

山梨県若手研究者奨励事業 研究成果報告書

<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

山梨大学大学院総合研究部医学域 特任助教 曾根 良太

<研究目的>

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、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。

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。各単独機能欠損変異体の表現型解析では、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、興味深いことに、X-Y 二重変異体では初期発生過程に異常を呈し、胚性致死の表現型(ヒトでは死産または重篤な先天性奇形児に相当)を示した。特に、X-Y 二重変異体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があることを示唆していた。そして 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げることを目的とし解析を行った。

<方法・結果>

1. 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。次に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(動画の中である決まった線上において目的とした物質データを抽出し、時間軸を X 軸とし、場所・位置について Y 軸へと並べ直した二次元表示の画像データ)を使用した所、野生型

と *X-Y* 変異体では同一時間当たりの繊毛速度に有意な差は認められなかった。しかし繊毛運動に関しては縦軸における繊毛の振幅運動について野生型は鋭角な形態を示すが、*X-Y*変異体ではやや丸みを帯びるような形態を示し、運動異常を示すことが判明した。

2. 本研究で解明する *Ddx* 型ヘリカーゼの繊毛機能制御が種を超えて保存される新規生理機能であるかを調べる目的で、鞭毛（構成タンパク質が繊毛と類似）研究に最適なモデル生物で、遺伝的な協調作用を検証できる単細胞緑藻類クラミドモナスを本学解剖学講座の久保智広講師と連携し解析を行った。

ゲノム編集技術 *CRISPR-Cas9* を用いて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、遊泳速度の違いの有無を計測した。クラミドモナスは遊泳をする際に 2 本の鞭毛を用いることが知られており、遊泳速度の異常から鞭毛の運動異常を簡易的に調べることが可能となっている。

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。しかし、ゼブラフィッシュにおける *X-Y* 変異体ほどの目立った鞭毛の運動異常をクラミドモナス *X-Y* 変異体では確認することができなかった。

3. *DDX* 型 RNA ヘリカーゼは遺伝子発現制御に関与することから野生型と *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*)解析を行い、得られたデータから繊毛構造・関連蛋白に関する遺伝子に焦点を当て表現型に関連する遺伝子を探索した。*RNA seq* 解析自体で得られたデータでは野生型と *X-Y* 変異体において 1782 遺伝子の発現変動が確認された。その遺伝子の中から繊毛構造・関連蛋白に関する遺伝子に候補を絞り、65 遺伝子が候補として残った。これらの候補遺伝子に関しては *RT-PCR*(reverse transcription *PCR*)法および *real time PCR* 法を用いて定量解析を行い、*RNA seq* 解析と相関性を示す遺伝子についてさらに絞ることで関連遺伝子を探索した。これらの解析手法で最終的に候補として残った遺伝子は *a, b, c, d, e, f* の 6 遺伝子となった。

次に候補遺伝子の発現部位および発現動態を把握するために *whole-mount in situ hybridization*(*WISH*)法を行った。この *WISH* 解析によって野生型または *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確認を行った。

結果として、繊毛を有する臓器特異的に発現が見られた遺伝子は *a, d, e* のみであり、発現に差が見られたのは *d* であり、*X-Y* 変異体では *d* の発現が野生型と比較し上昇していることが分かった。

d 遺伝子に関しては先行研究で精子の鞭毛生成に必要不可欠なタンパク質であること

が報告されており、*d* に変異があると水頭症や精子無力症(精子の運動低下に起因する疾患)を呈することが知られている。また、*d* タンパク質は一部の *Ddx* 分子と結合し微小管（繊毛の内部骨格を形成する）を介すことで、繊毛形成に必要な分子の運搬ともかかわっていることが報告されている。このことから推測ではあるが、*X* および *Y* 遺伝子の変異により *d* 遺伝子の発現量が上昇することで、繊毛形成に必要なタンパク質を過剰な量を運搬してしまい、繊毛運動に異常をきたしている可能性が考えられる。

<今後の展望>

X および *Y* がある特定の繊毛構造蛋白質をコードする遺伝子と関連性を有する可能性を得ることで、*DDX* 型ヘリカーゼが繊毛機能に関連する新規機能を示す足掛かりを見つけることができた。クラミドモナスも用いることで、今後もより詳細に繊毛機能・構造について如何様な役割を *DDX* 型ヘリカーゼが有するか探求し、*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ていく。また本研究での変異体の病態解析は、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。

<研究成果の発信方法>

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。

<謝辞>

本研究を遂行するにあたり、山梨大学発生生物学教室川原敦雄教授、山梨大学解剖学講座久保智広講師、審査に携わってくださった先生方、県民生活部私学・科学振興課のご担当者様を含めた関係者の皆様に深く御礼申し上げます。

*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。