

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08260

研究課題名(和文) リボソームタンパク質のリン酸化を介した先天性貧血における造血制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of hematopoietic regulation in congenital anemia via phosphorylation of ribosomal proteins

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ゼブラフィッシュモデルを用いて、(1)rps19 Ser59のリン酸化・非リン酸化の状態における解析と、(2)リン酸化酵素pim1のリン酸化制御が与える影響の解析両面から、赤血球造血へのリン酸化の影響を検討した。(1)については、網羅的遺伝子解析および赤血球細胞を単離した実験で、他の組織と異なる発現プロファイルが得られた。(2)については、これまで作製したノックダウン・ノックアウトゼブラフィッシュでの解析に加え、阻害剤によっても同様に赤血球造血が障害されるという結果を得た。今後は、これらのモデルを用いて、rps19のリン酸化関与する赤血球造血機構の解明を目指す。

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、これまで関連が知られていない経路による造血制御機構の存在が示唆された。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 characterized by mutations in the ribosomal protein (RP) gene, observed in approximately half of the patients. The ribosomal protein S19 (RPS19) gene, in particular, exhibits the highest mutation frequency (~25%), with a mutational hotspot identified between amino acid residues 52 and 62. Nevertheless, the precise reason why mutations in the ubiquitously expressed RPS19 gene specifically impact erythropoiesis remains unclear. In a previous study, we demonstrated in vitro that the 59th serine residue (Ser59) of RPS19 undergoes phosphorylation mediated by the PIM1 kinase. Therefore, we employed zebrafish as a model organism to investigate the influence of RPS19 phosphorylation on erythropoiesis within the context of ribosomal composition.

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

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、主に乳幼児期に発症する先天性の疾患で、造血過程においては赤血球への分化のみが障害される。予後は比較的良いが、患者の 40-50%において、頭部、顔部、上肢、泌尿生殖器、心臓等に奇形を合併する。血液腫瘍や固形がんを伴う場合も多い。1930年代に初めて患者が報告された後、詳細な病因は不明であったが、1999年に、ヒトで 79種類あるリボソームタンパク質 (RP) のうち、*RPS19* をコードする遺伝子が原因遺伝子であることが明らかとなった。*RPS19* の変異は DBA の全患者の約 25% を占める。興味深いことに *RPS19* 以外にも多数の RP において変異が確認されている。このことから、DBA の発症機序にはリボソームの機能障害が中心的な役割を果たしていると考えられている。マウスにおいて、患者型の変異を導入した *Rps19* の過剰発現や RNAi による *Rps19* 発現抑制をコンディショナルな条件下で行なうと、ヒトと同様に赤血球造血が障害され、がん抑制遺伝子 *TP53* 経路の活性化が示唆された。近年では、臨床的に DBA と診断された患者で、*TP53* に変異が見つかり、*TP53* 経路の活性化が明らかにされている。これらのことから、*TP53* 経路の活性化が DBA 発症の主要な分子機構と考えられている。一方、我々は以前、ゼブラフィッシュによる個体レベルでの解析により、赤血球造血には *TP53* 以外の経路が関わっている可能性を報告した。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。そこで今回、RP のリン酸化に着目し、赤血球造血機構の検討を行った。

2. 研究の目的

DBA の原因遺伝子の 1 つである *RPS19* について、リン酸化を介した赤血球造血機構の解析を行う。ゼブラフィッシュを用い、オルソログの *rps19* のリン酸化制御が赤血球造血に関与していると仮説を立てて検証し、現在知られていない DBA 発症機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ゼブラフィッシュの初期発生の各種遺伝子発現変動の解析

定量 PCR 法により、ゼブラフィッシュ初期発生における各種遺伝子発現変動を解析する。

(2) 赤血球特異的な遺伝子発現変動解析

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。

(3) Pim1 ノックアウトゼブラフィッシュを用いた解析

RPS19 (Ser59) リン酸化キナーゼである *pim1* ノックアウトゼブラフィッシュを用いた RNA-seq 解析、および阻害剤による赤血球造血の解析を行う。

(4) *Rps19* のリン酸化状態による翻訳効率を考慮した遺伝子発現解析

(2) で作成したゼブラフィッシュモデルを用い、RNA-seq による解析を行う。このとき、mRNA の翻訳効率が反映される系を用いることにより、リボソームタンパク質のリン酸化が翻訳制御に与える影響も解析する。

4. 研究成果

(1) ゼブラフィッシュの初期発生の各種遺伝子発現変動の解析

ゼブラフィッシュは、受精後約 24 時間 (24 hpf) で初期造血から二次造血に切り替わる。そこで受精直後から 48 hpf において、定量 PCR による経時的な各種遺伝子の発現変動を解析した。その結果、赤血球マーカー遺伝子である *gata1* ならびに RPS19 (Ser59) リン酸化酵素遺伝子 *pim1* は、15-21 hpf において、発現ピークがあることを確認した。

(2) 赤血球特異的な遺伝子発現変動解析

赤血球特異的なマーカー遺伝子である *gata1* プロモーター領域に mRFP を接続した遺伝子改変ゼブラフィッシュを用い、*gata1* 発現細胞をセルソーターにより分取することで赤血球を単離した。解析には、*rps19* MO ノックダウン胚、野生型の合成 mRNA レスキュー胚、Ser59 の恒常的リン酸化変異 (S59D) および恒常的脱リン酸化変異 (S59A) 合成 mRNA によるレスキュー胚を用い、定量 PCR を行った。その結果、赤血球造血関連の遺伝子について、S59D 胚では発現の回復が一部障害され、*hbbe1* では約 6 割の回復にとどまることが明らかになった。これにより、RPS19 リン酸化が赤血球造血に関与する可能性が強く示唆された。

(3) *pim1* ノックアウトゼブラフィッシュを用いた解析

以前作成した RPS19 (Ser59) リン酸化酵素遺伝子 *pim1* のノックアウトゼブラフィッシュについて、RNA-seq 解析を行ったところ、糖脂質代謝に関連する遺伝子群で変動が見られた。また、ゼブラフィッシュ初期胚のヘモグロビン染色を行ったところ、以前行った *pim1* ノックダウン胚同様、ノックアウト体および、阻害剤処理胚で同様の赤血球造血の障害が観察され、Pim1 のキナーゼ活性と造血の関連が示唆された。

(4) Rps19 のリン酸化状態による翻訳効率を考慮した遺伝子発現解析

(2)で作成したゼブラフィッシュモデルを用い、RNA-seq を行った。このとき、total RNA と同時に、リボソームが結合する mRNA を分取し、翻訳効率が反映された発現プロファイルを得た。その結果、赤血球造血関連遺伝子に加え、(3)同様、糖脂質代謝に関連する遺伝子の変動が見られた。現在、より詳細な解析を進めている。今後はこれらの遺伝子についてノックダウンおよびノックアウトゼブラフィッシュを作成し、リン酸化状態との関連を詳細に検討し、RPS19 のリン酸化が関与する赤血球造血機構について明らかにしたいと考えている。

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, Higashiyama Shigeki, Yamamoto Hideyuki	4. 巻 236
2. 論文標題 Roles of Pyk2 in signal transduction after gonadotropin releasing hormone receptor stimulation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 3033 ~ 3043
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcp.30077	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3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 GnRH受容体刺激後のシグナル伝達におけるPyk2の機能
3. 学会等名 第73回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本秀幸, 仲嶺三代美, 澳津志帆, 鳥原英嗣
2. 発表標題 GnRHによるPyk2の活性化のシグナル伝達へのCaMキナーゼグループの関与
3. 学会等名 第63回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鳥原英嗣, 黒柳秀人
2. 発表標題 Regulation of erythropoiesis by phosphorylation of ribosomal protein S19 in the zebrafish model
3. 学会等名 第23回日本RNA学会年会
4. 発表年 2022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
研究 分担 者	仲嶺 三代美 (Nakamine Sayomi) (20381105)	琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授 (18001)	

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
---------	---------