

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08677

研究課題名(和文) TAR症候群原因遺伝子産物Y14におけるリン酸化制御解析

研究課題名(英文) Phosphorylation of Y14 mutated in TAR syndrome

研究代表者

石垣 靖人 (ISHIGAKI, Yasuhito)

金沢医科大学・総合医学研究所・教授

研究者番号：20232275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Y14(RBM8A)遺伝子の発現低下は、橈骨欠損血小板減少症(TAR症候群)の原因として知られている。本研究では、特にY14に存在する2カ所のセリンのリン酸化制御が、核内局在に関与することを初めて報告した。さらに、Y14と細胞内で安定に結合するMagohが、それぞれの細胞内安定性に寄与していることを明らかにした。また、Y14の局在解析を電子顕微鏡レベルで観察することで、mRNA結合因子Upf2との共局在からmRNAの構造を観察する手法を提案した。さらに、リン酸化変異体の誘導発現系とゲノム編集マウス系統を確立し、細胞および個体レベルでの役割も解析を継続している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者のオリジナルなY14のリン酸化研究をもとに、核内で作られたmRNAが、膜で仕切られていない核小体へ混入させない仕組みと欠損の影響を分子レベルで提案できた点に学術的な意義がある。本研究では、RNAの分解経路や中心体と関連させて研究されてきたY14について、これまで予想もされていなかった機能を核小体への局在と関連させて初めて明らかにすることに従来の研究にはない特色があった。さらに、TAR症候群の発症機序解明に有用なヒト細胞系およびマウスモデル系を提供し、細胞死に隠されていた未知のY14の機能とTAR症候群における病態との関係を解き明かすことができた点にも意義がある。

研究成果の概要(英文)：Deficient expression of Y14 (RBM8A) gene is known to be a cause of radial defect thrombocytopenia (TAR syndrome). In this study, we reported that the phosphorylation control of two serines in Y14 is involved in nuclear localization. Furthermore, it was revealed that Magoh, which stably binds to Y14 intracellularly, contributes to the intracellular stability of each. In addition, localization analysis of Y14 was performed at the electron microscope level. We proposed a method to observe the structure of mRNA from its co-localization with the mRNA binding factor Upf2. Furthermore, we have established an inducible expression system for phosphorylated mutants and a genome editing mouse strain, and are continuing to analyze their roles at the cell and animal level.

研究分野：病態医化学

キーワード：Y14 Magoh リン酸化 ゲノム編集 核小体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

TAR 症候群は mRNA の結合因子である Y14 (RBM8A) の片側アレルの欠失と反対アレルに存在する転写調節領域の SNP が発現質量低下を来たし発症すると考えられている (Albers ら, 2012, Nat Genet)。一方 EJC (Exon Junction Complex) はスプライシングに伴って mRNA エキソンのつなぎ目に形成される複合体で、Y14、Magoh、Casc3、eIF4A3、Upf3 など構成され、分解経路や輸送にかかわる因子群が結合することが知られている。

研究代表者らは mRNA の輸送、分解、翻訳や細胞周期に関わることを報告してきた (研究代表者ら, 2001, Cell; 2013, Exp Biol Med, 2015, Histochem Cell Biol)。また、EJC の欠損は、幹細胞の増殖不全により中枢神経系に発達障害が起きることや、機序不明だが骨形成に異常が起きることも知られている (Favaro ら, 2014, Am J Hum Gene, Volodarsky ら, 2015, Hum Mol Genet など)。研究代表者らは、Y14 が M 期特異的に細胞周期進行に必須であることを明らかにして (研究代表者ら, 2013, Exp Biol Med)、ロックダウンががんの細胞死を誘導することを示してきた (特許取得済)。さらに、Y14 を含む EJC は中心体へ局在し、その成熟に関与していることを報告してきた (研究代表者ら, 2014, Histochem Cell Biol)。一方、Tarn らはリコンビナントタンパク質での試験管内リン酸解析から、Y14 は通常リン酸化されておらずリン酸化が RNA 分解のスイッチとして働くモデルを提案した (Hsu ら, 2005, JBC)。そこで、研究代表者は細胞内 Y14 のリン酸化状態を PhosTag システムで調べた。その結果、リン酸化部位は 166 および 168 番目のセリンであり、168 セリンのリン酸化が 166 のリン酸化に必須であり、優先順位が存在することを初めて報告した。研究代表者らの解析では、複数の培養細胞内ではほぼ 100% の Y14 がリン酸化を受けており、非リン酸化型の Y14 はほとんど検出できなかった (研究代表者ら, 2015, Exp Biol Med, および未発表データ)。そこで Tarn らが提案した非リン酸化 リン酸化による RNA 分解スイッチモデルは試験管内でこそ成立するが、我々の実験から培養細胞では成立しないと結論された。従って、細胞における mRNA 結合タンパク質 Y14 のリン酸化には、これまでに提案されていない未知の役割があると考えられた。

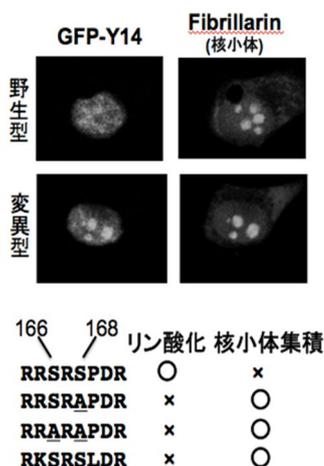
### 2. 研究の目的

TAR 症候群 (Thrombocytopenia-absent radius syndrome) は、血小板減少と橈骨の欠損を特徴とする劣性の遺伝疾患である。原因遺伝子は Y14 (RBM8A) と呼ばれる RNA 結合因子であるが、従来のロックダウン、ロックアウト系では細胞死が誘導され発症の分子機序を解くことは困難である。研究代表者は核質の Y14 がリン酸化を受けることで、リボソーム合成の場である核小体への誤った mRNA 集積を防いでいる新知見を得てきた。この発見を更に発展させ、核小体での解析から Y14 のリン酸化が生体にどのように寄与するのかを分子、細胞、個体レベルで明らかにしていきたい。これにより、Y14 のかかわる生命現象に新しい知見を加え、TAR 症候群や橈骨欠損、血小板減少症の解明や治療に貢献することが本申請の目的である。

### 3. 研究の方法

- (1) 培養細胞にてリン酸化を受けない変異型 Y14 タンパク質が形成する核小体局在性の複合体の性質を免疫沈降法や免疫染色実験等により明らかにし、リン酸化を受ける野生型と比較する。
- (2) 遺伝子操作により Y14 リン酸化部位に変異を導入することによって得られたマウス個体を利用して、発生や分化を含めた Y14 リン酸化の意義を解析する。

### 4. 研究成果



各種変異体 Y14 のリン酸化と局在

本研究では、特に Y14 に存在する 2カ所のセリンのリン酸化制御を中心として成果を発表してきたが (Sci Rep 2018)。

Y14 タンパク質は核内に局在するが、転写やスプライシング部位に局在していて、核小体には移行しないことが報告されてきた (左図上段の野生型 GFP-Y14、核小体は抜けている)。ところが、リン酸化ドメインに変異を導入されリン酸化を受けない変異型 GFP-Y14 タンパク質は、核内の局在が変化し核小体へ偏って集積することが明らかとなった (左図上段変異型、さらに各種変異体による結果を左図下段表にまとめた。変異導入部位 (下線) と、リン酸化と核小体への局在を × で示した)。さらに、C 末端 RS 反復含有配列自体が核小体局在化することが明らかとなった (Sci Rep, Tatsuno & Ishigaki, 2018)。

この結果は、種々のセリン置換体で共通に観察された。例えば、セリンを置換せずに前後のアミノ酸配列を置換した場合にもリン酸化は失われたが、このような変異体も同様に核小体へ集積した。

なお、リン酸化変異体は中心体異常や細胞死を引き起こさず、リン酸化は中心体成熟や増殖以外の機能を持つと考えている。また、変異体でも Magoh などの EJC 因子と細胞内複合体を形成できることを確認済みであり、結合解析から mRNA にも結合していると考えられた。さらに、Y14 と細胞内で安定に結合してヘテロダイマーを形成する Magoh についても解析を行ない、両者の複合体形成がそれぞれのタンパク質レベルでの安定性に寄与していることを明らかにすることができた。この結果は、2013 年に研究代表者が *Exp Biol Med* 誌において報告した、培養細胞におけるノックダウン実験の結果とも一致した。研究の成果は *Biochem Biophys Res Commun* 誌(Ma et al., 2019)に発表できた。また、Y 14 の局在解析を電子顕微鏡レベルで実施していることで、mRNA 結合因子 Upf2 との共局在から mRNA の構造を観察する手法を提案し、*Microsc Res Tech* 誌(Ma et al., 2019)に公表することができた。本報告では、外因的に発現された Magoh L136R および Y14 L118R(それぞれアミノ酸残基 136 および 118 でのロイシンからアルギニンへの置換、その結果失われる複合体の形成をもたらす)のタンパク質発現レベルがそれらの野生型より低いことを見出した。mRNA レベルの差が検出されなかったため、この減少はおそらくタンパク質レベルによって引き起こされる。一方、シクロヘキシミド追跡アッセイは、Magoh L136R および Y14 L118R の分解速度がそれらの野生型より速いことを決定した。Y14 L118R と Magoh L136R の両方は、対応する野生型タンパク質とヘテロ二量体を形成する能力を失った。しかしながら、Y14 L118R は依然として核内に局在化することができ、それは Y14 L118R の安定性を Magoh L136R よりも高くする。これらの結果は、Magoh および Y14 の安定性がヘテロ二量体構造に依存するだけでなく、核局在にも依存することを明らかにしている。

さらに、ここまでで得られた成果をもとに、リン酸化変異体の発現が腫瘍の悪性化に関与する可能性を薬剤誘導系の構築とともに進めている。また、マウスを用いたインビボでの変異体作成についてはゲノム編集による変異体の作成に成功し、系統を樹立することができた。こちらも現在解析を実施中である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 17件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Ma Q, Tatsuno T, Nakamura Y, Izumi SI, Tomosugi N, Ishigaki Y	4. 巻 511
2. 論文標題 Immuno-detection of mRNA-binding protein complex in human cells under transmission electron microscopy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microscopy Research and Technique	6. 最初と最後の頁 631-636
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jemt.23214	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ma Q, Tatsuno T, Nakamura Y, Ishigaki Y.	4. 巻 511
2. 論文標題 The stability of Magoh and Y14 depends on their heterodimer formation and nuclear localization.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 631-636
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.02.097	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Tatsuno T & Ishigaki Y	4. 巻 8
2. 論文標題 C-terminal short arginine/serine repeat sequence-dependent regulation of Y14 (RBM8A) localization.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 612
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-18765-1.	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 Sunatani Y, Kamdar RP, Sharma MK, Matsui T, Sakasai R, Hashimoto M, Ishigaki Y, Matsumoto Y, Iwabuchi K.	4. 巻 362
2. 論文標題 Caspase-mediated cleavage of X-ray repair cross-complementing group 4 promotes apoptosis by enhancing nuclear translocation of caspase-activated DNase.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 450-460
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2017.12.009.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Shibata T, Shibata S, Ishigaki Y, Kiyokawa E, Ikawa M, Singh DP, Sasaki H, Kubo E.	4. 巻 171
2. 論文標題 Tropomyosin 2 heterozygous knockout in mice using CRISPR-Cas9 system displays the inhibition of injury-induced epithelial-mesenchymal transition, and lens opacity.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mechanisms of Ageing and Development	6. 最初と最後の頁 24-30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mad.2018.03.001.	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 Xu X, Yoshizaki H, Ishigaki Y, Kubo E, Minato H, Kiyokawa E.	4. 巻 23
2. 論文標題 Upregulation of multiple signaling pathways by Dock5 deletion in epithelial cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular Vision	6. 最初と最後の頁 1081-1092
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Iezaki T, Horie T, Fukasawa K, Kitabatake M, Nakamura Y, Park G, Onishi Y, Ozaki K, Kanayama T, Hiraiwa M, Kitaguchi Y, Kaneda K, Manabe T, Ishigaki Y, Ohno M, Hinoi E.	4. 巻 11
2. 論文標題 Translational Control of Sox9 RNA by mTORC1 Contributes to Skeletogenesis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 228-241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2018.05.020.	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 Zhang J, Guo X, Hamada T, Yokoyama S, Nakamura Y, Zheng J, Kurose N, Ishigaki Y,	4. 巻 19
2. 論文標題 Protective Effects of Peroxiredoxin 4 (PRDX4) on Cholestatic Liver Injury.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2509
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19092509.	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 Yoshitomi Y, Osada H, Satake H, Kojima M, Saito-Takatsuji H, Ikeda T, Yoshitake Y, Ishigaki Y, Kubo E, Sasaki H, Yonekura H.	4. 巻 8
2. 論文標題 Ultraviolet B-induced Otx2 expression in lens epithelial cells promotes epithelial-mesenchymal transition.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biology Open	6. 最初と最後の頁 35691
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/bio.035691.	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 Kiuchi Z, Nishibori Y, Kutsuna S, Kotani M, Hada I, Kimura T, Fukutomi T, Fukuhara D, Ito-Nitta N, Kudo A, Takata T, Ishigaki Y, Tomosugi N, Tanaka H, Matsushima S, Ogasawara S, Hirayama Y, Takematsu H, Yan K.	4. 巻 33
2. 論文標題 GLCC11 is a novel protector against glucocorticoid-induced apoptosis in T cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 7387-7402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201800344RR.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura T, Satoh-Nakamura T, Nakajima A, Kawanami T, Sakai T, Fujita Y, Iwao H, Miki M, Masaki Y, Okazaki T, Ishigaki Y, Kawano M, Yamada K, Matsui S, Saeki T, Kamisawa T, Yamamoto M, Hamano H, Origuchi T, Hirata S, Tanaka Y, Tsuboi H, Sumida T, Okazaki K, Tanaka M, Chiba T, Mimori T, Umehara H.	4. 巻 30
2. 論文標題 Impaired expression of innate immunity-related genes in IgG4-related disease: A possible mechanism in the pathogenesis of IgG4-RD.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 551-557
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2019.1621475.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakazawa Y, Inoue S, Nakamura Y, Iida Y, Ishigaki Y, Miyazawa K.	4. 巻 26
2. 論文標題 High-salt diet promotes crystal deposition through hypertension in Dahl salt-sensitive rat model.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 839-846
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/iju.14035.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masaki Y, Kawabata H, Takai K, Tsukamoto N, Fujimoto S, Ishigaki Y, Kurose N, Miura K, Nakamura S, Aoki S; Japanese TAFRO Syndrome Research Team.	4. 巻 111
2. 論文標題 2019 Updated diagnostic criteria and disease severity classification for TAFRO syndrome.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 155-158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-019-02780-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 He Q, Sawada M, Yamasaki N, Akazawa S, Furuta H, Uenishi H, Meng X, Nakahashi T, Ishigaki Y, Moriya J.	4. 巻 43
2. 論文標題 Neuroinflammation, Oxidative Stress, and Neurogenesis in a Mouse Model of Chronic Fatigue Syndrome, and the Treatment With Kampo Medicine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 110-115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b19-00616	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mizunuma Y, Kanasaki K, Nitta K, Takagaki Y, Kitada M, Nakamura Y, Ishigaki Y, Li S, Liu H, Li J, Isao Usui, Aso Y, Koya K.	4. 巻 -
2. 論文標題 DCD-1db/db mice; the novel type 2 diabetic mouse model with progressive kidney fibrosis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of diabetes investigation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13311	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 辰野貴則、石垣靖人
2. 発表標題 RS 繰り返し配列を持つ RNA 結合タンパク質 Y14 の局在解析
3. 学会等名 第20回日本RNA学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 辰野貴則、石垣靖人
2. 発表標題 RNA結合タンパク質が持つRS繰り返し配列におけるリン酸化の役割
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 辰野貴則、石垣靖人
2. 発表標題 RS繰り返し配列を持つRNA結合タンパク質の局在解析
3. 学会等名 第19回日本RNA学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 辰野貴則、石垣靖人
2. 発表標題 TEMを用いたRNA結合蛋白複合体の細胞質輸送の観察
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

金沢医科大学総合医学研究所生命科学研究領域細胞機能研究分野  
<http://www.kanazawa-med.ac.jp/~souiken/ls/dmov/>

## 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
研究 分担者	大塚 哲  (OHTSUKA Satoshi)  (40360515)	金沢医科大学・総合医学研究所・准教授    (33303)	
研究 協力者	中村 有香  (NAKAMURA Yuka)		