

研究題目 ゼブラフィッシュを用いたリボソーム病の発症機序の解明

研究組織

研究代表者：上地珠代（宮崎大学医学部）

共同研究者：小迫英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

【1】研究の概要

[1-1] 本研究の目的・概要

リボソームは4種類のrRNAと80種類のリボソームタンパク質（RP）で構成される高次複合体で、生合成に関与する因子も多数ある。これら構成因子や生合成因子をコードする遺伝子の変異が、様々な疾患とリンクすることがわかってきた。このような疾患はリボソーム病と呼ばれている。代表的な疾患は、先天性の赤芽球ろうであるダイヤモンド・ブラックファン貧血（DBA）である。これまでにDBA患者では、約20種類のRP遺伝子の変異が報告され、リボソームの翻訳異常と疾患との関連が示唆されている。私たちは、ゼブラフィッシュを用いてRP遺伝子のノックダウン胚を作製し、赤血球造血に関与する複数の遺伝子の翻訳効率が低下することを見出した。しかし、特定遺伝子の翻訳がどのように制御されるのか未知である。翻訳関連因子群を含めたプロテオーム解析を行うことにより、特定遺伝子の翻訳制御のメカニズムに迫ることができると考えた。特定のRP遺伝子をノックダウンしたゼブラフィッシュ（疾患モデル）からポリソームを分画し、翻訳に関与するタンパク質群とRPとの関連を明らかにし、新規の翻訳制御機構を明らかにすることが目的である。

[1-2] 研究の方法・経過

1) ポリソーム解析

DBA患者の25%で変異が確認されるRPS19遺伝子のゼブラフィッシュオーソログ（rps19）をモルフオリノアンチセンスオリゴ（MO）でノックダウンした胚を用いポリソーム解析を

行う。比較対象として野生型胚、コントロール胚（ミスマッチMOを注入した胚）を準備する。それぞれ60匹の胚から、ショ糖密度勾配遠心によりリボソームのサブユニットおよびポリソームを分画する。

2) プロテオーム解析

分画した試料を用いて網羅的定量プロテオーム解析を行い、タンパク質の同定および定量データを得る。

3) Ribo-seq解析

ポリソーム分画からリボソームに覆われているmRNA部分を抽出し、翻訳活動のスナップショットデータを得る。翻訳効率が変動する遺伝子群に特異的な配列・モチーフを探索し、新規の翻訳調節機構を解明する手掛かりとする。

本年度は、野生型胚を用いた質量分析のための条件検討、および1)に示した試料の解析を行った。また、新たな試料セットを用いたLC-MS解析も進行している。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

ゼブラフィッシュ胚のポリソーム分画を用いた解析により、86種類のリボソームタンパク質（RP）と31種類の翻訳開始因子を含む、約2,000種類のタンパク質を同定した。クラスター解析、GO-term解析を行ったところ、多くのリボソーム生合成因子やスプライセオソーム構成因子などが含まれていた。また、リボソームを構成するRPの頻度にばらつきがあることが示唆されたことから、翻訳活動を行うリボソームの不均一性を示すことができる可能性があると考えた。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

リボソームと疾患との関連が最初に報告されてから 20 年以上経つが、発症機序は未だ解明されていない。また、リボソーム病患者は将来、大腸がんなどを発症するリスクが高いことも最近わかってきた。長期に渡るリボソームの異常が細胞のがん化を促進する可能性が示唆される。プロテオーム解析を行うことにより、これまでの「すべての構成因子が正常なリボソームのみ機能する」という通説を覆すことができると期待している。さらに、このリボソームの不均一性と特定遺伝子の翻訳効率の変動との関連を明らかにすることで、リボソーム病の理解が深まると考える。

プロテオーム解析も行い、抑制する RP によってリボソームの不均一性や翻訳関連因子群にどのような違いが生じるのかを明らかにしたいと考えている。

【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表

なし

[3-2] 学会発表

1) Tamayo Uechi. Translational efficiency of mRNAs required for hematopoiesis were decreased in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia. Toward understanding the mechanism of human diseases: Challenges with model organisms, 三島, 11 月 10 日, 2023 年

2) 上地球代, 長友麻里子, 中島由香里, 吉浜麻生, 鈴木穰, 剣持直哉. ゼブラフィッシュのリボソーム病モデルを用いた未知の翻訳制御機構の解明. 第 46 回日本分子生物学会, 神戸ポートアイランド, 12 月 8 日, 2023 年

[3-3] 成果資料等

なし

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

シヨ糖密度勾配を利用した超遠心分離によるポリソーム解析はやや難易度が高く、実験毎の誤差が生じる可能性がある。そこで、吉川博士が開発した、古典的手法に替わるより安定度の高い方法（クロマトグラフィーを利用した Ribo Mega-SEC 法）によるポリソームの分離を試みる。この手法を用いた反復実験で確度の高いデータが得られると期待する。

RPL5 および *RPL11* 遺伝子の変異も多くの DBA 患者で確認され、これら遺伝子のゼブラフィッシュオーソログのノックダウン胚でも顕著な貧血を示す。これらの DBA モデルを用いた