

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09656

研究課題名(和文)ゼブラフィッシュを用いた先天性貧血発症の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Studies on the molecular pathogenesis of the congenital anemia using zebrafish as a model

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) 3,700,000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)は、リボソームのタンパク質合成過程の異常に起因すると推測される。ゼブラフィッシュのDBAモデル(遺伝子の発現抑制による)を用いた解析では、造血関連遺伝子に加え、糖鎖修飾に関与する遺伝子の翻訳効率が抑制されていた。その一つの遺伝子の機能を個体レベルで解析したところ、赤血球造血に関与することが示唆された。また、ゲノム編集技術を用いたリボソームタンパク質(RP)遺伝子変異モデルの系統を確立した。DBA発症機序をより詳細に解析できるツールを得ることができたと考える。

研究成果の概要(英文)：Diamond-Blackfan Anemia (DBA) is a congenital disease, which is predominantly thought to be caused by abnormalities in protein synthesis. Our studies using zebrafish as a model (developed by knocking down zebrafish orthologous genes that are mutated in DBA patients) indicates that the expressions of genes involved in glycosylation modification are suppressed at translational level but not at transcription level. Functional analysis of one of those genes in vivo suggests that the gene is involved in erythropoiesis during early development of zebrafish. These data indicate the glycosylation pathway may be implicated in the pathogenesis of DBA. To address this important questions we have developed a zebrafish strain carrying mutations in DBA-associated ribosomal protein genes using CRISPR/Cas9, genome-editing technology. The results from these studies will provide new insights into rational design of new treatments.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：翻訳異常 リボソームタンパク質遺伝子 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

ダイヤモンド・ブラックファン貧血(DBA)は先天性の赤芽球癆で、骨格異常や心疾患を伴う患者もいる。1999年に約25%の患者でリボソームタンパク質S19遺伝子(*RPS19*)が変異していることが報告された。*RPS19*遺伝子は、リボソームの構成因子のひとつであるが、当初はこのタンパク質単独の機能が貧血の発症に関連すると推測された。しかし、その後、次々と10種類以上のRP遺伝子に変異が確認された。RP遺伝子と疾患との関連が初めて示された例として注目を集め、全身に存在するRPの異常がなぜ貧血を引き起こすのか興味もたれた。多くの研究者が精力的に研究を行ったが発症機序の解明には至らなかった。

リボソームの構造はきわめて複雑で、脊椎動物の場合、4種類のRNAと79種類のタンパク質で構成される。しかし、タンパク質の翻訳過程においてこれらの構成因子がどのような役割を果たしているのかは不明な点が多い。リボソームの構成因子の異常は核小体ストレスを引き起こし、細胞のアポトーシスを亢進させることが示唆され、貧血の原因としてこの経路の解明が盛んに行なわれた。しかし、私たちが行なったゼブラフィッシュのDBAモデルを用いた実験では、貧血発症の主因はアポトーシスではないことが示唆された。私たちは、リボソームの構成因子それぞれが組織特異的な機能をもっているために、それら遺伝子の変異によって特定の疾患を引き起こされると推測した。これを解明するために、ゼブラフィッシュのDBAモデルを用いて、リボソームの翻訳効率の変動に着目した解析を行なった。興味深いことに、造血関連の遺伝子に加え、糖鎖修飾に関連する遺伝子の翻訳効率が抑制されていることを見いだした。

## 2. 研究の目的

ゼブラフィッシュのDBAモデルにおいて、翻訳効率が低下する遺伝子に着目し、個体においてこれら遺伝子が造血に関与することを確認した。さらに、これら遺伝子のタンパク質での発現レベルをDBA細胞モデルにおいて解析することを試みた。さらに、ゲノム編集技術を用いてRP遺伝子に変異をもつゼ

ブラフィッシュを作製し、より詳細な発症機序の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

(1) 翻訳効率変動にもとづいた遺伝子リストを用いた解析

先行研究において、ゼブラフィッシュのDBAモデルを用いたトランスクリプトーム解析およびポリソームを形成するmRNA解析により、5464個の遺伝子について翻訳効率を算出した。この解析法がこれまでの知見や、ゼブラフィッシュの表現型と一致するかどうかが解析を行なう。

翻訳効率が低下する遺伝子について、定量PCR法により発現変動の検証を行なう。翻訳効率が低下する遺伝子の発現をゼブラフィッシュにおいて抑制し、赤血球造血に異常が現れるかどうかを確認する。特定の遺伝子群を抽出し、翻訳効率の変動の傾向を解析する。

(2) K562細胞を用いた解析

ヒト細胞のDBAモデルを用いて、タンパク質レベルの発現が低下しているかどうかを確認する。

(3) ゲノム編集技術によるゼブラフィッシュモデルの作製

ゼブラフィッシュのDBAモデルは、モルフォリノアンチセンスオリゴを用いてリボソームタンパク質(RP)遺伝子の発現を抑制することで作製した。DBA患者では、様々な塩基配列の変異が報告されており、RPの発現量のみではDBAの発症機序を説明できない可能性も高い。そこで、より詳細な疾患の分子メカニズムを解明するために、患者型変異をもつゼブラフィッシュモデルの作製を目指す。

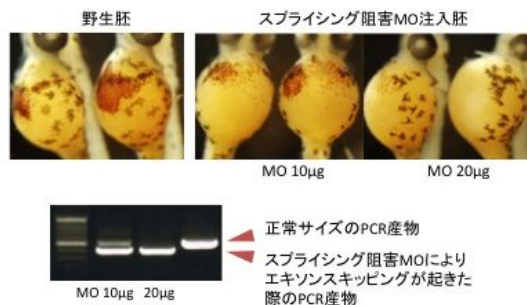
## 4. 研究成果

(1) 翻訳効率変動にもとづいた遺伝子リストを用いた解析

先行研究で解析した遺伝子5464個の1.3%にあたる75個の遺伝子は、翻訳レベルで発現が抑制されていることが示唆された。GO解析により、75個中9個が造血、5個が糖鎖修飾の経路に関与する因子に分類された。そのうち、赤血球造血に関連する遺伝子およびGPIアンカーに関連する遺伝子につい

て定量 PCR 法により発現解析を行なった。その結果、一つの遺伝子を除き、DBA モデルでは翻訳レベルにおいて発現が抑制されていることが示唆された。アポトーシス関連の遺伝子については転写と翻訳において発現が亢進していた。これらの結果は、DNA マイクロアレイおよび RNA-seq 解析を用いた先行研究のデータと一致した。

翻訳効率が *gatal* に次いで低下する *pigq* 遺伝子は、造血および糖鎖修飾の両経路に参与する。この遺伝子に対してモルフォリノアンチセンスオリゴ (MO) を設計し、in vivo での機能解析を行なった。翻訳を阻害する MO (1 種) およびスプライシングを阻害する MO (2 種) をそれぞれゼブラフィッシュの受精卵に注入し、48 時間後にヘモグロビン染色を施した。その結果、いずれの MO を注入した場合も濃度に比例して赤血球数が減少した。また、形態形成や色素の異常はほとんど見られず、この遺伝子が初期胚において赤血球造血に特異的に参与している可能性が示唆された (下図)。



本研究で用いた翻訳効率を示した遺伝子リストには 63 種類の RP 遺伝子が含まれた。これら遺伝子の発現は、転写レベルではほとんど変動しなかった (0.8~1.2 倍)。一方、翻訳レベルでは、*rps19* を除く 62 個の遺伝子のうち 56 個の遺伝子の発現が 1.2~2.4 倍となった。*rps19* 遺伝子の発現量の低下によってリボソームの生合成に影響があると推測されるが、それを翻訳レベルで調節する機構があるのではないかと考えた。また、リボソームの構成因子の異常は核小体ストレスを引き起こし、p53 を介したアポトーシス経路が亢進することが示されている。アポトーシス経路に参与する遺伝子を抽出したところ、これまでの知見と一致して転写レベルおよび翻訳レベルで発現量の増加が示唆された。

## (2) K562 細胞を用いた解析

ヒト細胞において PIGQ の発現を解析するために、K562 細胞を用いて siRNA により *RPS19* および *RPS15A* 遺伝子をノックダウンした。siRNA を細胞に導入後 48, 72, 96 時間において細胞から RNA を回収して逆転写反応を行い、それぞれの遺伝子の発現レベルを確認した。その結果、コントロール細胞と比較して、*RPS19* 遺伝子は約 20~40%、*RPS15A* 遺伝子は約 10%~30%の発現量に抑制されていることを確認した。これらの細胞を用いてタンパク質の発現を確認したが、明らかな低下が確認できなかった。RP 遺伝子の発現を安定的に低下させるためにゲノム編集による細胞モデルの作製が必要であると考えた。

## (3) ゲノム編集技術によるゼブラフィッシュモデルの作製

*rps19* 遺伝子をターゲットとする gRNA/tracrRNA/Cas9 タンパク質の RNP をゼブラフィッシュの受精卵に注入し、ゲノム編集による変異体の作製を試みた。RNP を注入した胚の約 10%で生殖細胞での変異の導入が起こると推測された。これまでに 7 種類の in/del をヘテロ変異でもつ個体の作製に成功し、このうち 1 種類は F2 まで継代することができた。ヘテロ変異の成魚を掛け合わせて得られるホモ変異胚では、明らかな貧血を示すことも確認した。RNP に加え、患者型の変異を含む ssDNA を同時に注入することで、ゲノムの特定箇所に目的の変異を導入することができると予想し、患者型変異をもつゼブラフィッシュモデルの作製に着手した。これまでのところ、目的の変異をもつ個体は得られていないが、ssDNA の長さや RNP の注入条件を変えて実験を継続している。

## 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 4 件)

- (1) Chakraborty A, Uechi T, Nakajima Y, Gazda HT, O'Donohue MF, Gleizes PE, Kenmochi N. Cross talk between TP53 and c-Myc in the pathophysiology of Diamond-Blackfan anemia: Evidence from RPL11-deficient in vivo and in vitro models. 査読有り, Biochemical and Biophysical Research

Communications, 1839-1845, 2018. DOI:  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.12.019>

- (2) Ikeda F, Yoshida K, Toki T, Uechi T, Ishida S, Nakajima Y, Sasahara Y, Okuno Y, Kanazaki R, Terui K, Kamio T, Kobayashi A, Fujita T, Sato-Otsubo A, Shiraishi Y, Tanaka H, Chiba K, Muramatsu H, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kenmochi N, Miyano S, Ogawa S, Ito E. Exome sequencing identified RPS15A as a novel causative gene for Diamond-Blackfan anemia. 査読有り, Haematologica, 102:e93-e96. 2017. DOI: 10.3324/haematol.2016.153932

〔学会発表〕(計9件)

- (1) Tamayo Uechi, Yukari Nakajima, Maki Yoshihama, Etsuro Ito, Yutaka Suzuki, Naoya Kenmochi. Analysis of the translational efficiencies of mRNAs in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia. 15th Diamond Blackfan Anemia International Consensus Conference, 2018 年.
- (2) Tamayo Uechi, Maki Yoshihama, Yukari Nakajima, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Etsuro Ito, Naoya Kenmochi. Ribosomal dysfunction and defective erythropoiesis in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia. The 22nd Annual Meeting of the RNA Society, 2017 年.
- (3) 上地 珠代, 中島 由香里, 吉浜 麻生, 鈴木 穰, 菅野 純夫, 剣持 直哉. リボソームによる翻訳制御と疾患: ゼブラフィッシュを用いた解析. 第39回日本分子生物学会年会, 2016 年.
- (4) Tamayo Uechi, Yukari Nakajima, Maki Yoshihama, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Naoya Kenmochi. Selected mRNA translation and ribosomopathies: analyzing the zebrafish model of congenital pure red-cell aplasia. RNA2016, 2016 年.
- (5) 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 Symposium on Biomolecular Sciences, 2015 年.

- (6) 上地 珠代, 吉浜 麻生, 中島 由香里, 上米良 美香, 剣持 直哉. リボソーム病モデルを用いた発症機序の解明と化合物スクリーニング. 第1回ゼブラフィッシュ創薬研究会, 2015 年.

〔図書〕(計1件)

- (1) 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. 宮日分化情報センター, 146 ページ, 2016 年.

## 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