

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15680

研究課題名（和文）ダイヤモンド・ブラックファン貧血のリボソームタンパク質リン酸化による造血制御解析

研究課題名（英文）Analysis of the erythropoiesis regulation by ribosomal protein phosphorylation

研究代表者

鳥原 英嗣（Torihara, Hidetsugu）

琉球大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：50757218

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：Diamond-Blackfan貧血（DBA）は、赤芽球への分化異常によって引き起こされる先天性疾患である。原因遺伝子のひとつとしてリボソームタンパク質をコードするRPS19が知られている。本研究では、個体レベルで解析が可能なゼブラフィッシュを用い、RPS19のリン酸化状態が赤血球の生成に影響を及ぼすことを明らかにした。また、RPS19のリン酸化酵素の発現を抑制すると、同様に赤血球数が減少したため、RPのリン酸化を介した造血制御機構が存在する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Diamond-Blackfan貧血（DBA）の発症機序として現在最も有力とされるのは、RP遺伝子の変異によりがん抑制遺伝子TP53の経路が活性化されるというものである。しかし、その詳細は不明な点が多い。また、RP遺伝子に変異を持たない患者に関しては原因が不明なままである。本研究では、RPのリン酸化・脱リン酸化の制御が赤血球造血に関与する可能性を見出した。これにより、TP53経路以外のDBAの分子機構について、新たな知見が得られることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Diamond-Blackfan anemia (DBA) is a congenital erythroid aplasia. Ribosomal protein (RP) S19 is one of the causative genes for DBA. The most likely pathogenic mechanism is that the mutation of the RP genes activate the tumor suppressor gene TP53 pathway. However, in this study, we found that the RP phosphorylation might be involved in erythropoiesis in zebrafish.

研究分野：分子生物学

キーワード：ダイヤモンド・ブラックファン貧血 先天性貧血 疾患モデル リン酸化 リボソームタンパク質 ゼブラフィッシュ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Diamond-Blackfan 貧血 (DBA) は、赤芽球への分化異常によって引き起こされる先天性疾患である。その病因は長らく不明であったが、1999 年、原因遺伝子のひとつがリボソームタンパク質 (RP) をコードする *RPS19* であることが明らかになった。興味深いことに、ヒトで 79 種類存在する RP のうち、*RPS19* 以外の一部の RP 遺伝子についても変異が同定されている。患者全体では、約半数が RP 遺伝子に変異を持つため、DBA はリボソームの異常に起因する「リボソーム病」の代表疾患であると考えられている。しかし、疾患の分子機構については不明な点が多く、RP 遺伝子に変異を持たない患者に関しては原因が不明なままである。

現在最も有力なのは、RP 遺伝子の変異によりがん抑制遺伝子 TP53 の経路が活性化され、DBA の発症に重要な役割を果たしているというものである。ところが、ゼブラフィッシュを用いた系において、RP 異常による貧血の主な原因として TP53 以外の経路が関わる可能性が示唆された。また、DBA 患者で確認された *RPS19* 変異箇所は、リン酸化領域が多数含まれている。そのひとつである 59 番目のセリン残基 (Ser59) は、*in vitro* での解析により、リン酸化を受けやすいことを以前見出した。そこで、RP のリン酸化が赤血球造血に関与する仕組みがあるのではないかと考え、本研究を立案した。ゼブラフィッシュを用いた独自のリン酸化解析システムにより、DBA の分子機構として新たな知見を得ることを目指す。

### 2. 研究の目的

- (1) DBA 患者で最も多く変異が確認されている *RPS19* について、そのリン酸化状態が赤血球造血に関与するとの仮説を立て、検証する。
- (2) *RPS19* をリン酸化するキナーゼについて、ゼブラフィッシュを用いて発現を調節し、リン酸化が関わる赤血球造血の分子機構を明らかにする。

### 3. 研究の方法

- (1) DBA の原因遺伝子の 1 つである *RPS19* について、ゼブラフィッシュのオルソログである *rps19* をモルフォリノアンチセンスオリゴ (MO) によりノックダウンする。DBA 患者で変異が見出されている 59 番目のセリン残基 (Ser59) において、変異を導入した合成 mRNA によるレスキュー実験を行い、赤血球造血への影響を検討する。
- (2) *RPS19* をリン酸化するキナーゼである PIM1 について、ゼブラフィッシュで発現抑制胚とノックアウト体を作成し、赤血球造血への影響を検討する。  
ヘモグロビン染色により、初期胚における赤血球造血を観察する。  
定量 PCR による造血因子の発現変動を検討する。

### 4. 研究成果

- (1) ゼブラフィッシュ *rps19* の発現抑制および野生型 mRNA によるレスキュー実験は、これまでに報告されている系を用いた。*rps19* の翻訳開始点を含む領域を標的とした MO を受精卵に微量注入すると、頭部や尾部の発生に異常が生じた。発現量については、転写レベルおよび翻訳レベルでの低下を確認した。また、MO と同時に *in vitro* 合成した野生型 (WT) mRNA を注入すると、異常表現型と発現量はほぼ正常にレスキューされることを確認した。これに対し、Ser59 をアラニン残基あるいはアスパラギン酸残基に置換した合成 *rps19* mRNA (S59A、S59D) を MO と同時に注入し、解析を行った。*rps19* MO の注入で生じる頭部や尾部の異常は、S59A mRNA では一部回復したが、S59D mRNA ではほとんど回復が見られなかった。次に受精後 48 時間の各胚に対し、ヘモグロビン染色による胸部の赤血球数を比較した。その結果、MO による赤血球数の著減は WT mRNA によって回復することを確認した。これに対し、S59A mRNA、S59D mRNA では、赤血球数の回復は限定的だった。以上より、正常な赤血球造血には、*RPS19* (Ser59) の可逆的なリン酸化制御が重要であることが示唆された。

得られた各種胚について、定量 PCR による発現量解析を行ったが、造血関連因子について、顕著な発現量の差は見出せなかった。赤血球の細胞数は胚全体の 1% 以下であるため、現在、それぞれの胚から赤血球を単離し、発生ステージ毎の発現プロファイルの詳細な解析を進めている。

- (2) *rps19* のリン酸化状態がどのように造血に関与するか詳細はまだ不明だが、可逆的なリン酸化の障害が赤血球造血に影響を与えていることが示唆されたため、次に *rps19* Ser59 をリン酸化するキナーゼ *pim1* に対して、MO による発現抑制胚および、ゲノム編集によるノックアウト

体の作成を行った。pim1 MO はエクソンとイントロンの境界部位に設計し、スプライシング異常による正常な成熟 mRNA 産生の阻害を試みた。MO を微量注入し、RT-PCR により転写産物を解析したところ、本来イントロンがスキップする部位が残存し、残ったイントロンの途中でストップコドンが生じた。得られた発現抑制胚では、rps19 発現抑制胚同様、頭部と尾部に形態の異常が見られた。ゲノム編集は CRISPR/Cas9 システムを用い、非相同性末端結合 (NHEJ) での欠失によりファウンダーを得、F2 世代でホモ変異体を選別した。

得られた胚に対し、受精後 48 時間時点でヘモグロビン染色を行ったところ、rps19 ノックダウン胚と同様に赤血球数が著しく減少した。

受精後 24 時間の *pim1* ノックアウトゼブラフィッシュを用いて、造血関連因子について定量 PCR を行った。その結果、赤血球の分化を誘導する転写因子 *gata1* の発現が約 3 倍に上昇した。*gata1* は、DBA 患者において RP 以外で変異が確認された唯一の遺伝子であり、リン酸化が *gata1* の発現制御に関与している可能性が示唆された。しかし、DBA 患者では造血において赤血球のみ障害が生じるため *gata1* は発現減少が期待されること、また本実験は (1) 同様胚の全細胞を用いていること、さらに翻訳レベルでの結果ではないこと、を踏まえ、慎重に検討する必要がある。現在、*pim1* についても、赤血球を単離した解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Okitsu-Sakurayama Shiho, Higa-Nakamine Sayomi, Torihara Hidetsugu, Takahashi Hana, Higashiyama Shigeki, Yamamoto Hideyuki	4. 巻 234
2. 論文標題 Activation of Pyk2 by CaM kinase II in cultured hypothalamic neurons and gonadotroph cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 6865 ~ 6875
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcp.27443	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 澳津志帆, 仲嶺三代美, 鳥原英嗣, 山本秀幸
2. 発表標題 Gq/11と共役するGPCR刺激によるPyk2の活性化反応
3. 学会等名 平成30年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 澳津志帆, 仲嶺三代美, 鳥原英嗣, 東山繁樹, 山本秀幸
2. 発表標題 GnRH受容体刺激によるERKの活性化反応とProHB-EGFの切断反応へのPyk2の関与
3. 学会等名 第71回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鳥原英嗣, 仲嶺三代美, 前田紀子, 上地球代, 吉浜麻生, 中島由香里, 剣持直哉, 山本 秀幸
2. 発表標題 ゼブラフィッシュDBAモデルを用いたリボソームタンパク質S19のリン酸化および赤血球造血制御の解析
3. 学会等名 第71回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 澳津志帆, 仲嶺三代美, 鳥原英嗣, 東山繁樹, 山本秀幸
2. 発表標題 GnRH受容体刺激後によるPyk2の活性化反応とproHB-EGFの切断反応
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 鳥原英嗣, 仲嶺三代美, 澳津志帆, 上地珠代, 剣持直哉, 山本秀幸
2. 発表標題 ゼブラフィッシュを用いたリポソームタンパク質S19のリン酸化反応による赤血球造血制御の解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----