

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02014/136870

発行日 平成29年2月16日 (2017. 2. 16)

(43) 国際公開日 平成26年9月12日 (2014. 9. 12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 33 頁)

出願番号 特願2015-504379 (P2015-504379)	(71) 出願人 504159235 国立大学法人 熊本大学 熊本県熊本市中央区黒髪二丁目39番1号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2014/055758	
(22) 国際出願日 平成26年3月6日 (2014. 3. 6)	
(31) 優先権主張番号 特願2013-47278 (P2013-47278)	(74) 代理人 100102015 弁理士 大澤 健一
(32) 優先日 平成25年3月8日 (2013. 3. 8)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 富澤 一仁 熊本県熊本市中央区黒髪二丁目39番1号 国立大学法人熊本大学内
(31) 優先権主張番号 特願2013-150133 (P2013-150133)	(72) 発明者 魏 範研 熊本県熊本市中央区黒髪二丁目39番1号 国立大学法人熊本大学内
(32) 優先日 平成25年7月19日 (2013. 7. 19)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 鈴木 健夫 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大 学法人東京大学内

最終頁に続く

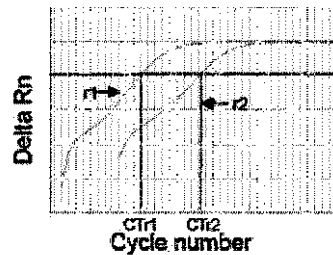
(54) 【発明の名称】 RNA 修飾の簡易検出法、及び該検出法を用いた2型糖尿病の検査方法

(57) 【要約】

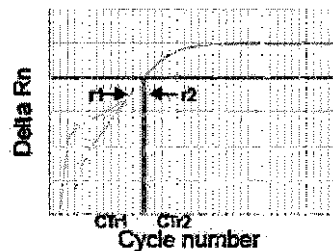
本発明は、少量のRNA試料を用いて、RNAに存在する修飾を検出する方法を提供することを目的とする。本発明は、更には、tRNAに存在する修飾、例えば、チオメチル化を検出する方法を提供することを目的とする。本発明はまた、tRNAのチオメチル化を検出することにより、ヒト2型糖尿病又はそのリスクを診断する方法を提供することを目的とする。

本発明は、RNA試料中のRNAに存在する修飾を、第1のプライマーを用いてRNAから逆転写によりcDNAを生成し、そのcDNAの量を、第2のプライマーを用いてRNAから逆転写により生成されるcDNAの量と比較することにより、RNAに存在する修飾（例えば、チオメチル化）を検出することを特徴とする。

a Total RNAs in WT mice  
ms<sup>2</sup> modification (+)



b Total RNAs in Cdkal1 KO mice  
ms<sup>2</sup> modification (-)



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

R N A に存在する R N A 修飾を検出するための方法であって、  
以下の 2 つの工程：

- a . 第 1 プライマーを用いて、該 R N A から逆転写により c D N A を生成する工程、ここで、該第 1 プライマーは、該 R N A 上の該 R N A 修飾を有する部位を含む領域と相補的に結合するように設計されたオリゴヌクレオチドである、
  - b . 第 2 プライマーを用いて、該 R N A から逆転写により c D N A を生成する工程、ここで、該第 2 プライマーは、該 R N A 上の該 R N A 修飾を有する部位より上流側（3'側）の領域と相補的に結合するように設計されたオリゴヌクレオチドである、
- をそれぞれ別々又は同時に行い、それぞれの工程から生成された c D N A 量の差を測定することにより該 R N A 修飾を検出する方法。

10

**【請求項 2】**

前記工程 a と b を別々に行う請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記 c D N A 量の差を核酸増幅反応又は蛍光法により測定する請求項 1 又は 2 に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記核酸増幅反応が、定量 P C R 法又はリアルタイム定量 P C R 法を用いて行われる、請求項 3 に記載の方法。

20

**【請求項 5】**

前記 c D N A 量の差を、核酸増幅反応における核酸の増幅速度の差として測定する、請求項 4 に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記 R N A が t R N A である請求項 1 ~ 5 のいずれか一つに記載の方法。

**【請求項 7】**

前記 R N A に存在する R N A 修飾が、t R N A に存在するチオメチル化、メチル化又はタウリン化である、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記 t R N A に存在するチオメチル化が、L y s に対応する t R N A、T r p に対する t R N A、P h e に対する t R N A、又は S e r ( U C N ) に対する t R N A のいずれかの 37 番目のアデノシンのチオメチル化である、請求項 7 に記載の方法。

30

**【請求項 9】**

前記 t R N A に存在するチオメチル化が、L y s に対応する t R N A の 37 番目のアデノシンのチオメチル化である、請求項 8 に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記 R N A がヒト組織又はヒト血液由来の R N A を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一つに記載の方法。

**【請求項 11】**

前記 R N A がヒト末梢血由来の R N A を含む請求項 10 に記載の方法。

40

**【請求項 12】**

R N A に存在する R N A 修飾率が既知の少なくとも 2 つの試料、及び R N A 修飾率が未知の試料、のそれぞれについて請求項 1 ~ 11 のいずれか一つに記載の方法を行い、それぞれの試料について測定された c D N A 量の差を示すパラメーターを比較することにより、未知の試料中の R N A 修飾率を測定する方法。

**【請求項 13】**

前記核酸増幅反応が定量 P C R 法又はリアルタイム定量 P C R 法であり、かつ前記パラメーターが、第 1 のプライマー及び第 2 のプライマーを用いた際の標的核酸増幅のための閾値サイクル数 ( threshold cycle ) の差である、請求項 12 に記載の方法。

**【請求項 14】**

50

R N A に存在する R N A 修飾率が未知の試料について請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一つに記載の方法を行い、該試料について測定された c D N A 量の差を示すパラメーターを予め決められている検量線と比較することにより、未知の試料中の R N A 修飾率を測定する方法。

【請求項 1 5】

前記核酸増幅反応が定量 P C R 法又はリアルタイム定量 P C R 法であり、かつ前記パラメーターが、第 1 のプライマー及び第 2 のプライマーを用いた際の標的核酸増幅のための閾値サイクル数 ( threshold cycle ) の差である、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

試料中の R N A に存在する R N A 修飾を検出するためのキットであって、  
該 R N A 上の該 R N A 修飾を有する部位を含む領域と相補的に結合するように設計されたオリゴヌクレオチドである第 1 のプライマー、および  
該 R N A 上の該 R N A 修飾を有する部位より 3 ' 側の領域と相補的に結合するように設計されたオリゴヌクレオチドである第 2 のプライマー、  
を含むキット。

10

【請求項 1 7】

前記 R N A が t R N A である請求項 1 6 に記載のキット。

【請求項 1 8】

前記 R N A に存在する R N A 修飾が、 t R N A に存在するチオメチル化である、請求項 1 7 に記載のキット。

20

【請求項 1 9】

前記 t R N A に存在するチオメチル化が、 L y s に対応する t R N A、 T r p に対する t R N A、 P h e に対する t R N A、又は S e r ( U C N ) に対する t R N A のいずれかの 3 7 番目のアデノシンのチオメチル化である、請求項 1 8 に記載のキット。

【請求項 2 0】

さらに、 P C R を行うための別のプライマーを含む、請求項 1 6 ~ 1 9 のいずれか一つに記載のキット。

【請求項 2 1】

請求項 9 に記載の方法を用いて、前記 t R N A が由来する被験者が 2 型糖尿病患者又はそのリスクがあるか否かを判定する方法。

30

【請求項 2 2】

前記 t R N A は、被験者の組織又は血液に由来する t R N A である請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

請求項 9 に記載の方法を用いて、前記 t R N A が由来する被験者のインスリン分泌能を検定する方法。

【請求項 2 4】

前記 t R N A は、被験者の組織又は血液に由来する t R N A である請求項 2 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【 0 0 0 1】

本発明は、逆転写法を用いて R N A 修飾を検出する方法に関する。本発明はまた、逆転写法と核酸増幅法、例えば P C R 法を組み合わせ、R N A における修飾を検出するとともに、修飾の程度を定量する方法に関する。より詳しくは、R N A の修飾部位を含む領域と結合するプライマー、及び R N A の修飾部位を含まない領域と相補的に結合するプライマーを含む、少なくとも 2 種類のプライマーを用いて逆転写を行い、次いで核酸増幅、例えば P C R を行うことにより、該修飾を検出及び / 又は定量する方法に関する。本発明はまた、該検出方法を用いた、2 型糖尿病に対する遺伝的感受性の検査方法に関する。

【背景技術】

50

## 【 0 0 0 2 】

トランスファーRNA ( tRNA ) は、 mRNA の情報 ( コドン ) を解読して、対応するアミノ酸を合成中のポリペプチド鎖に転移させるアダプター分子であり、タンパク翻訳において中心的な役割を有する小分子RNAである。tRNAのアンチコドンループは化学修飾を受けるが、これは、翻訳の忠実度 ( ファイデリティ ) に必要であり、特にアンチコドンに位置する34番の塩基及びアンチコドンすぐ近傍の37番の塩基における化学修飾は、翻訳の正確性を制御する重要な役割を有する。また、tRNAのアンチコドンループの化学修飾の破綻は、疾患に関係していると考えられている。

## 【 0 0 0 3 】

2型糖尿病は、環境因子及び遺伝因子の組み合わせによって発症する疾患であり、世界中で患者は2億人を超えており、多くの国において患者数は増加している。2型糖尿病は、インスリン抵抗性及び/又は膵臓細胞でのインスリン分泌の異常を特徴としているが、主要なメカニズムはまだ議論されている。2007年以降、世界各国で2型糖尿病患者を対象とした大規模遺伝子多型疫学研究が精力的に行われ、糖尿病の罹患と相関のある遺伝子一塩基多型 ( SNP ) が多く同定されている。中でも、Cdkal1 ( cdk5 regulatory associated protein 1-like 1 ) のSNPsは、2型糖尿病の発症と最も高い相関があることが多くの論文で報告されている。そして、Cdkal1遺伝子の危険対立遺伝子 ( リスクアレル ) を保有している人では、ブドウ糖応答性インスリン分泌が悪いが、肥満、インスリン抵抗性とは相関がないことが明かとされている。また、アジア人種がこの遺伝子リスクアレルを多く保有しており、リスクアレル保有者の表現型を加味すると、Cdkal1のSNPsはアジア人種型2型糖尿病の発症に関与していると推察されている。

## 【 0 0 0 4 】

そして、Cdkal1の生理機能は、リジンに対応するtRNAの37番目のアデニンをチオメチル化して、2-メチルチオ-N<sup>6</sup>-スレオニルカルバモイルアデノシン ( m s<sup>2</sup> t<sup>6</sup> A ) とする酵素であることが明らかにされた ( 非特許文献1 : Arragain S., et al. J. Biol. Chem. 285, 28425-28433 (2010) )、及び非特許文献2 : 富澤ら、上原記念生命科学財団研究報告書、25 (2011) 論文番号77)。m s<sup>2</sup> t<sup>6</sup> A修飾は、リジンコドンの正確なデコーディング ( decoding ) に必要であり ( 非特許文献1 )、同種コドン ( cognate codons ) の読み誤りを防ぐのに、特に翻訳速度が比較的早い場合に読み誤りを防ぐのに重要な役割を果たしていることが示された ( 非特許文献3 : 富澤ら、Endocrine Journal 2011, 58 (10), 819-825 )。

## 【 0 0 0 5 】

Cdkal1欠損マウスにおいては、ミトコンドリアATP生成及び第一相インスリン分泌が損なわれることが観察されること、そして、膵臓細胞特異的Cdkal1ノックアウトマウスは、2型糖尿病の病態を示し、膵島肥大と血中グルコースの制御障害が観察され、高脂肪食で誘発される小胞体ストレスに対して過敏であることが報告されている ( 非特許文献3、及び非特許文献4 : Wei, F. Y. et al. J. Clin. Invest. 121, 3598-3608 (2011) )。

## 【 0 0 0 6 】

すなわち、本発明者らにより、遺伝的あるいは環境的な要因によりCdkal1の発現量や活性が低下すると、リジンtRNAのチオメチル化が低下し、その結果、インスリンの翻訳精度が低下し、2型糖尿病が発症するというメカニズムが示され、リジンtRNAのチオメチル化は糖尿病発症と密接に関連することが判った。一方、ミトコンドリアDNAがコードするミトコンドリアtRNAにもチオメチル化が存在する。ミトコンドリアtRNAのチオメチル化はCdk5rap1によって修飾され、Cdk5rap1遺伝子の一塩基多型変異は白斑症の発症と相関することが報告されている ( 非特許文献1、及び比特許文献5 : Reiter, V. et al. Nucleic Acids Res. 40, 6235-6240(2012) )。このようにtRNAのチオメチル化は疾患の新たなバイオマーカーとして注目されている。

## 【 0 0 0 7 】

tRNAのチオメチル化を検出する方法としては、質量分析法を利用した検出法が一般的に使用されている ( 非特許文献6 : Suzuki, T. et al. Method. Enzymol. 425, 211-22

10

20

30

40

50

9 (2007) )。質量分析法では、まず、組織や細胞から tRNA を精製したのち、ヌクレアーゼにより tRNA を数個のオリゴヌクレオチドまで消化する。その後、消化されたオリゴヌクレオチドを精製し、逆相液体クロマトグラフィ及び質量分析機にて分析することによりチオメチル化を検出する。しかし、この質量分析によるチオメチル化の検出は、多量の RNA (mg 単位) を必要とするが、臨床サンプルは量が一般的に限られ、mg 単位のサンプルを入手することが困難である。そのため、臨床サンプルを用いて、質量分析によりチオメチル化を検出することは困難である。また、質量分析によるチオメチル化検出法は、上述したように多くの前処理が必要であるため、チオメチル化を検出するまでに数日かかり、迅速な検出ができないばかりか、コストが高むという問題がある。更には、多くの試料を同時に扱うことは困難である。その上、質量分析機は非常に高価であり、また、使用するためには熟練した経験が必要とされるため、一般的な医療機関や研究室で分析を行うのは困難であるという問題がある。

10

#### 【0008】

上記したように、質量分析法は時間及びコストがかかり、更には、多量の臨床サンプルを入手することは困難であるという問題のため、RNA のチオメチル化の検出法として質量分析法は臨床応用に対応できない。従って、RNA のチオメチル化を効率よく、つまり迅速にそして安価に検出でき、更には、少ないサンプルを用いて検出できる、新しい検出法が望まれていた。

#### 【先行技術文献】

#### 【非特許文献】

20

#### 【0009】

【非特許文献1】Arragain S., et al. J. Biol. Chem. 285, 28425-28433 (2010)

【非特許文献2】富澤ら、上原記念生命科学財団研究報告書、25 (2011) 論文番号77

【非特許文献3】富澤ら、Endocrine Journal 2011, 58 (10), 819-825

【非特許文献4】Wei, F. Y. et al. J. Clin. Invest. 121, 3598-3608 (2011)

【非特許文献5】Reiter, V. et al. Nucleic Acids Res. 40, 6235-6240 (2012)

【非特許文献6】Suzuki, T. et al. Method. Enzymol. 425, 211-229 (2007)

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0010】

30

本発明は、少量の RNA 試料を用いて、RNA に存在する修飾を検出及び / 又は定量する方法を提供することを目的とする。本発明は、更には、tRNA に存在する修飾、例えば、チオメチル化を検出及び / 又は定量する方法を提供することを目的とする。

本発明はまた、RNA に存在する修飾を検出及び / 又は定量することにより、該修飾に関連する疾患又はそのリスクを診断する方法を提供することを目的とする。例えば、リジン tRNA のチオメチル化を検出及び / 又は定量することにより、ヒト 2 型糖尿病又はそのリスクを診断する方法を提供することを目的とする。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0011】

本発明者らは、上記目的を達成するために鋭意研究した結果、逆転写法及び核酸増幅法 (例えば、定量 PCR 法) を併用することにより、RNA (例えば、tRNA) における修飾 (例えば、チオメチル化) を検出する方法を見だし、本発明を完成した。

40

本発明は以下の通りである。

(1) RNA に存在する RNA 修飾を検出するための方法であって、

以下の 2 つの工程：

a. 第 1 プライマーを用いて、該 RNA から逆転写により cDNA を生成する工程、ここで、該第 1 プライマーは、該 RNA 上の該 RNA 修飾を有する部位を含む領域と相補的に結合するように設計されたオリゴヌクレオチドである、

b. 第 2 プライマーを用いて、該 RNA から逆転写により cDNA を生成する工程、ここで、該第 2 プライマーは、該 RNA 上の該 RNA 修飾を有する部位より上流側 (3' 側)

50

の領域と相補的に結合するように設計されたオリゴヌクレオチドである、  
をそれぞれ別々又は同時に行い、それぞれの工程から生成された cDNA 量の差を測定することにより該 RNA 修飾を検出する方法。

(2) 前記工程 a と b を別々に行う前記 (1) に記載の方法。

(3) 前記 cDNA 量の差を核酸増幅反応又は蛍光法により測定する前記 (1) 又は (2) に記載の方法。

(4) 前記核酸増幅反応が、定量 PCR 法又はリアルタイム定量 PCR 法を用いて行われる、前記 (3) に記載の方法。

(5) 前記 cDNA 量の差を、核酸増幅反応における核酸の増幅速度の差として測定する、前記 (4) に記載の方法。

(6) 前記 RNA が tRNA である前記 (1) ~ (5) のいずれか一つに記載の方法。

(7) 前記 RNA に存在する RNA 修飾が、tRNA に存在するチオメチル化、メチル化又はタウリン化である、前記 (6) に記載の方法。

(8) 前記 tRNA に存在するチオメチル化が、Lys に対応する tRNA、Trp に対する tRNA、Phe に対する tRNA、又は Ser (UCN) に対する tRNA のいずれかの 37 番目のアデノシンのチオメチル化である、前記 (7) に記載の方法。

(9) 前記 tRNA に存在するチオメチル化が、Lys に対応する tRNA の 37 番目のアデノシンのチオメチル化である、前記 (8) に記載の方法。

(10) 前記 RNA がヒト組織又はヒト血液由来の RNA を含む、前記 (1) ~ (9) のいずれか一つに記載の方法。

(11) 前記 RNA がヒト末梢血由来の RNA を含む前記 (10) に記載の方法。

#### 【0012】

(12) RNA に存在する RNA 修飾率が既知の少なくとも 2 つの試料、及び RNA 修飾率が未知の試料、のそれぞれについて前記 (1) ~ (11) のいずれか一つに記載の方法を行い、それぞれの試料について測定された cDNA 量の差を示すパラメーターを比較することにより、未知の試料中の RNA 修飾率を測定する方法。

(13) 前記核酸増幅反応が定量 PCR 法又はリアルタイム定量 PCR 法であり、かつ前記パラメーターが、第 1 のプライマー及び第 2 のプライマーを用いた際の標的核酸増幅のための閾値サイクル数 (threshold cycle) の差である、前記 (12) に記載の方法。

(14) RNA に存在する RNA 修飾率が未知の試料について前記 (1) ~ (11) のいずれか一つに記載の方法を行い、その試料について測定された cDNA 量の差を示すパラメーターを予め決められている検量線と比較することにより、未知の試料中の RNA 修飾率を測定する方法。

(15) 前記核酸増幅反応が定量 PCR 法又はリアルタイム定量 PCR 法であり、かつ前記パラメーターが、第 1 のプライマー及び第 2 のプライマーを用いた際の標的核酸増幅のための閾値サイクル数 (threshold cycle) の差である、前記 (14) に記載の方法。

#### 【0013】

(16) RNA 試料 (例えば、ヒト組織又はヒト血液由来の試料) 中の RNA に存在する RNA 修飾を検出するためのキットであって、  
該 RNA 上の該 RNA 修飾を有する部位を含む領域と相補的に結合するように設計されたオリゴヌクレオチドである第 1 のプライマー、および  
該 RNA 上の該 RNA 修飾を有する部位より 3' 側の領域と相補的に結合するように設計されたオリゴヌクレオチドである第 2 のプライマー、  
を含むキット。

(17) 前記 RNA が tRNA である前記 (16) に記載のキット。

(18) 前記 RNA に存在する RNA 修飾が、tRNA に存在するチオメチル化である、前記 (17) に記載のキット。

(19) 前記 tRNA に存在するチオメチル化が、Lys に対応する tRNA、Trp に対する tRNA、Phe に対する tRNA、又は Ser (UCN) に対する tRNA のいずれかの 37 番目のアデノシンのチオメチル化である、前記 (18) に記載のキット。

10

20

30

40

50

(20) さらに、PCRを行うための別のプライマーを含む、前記(16)~(19)のいずれか一つに記載のキット。

【0014】

(21) 前記(9)に記載の方法を用いて、前記tRNAが由来する被験者が2型糖尿病患者又はそのリスクがあるか否かを判定する方法。

(22) 前記tRNAは、被験者の組織又は血液(好ましくは末梢血)に由来するtRNAである前記(21)に記載の方法。

(23) 前記(9)に記載の方法を用いて、前記tRNAが由来する被験者のインスリン分泌能を検定する方法。

(24) 前記tRNAは、被験者の組織又は血液(好ましくは末梢血)に由来するtRNAである前記(23)に記載の方法。

【発明の効果】

【0015】

本発明によれば、少量のサンプルを用いて、迅速にそして安価に、RNAの修飾、例えばtRNAのチオメチル化を検出できるので、臨床サンプル(例えば、組織又は血液)を用いた種々の遺伝的異常(例えば、これに限定されないが、2型糖尿病の遺伝的感受性)の検出方法として有用である。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】左図は、37番目のアデニンがチオメチル化されている、リジンに対応するtRNAを示している。右図は、Cdkal1によるチオメチル化反応を示している。

【図2】本発明の一つの態様である第1及び第2のリバースプライマーを用いたRNA修飾の検出方法における、逆転写法及びそれに引き続く定量PCR法(qPCR-Mt法)の手順の概略を、リジンtRNAをモデルとして示した図である。

【図3】野生型及びCdkal1 KOマウスから精製したリジンtRNAを用いて、逆転写法及び定量PCR法により、リジンtRNAの $m^5s^2$ 修飾を検出した結果である。

【図4】精製RNAを用いた結果を、計算修飾率(calculated ratio)と期待される修飾率(expected ratio)をそれぞれ、Y軸及びX軸にプロットした図である。

【図5】野生型マウス及びCdkal1 KOマウスから単離した粗精製RNAを用いて、逆転写及び定量PCR法により、リジンtRNAの $m^5s^2$ 修飾を検出した結果である。

【図6】粗精製RNAを用いた結果を、計算修飾率(calculated ratio)と期待される修飾率(expected ratio)をそれぞれ、Y軸及びX軸にプロットした図である。

【図7】野生型マウス及びCdkal1 KOマウスから単離した粗精製RNA(2ng)を用いて、逆転写及び定量PCR法により、リジンtRNAの $m^5s^2$ 修飾を検出した結果を、計算修飾率(calculated ratio)と期待される修飾率(expected ratio)をそれぞれ、Y軸及びX軸にプロットした図である。

【図8】Cdkal1 SNP(rs775840)の2型糖尿病関連リスクアレルをもつ人(Risk群)及び健常人(Cdkal1 SNPのリスクアレルをもたない人)(Non-risk群)の末梢血からの粗精製RNAを用いて、逆転写及び定量PCR法により、リジンtRNAの $m^5s^2$ 修飾を検出した結果である。

【図9】Cdkal1 SNP(rs775840)の2型糖尿病関連リスクアレルをもつ人(図9b)及び健常人(Cdkal1 SNPのリスクアレルをもたない人)(図9a)の末梢血からの精製RNAを用いて質量分析した結果である。図9cは、全リジンtRNA( $m^5s^2t^6A + t^6A$ )中の $m^5s^2$ 未修飾リジンtRNA( $t^6A$ )の割合を示している。

【図10】ミトコンドリアtRNAのA37における $m^5s^2$ 修飾を質量分析した結果である。上段は、 $m^5s^2$ 修飾されたオリゴヌクレオチド、下段は、 $m^5s^2$ 修飾されていないオリゴヌクレオチドのマスクロマトグラムを示している。

【図11】Cdkal1遺伝子変異を有する群(ホモで有する(C/C)群およびヘテロで有する群(G/C))と有さない群(G/G)のそれぞれの個体群におけるリジンRNAのチオメチル化修飾度を示している。

10

20

30

40

50

【図12】リジン tRNA のチオメチル化修飾度とインスリン分泌能との相関を示している。

【発明を実施するための形態】

【0017】

以下、本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施態様に限定されるものではない。

本発明は、RNA 試料中の RNA 上に存在する修飾を、第1のプライマー及び第2のプライマーを用いて逆転写することにより検出することを特徴とする。より具体的には、第1のプライマーを用いて RNA から逆転写により cDNA を生成し、その cDNA の量を、第2のプライマーを用いて RNA から逆転写により生成される cDNA の量と比較することにより、RNA 上に存在する修飾を検出することを特徴とする。

10

【0018】

本発明の検出方法の対象とするものは、RNA であり、例えば、これに限定されないが、tRNA、rRNA、snRNA、mRNA-like ncRNA、snRNA、又は miRNA をあげることができ、好ましくは、tRNA、rRNA、又は snRNA であり、より好ましくは、tRNA である。

また、検出対象とする tRNA も特に限定されず、例えば、Lys に対応する tRNA、Trp に対する tRNA、Phe に対する tRNA、又は Ser (UCN) に対する tRNA 等をあげることができる。

【0019】

20

また、本発明において「RNA 試料」とは、特に制限されず、RNA の種類や含有量にかかわらず、RNA が含まれている試料を意味する。RNA 試料として、例えば、哺乳動物組織、臓器又は血液、例えばヒト組織、臓器又はヒト血液由来の RNA を含む試料をあげることができるが、好ましくは、被験者に過度の負担をかけずまた採取が容易であるヒト末梢血由来の RNA を含む試料である。血液からの白血球 RNA の採取方法は、特に限定されないが、例えば、全血をフィコール比重遠心法で処理して白血球を濃縮した後、RNA 抽出を行う方法や、RNA 採血管、例えば、パクスジーン RNA 採血管 (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社製) に血液を採った後に、製造者のプロトコルに従い白血球を分離することなしに直接 RNA 試料とする方法、をあげることができる。

【0020】

30

本発明の検出方法において、検出できる RNA 修飾は、例えば、これに限定されないが、チオメチル化、メチル化、及びタウリン化をあげることができ、好ましくは、チオメチル化、及びメチル化、より好ましくはチオメチル化である。特定の疾患との関連が判っている或いは推定されている RNA 修飾の場合は、本発明の方法を用いてその修飾を検出又は定量することにより、その疾患に罹っている或いはそのリスクがあるかを判定することができる。例えば、既に記載しているように、リジンに対する tRNA の37番目のアデノシンのチオメチル化は、2型糖尿病と関連しているので、その RNA 修飾を検出又は定量することにより、2型糖尿病に罹っている或いはそのリスクがあるかを判定できる。

本発明の方法において検出できる RNA 修飾と、その修飾との関連が判っている疾患 (すなわち、本発明の方法を用いて、その疾患に罹っている或いはそのリスクがあるかを判定できる疾患) は、例えば、タウリン化とミトコンドリア脳筋症、チオメチル化と糖尿病、メチル化と X 染色体連鎖性精神遅滞をあげることができる。

40

【0021】

本発明で用いられる第1プライマーとは、本発明の検出方法において検出すべき RNA 修飾を有する部位 (例えば、これに限定されないが、チオメチル化された塩基) を含む領域と相補的に結合するように設計されたオリゴヌクレオチドであり、逆転写法、及び必要に応じて本発明においてそれに組み合わされる PCR 法のそれぞれで、プライマーとして機能する限りその長さは特に制限はなく、例えば、10塩基以上、好ましくは、10~30塩基、より好ましくは、15~20塩基である。オリゴヌクレオチド (プライマー) の設計において用いられる上記 RNA 修飾を有する部位を含む領域は、該修飾部位を含む限

50



り特に制限がないが、領域の（中心より）5'側にRNA修飾部位が位置するように選択するのが好ましい。このように第1プライマーを設計することにより、逆転写を、RNA修飾を有する部位の影響を受けずに又は影響を小さくして行うことができる。

#### 【0022】

本発明で用いられる第2プライマーとは、本発明の検出方法において検出すべきRNA修飾を有する部位（例えば、これに限定されないが、チオメチル化された塩基）より上流側（3'側）の任意の領域と相補的に結合するように設計されたオリゴヌクレオチドであり、逆転写法、及び必要に応じて本発明においてそれに組み合わされるPCR法のそれぞれで、プライマーとして機能する限りその長さは特に制限はなく、例えば、10塩基以上、好ましくは、10～30塩基、より好ましくは、15～20塩基である。第2プライマーが相補的に結合する領域がRNA修飾を有する部位の3'側に存在するため、逆転写において、RNA修飾（例えば、これに限定されないが、チオメチル化）が逆転写を阻害する。そのため、上記のように設計された第2プライマーを用いて逆転写を行うと、修飾された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、第1プライマーを用いた逆転写はRNA修飾とは非依存的にcDNAを生成するので、第2プライマーを用いて生成されるcDNA量は、第1プライマーを用いて生成されるcDNA量より少なくなる。第2プライマーが相補的に結合する上記3'側の任意の領域は、特に制限がなく、逆転写においてRNA修飾が逆転写を少なくとも部分的に、好ましくは実質的に阻害する限り、いずれの領域でもよいが、上記3'側の任意の領域は、RNA修飾部位から離れすぎずまた近づきすぎないように設計するのが好ましく、例えば、RNA修飾部位からおおよそ3～10塩基、好ましくはおおよそ3～5塩基はなれたところから始まるように設計するのが好ましい。

10

20

#### 【0023】

このように、RNA修飾部位との位置関係において第1プライマー及び第2プライマーを設計することにより、それぞれのプライマーを用いた逆転写による生成されるcDNA量に差異がより生じやすくなる。

#### 【0024】

また、本発明で用いる第1プライマー及び/又は第2プライマーは、適当な標識剤、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などで標識されてもよい。放射性同位元素としては、例えば、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ をあげることができ、酵素としては、例えば、 $\alpha$ -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素をあげることができ、蛍光物質としては、例えば、フルオレセイン、Alex Fluorをあげることができ、発光物質としては、例えば、ルミノールをあげることができる。

30

#### 【0025】

本発明において用いる第1及び第2プライマーは、検査対象であるRNA及び標的とするRNA修飾（その位置及びその種類）に基づいて、標的の領域と相補的に結合するように設計し、DNA/RNA自動合成機を用いて常法に従って合成することができる。このような第1及び第2プライマーは、各々別個に、水又は適当な緩衝液（例えば、TE緩衝液）中に適当な濃度となるように溶解し、約-20℃で保存することができる。

40

#### 【0026】

本発明の特徴の一つである、第1プライマーにより生成されるcDNA量と第2プライマーにより生成されるcDNA量の差の検出は、その差を検出できる限り、任意の方法を用いることができるが、例えば、核酸増幅法（核酸増幅反応）、質量分析法等をあげることができるが、好ましくは核酸増幅法である。核酸増幅法を用いることにより、cDNAの量の差を、迅速にそして安価に測定することができる。なお、逆転写時に蛍光標識したヌクレオチドを用いることにより、その後の核酸増幅法によるcDNA量の差の検出を省くことも可能となるが、検出感度及び検出精度の点より、逆転写法と核酸増幅法を組み合わせるのが好ましい。

#### 【0027】

核酸増幅反応としては、定量PCR又はリアルタイム定量PCRをあげることができる

50

が、好ましくは、SYBR GREENを用いたインターカレーション法、又はTaqMan（登録商標）プローブ法をあげることができ、これらの方法を用いることにより、RNA修飾の検出ばかりだけでなく、測定対象試料間の比較、さらにはRNA修飾の定量が可能となる。また、検出目的であれば、第1プライマー及び第2プライマーを別々の蛍光物質で標識して、マルチプレックス解析を行うことにより、少ない試料で迅速にRNA修飾を検出することも可能である。

【0028】

第1プライマー又は第2プライマーを用いて生成されたcDNAを増幅する上記核酸増幅反応において用いるプライマーは、逆転写産物である生成されたcDNAと相補的に結合する一对のプライマー（リバープライマーとフォワードプライマー）であれば特に制限なく用いることができるが、好ましくは、一对のプライマーの一方は、第1プライマーと同じである。

10

【0029】

また、本発明の一つの態様である、第1及び第2プライマーを用いてRNAから逆転写によりcDNAを生成し、次いで、生成されたcDNAをリアルタイム定量PCRにより増幅する工程は、別々に行っても、或いは、逆転写に用いたプライマーと同じプライマーをPCRに用いて、リアルタイム装置の中で逆転写反応も行うOne-step定量RT-PCRであってもよい。

【0030】

PCR法を組み合わせた本発明の検出法において、第1プライマーにより生成されるcDNA量と第2プライマーにより生成されるcDNA量の差の検出は、DNAの増幅を経時的に（PCRのサイクル数の増加とともに）観察して検出しても、或いは、任意のPCRのサイクル数におけるDNA量の差として検出してもよい。

20

【0031】

本発明の一つの態様である、逆転写法と定量PCR法を組み合わせたRNA修飾の検出方法は、検出感度が非常に高く、例えば、僅か1ngの全RNAを用いてRNA修飾があるか否かの検出をすることが可能であり、従来の質量分析法に比べて約1000倍以上の感度を有する。また、逆転写後にPCRを行うという、2ステップのRT-PCR法或いは1ステップRT-PCR法であるため、短時間、例えば2～3時間以内で検出操作を終了でき、また、多量のサンプルを同時に処理することも可能である。さらには、質量分析法に比べて、必要となる機器も安価であり、操作も簡便である。

30

【0032】

本発明の別の一つの態様においては、RNA試料中のRNAに存在するRNA修飾を検出するためのキットであり、RNA修飾を有する部位を含む領域と相補的に結合するように設計されたオリゴヌクレオチドである第1プライマー、及びRNA修飾を有する部位より3'側の領域と相補的に結合するように設計されたオリゴヌクレオチドである第2プライマーを含むキットである。また、上記キットは、第1及び第2プライマーを含み、更に検出法に応じて、検出を行うのに必要な他の成分を構成として含んでもよい。例えば、PCR法を行うための、別のプライマー（フォワードプライマー及び/又はリバープライマー）やPCRを行うための、反応緩衝液、DNAポリメラーゼ等をさらに含むことができる。

40

【0033】

本発明のさらに別の一つの態様においては、RNA試料中のtRNAに存在するチオメチル化を検出するための方法であって、tRNAに対して相補的に結合する少なくとも2つのプライマー、すなわち、検出すべきチオメチル化された塩基を含む領域と相補的に結合するように設計されたオリゴヌクレオチドである第1プライマー、及び検出すべきチオメチル化された塩基より3'側の任意の領域と相補的に結合するように設計されたオリゴヌクレオチドを用いることを特徴とする。

第1プライマー及び第2プライマーは、上記条件を満たし、かつ、逆転写法、及び必要に応じて本発明においてそれに組み合わされるPCR法のそれぞれでプライマーとして機

50

能する限り特に制限はなく設計することができ、その長さは、特に制限がないが、例えば、10塩基以上、好ましくは、10～30塩基、より好ましくは、15～20塩基に設計できる。

第1プライマーは、上記のように標的のチオメチル化塩基部位を含む領域と相補的に結合するように設計され、より好ましくは、標的のチオメチル化塩基部位がプライマーのほぼ中心の位置に対応するように設計する。この第1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tRNAの全量に相関する。一方、第2プライマーは、標的のチオメチル化塩基部位より3'側に位置するように設計されているので、チオメチル化部位のチオメチル基が逆転写の効率を阻害するため、第2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生じる。その結果、tRNAのチオメチル化の程度に相関して、第2プライマーを用いて生成されるcDNA量は、第1プライマーを用いて生成されるcDNA量より少なくなる。

#### 【0034】

本発明のさらに一つの態様においては、上記のチオメチル化の検出において、第1プライマーと第2プライマーから生成されるcDNA量の差を、逆転写後に、さらに、上記した核酸増幅法、例えば、リアルタイムPCR（例えば、SYBR GREENを用いたインターカレーション法、又はTaqMan（登録商標）プローブ法）を用いて測定することができる。また、上記したように、2ステップのRT-PCR法或いは1ステップRT-PCR法のいずれも用いることができる。

#### 【0035】

本発明のさらに別の一つの態様において、上記のtRNAのチオメチル化を検出する方法を用いて、被験者由来のtRNAのチオメチル化（リジンに対応するtRNAの37番目のアデニンのチオメチル化）を検出することにより、被験者が2型糖尿病患者又はそのリスクがあるか否かを判定する方法が提供される。それにより、2型糖尿病の正確で、簡便かつ迅速な検査が可能であり、2型糖尿病の発症前検査、リスク検査、早期検査も可能である。

本発明において「被験者」とは、特に制限されず、2型糖尿病患者、2型糖尿病に対する感受性を有する者、及び健常人を含む。

また、本発明の検査方法を用いて、2型糖尿病を発症した患者から採取した試料を検査することにより、2型糖尿病の原因としてtRNAのチオメチル化に異常があるか否かを判断可能である。

#### 【0036】

本発明の別の一つの態様において、2型糖尿病に対する遺伝的感受性の検査キットが提供され、該キットは、少なくとも、リジンに対応するtRNAの37番目のアデノシンを含む領域と相補的に結合するように設計されたオリゴヌクレオチドである第1プライマー、及びリジンに対応するtRNAの37番目より3'側の任意の領域と相補的に結合するように設計されたオリゴヌクレオチドである第2プライマーを含む。

#### 【0037】

上記したように、本発明の検出方法を用いると、短時間・低コスト・高感度でRNA修飾（例えば、チオメチル化）を検出することが可能である。また、本発明を用いれば、僅かなRNA試料（例えば、検体の末梢血からのtRNA）を用いて、RNA修飾（例えば、tRNAのチオメチル化）を検出し、疾患（例えば、糖尿病）の発症リスクの診断を行うことができ、更には、患者に対しては、テーラーメイド医療（個人の体質に合わせた治療、例えば治療薬の種類や投薬方法）を開発することができる。

#### 【実施例】

#### 【0038】

以下、実施例により、本発明を具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

実施例1：tRNAのチオメチル化の検出

10

20

30

40

50

(1) リジンに対応する tRNA ( tRNA<sup>Lys</sup> (UUU) ) のチオメチル化

2型糖尿病の発症と最も高い相関があるSNPsが確認されているCdkal1は、リジンに対応するtRNAの37番目のアデノシンをチオメチル化して、2-メチルチオ-N<sup>6</sup>-スレオニルカルバモイルアデノシン (ms<sup>2</sup>t<sup>6</sup>A) とする酵素である。チオメチル修飾 (37A (ms<sup>2</sup>)) されたリジンtRNA及びCdkal1によるチオメチル化反応を図1に模式的に示す。

## 【0039】

(2) tRNA<sup>Lys</sup> (UUU) の検出

tRNA<sup>Lys</sup> (UUU) の検出の概略図を図2に示す。tRNA<sup>Lys</sup> (UUU) のユニーク部位 (チオメチル化部位) を標的とするように2つのリバースプライマーを用いて逆転写を行った。第1のリバースプライマーは、チオメチル化部位 (37番目のアデノシン) を含む特異的領域にアニールするように設計し、一方、第2のリバースプライマーは、チオメチル化部位の3'方向の下流の特異的配列にアニールするように設計した。まず、tRNA<sup>Lys</sup> (UUU) を線状化し (Step 1)、ついで、第1又は第2のリバースプライマーを用いて、逆転写を行った (Step 2)。その後、第1のリバースプライマー又は第2のリバースプライマーのいずれかによって生成されたcDNAを、定量PCRを行って増幅した (Step 3)。

完全に修飾されたtRNA<sup>Lys</sup> (UUU) の逆転写においては、37番目のアデノシンのms<sup>2</sup>修飾が逆転写を減衰させるので、第2のリバースプライマーによって生成されるcDNA量は、第1のリバースプライマーによって生成されるcDNA量より少なくなる。一方、部分的に修飾されたtRNA<sup>Lys</sup> (UUU) の場合は、修飾の減少に応じて、第2のリバースプライマーによって生成されるcDNA量は、第1のリバースプライマーによって生成されるcDNA量に近づく。

## 【0040】

## (3) RNAの単離

## (3-1) 粗精製RNAの単離

全RNA単離物 (粗精製RNA) は、細胞又は組織 (マウス肝臓) より、TRIzol試薬 (Invitrogen) を用いたグアニジンチオシアネート/フェノール/クロロフォルム法により、製造元のプロトコルに従い単離した。

## (3-2) RNAの精製

個々のtRNA<sup>Lys</sup> (UUU) は、Miyachi, et al. Nucleic Acids Res. 35, e24 (2007) に記載の方法に従い、往復循環クロマトグラフィ (RCC) 法を用いて精製した。

## (3-3) 末梢血からのRNAの単離

全RNA (粗精製RNA) は、1.5mlの末梢血から、QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen) を用いて製造元のプロトコルに従って単離した。精製RNAは、50mlの末梢血から、過剰のQIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen) の低張液を加えて赤血球を破壊し、その後、TRIzolを用いて白血球中の全RNAを精製することにより、単離した。

## (4) 質量分析

単離・精製したそれぞれのtRNA (tRNA<sup>Lys</sup> (UUU)、tRNA<sup>Trp</sup>、tRNA<sup>Phe</sup>、tRNA<sup>Ser</sup> (UCN)、及びtRNA<sup>Leu</sup> (UUR)) を消化してオリゴヌクレオチドにした後、Weira (非特許文献4) に記載の方法に従って、液体クロマトグラフィ/質量分析を行った。

## (5) プライマー

tRNA<sup>Lys</sup> のms<sup>2</sup>修飾を測定するために設計したプライマー配列 (フォワードプライマー (forward primer) 配列 (配列番号2)、第1リバースプライマー (reverse Primer r1) 配列 (配列番号3)、第2リバースプライマー (reverse Primer r2) 配列 (配列番号4)) を、tRNA<sup>Lys</sup> 配列 (配列番号1) (ms<sup>2</sup>修飾部位である37番目のアデノシン (A37) を矢印で示す) とともに以下の表1に示す。

## 【0041】

10

20

30

40

50

## 【表 1】

tRNA<sup>Lys</sup>(UUU) (配列番号 1)

5'-GCCCCGATAGCTCAGTCGGTAGAGCATCAGACTTTTAACTCTGAGGGTCCAGGGTTCAAGTCCCTGTTCGGGCG

HuMsLys\_forward primer: GTCGGTAGAGCATCAGACTT (配列番号2)  
 HuMsLys\_reverse primer r1: CCTGGACCCTCAGATTA AAA (配列番号3)  
 HuMsLys\_reverse primer r2: GAACAGGGACTTGAACCCTG (配列番号4)

10

マウスミトコンドリア tRNA<sup>Trp</sup>、tRNA<sup>Phe</sup>、及び tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>、及び tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> の m s<sup>2</sup> 修飾を測定するために設計したプライマー配列 (フォワードプライマー (forward primer) 配列、第 1 リバースプライマー (reverse Primer r 1) 配列、第 2 リバースプライマー (reverse Primer r 2) 配列) を、それぞれの tRNA 配列 (m s<sup>2</sup> 修飾部位である A 3 7 を矢印で示す) とともに以下の表 2 に示す。

【 0 0 4 2 】

## 【表 2】

tRNA<sup>Trp</sup>: (配列番号5)

5'-AGAAGTTTAGGATATACTAGTCCGCGAGCCTTCAAAGCCCTAAGAAAACACACAAGTTTAACTTCTG

MsTrp\_forward primer: GGATATACTAGTCCGCGAGC (配列番号6)

MsTrp\_reverse primer r1: GTGTTTTCTTAGGGCTTTGA (配列番号7)

MsTrp\_reverse primer r2: GTTAAACTTGTGTGTTTTCTTAG (配列番号8)

20

tRNA<sup>Phe</sup>: (配列番号9)

5'-GTTAATGTAGCTTAATAACAAAGCAAAGCACTGAAAATGCTTAGATGGATAATTGTATCCCATAAACA

MsPhe\_forward primer: GCTTAATAACAAAGCAAAGCA (配列番号 10)

MsPhe\_reverse primer r1: TATCCATCTAAGCATTTTCA (配列番号 11)

MsPhe\_reverse primer r2: TGGGATACAATTATCCATCT (配列番号 12)

tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> (配列番号13)

5'-GAGAAAGACATATAGGATATGAGATTGGCTTGAACCAATTTTAGGGGGTTCGATTCCTTCTTTCTTA

MsSerUCN\_forward primer: CATATAGGATATGAGATTGGC (配列番号 14)

MsSerUCN\_reverse primer r1: AACCCCTAAAATTGGTTTCA (配列番号 15)

MsSerUCN\_reverse primer r2: GAAGGAATCGAACCCCTAA (配列番号 16)

30

tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>: (配列番号 17)

5'-ATTAGGGTGGCAGAGCCAGGAAATTGCGTAAGACTTAAAACCTTGTTCAGAGGTTCAAATCCTCTCCCTAATA

MsLeuUUR\_forward primer: AGCCAGGAAATTGCGTAAGA (配列番号 18)

MsLeuUUR\_reverse primer r1: CCTCTGGGAACAAGGTTTTA (配列番号 19)

MsLeuUUR\_reverse primer r2: AGGATTTGAACCTCTGGGAA (配列番号 20)

40

## Sequence of mouse mitochondrial tRNAs and primers.

ヒトミトコンドリア tRNA<sup>Trp</sup>、tRNA<sup>Phe</sup>、及び tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>、及び tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> の m s<sup>2</sup> 修飾を測定するために設計したプライマー配列 (フォワードプライマー (forward primer) 、第 1 リバースプライマー (reverse Primer r 1) 配列、第 2 リバースプライマー (reverse Primer r 2) 配列) を、それぞれの tRNA 配列 (m s<sup>2</sup> 修飾部位である A 3 7 を矢印で示す) とともに以下の表 3 に示す。

【 0 0 4 3 】

【表 3】

tRNA <sup>Trp</sup> : (配列番号 21)	↓	
5' -AGAAATTTAGGTTAAATACAGACCAAGAGCCTTCAAAGCCCTCAGTAAGTTGCAATACTTAATTTCTG		
HuTrp_forward primer: GGTAAATACAGACCAAGAGC		(配列番号 22)
HuTrp_reverse primer r1: CAACTTACTGAGGGCTTTGAA		(配列番号 23)
HuTrp_reverse primer r2: TTAAGTATTGCAACTTACTGAGG		(配列番号 24)
tRNA <sup>Phe</sup> : (配列番号 25)	↓	
5' -GTTTATGTAGCTTACCTCCTCAAAGCAATACACTGAAAATGTTTAGACGGGCTCACATCACCCATAAACA		
HuPhe_forward primer: CTCCTCAAAGCAATACACTG		(配列番号 26)
HuPhe_reverse primer r1: AGCCCGTCTAAACATTTTCA		(配列番号 27)
HuPhe_reverse primer r2: GGGTGATGTGAGCCCGTCTA		(配列番号 28)
tRNA <sup>Ser(UCN)</sup> (配列番号 29)	↓	
5' -GAAAAAGTCATGGAGGCCATGGGGTTGGCTTGAACCAGCTTTGGGGGGTTCGATTCCTTCTTTTTTGG		
HuSerUCN__forward primer: GAGGCCATGGGGTTGG		(配列番号 30)
HuSerUCN__reverse primer r1: CCCAAAGCTGGTTTCAAGC		(配列番号 31)
HuSerUCN__reverse primer r2: AATCGAACCCCCCAAAGC		(配列番号 32)
tRNA <sup>Leu(UUR)</sup> : (配列番号 33)	↓	
5' -GTTAAGATGGCAGAGCCCGGTAATCGCATAAACTTAAAACCTTACAGTCAGAGGTTCAATTCCTTCTTAAACA		
HuLeuUUR__forward primer: GCCCGGTAATCGCATAAAAC		(配列番号 34)
HuLeuUUR__reverse primer r1: CCTCTGACTGTAAAGTTTTAA		(配列番号 35)
HuLeuUUR__reverse primer r2: GGAATTGAACCTCTGACTGTA		(配列番号 36)

## Sequence of human mitochondrial tRNAs and primers

## 【0044】

(6) 逆転写及び定量PCR (本明細書中、tRNAのチオメチル化の検出のために用いる際は、「qPCR-MtR」という場合がある)

細胞又は組織 (例えば、肝臓) より単離した全RNA (粗精製又は精製RNA) を、特にことわりのない限り、RNase-free水で100ng/mlに調製した。ゲノムの混入を避けるために、20µlの反応液中、2µl (200ng) の全RNAを5UnitsのDNase I (Roche) で、37℃で20分間分解し、次いで、75℃で10分間処理することにより、DNase Iを熱不活性化した。DNase処理後に、消化した全RNAの2.5µlを、20µMの第1リバースプライマー又は第2リバースプライマーを含む1µlの溶液と混合し、次いで、65℃で10分間、熱変性を行った後、少なくとも5分間氷上にて急速に冷却した。氷上にて、組換え逆転写酵素 (Transcriptor、Roche) を終濃度が、0.5unit/µlとなるように添加した。逆転写を、10µlの全反応容量中で、55℃で30分間行い、次いで、85℃で5分間、熱不活性化を行った。第1又は第2リバースプライマーから合成されたcDNAについて、SYBR Premix Ex Taq Kit (Takara) 及びABI PRISM 7300 Real-Time PCRシステム (Applied biosystems) を用いて、製造元のプロトコールに従い、定量PCRを行った。

## 【0045】

(7) ノックアウトマウス及び細胞培養

Cdkal1ノックアウトマウスは、Wei, F. Y. et al. J. Clin. Invest. 121, 3598-3608 (2011) (非特許文献4) に記載の方法に従って作成した。偏在的なCdk5rap1の発現を取り除くために、10xP配列よって隣接されたCdk5rap1のエクソン4及び5をもったトランスジェニックマウスを、CAGプロモーターの制御下にあるCreリコンビナーゼを発

現しているトランスジェニックマウスと交配させた。全ての動物実験は、熊本大学の動物倫理委員会の承認を得た手順書 (ID:B24-134、B24-132) に従って行った。

(8) トランスフェクション

HeLa細胞は、10% FBSを含む高グルコース濃度DMEM培地 (Invitrogen) で培養した。siRNAのトランスフェクションは、以下のようにして行った。HeLa細胞を、24ウェルプレートに、30%の密度になるように播種した。24時間後、細胞に、ヒトCdk5rap1をターゲットとするsiRNA (Dharmacon) 又はネガティブコントロールsiRNA (Ambion) を、Lipofectamine RNAiMAX試薬 (Invitrogen) を用いて、終濃度50nMにて導入した。トランスフェクション3日後に、全RNAを上記の方法を用いて単離した。

【0046】

(9) Cdkal1の一塩基遺伝子多型 (SNP) の同定

QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) を用いて、200 $\mu$ lの末梢血からゲノムDNAを精製し、蒸留水で10ng/ $\mu$ lとなるように調製した。Cdkal1のSNP (rs7754840) は、Taqman SNP Genotyping Assay Kit (Applied biosystems) を用いて検査した。ヒトのゲノム試料を用いた実験は、熊本大学の倫理委員会の承認 (承認番号: ゲノム159) を得て行った。

【0047】

実施例2 : 野生型マウス及びCadKal1 KOマウスの精製RNAを用いた $m^2$ 修飾の検出

上記に記載のRNAの単離方法に従い、野生型マウスの肝臓より37番目のアデノシンが $m^2$ によって完全に修飾されているtRNA<sup>Lys</sup> (UUU) を、CadKal1 KOマウスの肝臓より $m^2$ 修飾が完全に止められているtRNA<sup>Lys</sup> (UUU) を精製した。精製したそれぞれのtRNA<sup>Lys</sup> (UUU) を用いて、逆転写、次いで定量PCRを行った。結果を図3に示す。図3aは、野生型マウスからのtRNA<sup>Lys</sup> (UUU) を用いてqPCR-MtRを行った結果を、図3bは、CadKal1 KOマウスからのtRNA<sup>Lys</sup> (UUU) を用いてqPCR-MtRを行った結果を示している。

完全に $m^2$ 修飾された野生型tRNA<sup>Lys</sup> (UUU) をテンプレートとして用いた場合は、第2のリバースプライマー (r2) によって得られる閾値サイクル数 (threshold cycle: CT) CT<sub>r2</sub>は、第1のリバースプライマー (r1) によって得られる閾値サイクル数CT<sub>r1</sub>に比べて、顕著に増加していた (図3a)。一方、 $m^2$ 修飾を欠いているtRNA<sup>Lys</sup> (UUU) の場合は、CT<sub>r2</sub>は、CT<sub>r1</sub>に近づいていた。これらの結果より、第2のリバースプライマーを用いた場合は、37番目のアデノシンの $m^2$ 修飾によって逆転写が減らされているが、第1のリバースプライマーを用いた場合は、逆転写に影響がないことが確認された。すなわち、CT<sub>r2</sub>は $m^2$ 修飾の程度を反映し、CT<sub>r1</sub>は、tRNA試料中の全tRNA分子を反映していることが判った。

【0048】

実施例3 : 試料中のtRNAにおける $m^2$ 修飾率の測定

慣用のddCT法と以下の計算モデルを用い、修飾率を表す指標として、任意の試料中のCT<sub>r1</sub>とCT<sub>r2</sub>間の差 ( $dCT_{r2r1} = CT_{r2} - CT_{r1}$ ) を用いることができる。すなわち、 $dCT_{r2r1}$ 値が小さければ小さいほど、tRNAの $m^2$ 修飾は少ない。また、以下の計算式に基づき、tRNAの $m^2$ 修飾率について既知の2つの参照試料を用いて、未知の試験試料中のtRNAの $m^2$ 修飾率を求めることができる。

【0049】

10

20

30

40

【数 1】



$m s^2$ 修飾をもつ tRNA 分子の総数を  $L^{ms}$ 、 $m s^2$ 修飾をもたない tRNA 分子の総数を  $L^{t6}$  とし、全 RNA 分子数を  $L^{total}$  とする。従って、絶対修飾率 ( $x$ ) は以下の式で表される。

10

【0050】

【数 2】

$$(1) L^{total} = L^{ms} + L^{t6}, \quad (2) x = \frac{L^{ms}}{L^{total}}, \quad 1 - x = \frac{L^{t6}}{L^{total}}, \quad 0 \leq x \leq 1$$

逆転写の間、 $m s^2$ 修飾をもつ tRNA は、第 1 のリバースプライマー ( $r 1$ ) 又は第 2 のリバースプライマー ( $r 2$ ) によって、それぞれの率、 $R T_{r1}^{ms}$  又は  $R T_{r2}^{ms}$  で転写される。一方、 $m s^2$ 修飾をもたない tRNA は、第 1 のリバースプライマー ( $r 1$ ) 又は第 2 のリバースプライマー ( $r 2$ ) によって、それぞれの率、 $R T_{r1}^{t6}$  又は  $R T_{r2}^{t6}$  で転写される。 $r 1$  による逆転写は、 $m s^2$ 修飾とは関係ないので、以下の式 (3) で表され、一方、 $r 2$  による逆転写は、 $m s^2$ 修飾により減ぜられるので、以下の式 (4) で表される。

20

【0051】

【数 3】

$$(3) R T_{r1}^{ms} = R T_{r1}^{t6} = R T_{r1}, \quad (4) R T_{r2}^{ms} < R T_{r2}^{t6}, \quad \frac{R T_{r2}^{ms}}{R T_{r2}^{t6}} = D, \quad 0 < D < 1$$

$L^{ms}$  及び  $L^{t6}$  を含む全 RNA 試料を用いて逆転写を行うと、以下の式 (5) ~ (7) のように表すことができる。

30

【0052】

【数 4】

$$(5) R_0 = R T_{r1}^{ms} \cdot L^{ms} + R T_{r1}^{t6} \cdot L^{t6} = R T_{r1} \cdot L^{total},$$

$$(6) M_0 = R T_{r2}^{ms} \cdot L^{ms} + R T_{r2}^{t6} \cdot L^{t6} = (x \cdot R T_{r2}^{ms} + (1 - x) \cdot R T_{r2}^{t6}) \cdot L^{total}$$

$$(7) \text{ If } x = a, \text{ then } M_{0a} = (a \cdot R T_{r2}^{ms} + (1 - a) \cdot R T_{r2}^{t6}) \cdot L^{total}, \quad R_{0a} = R T_{r1} \cdot L^{total}$$

ここで、 $R_0$  又は  $M_0$  は、それぞれ、プライマー  $r 1$  又は  $r 2$  を用いて生成された cDNA 量である。 $R_{0a}$  又は  $M_{0a}$  は、それぞれ、修飾率  $a$  の全 RNA 試料を用いて、プライマー  $r 1$  又は  $r 2$  で生成された cDNA 量である。以下の方程式 (8) は、引き続いての PCR による指数関数的増幅を示している。

40

【0053】

【数 5】

$$(8) X_T = X_0 \cdot (1 + E)^{CT_x}, \quad \text{従って } X_0 = X_T \cdot (1 + E)^{-CT_x},$$

ここで、 $X_T$  は、標的分子の閾値数 (threshold number) であり、 $CT_x$  は、標的増幅のための閾値サイクル数 (threshold cycle) であり、 $E$  は、標的増幅効率である。

50



修飾率 a の任意の試料からプライマー r 1 又は r 2 により生成された cDNA を用いて PCR を行っている間は、以下の関係式 ( 9 ) で表される。

【 0 0 5 4 】

【 数 6 】

$$(9) \quad M_{0a} = M_T \cdot (1 + E)^{-CT_{r2a}}, R_{0a} = R_T \cdot (1 + E)^{-CT_{r1a}}$$

$R_{0a}$  で  $M_{0a}$  を割ると、以下の式 ( 1 0 ) が与えられる。

【 0 0 5 5 】

【 数 7 】

$$(10) \quad r_a = \frac{M_{0a}}{R_{0a}} = \frac{M_T}{R_T} \cdot (1 + E)^{-(CT_{r2a} - CT_{r1a})} = \frac{M_T}{R_T} \cdot (1 + E)^{-dCT_{r2a-r1a}},$$

$$-(CT_{r2a} - CT_{r1a}) = -dCT_{r2ar1a}$$

ここで、 $CT_{r2a}$  は、プライマー r 2 によって生成される  $M_{0a}$  の増幅の閾値サイクル数であり、 $CT_{r1a}$  は、プライマー r 1 によって生成される  $R_{0a}$  の増幅の閾値サイクル数である。

修飾率 a 又は b の試料を比較すると、以下の式 ( 1 1 ) となる。

【 0 0 5 6 】

【 数 8 】

$$(11) \quad \frac{r_b}{r_a} = (1 + E)^{-(dCT_{r2br1b} - dCT_{r2ar1a})} = (1 + E)^{-ddCT_{ba}},$$

$$-(dCT_{r2br1b} - dCT_{r2ar1a}) = -ddCT_{ba}$$

一方、式 ( 4 ) と式 ( 7 ) から以下の式 ( 1 2 ) が求められる。

【 0 0 5 7 】

【 数 9 】

$$(12) \quad \frac{r_b}{r_a} = \frac{M_{0b}}{R_{0b}} \cdot \frac{R_{0a}}{M_{0a}} = \frac{b \cdot \frac{RT_{r2}^{ms}}{RT_{r2}^{ls}} + (1-b)}{a \cdot \frac{RT_{r2}^{ms}}{RT_{r2}^{ls}} + (1-a)} = \frac{1-b(1-D)}{1-a(1-D)}$$

修飾率 w、k 又は s の個々の試料から以下 ( 1 3 ) の式が導かれる。

【 0 0 5 8 】

【 数 1 0 】

$$\frac{r_w}{r_k} = (1 + E)^{-(dCT_{r2wr1w} - dCT_{r2kr1k})} = (1 + E)^{-ddCT_{wk}}$$

$$\frac{r_s}{r_k} = (1 + E)^{-(dCT_{r2sr1s} - dCT_{r2kr1k})} = (1 + E)^{-ddCT_{sk}}, \text{ よって}$$

$$(13) \quad s = \frac{1 - (1+E)^{-ddCT_{sk}}}{1 - (1+E)^{-ddCT_{wk}}} w + \frac{(1+E)^{-ddCT_{sk}} - (1+E)^{-ddCT_{wk}}}{1 - (1+E)^{-ddCT_{wk}}} k$$

もし、修飾率 w 及び k が既に判っていれば、修飾率 s を式 ( 1 3 ) から求められる。修飾率 w、k、s が判らない場合でも、それぞれの間の修飾率の相対比較は、以下の式で表さ

10

20

30

40

50

れるように、 $dCT_{r_2r_1}$ を用いて容易である。

【 0 0 5 9 】

【 数 1 1 】

$$\frac{r_w}{r_w} = (1 + E)^{-ddCT_{ww}} = 1$$

$$\frac{r_k}{r_w} = (1 + E)^{-ddCT_{kw}},$$

$$\frac{r_s}{r_w} = (1 + E)^{-ddCT_{sw}}$$

10

If  $k > w > s$ , よって

$$(1 + E)^{-ddCT_{kw}} < (1 + E)^{-ddCT_{ww}} = 1 < (1 + E)^{-ddCT_{sw}}$$

$$ddCT_{kw} > ddCT_{ww} = 0 > ddCT_{sw}$$

$$dCT_{r_2kr_1k} - dCT_{r_2wr_1w} > dCT_{r_2wr_1w} - dCT_{r_2wr_1w} > dCT_{r_2sr_1s} - dCT_{r_2wr_1w}$$

20

$$\therefore dCT_{r_2kr_1k} > dCT_{r_2wr_1w} > dCT_{r_2sr_1s}$$

【 0 0 6 0 】

実施例 4 : 種々の  $m s^2$  修飾率の tRNA の測定

本発明の原理を用いて、種々の  $m s^2$  修飾率の tRNA の試料を測定した。野生型マウスからの精製 tRNA<sup>lys</sup> (UUU) と CadK<sup>1</sup> KO マウスからの精製 tRNA<sup>lys</sup> (UUU) を、表に示した割合で組み合わせることにより、種々の  $m s^2$  修飾率 (25、50、75、及び 100%) をもつ tRNA を調製し、qPCR-MtR を行った。ddCT 値は、サンプル 1 の  $dCT_{r_2r_1}$  値から各サンプルの  $dCT_{r_2r_1}$  値を引くことにより算出した。計算修飾率 (calculated modification ratio) は、実施例 3 の式に従って算出した。結果を以下の表 4 に示す。

30

【 0 0 6 1 】

【表 4】

Sample No.	Ratio of Sample (WT:KO)	ddCT	$2^{(-ddCT)}$	calculated rate	Expected rate
1	0 : 100	0	1.000	0.000000	0.00
2	25 : 75	0.17	0.889	0.1145437	0.25
3	50 : 50	0.67	0.629	0.3828109	0.50
4	75 : 25	1.79	0.289	0.7324833	0.75
5	100 : 0	5.08	0.030	1.000000	1.00

10

20

通常の d C T 値は、m s<sup>2</sup>修飾率の減少にともなって減少した。また、完全に m s<sup>2</sup>修飾された t R N A 試料 (Sample No.5) と m s<sup>2</sup>修飾がない t R N A 試料 (Sample No.1) を参照として、一部が m s<sup>2</sup>修飾された試料 (Sample Nos. 2~4) の、計算上の修飾率と期待される修飾率を比較したところ、計算値が期待値を正確に予測できることが判った (図 4)。これにより、修飾率が判っている t R N A を参照試料として用いて、或いは、予め求めておいた標準検量線を用いて、未知の試料中の t R N A の修飾率を測定できることが判った。

## 【 0 0 6 2 】

実施例 5 : 粗精製 R N A を用いた m s<sup>2</sup>修飾の測定

少量の粗精製 R N A を用いて、q P C R - M t R により、m s<sup>2</sup>修飾の測定を行った。野生型マウスと CadKal1 KOマウスのそれぞれから、200ngの全 R N A を単離し、第 1 又は第 2 のリバースプライマーを用いて、q P C R - M t R を行った。結果を図 5 に示す。図 5 a は、野生型マウスからの粗精製 R N A を用いて q P C R - M t R を行った結果を、図 5 b は、CadKal1 KOマウスからの粗精製 R N A を用いて q P C R - M t R を行った結果を示している。精製 t R N A<sup>lys</sup> (UUU) を用いた実験結果と一致し、CadKal1 KOマウスからの全 R N A から得られた C T<sub>r2</sub>値は、野生型マウスからの全 R N A から得られた C T<sub>r2</sub>値に比べて顕著に減少していた。

さらに、実施例 4 と同様に、野生型マウスからの全 R N A (粗精製 R N A) と CadKal1 KOマウスからの全 R N A (粗精製 R N A) を、特定の割合で組み合わせることにより、種々の m s<sup>2</sup>修飾率 (25、50、75、及び 100%) をもつ R N A を調製し、同様にして q P C R - M t R を行った。各 Sample の d C T<sub>r2r1</sub>値は、Sample 1 の d C T<sub>r2r1</sub>値をもとに標準化し、d d C T 値として示している。結果を以下の表 5 に示す。

## 【 0 0 6 3 】

30

40

【表 5】

## Cycle number

Sample No.	Ratio of Sample (WT:KO)	ddCt	2 <sup>(-ddCt)</sup>	calculated ratio	Expected ratio
1	0 : 100	0	1.000	0.000000	0.00
2	25 : 75	0.4771	0.718	0.2844918	0.25
3	50 : 50	1.1245	0.459	0.5469375	0.50
4	75 : 25	2.9289	0.131	0.8776691	0.75
5	100 : 0	6.6102	0.010	1.000000	1.00

10

20

d C T 値は、m s<sup>2</sup>修飾率の減少にともなって減少した。また、完全にm s<sup>2</sup>修飾された t R N A 試料 (Sample No.5) と m s<sup>2</sup>修飾がない t R N A 試料 (Sample No.1) を参照として、一部が m s<sup>2</sup>修飾された試料 (Sample Nos. 2~4) の、計算上の修飾率と期待される修飾率を比較したところ、計算値が期待値を正確に予測できることが判った (図 6)。これにより、全 R N A を用いた場合でも、修飾率が判っている参照試料を用いて、或いは、予め求めておいた標準検量線を用いて、未知の試料中の t R N A の修飾率を測定できることが判った。

【 0 0 6 4 】

30

実施例 6 : 少量の粗精製 R N A を用いた m s<sup>2</sup>修飾の測定

実施例 5 と同様にして測定を行った。但し、用いた全 R N A 量は、2 ng とした。野生型マウス及び CadK a l 1 K O マウスから得られた全 R N A を、1 ng / μ l となるように調製し、第 1 又は第 2 のリバースプライマーを用いて、q P C R - M t R を行った。結果を以下の表 6 及び図 7 に示す。R N A 量が 2 ng でも、十分に検出できることが判った。

【 0 0 6 5 】

【表 6】

Sample No.	Ratio of Sample (WT:KO)	ddCt	$2^{(-ddCt)}$	calculated ratio	Expected ratio
1	0 : 100	0.000	1.000	0.000	0.000
2	25 : 75	0.227	0.855	0.169	0.250
3	50 : 50	0.691	0.619	0.442	0.500
4	75 : 25	1.585	0.333	0.774	0.750
5	100 : 0	2.848	0.139	1.000	1.000

10

## 【 0 0 6 6】

20

## 実施例 7 : 末梢血からの RNA 試料を用いた測定

Cdkal1 SNP (rs775840) の 2 型糖尿病関連リスクアレルをもつ人及び健常人 (Cdkal1 SNP のリスクアレルをもたない人) から末梢血を採取し、以下の実験を行った。末梢血試料から単離した全 RNA (粗精製 RNA) の 100 ng を用いて、第 1 又は第 2 のリバースプライマーを用いて、qPCR-MtR を行った。ヒトの tRNA<sup>Lys</sup> (UUU) の絶対  $m^2$  修飾率を求めるための参照が入手できないので、dCt<sub>r2r1</sub> 値を用いて、相対修飾レベルを測定した。Cdkal1 SNP (rs775840) の 2 型糖尿病関連リスクアレルをもつ人 (個体数 : 6) 及び健常人 (個体数 : 7) のそれぞれの末梢血 1.5 ml から単離した全 RNA の dCt<sub>r2r1</sub> 値を、修飾指標 (Modification Index) として比較した。結果を図 8 に示す。Cdkal1 SNP のリスクアレルをもつ人の dCt<sub>r2r1</sub> 値は、健常人の dCt<sub>r2r1</sub> 値に比べて顕著に低かった。これは、2 型糖尿病関連 Cdkal1 SNP をもつ人において、 $m^2$  修飾が抑制されていることを示している。

30

## 【 0 0 6 7】

qPCR-MtR の結果を、質量分析により確認した。Cdkal1 SNP のリスクアレルをもつ人及び健常人、それぞれの末梢血 30 ml から単離した全 RNA 50 µg を用いて tRNA<sup>Lys</sup> (UUU) を精製し、精製 tRNA<sup>Lys</sup> (UUU) の質量分析を行った。結果を図 9 に示す。図 9 b がリスクアレルをもつ人の結果であり、図 9 a が健常人の結果である (マスプロトグラム :  $m^2 t^6 A$  (m/z 459)、 $t^6 A$  (m/z 413))。非修飾率は、 $t^6 A$  と  $m^2 t^6 A$  の合計領域に対する  $t^6 A$  領域の比として標準化した。同じ個体から単離した全 RNA を用いて 3 回実験した平均を示している。図 9 c に示されるように、リスクアレルをもつ人の  $m^2$  未修飾 tRNA<sup>Lys</sup> (UUU) は、1.47 倍に増加していた。

40

## 【 0 0 6 8】

## 実施例 8 :

## ミトコンドリア tRNA 試料を用いた測定

哺乳動物のミトコンドリア tRNA も、2 - メチルチオ - N<sup>6</sup> - スレオニルカルバモイルアデノシン ( $m^2 t^6 A$ ) 修飾を受けている。ミトコンドリア tRNA においては、tRNA<sup>Trp</sup>、tRNA<sup>Phe</sup>、及び tRNA<sup>Ser</sup>(UCN) は、 $m^2 t^6 A$  修飾を受けているが、tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) は、 $m^2 t^6 A$  修飾を受けていない。哺乳動物細胞においては、Cdk5rap1 が、A37 において、N<sup>6</sup> - イソペンテニルアデノシン ( $i^6 A$ ) を、 $m^2 i^6 A$  に変換している。

50

Cdk5rap1ノックアウト (Cdk5rap1 KO) マウスにおけるミトコンドリア tRNA の  $m s^2 i^6 A$  修飾を、第 1 又は第 2 のリバースプライマーを用いて、qPCR-MtRを行うことにより、システマチックに調べた。野生型マウス及びCdk5rap1 KOマウスからそれぞれ全RNA (粗精製RNA) を調製し、前記表 3 に示されるプライマーを用いて、それぞれの、tRNA<sup>Trp</sup>、tRNA<sup>Phe</sup>、tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>、及びtRNA<sup>Leu(UUR)</sup>のdC<sub>T<sub>r2r1</sub></sub>値を測定した。

結果を、以下の表 7 に示す。野生型マウス (WT) の tRNA<sup>Trp</sup>、tRNA<sup>Phe</sup>、及び tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> の dC<sub>T<sub>r2r1</sub></sub> 値は、Cdk5rap1 KOマウスから得られた dC<sub>T<sub>r2r1</sub></sub> 値に比べて顕著に大きかった。このことは、ノックアウトマウスにおいて、tRNA<sup>Trp</sup>、tRNA<sup>Phe</sup>、及び tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> の  $m s^2$  修飾が抑制されていることを示している。一方、野生型マウスの tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> の dC<sub>T<sub>r2r1</sub></sub> 値は、Cdk5rap1 KOマウスから得られた dC<sub>T<sub>r2r1</sub></sub> 値と殆ど同じであった。

【 0 0 6 9 】

【 表 7 】

	dCt			
	tRNA <sup>Trp</sup>	tRNA <sup>Phe</sup>	tRNA <sup>Ser(UCN)</sup>	tRNA <sup>Leu(UUR)</sup>
WT	2.053	2.466	0.620	0.369
Cdk5rap1 KO	0.252	-0.404	0.0001	0.360
p value	0.000004	0.00004	0.0005	0.097

n=3, Student's t-test was performed to examine the statistical significance.

また、野生型マウス及びCdk5rap1 KOマウスの肝臓から単離・精製した、ミトコンドリア tRNA<sup>Trp</sup>、tRNA<sup>Phe</sup>、及びtRNA<sup>Ser(UCN)</sup>のそれぞれについて、質量分析により  $m s^2$  修飾を確認したところ、tRNA<sup>Trp</sup>、tRNA<sup>Phe</sup>、及びtRNA<sup>Ser(UCN)</sup>の  $m s^2$  修飾が消失していることが確認され、qPCR-MtRの結果と一致した。結果を図 10 に示す。

【 0 0 7 0 】

**実施例 9** : HeLa細胞を用いた tRNA の  $m s^2$  修飾の測定

Cdk5rap1 に対する siRNA を導入した HeLa 細胞 (KD) 及びコントロールの siRNA を導入した HeLa 細胞 (Control) を調製し、それぞれの細胞から、実施例 1 に記載の方法に従って、粗精製 RNA を単離した。単離した粗精製 RNA を用いて、第 1 又は第 2 のリバースプライマーを用いて、qPCR-MtR を行い、tRNA<sup>Trp</sup>、tRNA<sup>Phe</sup>、tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>、及び tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> の dC<sub>T<sub>r2r1</sub></sub> 値を測定した。結果を、以下の表 8 に示す。

【 0 0 7 1 】

【表 8】

tRNA species	tRNA <sup>Trp</sup>	tRNA <sup>Phe</sup>	tRNA <sup>Ser(UCN)</sup>	tRNA <sup>Leu(UUR)</sup>
Control (dCT)	3.733	2.702	2.175	0.333
KD (dCT)	0.233	-0.359	-1.359	0.566
p value	p=0.00002	p=0.000186	p=0.00002	p=0.1

n=3, Student's t-test was performed to examine the statistical significance.

10

HeLa細胞を用いた結果も、マウスを用いた結果と同様に、Controlの細胞から得られたtRNA<sup>Trp</sup>、tRNA<sup>Phe</sup>、及びtRNA<sup>Ser(UCN)</sup>のdCT<sub>r2r1</sub>値は、Cdk5rap1をノックダウン(KD)した細胞から得られたdCT<sub>r2r1</sub>値に比べて顕著に大きかった。一方、Control tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>のdCT<sub>r2r1</sub>値は、Cdk5rap1 KDのdCT<sub>r2r1</sub>値と殆ど同じであった。

【0072】

20

実施例10：Cdkal1遺伝子変異とtRNA<sup>Leu</sup>(UUU)の修飾の相関の検討

実施例1に従い、ヒトの末梢血液よりDNA及びRNAを抽出した。実施例1(9)の方法に従い、糖尿病の発症と関わるCdkal1遺伝子変異を同定し、危険型Cdkal1変異をホモで持つ群(C/C、n=20)、非危険型Cdkal1変異をホモで持つ群(G/G、n=31)及びヘテロ群(G/C、n=35)に分けた。次に各群のRNAを用いてPCR法を行ってtRNA<sup>Leu</sup>(UUU)の修飾を測定して、相対的修飾率を検討した。結果を図11に示す。その結果、糖尿病発症のリスクを高める危険型Cdkal1遺伝子変異を持つ群は、非危険型Cdkal1変異を持つ群より有意にチオメチル化の修飾率が低下した。P<0.05を有意とする。検定はANOVAを用いた。

【0073】

30

実施例11：チオメチル化とインスリン分泌能の相関の検討

tRNA<sup>Leu</sup>(UUU)のチオメチル化とインスリン分泌能の相関を検討するために、ヒトにおける糖負荷試験を常法に従って実施した。一晚絶食したボランティア28人(Cdkal1変異遺伝子型：C/C、n=9、G/C、n=12、G/G、n=7)に75グラムのブドウ糖を含む溶液(トレランG)を飲んでもらい、飲む前と飲んで30分後に採血し、血中インスリン、血糖値を基にインスリン分泌能(Corrected insulin response)を算出した。また、同血液サンプルよりRNAを精製し、PCR法によりチオメチル化修飾の度合いの検出し、インスリン分泌能とチオメチル化の度合いとの相関を検討した。結果を図12に示す。その結果、チオメチル化修飾が低いほど、インスリン分泌能が低いという正の相関が認められた。

【0074】

40

上記の記載は、本発明の目的及び対象を単に説明するものであり、添付の特許請求の範囲を限定するものではない。添付の特許請求の範囲から離れることなしに、記載された実施態様に対しての、種々の変更及び置換は、本明細書に記載された教示より当業者にとって明らかである。

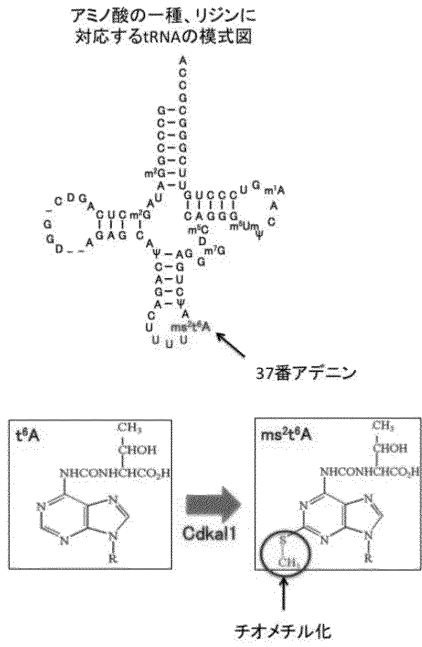
【産業上の利用可能性】

【0075】

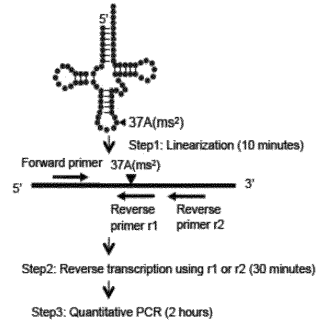
本発明の検出方法を用いて、短時間・低コスト・高感度でRNA修飾(例えば、チオメチル化)を検出することができる。また、本発明の検出方法を用いて、僅かなRNA試料(例えば、末梢血からのtRNA)を用いて、RNA修飾(例えば、tRNAのチオメチル化)を検出し、疾患(例えば、糖尿病)の発症リスクの診断を行うことができる。

50

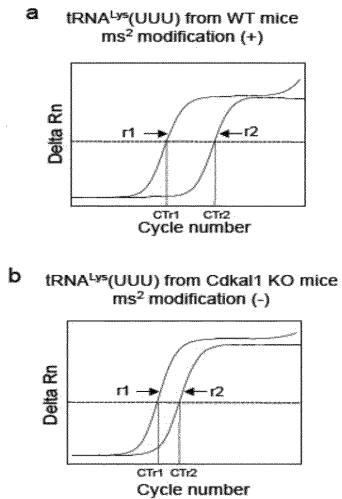
【 図 1 】



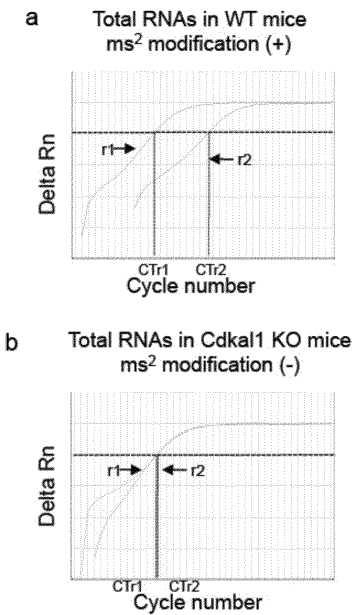
【 図 2 】



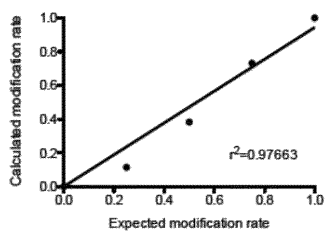
【 図 3 】



【 図 5 】

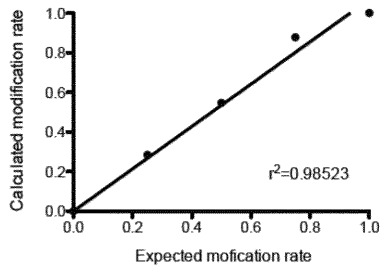


【 図 4 】

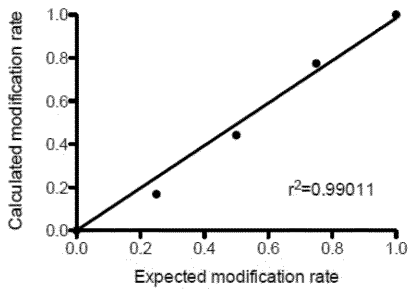




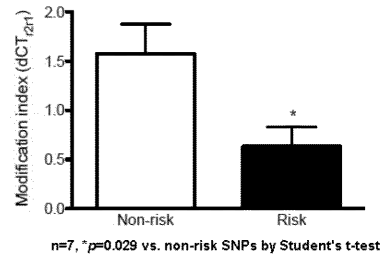
【 図 6 】



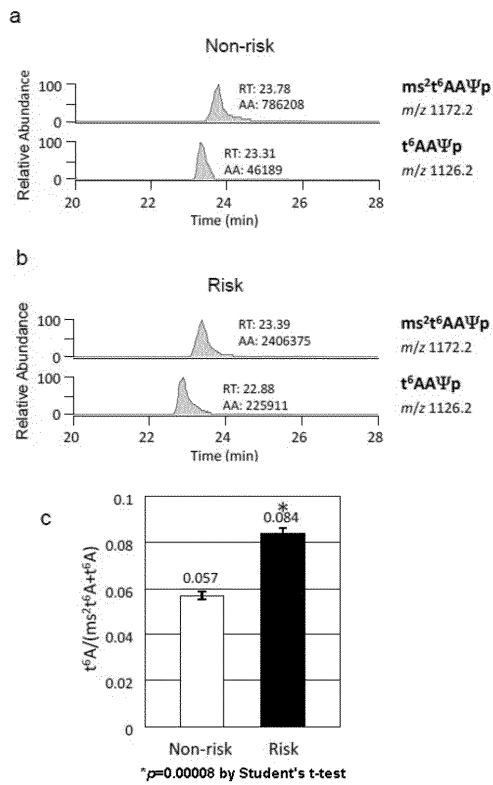
【 図 7 】



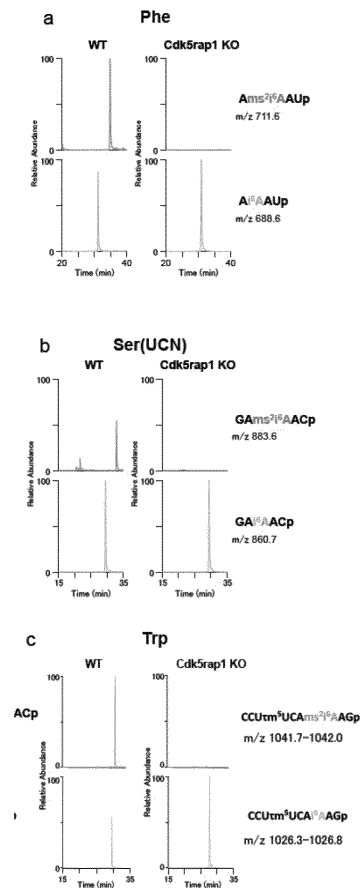
【 図 8 】



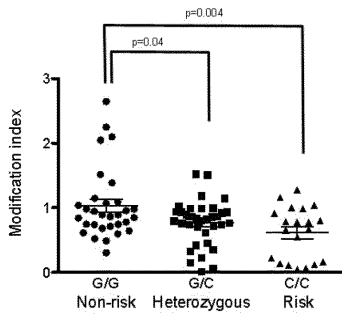
【 図 9 】



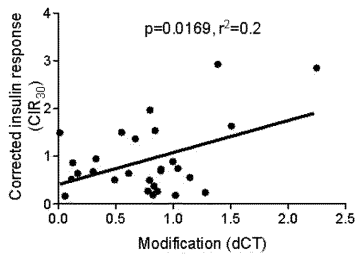
【 図 10 】



【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【 配列表 】

2014136870000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2014/055758
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C12Q1/68(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q, C12N  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2014 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2014 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2014  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CApplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), Thomson Innovation		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YANO et al., "Genome-wide exploring A-to-I RNA editing sites in human transcriptome", Clinical testing, 15 September 2011 (15.09.2011), vol.55, no.9, pages 858 to 864	1-20
A	Kirino et al, PNAS, 2005.05.17, vol. 102, no. 20, p. 7127-7132	1-20
A	WO 2007/018169 A1 (The University of Tokyo), 15 February 2007 (15.02.2007), claims; drawings & JP 2008-259425 A	1-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 28 May, 2014 (28.05.14)		Date of mailing of the international search report 10 June, 2014 (10.06.14)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/055758

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2008/149855 A1 (Bio-Dixam, LLC), 11 December 2008 (11.12.2008), claims & US 2011/0097714 A1 & EP 2154247 A1 & JP 5258760 B & CA 2687171 A & CN 101796185 A	1-20
A	JP 2007-295855 A (Toppan Printing Co., Ltd.), 15 November 2007 (15.11.2007), claims; drawings (Family: none)	1-20
A	WO 2008/109945 A1 (HUMAN GENETIC SIGNATURES PTY LTD.), 18 September 2008 (18.09.2008), claims (Family: none)	1-20
A	JP 2007-509613 A (Genomic Health, Inc.), 19 April 2007 (19.04.2007), claims & WO 2005/040396 A2 & EP 1678327 A & US 2005/0095634 A1 & CA 2542656 A & AU 2004284434 A	1-20
A	Vendeix et al, J. Mol. Biol., 2012, Vol. 416, p. 467-485	1-20
P,A	Xie et al, Simple and Rapid Detection of 2-methylthio Modification in tRNA for Diagnostic Application of Type 2 Diabetes, Dai 90 Kai The Physiological Society of Japan Taikai, 2013.03.29, p. S248, 3PK-060	1-20

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2014/055758

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 21-24  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
It appears that the inventions according to claims 21 to 24 include a case wherein diagnosis is practiced by a medical doctor on the basis of the presence or absence of type 2 diabetes in a patient or the degree of insulin secretion ability.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 5 5 7 5 8									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12Q1/68(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12Q, C12N											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2014年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2014年	日本国実用新案登録公報	1996-2014年	日本国登録実用新案公報	1994-2014年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2014年										
日本国実用新案登録公報	1996-2014年										
日本国登録実用新案公報	1994-2014年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAPus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Thomson Innovation											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
A	矢野 他, RNAエディティングの網羅的探索と機能解析, 臨床検査, 2011.09.15, Vol. 55, No. 9, p. 858-864	1 - 20									
A	Kirino et al, PNAS, 2005.05.17, vol. 102, no. 20, p. 7127-7132	1 - 20									
A	W0 2007/018169 A1 (国立大学法人東京大学) 2007.02.15, 請求の範囲、図面 & JP 2008-259425 A	1 - 20									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。									
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 28.05.2014		国際調査報告の発送日 10.06.2014									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 山本 晋也	4 N 3 3 4 1								
		電話番号 03-3581-1101 内線	3488								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 5 5 7 5 8
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2008/149855 A1 (合同会社B i o - D i x a m) 2008.12.11, 請求の範囲 & US 2011/0097714 A1 & EP 2154247 A1 & JP 5258760 B & CA 2687171 A & CN 101796185 A	1 - 20
A	JP 2007-295855 A (凸版印刷株式会社) 2007.11.15, 特許請求の範囲、図面 (ファミリーなし)	1 - 20
A	WO 2008/109945 A1 (HUMAN GENETIC SIGNATURES PTY LTD) 2008.09.18, Claims (ファミリーなし)	1 - 20
A	JP 2007-509613 A (ジェノミック ヘルス, インコーポレイテッド) 2007.04.19, 特許請求の範囲 & WO 2005/040396 A2 & EP 1678327 A & US 2005/0095634 A1 & CA 2542656 A & AU 2004284434 A	1 - 20
A	Vendeix et al, J. Mol. Biol., 2012, Vol. 416, p. 467-485	1 - 20
P, A	Xie et al, Simple and Rapid Detection of 2-methylthio Modification in tRNA for Diagnostic Application of Type 2 Diabetes, 第90回日本生理学会大会, 2013.03.29, p. S248, 3PK-060	1 - 20

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 5 5 7 5 8

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求項 \_\_\_\_\_ 21-24 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、請求項 2 1 - 2 4 に係る発明は、2型糖尿病患者であるか否かやインスリンの分泌能の程度について、医師が診断を実施する場合も包含している発明であると解される。
2.  請求項 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求項 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2009年7月)



## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

特許法第30条第2項適用申請有り 平成25年3月29日、第90回日本生理学会大会(東京都江戸川区)において発表(演題番号3PK-060)

(72)発明者 鈴木 勉

東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA04 CA11 HA14 HA20

4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ03 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR40 QR62

QR72 QR77 QS25 QS34 QX02

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。