

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22370065

研究課題名(和文) リボソームの異常と疾患：新たな疾患「リボソーム病」発症の分子機構

研究課題名(英文) Ribosomal abnormalities and human diseases: Molecular pathogenesis of ribosomopathies

研究代表者

剣持 直哉 (Kenmochi, Naoya)

宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・教授

研究者番号：00133124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円、(間接経費) 4,320,000円

研究成果の概要(和文)：リボソームはすべての生物に不可欠なタンパク質の合成工場である。最近、リボソームの異常が細胞のがん化や骨髄不全などの原因となる可能性が示された。本研究は、リボソームの異常に起因する「リボソーム病」発症の分子機構を解明することを目的とした。ゼブラフィッシュを用いた疾患モデルの解析により、リボソーム病発症に関わる重要な因子を同定した。また、研究推進に不可欠なデータベースの整備を行った。

研究成果の概要(英文)：The ribosome, as the protein synthesis machinery, is essential to all organisms. Recently, it became clear that ribosomal abnormalities cause pleiotropic effects that may manifest as specific disease conditions in humans called ribosomopathies. To investigate the molecular pathogenesis of ribosomopathies, we developed zebrafish models of the diseases and found important factors that may link to the disease pathogenesis. In addition, we also developed databases that serve as a basis for the study of ribosomopathies.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：翻訳 リボソーム 造血異常 発がん ゼブラフィッシュ 核小体 p53 リボソーム病

1. 研究開始当初の背景

リボソームは、すべての生物に不可欠な細胞内マシナリーである。RNA とタンパク質からなる巨大な複合体で、遺伝情報の翻訳装置として重要な役割を担っている。1999 年にダイヤモンド・ブラックファン貧血 (DBA) の患者でリボソームタンパク質遺伝子に変異が見つかり、リボソームの異常が必ずしも致死とはならず疾患を引き起こすことが明らかとなった。その後、造血障害を示す多くの疾患でリボソームの異常が同定され、これら一群の疾患は「リボソーム病」と呼ばれるようになった。しかし、ユビキタスに存在するリボソームの異常がなぜ特定の組織や細胞にのみ影響を与えるのか、大きな謎であった。

申請者は、早くからリボソームの異常と疾患の関連に注目し、リボソーム病の概念を提唱していた (*Genome Res*, 1998)。これを検証するために、リボソーム構成遺伝子、特に、ヒトリボソームタンパク質 (RP) 遺伝子群のゲノムレベルでの系統的な解析に取り組み、染色体マッピング、塩基配列の決定、プロモーター解析などで多くの実績をあげてきた。本研究計画は、これらの基盤をもとにリボソーム病発症の分子機構を解明することを目指して立案された。

2. 研究の目的

ユビキタスに存在するリボソームの変異が、なぜ特定の部位に障害をもたらすのか？リボソーム病の病態は、RP の変異や rRNA の修飾が特定組織の mRNA の翻訳効率に影響を与えた結果であると考えている。これを検証するために、リボソーム病のゼブラフィッシュモデルを作製し、①DBA 発症に関わる制御因子を同定する。②腫瘍形成を促進する因子を同定する。③先天性角化不全症 (DC) 発症に関わる制御因子および RNA 修飾の生理的意義を解析する。以上の解析を通して、リボソーム病発症の分子機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) DBA モデルの解析

DBA 患者で最も多くの変異が同定されている *RPS19* のノックダウン胚 (DBA モデル) を用いて、ショ糖密度勾配遠心によりポリソームのパターンを解析した。ノックダウン胚とコントロール胚を比較してリボソームの活性変化を検討した。次に、ポリソーム画分から mRNA を抽出して、DNA チップ (Affymetrix) および次世代シーケンサーで mRNA の翻訳レベルを解析した。それぞれの翻訳レベルを比較し、*RPS19* の生成阻害により翻訳効率が変動した遺伝子を同定した。

(2) p53 活性化機構の解析

リボソーム病 (発がんを含む) の発症と p53 経路の活性化の関係を調べるために、p53 変異ゼブラフィッシュを用いて RP 遺伝子をノ

ックダウンした。また、野生型においても p53 と RP 遺伝子の二重欠損モデルを作製し、リボソーム病発症における p53 の関わりを解析した。

(3) 発がんモデルの作製・解析

RP 遺伝子のノックダウン胚は 1 週間程度で致死となるため発がんモデルとしては適さない。この問題を解決するために、Tol2 トランスポゾンシステムを用いて RP 遺伝子に対する miRNA を組織特異的に発現させることで、RP の欠損と発がんとの関連を解析した。

(4) RNA 修飾欠損モデルの作製・解析

先天性角化不全症 (DC) 患者で変異が同定されたディスクリン (*DKC*) 遺伝子をノックダウンして病態との関連を解析した。DBA モデルと同様、ポリソームの mRNA を解析し疾患モデルで翻訳効率が変動した遺伝子を同定した。また、rRNA 修飾に働く snoRNA の発現を阻害して、rRNA 修飾の生体における機能を解析した。

4. 研究成果

(1) DBA 発症の分子機構

①ポリソームパターンの解析: DBA モデルにおけるリボソームの翻訳活性を調べるために、*RPS19* ノックダウン胚のポリソームパターンを解析した。その結果、ミスマッチオリゴを注入したコントロール胚と比較して、ポリソームパターンに大きな差は認められなかった (図 1)。造血障害などの表現型は強く表れていることから、ポリソームを形成する mRNA の分布 (翻訳効率) に差があることが示唆された。

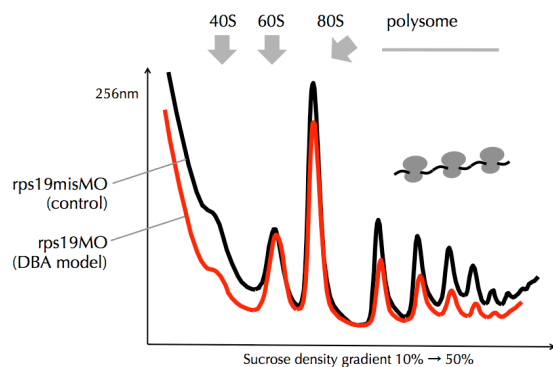


図 1 DBA モデルのポリソーム解析

②ポリソーム mRNA の解析: 前述のポリソーム画分から mRNA を調製して、DNA チップおよび次世代シーケンサーを用いて RNA の発現解析を行った。その結果、mRNA の発現量が大きく変動する遺伝子を約 300 個同定した (図 2)。これらの遺伝子は、*RPS19* の欠損により翻訳効率が変動したのと考えられ、DBA 発症に関わる重要な因子である可能性が高い。現在、パスウェイ解析により絞り

込んだ2つの遺伝子に着目して機能解析を進めている。

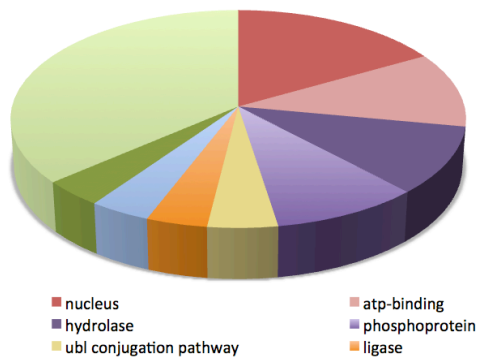


図2 DBAモデルで変動したポリソーム mRNA

③RP/p53 二重欠損モデルの解析: DBA 発症と p53 の関わりを明らかにするために、RP/p53 二重欠損モデルを作製し p53 経路の活性化を検討した。その結果、p53 変異体で *RPS19* をノックダウンした場合または野生型で *Tp53* と *RPS19* を同時にノックダウンした場合ともに、造血機能に回復は見られず、DBA 患者の造血障害に p53 は関与していない可能性が示された。これは、これまでの培養細胞などを用いた解析から得られた知見とは異なる結果で、DBA 発症の新たな経路の存在を示唆するものである。一方、尾部の屈曲など形態の異常は回復したことから、患者で見られる親指の奇形などの骨格異常には p53 が関与している可能性がある。

(2) 腫瘍形成の分子機構

①発がんモデルの作製: RP 遺伝子の異常と腫瘍形成の分子機構を明らかにするために、組織特異的に RP 遺伝子の発現を抑制したゼブラフィッシュモデルの作製に取り組んだ。Tol2 トランスポゾンシステムを用いて、神経、体節、肝臓に特異的なプロモーターを有する miRNA 遺伝子 (*RPS8* を標的とする) をゼブラフィッシュのゲノムに組み込んだ。これらのゼブラフィッシュを長期飼育したところ、神経特異的に *RPS8* の miRNA を発現するラインで腫瘍の形成を確認した。RP の発現抑制が神経細胞のがん化を誘導した可能性があり、RP 遺伝子の異常と発がんの関連を解析するための重要なモデルになると考えられる。

②発がんモデルの解析: この個体から組織切片を作製し、抗体を用いた免疫組織化学的手法で腫瘍部位における *RPS8* の発現レベルの低下を確認した。他の RP 遺伝子 (*RPL23*) の発現に変化はないことから、腫瘍形成は *RPS8* 依存的事であることが示唆された。また、rRNA 遺伝子の発現にも大きな変動は見られなかった。現在、神経特異的なマーカー遺伝子を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションにより腫瘍が神経細胞由来であることを確認している。

(3) RNA 修飾の生理的意義

①修飾欠損モデルの作製・解析: ゼブラフィッシュを用いて rRNA の修飾に働くディスクケリンまたは snoRNA (U26、U44、U78) の発現を阻害した。その結果、頭部や尾部、色素沈着などに異常を認め、1週間で致死となることが明らかになった。また、U26 snoRNA の生成を阻害した胚から rRNA を抽出して、質量分析計により RNA 修飾を解析したところ、U26 の標的部位である 398 番目のヌクレオチドの修飾が低下していることを検出した (図3)。一方、その他の snoRNA (U25、HBII-99 など) の標的部位の RNA 修飾には全く変化がないことも確認した。これは、たった一カ所の RNA 修飾の低下が、脊椎動物の初期発生に重大な影響を与えることを示した重要な成果である。

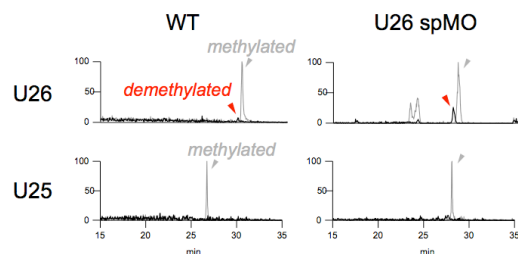


図3 rRNA 修飾の LC/MS 解析

②修飾欠損モデルのポリソーム解析: ディスケリンまたは U26 snoRNA の発現を阻害したゼブラフィッシュ胚からポリソーム画分を調製し、ポリソームパターンを解析した。その結果、ディスケリンのノックダウン胚ではリボソームの 80S/60S 比が大きく低下していた。一方、U26 ノックダウン胚では大きな変化は観察されなかった。

③ポリソーム mRNA の解析: ディスケリンまたは U26 snoRNA の発現阻害により、ポリソームを形成する mRNA の分布に違いが生じた可能性があると考え、ポリソーム mRNA を次世代シーケンサーで解析した。その結果、欠損モデルにおいて翻訳効率が大きく変動 (2 倍または 1/2) した遺伝子を、ディスケリンの発現阻害胚で 176 個、U26 snoRNA の発現阻害胚で 252 個同定した。これらのデータは RNA 修飾と疾患との関連を明らかにするための重要な基盤となる。

(4) データベースの整備

リボソーム病発症の機構を解析するために必要となる RP 遺伝子および snoRNA 遺伝子に関する情報を収集したデータベースを整備した。RP 遺伝子データベース (RPG, <http://ribosome.med.miyazaki-u.ac.jp>) では真核生物 39 種類、原核生物 8 種類の RP 遺伝子の塩基配列やゲノム上の位置、オルソログの情報などを公開している。生物種間で多重配列アライメントを行うこともでき、重要なドメ

インの解析等が可能である。また、snoRNA 遺伝子データベース (snOPY, <http://snoopy.med.miyazaki-u.ac.jp>) では、真核生物 34 種類の snoRNA 遺伝子の配列やゲノム上の位置、オルソログおよびターゲット RNA や RNA 修飾の部位などの情報が得られる。これらのデータベースには毎日 1,000 件以上のアクセスがあり、ライフサイエンス研究の様々な局面で十分に活用されている。



図4 RPG と snOPY のトップ画面

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Yadav, V.G., Chakraborty, A., Uechi, T., and Kenmochi, N. (2014). Ribosomal protein deficiency causes Tp53-independent erythropoiesis failure in zebrafish. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **49**, 1-7. 査読あり
DOI: 10.1016/j.biocel.2014.01.006
- ② Yoshihama, M., Nakao, A. and Kenmochi, N. (2013) snOPY: a small nucleolar RNA orthological gene database. *BMC Research Notes*, **6**, 426. 査読あり
DOI: 10.1186/1756-0500-6-426
- ③ Yamamori, K., Matsuo, T., Iwakiri, J., Kenmochi, N. and Yoshihara, I. (2013) A detection method for intronic snoRNA genes using extended- weight-updating SOM with appearance probability of bases. *Artificial Life and Robotics*, **17**, 405-411. 査読あり
DOI: 10.1007/s10015-012-0072-y
- ④ 剣持直哉 (2013) リボソーム病 -リボソーム合成の異常と疾患-. 生化学 (リボソームの機能調節と疾患), **85**, 909-915. 査読なし
- ⑤ 上地珠代, 剣持直哉 (2012) リボソームタンパク質と翻訳制御. 生体の科学 (細胞の分子構造と機能-核以外の細胞小器官), **63**, 362-363. 査読なし
- ⑥ Iwakiri, J., Tateishi, H., Chakraborty, A., Patil, P. and Kenmochi, N. (2012) Dissecting the protein-RNA interface: the role of protein

surface shapes and RNA secondary structures in protein-RNA recognition. *Nucleic Acids Res.* **40**, 3299-3306. 査読あり

DOI: 10.1093/nar/gkr1225

- ⑦ Higa-Nakamine, S., Suzuki, T., Uechi, T., Chakraborty, A., Nakajima, Y., Nakamura, M., Hirano, N., Suzuki, T. and Kenmochi, N. (2012) Loss of ribosomal RNA modification causes developmental defects in zebrafish. *Nucleic Acids Res.* **40**, 391-398. 査読あり
DOI: 10.1093/nar/gkr700

- ⑧ Ikeda, M., Andoo, A., Shimono, M., Takamatsu, N., Taki, A., Muta, K., Matsushita, W., Uechi, T., Matsuzaki, T., Kenmochi, N., Takata, K., Sasaki, S., Ito, K. and Ishibashi, K. (2011) The NPC motif of aquaporin-11, unlike the NPA motif of known aquaporins, is essential for full expression of molecular function. *J. Biol. Chem.* **286**, 3342-3350. 査読あり

DOI: 10.1074/jbc.M110.180968

- ⑨ Torihara, H., Uechi, U., Chakraborty, A., Shinya, M., Sakai, N. and Kenmochi, N. (2011) Erythropoiesis failure due to RPS19 deficiency is independent of an activated p53 response in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anaemia. *Brit. J. Haematol.* **152**, 648-654. 査読あり

DOI: 10.1111/j.1365-2141.2010.08535.x

- ⑩ Chakraborty, A., Uechi, T. and Kenmochi, N. (2011) Guarding the 'translation apparatus': defective ribosome biogenesis and the p53 signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, **2**, 507-522. 査読あり

DOI: 10.1002/wrna.73

- ⑪ 剣持直哉 (2011) リボソーム病と p53 経路. 医学のあゆみ (RNA 医学・医療), **238**, 476-480. 査読なし

[学会発表] (計 75 件)

- ① Uechi, T., Nakajima, Y., Yadav, G., H., Suzuki, Y., Sugano, S. and Kenmochi, N. Analyzing the zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia. The 13th Diamond Blackfan Anemia International Consensus Conference, Atlanta, USA, 2014. 3/8-10.
- ② Uechi, T., Nakajima, Y., Yadav, G., Sawada, T., Ikeda, M. and Kenmochi, N. Erythropoiesis failure and ribosomal dysfunction in zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia. The 62nd Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Boston, USA, 2013. 10/22-26.
- ③ Chakraborty, A., Uechi, T. Gleizes, P.E. and Kenmochi, N. When p53 senses faulty ribosomes: Induction of Tp53 correlates with enhanced expression of c-Myc target nucleolar proteins in Rpl11-deficient zebrafish. The 18th Annual Meeting of the RNA Society, Davos, Switzerland, 2013. 6/11-16.

- ④ Kenmochi, N., Higa-Nakamine, S., Uechi, T., Chakraborty, A., Suzuki, T. and Suzuki, T. Loss of snoRNA expression leads to developmental defects in zebrafish. Keystone symposia "Noncoding RNAs in Development and Cancer", Vancouver, Canada, 2013. 1/20-24.
- ⑤ Higa-Nakamine, S., Uechi, T., Chakraborty, A., Suzuki, T., Suzuki, T. and Kenmochi, N. Loss of ribosomal RNA modification causes developmental defects in zebrafish. International Conference on Ribosome Synthesis, Banff, Canada, 2012. 8/22-25.
- ⑥ Kenmochi, N., Higa-Nakamine, S., Uechi, T., Chakraborty, A., Nakajima, Y., Suzuki, T. and Suzuki, T. Loss of snoRNA expression impairs ribosomal RNA modification and causes developmental defects in zebrafish, Keystone symposia "Protein-RNA Interactions in Biology and Disease", Santa Fe, USA, 2012. 3/4-8.

[図書] (計 2 件)

- ① Chakraborty, A. and Kenmochi, N. (2012) Ribosomes and ribosomal proteins: more than just 'housekeeping'. In: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
DOI: 10.1002/9780470015902.a0005055.pub2

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：抗 RNA 抗体のスクリーニング方法及び RNA 抗体の製造方法
発明者：剣持直哉、吉浜麻生、高柳淳、清水信義
権利者：宮崎大学、慶應義塾大学
番号：特願 2011-098698
出願年月日：2011 年 4 月 26 日
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

- ① リボソームタンパク質遺伝子データベース (RPG)
<http://ribosome.med.miyazaki-u.ac.jp/>
- ② snoRNA 遺伝子データベース (snOPY)
<http://snoopy.med.miyazaki-u.ac.jp/>
- ③ ゼブラフィッシュ RP 遺伝子ノックダウンデータベース
<http://zebrafish.med.miyazaki-u.ac.jp/>
- ④ 研究室ホームページ
<http://ribosome.med.miyazaki-u.ac.jp/labo/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

剣持 直哉 (KENMOCHI, Naoya)

宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・教授

研究者番号：00133124

(2)研究分担者

(3)連携研究者

鈴木 勉 (SUZUKI, Tsutomu)

東京大学・工学研究科・教授

研究者番号：20292782

高柳 淳 (TAKAYANAGI, Atsushi)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：80245464