

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 25日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790989

研究課題名（和文）リボソームの翻訳異常と造血機構の破綻：ゼブラフィッシュを用いた解析

研究課題名（英文） Defective erythropoiesis and ribosomal dysfunction : Analysis of zebrafish model for Diamond-Blackfan anemia.

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

研究成果の概要（和文）：ゼブラフィッシュのダイヤモンド・ブラックファン貧血モデルを用いて、特定遺伝子の翻訳効率に変動が起きているかどうかを解析した。まず、モデル胚からポリソーム（リボソームと mRNA の複合体）を分画し、そこからさらに mRNA を精製した。これを用いて、マイクロアレイによる発現解析を行った。その結果、いくつかの赤血球造血に関する遺伝子の翻訳効率に変動していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）： To investigate the molecular mechanism underlying the pathogenesis of Diamond-Blackfan anemia, we have developed a zebrafish model and carried out microarray analyses to quantify translating mRNAs from polysomal fractions. We found that translational efficiency of some genes required for erythropoiesis had affected.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：分子遺伝学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：リボソームタンパク質遺伝子、造血異常、ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

リボソームは、リボソーム RNA (rRNA: ヒトの場合 4 種類) とリボソームタンパク質 (RP: ヒトの場合 79 種類) で構成され、その生合成過程にはさらに 200 種類以上の因子が関わる。骨髄異常を示す Schwachman-Diamond 症候群、先天性角化不全症、Cartilage-hair hypoplasia の患者において、リボソーム RNA の成熟に関わる遺伝子の変異が確認された。また、ダイヤモンド・ブラック

ファン貧血 (DBA) は、ヒト疾患と RP との関連性を強く示唆する例となっていた。いずれにしても、翻訳機能の変化が特定の疾患を引き起こす可能性が非常に高いことを示していた。それまでは、リボソームの異常は翻訳低下を引き起こし、個体の死を招くだけであると考えられてきた。しかし、この頃には、翻訳制御のわずかな変化によって様々な疾患が発症し得るという予測を基に研究が進められるようになっていた。

リボソームは、生命活動に必須なすべてのタンパク質の合成を行う。その機能本体が rRNA であるとされる一方で、RP の機能については未知の部分が多い。しかし、ショウジョウバエにおいて、RP 遺伝子のうちの一つが変異しても発育遅滞や不妊を示す *Minute* 変異体になることが確認された。マウスでも、特定の RP 遺伝子と骨格異常との関連が示唆された。さらに、ヒトにおいて貧血と RP 遺伝子変異が連鎖することが示唆されたことから、各 RP の異常が原因となる疾患が明らかにされる可能性が高かった。つまり、RP の変異によってリボソームの翻訳能が変化し、その変化に対して感受性の高い器官で顕著に異常が現れる、という機序が考えられた。これは、リボソームの機能が全身で均一ではなく、それぞれの器官に最も適した活性状態があり、それを規定しているのが RP ではないかという予測に基づいていた。そこで、まず、疾患との関連が明らかである RPS19 に着目し、造血器官特異的な翻訳調節能を解明したいと考えた。

2. 研究の目的

正常な RPS19 の欠損によって mRNA 特異的な翻訳異常が起きていることを明らかにするために、ポリソーム解析を応用したトランスクリプトーム解析により、リボソームの翻訳効率の変動を明らかにする。活発に翻訳される mRNA には複数のリボソームが結合しポリソームを形成する。超遠心により分離したポリソーム画分から mRNA を抽出し、各 mRNA の網羅的な定量解析を行う。この方法では、mRNA 量を翻訳されるタンパク質量として捉えることができる。S19 タンパク質の変異により発現量が大きく変動する遺伝子と血球成熟との関連を検討し、DBA の発症機構の解明をめざす。

3. 研究の方法

(1) ポリソーム解析

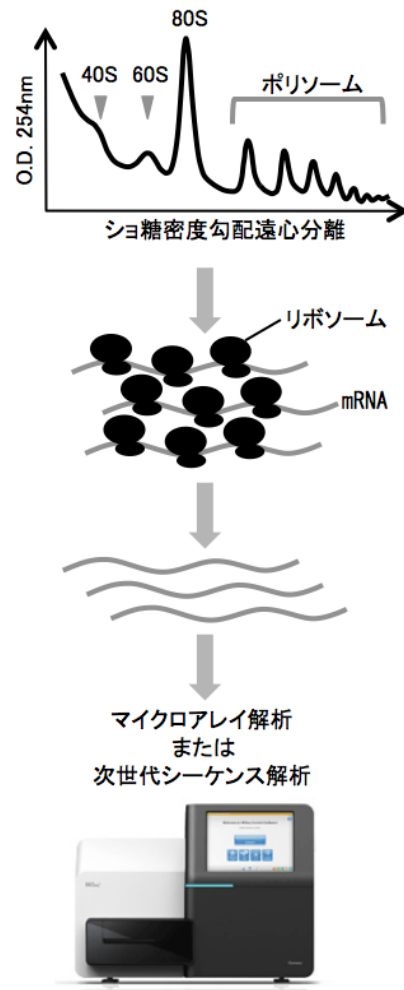
2つのサブユニットが正常に会合した 80S モノソーム、また1つの mRNA に複数のリボソームが結合したポリソーム形成のパターンを解析した。

モルフォリノアンチセンスオリゴの注入による RPS19 タンパク質の発現抑制胚からの抽出物を、ショ糖密度勾配 (10%~50%) に載せて遠心し、フラクションコレクターにより分取した。その際に、各画分の 254nm での吸光度を測定した。吸光度を正常胚の場合と比較解析し、RPS19 タンパク質の欠損がリボソームの生合成に及ぼす影響を明らか

にした。また、各画分から rRNA を精製して電気泳動とバイオアナライザーにより、rRNA の成熟にどのような影響が及んでいるのかを解析した。

(2) ポリソームを形成する mRNA の発現解析

上記の実験で得られたポリソーム画分に含まれる mRNA の頻度を、マイクロアレイまたは次世代シーケンサーを用いて解析した。RPS19 タンパク質の欠損によって、翻訳頻度が変動する遺伝子を抽出した。



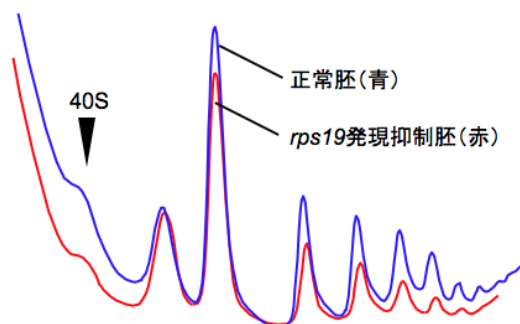
(3) 新たな責任遺伝子の同定

RPS19 タンパク質が欠損した場合、ポリソームを形成する mRNA のうち、赤血球の分化、増殖に関連する遺伝子の翻訳効率がどのように変動するのかを詳細に解析した。また、マイクロアレイ解析で明らかになった翻訳効率の変動を、定量 PCR で確認するために、プライマーとプローブの設定を行った。

4. 研究成果

(1) ポリソーム解析

DBA モデルから、ショ糖密度勾配遠心法によりポリソーム (mRNA に複数のリボソームが結合し翻訳活動を行っている状態) を分画した。正常胚と比較すると、RPS19 タンパク質が構成成分となる小サブユニットの生合成が減少していることが示唆された (下図: 40S)。40S サブユニットの減少により、翻訳活動を行う 80S リボソームの数が減少したと考えられたが、翻訳能を示すポリソームパターン (下図: 連続した波) は大きく変化しないことから、RPS19 が欠損したリボソームも翻訳活動に関与している可能性があると考えた。そこで、リボソームに含まれる RP の定量、定性解析を行うために、ポリソーム画分からタンパク質を精製する方法を検討し、確立した。また、DBA 遺伝子の一つである *rpl11* の発現抑制胚を用いてポリソームパターンを解析した結果、*rps19* 抑制胚と同様に、ポリソーム形成にほとんど変化は見られなかった。このことから、特定の RP に異常がおきても、リボソームの生合成と翻訳活動が極端に失われることはなく、むしろ、不完全なリボソームも翻訳を行っていることが示唆された。



(2) ポリソームを形成する mRNA を用いたマイクロアレイ解析

アンチセンスオリゴで *rps19* の発現を抑制した DBA モデル約 200 匹から、ショ糖密度勾配遠心法によりポリソーム (リボソームと mRNA の複合体) を分画した。この画分から mRNA を精製し、逆転写によって合成した cDNA をビオチン標識して、マイクロアレイ上のプローブとハイブリダイズさせて発現強度を解析した。コントロール (ミスマッチアンチセンスオリゴを注入した) 胚についても同様の解析を行った。マイクロアレイには約 15,000 種類の遺伝子のプローブが搭載されているが、その内、約半数の遺伝子の発現を有効データとして利用できる結果が得られた。

(3) 翻訳効率が変動する遺伝子の抽出

コントロールと比較して翻訳される頻度の増減について解析を行った。その結果、リボソームを構成する 79 種類の RP の翻訳量はほとんど変化しないことが示唆された。また、*rps19* の発現抑制によって、p53 を介したアポトーシス経路が活性化することを既に明らかにしていたが、その結果と一致して、*rps19* 発現抑制胚では、*tp53*、*mdm2* などアポトーシス経路に関わる遺伝子の翻訳量が増加していることも示された。さらに、赤血球の分化関わる遺伝子群に関して、特に詳細に解析を行った。その結果、全 RNA を用いたマイクロアレイ解析では、発現量に差のある遺伝子を抽出できなかったが、ポリソームを形成する mRNA のみを用いたアレイ解析からは、赤血球の分化に関与するいくつかの遺伝子について発現量の違いが示唆された。このことから、RPS19 タンパク質の欠損と、赤血球造血に関与するいくつかの遺伝子の翻訳効率の変動との関連が示唆された。

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 4 件)

- ① Higa-Nakamine S, Suzuki T, Uechi T, Chakraborty A, Nakajima Y, Nakamura M, Hirano N, Suzuki T, Kenmochi N. Loss of ribosomal RNA modification causes developmental defects in zebrafish. *Nucleic Acids Res*, 査読有り 40: 391-398 (2012)
- ② Chakraborty A, Uechi T, Kenmochi N. Guarding the 'translation apparatus': defective ribosome biogenesis and the p53 signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 査読有り 2: 507-522 (2011)
- ③ Torihara H, Uechi T, Chakraborty A, Shinya M, Sakai N, Kenmochi N. Erythropoiesis failure due to RPS19 deficiency is independent of an activated p53 response in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol*, 査読有り 152: 648-654 (2011)
- ④ 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, Ishibashi K. The NPC motif of aquaporin-11, unlike the NPA motif of known aquaporins, is essential for full expression of molecular function. *J Biol Chem*, 査読有り 286: 3342-3350 (2011)

〔学会発表〕(計5件)

- ① 上地球代. リボソームの異常と赤血球形成不全: ゼブラフィッシュを用いた解析. 日本分子生物学会. 2011年12月13日, 横浜.
- ② Uechi T. Defective erythropoiesis and ribosomal dysfunction in zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia. RNA Society Meeting "RNA 2011 Kyoto". 2011年6月14日, 京都.
- ③ 上地球代. ゼブラフィッシュを用いた初期造血異常とリボソームの翻訳調節機構の解析. 日本分子生物学会. 2010年12月8日, 神戸.
- ④ 上地球代. 造血異常を引き起こすリボソームの翻訳調節機構の解析. 日本 RNA 学会年会. 2010年7月28日, 東京.
- ⑤ Uechi T. Ribosomal dysfunction and bone marrow failure: Analysis of zebrafish model for Diamond-Blackfan anemia. 15th Annual Meeting of the RNA Society. 2010年6月24日, シアトル, 米国.

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