

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 13 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670284

研究課題名(和文)ハイスループットtRNA修飾分析技術の開発

研究課題名(英文)Development of high-throughput detection method of tRNA modifications

研究代表者

富澤 一仁(Tomizawa, Kazuhito)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授

研究者番号：40274287

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：tRNA修飾が診断や予後予測マーカーとして検査医学へ応用されることが期待される。しかし、従来のtRNA修飾解析方法では、高感度かつハイスループットに解析することが困難であった。そこで本研究では、PCR法の原理を利用して簡単かつ迅速にハイスループットで解析できる技術開発を行った。本技術を用いると100マイクロリットルの末梢血からtRNA修飾が定量解析できた。本技術の開発により、tRNA修飾解析を検査医学へ応用することが期待できるようになった。

研究成果の概要(英文)：Modification of tRNAs is a critical factor underlying the development of diabetes, and the measurements of the modification level could be used as a clinical biomarker for the diagnosis of diabetes. However, there is no convenient method to detect tRNA modifications. Current methods, such as mass spectrometry and primer extension method, are not ideal for the easily and reliably detection of such modifications in clinical samples. Here, I present a new method (qPCR-MtR) that overcomes the disadvantages of the current methods and can detect and quantify the modification of tRNAs in multiple samples. The method was sensitive enough to measure 2-methylthio (ms2) modification levels of tRNALys(UUU) in total RNA sample isolated from human peripheral blood specimens and revealed that ms2-modification levels in tRNALys(UUU) were lower in individuals carrying higher-risk SNP of cdkal1.

研究分野：生理学

キーワード：糖尿病 ミトコンドリア tRNA 化学修飾 定量PCR

1. 研究開始当初の背景

リン酸化や SUMO 化などの蛋白質修飾、あるいは DNA やヒストンのメチル化などのエピジェネティクス修飾は、バイオマーカーや癌などの疾患の予後マーカーとして検査医学の重要な研究分野になっている。このように蛋白質、DNA の化学修飾とは異なり、RNA の化学修飾については研究が進んでいなかった。細菌や酵母において、tRNA が修飾されているのは知られていたが、ヒトの tRNA 修飾については全く研究されていなかった。それは、疾患との関連性が不明であったからである。

Cdkal1 は、すべての人種において 2 型糖尿病と最も相関のある危険因子の一つであるが、その機能は不明であった。我々は同分子が 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 (J Biol Chem (2010) 285,28425; Drug Discovery Today (2013) 10, 65)。さらに Cdkal1 欠損マウスを作製し、Cdkal1 機能欠損がなぜ 2 型糖尿病を引き起こすかその分子機構を解明した (J Clin Invest (2011) 121,3598)。本成果は、tRNA 修飾異常が疾患発症に関与するという新しい概念を提唱したとして、N Engl J Med、Nature、J Clin Invest などのレビューに取り上げられた。我々が J. Clin Invest. に報告した以降、tRNA 修飾異常が、癌、不整脈、心不全、難聴、ミトコンドリア病など様々な疾患に関与していることが明らかになり、tRNA 修飾が新規バイオマーカーや疾患予後マーカーとして注目されるようになった。しかし、従来の tRNA 修飾分析法では、微量検体から分析することは困難であり、一度に多量検体を分析できず、さらに熟練した技術と高価な装置が必要であった。検査医学分野で普及するためには、簡便にハイスループットに tRNA 修飾を分析する技術開発が必要である。

2. 研究の目的

誰にでも簡便にハイスループットに、かつ定量的に tRNA 修飾を分析できる技術開発を行う。具体的には、tRNA を直接逆転写し、定量 PCR の原理で tRNA 修飾を定量的に解析する技術の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) qPCR-tRNA 修飾分析法によるミトコンドリア tRNA 修飾解析の実証

tRNA には、細胞質 tRNA とミトコンドリア tRNA に区分される。我々は、癌と関連のある Cdk5rap1 は、ミトコンドリア tRNA 修飾酵素であることを突きとめた (Drug Discovery Today (2013) 10, 65)。qPCR-tRNA 修飾分析法が細胞質 tRNA の修飾解析に有用であることは明らかにしているが (Clin Chem (2013) 59, in press)、ミトコンドリア tRNA 修飾解析に有用か不明である。そこで、本研究では、その有用性について実証した。具体的には、

Cdk5rap1 欠損マウスの肝臓および胃から全 RNA を精製した。ノックアウトマウスならびに野生型マウスから精製した全 RNA を、100:0, 75:25, 50:50, 25:75, 0:100 で混合した。すると、理論的修飾率について、0-100%の範囲で求めることができる。これら混合全 RNA を図 1 で示すプライマーで逆転写した。

Cdk5rap1 は、ミトコンドリア tRNA^{Phe}(UUU) の 37 番アデニンをチオメチル化する酵素である。そこで修飾部位から 20 ヌクレオチド 3' 側に修飾検出用プライマーを設計し、また修飾部位から 5' 側にコントロールプライマーを設定した (図 1 参照)。次にそれぞれ逆転写によりできた DNA を、ミトコンドリア tRNA^{Leu}(UAA) ならびにミトコンドリア tRNA^{Phe}(UUU) にそれぞれ特異的なプライマーにより定量 PCR (qPCR) を行い、CT 値を求めた。修飾検出用プライマーによる CT 値を CT₁ とし、コントロールプライマーによる CT 値を CT₂ とすると dCT=CT₁-CT₂ となる。dCT を逆数したものが修飾実測値となる。

tRNAダイレクト逆転写用プライマーのデザイン

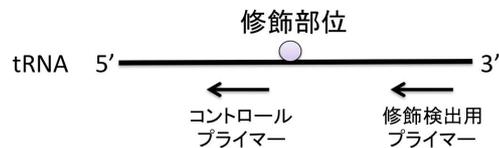


図 1 逆転写用プライマーのデザイン

(2) qPCR-tRNA 修飾分析法によるヒト末梢血標本の tRNA^{Lys}(UUU) 修飾解析の実証

qPCR-tRNA 修飾分析法が臨床検査分野で応用可能か実証するために、ボランティア健康人末梢血標本を用いて 2 型糖尿病と関連のある tRNA 修飾である tRNA^{Lys}(UUU) 修飾について検討した。30 名のボランティア健康人から 40 ml の末梢血を採取した。5ml、1ml、0.5ml ならびに 0.1ml の全血から血球成分を分離後、赤血球を低浸透圧溶血させ、残存した血球から全 RNA を精製した。qPCR-tRNA 修飾分析法により、tRNA^{Lys}(UUU) の 37 番アデニンのチオメチル化修飾について解析を行い、同法のヒト末梢血標本を用いた時の感度、正確性を検討する。コントロールとして、30ml の全血を用いて質量分析法により tRNA^{Lys}(UUU) の修飾を解析し、その解析結果と qPCR-tRNA 分析法の結果を比較することにより、両方の感度、正確性について比較した。

(3) qPCR-tRNA 修飾分析法による 2 型糖尿病患者末梢血標本の tRNA 修飾解析の実証

2 型糖尿病患者の末梢血を用いて tRNA^{Lys}(UUU) のチオメチル化修飾解析を行った。解析を方法は (1) の方法に準じた。ゲノム関連解析の結果より、tRNA^{Lys}(UUU) の 34 番アデニンのチオメチル化修飾酵素である Cdkal1 の SNPs と 2 型糖尿病発症の相関性が明らかなため、各患者の SNPs 解析を行い、リスクアレル保有者と非リスクアレル保有

者で tRNA^{Lys}(UUU)の修飾に有意差があるか検討した。

4. 研究成果

(1) qPCR-tRNA 修飾分析法によるミトコンドリア tRNA 修飾解析の実証

Cdk5ap1 は、トリプトファン、フェニルアラニン、チロシンに対応するミトコンドリア

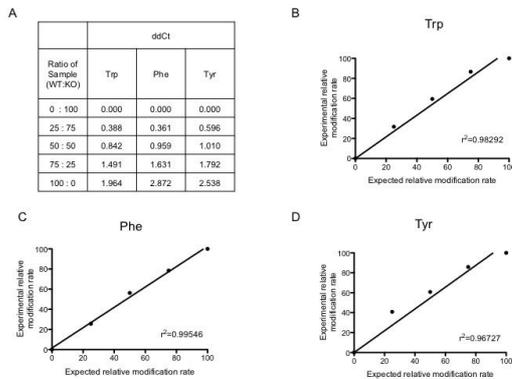


図2 qPCR-tRNA修飾分析法によるミトコンドリアtRNA修飾解析結果

tRNA のチオメチル化修飾酵素であることが知られている。そこで、野生型マウスおよび Cdk5rap1 欠損マウスの肝臓からトータル RNA を精製し、各々のトータル RNA を、0:100、25:75、50:50、75:25、100:0 の割合で混合した。その混合した RNA を標本として、qPCR-tRNA 修飾分析法により、Cdk5rap1 のチオメチル化修飾について dCt 値を用いて解析した(図 2 A)。各 tRNA 修飾の解析結果と予測修飾値をプロットして比較したところ、トリプトファン、フェニルアラニン、チロシンに対応するミトコンドリア tRNA いずれにおいても解析値と予測値が一致した(図 2 B~C)。

以上の結果から、qPCR-tRNA 修飾分析法が、ミトコンドリア tRNA のチオメチル化修飾解析にも有用であることが示された。

(2) qPCR-tRNA 修飾分析法によるヒト末梢血標本の tRNA^{Lys}(UUU)修飾解析の実証

健康人の 5ml、1ml、0.5ml ならびに 0.1ml 末梢血からそれぞれトータル RNA を精製した。精製したトータル RNA をサンプルとして、qPCR-tRNA 修飾分析法を用いて、2 型糖尿病と関連のあるチオメチル化修飾である tRNA^{Lys}(UUU)のチオメチル化修飾について分析し、qPCR-tRNA 修飾分析法の検出限界感度について調査した。その結果、0.1 ml の末梢血から精製したトータル RNA サンプルからもチオメチル化修飾が検出できることが明らかになった。

さらに、qPCR-tRNA 修飾分析法のトータル RNA 濃度の検出限界感度について検討した。100 ng/ml、10 ng/ml、1 ng/ml 濃度のトータル RNA 中の tRNA^{Lys}(UUU)チオメチル化修飾について qPCR-tRNA 修飾分析法にて解析した。すると、100 ng/ml および 10 ng/ml 濃度のトータル RNA では、1 µg/ml 濃度と同様の dCT

値であった。1 ng/ml 濃度では、dCT 値が 100 ng/ml および 10 ng/ml 濃度のトータル RNA と比較して、約 50%であった(図 3)。以上の結果から、1ng/ml トータル RNA 濃度では、10 ng/ml 濃度以上のサンプルと比較して、検出感度が 50%低下するが、チオメチル化修飾を検出できることが明らかになった。この検出感度は、従来法と比較して、約 1000 倍高かった。

Concentration of total RNA	100 ng/ml	10 ng/ml	1 ng/ml
Normalized Ct (Ct ^{wild-type} (R2-R1)-Ct ^{Cdkal1 KO} (R2-R1))	7.055±0.21	6.703±0.1	3.0±0.61

図3 qPCR-tRNA修飾分析法の限界検出感度

(3) qPCR-tRNA 修飾分析法による 2 型糖尿病患者末梢血標本の tRNA 修飾解析の実証

2 型糖尿病と診断された患者の末梢血を採取し、Cdkal1 のアレル検査と qPCR-tRNA 修飾分析法による tRNA^{Lys}(UUU)のチオメチル化修飾解析を行った。その結果、リスクアレル保有 2 型糖尿病患者の修飾率は、非リスクアレル保有 2 型糖尿病患者と比較して、有意に低かった。さらに、同修飾率と HbA1c の値をプロットし、相関関係について検討した。すると、修飾率と HbA1c の間には、有意な逆相関が認められた。

以上の結果から、qPCR-tRNA 修飾分析法による tRNA^{Lys}(UUU)チオメチル化修飾解析が、Cdkal1 アレル解析替わる有用な解析技術であることが示された。さらに、Cdkal1 遺伝子にリスクアレルを保有している 2 型糖尿病患者では、tRNA^{Lys}(UUU)のチオメチル化修飾が低下していることが明らかになった。

結論

本研究成果により、qPCR-tRNA 修飾分析法が従来の tRNA 修飾解析法と比較して、より高感度に、そしてハイスループットに解析できる技術であることが明らかになった。また、2 型糖尿病など疾患の病態や予後予測に応用できることが示唆された。

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 4 件)

- Wei, F.-Y., Zhou, B., Suzuki, T., Miyata, K., Ujihara, Y., Horiguchi, H., Takahashi, N., Xie, P., Michiue, H., Fujimura, A., Kaitsuka, T., Matsui, H., Koga, Y., Mohri, S., Suzuki, T., Oike, Y., and Tomizawa, K. Cdk5rap1-mediated 2-methylthio modification of mitochondrial tRNAs governs protein translation and contributes to myopathy

- in mice and humans. **Cell Metab.** 21, 428-442, 2015.
2. Locke, J.M., Wei, F.-Y., Tomizawa, K., Weedon, M.N., and Harries, L.W. A cautionary tale: The non-causal association between type 2 diabetes risk SNP, rs7756992, and levels of non-coding RNA, CDKAL1-v1. **Diabetologia** 58, 745-748, 2015.
 3. Wei, F.-Y., and Tomizawa, K. Measurement of 2-methylthio Modifications in Mitochondrial Transfer RNAs by Reverse-transcription Quantitative PCR. **Bio-protocol** 6(1), e1695, 2016.
 4. Lamichhane, T., Arimbasseri, A., Rijal, K., Iben, J.R., Wei, F.-Y., Tomizawa, K. and Maraia, R. Lack of tRNA-i6A37 modification causes mitochondrial-like metabolic deficiency in *S. pombe* by limiting activity of cytosolic tRNA^{Tyr}, not mito-tRNA. **RNA** 22, 583-596, 2016.

〔学会発表〕(計 3件)

1. 渡部佐耶加、富澤一仁、魏范研、貝塚拓 . 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、2014 年 10 月 23 日、那覇市(口演).
2. 富澤一仁 . 糖尿病疾患感受性遺伝子、Cdkal1 とインスリン分泌 . 第 52 回日本糖尿病学会九州地方会、2014 年 11 月 1 日、熊本市(招待講演).
3. 富澤一仁 . tRNA 修飾異常と代謝疾患 . 第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会、2015 年 12 月 3 日、神戸市(シンポジウム講演).

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

・ホームページ:熊本大学大学院生命科学研究部・分子生理学分野

<http://kumamoto-physiology.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

富澤 一仁 (TOMIZAWA, Kazuhiro)

熊本大学大学院生命科学研究部・教授

研究者番号: 40274287

(2)研究分担者

該当無し

(3)連携研究者

該当無し