

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08869

研究課題名（和文）先天性貧血の発症に関与するmRNA選択的な翻訳調節機構の解明

研究課題名（英文）Depletion of ribosomal proteins and mRNA-specific translation control: studying the molecular pathogenesis of congenital anemia

研究代表者

上地 珠代 (Uechi, Tamayo)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：10381104

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：リボソームはタンパク質を合成する装置で、全身の細胞に存在する。しかし、その異常は特定の組織の異常（疾患）を引き起こす。それは、組織ごとに異なる翻訳調節のしくみがあるためと推測した。代表的な疾患である先天性貧血を、ゼブラフィッシュを用いて再現（特定のリボソームタンパク質の発現を抑制）し、貧血を引き起こす分子メカニズムの解明に挑んだ。その結果、造血に関与する遺伝子に加え、糖鎖の生合成に関与する遺伝子の翻訳効率が低下することを見出した。また、この遺伝子の過剰発現により赤血球数が回復することも確認した。リボソームタンパク質が関与する遺伝子特異的な翻訳調節機構が正常な赤血球造血に必要であると考えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトのリボソームは79種類のタンパク質と4種類のRNAで構成され、RNAは約200箇所化学修飾を受ける複雑な構造体である。タンパク質や修飾の翻訳における役割は未解明であり、リボソームの組み立てを担う因子も含めて、いずれかの異常は様々な先天性疾患との関連が示唆され、将来的にがんを発症しやすいこともわかってきた。これらリボソーム病の発症メカニズムの解明は、治療法の開発や創薬に必須である。先天性貧血モデルを用いて新たな知見が得られたことは、リボソーム病の解明に向けた重要な基盤情報になると考える。

研究成果の概要（英文）：The ribosome is a cellular component responsible for synthesizing proteins and found within all cells. However, abnormalities in the ribosome can lead to specific tissue abnormalities. We speculated that this is because of the presence of different translation regulatory mechanisms in each tissue. To investigate the molecular mechanism of congenital anemia, a representative disease, we developed zebrafish anemia model by suppressing the expression of a specific ribosomal protein gene and attempted to elucidate the mechanism that causes anemia. As a result, we found that not only genes involved in hematopoiesis but also a gene involved in the biosynthesis of glycans showed decreased translation efficiency. Additionally, we confirmed that overexpression of the gene leads to the recovery of red blood cell count. We concluded that the gene-specific translation regulatory mechanism involving ribosomal proteins is necessary for normal erythropoiesis.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：リボソームタンパク質 先天性貧血 ゼブラフィッシュ 翻訳

1. 研究開始当初の背景

リボソームはすべての細胞においてタンパク質を合成している。リボソームの構造はきわめて複雑で、脊椎動物の場合、4種類のリボソームRNA (rRNA) と79種類のリボソームタンパク質 (RP) で構成される。さらに、rRNA は200か所以上でメチル化やシュードウリジル化などの修飾を受ける。しかし、翻訳におけるそれぞれの役割については不明な点が多い。私たちは、ゼブラフィッシュを用いて、これら構成因子の異常が様々な発生異常を引き起こすことを示した。このような異常はヒト疾患の原因にもなり得ると推測し「リボソーム病」という概念を提唱した。1999年に、ダイヤモンド・ブラックファン貧血 (DBA) の患者で RPS19 遺伝子の変異が報告され、これがリボソームの異常と疾患との関連を示した最初の例となった。DBA 患者では現在までに20種類の RP 遺伝子に変異が同定されている。さらに、rRNA 修飾に関与する因子やリボソームの生合成因子の遺伝子の異常も特定の疾患 (リボソーム病) との関連性が示唆された。しかし、全身に存在するリボソームの異常が、なぜ特定の疾患を引き起こすのか発症機序は明らかではなかった。リボソーム病の患者は将来的にがんを発症するリスクが高いことも明らかになってきた。ゼブラフィッシュの疾患モデルを用いてリボソームの異常と細胞がん化との関連に迫ることもできるのではないかと考えた。

先行研究においては、トランスクリプトーム解析とポリソームを形成する mRNA (リボソームが結合して翻訳されている mRNA、図1) の RNA-seq 解析を組み合わせ、5464 個の遺伝子の翻訳効率を算出した。その結果、翻訳効率が40%以下になる遺伝子26個には、造血に関与する遺伝子が9個、糖鎖修飾に関与する遺伝子が5個含まれることを確認した。

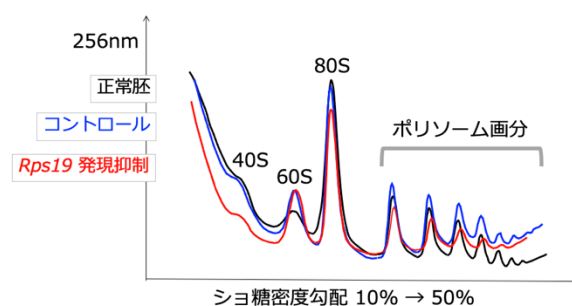


図1. ゼブラフィッシュ胚を用いたポリソーム解析。正常胚、コントロール胚(ミスマッチのアンチセンスオリゴを注入)、*rps19* 発現抑制胚をそれぞれ200匹程度用いてシヨ糖密度勾配遠心により分画した。ポリソーム画分から mRNA を精製し、RNA-seq 解析を行った。

2. 研究の目的

DBA 患者の25%で変異が見つかった *RPS19* 遺伝子のゼブラフィッシュのオーソログ遺伝子 (*rps19*) を、モルフォリノアンチセンスオリゴを用いてノックダウンすると、造血や糖鎖生合成に関連する遺伝子の翻訳効率が低下することを先行研究で見いだした。本研究では、1) 翻訳効率が低下する遺伝子について、造血との関連を明らかにする解析、2) ゲノム編集により *rps19* 遺伝子にヘテロ変異を導入し、より患者に近いと考えられるモデルを用いた解析、3) 患者 DNA を用い、新たな DBA 責任候補遺伝子同定の試みにより、DBA 発症の分子メカニズムを明らかにするための新たな基盤情報を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 翻訳効率が低下する遺伝子について、mRNA を *in vitro* 合成し、*rps19* ノックダウン胚または変異体から得た受精卵へ微量注入し、赤血球の造血が回復するかどうかを検証した。
- (2) CRISPR/Cas システムを応用した手法により、患者と同じ変異を持つ DBA モデルの作製を試みた。
- (3) 患者 DNA を用いたエキソーム解析により DBA 原因候補遺伝子が新たに2つ得られた。これら遺伝子について発現抑制胚を作製し解析した。

4. 研究成果

- (1) 翻訳効率が低下する遺伝子を用いたレスキュー実験

① 赤血球造血において重要な役割を果たす *gata1* の mRNA を人工合成し、*rps19* 変異体の一細胞期の受精卵へ微量注入した。発生初期の *gata1* の発現は形態形成に有害な影響を及ぼした。そこで、器官原基の形成が進み、さらに、赤血球循環が始まる前のステージで *gata1* の微量注入を試みた。その結果、形態形成に異常は現れなかった。赤血球数は回復する傾向が見られた。

② *pigq* 遺伝子 (GPI アンカーの生合成に関与する因子) はゼブラフィッシュ胚の初期造血器官である ICM で強く発現することから、この遺伝子の翻訳効率の低下が赤血球の造血に大きな影響を及ぼしている可能性が高いと推測した。この遺伝子の発現を、モルフォリノアンチセンスオリゴを用いて抑制したところ、形態形成にはほとんど影響がなく、赤血球数が顕著に減少することを確認した。さらに *pigq* の mRNA を人工合成し、*rps19* ノックダウン胚へ微量注入したところ赤血球造血が促進されることを確認した (図 2)。特異的な翻訳効率の変動には翻訳開始因子が関与すると予測し、長い非翻訳領域を含む合成 mRNA によるレスキュー実験を行った。しかし、仮説を証明する結論は得られなかった。

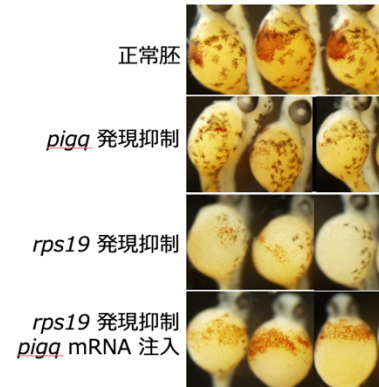


図 2. 受精後 48 時間胚を用いたヘモグロビン染色。卵黄囊の表面に見える赤褐色に染まる顆粒が赤血球。正常胚と *pigq* 発現抑制胚に見られる濃茶～黒の模様はメラニン色素で、正常に発生する胚に見られる。

(2) ゲノム編集による DBA モデルの作製

① crRNA-Cas9 タンパク質複合体と患者型変異を導入した一本鎖 DNA をゼブラフィッシュ胚に注入することで、ゲノムへの任意の変異の導入を試みた。今のところ、目的とする変異をもつ個体は得られていないが、各因子の濃度を変えた組み合わせを検討し、繁殖可能な F1 世代を得て、解析を継続している。

② 患者型ではないが *rps19* 遺伝子に変異が導入された個体、およびがん抑制遺伝子 *tp53* の indel 変異体をそれぞれ複数種類作製し、長期飼育している。*rps19* にヘテロ変異を持つ 5 つの系統では、1 年半～2 年以内に 13～50% の個体で腫瘍形成を確認した。組織切片では異型紡錘形細胞の束状配列が観察されたことから、*tp53* 変異体と同様に MPNST (悪性末梢神経鞘腫) を形成したと考えた。さらに腫瘍組織から RNA を精製してがん関連遺伝子の発現解析を行ったところ、優位に発現量が上昇する遺伝子を見出した。RP 遺伝子変異とがん化との関連を明らかにするモデルとしての利用を検討している。

(3) 新たな DBA 原因候補遺伝子の同定の試み

DBA 患者 (83 症例 81 家系) の DNA を用いたエクソーム解析を行った。その結果、新たに 2 つの原因候補遺伝子を同定した。rRNA のプロセッシングに関与することが示唆される遺伝子と、リボソーム前駆体の形成に関与する遺伝子であった。いずれのゼブラフィッシュオルソログもヒトとの保存性が高いため、個体を用いた機能解析を進め造血との関連性を検討している。

本研究により、GPI アンカー生合成因子と赤血球造血との関連が示唆されたことは興味深い。DBA 発症の分子メカニズムに迫る重要な基盤情報になると期待している。また、RP 遺伝子の変異体が高い確立で腫瘍を形成することが明らかになった。これは、リボソーム病の患者が将来的にがんを発症する可能性が高いことと一致している。長期に渡るリボソームの翻訳機能の異常が細胞のがん化を招くメカニズムを解明するモデルとして有用ではないかと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hideaki Matsui, Junko Ito, Noriko Matsui, Tamayo Uechi, Osamu Onodera, Akiyoshi Kakita	4. 巻 12
2. 論文標題 Cytosolic dsDNA of mitochondrial origin induces cytotoxicity and neurodegeneration in cellular and zebrafish models of Parkinson's disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3101
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-23452-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Douglas C. Bittel, Email authorNataliya Kibiryeve, Naoya Kenmochi, Prakash Patil, Tamayo Uechi, Brenda Rongish, Mike Filla, Jennifer Marshall, Michael Artman, Rajasingh Johnson, James E. O' BrienJr	4. 巻 -
2. 論文標題 The Role of Alternative mRNA Splicing in Heart Development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Mechanism of Congenital Heart Disease and Pulmonary Hypertension	6. 最初と最後の頁 339-351
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-981-15-1185-1_53	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tamayo Uechi, Naoya Kenmochi	4. 巻 12
2. 論文標題 Zebrafish Models of Diamond-Blackfan Anemia: A Tool for Understanding the Disease Pathogenesis and Drug Discovery	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 pharmaceuticals	6. 最初と最後の頁 151
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ph12040151	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kunwadee Palasin, Tamayo Uechi, Maki Yoshihama, Naparee Srisowanna, Narantsog Choijookhuu, Yoshitaka Hishikawa, Naoya Kenmochi & Wilaiwan Chotigeat	4. 巻 9
2. 論文標題 Abnormal development of zebrafish after knockout and knockdown of ribosomal protein L10a	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18130
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-54544-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 上地球代, 吉浜麻生, 中島由香里, 長友麻里子, 鈴木穰, 剣持直哉
2. 発表標題 先天性貧血とmRNA選択的な翻訳効率の変動: ゼブラフィッシュを用いた解析
3. 学会等名 第44回分子生物学学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上地球代
2. 発表標題 先天性貧血とリボソームの異常 ゼブラフィッシュを用いて未知の翻訳機構の解明をめざす
3. 学会等名 第27回八幡平造血セミナー (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tamayo Uechi, Maki Yoshihama, Yukari Nakajima, Mariko Nagatomo, Yutaka Suzuki, Naoya Kenmochi
2. 発表標題 Translational efficiency of mRNAs required for hematopoiesis were decreased in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上地球代, Mary McMahon, Davide Ruggero
2. 発表標題 リボソームRNAの修飾欠損によるtRNA結合の変化
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tamayo Uechi, Maki Yoshihama, Yukari Nakajima, Mariko Nagatomo, Yutaka Suzuki, Etsuro Ito, Naoya Kenmochi
2. 発表標題 Molecular Pathogenesis of Diamond-Blackfan Anemia and Drug Screening for the Disease Using Zebrafish as a Model Animal
3. 学会等名 RNA 2019 (The 24th Annual Meeting of the RNA Society) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上地球代, 中島由香里, 長友麻里子, 吉浜麻生, 鈴木稜, 剣持直哉
2. 発表標題 リボソームタンパク質とmRNA選択的な翻訳調節: ゼブラフィッシュを用いた解析
3. 学会等名 第45回分子生物学学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上地球代, 長友麻里子, 剣持直哉
2. 発表標題 ゼブラフィッシュを用いたリボソーム病の発症機構の解明
3. 学会等名 第45回分子生物学学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔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
---------	---------