

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、*RPS19*や*RPL11*を含む約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性が示唆されている。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およびノックアウトしたゼブラフィッシュ（疾患モデル）のポリソーム分画を用いたプロテオーム解析を基盤に、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) Ribo Mega-SEC法によるポリソームの分離

昨年度はショ糖密度勾配遠心法によりポリソーム分画を得てプロテオーム解析を行ったが、実験ごとのばらつきが予想以上に大きかった。そこで本年度は、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た。野生型胚をホモジナイ

ズして得た抽出液を用いて試験的に実験したところ、40S/60S/ポリソームの各分画を現すクロマトグラムが得られた。

そこで、DBA患者の25%で変異が確認された*RPS19*遺伝子、および5%で変異が確認された*RPL11*遺伝子のゼブラフィッシュのオーソログ（それぞれ*rps19*遺伝子および*rpl11*遺伝子）をノックダウンした疾患モデル胚を作製し、Ribo Mega-SEC法による40S/60S/ポリソームの分画を行った。

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た。主成分分析でばらつきが明らかになったため繰り返し実験の準備を進めている。一方、個別のサンプルデータから有用な情報が得られる可能性もあるため、過去に行なったRNA-seq解析のデータも併せて慎重に比較解析を行っている。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

サイズ排除クロマトグラフィーは、ゼブラフィッシュ胚の抽出物からのリボソームの分離にも有効であった。比較的簡便で安定した手法であるため、リボソームの構成成分の不均一性が翻訳にどのような影響を及ぼしうのか、網羅的な比較解析が可能であると期待する。

*rps19*遺伝子および*rpl11*遺伝子のノックダウン胚を用いたプロテオーム解析のデータを比較すると、共通して発現量が変動する因子（RPや翻訳関連因子）も確認された。赤血球造血に関与する因子との関連性を探究することで、DBA発症機序の解明につながる可能性があると考えている。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

リボソームタンパク質の変異と DBA 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。さらに様々な疾患がリボソーム生合成の異常に起因すると推測されるようになり、リボソーム病の理解は新たな翻訳制御の探索に繋がると考える。また、リボソーム病患者は将来がん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。

【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, Mariko Nagatomo, Maki Yoshihama, Yukari Nakajima, Yutaka Suzuki, Naoya Kenmochi. Overexpression of pigq gene restores the blood cell counts in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia, 第 25 回日本 RNA 学会, 東京, 6 月 26 日, 2024 年
- 2) 上地珠代, 長友麻里子, 中島由香里, 吉浜麻生, 鈴木穰, 剣持直哉. 翻訳制御の異常とリボソーム病: ゼブラフィッシュを用いた解析. 第 47 回日本分子生物学会, 福岡, 11 月 28 日, 2024 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

本研究では、ゼブラフィッシュの受精卵にアンチセンスオリゴを微量注入して作製したノックダウン胚を用いた。現在、ゲノム編集により患者の遺伝子変異を再現したモデル（ヘテロ変異体）を経代している。これら個体は患者の分子動態をより正確に再現すると予想している。今後は、これらのモデル個体から得られる胚を用いて解析を進める予定である。さらに、

これら変異体を長期間飼育すると高確率で悪性末梢神経鞘腫（MPNST）を形成することが確認された。腫瘍組織を用いたオミクス解析を試み、本研究を発展させる形で、リボソームの異常に起因する細胞がん化の分子メカニズムを探究したい。