

令和 2 年 4 月 21 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2017～2019

課題番号：17KT0054

研究課題名(和文) tRNAモドミクス研究分野の創造を可能とする解析技術の開発

研究課題名(英文) Development of the method for tRNA modomics

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) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、尿および末梢血標本からtRNA修飾をハイスループットかつ網羅的に解析する技術開発と同技術を用いたミトコンドリア病およびアジア型2型糖尿病診断技術の開発を行った。ごく少量の尿あるいは血漿からメタノールで除タンパク後、LC/MS質量分析機器で、1時間以内に30種類の修飾ヌクレオシドを網羅的に解析する技術開発に成功した。本技術を用いて、ミトコンドリア病患者の尿中の2種類の修飾ヌクレオシド量を調査することにより、ミトコンドリア病を診断できることが明らかになった。さらに、2型糖尿病危険因子のCdkal1のリスクアレル保有者では、末梢血中のms2t6A量が有意に減少していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、エピジェネティクスやメタボロミクスのようにセントラルドグマを制御する因子を網羅的に解析するオミックス研究は、生命現象を解明するだけではなく、疾病発症や病態進行の予測、あるいはプレジジョン・メディシンへの期待から、全世界で熾烈な競争が行われている。本研究により、私はtRNA修飾を網羅的かつハイスループットに解析する技術開発に成功した。本成果により、tRNAモドミクスという新しいオミックス研究分野の開拓と既存のオミックス研究と統合することにより、次世代マルチオミックス研究への発展が期待できる。また、乳幼児に多く発症するミトコンドリア病の診断を非侵襲的にかつ簡易に診断できることが示せた。

研究成果の概要(英文)：I studied to develop an inclusive and high throughput analysis method for tRNA modifications in urine and peripheral blood samples, and applied the method to diagnose mitochondrial disease and Asian-type diabetes. I succeeded to develop a analysis method by which we could detect more than 30 modified nucleosides within 1 h by LC/MS after removal of proteins from a small volume of urine and peripheral blood. I verified that we diagnosed mitochondrial disease by measuring two kinds of modified nucleosides in urine using the new analysis method. Moreover, this method was also useful for the diagnosis of Asian-type diabetes in patients who carry risk alleles in CDKAL1 gene.

研究分野：生理学

キーワード：tRNA ミトコンドリア病 糖尿病 修飾ヌクレオシド

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、エピジェネティクスやメタボロミクスのようにセントラルドグマを制御する因子を網羅的に解析するオミックス研究は、生命現象を解明するだけでは無く、疾病発症や病態進行の予測、あるいはプレジジョン・メディシンへの期待から、全世界で熾烈な競争が行われている。さらに各オミックス研究で得られたデータを統合し、疾病の解明や予防に役立てようとする多階層オミックスも精力的に行われている。しかし、現在のオミックス研究は、セントラルドグマを制御する分子や化学修飾のすべてを網羅しているわけではない。tRNAは、すべての生物種において複雑かつ多彩な化学修飾を受けており、同化学修飾は翻訳の正確性や速度、tRNAの構造や代謝を制御していることが知られていた。従来 tRNA 修飾研究は、化学修飾の同定とその生理的意義の研究が主であった。しかし我々が、tRNA 修飾異常が 2 型糖尿病、ミトコンドリア脳筋症、小児急性肝不全など様々な疾患発症に関与することを報告して以来⁽¹⁻³⁾、tRNA 修飾と疾病との関係がクローズアップされている^{4,5)}。

そこで私は、tRNA 修飾を網羅的に解析する研究分野を新しいオミックス研究分野と位置づけ、tRNA モドミクスと命名した(図 1)。tRNA モドミクスの成果と従来のオミックス研究成果を統合させた次世代マルチオミックス研究を実施することにより、これまで以上に先鋭な疾病発症と病態進行を予測できる方法の開発に繋がるとの着想に至った。しかし、これまで tRNA 修飾をハイスループットかつ網羅的に解析技術が無いため、tRNA モドミクス研究を実施することは不可能であった。さらに、尿や血液中に修飾 tRNA の代謝産物である修飾リボヌクレオチドが存在するかも不明であった。

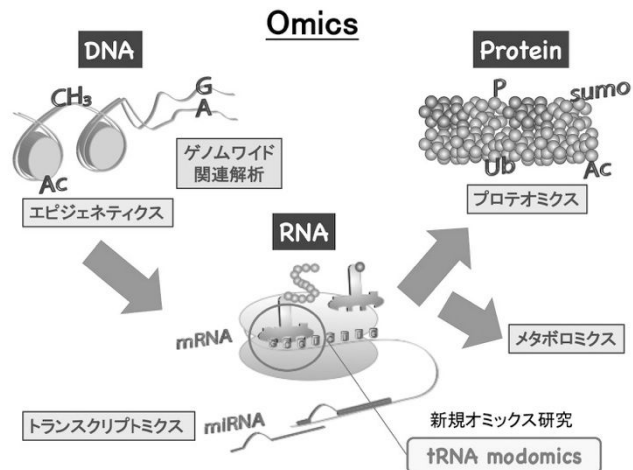


図 1 現在のオミックス研究

2. 研究の目的

最近、酵母の tRNA 修飾を HPLC と質量分析 (LC-MS) を組み合わせて網羅的に解析する技術が報告された⁶⁾。私は、この技術をヒト tRNA 修飾の網羅的解析に応用することができるのではないかと考えた。しかし、ヒトの血中や尿中に tRNA の代謝ヌクレオチド (化学修飾リボヌクレオチド) が存在するか全く報告が無いため、ヒトの血漿および尿を用いて予備実験を実施した。すると、血漿および尿のいずれの標本においても、100 μ l の検体量で tRNA 特異的な 30 種類の化学修飾ヌクレオチドを網羅的に同定することに成功した。

以上のことを踏まえて、本研究は、新しいオミックス研究として tRNA モドミクスを確立し、解析技術の開発と各疾患における tRNA 修飾解析、また疾患発症分子機構を解明することを目的として実施した。

具体的に下記の研究事項を目的とした。

ヒト尿および血漿中の tRNA 修飾を網羅的かつ定量的に解析できる技術の開発・・・100 μ l の極微量検体からヒト tRNA を構成するヌクレオチドの全修飾を網羅的かつ定量的に解析できる技術の開発を行った。

tRNA 修飾を標的とした疾患マーカー、予後予測マーカー探索研究・・・ミトコンドリア病患者の tRNA タウリノメチル修飾ウリジン (m^5U) およびチオメチル化修飾アデノシン (ms^2t^6A) について、で開発した技術を用いて定量解析を実施し、診断および予後予測マーカーとしての有用性について検討した。

アジア型 2 型糖尿病診断解析技術開発・・・CDKAL1 は、アジア型 2 型糖尿病の危険因子である。2 型糖尿病患者を CDKAL1 の一塩基多型 (SNP) で、リスクアレル群と非リスクアレル群に分け、末梢血中のチオメチル化修飾 (ms^2t^6A) について で開発した技術で解析し、アジア型 2 型糖尿病が診断できるか原理検証を行った。

3. 研究の方法

ヒト尿および血漿中の tRNA 修飾を網羅的かつ定量的に解析できる技術の開発

ごく最近、酵母から精製した RNA をヌクレアーゼで処理し、HPLC で分離後、LC-MS 質量分析器で測定することにより、20 種類の tRNA 修飾が解析できる技術が報告された⁶⁾。本研究では、尿中に tRNA の代謝産物、すなわち修飾ヌクレオチドが含まれているのではとの仮説のもと、上述の方法を変法し、尿から修飾リボヌクレオチドが検出できるか予備実験を行った。具体的方法は、尿をタンパク質吸着カラムで除タンパクした後、酸処理を行った。その後、HPLC に注入し分離後、トリプル四重極 LC/MS にて質量分析を行い、Nat. Protoc. に報告されていた各化学修飾リボヌクレオチドの質量と飛行時間から、各化学修飾リボヌクレオチドについて測定した。現在ヒト tRNA のリボヌクレオチドの化学修飾は、38 種類同定されている。酵母もほぼ同

数の化学修飾が判明しているが、Nat Protocの方法では20種類しか同定できていない。そこで、本研究では30種類以上の修飾ヌクレオシドを解析できる技術開発を行った。

tRNA 修飾を標的とした疾患マーカー、予後予測マーカー探索研究

ミトコンドリア病 (MELAS) 患者、未成人の場合は患者の後見人に対してインフォームド・コンセント (IC) を行った。IC で同意を得患者に対して、患者登録、血液、尿標本の採取、臨床データの収集を行った。目標症例数は、ミトコンドリア病患者および健康人にそれぞれ 40 名の登録ならびに尿標本の採取とした。

同意が得られた MELAS 患者および健康人から採取した尿中修飾ヌクレオチド (m^5U ならびに ms^2i^6A) 解析で得られた各修飾ヌクレオチド量が MELAS 診断マーカーとして有用か、ROC (receiver operating characteristic) 分析を実施した。また、現在 MELAS 診断マーカーとして最も有力視されている FGF-21 と比較して AUC (area under curve) が同等以上であるか検討した。さらに、コントロールの修飾ヌクレオチドの結果にサンプル間のバラツキがある場合は、 m^6A から ms^2t^6A に変更するなど、開発項目 1-2 の尿中修飾ヌクレオチド解析にフィードバックを行い、解析方法の修正を図った。

アジア型 2 型糖尿病診断解析技術開発

で開発した尿中 tRNA 修飾解析技術を用いて、糖尿病患者の末梢血標本のチオメチル化アデノシン (ms^2t^6A) 量について測定した。血球中のチオメチル化修飾については、定量 PCR 法で解析しており、今回の測定結果と定量 PCR 法で解析した結果について比較し、で開発した解析技術のアジア型 2 型糖尿病診断に対する有用性について調査した。

4. 研究成果

ヒト尿および血漿中の tRNA 修飾を網羅的かつ定量的に解析できる技術の開発

40 名の健康人の尿を用いて、36 種類の修飾ヌクレオチドについて網羅的に解析した。36 種類すべての修飾ヌクレオチドについて LC/MS で半定量的に解析を行い、年齢ならびに性別で有意差のある修飾ヌクレオチドがあるか検討したが、認められなかった。

40 名の健康人の尿中の m^5U および ms^2i^6A について、 m^7G を補正コントロールとして解析した。すると、 m^5U では最小値と最大値で約 40 倍の差があり、また ms^2i^6A では、約 10 倍の差が認められた (図 2)。すなわち、 m^7G を補正コントロールとして用いた場合、健康人でも個人差が大きいことが明らかになった。

そこで、内部補正コントロール修飾ヌクレオチドとしてどの修飾ヌクレオチドが最適であるか検討するために、40 名の健康者尿標本中の 36 種類のヌクレオチド量から、ミトコンドリア病発症および進行の原因修飾ヌクレオチドである m^5U および ms^2i^6A とそれ以外のヌクレオチド量を比較検討した。その結果、 m^5U および ms^2i^6A ヌクレオチド量と相

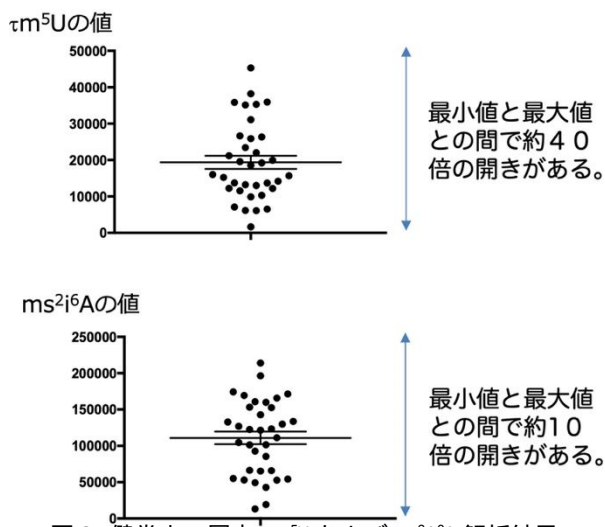


図 2 健康人の尿中 m^5U および ms^2i^6A 解析結果

関するヌクレオチドと相関しないヌクレオチドに区分できることが明らかになった。健康者で相関するヌクレオチドが補正コントロールとして適していると考えられるため、相関するヌクレオチドからピアソン積率相関係数 (r) が 0.75 以上であるヌクレオチドを抽出した。抽出したヌクレオチドの幾何平均を補正コントロールとして、40 名の MELAS 患者と 40 名の健康者尿中の m^5U および ms^2i^6A 量を解析し、比較した。その結果、 m^5U 量は、健康者と比較して MELAS 患者で有意に低かった。P 値は、0.0146 であった。また、 ms^2i^6A 量についても MELAS 患者で有意に低かった。P 値は、 <0.0001 であった。

次に、抽出したピアソン積率相関係数 (r) が 0.75 以上である修飾ヌクレオチドについて、L1 正則化 (Lasso 解析) を実施した。その結果、補正コントロール修飾ヌクレオチドとして acp^3U のみを用いることにより、健康者群でばらつきが最小限に抑えられることが明らかになった。

以上のことから、これまでの技術では酵母から 20 種類の修飾ヌクレオチドしか同定できなかったが、本研究により開発した解析方法を用いると、36 種類の修飾ヌクレオチドが網羅的に解析できることが明らかになった。さらに補正コントロールは、 acp^3U のみで良いことが明らかになった。

tRNA 修飾を標的とした疾患マーカー、予後予測マーカー探索研究

acp^3U を内部補正コントロール修飾ヌクレオチドをとして、尿中の m^5U 量および ms^2i^6A 量を幾何平均した値を MELAS Index とした。そして、MELAS Index について、MELAS 患者と健康者

で比較検討した。すると、MELAS 患者では、MELAS Index が健常者と比較して有意に小さいことが明らかになった (図 3)。

次に受信者動作特性解析 (ROC 解析) を行い、ROC 曲線を描写した。ROC=0.9796、95% CI=0.9519~1.000 であった (図 4)。またカットオフ値の見定めを行った。カットオフ値を 0.687879 とすると、感度：95.24%、特異度：91.43%であった。

現在、ミトコンドリア病診断のためのマーカーとして、クレアチンキナーゼ (CK)、ピルビン酸、乳酸、乳酸/ピルビン酸比、FGF-21 などが用いられている (図 4)。そこで、これらマーカーと MELAS Index について ROC 曲線、Area under the curve (AUC) について比較検討した。MELAS index の AUC が最も大きいことが明らかになった (図 5)。

アジア型 2 型糖尿病診断解析技術開発

44 名アジア型 2 型糖尿病患者の末梢血から、DNA を精製し、CDKAL1 の SNP(rs10946398) を調査し、リスクアレル群と非リスクアレル群に分けた。リスクアレルを保有している患者が 19 名、非リスクアレルを保有している患者が 25 名であった。

次に、末梢血から血漿を分離し、メタノールで除タンパク後、 ms^2t^6A 量について LC/MS で検討した。その結果、リスクアレル群の ms^2t^6A 量が、非リスクアレル群のそれより有意に少ないことが明らかになった ($P < 0.01$)。本結果より、末梢血の修飾ヌクレオシド量を測定することにより、アジア型 2 型糖尿病が診断できる可能性が示唆された。

引用文献

1. Wei, F.Y. et al. Deficit of tRNA^{Lys} modification by Cdkal1 causes the development of type 2 diabetes in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 3598-3608, 2011.
2. Wei, F.Y. et al. 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.
3. Wu, Y. et al. Mtu1-mediated thiouridine formation of mitochondrial tRNAs is required for mitochondrial translation and is involved in the reversible infantile liver injury. *PLoS Genet.* 12, e1006355, 2016.
4. Kaufman, R.J. Beta-cell failure, stress, and type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* 365, 1931-1933 (2011).
5. Horvath, R. and Chinnery P.F. Modifying mitochondrial tRNAs: Delivering what the cell needs. *Cell Metab.* 21, 351-352, 2015.
6. Su, D. et al., Quantitative analysis of ribonucleoside modifications in tRNA by HPLC-coupled mass spectrometry. *Nat. Protoc.* 9, 828-841, 2014.

	MELAS	Normal
Minimum	0.2718	0.5569
25% Percentile	0.4020	0.8382
Median	0.5087	0.9497
75% Percentile	0.6093	1.174
Maximum	0.7431	1.547

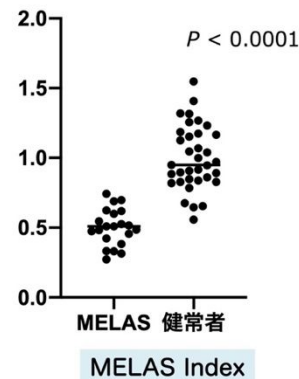


図 3 MELAS 患者と健常人の MELAS Index の比較

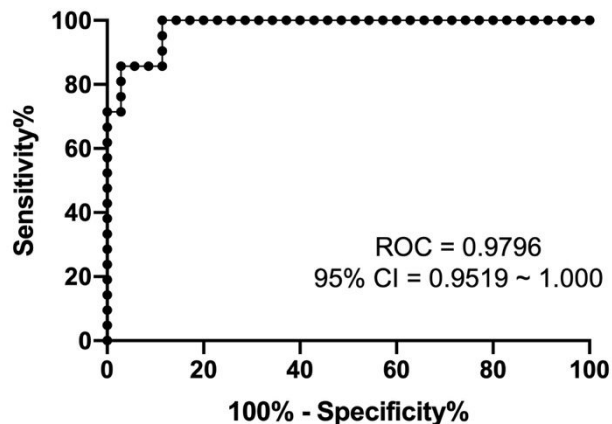


図 4 MELAS Index の ROC 曲線

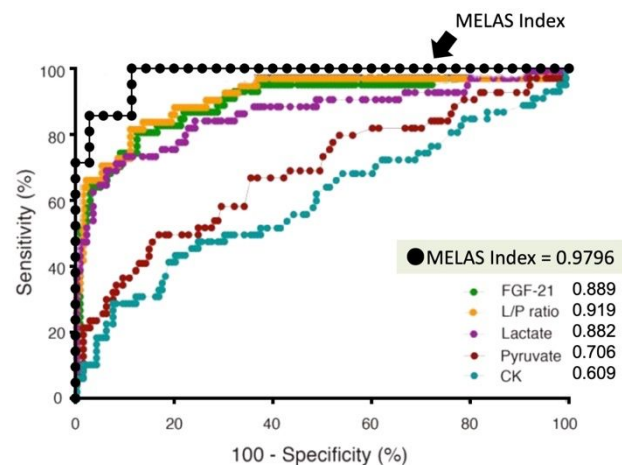


図 5 MELAS Index の ROC 曲線と AUC : 従来の診断マーカーとの比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Wei FY, Tomizawa K.	4. 巻 Supple 2
2. 論文標題 tRNA modifications and islet function.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Diabetes Obes Metab.	6. 最初と最後の頁 20-27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dom.13405.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Mon EE, Wei FY, Ahmad RNR, Yamamoto T, Moroishi T, Tomizawa K.	4. 巻 69
2. 論文標題 Regulation of mitochondrial iron homeostasis by sideroflexin 2.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Physiol Sci.	6. 最初と最後の頁 359-373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12576-018-0652-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Fakruddin M, Wei FY, Suzuki T, Asano K, Kaieda T, Omori A, Izumi R, Fujimura A, Kaitsuka T, Miyata K, Araki K, Oike Y, Scorrano L, Suzuki T, Tomizawa K.	4. 巻 22
2. 論文標題 Defective Mitochondrial tRNA Taurine Modification Activates Global Proteostress and Leads to Mitochondrial Disease.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 482-496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2017.12.051.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Sakakida K, Wei FY, Senokuchi T, Shimoda S, Kakuma T, Araki E, Tomizawa K; Eperisone for Diabetes with Impaired tRNA (EDIT) Study Group.	4. 巻 72
2. 論文標題 Study Design of a Phase II Clinical Trial to Assess the Efficacy and Safety of Eperisone in Japanese Type 2 Diabetes Patients with Risk and Non-risk Alleles of CDKAL1.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta Med Okayama.	6. 最初と最後の頁 423-426
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18926/AMO/56182	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 富澤一仁
2. 発表標題 tRNAメチル化の恒常性
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuhiro Tomizawa
2. 発表標題 Taurine-modification of mitochondrial tRNAs is essential for translation and controls proteostasis network via Opa1
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asiaミーティング（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

難病「ミトコンドリア病」発症の原因解明～治療薬の開発に道筋～ http://www.kumamoto-u.ac.jp/whatsnew/seimei/20180110

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----