

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23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

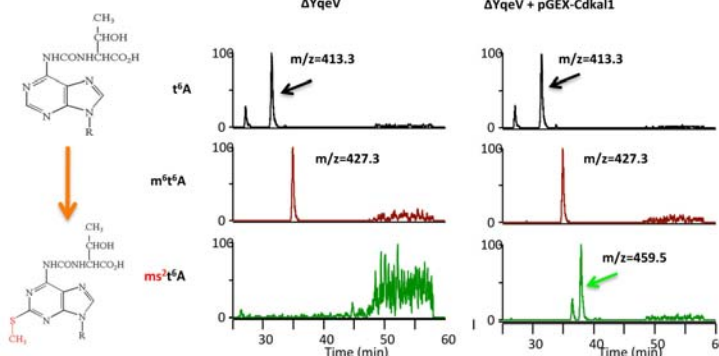
1. 当該年度の研究目的

<p>① マウス tRNA 化学修飾酵素の同定・・・マウスの tRNA を化学修飾する酵素を同定することを目的として、今年度はマウス肝臓の tRNA の化学修飾について網羅的に解析を行う。とくに今年度は tRNA の 37 番目のヌクレオチド修飾を同定することを目標とする。</p> <p>② 膵β細胞特異的 Cdkal1 欠損マウスにおける tRNA 修飾解析・・・平成22年度からの継続研究。Cdkal1 の tRNA 修飾機能を明らかにすることを目的とする。</p> <p>③ Cdkal1 欠損マウスの耐糖能、インスリン合成・分泌能検査・・・Cdkal1 がインスリン合成・分泌機構ならびに血糖値調節機構に関与しているかを明らかにすることを目的とする。当該年度は、Cdkal1 欠損マウスの耐糖能、インスリン合成ならびに分泌能を明らかにすることを目的とする。</p> <p>④ Cdk5RAP1 欠損マウス作製・・・新規 tRNA として同定した Cdk5RAP1 の生理機能を明らかにすることを目的として、同遺伝子欠損マウスを作製する。H23 年度は、Cre-loxP システムで臓器特異的に Cdk5rap1 を欠損できるマウス作製のためにエクソン 2~4 に loxP 配列を挿入したトランスジェニックマウスの作製、ならびに同マウスとβアクチンプロモーター下に Cre を発現するトランスジェニックマウスを交配し、全身で Cdk5rap1 を欠損したマウスの作製が終了していることを目標とする。</p> <p>⑤ Mto1 欠損マウス作製・・・ミトコンドリア脳筋症の分子機構解明を目的として、tRNA のタウリン修飾酵素である Mto1 遺伝子の機能解析を行う。当該年度は、Mto1 欠損マウスの F1 マウス作製が終了していることを目標とする。</p>
--

2. 研究の実施状況

<p>① マウス tRNA 化学修飾酵素の同定・・・マウス肝臓から tRNA を精製し、核酸分解酵素でヌクレオチドに分解後、質量分析解析を行った。その結果、ms²t⁶ならびに ms²i⁶ 修飾を受けているアデニンを同定することができた。</p> <p>② 膵β細胞特異的 CDKAL1 欠損マウスにおける tRNA 修飾解析・・・Cdkal1 は枯草菌が発現している MiaB ならびに YqeV と相同性が高い。そこで、Cdkal1 が、MiaB タイプの修飾酵素か、あるいは YqeV タイプの修飾酵素か枯草菌を用いて検討した。枯草菌の MiaB および YqeV 欠損株に、ヒト Cdkal1 遺伝子を形質転換した。その後 tRNA を精製し、質量分析法にてチオメチル化修飾の有無について解析し</p>
--

た。MiaB 欠損株に Cdkal1 遺伝子を形質転換しても、tRNA のチオメチル化修飾は認められなかった。一方、YqeV 欠損株では、Cdkal1 遺伝子を形質転換することにより、tRNA にチオメチル化修飾が付加された(右上図)。以上の結果より、Cdkal1 はリジンに対応する tRNA の 37 番目のスレオニノカルボニル化アデニンをさらにチオメチル化する酵素であることが明らかになった。



③ Cdkal1 欠損(KO)マウスの耐糖能、インスリン合成・分泌能検査・・・KO マウス

の耐糖能を調べるために、ブドウ糖負荷試験を行った。生後 5, 10 ならびに 15 週齢の KO およびコントロールマウスを 7 時間絶食させた。その後、1g/kg のブドウ糖を腹腔内に投与し、投与後の血糖値の経時的変化について両群で比較検討した。すべての週齢において、糖負荷前の血糖値は両群で有意差は認められなかったが、ぶどう糖負荷後 KO マウスの血糖値がコントロールマウスより高かった。さらにぶどう糖負荷後の血清インスリン濃度について両群で比較検討した。ぶどう糖負荷 15 分後において、KO マウスの血清インスリン濃度がコントロールマウスより有意に少なかった。

次に高脂肪食負荷が KO マウスのインスリン抵抗性に及ぼす影響について検討した。KO ならびにコントロールマウスに 7 週間高脂肪食あるいは低脂肪食を自由摂食させ、その後インスリン抵抗試験を実施した。いずれの群もインスリン(1U/kg)投与後の血糖値に有意な差は認められなかった。すなわち、Cdkal1 はインスリン抵抗性に関与していないことが示唆された。さらに Cdkal1 欠損マウスについて高脂肪食負荷のぶどう糖応答性インスリン分泌に及ぼす影響について検討した。KO ならびにコントロールマウスを 7 週間高脂肪食負荷後、7 時間絶食させた。その後、1g/kg ぶどう糖を腹腔内に投与し、投与 15 分、20 分後の血清インスリン濃度について ELISA 法にて調査した。KO マウスのぶどう糖負荷 15 分後の血清インスリン濃度が、コントロールマウスと比較して少なかった。

さらに、KO マウスにおいて高脂肪食負荷が膵β細胞の小胞体ストレスに及ぼす影響について検討した。KO ならびにコントロールマウスに高脂肪食を 8 週間自由摂食させた後、膵島を摘出し、小胞体ストレスマーカー遺伝子の発現について定量 RT-PCR 法にて比較検討した。その結果、KO マウスにおいてすべてのマーカー遺伝子の発現がコントロールマウスと比較して、有意に上昇していた。

④ Cdk5RAP1 欠損マウス作製・・・全身の細胞で Cdk5rap1 が欠損したマウスの作製に成功した。Cdk5RAP1 欠損マウスと野生型マウスで体重、発育、毛並みなどを比較検討したが、差は認められなかった。また、同遺伝子欠損マウスで、異常行動は認めなかった。以上の結果より、Cdk5RAP1 の欠損は、発育に影響を及ぼさないことが明らかになった。

⑤ Mto1 欠損マウス作製・・・Mto1 欠損(null)マウスを作製するために、キメラマウスを作製し、そのマウスを用いて F1 マウスの作製に成功した。その後ヘテロマウスを作製し、ヘテロマウス同士を交配させ null マウスの作製を試みた。しかし、野生型マウスとヘテロマウスを産まれるが、null マウスは生まれてこなかった。そこで E10 で子宮を取り出し胎児を観察したところ、null マウスは、血管系の発育不全が認められた。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計3件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計3件 1. Fan-Yan Wei, and Kazuhito Tomizawa. Development of type 2 diabetes caused by a deficiency of a tRNALys modification. Islets 4, 71-73, 2012. 2. Fan-Yan Wei, and Kazuhito Tomizawa. Functional loss of Cdkal1, a novel tRNA modification enzyme, causes the development of type 2 diabetes. Endocrine Journal 58, 819-825, 2011. 3. Fan-Yan Wei, Takeo Suzuki, Sayaka Watanabe, Satoshi Kimura, Taku Kaitsuka, Atsushi Fujimura, Hideki Matsui, Mohamed Atta, Hiroyuki Michiue, Marc Fontecave, Kazuya Yamagata, Tsutomu Suzuki, and Kazuhito Tomizawa. Deficit of tRNALys modification by Cdkal1 causes the development of type 2 diabetes in mice. Journal of Clinical Investigation 121, 3598-3608, 2011. (掲載済み一査読無し) 計0件 (未掲載) 計0件</p>
<p>会議発表 計12件</p>	<p>専門家向け 計 11 件 【招待講演・シンポジウム講演】 1. 富澤一仁、第 573 回生医研セミナー・グローバル COD 理医連携セミナー、「tRNA 修飾異常と疾患:アジア人種型 2 型糖尿病原因遺伝子とその分子機構」、平成 23 年 4 月 12 日、福岡。 2. 富澤一仁、岡山大学第 8 回 ART セミナー、「アジア人種型 2 型糖尿病発症の分子機構」、平成 23 年 8 月 31 日、岡山。 3. 富澤一仁、第 2 回医学研究科合同リサーチカンファレンス、「アジア人種型 2 型糖尿病発症の分子機構」平成 23 年 9 月 28 日、那覇。 4. 富澤一仁、第 17 回 MPO 研究会、「リジンに対応する tRNA の修飾欠損による 2 型糖尿病発症機構」、平成 23 年 10 月 28 日、熊本。 5. 富澤一仁、第 8 回宮崎サイエンスキャンプ、「2 型糖尿病危険因子 Cdkal1 の生理機能」、平成 24 年 2 月 17 日、宮崎。 6. 富澤一仁、第 16 回東京インスリン分泌研究会、「tRNA 修飾欠損と 2 型糖尿病」、平成 24 年 2 月 23 日、東京。 【一般講演】 1. 魏 范研、富澤一仁、第 62 回西日本生理学会大会、「Cdkal1 機能欠損による 2 型糖尿病発症機序の解明」平成 23 年 10 月 14 日、佐賀。*日本生理学会九州奨励賞受賞 2. Bou Zhou, Fan-Yan Wei, Taku Kaitsuka, Kazuhito Tomizawa、第 62 回西日本生理学会、「Chemical modifications of mitochondrial tRNA by Cdkr5ap1 regulates mitochondrial functions through the enhancement of precise protein synthesis」、平成 23 年 10 月 14 日、佐賀。 3. 魏 范研、渡部沙耶加、鈴木健夫、貝塚拓、山縣和也、鈴木勉、富澤一仁、第 23 回分子糖尿病学シンポジウム、「2 型糖尿病危険因子 Cdkal1 の生理機能解析」、平成 23 年 11 月 26 日、熊本。*若手研究奨励賞受賞 4. 周 波、魏 范研、貝塚 拓、富澤一仁、第 89 回日本生理学会大会、「新規 tRNA 修飾酵素 Cdk5rap1 によるミトコンドリア機能制御機構」、平成 24 年 3 月 31 日、松本。 5. Fan-Yan Wei, Sayaka Watanabe, Takeo Suzuki, Taku Kaitsuka, Kazuya Yamagata, Tsutomu Suzuki, Kazuhito Tomizawa、第 89 回日本生理学会大会、「Functional characterization of Cdkal1, a novel type 2 diabetes risk gene」平成 24 年 3 月 31 日、松本。 一般向け 計 1 件 1. 富澤一仁、熊本大学 最先端・次世代研究開発プログラムキックオフシンポジウム—生活習慣病とその再生医療の最先端・次世代研究—、「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」、平成 23 年 6 月 30 日、熊本 *自ら一般の人向けの会議を主催し、発表した。</p>
<p>図書 計0件</p>	

様式19 別紙1

産業財産権 出願・取得状 況 計0件	(取得済み) 計0件 (出願中) 計0件
Webページ (URL)	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/)
国民との科 学・技術対話 の実施状況	<ol style="list-style-type: none"> 1. 熊本大学教育学部附属中学校において中学生ならびに一般の方を対象に、「医学部ではどんな研究をしているの?①—糖尿病とその研究—」と題し、講演ならびに実習を行った。日時:平成 23 年 9 月 22 日、熊本市、参加者 36 名。 2. 一般の人を対象に、熊本大学において今後最先端・次世代研究開発支援プログラム研究でどのような研究を実施するか紹介するためのシンポジウム(熊本大学 最先端・次世代研究開発プログラムキックオフシンポジウム—生活習慣病とその再生医療の最先端・次世代研究—)を開催した。平成 23 年 6 月 30 日、熊本、参加者約 200 名。 3. 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。
新聞・一般雑 誌等掲載 計6件	<ol style="list-style-type: none"> 1. 朝日新聞朝刊、平成 23 年 8 月 26 日、1 頁、「やせ形糖尿病発症の仕組み解明」 2. 毎日新聞朝刊、平成 23 年 8 月 16 日、1 頁、「遺伝子欠如で糖尿病リスク」 3. 西日本新聞朝刊、平成 23 年 8 月 16 日、1 頁、「糖尿病発症の仕組みを解明」 4. 熊本日日新聞朝刊、平成 23 年 8 月 16 日、1 頁、「2 型糖尿病患者の特有の遺伝子変異」 5. 朝日新聞朝刊、平成 23 年 8 月 29 日、1 頁、「やせ形糖尿病 新薬に光」 6. 日経産業新聞朝刊、平成 23 年 12 月 8 日、1 頁、「糖尿病モデルマウス アジア人に多い症状再現」
その他	<ol style="list-style-type: none"> 1. 7. NHK 熊本、イブニングニュース(クマロク)、「日本人タイプの 2 型糖尿病野メカニズム発見」、平成 23 年 8 月 16 日(午後 6 時 21 分～放映)

4. その他特記事項

特記事項無し。

実施状況報告書(平成23年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されます

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	50,200,000	0	72,800,000	0
間接経費	36,900,000	15,060,000	0	21,840,000	0
合計	159,900,000	65,260,000	0	94,640,000	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	50,007,535	0	0	50,007,535	50,007,535	0	0
間接経費	15,060,000	0	0	15,060,000	15,000,000	60,000	0
合計	65,067,535	0	0	65,067,535	65,007,535	60,000	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	30,112,743	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	655,760	共同研究実施のため岡山大学、東京大学出張費
謝金・人件費等	6,792,085	研究補助員2名、大学院生RA費
その他	12,446,947	遺伝子改変マウス作製費
直接経費計	50,007,535	
間接経費計	15,000,000	
合計	65,007,535	

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
Odyssey Infrared Imaging System	米国LI-COR社 9120	1	4,987,500	4,987,500	2011/5/10	熊本大学
倒立型顕微鏡イメージングシステム	オリンパス社製 IX81-IMAGE	1	12,600,000	12,600,000	2011/8/31	熊本大学
マルチガスインキュベーターウォーター	アステック社製 APM-30DR	1	705,075	705,075	2011/7/28	熊本大学