

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4 月 15 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790214

研究課題名（和文） Cdkal1による2型糖尿病の発症メカニズムの解析

研究課題名（英文） Characterization of Cdkal1, a novel type 2 diabetes risk gene

研究代表者

魏 范研（WEI FANYAN）

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：90555773

研究成果の概要（和文）：

Cdkal1は2型糖尿病の新規危険因子である。Cdkal1遺伝子変異による2型糖尿病発症メカニズムを明らかにするために、本研究では、膵β細胞特異的Cdkal1欠損マウスを作製し、表現型解析を行った。Cdkal1欠損マウスは、インスリン分泌能の低下ならびに耐糖能異常を示した。その分子メカニズムを検討したところ、Cdkal1欠損β細胞では、tRNA^{Lys}(UUU)のチオメチル化修飾欠損によりプロインスリン中のリジンコドンの誤翻訳が見られた。その結果、プロインスリンが正しく切断されなくなり、C-peptideの含量が低下することが明らかになった。また、誤翻訳による異常プロインスリンが産生された結果、β細胞内において小胞体ストレスが惹起された。さらに、Cdkal1欠損マウスに高脂肪食負荷を与えると、耐糖能異常、インスリン分泌低下、小胞体ストレスがより著明になった。以上の結果から、Cdkal1は、リジンに対応するtRNAを修飾することによりプロインスリンの誤翻訳を防止していることが推察された。

研究成果の概要（英文）：

Genetic variations in *cdkal1* (Cdk5 regulatory subunit associated protein 1-like 1) have been identified as a risk for type 2 diabetes. Despite the accumulating clinical evidence, the molecular characterization of Cdkal1 is completely unknown. To investigate the physiological role of Cdkal1, pancreatic b-cell-specific Cdkal1 knockout (Cdkal1 KO) mice were generated. Cdkal1 KO mice showed glucose intolerance and impaired insulin secretion. We have identified that Cdkal1 is a mammalian methylthio transferase, which specifically modifies tRNA^{Lys}(UUU) at position 37 by catalyzing the biosynthesis of N6-threonylcabamoyladenosine (t6A) to 2-methylthio- N6-threonylcabamoyladenosine (ms2t6A) in both bacteria and mammalian cells. Modification of tRNA^{Lys}(UUU) by Cdkal1 is critical for the accurate decoding of Lys codon. In Cdkal1 KO b-cells, deficiency of modification in tRNA^{Lys}(UUU) caused mistranslation of proinsulin and thus triggered endoplasmic reticulum (ER) stress response. Furthermore, Cdkal1 KO mice fed with a high fat diet developed severe glucose intolerance and ER stress response. From these results, we concluded that modification of tRNA by Cdkal1 in b-cells is critical to maintaining translation fidelity, which contributes to the homeostasis of b-cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：病態生理・糖尿病

1. 研究開始当初の背景

2006年に数千名にも及ぶ大規模の2型糖尿病患者集団のゲノム情報を利用して全ゲノム相関解析が行われた。その結果、Cdk5の関連分子であるCdkal1が2型糖尿病の新規危険因子として同定された(**Science** (2007) 316, 1331; **Science** (2007) 316, 1336; **Science** (2007) 316, 1341; **Nat Genet** (2007) 39, 770)。Cdkal1遺伝子に特異的な一塩基多型(以下SNPs)を持つ人が有意に2型糖尿病になりやすいことが分かった。また、日本を含めたアジア圏において危険型とされるSNPs(上図、危険型遺伝子aa)を持つ人口は、全人口の約2割であることも分かった。一方、ヨーロッパ圏では、危険型SNPsを持つ人口は全人口の1割未満であった。これまでに約50報の論文(2010年当時)が世界各国の臨床研究機関より発表され、ほぼすべての論文においてCdkal1の特異的なSNPsと2型糖尿病の相関が有意に認められた。しかしながら、これらの論文は、すべて2型糖尿病患者に対する臨床的な調査研究であり、Cdkal1の生理機能に関する基礎研究が全くされていない。

2. 研究の目的

本研究は、Cdkal1の生理機能を解明し、Cdkal1異常による2型糖尿病発症のメカニズムを明らかにすることを目的とし、膵臓β細胞特異的なCdkal1欠損マウスを作製及び解析する。

3. 研究の方法

(1)これまでCdkal1の臨床研究によれば、Cdkal1遺伝子に特異的なSNPsを持つ人においてインスリン分泌量の低下が有意に見られる(**Nat Genet** (2007) 39, 770; **N Engl J Med**. (2008) 359, 2220)。このことは、膵臓β細胞におけるインスリンの分泌或いは生合成にCdkal1が重要であることを強く示唆している。インスリン膵臓β細胞におけるCdkal1の機能を調べるために、本研究は膵臓β細胞特異的なCdkal1欠損マウスを作製し、Cdkal1欠損マウスにおける血糖値やインスリンの動態を検討する。

(2)2型糖尿病の発症させる環境要因として高脂肪、高カロリー食品の摂取が挙げられる。本研究においては、Cdkal1の膵臓β細胞特異的な欠損マウスに高脂肪、高カロリー食を与え、2型糖尿病様の症状を呈

するかどうかを検討する

(3)我々は世界で初めてCdk5が膵臓β細胞においてインスリン分泌を制御していることを見出し報告した(**Nature Med** (2005) 11, 1104)。また、Cdk5の関連分子であるCdkal1もインスリン分泌に関与する可能性が高いと思われる(**Nat Genet** (2007) 39)。従って、Cdkal1はCdk5を介してインスリン分泌に関与している可能性が十分に考えられる。そこで、本研究はCdkal1欠損マウスのβ細胞においてCdk5のリン酸化酵素活性やCdk5の基質のリン酸化状態に焦点を絞り検討する。

4. 研究成果

(1)膵β細胞特異的なCdkal1欠損マウスの作製

マウスCdkal1遺伝子の第五エキソンの両側にLoxP配列を持つトランスジェニックマウスと、ラットインスリンプロモーターによって支配されるCre遺伝子を持つトランスジェニックマウスと交配することにより、膵臓β細胞特異的なCdkal1欠損マウスを作製した。

(2)Cdkal1欠損マウスは耐糖能異常を示す

Cdkal1欠損マウスは、野生型マウスと同程度の体重であった。また、Cdkal1欠損マウス及び野生型マウスの膵臓を固定し、抗インスリン抗体を用いて免疫染色した結果、膵臓β細胞の形態は両者において差が認められなかった。Cdkal1欠損マウスが5週齢、10週齢、20週齢に達した時に、ブドウ糖負荷試験を行った。その結果、野生型マウスと比べ、Cdkal1欠損マウスの耐糖能が低下していた。また、ブドウ糖を負荷時の血中インスリン濃度を測定した結果、Cdkal1欠損マウスにおけるインスリン分泌が野生型マウスより有意に低下していた。さらに、ランゲルハンス島を精製し、試験管内でブドウ糖刺激を行い、インスリン分泌を測定した。その結果、Cdkal1欠損マウス由来のランゲルハンス島から分泌されるインスリンは、野生型マウス由来のランゲルハンス島から分泌されるインスリンより有意に少なかった。

(3)Cdkal1欠損マウスは高脂肪食による環境ストレスに弱い

23年度においてCdkal1欠損マウスに総カロリーのうち脂肪由来のカロリーが45%となる高脂肪食を9週に渡り摂取させ、その後糖

負荷試験を行い、耐糖能の変化及び膵β細胞機能に関わる遺伝子の発現を検討した。その結果、高脂肪食を摂取したCdkal1欠損マウスの耐糖能及びインスリン分泌は、高脂肪食を摂取した野生型マウスと比べ有意に低下した。また、インスリン負荷試験を行った結果、Cdkal1欠損マウスと野生型マウスとの間で有意な差が見られなかった。これらのことから、高脂肪食摂取によるCdkal1欠損マウスでは、末梢のインスリン感受性ではなく、高脂肪食を摂取する前よりも膵β細胞機能がさらに低下したことが明らかになった。また、Cdkal1欠損マウスの膵β細胞よりRNAを精製し、β細胞機能に関わる遺伝子発現を検討した結果、小胞体ストレスに関わる遺伝子発現がCdkal1欠損マウスにおいて有意に上昇した

(4) Cdkal1 は Cdk5 非依存的に膵β細胞機能を制御する

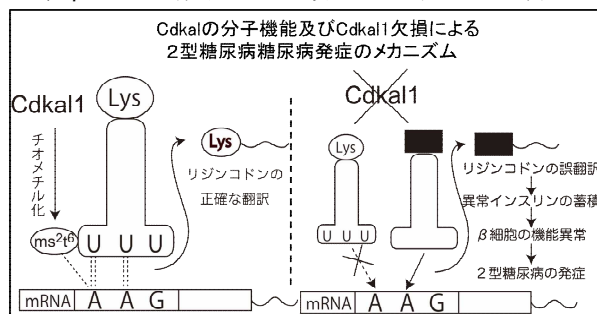
Cdkal1 は Cdk5 を介してインスリン分泌を制御している可能性がある。そこで、試験管内に Cdkal1 が存在するあるいはしない条件下において、Cdk5 及びその基質である dynamin を加え、Cdk5 のリン酸化酵素活性に Cdkal1 が関与するかどうかを検討した。その結果、Cdkal1 は Cdk5 の酵素活性に影響を与えないことが明らかになった

(5) Cdkal1 は tRNA を修飾する酵素であり、リジンの正確な翻訳に重要である

Cdkal1 はリジン tRNA の 37 番のアデニンをチオメチル化する酵素であることを突き止めた。リジン tRNA は AAA コドンに対応する tRNA(UUU) と AAG コドンに対応する tRNA(CUU) が存在する。さらに、Cdkal1 欠損マウスを用いて解析した結果、Cdkal1 は tRNA(UUU) のみを修飾することを明らかにした。また、レポーターアッセイを用いて検討した結果、tRNA(UUU) のチオメチル化はリジンコドンの正確な翻訳に重要であることが明らかになった。さらに、Cdkal1 欠損マウスの膵β細胞におけるインスリンのリジン残基の翻訳を検討した結果、Cdkal1 欠損マウスの膵β細胞のインスリンでは、リジン残基の異常な翻訳が見られた。

以上の結果から本研究は Cdkal1 欠損による 2 型糖尿病の発症分子メカニズムを明らかにした。即ち、Cdkal1 は tRNA(UUU) をチオメチル化することにより、リジンコドンの正確な翻訳に寄与する。Cdkal1 遺伝子が欠損したマウスあるいは 2 型糖尿病患者の膵β細胞では、CDKAL1 欠損したβ細胞では、リジンコドンでの翻訳精度が低下し、インスリンを含め、異常タンパクが蓄積することが明らか

になった。その結果、ER ストレスを引き起こし、β細胞の機能不全を引き起こすことが判



明した (下図参照)

(6) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

これまで Cdkal1 に関する報告は疫学的な報告のみであり、Cdkal1 の生理機能ならびに Cdkal1 遺伝子異常による 2 型糖尿病発症のメカニズムが不明であった。本研究は、Cdkal1 が tRNA 修飾酵素であることを突き止め、さらに Cdkal1 欠損マウスの表現型を解析することにより、Cdkal1 欠損による 2 型糖尿病発症の分子メカニズムを明らかにした。これらの成果は、いずれも世界初の発見である。また、Cdkal1 遺伝子異常を持つ 2 型糖尿病患者は世界全体で数千万人にも上るため、本研究によって明らかにされた Cdkal1 遺伝子異常による 2 型糖尿病発症メカニズムは、これらの患者に対する有効な治療薬、治療法の開発に貢献できるため、本研究成果の学術的及び社会的なインパクトが大きい。

(7) 今後の展望

Cdkal1 欠損マウスの解析を行った結果、Cdkal1 欠損による 2 型糖尿病発症の分子メカニズムが本研究において明らかになった。今後は Cdkal1 遺伝子異常に起因する 2 型糖尿病患者で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かを検討する。

また、本研究で作製した Cdkal1 欠損マウスは、これまでの肥満を伴う 2 型糖尿病モデルマウスとは対照的に、非肥満型の 2 型糖尿病の病態を忠実に再現する初めてのモデルマウスである。本モデルマウスを利用して、アジアに多く見られる非肥満型の 2 型糖尿病患者に対する新しい治療薬及び治療法の開発に応用する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Wei FY, Tomizawa K. Development of

type 2 diabetes caused by a deficiency of a tRNA^{Lys} modification. Islets 4, 2012 (In Press) 査読有

2. **Wei FY**, Suzuki T, Watanabe S, Kimura S, Kaitsuka T, Fujimura A, Matsui H, Atta M, Michiue H, Fontecave M, Yamagata K, Suzuki T, Tomizawa K. Deficit of Lys-tRNA modification by Cdkal1 causes the development of type 2 diabetes in mice. J. Clin. Invest. 121 (9): 3598-608. 2011 査読有
3. **Wei FY**, Tomizawa K. Functional loss of Cdkal1, a novel tRNA modification enzyme, causes the development of type 2 diabetes. Endocr J. 58, 819-825 2011 査読無
4. Arragain S, Handelman SK, Forouhar F, **Wei FY**, Tomizawa K, Hunt JF, Douki T, Fontecave M, Mulliez E, Atta M. Identification of eukaryotic and prokaryotic methylthiotransferase for biosynthesis of 2-methylthio-N6-threonylcarbamoyl adenosine in tRNA. J. Biol. Chem. 285(37):28425-33. 2010 査読有

〔学会発表〕(計 4件)

1. **魏 范研**、渡部 佐耶加、鈴木 健夫、貝塚 拓、山懸 和也、鈴木 勉、富澤 一仁 (2型糖尿病危険遺伝子 Cdkal1 の生理機能解析) 第89回日本生理学会、2012.3.31 長野県松本市総合体育館
2. **魏 范研**、富澤 一仁 (Cdkal1 機能欠損による2型糖尿病発症機序の解明) 第62回西日本生理学会、2011.10.14 佐賀大学 (佐賀)
3. 渡部 佐耶加、**魏 范研**、鈴木 健夫、貝塚 拓、山懸 和也、鈴木 勉、富澤 一仁 (新規2型糖尿病危険因子 Cdkal1 の生理機能) 第88回日本生理学会、2011.3.28 パシフィコ横浜 (横浜)
4. **魏 范研**、鈴木 健夫、貝塚 拓、山懸 和也、鈴木 勉、富澤 一仁 (膵臓β細胞における新規2型糖尿病危険因子 C d k a l 1 の機能解析) 第87回日本生理学会、2010.5.20 岩手県民情報交流センター (盛岡)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称：2型糖尿病モデル非ヒト動物

発明者：**魏 范研**、富澤 一仁

権利者：熊本大学

種類：特許

番号：特願 2010-181161 (PCT/JP2010/070006)

出願年月日：2010年8月12日

国内外の別：国内、国外 (米国)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

魏 范研 (WEI FANYAN)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：90555773

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：