

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 5月 1日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659148

研究課題名（和文） 糖尿病大規模コホート研究におけるミトコンドリア DNA 解析

研究課題名（英文） Mitochondrial DNA analysis for diabetes cohort study

研究代表者

康 東天 (KANG DONGCHON)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：80214716

研究成果の概要（和文）：

ミトコンドリア DNA (mtDNA) の転写・複製の制御部位である D-loop 領域の約 1kbp と電子伝達系複合体 I サブユニット 6 をコードする約 1kbp をターゲットとして、上記 3000 人以上の全配列を決定した。現在この配列データを基に、疾患との連鎖する多型について多変量解析を終えた。その結果、P 値が 0.01 未満の多型を見出した。この SNP mtDNA と対照 mtDNA を持つ 2 種類のサイブリッド細胞を作製した。この両細胞間のエネルギー代謝、インスリン様成長因子 (IGF) に対する反応性の違いなどの解析予定。

研究成果の概要（英文）：

The mitochondrial DNA sequences in the two regions (D-loop and ND6) have been determined for over 3 thousand residents in Hisayama town, Fukuoka prefecture. We have found that one single nucleotide polymorphism (SNP) is statistically linked to a metabolic syndrome. We have established the cybrid cell lines which contain the SNP and now we plan to analyze their mitochondrial activities, IGF response, and so on.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	0	1,200,000
2010年度	1,000,000	0	1,000,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	300,000	3,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：

(1)ミトコンドリア (2)ミトコンドリア病 (3)遺伝子診断 (4)糖尿病 (5)コホート研究

1. 研究開始当初の背景

糖尿病の発症とその進展にミトコンドリア機能が深く関わっている。なかでもミトコンドリア DNA はミトコンドリアにおける ATP 合成電子伝達系の必須サブユニットをコードしており、その異常と糖尿病発症が深く関わ

っていることは良く知られている。このことはミトコンドリア DNA 変異が原因のいわゆるミトコンドリア脳筋症において糖尿病がしばしば合併することからも容易に理解できる。ミトコンドリア DNA の A3243G 変異はそ

の典型例である。このように、ミトコンドリア機能に重大な支障をきたす変異による糖尿病発症は多く知られているにも拘らず、いわゆるミトコンドリア DNA 多型と糖尿病発症リスクに関しては、明確な関連を示せたものは国内外で皆無である。

その最大の理由は、耐糖能、血圧、BMI など重要な糖尿病発症リスク関連情報を網羅し、長期的にフォローでき、かつ低い相関でも検出できる十分な数の解析対象者をそろえた研究ができていないことによる。申請者は九州大学の久山町コホート研究という世界的に稀な地域密着長期コホートスタディとタイアップしその問題点を克服することを目指す。

2. 研究の目的

九州大学の久山町コホート研究グループは、近年、年齢、性別等をマッチングさせた 3000 人以上のゲノムサンプルの収集を終え、長期前向きのコホートスタディを新たに開始している（例数はさらに増加中）。特筆すべきはこれら解析対象者全員について、生活習慣情報や一般検査情報に加え、糖負荷試験による精密な耐糖能情報が得られていることである。申請者は共同研究として、この大集団のミトコンドリア DNA 配列を解析することで、これまで誰も明確に示すことが出来なかったミトコンドリア DNA 多型と糖尿病発症リスクとの関連にはっきりとした結論を出すことを目的としている。

3. 研究の方法

(1) DNA 配列決定：ミトコンドリア DNA の D-loop 領域ならび複合体 I サブユニット遺伝子群の DNA 配列の決定。DNA サンプルは久山町研究グループ（連携研究者：清原 裕）から提供を受ける。

(2) 多変量解析：久山町研究グループがこれまで起こってきている方法による（連携、清原 裕）

4. 研究成果

ミトコンドリア DNA の転写・複製の制御部位である D-loop 領域の約 1kbp と電子伝達系複合体 I サブユニット 6 をコードする約 1kbp をターゲットとして、上記 3000 人以

上の全配列を決定した。現在この配列データを基に、疾患との連鎖する多型について多変量解析を終えた。その結果、P 値が 0.01 未満の多型を見出した（下図参照。具体的位置は未発表のため伏せている）。

	メタボ+	(%)	P
領域A			
Aw	882/2574	(34.3)	
Am	73/281	(26.0)	0.0029
領域B			
B1w	933/2758	(33.8)	
B1m	22/96	(22.9)	0.0172
B2w	481/1368	(35.2)	
B2m	474/1487	(31.8)	0.0319

この SNP を持つミトコンドリア DNA と対照配列ミトコンドリア DNA を持つ 2 種類のサイブリッド細胞を作製した。サイブリッド細胞とは、ミトコンドリア DNA を持たない細胞（ ρ^0 細胞と呼ぶ）に目的ミトコンドリアだけを導入したものである。このような細胞は核ゲノムは同一でミトコンドリアゲノム情報だけが異なることになる。このようなサイブリッド細胞を作ることで、ミトコンドリア DNA の配列の違いだけに依存する表現型を探索することが出来る。このサイブリッド細胞を用いてのエネルギー代謝、インスリン様成長因子（IGF）に対する反応性の違いなどの解析予定。

それに加え、一定の糖尿病診断基準を満たした 5000 人の糖尿病患者の血液生化学検査値とトータルゲノムを収集した。今後これらのミトコンドリアゲノム解析なども行う予定である。

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 24 件）

1. Wollen Steen, K., Doseth, B., M, P. W., Akbari, M., Kang, D., Falkenberg, M., Slupphaug, G. (2012) mtSSB may sequester UNG1 at mitochondrial ssDNA and delay uracil processing until the dsDNA conformation is restored. DNA Repair (Amst) 11, 82-91.
2. Takazaki, S., Abe, Y., Yamaguchi, T., Yagi, M., Ueda, T., Kang, D., Hamasaki, N. (2012) Arg 901 in the AE1 C-terminal tail is involved in conformational change but not in substrate binding. Biochim Biophys Acta 1818, 658-65.
3. Morimoto, N., Miyazaki, K., Kurata, T.,

- Ikeda, Y., Matsuura, T., Kang, D., Ide, T., Abe, K. (2012) Effect of mitochondrial transcription factor a overexpression on motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis model mice. *J Neurosci Res* 90, 1200-8.
4. Matsumoto, S., Uchiumi, T., Tanamachi, H., Saito, T., Yagi, M., Takazaki, S., Kanki, T., Kang, D. (2012) Ribonucleoprotein Y-box-binding protein-1 regulates mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) protein expression after serum stimulation through binding to OXPHOS mRNA. *Biochem J* 443, 573-84.
 5. Matsumoto, S., Uchiumi, T., Saito, T., Yagi, M., Takazaki, S., Kanki, T., Kang, D. (2012) Localization of mRNAs encoding human mitochondrial oxidative phosphorylation proteins. *Mitochondrion* 12, 391-398.
 6. Kurihara, Y., Kanki, T., Aoki, Y., Hirota, Y., Saigusa, T., Uchiumi, T., Kang, D. (2012) Mitophagy plays an essential role in reducing mitochondrial production of reactive oxygen species and mutation of mitochondrial DNA by maintaining mitochondrial quantity and quality in yeast. *J Biol Chem* 287, 3265-72.
 7. Guo, J., Zheng, L., Liu, W., Wang, X., Wang, Z., Wang, Z., French, A. J., Kang, D., Chen, L., Thibodeau, S. N., Liu, W. (2011) Frequent Truncating Mutation of TFAM Induces Mitochondrial DNA Depletion and Apoptotic Resistance in Microsatellite-Unstable Colorectal Cancer. *Cancer Res* 71, 2978-87.
 8. Aoki, Y., Kanki, T., Hirota, Y., Kurihara, Y., Saigusa, T., Uchiumi, T., Kang, D. (2011) Phosphorylation of Serine 114 on Atg32 mediates mitophagy. *Mol Biol Cell* 22, 3206-17.
 9. Amamoto, R., Yagi, M., Song, Y., Oda, Y., Tsuneyoshi, M., Naito, S., Yokomizo, A., Kuroiwa, K., Tokunaga, S., Kato, S., Hiura, H., Samori, T., Kang, D., Uchiumi, T. (2011) Mitochondrial p32/CIQBP is highly expressed in prostate cancer and is associated with shorter prostate-specific antigen relapse time after radical prostatectomy. *Cancer Sci* 102, 639-47.
 10. Yamaguchi, T., Ikeda, Y., Abe, Y., Kuma, H., Kang, D., Hamasaki, N., Hirai, T. (2010) Structure of the membrane domain of human erythrocyte anion exchanger 1 revealed by electron crystallography. *J Mol Biol* 397, 179-89.
 11. Yamaguchi, T., Fujii, T., Abe, Y., Hirai, T., Kang, D., Namba, K., Hamasaki, N., Mitsuoka, K. (2010) Helical image reconstruction of the outward-open human erythrocyte band 3 membrane domain in tubular crystals. *J Struct Biol* 169, 406-412.
 12. Uchiumi, T., Ohgaki, K., Yagi, M., Aoki, Y., Sakai, A., Matsumoto, S., Kang, D. (2010) ERAL1 is associated with mitochondrial ribosome and elimination of ERAL1 leads to mitochondrial dysfunction and growth retardation. *Nucleic Acids Res* 38, 5554-5568.
 13. Uchida, Y., Mochimaru, T., Morokuma, Y., Kiyosuke, M., Fujise, M., Eto, F., Harada, Y., Kadowaki, M., Shimono, N., Kang, D. (2010) Geographic distribution of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* strains in Asia. *Int J Antimicrob Agents* 35, 387-91.
 14. Uchida, Y., Mochimaru, T., Morokuma, Y., Kiyosuke, M., Fujise, M., Eto, F., Eriguchi, Y., Nagasaki, Y., Shimono, N., Kang, D. (2010) Clonal spread in Eastern Asia of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* serogroup O25 strains, and associated virulence factors. *Int J Antimicrob Agents* 35, 444-50.
 15. Takazaki, S., Abe, Y., Yamaguchi, T., Yagi, M., Ueda, T., Kang, D., Hamasaki, N. (2010) Mutation of His 834 in human anion exchanger 1 affects substrate binding. *Biochim Biophys Acta* 1798, 903-908.
 16. Sekiguchi, K., Akiyoshi, K., Okazaki, N., Yamada, H., Suzuki, M., Maeda, T., Suenobu, S., Izumi, T., Kang, D. (2010) PLEDs in an infant with congenital protein C deficiency: a case report. *Clin Neurophysiol* 121, 800-1.
 17. Schumann, G., Canalias, F., Joergensen, P. J., Kang, D., Lessinger, J. M., Klauke, R. (2010) IFCC reference procedures for measurement of the catalytic concentrations of enzymes: corrigendum, notes and useful advice. *Clin Chem Lab Med* 48, 615-21.
 18. Ruhanen, H., Borrie, S., Szabadkai, G.,

- Tyynismaa, H., Jones, A.W., Kang, D., Taanman, J.W., Yasukawa, T. (2010) Mitochondrial single-stranded DNA binding protein is required for maintenance of mitochondrial DNA and 7S DNA but is not required for mitochondrial nucleoid organisation. *Biochim Biophys Acta* 1803, 931-939.
19. Sumitani, M., Kasashima, K., Ohta, E., Kang, D., Endo, H. (2009) Association of a novel mitochondrial protein M19 with mitochondrial nucleoids. *J Biochem* 146, 725-732.
20. Pohjoismaki, J.L., Goffart, S., Tyynismaa, H., Willcox, S., Ide, T., Kang, D., Suomalainen, A., Karhunen, P.J., Griffith, J.D., Holt, I.J., Jacobs, H.T. (2009) Human heart mitochondrial DNA is organized in complex catenated networks containing abundant four-way junctions and replication forks. *J Biol Chem* 284, 21446-57.
21. Ono, M., Aoki, Y., Masumoto, M., Hotta, T., Uchida, Y., Kayamori, Y., Kang, D. (2009) High-dose penicillin G-treatment causes underestimation of serum albumin measured by a modified BCP method. *Clin. Chim. Acta* 407, 75-76.
22. Ishimura, M., Saito, M., Ohga, S., Hoshina, T., Baba, H., Urata, M., Kira, R., Takada, H., Kusuhara, K., Kang, D., Hara, T. (2009) Fulminant sepsis/meningitis due to *Haemophilus influenzae* in a protein C-deficient heterozygote treated with activated protein C therapy. *Eur J Pediatr* 168, 673-7.
23. Hokazono, E., Osawa, S., Nakano, T., Kawamoto, Y., Oguchi, Y., Hotta, T., Kayamori, Y., Kang, D., Cho, Y., Shiba, K., Sato, K. (2009) Development of a new measurement method for serum calcium with chlorophosphonazo-III. *Ann Clin Biochem* 46, 296-301.
24. Fukuoh, A., Ohgaki, K., Hatae, H., Kuraoka, I., Aoki, Y., Uchiumi, T., Jacobs, H.T., Kang, D. (2009) DNA conformation-dependent activities of human mitochondrial RNA polymerase. *Genes Cells* 14, 1029-42.

[学会発表] (計9件)

- (1) Dongchon Kang (Invited speaker)
Implications of mitochondrial oxidative

stress in common diseases: International symposium of mitochondrial biomedicine & ASMRM Council Meeting: April 8, 2012

(Hangzhou, China)

(2) 康東天 (特別講演)

ミトコンドリアゲノムと酸化ストレス: T F AMから見る細胞機能

第22回生物試料分析科学会年次学術集会
2012年3月10-11日 (福岡)

(3) Dongchon Kang (Keynote lecture)

Importance of Mitochondrial genome in cellular functions: Oxidative stress and TFAM: Mckay International symposium On mitochondrial medicine in human health and diseases: 9 July, 2011 (Taipei, Taiwan)

(4) 康東天 (招待講演)

生化学検査標準化と共通基準範囲に向けて
第8回日本医学会総会 (東京)

2011年4月8-10日

(5) Dongchon Kang (Invited speaker)

TFAM-associated proteins that are involved in mitochondrial RNA metabolisms: The 7th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine: December 16-18, 2010 (Fukuoka, Japan)

(6) Dongchon Kang (Invited speaker)

Importance of Mitochondrial Genome in Cellular Functions: The 21st Annual Meeting of the Korean Society of Molecular and Cellular Biology (KSMCB): 15-16 October, 2009 (Seoul, Korea)

(7) 康東天 (招待教育講演)

ミトコンドリア病とミトコンドリアDNA
第49回日本臨床化学会年次学術集会 (長崎)
2009年9月18日-20日

(8) Dongchon Kang (Invited speaker)

Mitochondria: genome, ROS, and cellular functions: SFRR (Society of Free Radical Research) International Free Radical School in Japan: 2-6 September 2009

(Yuzawa, Niigata)

(9) Dongchon Kang (Invited speaker)

Aging and mitochondrial dysfunction: The
11th annual lodge meeting for Southern
district of the Korean Society for
Laboratory Medicine: June 18-19, 2010
(Pusan, Korea)

[その他]
ホームページ等
<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/cc1m/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

康 東天 (KANG DONGCHON)
九州大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：80214716

(2) 連携研究者

清原 裕 (KIYOHARA YUTAKA)
九州大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：80161602