

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591556

研究課題名(和文)先天性貧血に関与する選択的翻訳機構の解明：ゼブラフィッシュを用いた研究

研究課題名(英文) Selected mRNA translation and congenital pure red-cell aplasia: Studying the molecular pathogenesis of the anemia using zebrafish as a model system

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ダイヤモンド・ブラックファン貧血(DBA)の患者では、10種類以上のリボソームタンパク質(RP)遺伝子の変異が、約60%の患者で確認されている。本研究では、RPS19遺伝子(患者の25%で変異)のゼブラフィッシュオオソログの発現を抑制し(DBAモデル)、ポリソーム解析を用いて遺伝子の翻訳効率を明らかにした。興味深いことに、翻訳が抑制される遺伝子の中には多くの造血関連因子が含まれた。その一つの遺伝子のmRNAをin vitro合成しDBAモデルに注入したところ貧血様の表現型が回復した。この結果は、DBAの発症機序を解明する大きな手がかりになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：More than ten ribosomal protein (RP) genes have been identified in 60% of the Diamond-Blackfan anemia (DBA) patients. We speculated that translation efficiency of specific mRNAs required for erythropoiesis was altered due to RP gene mutations. To evaluate the impact of RP deficiency on translation, we carried out microarray analysis of total mRNAs and RNA-seq analysis of polysomal mRNAs using zebrafish model of DBA. Comparing the data from both analyses enabled us to calculate the net translation efficiency. We found that the expression of 75 genes was repressed by more than 50%. Eight genes among the most repressed 50 genes were found to be involved in hematopoiesis. In-vitro synthesized mRNA of one of these genes partially rescued the anemia phenotype in the DBA model. These data should provide an important clue to the pathogenesis of DBA.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：リボソームタンパク質遺伝子 翻訳異常 ゼブラフィッシュ ダイヤモンド・ブラックファン貧血

1. 研究開始当初の背景

細胞が正常に増殖、分化して機能するため、遺伝子の発現は時空間的、量的に制御される。また、mRNA を翻訳するリボソームの量や質も、遺伝子の発現制御に影響を及ぼすと推測される。リボソームは、一細胞あたり数十万個存在するといわれる。また、一個のリボソームは、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) からなり、その生合成過程にはさらに 200 種類もの因子が関わる。構成成分うち、どの一つが欠損しても正常なリボソームは構築されず、その結果、個体の発生そのものが破綻すると考えられ、リボソームの異常と疾患との関連づけはナンセンスであるとされていた。

ところが、ダイヤモンド・ブラックファン貧血 (DBA) 患者の 25% で *RPS19* 遺伝子の変異が確認され、それまでの考えが一変した。その後のスクリーニングでは *RPS24* や *RPL11* など 10 種類以上の RP 遺伝子にも変異が見つかった。さらに、rRNA の成熟や修飾に関わる遺伝子が、シュバツハマン・ダイヤモンド (Schwachman-Diamond) 症候群、先天性角化不全症 (Dyskeratosis congenita)、軟骨毛髪低形成 (Cartilage-hair hypoplasia) の患者で変異していることも明らかになった。また、後天的に血球細胞で染色体異常が起こる 5q- 症候群においても、*RPS14* 遺伝子が有力な原因候補遺伝子となった。これらは、いずれも骨髄異常を示す疾患である。

一方、リボソームの異常による核小体ストレスが p53 を安定化させる機構も明らかになりつつある。そのため、これら骨髄不全の原因として、アポトーシスを活性化する経路の解明が盛んに行われた。しかし、全身に存在するリボソームの異常が、なぜ造血過程に強く影響を及ぼすのかは全くわかっていなかった。

2. 研究の目的

赤芽球形成不全を示すダイヤモンド・ブラックファン貧血のゼブラフィッシュモデルを用いて、赤血球分化に特異的な翻訳調節機構の解明を目指した。そのために、ポリソーム解析を応用した手法を用いた。これにより、僅かな翻訳調節の乱れが疾患の原因となる可能性を示し、疾患発症の分子機構を解明する新たなアプローチ法を提唱することを目的とした。

3. 研究の方法

ゼブラフィッシュの DBA モデルでは、血液循環が始まる前後で血球数が著しく減少することが示唆されている。血球細胞に起こる細胞周期と細胞数の変化を、蛍光プローブ zFucci を利用して詳細に解析し、分化、増殖のどの過程で異常が起きているのか明らかにする。この時期に必須の因子の翻訳効率が

変動している可能性が高く、ポリソーム解析を応用して、翻訳されている mRNA のみを抽出し、リボソームと mRNA との関係を詳細に解析する。この結果をもとに、翻訳異常が起こる分子メカニズムにも迫る。また、翻訳効率の変動が確認された遺伝子を、新たな DBA 遺伝子候補とし、患者 DNA を用いたスクリーニングを行う。

(1) zFucci を発現する DBA モデルの作製

蛍光プローブ zFucci によって全身の細胞周期の進行を観察できるゼブラフィッシュ (Cecylil: Cell cycle illuminated) の受精卵に *rps19* 遺伝子対するモルフォリノアンチセンスオリゴ (MO) を注入し DBA モデルを作製する。

一次造血器官 ICM において増殖した赤血球系細胞が成熟し、血管に入り込んで血液循環が開始されるまでの過程を蛍光顕微鏡下で時空間的に観察し、異常がおこる時期を特定する。

(2) ポリソームを形成する mRNA の頻度解析

DBA モデルから、シヨ糖密度勾配法によりポリソーム (リボソームと mRNA の複合体) を精製する。

ポリソーム画分から mRNA を精製し、次世代シーケンサーを用いて RNA-seq 解析を行い、どの mRNA がどれくらい出現するのか (リード数) を解析する。ポリソームに含まれる mRNA の頻度は、翻訳されるタンパク質量を反映する。

コントロール胚と比較して、リード数 (翻訳効率) が大きく変動する mRNA を抽出し、新規の DBA 遺伝子の候補とし、造血との関連を *in vivo* で確認する実験へと進める。

(3) DBA の新規候補遺伝子の同定

ポリソーム画分に含まれる mRNA の頻度解析により抽出された候補遺伝子に対して MO を設計する。

MO をゼブラフィッシュの受精卵に注入し、赤血球造血に影響が及ぼされるかどうかをみる。

rps19 遺伝子の発現を抑制した胚 (DBA モデル) に対して、候補遺伝子の mRNA を注入し、赤血球造血が回復するかどうかを確認する。

(4) 患者 DNA を用いた遺伝子変異スクリーニング

DBA 患者登録システムを構築している弘前大学の協力を得て、患者及びその家族の遺伝子配列の情報提供を受ける。

これまでの実験で抽出された候補遺伝子に、患者でのみ確認される変異がないかどうかを解析する。

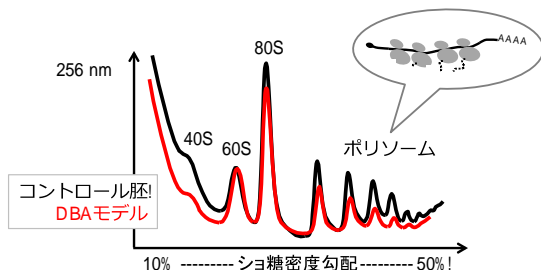
4. 研究成果

(1) zFucci を発現する DBA モデルの作製

DBA モデルにおいて、赤血球造血に異常が起こるステージを明らかにするために、細胞周期の変化を観察できるゼブラフィッシュ (cecylil) を用いた解析を試みた。まず、G1 期に赤色蛍光プローブ、S/G2/M 期に緑色蛍光プローブをそれぞれ発現する cecylil をリソースセンターから入手した。両者を掛け合わせ、両方の蛍光プローブをもつ固体を作製し、経時的に細胞周期の変化を撮影する条件の検討を行った。しかし、*rps19* 遺伝子の発現を抑制した胚 (DBA モデル) を用いて、赤血球が分化する課程のどこで異常が起きているかを特定するには至らなかった。

(2) ポリソームを形成する mRNA の頻度解析

DBA モデルの 24 時間胚からの抽出物からシヨ糖密度勾配遠心法によりポリソーム画分を得た。そこから mRNA を精製し、次世代シーケンサーを用いて RNA-seq 解析を行った (下図)。遺伝子の翻訳量は転写量の影響を受けることが推測された。そこで、正常胚



と DBA モデルの転写量をもとにそれぞれの翻訳量の変動を補正し、真に翻訳レベルで調節を受けている遺伝子を見つけようと考えた。正味の翻訳効率を算出するために、トランスクリプトーム (全 mRNA) 解析と、ポリソームを形成する mRNA の解析の結果を比較した。両解析で共通して有効データを取ることのできる遺伝子は、約 5,500 個あった。その内、約 2,500 個は、DBA モデルにおいて転写レベルではあまり変動せず、リボソームによる翻訳調節を受けている可能性が高い遺伝子であることが示唆された。

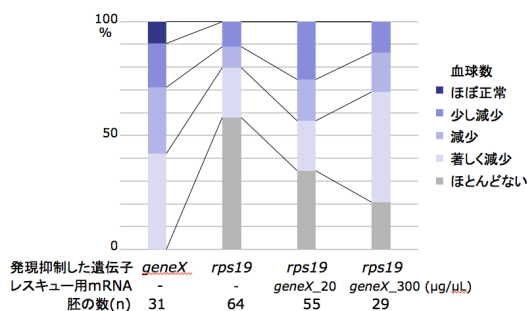
最も翻訳効率が低下したのは *gata1* 遺伝子であった。この遺伝子は DBA 患者において変異が確認されており、RP 遺伝子群以外の DBA 遺伝子候補として注目されている。この点から、私たちが作成した遺伝子リストは発症機序を解明する重要な手がかりになると考えた。

(3) 新規 DBA 候補遺伝子の同定

翻訳効率が最も低下する 50 個の遺伝子のうち、*gata1*, *rps19* を含めて 8 個が造血に関与することが知られている遺伝子であった。*gata1* を除く上位 3 つの遺伝子に対してモルフオリノアンチセンスオリゴ (MO) を設計し、ゼブラフィッシュにおいて発現抑制実験

を行った。いずれの場合も MO の濃度に依存して形態形成、造血ともに異常が現れた。

また、翻訳効率が 50% 以下に低下する遺伝子 75 個の中には、特定の細胞内分子の生合成経路に関わる遺伝子が 6 個含まれることを見いだした。その内のひとつは、*gata1* に続いて 2 番目にもっとも翻訳効率が低下する遺伝子 (*geneX*) であった。そこで、この遺伝子の mRNA を *in vitro* 合成し、*rps19* に対するアンチセンスとともに受精卵に注入した。その結果、DBA モデルにおいて赤血球が増加することを確認した (下図)。



(4) DBA 患者及びその家族のエキソーム解析結果との比較

弘前大学より、本邦の DBA 患者およびその家族のエキソーム解析のデータの提供を受けた。ゼブラフィッシュの実験系で翻訳効率が低下していた遺伝子について、患者で変異があるかどうか確認した。その結果、24 種類の遺伝子で、患者のみで見られる変異を同定した。しかし、各個人のサンプルを用いた確認作業が必要であり、研究期間終了時までには有力な新規 DBA 候補遺伝子の同定には至らなかった。*geneX* については、1 人の患者においてヘテロ変異していること、SNP (一塩基多型) データベースへの登録がないことを確認したが、新規の DBA 候補遺伝子とするには、複数の例が必要であると判断した。

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 5 件)

Patil P, Uechi T, Kenmochi N. Incomplete splicing of neutrophil-specific genes affects neutrophil development in a zebrafish model of poikiloderma with neutropenia. 査読有り, RNA Biology, 12:426-434, 2015. DOI:10.1080/15476286.2015.1017240

Wang R, Yoshida K, Toki T, Sawada T, Uechi T, Okuno Y, Sato-Otsubo A, et al. Loss of function mutations in *RPL27* and *RPS27* identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan anaemia. 査読有り, Br J Haematol,

168:854-864, 2015.
DOI:10.1080/15476286.2015.1017240

Yadav VG, Chakraborty A, Uechi T, Kenmochi N. Ribosomal protein deficiency causes Tp53-independent erythropoiesis failure in zebrafish, 査読有り, Int J Biochem Cell Biol, 49:1-7, 2014.
DOI:10.1016/j.biocel.2014.01.006

上地珠代, 剣持直哉. 第 1 章リボソーム : 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, 査読なし, 63:362-363, 2012.
<http://www.igaku-shoin.co.jp/journalDetail.do?journal=34660>

[学会発表](計 14 件)

Tamayo Uechi, Yukari Nakajima, Maki Yoshihama, Tsutomu Toki, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Etsuro Ito, Naoya Kenmochi. Decreased translation efficiency of mRNAs required for hematopoiesis in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia. The 14th Diamond Blackfan Anemia International Consensus Conference. 2016 年 3 月 6 日, アトランタ (米国).

上地珠代, 中島由香里, 吉浜麻生, 鈴木穰, 菅野純夫, 剣持直哉. ゼブラフィッシュを用いたリボソーム病発症メカニズムの解明. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会. 2015 年 12 月 1 日, 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市).

Tamayo Uechi, Yukari Nakajima, Maki Yoshihama, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Naoya Kenmochi. Selected mRNA translation and ribosomopathies: studying the molecular pathogenesis of congenital anemia using zebrafish as a model system. International Conference on Ribosome Synthesis. 2015 年 8 月 20 日, ブリュッセル (ベルギー).

Tamayo Uechi, Yukari Nakajima, Gnaneshwar Yadav, Maki Yoshihama, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Naoya Kenmochi. Studying the molecular pathogenesis of Diamond-Blackfan anemia using zebrafish as a model system. The 14th Conference on Translational Control. 2014 年 9 月 5 日, ニューヨーク州コールドスプリングハーバー (米国).

Tamayo Uechi, Yukari Nakajima, Gnaneshwar Yadav, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Naoya Kenmochi. Ribosome dysfunction and erythroid failure: Analyzing the zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia. The 19th

Annual Meeting of the RNA Society. 2014 年 6 月 4 日, ケベック (カナダ).

Tamayo Uechi, Yukari Nakajima, Gnaneshwar V. Yadav, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Naoya Kenmochi. Analyzing the zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia. The 13th Diamond Blackfan Anemia International Consensus Conference. 2014 年 3 月 9 日, アトランタ (米国).

Tamayo Uechi, Yukari Nakajima, Hiroko Sonoda, Masahiro Ikeda, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Naoya Kenmochi. Molecular pathogenesis of ribosomopathies in zebrafish model for Diamond-Blackfan anemia. The 18th annual meeting of the RNA Society. 2013 年 6 月 14 日, ダボス (スイス).

上地珠代, 中嶋由香里, 澤田尚史, 白井智之, 鈴木穰, 菅野純夫, 剣持直哉. ゼブラフィッシュ貧血モデルを用いたリボソーム病発症機構の解析. 第 35 回日本分子生物学会年会. 2012 年 12 月 13 日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡県福岡市).

Tamayo Uechi, Yukari Nakajima, Hidetsugu Torihara, Hiroko Sonoda, Masahiro Ikeda, Naoya Kenmochi. Defective erythropoiesis due to ribosome dysfunction in zebrafish. International Conference on Ribosome Synthesis. 2012 年 8 月 23 日, バンフ (カナダ).

[図書](計 1 件)

上地珠代, 剣持直哉. 第 2 章 動物実験の対象 : ゼブラフィッシュ, 第 3 章 動物の飼育管理・基本的手技 : 魚類 (ゼブラフィッシュ), 第 4 章 動物実験手法 : ゼブラフィッシュを用いた疾患モデルの作製・解析, 大・中・小動物実験プロトコル. 宮日文化情報センター, 146 ページ, 2016.

6 . 研究組織

(1) 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

