

山梨県若手研究者奨励事業 研究成果概要書

所属機関名	山梨大学大学院総合研究部医学域
職名・氏名	特任助教 曾根 良太 ⑩

1 研究テーマ

DDX 型 RNA ヘリカーゼの機能欠損による繊毛病モデル動物の解析

2 研究の目的

DDX 型 RNA ヘリカーゼは DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp)モチーフを保有する RNA ヘリカーゼであり、現在 30 を超える分子種が同定されている。この巨大なファミリーは、RNA 代謝や転写制御、スプライシング調節、microRNA プロセッシングなど生体反応において重要な役割を担っていることが明らかにされているが、器官形成における DDX 型ヘリカーゼの生理機能は不明な点が多い。また、DDX ファミリー間での遺伝学的な協調作用については全く未解明ではある。

申請者は未解明の巨大分子ファミリーである DEAD-box (DDX)型 RNA ヘリカーゼ、特に X サブファミリーに着目し、ゲノム編集技術 CRISPR-Cas9 法による X サブファミリー遺伝子に対する機能欠損型ゼブラフィッシュを作製している。本研究では X サブファミリーの中でも X、Y について解析を行った。Y 変異体は正常に継代が可能だが、X 変異体は生殖発生に異常を示した。次に X-Y 二重変異体の表現型解析を行った結果、X-Y 二重変異体では繊毛の機能不全で呈する腹側への湾曲(ヒトでは側彎症に相当)、水頭症、腎細胞管腔の拡張、巨大腎嚢胞の表現型が観察された。これらの結果は、X と Y が協調して繊毛の機能を制御する新規の分子機能を捉えている可能性を示していた。これらの現象を解明することで DDX 型ヘリカーゼ解析から繊毛病に対する病態解明、根治的な新規治療薬の開発につながることを目的とし解析を行った。

3 研究の方法 および 4 研究の成果

申請者は形態学的特徴として腎細胞管腔内での繊毛形態に異常があるかどうか確認するため、繊毛内にある微小管を染色する抗 acetylated tubulin 染色で繊毛の形態異常の有無を調べ、ハイスピードカメラを用い繊毛の運動異常について動態解析を行った。

抗 acetylated tubulin 染色をゼブラフィッシュの腎細胞を用い、染色を行った結果、野生型と比較し、X-Y 変異体では秩序だった繊毛の配列が消失し、所々丸みを帯びた形態を呈していることが明らかとなった。運動解析についてはハイスピードカメラを使用し腎細胞管腔内に存在する繊毛運動について計測を行った。繊毛運動に関してカイモグラフ解析を使用した所、X-Y 変異体では繊毛の振幅速度に関しては野生型と比較し同程度であった

留意事項

① 3 枚程度で作成してください。

② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

が、繊毛運動異常を示すことを見出した。

次にゲノム編集技術 CRISPR-Cas9 を用いて鞭毛研究に最適なモデル生物であるクラミドモナスを用い、クラミドモナス野生株から *X* 変異体、*Y* 変異体、*X-Y* 変異体を作製し、遊泳速度の変化の有無を計測した。

クラミドモナス野生株と比較し、*X-Y* 変異体では遊泳速度がやや低下していることが判明し、統計学的にも有意な差を得たが、ゼブラフィッシュにおける *X-Y* 変異体ほどの目立った繊毛の運動異常を確認することができなかった。

繊毛機能不全の原因遺伝子を解明するため、野生型と *X-Y* 二重変異体ゼブラフィッシュを用い、RNA シークエンス(RNA seq)解析、RT-PCR(reverse transcription PCR)法および real time PCR 法を用いて候補遺伝子を探索した。

そして候補として挙げた遺伝子に関しては、発現部位および発現動態を把握する手法として、whole-mount in situ hybridization(WISH)法を行うことで野生型または *X-Y* 変異体ゼブラフィッシュにおいて繊毛が発現している代表的な臓器（腎臓、脳室、耳胞、脊柱管など）に候補遺伝子の発現が見られるか解析を行った。最終的には *d* 遺伝子が候補遺伝子として残り、*X-Y* 変異体で発現量が上昇しており、発現部位も繊毛が発現している腎臓に一致していた。このことから *X-Y* 変異体において *d* 遺伝子が繊毛運動に何らかの影響を与えている可能性が考えられた。

5 今後の展望

DDX 型ヘリカーゼが繊毛機能に関連する新規機能を示すことを明らかにした。*X* および *Y* が繊毛症の新規原因遺伝子候補であることを提唱し、新しい診断方法の確立やヒト疾患の病態解明につながると考えている。

6 研究成果の発信方法（予定を含む）

本研究に関しては 2024 年国際ゼブラフィッシュ学会で発表を行った。今後、学術論文として国内外へ発表する予定で論文執筆にあたっている。県民に対してはプレスリリースを作成し、県内の発表会や報告会に参加することで情報提供を行い、本研究内容を周知していく。

*また特許申請計画中であることから具体的な遺伝子名や分子名、および画像データは控えさせていただきます。

留意事項

① 3 枚程度で作成してください。

② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。