

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24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><b>1. Cdkal1 遺伝子に一塩基多型を有するヒトにおける高い2型糖尿病の発症リスクの分子機構の解明・・・</b> 我々は平成23年度までの研究により、Cdkal1の機能不全が2型糖尿病を引き起こすことを明らかにした。しかし、2型糖尿病の発症と相関のあるCdkal1の一塩基多型(SNPs)は、同遺伝子のイントロンに存在し、Cdkal1の機能は保たれていると推測される。そこで、なぜCdkal1のSNPsは2型糖尿病を発症しやすくなるのかその分子機構を明らかにする。とくにCdkal1遺伝子にリスク変異のある健常人ボランティアと変異の無い健常人ボランティアの間で、Cdkal1発現量やtRNA修飾に違いがあるか臨床研究を実施する。</p> <p><b>2. Cdk5rap1の生理機能の解明・・・</b>Cdk5rap1は、その一次構造からtRNA修飾酵素であると推測されるが、その生理機能は不明である。そこで前年度に作製したCdk5rap1欠損マウスの表現型を解析することにより、Cdk5rap1の生理機能を明らかにする。とくにCdk5rap1はミトコンドリア局在蛋白質であるため、ミトコンドリアtRNA修飾、ミトコンドリア機能に着目し研究を実施する。</p> <p><b>3. ミトコンドリア脳筋症の分子メカニズムの解明・・・</b>ミトコンドリア脳筋症は、ミトコンドリアDNAの変異により起こる疾患であるが、その分子機構は不明である。我々は、ミトコンドリア脳筋症患者では、ミトコンドリアDNAの変異によりミトコンドリアtRNAのタウリン修飾が欠損していることを見出した。またその修飾酵素としてMto1を同定した。当該年度は、昨年度作製したMto1欠損マウスの表現型を解析することにより、Mto1によるtRNA修飾欠損がミトコンドリア病の分子メカニズムに関与していることを明らかにすることを目的として研究を実施する。</p>
--

**2. 研究の実施状況**

<p><b>1. Cdkal1 遺伝子に一塩基多型を有するヒトにおける高い2型糖尿病の発症リスクの分子機構の解明</b> 100名の健常人ボランティアについてCdkal1遺伝子のアレル解析を行った。そして、ホモ接合危険型アレル保有者、ヘテロ接合アレル保有者ならびにホモ接合非危険アレル保有者に分類した。3群間で全長Cdkal1遺伝子の発現について比較検討したが、差は認められなかった。 Cdkal1遺伝子にバリエーションフォームが存在することを突きとめ、その全長をクローニングした。このバリエーションフォームの発現について、ホモ接合危険型アレル保有者、ヘテロ接合アレル保有者ならびにホモ接合非危険アレル保有者間で比較検討した。すると、ホモ接合危険型アレル</p>
---

保有者では、その発現が有意に低下していた。バリエントフォームの発現が多いヒトと少ないヒトで、グルコース応答性インスリン分泌について比較した。バリエントフォームの発現が多いヒトでは、インスリン分泌が多かった。Cdkal1 バリエントフォームの発現とインスリン分泌が関連することが明らかになった。

ホモ接合危険型アレルならびに非危険アレルのヒト線維芽細胞間で、Cdkal1 タンパク質量について比較したところ、ホモ接合危険型アレルを保有する線維芽細胞では、Cdkal1 タンパク質量が低下していた。さらにその分子機構も明らかにすることができた。全長 Cdkal1 ならびに同バリエントフォームともマイクロ RNA の 1 種 miRNA494 でタンパク質量が抑制されており、バリエントフォームが多く発現していると、デコイ的な働きにより、Cdkal1 タンパク質量が増加することが明らかになった。

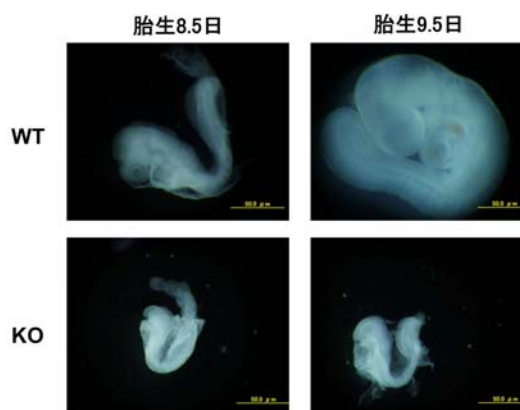
## 2. Cdk5rap1 の生理機能の解明

Cdk5rap1 欠損マウスは、特に発育異常は認めなかった。同マウスの脳、肝臓、および心臓からミトコンドリア tRNA を単離し、同 tRNA のチオメチル化修飾について質量分析で解析した。その結果、tRNA<sup>Phe</sup>、tRNA<sup>Ser</sup>、tRNA<sup>Tyr</sup>、tRNA<sup>Trp</sup> の 37 番のアデニンのチオメチル化修飾が欠失していることが判明した。すなわち、Cdk5rap1 がこれら tRNA を特異的にチオメチル化する酵素であることが明らかになった。

Cdk5rap1 欠損マウスは、野生型マウスと比較して酸素消費量が減少し、二酸化炭素排出量が増加していた。すなわち好気呼吸が減少し、嫌気呼吸が促進していることが示唆された。また同欠損マウスでは、電子伝達系機能ならびに ATP 合成量が減少していた。これらのことから、Cdk5rap1 の機能が欠損するとミトコンドリア機能が低下することが明らかになった。さらに同欠損マウスは、洞不全症候群様の不整脈を呈することが明らかになった。

## 3. ミトコンドリア脳筋症の分子メカニズムの解明

昨年度同定したミトコンドリア tRNA のタウリン修飾酵素である MT01 は、マウスのすべての組織に発現しているが、筋肉、脳及び心臓に特に多く分布していた。また、MT01 は細胞内においてミトコンドリアに局在していた。MT01 遺伝子をノックダウンすると、複合体 I などミトコンドリア上に存在する好氣的呼吸に関わる酵素群の活性が障害され、ミトコンドリアの膜電位が低下した。MT01 KO マウスを作製するため、MT01 のヘテロマウス同士を交配させたところ、MT01 KO マウスは誕生せず、胎生致死であることが判明した。また、胎生致死の時期を検討したところ、MT01 KO マウスは胎生 7.5 日で死亡することが明らかになった。MT01 KO マウス胎児は、野生型マウスと比較して大きさが小さく、心臓の形成に障害があった（上図参照）。MT01 が心血管形成に重要な役割を担っていることが明らかになった。



3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 8 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 7 件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Wei, F.Y., and Tomizawa, K. Development of type 2 diabetes caused by a deficiency of a tRNA<sup>lys</sup> modification. <b>Islets</b> 4, 71-73, 2012.</li> <li>Yamada, H., Abe, T., Satoh, A., Okazaki, N., Tago, S., Kabayashi, K., Yoshida, Y., Oda, Y., Watanabe, M., Tomizawa, K., Matsui, H., and Takei, K. Stabilization of actin bundles by a Dynamin 1 / Cortactin ring complex is necessary for growth cone filopodia. <b>J. Neurosci.</b>, 33, 4514-4526, 2013.</li> <li>Ueda, Y., Wei, F.-Y., Hide, T., Michiue, H., Takayama K., Kaitsuka, T., Nakamura, H., Makino, K., Kuratsu, J., Futaki, S., and Tomizawa, K. Induction of autophagic cell death of glioma-initiating cells by cell-penetrating D-isomer peptides consisting of Pas and the p53 C-terminus. <b>Biomaterials</b> 33, 9061-9069, 2012.</li> <li>Candan, G., Michiue, H., Ishikawa, S., Fujimura, A., Hayashi, K., Uneda, A., Mori, A., Ohmori, I., Nishiki, T., Matsui, H., and Tomizawa, K. Combining poly-arginine with the hydrophobic counter-anion 4-(1-pyrenyl)-butyric acid for protein transduction in transdermal delivery. <b>Biomaterials</b> 33, 6468-6475, 2012.</li> <li>Sato, Y., Hatta, M., Karim, M.F., Sawa, T., Wei, F.Y., Sato, S., Magnuson, M.A., Gonzalez, F.J., Tomizawa, K., Akaike, T., Yoshizawa, T., and Yamagata, K. Anks4b, a novel target of HNF4α interacts with GRP78 and regulates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in pancreatic β-cells. <b>J. Biol. Chem.</b> 287, 23236-23245, 2012.</li> <li>Hitsuda, T., Michiue, H., Kitamatsu, M., Wang, F. Fujimura, A., Yamamoto, T., Han, X.-J., Tazawa, H., Uneda, A., Ohmori, I., Nishiki, T., Tomizawa, K., and Matsui, H. A protein transduction method using oligo-arginine (3R) for the delivery of transcription factors in to cell nuclei. <b>Biomaterials</b> 33, 4665-4672, 2012.</li> <li>Okimoto, N., Oliver, J.B., Slattery, D.A., Pflaum K., Matsushita, H., Wei, F.-Y., Ohmori, M., Nishiki, T., Ohmori, I., Hiramatsu, Y., Matsui, H., Neumann, I.D., and Tomizawa, K. RGS2 mediates the anxiolytic effect of oxytocin. <b>Brain Res.</b> 1453, 26-33, 2012.</li> </ol> <p>(掲載済み一査読無し) 計 0 件</p> <p>(未掲載) 計 1 件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Watanabe, S., Wei, F.-Y., and Tomizawa, K. Functional characterization of Cdkal1, a risk factor of type 2 diabetes, and the translational opportunities. <b>Drug Discov. Today</b>, 2013, in press.</li> </ol>
<p>会議発表 計 8 件</p>	<p>専門家向け 計 8 件</p> <p>【シンポジウム開催】</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>富澤一仁、松下正之. 第 90 回日本生理学会大会、「From translation to molecular chaperon -Physiological function and pathology-」、平成 25 年 3 月 28 日、東京。</li> </ol> <p>【招待講演・シンポジウム講演】</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>富澤一仁. 関東ハートセミナー、「tRNA 修飾異常と疾患」、平成 24 年 9 月 28 日、東京。</li> <li>富澤一仁. 産業医科大学大学院セミナー、「アジア人種型 2 型糖尿病発症の分子機構 (tRNA 修飾異常と疾患)」、平成 24 年 11 月 22 日、北九州。</li> <li>富澤一仁. Cardiovascular Diabetology Conference 第 10 回学術集会、「tRNA 修飾異常と代謝・循環器疾患」、平成 25 年 3 月 2 日、東京。</li> <li>Kazuhiro Tomizawa. International Academic Seminar in Nanchang University, 「Molecular mechanism on type-2 diabetes in Asian populations」、平成 25 年 3 月 20 日、Nanchang (China)。</li> <li>Fan-Yan Wei. 第 90 回日本生理学会大会、「Fine-tuning of protein translation by tRNA modification and its pathological relevance」、平成 25 年 3 月 28 日、東京。</li> </ol> <p>【一般講演】</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>謝 佩玉、魏 范研、鈴木健夫、貝塚 拓、鈴木 勉、富澤一仁. 第 90 回日本生理学会大会、「Simple and rapid detection of 2-methylthio modification in tRNA for diagnostic application of type 2 diabetes」、平成 25 年 3 月 29 日、東京。</li> <li>渡部佐耶加、魏 范研、貝塚 拓、富澤一仁. 第 90 回日本生理学会大会、「Comparison of the effect of current therapeutic agents for diabetes in Cdkal1-deficient mice」、</li> </ol>

様式19 別紙1

	平成 25 年 3 月 29 日、東京。 一般向け 計 0 件
図書 計 1 件	1. 富澤一仁. Cdkal1 による tRNA 修飾とインスリン分泌制御。Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌(寺内康夫、伊藤 裕、石橋 俊編)Pp155-161, 中外医学社, 2013. ISBN978-4-498-12345-8
産業財産権 出願・取得状況 計 2 件	(取得済み) 計 0 件 (出願中) 計 2 件 1. 出願番号: 2013-72391 発明者:富澤一仁、魏 范研、井上謙吾. 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、出願日:2013 年 3 月 29 日。 2. 出願番号: 2013-47278 発明者:富澤一仁、魏 范研、鈴木健夫、鈴木 勉. 発明の名称:tRNA 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、出願日:2013 年 3 月 8 日。
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。 ( <a href="http://kumamoto-saisentan.org/">http://kumamoto-saisentan.org/</a> )
国民との科学・技術対話の実施状況	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 24 年 12 月 1 日、(熊本大学医学部基礎研究棟 6 階)熊本、参加者 10 名。 2. 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 30 日、(熊本大学本荘キャンパス内)熊本、参加者約 48 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 0 件	
その他	

4. その他特記事項

特記事項無し。

## 実施状況報告書(平成24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	50,200,000	40,600,000	32,200,000	0
間接経費	36,900,000	15,060,000	12,180,000	9,660,000	0
合計	159,900,000	65,260,000	52,780,000	41,860,000	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	0	40,600,000	0	40,600,000	40,600,000	0	0
間接経費	60,000	12,180,000	0	12,240,000	12,240,000	0	0
合計	60,000	52,780,000	0	52,840,000	52,840,000	0	0

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	16,910,962	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	724,900	共同研究実施のため岡山大学、京都大学出張費
謝金・人件費等	8,032,157	研究補助員2名、大学院生RA費
その他	14,931,981	遺伝子改変マウス作製費
直接経費計	40,600,000	
間接経費計	12,240,000	
合計	52,840,000	

## 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
照明装置	オリンパス IX2-LS	1	517,860	517,860	2012/6/27	熊本大学
マルチガスインキュベーター	アステック社製 APM-30DR	1	663,600	663,600	2013/1/29	熊本大学