

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860753

研究課題名(和文) Cdkal1一塩基多型による2型糖尿病発症分子機構の解明及び治療法の開発

研究課題名(英文) Molecular mechanism of Cdkal1 single nucleotide polymorphism-dependent type 2 diabetes

研究代表者

魏 范研 (Wei, Fan-Yan)

熊本大学・生命科学研究部・助教

研究者番号：90555773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：CDKAL1遺伝子の一塩基多型変異(SNPs)は2型糖尿病発症と相関する。本研究は、糖尿病リスク型のヒトにおいてCDKAL1のスプライシングバリエーションであるCDKAL1-v1の発現量が顕著に低下することを見出した。CDKAL1-v1はタンパク質に翻訳されない非コードRNAであり、全長型CDKAL1と共通してmiR494と結合する。CDKAL1-v1が低下しているリスク型のヒトにおいて、miR494によるCDKAL1-v1の抑制がはずれ、miR494によるCDKAL1の抑制が亢進していた。その結果、CDKAL1の活性並びにインスリン分泌が低下し、2型糖尿病が誘発されることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：SNPs in CDKAL1 is one of the most reliable risk factors for type 2 diabetes (T2D). However, the molecular mechanism by which the intronic single nucleotide polymorphisms (SNPs) contribute to T2D has been unclear. This study revealed the SNPs as actively involved in the regulation of cellular CDKAL1 levels through a unique post-transcriptional mechanism. A specific splicing variant of CDKAL1 (CDKAL1-v1) was drastically decreased in individuals carrying the risk SNPs in CDKAL1. CDKAL1-v1 is a non-coding transcript, which regulates Cdkal1 level by the competitive binding of a CDKAL1-targeting microRNA. By direct editing of genome in human cell lines, this study further shows that the nucleotides around the SNPs regions are critical for the alternative splicing of CDKAL1-v1. These findings demonstrate that the T2D-associated SNPs in CDKAL1 directly contribute to the decrease in CDKAL1-v1 by impairing splicing, which in turn induces microRNA-mediated suppression of cellular CDKAL1 level.

研究分野：生理学

キーワード：糖尿病 tRNA 修飾

1. 研究開始当初の背景

Cdkal1 (Cdk5 regulatory subunit associated protein 1-like 1) は、全ゲノム相関解析により同定された新規 2 型糖尿病危険因子である (Science (2007) 316.; Nat Genet (2007) 39 など)。Cdkal1 の第 5 イントロンに存在する特異的な SNPs (危険型) を持つ人は、非危険型の人と比べ、インスリン分泌が 22% 低下し、2 型糖尿病の発症率が最大で約 2 倍まで上昇する。さらに、アジア人種において危険型 Cdkal1 SNPs が 2 型糖尿病発症と最も相関する因子の一つであることも最近報告された (Diabetes (2009) 58)。Cdkal1 に関してこれまでに国内外から約百報以上の論文が報告されている。すべての論文において危険型 Cdkal1 SNPs が 2 型糖尿病発症に相関することを認めている。しかし、Cdkal1 の分子機能が不明であった上、Cdkal1 のイントロン領域に存在する一塩基の変異がどのような分子機構で 2 型糖尿病の発症を引き起こすかも不明であった。

申請者は、先行研究において Cdkal1 の分子機能を明らかにした。Cdkal1 はリジンコドンに対応する tRNA (tRNA^{Lys}(UUU)) の修飾酵素であった。Cdkal1 はリジン tRNA の 37 番アデノシンをチオメチル化 (S-CH₃) することで、リジンコドンとの結合を制御することで翻訳調節を行っていた。Cdkal1 欠損マウスを作製し解析した結果、リジンの誤翻訳に起因する異常なプロインスリンが細胞内に蓄積し、糖尿病を発症することが明らかになった (J.Clin.Invest. (121):3598, 2011)。

以上の結果から、危険型 Cdkal1 SNPs を有する人は、Cdkal1 遺伝子発現に何からの変異が生じ、そのため tRNA 修飾異常によって異常タンパクが翻訳され、2 型糖尿病が発症すると推測される。そこで、申請者は独自のヒト遺伝子解析を行い、2 型糖尿病発症を誘発する危険型 Cdkal1 SNPs を有する人において、Cdkal1 遺伝子の発現量を検討した。その結果、危険型 SNPs (rs7754840 の場合) を有するヒトでは、Cdkal1 の特異的な Splicing Variant (以下 Cdkal1-v1) の発現量が著しく低下することが明らかになった。2 型糖尿病発症と相関する危険型 Cdkal1 SNPs を持つ人では、Cdkal1-v1 の発現が低下することから、Cdkal1-v1 が危険型 Cdkal1 SNPs に起因する 2 型糖尿病の発症において中心的な役割を果たしている可能性が高い。本研究では、Cdkal1-v1 の生理機能の解明に集中的に取り組んだ。

2. 研究の目的

本研究は、Cdkal1-v1 の生理機能を解明することで、Cdkal1 の一塩基多型変異による 2 型糖尿病の発症機序を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 発現量解析

Cdkal1-v1 は末梢血のゲノム解析で発見した分子である。血球系細胞以外の組織における発現は不明である。そこで、ヒトの各臓器由来の全 RNA を用いて、ノーザンプロット或は定量 PCR 法により Cdkal1-v1 遺伝子の臓器別発現量を検討する。また、抗体 (作製済み) を用いて、ウェスタンプロット法により臓器別のタンパクの発現量を検討する。

(2) tRNA 修飾解析

Cdkal1-v1 の発現量が最終的に Cdkal1 の活性、即ち tRNA 修飾に影響するかどうかを検討するため、ヒト由来の細胞株 (HEK 細胞など) において siRNA を用いて Cdkal1-v1 発現量を抑制した後、tRNA を精製し、質量分析法により tRNA のチオメチル化を検討する。また、危険型 Cdkal1 SNPs あるいは非危険型 Cdkal1 SNPs を有するヒト由来の初代培養細胞株を入手し、Cdkal1-v1 の発現量を検討した後、Cdkal1-v1 の発現量が低下している細胞株において tRNA の修飾を検討する。

(3) 相互作用解析

Cdkal1-v1 は tRNA 修飾活性に関わる重要なドメイン (Radical SAM domain) を持たないため、tRNA を修飾できない。そこで、Cdkal1-v1 は UFP ドメインを介して Cdkal1 と相互作用することにより、Cdkal1 の安定性に影響する可能性がある。そこで、Cdkal1-v1 及びを強制発現させた細胞において免疫沈降法により Cdkal1 との結合を検討する。また、タグを取り付けた Cdkal1 及び Cdkal1-v1 のリコンビナントタンパクを精製し、Cdkal1 と Cdkal1-v1 の結合能や結合部位を *in vitro* で検討する。また、安定性への影響を検討するために、Cdkal1-v1 を強制発現あるいはノックダウンさせた後、Cdkal1 のタンパク量をウェスタンプロットで検討する。

(3) TALEN 法による SNPs 解析

イントロン領域に存在する Cdkal1 SNPs が Cdkal1-v1 の発現量の調節に直接関わるかを検討するために、TALEN 法を用いる。Cdkal1 SNPs の近傍配列と特異的に結合する DNA 結合領域と制限酵素 FokI との連結タンパクである TALEN をヒト由来の培養細胞に導入し、Cdkal1 SNPs の近傍を切断する。その際、危険型 Cdkal1 SNPs、あるいは非危険型 Cdkal1 SNPs を含むオリゴを細胞に導入すると、相同組み替えにより人工的に設計された Cdkal1 配列がゲノム上に組み込まれる。その後、培養細胞を限界希釈法でシングルクローン細胞を作製する。シーケンシングにより危険型 Cdkal1 SNPs の導入を確認した後、リアルタイム PCR 法やウェスタンプロット法を用いて Cdkal1-v1 の発現量を検討する。

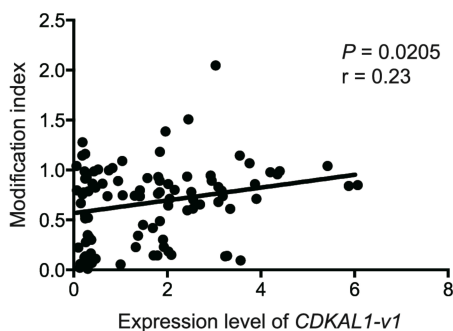
4. 研究成果

(1) 微量サンプルにおけるチオメチル化修飾の検出法の開発

先行研究において2型糖尿病の発症リスクを有する患者においてCdkal1-v1の発現量が低下することが明らかになったため、Cdkal1-v1が低下しているヒトにおいてCdkal1の活性が低下するかを検討した。一般的にtRNAのチオメチル化修飾は質量分析法を用いて検討するが、ヒトの末梢血から得られるRNAはごくわずかであるため、新しい分析方法を開発する必要があった。

そこで、申請者は、チオメチル化修飾が典型的なワトソン=クリック結合に対して立体障害を示すことに注目して蛍光プローブを用いた修飾検出法を開発した。具体的には、チオメチル化が存在するtRNAに対して相補的に結合する約19塩基のオリゴプライマーをまず設計する。一つのオリゴプライマーは、チオメチル化される37位より3'側に位置するように設計する。37位のチオメチル基が逆転写の効率を阻害するため、このプライマーを用いて逆転写を行うと、チオメチル化されたtRNAの量が多いほど逆転写産物の量が低下する、という反比例の相関が観察される。一方、もう一つのオリゴプライマーは、37位のチオメチル基を含むように設計する。このプライマーを利用して逆転写を行うと、チオメチル基に非依存的に逆転写が行われ、逆転写産物の量は即ちtRNAの全量に相関する。逆転写後、逆転写産物と相補的に結合する一対のプライマー及びSYBR greenを使用し、逆転写産物の量を定量PCR法により検出する。

(2) Cdkal1-v1の発現量はCdkal1活性及びインスリン分泌量と相関する。



上記の方法を用いて、ヒト末梢血よりRNAを精製し、Cdkal1-v1及びtRNAのチオメチル化修飾を定量PCRにより検討した。その結果、Cdkal1-v1の発現量が、tRNAチオメチル化修飾レベル、即ちCdkal1の活性と有意に相関することが明らかになった。特に、非リスクCdkal1遺伝子型を持つヒトと比較して、2型糖尿病発症リスクと相関するCdkal1変異を有する人において、tRNAのチオメチル化レベルが有意に低下していた。さらに、ヒトにおいてブドウ糖負荷試験を行い(上図参照)、インスリン分泌能を検討し、tRNAチオメチル

化修飾レベルとの相関を検討した結果、tRNA修飾が低下しているヒトにおいてインスリン分泌が有意に低下していたことが明らかになった。

(3) Cdkal1-v1はCdkal1のタンパクレベルを制御する。

Cdkal1-v1はヒト特異的に発現するスプライシングバリエーションである。ヒトの各臓器から精製したmRNAを用いて発現量を検討した結果、Cdkal1-v1は全て臓器において発現し、またその発現量は全長型Cdkal1の発現量と有意に相関していた。次に、ヒト由来の培養細胞であるHeLa細胞においてCdkal1-v1とCdkal1の相関について検討を行った。HeLa細胞においてCdkal1-v1をsiRNAによってノックダウンすると、Cdkal1の発現量、タンパク量、及び活性が低下していた。一方、Cdkal1をsiRNAによってノックダウンしても、Cdkal1-v1発現量低下が見られた。これらのことから、Cdkal1-v1はCdkal1の発現やタンパク量と強く相関することが明らかになった。

(4) Cdkal1-v1は非コードRNAである。

Cdkal1-v1はCdkal1のExon 1-4を含む非常に短いスプライシングバリエーションである。Cdkal1-v1のタンパクを検出するために、Cdkal1と共通するN末を認識する抗体を用いてウェスタンブロットを行った。同抗体は、ヒト由来の細胞において65kDaの全長型Cdkal1を検出できたが、Cdkal1-v1の予想分子量(11kDa)付近ではシグナルを検出することが出来なかった。さらに、Cdkal1-v1の5'UTR及びOpen Reading Frameを含む遺伝子領域とルシフェラーゼ遺伝子を連結したコンストラクト(Cdkal1-v1-Luc)を作成し、HeLa細胞に導入して、ルシフェラーゼ活性を検討した結果、ルシフェラーゼのみを含む対照と比較して、Cdkal1-v1-lucの活性が顕著に低下した。一方、In situ Hybridization法を用いて、Cdkal1-v1の細胞内局在を検討した結果、Cdkal1-v1は細胞質側に存在することが分かった。これらの結果から、Cdkal1-v1はタンパク翻訳を伴わない非コードRNAであることが示唆された。

(5) Cdkal1-v1はmiR-494を介してCdkal1を制御する。

Cdkal1-v1遺伝子配列を検討した結果、Cdkal1-v1及びCdkal1の3'UTRにおいて、miR-494と結合する共通配列が存在することが示唆された。そこで、HeLa細胞にmiR-494を導入し、Cdkal1及びCdkal1-v1の活性を検討すると、miR-494の強制発現は、Cdkal1-v1及びCdkal1の発現量とともに抑制した。一方、miR-494に対する阻害分子を細胞に導入すると、Cdkal1及びCdkal1-v1の発現量とともに上昇した。

(6)イントロン SNP は Cdkal1 のスプライシングを制御する。

Cdkal1 のイントロンに存在する一塩基多型(SNP)が Cdkal1-v1 のスプライシングを制御するかを検討するために、TALEN 法を用いて Cdkal1 のイントロン領域を直接改変した。具体的には、2 型糖尿病と相関する Cdkal1 の一塩基多型である rs10946398 を挟み、切断する TALEN コンストラクトを作成し、HeLa 細胞に導入した。その後、HeLa 細胞を限界希釈法でクローニングし、それぞれのクローン細胞の遺伝配列及び、Cdkal1 の発現量を検討した。その結果、TALEN によって rs10946398 領域が欠損した細胞において Cdkal1-v1 及び Cdkal1 の発現量が低下していた。

以上ことから、2 型糖尿病発症と相関する Cdkal1 の一塩基多型変異は、スプライシング異常により Cdkal1-v1 の発現量を低下させていた。その結果、Cdkal1-v1 による miR494 の抑制する効果が低下する一方、miR494 による Cdkal1 の抑制が亢進したことで、Cdkal1 の発現量及び活性が低下し、インスリン分泌が低下することが明らかになった。

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 8 件)

1.#Zhou B., #Wei F.Y., Kanai N., Fujimura A., Kaitsuka T., Tomizawa K. Identification of a splicing variant that regulates type 2 diabetes risk factor CDKAL1 level by a coding-independent mechanism in human. Hum. Mol. Genet. 23, 4639-4650, 2014. (#Contribute equally) 査読有

2.Kaitsuka T., Noguchi H., Shiraki N., Kubo T., Wei F.Y., Hakim F., Kume S., and Tomizawa K. Generation of functional insulin-producing cells from mouse ES cells through 804G cells-derived extracellular matrix and protein transduction of transcription factors. Stem Cells Translational Med. 3, 114-127, 2014. 査読有

3.Hakim F., Kaitsuka T., Raed J.M., Wei F.Y., Shiraki N., Akagi T., Yokota T., Kume S., Tomizawa K. 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. 査読有

6.Gotanda Y., Wei F.Y., Harada H., Nakamura K.I., Ohta K., Tomizawa K., Ushijima K. Efficient transduction of

eleven poly-arginine peptide in an ischemic lesion of mouse brain. J. Stroke Cerebrovasc. Dis. 8, 2023-2030, 2014. 査読有

4.#Xie P., #Wei F.Y., Hirata S., Kaitsuka T., Suzuki T., Suzuki T., and Tomizawa K. Quantitative PCR measurement of tRNA 2-methylthio modification for assessing type 2 diabetes risk. Clin. Chem. 59, 51-59, 2013. (#Contribute equally). 査読有

5.Fujimura A., Michiue H., Cheng Y., Uneda A., Tani Y., Nishiki T., Ichikawa T., Wei F.Y., Tomizawa K., Matsui H. Cyclin G2 promotes hypoxia-driven local invasion of glioblastoma by orchestrating cytoskeletal dynamics. Neoplasia, 15, 1272-1281, 2013. 査読有

[学会発表](計 4 件)

1. 渡部沙耶加、魏范研、貝塚拓、富澤一仁 Cdkal1 機能異常を標的とした 2 型糖尿病治療薬の最適化
第 65 回西日本生理学会、琉球大学(沖縄県、那覇市) 2014 年 10 月 24 日

2. 渡部沙耶加、魏范研、貝塚拓、富澤一仁 Cdkal1 欠損マウスにおける抗糖尿病治療薬効果の検討
第 91 回日本生理学大会シンポジウム、鹿児島大学(鹿児島県、鹿児島市) 2014 年 3 月 16 日

3. 魏范研
Cdkal1 遺伝子一塩基多型による 2 型糖尿病発症の分子メカニズム
第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会口演(熊本県、熊本市) 2013 年 5 月 16 日

4. 魏范研
翻訳精度維持における tRNA 修飾の役割及びその破綻による病態の解析
第 90 回日本生理学大会シンポジウムタワーホール船堀(東京都、江戸川区) 2013 年 3 月 27 日

[図書](計 0 件)

[産業財産権] 出願状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://kumamoto-physiology.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

魏范研 (Wei, Fan-Yan)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号: 90555773