

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20745

研究課題名(和文) リボソームrRNAプロセッシング異常による神経筋病態の新規分子メカニズム解明

研究課題名(英文) Elucidating novel molecular mechanisms of neuromuscular disorders due to impaired ribosomal rRNA processing

研究代表者

市野 紀子 (Ichino, Noriko)

順天堂大学・大学院医学研究科・特任研究員

研究者番号：40649365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：gar1はリボソーム機能に関わる分子であるが、その欠損による病態メカニズムは不明である。本研究では、gar1変異体の細胞死誘導メカニズムを解析した。p53の翻訳を抑制すると、骨格筋病変は改善されなかったが、他の病態モデルに共通する眼球病変はp53翻訳阻害により改善傾向があった。骨格筋ではp53非依存的な細胞死が、眼球ではp53依存的/非依存的細胞死が誘導されていることを示した。また、p53と拮抗する113p53の発現量がgar1変異体では増加していた。結論として、gar1欠損の病態メカニズムには組織特異的にp53依存性と非依存性があり、リボソーム病の病態関連してい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

ゼブラフィッシュgar1変異体には、他のリボソーム病のゼブラフィッシュ病態モデルと共通する発生異常だけでなく、著名な骨格筋発生異常が新たに見出されたが、その病態メカニズムは不明であった。本研究では、分子生物学的な手法を用いて、gar1変異体に特徴的な骨格筋病態がp53非依存的細胞死であることを示し、この骨格筋細胞死メカニズムの組織特異性を初めて明らかにした。リボソームは全ての細胞に重要なオルガネラであるが、リボソーム病には組織特異性があることから、本研究で見出された知見は、リボソーム病の病態メカニズムにおける組織特異性を解き明かすための重要なマイルストーンであると考えている。

研究成果の概要(英文)：gar1 is a gene involved in the function of ribosomes, but the pathogenic mechanism caused by its deficiency is unknown. In this study, we analyzed the mechanism of cell death induction in gar1 mutant showing developmental abnormalities in skeletal muscle and eyes. When translation of p53 protein was suppressed by microinjection of morpholino antisense oligonucleotide, microphthalmia tended to improve, but skeletal muscle impairment did not improve. This suggests that p53-independent cell death is induced skeletal muscle and both p53-dependent and p53-independent mechanisms of cell death are induced in the eyes. In addition, the expression level of p53 isoform 113p53 was increased in gar1 mutant, but it also had no effect on inhibition of cell death by p53. In conclusion, there is a tissue specificity in the mechanism of developmental abnormalities in skeletal muscle and eyes caused by gar1 deficiency, which may be related to the characteristic phenotype of ribosomal disease.

研究分野：発生生物学

キーワード：ribosome H/ACA ribonucleoprotein gar1 skeletal muscle developmental biology zebrafish

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

H/ACA ribonucleoproteinはDKC1、NOP10、NHP2、GAR1の4分子で構成されており、rRNAのシュドウリジル化を誘導する働きにより、リボソームの生合成に重要な役割を担っている。この複合体のCatalytic moleculeであるDKC1の欠損はDyskeratosis congenitaの原因として知られている[1]。一方で、GAR1変異とヒト疾患との関連性は知られていない(OMIM:606468)。研究代表者は、フォワードジェネティクス法により構築した1200種以上のゼブラフィッシュ変異体を用いて[2]、骨格筋の構造分子または骨格筋機能に関連する分子を抽出するため、フェノタイプスクリーニングを行ったところ、GBT0434変異体(*gar1^{mn0434Gt/mn0434Gt}*)が顕著な骨格筋構造異常を呈することを初めて見出した。リボソーム生合成に関わるGAR1を欠損したゼブラフィッシュGBT0434変異体(*gar1^{mn0434Gt/mn0434Gt}*)が呈するサルコメア構造が破壊されていることから、*gar1*欠損によるリボソーム生合成障害により、p53を介したアポトーシスの誘導が主要なメカニズムであることを仮定したが、予備実験において、*gar1^{mn0434Gt/mn0434Gt}*のp53ノックダウンによって、骨格筋発生異常が回復しない可能性を見出した。

2. 研究の目的

本研究は、ゼブラフィッシュ *gar1^{mn0434Gt/mn0434Gt}* 変異体に発現する骨格筋発生異常は、p53依存の経路または p53 非依存の経路のいずれかを介している可能性に着目し、病態メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

GBT0434ヘテロ接合体(*gar1^{mn0434Gt/+}*)を交配して獲得した受精卵のp53をノックダウンするために、1-4細胞期の受精卵にcontrol standard MO (ctrl-MO)またはp53転写を阻害するp53-MOを4ngをマイクロインジェクションした(IM-400,成重科学)。受精後48時間において、骨格筋病態を観察するために、複屈折光の物理的特性を活用し、骨格筋発生異常を定量化するBirefringence Assay法を用いた(REF)。またWT(*gar1^{+/+}*)はRFP(-)個体とし、RFP(+)個体のうち特徴的なPhenotypeを有する個体を*gar1^{mn0434Gt/mn0434Gt}*とした。このようにジェノタイプを判定することに問題がないことをPCR法を用いて確認した。次に、ジェノタイプ別に分類した複数個体を集め、Total RNAを抽出した(RNeasy micro kit, QIAGEN)。吸光度法を用いて抽出したtotal RNA濃度を測定し(NanoDrop, Thermo Fisher Scientific)。各サンプルから100ngのTotal RNAを用い、逆転写反応によりcDNAを合成した(iScript™ cDNA Synthesis Kit, BIO-RAD)。遺伝子発現解析は定量的RT-PCR法を用いて実施した(PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix, Thermo Fisher Scientific)。

4. 研究成果

Morpholino Antisense Oligonucleotide (MO)を用いて、GBT0434変異体(*gar1^{mn0434Gt/mn0434Gt}*)におけるp53タンパク質の翻訳を抑制することにより、骨格筋におけるp53依存のアポトーシス誘導を阻害したところ、GBT0434変異体の骨格筋病変の改善は見られなかった(Fig.1)。

このことから、p53非依存的なシグナルにより細胞死が誘導され、骨格筋構造が障害されることが確認された。一方でGBT0434変異体は小眼症を呈することも特徴的であるが、p53をノックダウンすることにより、眼球病変の改善傾向がみられることから、*gar1*欠損による病態メカニズムには組織特異性が確認されたことは新規性がある。さらに、アイソフォーム113p53は、主にbcl2l1を介してp53と拮抗してアポトーシスを抑制する働きを持つことから[3]、p53と113p53の発現量の変化を解析することにより、骨格筋病態の病態メカニズムがp53非依存的であることが定量的に評価することが可能となる。定量的逆転写PCR法を用いてp53および113p53 mRNAの発現量を測定すると、*gar1^{mn0434Gt/mn0434Gt}*はp53 mRNAが減少し、113p53 mRNAの増加が見られた。さらに、WTと*gar1^{mn0434Gt/mn0434Gt}*の両者にMOを導入してp53をノックダウンすると*gar1^{mn0434Gt/mn0434Gt}*において113p53 mRNAの発現のみが顕著に増加することが明らかとなった。これらの結果は、p53の113p53の発現増加が誘導しているにもかかわらず、細胞死が抑制されておらず、異なるシグナル経路を介して細胞死が誘導されていることを示唆している(Fig.2)。結論として、*gar1*欠損によりp53非依存的経路を介した細胞死が誘導されることによって、骨格筋発生が障害されていることが明らかとなった。また骨格筋以外の組織発生における異常(特に眼球発生)においては、p53依存の経路とp53非依存の経路の両方が誘導されている可能性があり、細胞死誘導メカニズムの組織特異性が示された。このことはリボソーム病が特徴的な組織特異的な病態を示すこととの関連性が考えられる[4]。

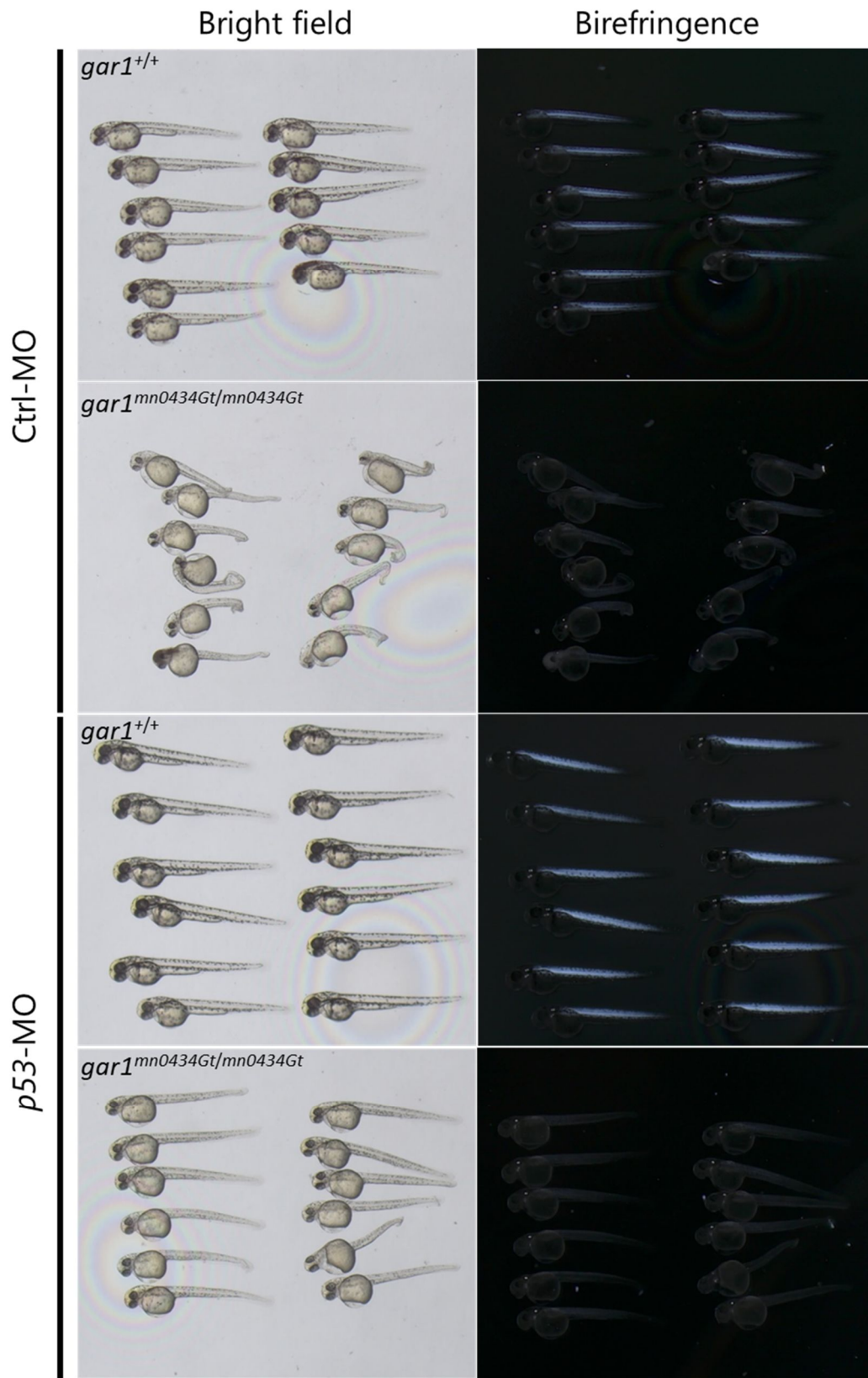


Fig. 1 Birefringence Assay による骨格筋病態評価

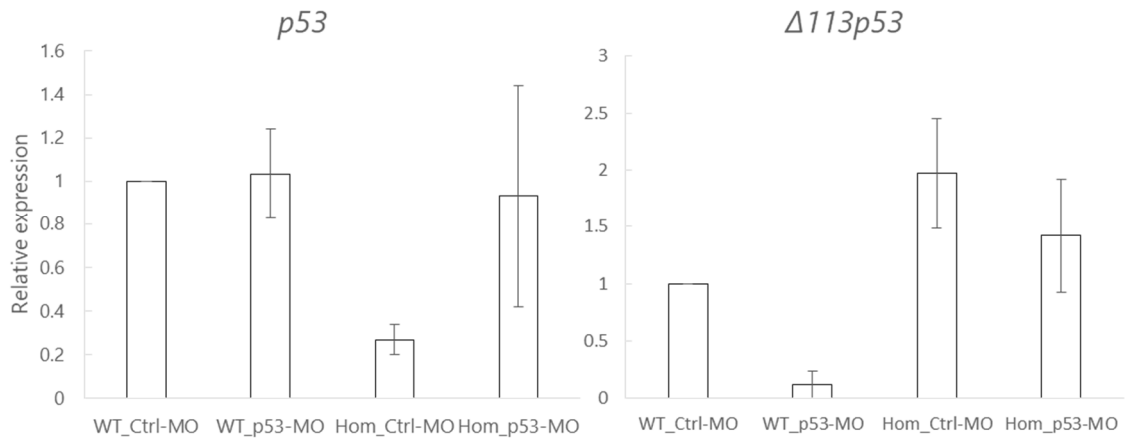


Fig. 2 *p53* および $\Delta 113p53$ mRNA の発現量

参考文献

- [1] Pogacić V, Dragon F, Filipowicz W. Human H/ACA small nucleolar RNPs and telomerase share evolutionarily conserved proteins NHP2 and NOP10. *Mol Cell Biol*. 2000 Dec;20(23):9028-40. doi: 10.1128/MCB.20.23.9028-9040.2000. PMID: 11074001; PMCID: PMC86556.
- [2] Ichino N, Serres MR, Urban RM, Urban MD, Treichel AJ, Schaeffbauer KJ, Tallant LE, Varshney GK, Skuster KJ, McNulty MS, Daby CL, Wang Y, Liao HK, El-Rass S, Ding Y, Liu W, Anderson JL, Wishman MD, Sabharwal A, Schimmenti LA, Sivasubbu S, Balciunas D, Hammerschmidt M, Farber SA, Wen XY, Xu X, McGrail M, Essner JJ, Burgess SM, Clark KJ, Ekker SC. Building the vertebrate codex using the gene breaking protein trap library. *Elife*. 2020 Aug 11;9:e54572. doi: 10.7554/eLife.54572. PMID: 32779569; PMCID: PMC7486118.
- [3] Chen J, Ng SM, Chang C, Zhang Z, Bourdon JC, Lane DP, Peng J. p53 isoform delta113p53 is a p53 target gene that antagonizes p53 apoptotic activity via BclxL activation in zebrafish. *Genes Dev*. 2009 Feb 1;23(3):278-90. doi: 10.1101/gad.1761609. PMID: 19204115; PMCID: PMC2648546.
- [4] 剣持直哉, 医学のあゆみ Vol , 238 No . 5 2011 , 7 . 30

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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			
米国	Mayo Clinic			