

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790288

研究課題名(和文) リボソームの異常による発がんの分子機構

研究課題名(英文) Ribosome abnormalities and cancer: Understanding the role of ribosomal proteins (RPs) in tumorigenesis and p53 regulation

研究代表者

チャクラボルティ アニルバン (CHAKRABORTY ANIRBAN)

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：40525565

研究成果の概要(和文): リボソームの生合成異常による核小体ストレスが、p53 を介して細胞の活動に影響を与えることが示唆されている。また、リボソームを構成するタンパク質(RP)の遺伝子の変異が、疾患の原因となる可能性も示されている。その場合、発がんリスクが高くなることもわかってきた。そこで、79 種類ある RP と p53 との関連を個体レベルで明らかにするために、ゼブラフィッシュを用いて臓器特異的な RP 発現抑制による発がんモデルの作製を試みた。その結果、Tol2 システムを利用して RP 遺伝子に対する miRNA を発現させることで、解析に有用な個体モデルが得られることが示唆された。

研究成果の概要(英文): It is now widely accepted that disruption of ribosome biogenesis triggers a p53 pathway and studies in cell lines have shown that several RPs are crucial players in this ribosome-p53 signaling pathway. Interestingly, human ribosomal diseases caused due to mutations in RP genes often present with increased cancer susceptibility. However, the molecular mechanism that links RPs to p53 regulation remains unknown. To investigate the role of RPs in p53 regulation and cancer, we undertook the development of tissue-specific RP knockdown model in zebrafish, which is a powerful cancer model system. We have found that tissue specific knockdown of RP gene using miRNA can be effectively carried out using the Tol2 transposase system. This technique will be a valuable tool to develop and understand cancer in zebrafish.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子遺伝学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：リボソームタンパク質、アポトーシス、がん、ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

リボソームは、細胞に必要なすべてのタンパク質を合成する装置で、ヒトの場合、79 種

類のタンパク質(RP)と4種類のRNA(rRNA)で構成されている。RPは、リボソームの機能本体であるrRNAの構造を支持する役割があ

る。最近では、がん抑制遺伝子としての機能も示唆されている。MIT の Hopkins らが、ゼブラフィッシュを用いた大規模な挿入変異スクリーニングを行ったところ、悪性末梢神経鞘腫瘍を呈した 17 系統で RP 遺伝子のヘテロ変異が確認された。興味深いことに、*p53* 遺伝子が変異した場合も、同じ腫瘍が形成された。

さらに、細胞レベルの研究で、特定の RP と *p53* との関係が明らかになっている。細胞が正常な状態にあるときは、*p53* には MDM2 が結合してその活性を抑制している。しかし、リボソームが正常に合成されないなどの核小体ストレスが生じると、リボソームタンパク質である RPL5、RPL11、RPL23 が核内に移動して MDM2 と結合するため *p53* が活性化される。また、マウスの培養細胞において 14 種類の RP の発現抑制により、*p53* の発現量が低下することも示されている。

ヒトにおいても、RP 遺伝子の異常と発がんとの関連性が示唆されている。先天性の赤芽球癆であるダイヤモンド・ブラックファン貧血の患者では、*RPS19*、*RPS24* 遺伝子などの変異が確認された。これらの患者は、将来、リンパ腫や固形がんを発症する確率が高いことが最近わかってきた。また、骨髄異形成症の一つである 5q-症候群の原因候補遺伝子として *RPS14* が注目されている。

リボソームの翻訳機能に異常が生じた場合、*p53* 経路を介して細胞活動が変化する仕組みがあると推測されるが、詳細な分子機構については不明である。また、79 種類ある RP は、組織特異的な機能を持つことも予想される。そこで、RP の発現量の変化が *p53* を介してどのようにがんを発症するのか、その仕組みを個体レベルで明らかにしたいと考えた。

2. 研究の目的

RP 遺伝子は *p53* との相互作用を介してがん抑制機能を発現していると推測される。両者の関係を明らかにするために、まず、*p53* 遺伝子がホモ変異のゼブラフィッシュを作製する。それら個体内の RP 遺伝子の発現量を抑制した場合に、形態形成、アポトーシス、細胞周期にどのような変化が現れるかを解析する。さらに、*Tol2* トランスポゼースを利用した遺伝子組換えシステムにより、臓器特異的に RP 遺伝子に対する miRNA を発現する個体を作製する。この個体と *p53* ホモ変異個体をかけ合わせ、RP が臓器特異的ながん発症にどのように関わるのかを解析する。

3. 研究の方法

(1) *p53* 経路に関わる RP 遺伝子の同定

リソースセンター (ZIRC; Zebrafish International Resource Center, 米国) から *p53* ヘテロ変異個体 (*p53*^{M214K/+}) を得て、当研究室においてホモ変異個体を作成する。

がん抑制遺伝子または疾患遺伝子としての機能が示唆される RP 遺伝子に対して、モルフォリノアンチセンスオリゴ (MO) を設計する。

これら MO と合成した *p53*mRNA を、*p53* ホモ変異の受精卵に注入し、UV 照射を行い、その後 4%パラホルムアルデヒドで固定する。

これら胚を用いて、アポトーシスや細胞周期に関する解析を行う。

UV 照射に対するストレス反応を示さない胚、腫瘍を形成する胚を選別することで、*p53* 経路に関与する RP 遺伝子をスクリーニングする。

(2) 臓器特異的な miRNA 発現システムの確立

Tol2 トランスポゾン配列と臓器特異的プロモーターで発現する GFP に対する miRNA、mCherry を組み込んだプラスミドベクターを構築する。

GFP を発現するゼブラフィッシュの受精卵に、*Tol2* mRNA とベクターを注入する。

GFP 発現が低下している胚を組換え体として選別する。

組換え体と野生型個体をかけ合わせ、特定臓器で mCherry が発現することを確認する。

(3) 臓器特異的な RP 遺伝子発現抑制個体の作製

肝臓、神経、心臓、小腸それぞれの特異的なプロモーター (L-FABP、HuC、I-FABP、*cmlc-2*) の下流に、*RPS8* または *RPS29* 遺伝子に対する miRNA 配列を組み込んだプラスミドベクターを構築する。

このベクターを、*Tol2* mRNA とともにゼブラフィッシュの受精卵に注入し、*Tol2* トランスポゼースシステムを利用してゼブラフィッシュのゲノムに組み込む。

ベクター配列がゲノムに組み込まれたゼブラフィッシュ (F0) と野生型とをかけ合わせ、目的とする臓器で miRNA を発現する F1 を得る。

臓器特異的に miRNA を発現する個体と、*p53* 変異個体とをかけ合わせ、RP/*p53* ダブル欠損システムを作成する。

4. 研究成果

(1) p53 経路に関わる RP 遺伝子の同定

リソースセンターから提供された p53 ヘテロ変異個体をかけ合わせ、ホモ変異個体の作出に成功した。しかし、繁殖力が弱く、メラノーマなどの腫瘍を形成して 10 ヶ月以内に致死となるため、リソースセンターに改めてホモ変異個体の提供を依頼した。

これまでの研究から明らかにされた、p53 の発現を関連性のある RP 遺伝子 15 種類に対して、モルフォリノアンチセンスオリゴ (MO) を設計した。そのうち 2 種類の遺伝子 (*RPL35*, *RPL36A*) に対するそれぞれの MO と *in vitro* 合成した p53 mRNA を、ホモ変異体から得た受精卵に注入した。受精後 24 時間で UV 照射 (400mJ/cm²) し、さらに 6 時間後に 4% パラホルムアルデヒドで固定した。これら胚を用いて、TUNEL 法によるアポトーシス解析、BrdU 染色や pH3 染色を用いた細胞周期の解析を行い、p53 経路に関わる RP 遺伝子の同定を行う準備ができた。

(2) 臓器特異的な miRNA 発現システムの確立

特定の遺伝子に対する miRNA を発現するベクター (pT2K) を用いたシステムが有効であるかどうかを確認した。まず、GFP に対する miRNA 配列を含むベクターを作製した。これを、温度刺激によって GFP を発現する受精卵に *Tol2*mRNA とともに注入した。受精後 6~8 時間で 39、1 時間、受精後 24 時間で 38、1 時間の処理を行った。その結果、GFP の発現が低下することを確認した。さらに、ベクターには miRNA と同じプロモーターで発現する mCherry も組み込まれている。従って、GFP の発現が低下した細胞では、mCherry が発現していることが確認できた (図 1, 矢頭)。これにより、pT2K ベクターを利用した miRNA 発現システムが、ゼブラフィッシュの個体内で有効に機能することが示唆された。

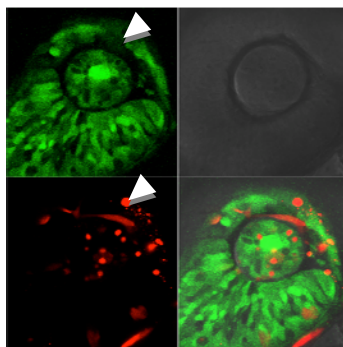


図 1 pT2K ベクターがゲノムに組み込まれた胚の網膜とレンズ。miRNA によって GFP の発現が低下した細胞 (左上) では mCherry が強く発現している (左下)。

(3) 臓器特異的な RP 遺伝子発現抑制個体の作製

肝臓、神経、小腸、心臓特異的に GFP に対する miRNA を発現するベクターを作製し、*Tol2* システムを用いてゼブラフィッシュのゲノムに組み込んだ。肝臓特異的に GFP に対する miRNA を発現する個体と、肝臓特異的に GFP を発現する個体を掛け合わせ、次の世代で GFP の発現が低下するかどうかを確認したが、明らかな結果は得られなかった。しかし、miRNA を発現している個体では安定して mCherry が発現することから、臓器特異的に miRNA が機能することが示唆された。さらに、RP 遺伝子に対する miRNA も同様に機能することが期待された (図 2)。そこで、*RPS8* お

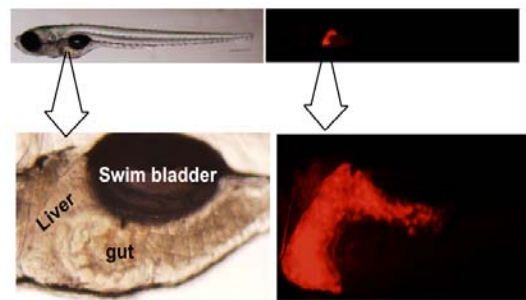


図 2 肝臓特異的なプロモーターを含むベクター配列がゲノムに組み込まれた個体。肝臓だけで mCherry (赤) が発現し、RP 遺伝子に対する miRNA も肝臓だけで発現していることが示唆される。

よび *RPS29* 遺伝子に対する miRNA をデザインし、肝臓、神経、小腸、心臓特異的なプロモーターで発現するようにベクターを構築した。これをゼブラフィッシュのゲノムに組み込み、臓器特異的な RP 遺伝子発現抑制個体の作出をめざす。

RP 遺伝子はコピキタスに発現しているため、全身で発現抑制すると 7~10 日で致死となる。miRNA を用いることで局所的に RP 遺伝子の発現を長期間抑制することが可能となるため、解析に有効な発がんモデルを作製することが示唆された。

今後は、ポリソーム (リボソームと mRNA の複合体) 解析を応用した mRNA プロファイルの作製により、発がんのメカニズムを翻訳異常という観点から探求していく予定である。本研究では、その解析に欠かせないツールとなる個体モデルを効率よく作製できる手法を確立することができた。

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2件)

Chakraborty A, Uechi T, Kenmochi N. Guarding the 'translation apparatus': defective ribosome biogenesis and the p53 signaling pathway. *WIREs RNA*. 査読有り *in press*.

Torihara H, Uechi T, Chakraborty A, Shinya M, Sakai N, Kenmochi N. Erythropoiesis failure due to RPS19 deficiency is independent of an activated Tp53 response in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anaemia. *The British Journal of Haematology*. 査読有り 152, 2011, 3342-3350.

[学会発表](計4件)

Anirban Chakraborty, Tamayo Uechi, Gnaneshwar Yadav and Naoya Kenmochi. Ribosome dysfunction and nucleolar stress: An activated p53 response correlates with aberrant expression of nucleolar proteins in ribosomal protein-deficient zebrafish. 日本分子生物学会, 2010年12月, 神戸.

Anirban Chakraborty, Tamayo Uechi, Hidetsugu Torihara and Naoya Kenmochi. Ribosomal Protein L11 (RPL11) Deficient Zebrafish Exhibit Upregulation of p53-Modulatory Nucleolar Proteins Involved in Ribosome Biogenesis. International Meeting on Zebrafish Development and Genetics. 2010年6月, マディソン (米国).

Anirban Chakraborty, Tamayo Uechi, Hidetsugu Torihara and Naoya Kenmochi. Ribosomal stress and the p53 network: Impaired ribosome biogenesis due to ribosomal protein (RP) deficiency leads to p53 induction in zebrafish. 2009年12月, 日本分子生物学会, 横浜.

Anirban Chakraborty, Tamayo Uechi, Hidetsugu Torihara and Naoya Kenmochi. Ribosomal Protein L11 (Rpl11) Deficiency In Zebrafish Leads to a Selective Upregulation of p53-Modulatory Nucleolar Proteins. 6th European Zebrafish Genetics and Development Meeting, 2009年7月, ローマ (イタリア).

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

チャクラボルティ アニルバン
(CHAKRABORTY ANIRBAN)

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: 40525565

(2) 研究分担者

研究者番号:

(3) 連携研究者

研究者番号: