

平成 22 年 5 月 27 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20790734
 研究課題名 (和文) 造血異常とリボソームタンパク質遺伝子の変異：ゼブラフィッシュを用いたアプローチ
 研究課題名 (英文) Defective erythropoiesis and ribosomal protein genes: Analysis of zebrafish model for Diamond-Blackfan anemia.
 研究代表者
 上地 珠代 (UECHI TAMAYO)
 宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・研究員
 研究者番号：10381104

研究成果の概要 (和文)：ゼブラフィッシュにおいて、アンチセンスオリゴによりリボソームタンパク質 *rps19* 遺伝子の発現を抑制し、ダイヤモンド・ブラックファン貧血モデルを作製した。S19 タンパク質の発現が抑制されても、個体の全タンパク質の量やリボソームの翻訳効率は大きく変化しなかった。しかし、受精後 2～3 日で血球の成熟が停止し血球数が顕著に減少した。これらのことから、造血に関与する因子の翻訳が特異的に阻害されている可能性が考えられた。

研究成果の概要 (英文)：To investigate the pathogenic mechanism of Diamond-Blackfan anemia (DBA), I have developed a zebrafish DBA model by knocking down the ribosomal protein s19 gene using morpholino antisense oligo. Translational efficiency or production of total proteins in this model seemed almost same as control embryos. However, they showed the defective maturation of erythroid lineage by 2-3 days post fertilization. This suggests that there is an unknown mechanism that affect translation of specific factors, especially those involved in the erythroid pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：分子遺伝学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：リボソームタンパク質遺伝子、造血異常、ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

リボソームは mRNA の情報をタンパク質へと翻訳する装置で、すべての生物がもっている。ヒトの場合、4 種類のリボソーム RNA (rRNA) と 79 種類のリボソームタンパク質 (RP) で構成される。これらの構成因子がひ

とつでも欠けると細胞内でタンパク質を合成できなくなり、生命を維持できなくなると考えられてきた。しかし、1999 年にダイヤモンド・ブラックファン貧血 (DBA) の患者の 25% で RPS19 遺伝子に変異していると報告された。従って、リボソームの異常は必ずし

も個体の死（発生異常）を招くものではなく、様々な疾患を引き起こす原因になり得ると予測されるようになった。特に、DBA と同様に骨髄機能不全を伴う疾患との関連が注目された。Schwachman-Diamond 症候群 (SDS)、先天性角化不全 (DC)、Cartilage-hair hypoplasia (CHH) の患者は骨髄不全の他に、DBA と類似の身体的特徴も示す。これらの疾患で同定された責任遺伝子（それぞれ *SBDS*、*DKC*、*RMRP*）は、直接リボソームを構成する成分ではないが、rRNA の成熟に何らかのかたちで関わることが明らかになりつつあった。しかし、これらの遺伝子は全身で発現している。そのような遺伝子の変異が、どのようにして特定組織の異常と結びつくのかが大きな謎となっていた。

そこで、私はリボソームの構成因子の異常によって翻訳機能が変化し、その変化に対して感受性の高い組織で顕著に異常が現れるのではないかと予測した（図 1）。例えば、RPS19 タンパク質が造血過程で働く因子を翻訳する際に、何か重要な役割を担っていると仮定すると、S19 タンパク質の変異によってその因子の翻訳効率が低下し、貧血が引き起こされると考えられる。これを証明するために、血球の解析に適したモデル生物であるゼブラフィッシュを用いて DBA モデルを作製し、RP の変異による貧血の発症機序を解明する手がかりを得たいと考えた。

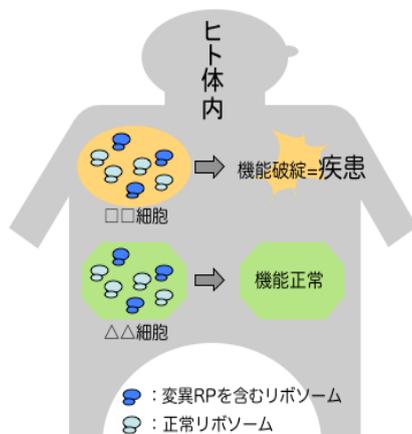


図 1 同じリボソーム異常でも影響を受ける細胞と受けにくい細胞があるのでは？

2. 研究の目的

ゼブラフィッシュにおいて *rps19* 遺伝子の発現をモルフォリンアンチセンスオリゴ (MO) によって抑制し、S19 タンパク質の量的変化がどのようにして造血に影響を及ぼすのかを明らかにするために、次のことを行う。

(1) S19 タンパク質の発現を抑制した DBA モデル胚からポリソーム (1つの mRNA に複数

のリボソームが結合した状態) を回収し、ポリソーム形成のパターンを解析する。さらに、ポリソームから mRNA を精製し、活発に翻訳されている mRNA のプロファイルを作製する。

(2) S19 タンパク質の発現量の低下と血球の成熟度との関連を明らかにするために、受精後 2~4 日目の DBA モデル胚から血球を採集し、それらの数や形態を詳細に解析する。

3. 研究の方法

(1) DBA モデルとしての有用性の確認

① Western blotting 解析：一細胞期の受精卵に MO を注入し、受精後 24 時間胚からタンパク質を抽出する。S19 タンパク質の発現量が低下していることを、により確認する。

② 血球系細胞の分化の解析：造血系細胞のマーカー遺伝子 (*lmo2*, *gata1*, *gata2*, *band3*, *pu.1*, *mpo*, *l-plastin*) の発現を、*in situ* ハイブリダイゼーション法または半定量的 PCR 法を用いて解析する。

③ レスキュー実験：正常な *rps19* mRNA および患者型変異を含む mRNA を *in vitro* 合成する。これら mRNA には MO が結合しないように塩基置換を施す。ただし、コードするアミノ酸が変更されないような塩基置換とする。合成 mRNA と MO を同時に受精卵へ注入し、異常な表現型が回復するかどうかを解析する。

④ マイクロアレイ解析：MO またはコントロール MO (*rps19* mRNA に結合しない mismatches を含むアンチセンス) を注入した胚から RNA を抽出する。これらを鋳型に cRNA を合成してビオチンラベルし、ゼブラフィッシュの約 15,000 遺伝子の発現が解析できる DNA チップ (Affymetrix 社製) に対してハイブリダイゼーション反応させる。結果を専用ソフト (GeneSpring) で解析し、ポリソームを形成する mRNA の発現プロファイルを作製する。正常胚と変異胚のプロファイルを比較し、増減が認められる遺伝子群を抽出する。

(2) ポリソーム解析

2つのサブユニットが正常に会合した 80S モノソーム、また 1つの mRNA に複数のリボソームが結合したポリソームの形成のパターンを解析する。DBA モデル胚からの抽出物をショ糖密度勾配 (10~50%) に載せて遠心し、フラクションコレクターにより分取する。分取の際に UV モニターにより 260nm での吸光度を連続的に測定する。正常胚と DBA モデル胚の吸光度の変化を比較し、S19 タンパク質の発現低下がリボソームの生合成に及ぼす影響を明らかにする。

さらに、80S およびポリソーム画分から RNA を抽出し cDNA を合成する。マイクロアレイ解析で発現が変動していた遺伝子などについて、翻訳レベルでも変動が見られるかどうか、合成した cDNA を鋳型として定量 PCR 法により解析する。

(3) 赤血球系細胞の成熟度の解析

S19 タンパク質の発現量の低下に伴って、赤血球の分化や形態にどのような異常が起きているかを解析する。MO を注入した受精後 30 時間、48 時間、72 時間、96 時間のそれぞれの胚から血球を採集する。サイトスピンを用いてプレパラートを作製し、ギムザ染色を行う。形態観察により、成熟度の判定を行う。また、*in vitro* 合成した *rps19* mRNA の注入によって、赤血球の成熟度が正常に回復するかどうかを確認する。

4. 研究成果

(1) DBA モデルとしての有効性の確認

MO の注入によって S19 タンパク質の量は正常胚の 30% 程度まで低下することが示唆された。これらの胚では受精後 48 時間までに著しい赤血球数の低下がみられた。血管形成、単球、顆粒球の形成は阻害されないことを確認した。赤血球数は合成 *rps19* mRNA の注入により回復した。また、患者型の変異を挿入した合成 mRNA では血球数の回復はみ

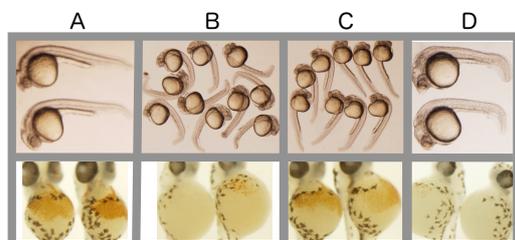


図2 合成 mRNA による異常表現型の回復
正常胚(A)と比較すると、*rps19* MO の注入によって尾部の屈曲や血球数が減少している(B)ことがわかる。これらの異常表現型は合成 *rps19* mRNA の注入によってレスキューされる(C)が、患者型の変異を含む mRNA の場合は回復しなかった(D)。下段の写真 A と C にみられる赤茶に染まっている領域は赤血球。

られなかった(図2)。これらのことから、S19 タンパク質が造血においては赤血球特異的な役割を担っていることが示唆された。形態形成においては、特に脳構造や尾部の変形が観察された。これらの部位ではアポトーシスが亢進していた。そこで、*rps19* と *p53* のダブルノックダウン胚を作製した。その結果、異常な表現型はほぼ完全にレスキューされた。また、リボソームの異常によるアポトーシスの亢進は普遍的な応答で、S19 発現抑制に特異的ではないことを確認した。また、

DBA モデルから RNA を回収し、DNA チップを用いてトランスクリプトーム解析を行った。その結果、造血に関わる遺伝子 (*hbbe2*, *melk*, *spil*, *tubb5* など) の mRNA レベルでの発現が変動していることが示唆された。

(2) ポリソーム解析

DBA モデル胚およびコントロール胚(ミスマッチの MO を注入) から、ショ糖密度勾配遠心法によりポリソームを分画した。S19 タンパク質の発現を抑制しても、ポリソーム形

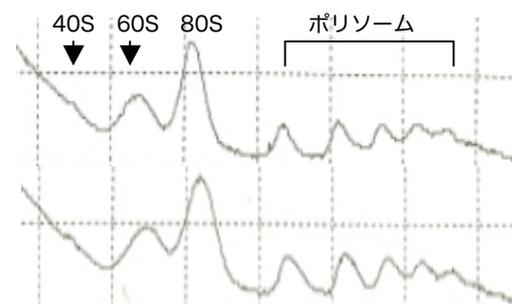


図3 ポリソーム解析
各リボソームのサブユニット(40S, 60S)、ポリソームの生成はコントロール胚(上)と DBA モデル胚(下)でほぼ同じパターンを示した。

成のパターンに変化はなく(図3)、リボソームの翻訳効率は大きく変化しないことが示唆された。そこで、翻訳されている mRNA の量に変動があるかどうかを確認するために、ポリソーム画分から mRNA を精製した。この mRNA を鋳型に cDNA を合成し、造血に関わる遺伝子 (*sptb*, *tubb5*, *mpo*) と、アポトーシスに関わる遺伝子 (*p53*, *p21*, *bax*) について半定量的 PCR を行った。表現型の解析によって赤血球の減少やアポトーシスの亢進が確認されたことと一致して、*sptb*、*tubb5*、*mpo* の発現は減少し、*p53* の発現は顕著に増加することが示唆された。

(3) 赤血球の成熟度の解析

受精後 30、48、72 時間の S19 発現抑制胚から血球を採集してギムザ染色後、形態観察により赤血球の成熟度を判定した。正常胚と比較して血球の成熟は遅延し(図4)、48 時間までにほとんどの血球でアポトーシスが亢進していた。合成した *rps19* mRNA の注入により血球の成熟はほぼ正常に回復した。そこで、頭部や尾部と同様に、血球の成熟も *p53* の発現抑制によってレスキューされるかどうかを解析した。しかし、*rps19* MO と *p53* MO を同時に注入しても、顕著な赤血球数と成熟度の回復は見られなかった。

マウスにおいて DBA モデルの作製が試みられたが、*RPS19* 完全欠損で致死、ヘテロ変異では正常個体しか得られなかった。ゼブラフィッシュを用いると、MO による遺伝子の

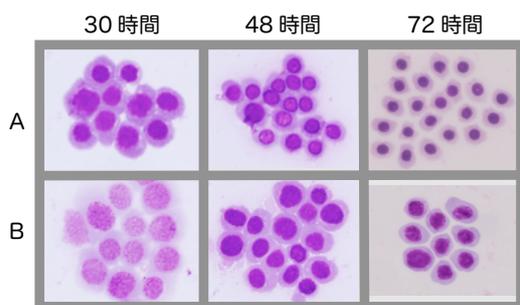


図4 赤血球の成熟
正常胚(A)の赤血球は核が凝縮し小さな楕円形の細胞へと成熟していく。しかし、DBAモデル(B)では核の大きさが不揃いで、受精後72時間でも大きな細胞しかみられなかった。

発現抑制の手法によって必要量のモデル胚を安定して得ることができる。また、様々な変異パターンのタンパク質を *in vivo* で発現させることもできる。個体を用いた多角的な解析により、造血に関する新たな知見が得られる可能性が高い。また、ゼブラフィッシュの造血プログラムはヒトとほぼ同じであるため、DBAの新たな治療を開発する上で有用な情報が得られると考えている。

ゼブラフィッシュを用いたポリソーム解析の手法を確立できたことにより、これまでとは全く異なる翻訳制御という観点からDBAにアプローチすることが可能となった。当初は、DNAチップを用いて、ポリソームを形成する mRNA のプロファイルの作製をめざしていた。しかし、次世代シーケンサーが普及したことから、現在はこれを用いた解析の準備を進めている。本研究において、私が提唱する「RP が関与する組織特異的な翻訳制御機構」を解明するための基盤を整備することができたと考える。

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3件)

- ① 上地球代, 剣持直哉. リボソーム病: 翻訳装置のシステム障害. 遺伝子医学MOOK15号「最新RNAと疾患研究」, 査読無し, 79-84 (2009)
- ② Chakraborty A, Uechi T, Higa S, Torihara H, Kenmochi N. Loss of ribosomal protein L11 affects zebrafish embryonic development through a p53-dependent apoptotic response. *PLoS ONE*. 査読有り 4: e4152 (2009)
- ③ Uechi T, Nakajima Y, Chakraborty A, Torihara H, Higa S, Kenmochi N. Deficiency of ribosomal protein S19 during early embryogenesis leads to reduction of erythrocytes in a zebrafish model of

Diamond-Blackfan anemia. *Hum Mol Genet*. 査読有り 17: 3204-3211 (2008)

[学会発表] (計5件)

- ① 上地球代, 中島由香里, 鳥原英嗣, 剣持直哉. リボソームの翻訳異常とダイヤモンド・ブラックファン貧血: ゼブラフィッシュを用いた解析 日本分子生物学会, 横浜, 2009年12月.
- ② Uechi T, Nakajima Y, Torihara H, Chakraborty A, and Kenmochi N. Loss of ribosomal protein s19 leads to defective erythropoiesis in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia Ribosome Synthesis, Regensburg, ドイツ, 2009年8月.
- ③ 上地球代, 中島由香里, 鳥原英嗣, 剣持直哉. 造血異常とリボソームタンパク質遺伝子の変異: ゼブラフィッシュを用いた解析, 日本RNA学会, 新潟, 2009年7月.
- ④ 上地球代, 中島由香里, 鳥原英嗣, アニルバン チャクラボルティ, 比嘉三代美, 剣持直哉. 翻訳異常とダイヤモンド・ブラックファン貧血: ゼブラフィッシュモデルを用いた解析, 日本分子生物学会, 神戸, 2008年12月.
- ⑤ 上地球代, 中島由香里, 鳥原英嗣, アニルバン チャクラボルティ, 比嘉三代美, 剣持直哉. リボソームタンパク質の変異と疾患: ダイヤモンド・ブラックファン貧血モデルの解析, 日本RNA学会, 札幌, 2008年7月.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上地球代 (UECHI TAMAYO)
宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・研究員
研究者番号: 10381104