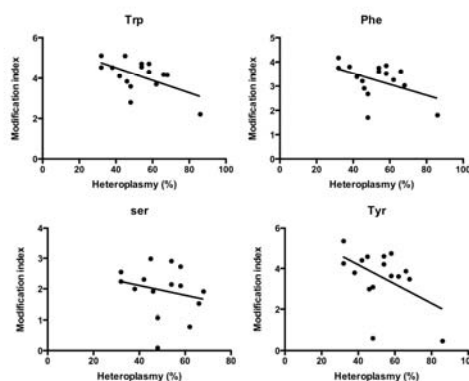
1. ミトコンドリア tRNA 修飾異常と疾患発症

Cdk5rap1 は、我々が新規に同定したミトコンドリア tRNA のチオメチル化修飾酵素である。胃がんならびに乳がん組織のミトコンドリア tRNA のチオメチル化修飾について解析を行った。130名の胃がん患者から採取した癌部ならびに非癌部の tRNA 修飾について比較すると、癌部の tRNA 修飾が有意に低下していた。乳がん患者から採取した組織を用いて同様に修飾解析を行うと、癌部で有意に tRNA 修飾が低下していた。また、様々な悪性度の乳がん組織から樹立した株化細胞を用いて、ミトコンドリア tRNA 修飾を比較した結果、悪性度に伴い tRNA 修飾が低下することが明らかになった。さらに、癌細胞ではミトコンドリア DNA にコードされた 13 のタンパク質翻訳が低下し、その結果、Complex 1 や Complex 5 などの電子伝達系の活性が低下し、ATP 合成量が低下していた。以上の結果から、癌ではミトコンドリア tRNA 修飾が低下することにより、ミトコンドリア DNA にコードされているタンパク質の翻訳時に誤翻訳が生じたり、翻訳が停止したりすることにより、ミトコンドリア機能が低下し、これらの結果癌特有の代謝であるワールブルグ効果が生じることが示唆された。本研究結果より、ミトコンドリア tRNA の修飾が、癌のマーカーや治療標的になることが示唆された。

2. ミトコンドリア脳筋症の分子メカニズムの解明

Mto1 欠損 ES 細胞の作製を行った。この ES 細胞のミトコンドリア tRNA のタウリン修飾について解析したところ、同修飾が完全に欠失していた。このことからミトコンドリア病に関連しているミトコンドリア tRNA のタウリン修飾酵素が Mto1 であることが明らかになった。また Cre/lox の系を用いて生後に Mto1 を欠失したマウスの作製を行った。このマウスでは、心筋および骨格筋においてミトコンドリアの増殖と肥大が認められた。またこれら組織において Complex 活性や ATP 産生量が低下しており、ミトコンドリア機能が低下していた。さらにこのマウスの大動脈を結紮し、心肥大モデルを作製した、すると、コントロールマウスと比較して顕著な左室肥大、心収縮力低下が認められた。またこのマウスに強制運動させると、コントロールマウスと比較して運動量ならびに骨格筋運動能力が有意に劣っていることが明らかになった。これらのことから、ミトコンドリア脳筋症の原因がミトコンドリア tRNA のタウリン修飾欠失であることを解明した。

図1 ミトコンドリア病患者血清におけるミトコンドリアtRNAのチオメチル化修飾解析



3. ヒト血液標本を用いた tRNA 修飾の網羅的解析

Cdkal1 遺伝子に 2 型糖尿病に関するリスクアレルを保有しているヒトと非リスクアレルを保有しているヒトの血清を用いて tRNA のチオメチル化修飾について比較検討した。リスクアレル保有者では、チオメチル化修飾が非リスクアレル保有者と比較して有意に低下していた。さらにミトコンドリア脳筋症患者の血液標本からミトコンドリア tRNA のチオメチル化修飾について解析を行った。

ミトコンドリア遺伝子の変異率とミトコンドリア tRNA のチオメチル化修飾には、逆相関があることが明らかになった (図 1) 以上の結果から、tRNA 修飾が 2 型糖尿病やミトコンドリア脳筋症のバイオマーカーや予後予測マーカーならびに治療薬感受性マーカーになることが明らかになった。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 11 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 9 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Yoshizawa, T., Karim, M.F., Sato, Y., Senokuchi, T., Miyata, K., Fukuda, T., Go, C., Tasaki, M., Uchimura, K., Kadomatsu, T., Tian, Z., Smolka, C., Sawa, T., Takeya, M., <u>Tomizawa, K.</u>, Ando, Y., Araki, E., Akaike, T., Braun, T., Oike, Y., Bober, E., and Yamagata, K. SIRT7 controls hepatic lipid metabolism by regulating the ubiquitin-proteasome pathway. Cell Metab. 19, 712-721, 2014. 2. Hakim, F., Kaitsuka, T., Raeed, J.M., Wei, F.-Y., Shiraki, N., Akagi, T., T., Kume, S., and <u>Tomizawa, K.</u> High oxygen condition facilitates the differentiation of mouse and human pluripotent stem cells into pancreatic progenitors and insulin-producing cells. J. Biol. Chem. 289, 9623-9638, 2014. 3. Michiue, H., Sakurai, Y., Kondo, N., Kitamatsu, M., Bin, F., Nakajima, K., Hirota, Y., Kawabata, S., Nishiki, T.-I., Ohmori, I., <u>Tomizawa, K.</u>, Miyatake, S.-I., Ono, K., and Matsui, H. The acceleration of boron neutron capture therapy using multi-linked mercaptoundecahydrododecaborate (BSH) fused cell-penetrating peptide. Biomaterials 35, 3396-3405, 2014. 4. Kaitsuka, T., Noguchi, H., Shiraki, N., Kubo, T., Wei, F.-Y., Hakim, F., Kume, S., and <u>Tomizawa, K.</u> Generation of functional insulin-producing cells from mouse ES cells through 804G cells-derived extracellular matrix and protein transduction of transcription factors. Stem Cells Transl. Med. 3, 114-127, 2014. 5. Xie, P., Wei, H.-Y., Hirata, S., Kaitsuka, T., Suzuki, T., Suzuki, T., and <u>Tomizawa, K.</u> Quantitative PCR measurement of tRNA 2-methylthio modification for assessing type 2 diabetes risk. Clin. Chem. 59, 51-59, 2013. 6. Fujimura, A., Michiue, H., Cheng, Y., Uneda, A., Tani, Y., Nishiki, T.-I., Ichikawa, T., Wei, F.-Y., <u>Tomizawa, K.</u>, and Matsui, H. Cyclin G2 promotes hypoxia-driven local invasion of glioblastoma by orchestrating cytoskeletal dynamics. Neoplasia 15, 1272-1281, 2013. 7. Han, X.-J., Sun, L.-F., Nishiyama, Y., Feng, B., Michiue, H., Seno, M., Matsui, H., <u>Tomizawa, K.</u> Theranostic protein targeting ErbB2 for bioluminescence imaging and therapy for cancer. PLoS One 8, e75288, 2013. 8. Karim, M.F., Yoshizawa, T., Sato, Y., Sawa, T., <u>Tomizawa, K.</u>, Akaike, T., Yamagata, K. Inhibition of H3K18 deacetylation of Sirt7 by Mub-binding protein 1a (Mybbp1a). Biochem. Biophys. Res. Commun. 441, 157-163, 2013 9. Watanabe, S., Wei, F.-Y., and <u>Tomizawa, K.</u> Functional characterization of Cdkal1, a risk factor of type 2 diabetes, and the translational opportunities. Drug Discov. Today, 10, 65-68, 2013. <p>(掲載済み一査読無し) 計 0 件</p> <p>(未掲載) 計 2 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Gotanda, Y., Wei, F.-Y., Harada, H., Ohta, K., Nakamura, K., <u>Tomizawa, K.</u>, Ushijima, K. Efficient transduction of eleven poly-arginine peptide in an ischemic lesion of mouse brain. J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 2014, in press. 2. Zhou, B, Wei, F.Y., Kanai, N., Fujimura, A., Kaitsuka, T., and <u>Tomizawa, K.</u> Identification of a splicing variant that regulates type 2 diabetes risk factor CDKAL1 level by a coding-independent mechanism in human. Hum. Mol. Genet. 2014, in press.
<p>会議発表 計 7 件</p>	<p>専門家向け 計 6 件 【招待講演・シンポジウム講演】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 富澤一仁. 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会、「糖尿病関連遺伝子 Cdkal1 の機能と糖尿病発症機構」、平成 25 年 5 月 17 日、熊本。 2. Kazuhito Tomizawa. Joint Academic Conference、「Molecular Mechanism on Asian type diabetes」、平成 25 年 8 月 28 日、Bangkok (タイ)。 3. 富澤一仁. 第 59 回日本臨床検査医学会 九州地方会、「tRNA 修飾の生理的意義と同修飾の簡易診断法—検査医学への応用—」、平成 26 年 3 月 15 日、熊本。

様式19 別紙1

	<p>【一般講演】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 永芳友、魏 范研、貝塚 拓、富澤一仁. 第15回ブレインサイエンス研究会、「X染色体連鎖性精神遅滞の分子機構解明に関する研究」、平成25年6月2日、博多。 2. Yutaka Ueda, Fan-Yan Wei, Taku-ichiro Hide, Hiroyuki Michiue, Kentaro Takayama, Taku Kaitsuka, Hideo Nakamura, Keishi Makino, Jun-ichi Kuratsu, Shiroh Futaki, and Kazuhito Tomizawa. 第20回日本遺伝子治療学会、「Cell-penetrating D-isomer peptides consisting of Pas and the p53 C-terminus induce autophagic cell death of glioma-initiating cells」、平成25年7月5日、岡山。 3. Farzana Hakim, Taku Kaitsuka, Kazuhito Tomizawa. The 7th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences、「High oxygen condition facilitates the differentiation of mouse and human pluripotent stem cells into pancreatic progenitors and insulin-producing cells」、平成26年1月17日、Osaka。 <p>一般向け 計1件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 富澤一仁. 「アジア型2型糖尿病と治療」、平成25年11月16日、玉名市文化センター(熊本)。
<p>図書</p> <p>計0件</p>	
<p>産業財産権 出願・取得状況</p> <p>計2件</p>	<p>(取得済み) 計0件</p> <p>(出願中) 計2件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. PCT/JP2014/055758、出願日:平成26年3月6日 発明の名称:RNA修飾の簡易検出法、及び該検出法を用いた2型糖尿病の検査方法 出願人:熊本大学、発明者:富澤一仁、魏 范研、鈴木健夫、鈴木 勉 2. PCT/JP2014/001853、出願日:平成26年3月28日 発明の名称:2型糖尿病治療剤 出願人:熊本大学、一般社団法人ファルマバレープロジェクト支援機構 発明者:富澤一仁、魏 范研、井上謙吾、大川原 正
<p>Webページ (URL)</p>	<p>研究成果ならびに国民との対話で実施した内容については、すべて独自HPに掲載している。 (http://kumamoto-saisentan.org/)</p>
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 熊本大学高大連携事業の一つであるスーパーサイエンスハイスクール事業の一環として、熊本第二高校ならびに熊本北高校の10名の生徒を対象に、「糖尿病とiPS細胞を用いた今後の糖尿病治療法」と題し、講演ならびに実習を行った。日時:平成25年12月14日、(熊本大学医学部基礎研究棟6階)熊本、参加者11名。 2. 熊本大学高大連携事業の一環として、熊本県立玉名高校45名の生徒を対象に、「アジア型2型糖尿病と治療」と題し、講演ならびに実習を行った。日時:平成25年11月16日、(玉名市文化センター)熊本、参加者45名。 3. 熊本県内の中学生ならびに高校生を対象に、熊本大学において本プロジェクトの紹介と研究の見学案内を実施した。平成25年8月7日、(熊本大学本荘キャンパス内)熊本、参加者約30名。 4. 本研究に関するホームページを開設し、国民から本研究あるいは2型糖尿病に関する質問などを受け付け、その質問などに回答した。
<p>新聞・一般雑誌等掲載</p> <p>計0件</p>	
<p>その他</p>	

4. その他特記事項

無し。

実施状況報告書(平成25年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されず

1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	123,000,000	90,800,000	32,200,000	0	
間接経費	36,900,000	27,240,000	9,660,000	0	
合計	159,900,000	118,040,000	41,860,000	0	0

2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	0	32,200,000	0	32,200,000	32,200,000	0	
間接経費	0	9,660,000	0	9,660,000	9,660,000	0	
合計	0	41,860,000	0	41,860,000	41,860,000	0	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	19,369,472	遺伝子解析用試薬、蛋白発現解析試薬、細胞培養用 消耗品
旅費	1,036,960	共同研究実施のため岡山大学出張、研究成果発表旅 費
謝金・人件費等	6,978,947	研究補助員2名、大学院生RA費
その他	4,814,621	動物飼育料、学会参加費、論文別刷料
直接経費計	32,200,000	
間接経費計	9,660,000	
合計	41,860,000	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
EDI付き超純水装 置(アリウム)	ザルトリウス・H2 O-II-2-T	1	1,344,000	1,344,000	2013/9/9	熊本大学
				0		
				0		