

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25291003

研究課題名(和文) リボソームCODEの破綻とリボソーム病発症の分子機構

研究課題名(英文) Molecular pathogenesis of ribosomopathies and defective ribosome CODE

研究代表者

剣持 直哉 (Kenmochi, Naoya)

宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・教授

研究者番号：00133124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：リボソームの異常に起因する疾患「リボソーム病」は、リボソームによる選択的な mRNA の翻訳調節機構が破綻した結果であると考え、これを検証するためにゼブラフィッシュで疾患モデルを作製し、系統的な解析を実施した。その結果、リボソームタンパク質RPS19に変異があるダイヤモンド・ブラックファン貧血のモデルでは、造血に関与する遺伝子や糖鎖の合成に関わる遺伝子の翻訳効率が低下した。また、rRNA の修飾を阻害したモデルでは、RNA修飾が初期発生に必須であり、多くの遺伝子の翻訳が変動した。本研究により、リボソームの選択的な翻訳調節機構がリボソーム病の発症に大きく関わるということが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Ribosomopathies are the diseases caused by ribosomal abnormalities. We hypothesized that the selected mRNA translation by ribosomes should play an important role in the disease onset. To investigate the molecular pathogenesis of ribosomopathies, we developed a zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia by knocking down a ribosomal protein gene RPS19 and found that the genes involved in erythropoiesis and glycan biosynthesis were translationally down-regulated. We also investigated the role of rRNA modifications in zebrafish and found that the modifications are essential for the early development of zebrafish and a loss of the modification leads to translational dysregulation of mRNAs. These results indicate that regulation of the selected mRNA translation is associated with the pathogenic mechanism of ribosomopathies.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：リボソーム 疾患モデル ゼブラフィッシュ 造血異常 核小体 発がん 翻訳 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

リボソームはすべての生物に不可欠な遺伝情報の翻訳装置であり、多数のタンパク質と RNA からなる巨大な複合体である。通常、このような細胞内装置の障害は生体にとって致命的であるため、疾患の原因にはならないと考えられていた。しかし、1999 年にダイヤモンド・ブラックファン貧血 (DBA) の患者でリボソームタンパク質 S19 遺伝子 (*RPS19*) に変異が見つかったことを契機に、リボソームの機能障害が必ずしも致死とはならず、疾患原因になり得ると考えられるようになった。また、リボソームの異常と発がんとの関連も報告され、疾患発症の分子機構について強い関心が寄せられていた。しかし、ユビキタスに存在するリボソームの異常がなぜ特定の組織や細胞にのみ影響を与えるのか大きな疑問であった。

2. 研究の目的

この疑問を解決するために、私達は、リボソームが細胞の種類により mRNA に対する親和性 (選択性) が異なるのではないかと考えた。すなわち、リボソームによる選択的な翻訳調節機構が存在し、この選択性は多数のリボソームタンパク質 (RP) や RNA 修飾の組み合わせ「リボソーム CODE」により制御されていると推測した。RP や rRNA に生じたわずかな変異がリボソーム CODE の破綻を招き、これが一連の mRNA の翻訳活性に影響を与えた結果、特定の組織に障害をもたらす、貧血などの病態を引き起こしたと考えることができる。本研究は、リボソーム CODE に制御された選択的 mRNA 翻訳機構を明らかにし、リボソームの異常に起因する疾患 (リボソーム病) 発症の分子機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) DBA モデルの解析

翻訳効率の解析

DBA のゼブラフィッシュモデル (*RPS19* 遺伝子のノックダウン胚) からショ糖密度勾配遠心法によりポリソーム画分を調製し、ここから抽出した mRNA を DNA チップおよび次世代シーケンサーを用いて解析することで、各 mRNA の翻訳量の変動を調べた。また、DBA モデルのトランスクリプトーム解析も同時に行い、このデータと比較することで正味の翻訳効率を推測した。これにより、DBA モデルで翻訳が変動した遺伝子を同定した。次世代シーケンサーによる解析は、連携研究者の鈴木穰 (東京大学) が担当した。

オントロジー解析

翻訳効率が変わった遺伝子についてオントロジー解析を行った。効率が 50% 以下に低下した遺伝子 75 個と効率が 2 倍以上に増加した遺伝子 181 個をフリープログラムの DAVID (Database for Annotation, Visualization,

and Integrated Discovery) を用いて解析した。翻訳効率が低下した遺伝子については、DBA 患者のエクソームデータを解析して遺伝子変異の有無も同定した。

(2) 新規 DBA 候補遺伝子の解析

候補遺伝子の機能解析

DBA 患者のエクソーム解析により同定された変異遺伝子が真の原因遺伝子であることを確認するために、ゼブラフィッシュを用いて当該変異の機能解析を行った。患者で同定された変異は RP 遺伝子 (*RPL27*, *RPS15A*, *RPS27*) のスプライシング異常またはフレームシフトを引き起こすと推測されたため、ゼブラフィッシュのオルソログの相同部位にモルフオリノアンチセンスオリゴ (MO) を設計し、これを受精卵に注入することでスプライシングを阻害した。得られたゼブラフィッシュ胚の形態および造血能を解析することで、当該遺伝子が新規の DBA 遺伝子であるかどうかを評価した。

シノニマス変異の解析

DBA 患者のスクリーニングが欧米・日本を中心として大規模に進められている。しかし、半数近くの患者でいまだに原因遺伝子は同定されていない。そこで、通常のエクソーム解析では発見できない変異が DBA の原因になっているものと考え、シノニマス変異の解析を行った。厚労省と AMED の難治性疾患克服事業で蓄積された約 50 例の患者および家族のエクソームデータを解析し、疾患発症にリンクする変異を検索した。

(3) 発がんモデルの作製

RP 遺伝子のノックダウン胚は、1 週間程度で致死となることより発がんモデルとしてはあまり適さない。この問題を解決するために、*Tol2* のシステムを用いて組織特異的に RP 遺伝子をノックダウンする方法の開発を試みた。*Tol2* は魚のトランスポゼースで、これを使って組織特異的なプロモーターを持つ miRNA 遺伝子 (*RPS8a* を標的とする) をゼブラフィッシュのゲノムに組み込んだ。得られたトランスジェニックゼブラフィッシュを長期間飼育し、腫瘍形成の有無を観察するとともに、組織化学的手法で特異性や *RPS8a* の発現レベル (miRNA の効果) などの解析を行った。

(4) RNA 修飾と翻訳活性の解析

rRNA 修飾の機能を明らかにするために、修飾が欠損したゼブラフィッシュを作製した。まず、修飾酵素 (ディスクリン) に変異が同定された先天性角化不全症 (DC) のモデルを作製し、ポリソーム mRNA-seq により翻訳効率が変わった遺伝子を同定した。これらの遺伝子は DC 発症に重要な役割を果たしていると考えられる。次に、修飾をガイドする snoRNA の発現を阻害して、DC モデルと同様

な手法により特定部位の修飾の機能を解析した。これにより RNA 修飾の機能を個体レベルで解析した。

4. 研究成果

(1) 翻訳効率が変動した遺伝子の解析

DBA のゼブラフィッシュモデル (*RPS19* 遺伝子のノックダウン胚) のトランスクリプトーム解析およびポリソーム mRNA 解析により、DBA モデルにおいて翻訳効率が変化した mRNA を同定した。効率が 2 倍以上に上昇した遺伝子 181 個、効率が 50% 以下に低下した遺伝子 75 個について、造血との関連を調べたところ、翻訳効率が低下した遺伝子の上位に多くの造血関連因子が含まれていた。最も翻訳効率が落ちた遺伝子は *GATA1* であり、赤血球産生に重要な転写因子であった。

GATA1 の翻訳が DBA 発症に關与する可能性がすでに報告されており、これを指示する結果となった。また、2 番目に翻訳効率が低下した遺伝子は、赤血球産生および GPI アンカーの生合成に働く遺伝子であった。興味深いことに、ジーンオントロジー (GO) 解析により、他にも多くの糖鎖合成に關与する遺伝子の翻訳が落ちていることが明らかとなった。DBA の発症に糖鎖の生合成が何らかの役割を果たしている可能性が示された。

次に、翻訳効率が変動した遺伝子と原因遺伝子が同定されていない DBA 患者のエクソームデータを比較したところ、翻訳効率が低下した上位 20 遺伝子のうち 6 遺伝子で患者に変異を発見した。RP 遺伝子以外では唯一 *GATA1* にしか変異が報告されていないことから、これらの遺伝子は前述の糖鎖関連遺伝子とともに DBA 発症機構の解明に重要な手がかりを与えると考えられる。

(2) 新規 DBA 遺伝子の同定

DBA 患者のエクソーム解析により同定された 3 種類の RP 遺伝子 (*RPL27*, *RPS15A*, *RPS27*) について、ゼブラフィッシュで機能解析を行った。*RPL27* および *RPS15A* はスプライス部位の変異により、患者ではそれぞれエキソン 2 とエキソン 3 が欠失していた。そこで、該当するスプライス部位を標的とした MO を受精卵に注入し、転写産物および表現系を解析した。RT-PCR で転写産物を解析したところ、MO を注入したゼブラフィッシュ胚では、患者と同様なエキソンスキップが起こった (図 1)。

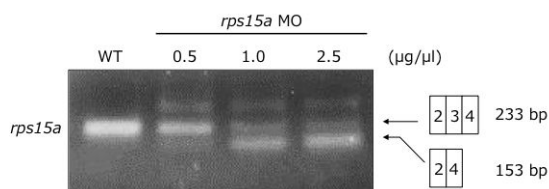


図 1 RT-PCR による転写産物の解析

これらの胚は尾部の屈曲や体調の短縮などの形態異常が認められ、また、ヘモグロビ

ン染色により血球を染色したところ、血球数が減少していることも明らかになった。さらに、これらの表現型は *RPL27*, *RPS15A* の mRNA を注入することで回復した (図 2)。以上の結果より、*RPL27* および *RPS15A* を新規の DBA 遺伝子として同定した (*Br. J. Haematol.* 2015; *Haematologica*, 2017)。

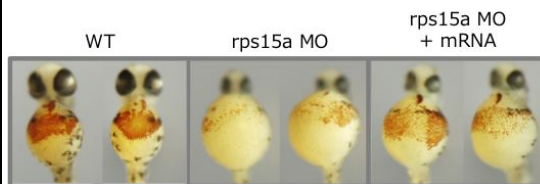


図 2 ヘモグロビン染色による血球の解析

RPS27 の変異をゼブラフィッシュで再現するために、イントロン 2 のスプライス部位を標的にした MO を受精卵に注入した。RT-PCR で転写産物を解析したところ、MO 注入胚ではエキソン 2 がスキップし、その結果、患者と同様にフレームシフトが生じた。これらの胚は、尾部の屈曲や卵黄伸長部の低形成などを示すとともに、造血も低下していた。これらの結果より、*RPS27* も新たな DBA 遺伝子であることが示唆された (*Br. J. Haematol.* 2015)。

シノニマス変異が疾患の原因になる可能性を検討するために、厚労省と AMED の難治性疾患克服事業で蓄積された約 50 例の患者および家族のエクソームデータを解析し、疾患発症にリンクする変異を検索した。その結果、複数の遺伝子で疾患発症との関連が明らかになった。現在、これらの遺伝子について機能解析を進めている。

(3) 発がんモデルの作製・解析

RP 遺伝子の異常に起因した腫瘍形成の分子機構を明らかにするために、*Tol2* のシステムを用いて、肝臓、神経、体節に特異的なプロモーターを有する miRNA 遺伝子 (*RPS8a* を標的とする) をゼブラフィッシュのゲノムに組み込んだ。これらのゼブラフィッシュを長期に飼育・観察を行った結果、神経特異的なプロモーターを持つゼブラフィッシュで腫瘍の形成を確認した (図 3)。



図 3 miRNA による腫瘍形成

この個体から組織切片を作製し、腫瘍組織の解析を行った結果、ゼブラフィッシュに特有な抹消神経鞘腫瘍様の特徴を示した。また、組織の免疫染色により *RPS8a* の発現レベルが低下していることも確認した。このゼブラフィッシュは RP 遺伝子の異常に起因した発

がんの優れたモデルになると考えられる。

(4) RNA 修飾の異常と mRNA の翻訳活性
リボソームにおける RNA 修飾の役割を明らかにするために、RNA 修飾が欠損したゼブラフィッシュモデルを作製した。修飾酵素 (ディスクリン) を欠損したゼブラフィッシュは先天性角化不全症 (DC) のモデルになると考えられる。また、U26 snoRNA の発現を阻害したゼブラフィッシュは特定の rRNA 修飾の機能を解析するモデルとなる。これらのモデルはいずれも発生初期に異常を示し、頭部や顎の形成異常、色素異常、心膜の浮腫、内蔵の形成不全などが観察された。また、7 日以内にすべて致死となった。

次に、ポリソーム mRNA 解析および DNA チップを用いたトランスクリプトーム解析を行った。その結果、欠損モデルにおいて翻訳効率が大きく変動 (2 倍または 1/2) した遺伝子を、ディスクリンの発現阻害で 176 個、U26 snoRNA の発現阻害で 252 個同定した。また、翻訳効率の変動が大きい遺伝子のオントロジー解析したところ、特に、U26 snoRNA の発現阻害で脳および神経系、眼の形成に関わる遺伝子が多数同定された。これらの結果は、RNA 修飾の役割および疾患との関連を明らかにするための重要な情報になると考えられる。

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 12 件)

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.

Haematologica. 102, e93-e96, 2017. 査読有 DOI:10.3324/haematol.2016.153932

Ikeda, T., Nakahara, A., Nagano, R., Utoyama, M., Obara, M., Moritake, H., Uechi, T., Mitsui, J., Ishiura, H., Yoshimura, J., Doi, K., Kenmochi, N., Morishita, S., Nishino, I., Tsuji, S., and Nunoi, H. TBCD may be a causal gene in progressive neurodegenerative encephalopathy with atypical infantile spinal muscular atrophy.

J. Hum Genet. 62, 473-480, 2017. 査読有 DOI:10.1038/jhg.2016.149

The RNAcentral Consortium. RNAcentral: a comprehensive database of non-coding RNA sequences. *Nucleic Acids Res*. 45, D128-D134, 2017. 査読有 DOI:10.1093/nar/gkw1008

Patil, P., Uechi, T., Kenmochi, N. Incomplete splicing of neutrophil-specific genes affects neutrophil development in a zebrafish model of poikiloderma with neutropenia. *RNA Biol*. 12(4), 426-434, 2015. 査読有

DOI: 10.1080/15476286.2015.1017240

Patil, P., Kibiryeveva, N., Uechi, T., Marshall, J., Artman, M., O'Brien, J.E., Kenmochi, N., Bittel, D.C. scaRNAs regulate splicing and vertebrate heart development. *Biochem Biophys. Acta*. 1852(8), 1619-1629, 2015. 査読有

DOI: 10.1016/j.bbadis.2015.04.016

Wang, R., Yoshida, K., Toki, T., Sawada, T., Uechi, T., Okuno, Y., Sato-Otsubo, A., Kudo, K., Kamimaki, I., Kanazaki, R., Shiraishi, Y., Chiba, K., Tanaka, H., Terui, K., Sato, T., Iribe, Y., Ohga, S., Kuramitsu, M., Hamaguchi, I., Ohara, A., Hara, J., Goi, K., Matsubara, K., Koike, K., Ishiguro, A., Okamoto, Y., Watanabe, K., Kanno, H., Kojima, S., Miyano, S., Kenmochi, N., Ogawa, S., Ito, E. Loss of function mutations in RPL27 and RPS27 identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan anaemia. *Br. J. Haematol*. 168(6), 854-864, 2015. 査読有

DOI: 10.1111/bjh.13229

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

剣持直哉. リボソーム病—リボソーム合成の異常と疾患— 生化学: リボソームの機能調節と疾患. 85(10), 909-915, 2013. 査読無

http://www.jbsoc.or.jp/back_no/85-10

Yoshihama, M., Nakao, A., Kenmochi, N. snOPY: a small nucleolar RNA orthological gene database. *BMC Res. Notes*, 6, 426, 2013. 査読有

DOI: 10.1186/1756-0500-6-426

[学会発表] (計 55 件)

Uechi, T., Yoshihama, M., Nakajima, Y., Suzuki, Y., Sugano, S., Kenmochi, N. Decreased translational efficiency of mRNAs required for hematopoiesis in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia. "Translation Machinery in Health & Disease" Gordon Research Conference, Galveston, USA, 2017, 3/19-24.

上地珠代, 中島由香里, 吉浜麻生, 鈴木 稜, 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, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市), 2016, 11/30-12/3.

Uechi, T., Nakajima, Y., Yoshihama, M., Suzuki, Y., Sugano, S., Kenmochi, N. Selected mRNA translation and ribosomopathies: analyzing the zebrafish model of congenital pure red-cell aplasia. The 21th Annual Meeting of the RNA Society, 国立京都国際会館(京都府・京都市), 2016, 6/28-7/2.

Kenmochi, N., Uechi, T., Higa-Nakamine, S., Yoshihama, M., Suzuki, T. Role of rRNA modification in zebrafish development. EMBL Conference on The Epitranscriptome, Heidelberg, Germany, 2016, 4/20-22.

Kenmochi, N., Uechi, T., Nakajima, Y., Yoshihama, M., Suzuki, Y., Sugano, S. Ribosomal dysfunction leads to erythropoiesis failure in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia. The 13th International Congress of Human Genetics, 国立京都国際会館(京都府・京都市), 2016, 4/3-7.

Uechi, T., Nakajima, Y., Yoshihama, M., Toki, T., Suzuki, Y., Sugano, S., Ito, E., Kenmochi, N. Decreased translation efficiency of mRNAs required for hematopoiesis in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia. The 14th Diamond Blackfan Anemia International Consensus Conference, Atlanta, USA, 2016, 3/5-7.

Uechi, T., Nakajima, Y., Yoshihama, M., Suzuki, Y., Sugano, S., Kenmochi, N. Selected mRNA translation and ribosomopathies: studying the molecular pathogenesis of congenital anemia using zebrafish as a model system. International Conference on Ribosome Synthesis, Brussels, Belgium, 2015, 8/19-23.

Uechi, T., Nakajima, Y., Yadav, V.G., Yoshihama, M., Suzuki, Y., Sugano, S. and Kenmochi, N. Ribosomal Dysfunction and Defective Erythropoiesis in a Zebrafish Model of Diamond-Blackfan Anemia. Translation Machinery in Health & Disease, Ventura, USA, 2015, 2/22-27.

剣持直哉. ゼブラフィッシュ初期発生における RNA 修飾の役割. 第 37 回日本分子生物学会年会(招待講演), パシフィック横浜 (神奈川県・横浜市), 2014, 11/25-27.

Uechi, T., Nakajima, Y., Yadav, V.G., Yoshihama, M., Suzuki, Y., Sugano, S. and Kenmochi, N. Studying the molecular pathogenesis of Diamond-Blackfan anemia using zebrafish as a model system. The 14th Conference on Translational Control, Cold Spring Harbor, USA, 2014, 9/2-6.

Yadav, V.G., Chakraborty, A., Uechi, T., Kenmochi, N. Zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia: Ribosomal protein deficiency causes Tp53-independent erythropoiesis failure. 第 36 回日本分子

生物学会年会, 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市), 2013, 12/3-6.

Chakraborty, A., Uechi, T., Gleizes, P-E., Kenmochi, N. When p53 senses faulty ribosomes: Induction of Tp53 correlates with enhanced expression of c-Myc target nucleolar proteins in Rpl11-deficient zebrafish. The 18th annual meeting of the RNA Society, Davos, Switzerland, 2013, 6/11-16.

〔図書〕(計 2 件)

上地珠代, 剣持直哉. 宮日文化情報センター, 大・中・小動物実験プロトコル. 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. 宮崎大学動物実験プロトコル編集委員会, 2016, 146 (第 4 章, 4 ページ)

剣持直哉, 吉浜麻生. 化学同人, ノンコーディング RNA - RNA 分子の全体像を俯瞰する. 第 4 章 snoRNA, 2016, 372 (第 4 章, 12 ページ)

〔その他〕

ホームページ等

RP 遺伝子データベース (RPG)

<http://ribosome.med.miyazaki-u.ac.jp>

snoRNA データベース (snOPY)

<http://snoopy.med.miyazaki-u.ac.jp>

研究室ホームページ

<http://ribosome-labo.med.miyazaki-u.ac.jp>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

剣持 直哉 (KENMOCHI, Naoya)

宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・教授

研究者番号: 00133124

(2)研究分担者

(3)連携研究者

鈴木 勉 (Suzuki, Tsutomu)

東京大学・工学研究科・教授

研究者番号: 20292782

鈴木 穰 (Suzuki, Yutaka)

東京大学・新領域創成科学研究科
・教授

研究者番号: 40323646