

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06963

研究課題名（和文）リボソーム病の病態形成機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of the pathogenesis of ribosomopathies

研究代表者

白石 裕士（SHIRAIISHI, Hiroshi）

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：80452837

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：生物のからだを構成するタンパク質は、リボソームと呼ばれる細胞内のタンパク質合成装置によって合成される。リボソームの異常は種々の疾患の原因になることが分かっており、「リボソーム病」と呼ばれている。本研究では、ポリヌクレオチドキナーゼのひとつであるNo19がリボソームの生合成に関与しており、その異常がリボソーム病様の症状を引き起こすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、リボソーム病を引き起こす分子の異常はいくつか知られていたが、ポリヌクレオチドキナーゼの異常がリボソーム病に寄与することはあまり分かっていなかった。本研究により、ポリヌクレオチドキナーゼの生理的役割の一部を明らかにした。またリボソーム病の病態形成機構の一端が明らかとなり、新たな治療法の開発につながる成果が得られた。

研究成果の概要（英文）： Ribosome are macromolecular machines that perform protein synthesis. Ribosomopathies are a collection of disorders of ribosome dysfunction characterized by a defect in ribosome biogenesis. In this study, we found that No19 is involved in ribosome synthesis, dysfunction of No19 causes ribosomopathy-like phenotype.

研究分野：細胞生物学

キーワード：リボソーム病

1. 研究開始当初の背景

リボソームは、**mRNA** からタンパク質を作るのに必要不可欠な、すべての生物が持っている最も基本的な細胞内装置である。近年、さまざまな原因によるリボソームの機能障害が、特定の疾患群と関連することが明らかとなり、それらの疾患群を総じてリボソーム病と呼び注目されている(**Blood 115:3196, 2010**)。先天性赤芽球癆(**Diamond-Blackfan 貧血**)をはじめとするリボソーム病の多くでは、造血異常が見られることが一つの特徴となっている。これまで、リボソーム病の原因遺伝子として **RPS19** を筆頭にリボソーム生合成に関わるいくつかの遺伝子が同定されているが、なぜリボソーム生合成の異常が特に造血系細胞に影響を及ぼすのか分かっていないことに加え、未だ **50%** 近くの患者において原因遺伝子が同定されていない。

また、治療においてはステロイド療法および輸血療法が基本であり、副作用や合併症が問題となっている。さらに、多くのリボソーム病において造血系の発がんリスクが上昇することが知られている。通常、がん細胞は正常細胞に比べて増殖速度が速く、タンパク質の合成を多く必要とすると考えられる。実際、がん細胞においてリボソームの量が増えていることが古くから知られており(**Biomedicine 20:327, 1974**)、原がん遺伝子である **c-Myc** や **mTOR** はリボソーム生合成を促進する一方で、いくつかのがん抑制遺伝子はリボソーム生合成を負に制御する。それにもかかわらず、リボソーム生合成に異常のあるリボソーム病において、なぜ逆に発がんリスクが上昇するのかは大きな謎である。

Nol9 タンパク質は、初め、リボソーム生合成が行われる核小体に局在するタンパク質の一つとして同定された(**Curr. Biol. 12:1, 2002; Mol. Biol. Cell 13:4100, 2002**)。その後、生化学的な解析により、ポリヌクレオチドキナーゼとして **DNA** および **RNA** の 5'末端をリン酸化しうること、また培養細胞を用いたノックダウン実験により、リボソーム **RNA** の生合成に関わることが報告された(**EMBO J. 29:4161, 2010**)。しかしながら、**Nol9** がどのようにリボソーム **RNA** の生合成に関わるのか、その分子機構は詳しく分かっておらず、また、その生体内での生理的な役割および疾患への関与は分かっていないことが多い。

2. 研究の目的

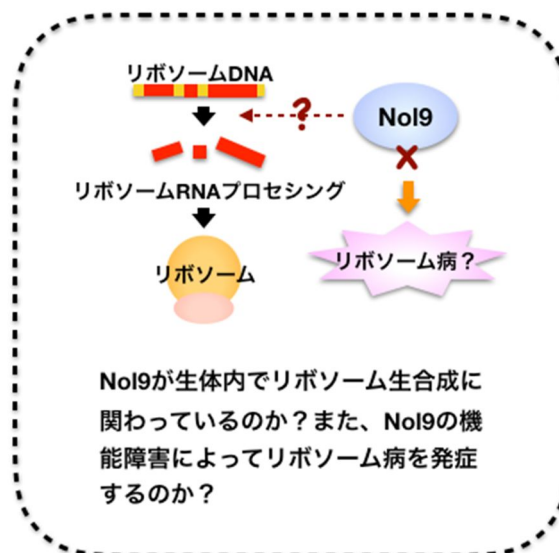
本研究では、ポリヌクレオチドキナーゼである **Nol9** の生理的役割を明らかにするとともに、**Nol9** がリボソーム病の病態形成にどのように関わるか明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

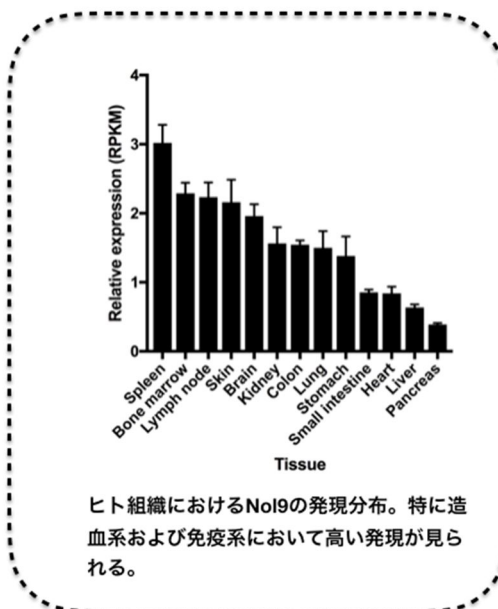
- (1) 野生型のマウスの組織から **mRNA** およびタンパク質を抽出し、生体内における **Nol9** の発現を解析した。
- (2) **Cre-loxP** システムを用いた組織特異的、時期特異的 **Nol9** 欠損マウスを作製し、表現型の解析を行った。
- (3) 造血細胞の解析は胎生 **14.5** 日目の胎仔肝および骨髓細胞を用い、フローサイトメトリーによって行った。
- (4) リボソームの機能は **O-propargyl-puromycin** を用いてタンパク質翻訳活性を測定することによって行った。

4. 研究成果

はじめに、全身性の **Nol9** 欠損マウスを作製するために、ヘテロ接合マウス同士の掛け合わせを行った。出産直後のマウスの遺伝子型を解析したところ、**Nol9** 欠損マウスは観察されず、胎生致死と考えられた。さらに、妊娠マウスより得た胎仔の遺伝子型を解析したところ、少なくとも胎生 **14.5** 日より早い段階での胎生致死と考えられた。最近、胎生致死を示す遺伝子欠損マウスのいくつかは胎盤の形成不全によるものだと報告されている (**Nature, 555(7697):463, 2018**)。 **Nol9** 欠損マウスもその可能性があるため、組織特異的な遺伝子欠損マウスの解析が必要と考えられた。

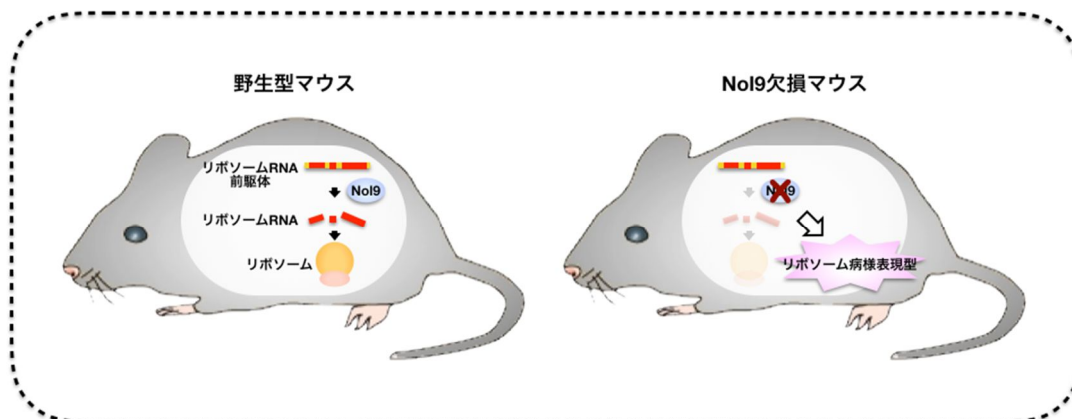


次に**Nol9**の発現組織について検討を行ったところ、他の組織に比べ、脾臓、骨髄、リンパ節といった造血系組織において発現が高いことが確認された。そこで、**Nol9 flox** マウスと造血細胞特異的 **Cre** リコンビナーゼ発現トランスジェニックマウスを交配することにより、造血細胞特異的に **Nol9** 遺伝子を欠損したマウスを作製した。造血細胞特異的 **Nol9** 欠損マウスは、貧血様症状を呈し、周産期に死亡した。胎生 **14.5** 日目の造血細胞特異的 **Nol9** 欠損マウスの胎仔肝を採取し、フローサイトメトリーにて**CD71** および**Ter119** 表面抗原の二重染色で赤血球の分化の解析を行った。**Nol9** 欠損マウスの胎仔肝は野生型マウスのもものと比較して小さく、また赤血球分化の最終段階である **CD71** 陰性**Ter119** 陽性の細胞集団が有意に低下しており、**Nol9** の欠損によって赤血球の分化が損なわれていることが明らかとなった。また、赤血球分化段階において、**Nol9** 欠損マウスでは **Annexin V** 陽性、活性化 **caspase-3** 陽性細胞が野生型マウスに比べ有意に増加していたため、**Nol9** 欠損マウスの赤血球分化異常はアポトーシスの亢進によるものと明らかとなった。



さらに、**Nol9** 欠損が胎生期の造血においてのみ影響を与えるのか調べるために、**Nol9 flox** マウスを時期特異的 **Cre** リコンビナーゼ発現トランスジェニックマウスと交配させ、**8** 週齢において **Nol9** 遺伝子の発現が欠損するマウスを作製して解析した。8 週齢において誘導した時期特異的 **Nol9** 欠損マウスも、造血細胞特異的 **Nol9** 欠損マウスと同様に、貧血症状を呈した。これらの結果から、**Nol9** の欠損がリボソーム病のような症状を引き起こすことが明らかとなった。

次に、生体内において、**Nol9** がリボソームの機能に関わるのか明らかにするために、ピュロマイシンアナログである **O-propargyl-puromycin** を用いて、時期特異的 **Nol9** 欠損マウスの血球系細胞におけるタンパク質翻訳活性を測定した。**Nol9** 欠損マウス由来の血球系細胞では、野生型マウスの血球系細胞に比べて有意に活性の低下を認めた。これらの結果から、生体内において **Nol9** がリボソームの合成に関与していること、そして **Nol9** の欠損がリボソーム病様症状を引き起こすことが明らかとなった。リボソーム合成経路の異常は核小体ストレスとなり、**p53** 経路を活性化して細胞死を誘導することが知られている (**Trends in Genetics, 35(10):754, 2019**)。現在、**p53** 依存性とともに、なぜリボソーム病において発がんリスクが上昇するのかについて、マウスにおける発がんモデルを作製し解析を行っており、**Nol9** の生理的・病理的役割について、さらに詳細な分子メカニズムについて明らかにしていく予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Higa R, Hanada T, Teranishi H, Miki D, Seo K, Hada K, Shiraishi H, Mimata H, Hanada R, Kangawa K, Murai T, Nakao K.	4. 巻 474
2. 論文標題 CD105 maintains the thermogenic program of beige adipocytes by regulating Smad2 signaling.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Endocrinology	6. 最初と最後の頁 184-193
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mce.2018.03.008	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 Fujinami H, Shiraishi H, Hada K, Inoue M, Morisaki I, Higa R, Shin T, Kobayashi T, Hanada R, Penninger JM, Mimata H, Hanada T	4. 巻 525
2. 論文標題 CLP1 acts as the main RNA kinase in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 129-134
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.02.066	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 Inoue M, Hada K, Shiraishi H, Yatsuka H, Fujinami H, Morisaki I, Nishida Y, Matsubara E, Ishitani T, Hanada R, Matsumoto M, Penninger JM, Ihara K, Hanada T	4. 巻 525
2. 論文標題 Tyrosine pre-transfer RNA fragments are linked to p53-dependent neuronal cell death via PKM2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 726-732
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.02.157	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 Yatsuka H, Hada K, Shiraishi H, Umeda R, Morisaki I, Urushibata H, Shimizu N, Sebastian WA, Hikida T, Ishitani T, Hanada R, Shimada T, Kimoto K, Kubota T, Hanada T	4. 巻 533
2. 論文標題 Exosc2 deficiency leads to developmental disorders by causing a nucleotide pool imbalance in zebrafish	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1470-1476
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.10.044	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 Inoue M, Miyahara H, Shiraishi H, Shimizu N, Tsumori M, Kiyota K, Maeda M, Umeda R, Ishitani T, Hanada R, Ihara K, Hanada T	4. 巻 11
2. 論文標題 Leucyl-tRNA synthetase deficiency systemically induces excessive autophagy in zebrafish	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8392
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-87879-4	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16件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 波田一誠、加藤京、漆畑博太郎、白石裕士、花田俊勝
2. 発表標題 セリン/スレオニンキナーゼVRK1遺伝子変異による進行性神経変性疾患モデルサカナの樹立
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森崎郁子、荒井勇二、白石裕士、花田礼子、小林隆志、花田俊勝
2. 発表標題 橋小脳低形成10型の疾患モデルマウス作製と解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上真紀、波田一誠、白石裕士、石谷太、松本雅記、井原健二、花田俊勝
2. 発表標題 tRNA代謝異常によるp53依存的神経細胞死の分子機構解明
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤浪弘行、白石裕士、秦聡孝、三股浩光、花田俊勝
2. 発表標題 RNAリン酸化酵素は癌の進展に関与する
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 志手優仁、梅田涼平、波田一誠、鹿野健史郎、比嘉涼子、漆畑博太郎、白石裕士、花田俊勝、花田礼子
2. 発表標題 VRK1遺伝子欠損ゼブラフィッシュの作製ならびに生理機能解析
3. 学会等名 第70回西日本生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅田涼平、波田一誠、鹿野健史郎、比嘉涼子、漆畑博太郎、白石裕士、花田俊勝、花田礼子
2. 発表標題 ゼブラフィッシュを用いたVRK2の生理機能解析
3. 学会等名 第70回西日本生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白石裕士
2. 発表標題 非免疫細胞による免疫反応制御機構
3. 学会等名 医大ヶ丘研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白石裕士
2. 発表標題 がんにおけるRNAリン酸化活性の役割
3. 学会等名 第9回癌・炎症と抗酸化研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 波田一誠・田中亮太・漆畑博太郎・井上真紀・白石裕士・花田俊勝
2. 発表標題 神経変性疾患橋小脳低形成のモデルサカナの作製
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masahito Shide, Ryohei Umeda, Kazumasa Hada, Kenshiro Shikano, Ryoko Higa, Hirotaro Urushibata, Hiroshi Shiraishi, Toshikatsu Hanada, Reiko Hanada
2. 発表標題 Deficiency of VRK1 causes microcephaly and alters social interactions in zebrafish
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ryohei Umeda, Kazumasa Hada, Kenshiro Shikano, Ryoko Higa, Hirotaro Urushibata, Hiroshi Shiraishi, Toshikatsu Hanada, Reiko Hanada
2. 発表標題 Physiological function of VRK2 in zebrafish model
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fujinami H, Shiraishi H, Shin T, Mimata H, Hanada T
2. 発表標題 RNA kinase links prostate cancer progression
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Inoue M, Hada K, Shiraishi H, Ishitani T, Matsumoto K, Hanada T
2. 発表標題 tRNA processing defects link to p53-dependent neurodegenerative disease
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Morisaki I, Arai Y, Shiraishi H, Hanada R, Kobayashi T, Hanada T
2. 発表標題 Establishment and Functional Analysis of Pontocerebellar Hypoplasia Type 10 mouse model
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 八塚洋之・白石裕士・清水誠之・石谷太・木許賢一・久保田敏昭・花田俊勝
2. 発表標題 RNAエキソソームの機能破綻による疾患発症の分子機構解明
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sebastian W.A, Shiraishi H, Shimizu N, Umeda R, Hanada R, Hanada T
2. 発表標題 Targeted deletion of ankle2 results brain and testes defect in zebrafish
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関