

令和元年6月14日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K06987

研究課題名(和文) 総腓骨神経を欠損する突然変異マウスの原因遺伝子の解明

研究課題名(英文) Molecular analysis of a mutant mouse having motor axon defects

研究代表者

榎 和子 (Kazuko, Keino-Masu)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：50344883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：特異的な神経投射は、発生期に誘引性分子と反発性分子により形成される。研究代表者は、腓骨神経を欠損した突然変異マウスの原因遺伝子を同定することにより、新しい軸索ガイダンス機構を見出そうとしている。これまでに候補領域に存在する全ての遺伝子エクソンの配列を決定したが、明らかな機能喪失変異は存在しなかった。本研究では、次世代シーケンサーを用いた解析によりゲノム異常を見出し、ゲノム編集を用いて正常化することにより表現型が消失することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊髄運動神経の軸索形成に関して今までに知られていない遺伝子を同定することができた。今後、この遺伝子の機能を解析することにより、新しい神経回路形成の分子機構を明らかにすることができる可能性がある。先天性の内反尖足はヒトでも高頻度で見られる異常であるが、その発症機序は不明であり、ごく少数例を除いては原因となる遺伝子異常が知られていない。本研究の成果がヒト内反尖足の遺伝的診断や治療法開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Neural circuits are formed by accurate guidance of growing axons towards their targets by the actions of attractants and repellents during development. Previous studies have revealed the roles of axon guidance molecules and their receptors, but the molecular mechanisms that control motor axon guidance have not been completely elucidated. I have been trying to identify the gene responsible for the spinal motor axon defects in a spontaneous mouse mutant line. Previously I mapped the critical region by linkage analysis and determined the sequences of all the exons of all the genes in the region. However, loss of function mutations were not identified. In this study, I performed the re-sequencing of the critical region and RNA-seq analysis to determine the genomic and genetic abnormalities. I also made genome-edited mouse lines to examine the roles of the genomic abnormalities identified by next generation sequencing.

研究分野：神経科学

キーワード：マウス 脊髄運動神経 変異 ゲノム異常 ゲノム編集

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊髄運動ニューロンは特定の筋を支配し運動を制御する。この特異的な神経投射は、発生期に様々な誘引性分子と反発性分子の相互作用によって形成される。これまでの研究から、後肢の背側筋へ投射する腓骨神経は、後肢芽の腹側間充組織に発現する EphrinA の反発作用と背側間充組織に発現する EphA・GDNF の誘引によって背側へ誘導されることが明らかになってきた。しかしながら、運動ニューロン軸索ガイダンスの分子機構には未だ不明な点が多い。

申請者は、腓骨筋萎縮マウス (peroneal muscular atrophy: pma) を用いてこの問題に挑戦している。pma マウスは、1980 年代に日本で発見された突然変異マウスであり、先天的に内反尖足を示す。この異常は、腓骨筋を支配する神経が欠損するため腓骨筋が神経原性の萎縮を起こすことによる。出生時に既に表現型が観察されることから、胎児期における腓骨神経の欠損が示唆されるが、胎児期の軸索走行については系統的には調べられていない。そこで、申請者は、脊髄運動ニューロンに特異的に EGFP を発現させた pma マウスを作製し、胎児期の後肢運動神経の走行を直接観察したところ、腓骨神経が形成されず、腰部に異常な軸索が観察された。このような異常は、腓骨神経が欠損する他の遺伝子改変マウスで報告されていないことから、pma マウスは、これまでに知られていない機序による軸索ガイダンス異常を有すると考えられ、pma の原因遺伝子同定が、運動神経の軸索ガイダンスの新たな分子機構の解明につながる可能性がある。

申請者は、これまでに、多数のマウスとマイクロサテライトマーカーを用いて連鎖解析を行い、その候補領域を約 1.1 Mb まで絞り込んだ。この領域に存在する 22 遺伝子、244 エクソン (およびスプライスジャンクション周辺) の塩基配列を決定し、エクソン内の一塩基置換や欠失・挿入が 195 カ所、アミノ酸の変化を伴う変異が 21 カ所存在することを明らかにした。後者は、マウスの一塩基多型 (SNP) データベースに登録されているものがほとんどであり、遺伝子機能の変化を伴わない多型であると考えられる。従って、遺伝子機能の喪失を引き起こすことが明らかな変異 (ナンセンス変異、フレームシフト変異など) は存在しない。以上の結果から、pma マウスの変異は、蛋白コーディング領域の異常ではなく、遺伝子の発現調節領域に存在する可能性が高いと考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、pma マウスの原因遺伝子を同定し、その発症機序を明らかにすることである。そのために、次世代シーケンサーを用いた胎児の RNA-seq 解析を行い、本研究の開始前に行った候補ゲノム領域のリシーケンスのデータと参照することにより、候補領域内に存在するゲノム異常を明らかにすることを第 1 の目標とした。次いで、CRISPR/Cas9 法を用いたゲノム編集により、同定したゲノム異常を正常化することにより、表現型が消失するかどうかを検討することにより、同定した異常が発症の要因になっていることを証明することを第 2 の目標とした。

3. 研究の方法

野生型 (またはヘテロ) マウスと pma ホモマウスの胎児からトータル RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いてシーケンスを行った。RNA のパライゼーションおよびシーケンスは、つくば i-Laboratory LLP の受託で実施し、解析は筑波大学医学医療系の村谷匡史博士と共同研究で実施した。

CRISPR/Cas9 法を用いたゲノム編集は、新学術領域研究「先端技術基盤支援プログラム」の「先端モデル動物支援プラットフォーム」による支援を受けて、筑波大学生命科学動物資源センターの水野聖哉博士との共同で実施した。先ず CRISPR/Cas9 による切断が起こりやすい配列を検索し、その配列をターゲットとするベクターを pma マウス受精卵に微量注入した。得られたマウスの尻尾からゲノム DNA を抽出し、PCR により予想される編集が起こったマウスを選択し、次に切断部位の配列を通常のシーケンスにより決定した。卵割の途中で遺伝子組換え時期が起こる結果、最初の世代では異なる組換えを起こした細胞が混在したキメラ状態となることがあるため、実験には、F1 世代を用いた。

ゲノム編集で得られた成獣マウスの表現型（尖足の有無）を観察した。次に胎児期に脊髄運動ニューロンを標識できるマウスと交配して、胎児期の運動神経走行を観察した。

4．研究成果

RNA-seq とゲノムリシーケンスの結果から、候補領域内に存在するある遺伝子に、正常マウスでは見られない挿入配列があることが分かった。そこで、CRISPR/Cas9 法により、この挿入配列を除去したマウスを作製し、表現型を解析したところ、この遺伝子改変マウスは pma の表現型を示さなくなった。さらに胎児期の運動神経走行の観察から、運動神経の形成が正常化していることが分かった。従って、この配列の挿入が pma マウスの原因であると考えられる。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

Okada, T., Keino-Masu, K., Suto, F., Mitchell, K.J., Masu, M. Remarkable complexity and variability of corticospinal tract defects in adult Semaphorin 6A knockout mice. *Brain Res.* 1710, 209-219, 2019. 査読有

Okada, T., Keino-Masu, K., Suto, F., Mitchell, K.J., Masu, M. Data for 3D reconstruction of the corticospinal tract in the wild-type and Semaphorin 6A knockout adult brain. *Data in Brief* 23, 103718, 2019. doi.org/10.1016/j.dib.2019.103718. 査読有

Okada, T., Keino-Masu, K., Nagamine, S., Kametani, F., Ohto, T., Hasegawa, M., van Kuppevelt, T.H., Kunita, S., Takahashi, S., and Masu, M. Desulfation of Heparan Sulfate by Sulf1 and Sulf2 Is Required for Corticospinal Tract Formation. *Sci. Rep.* 7, 13847, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-14185-3. 査読有

Terawaki, S., Fujita, S., Katsutani, T., Shiomi, K., Keino-Masu, K., Masu, M., Wakamatsu, K., Shibata, N., and Higuchi, Y. Structural basis for CCd1 auto-inhibition in the Wnt pathway through homomerization of the DIX domain. *Sci. Rep.* 10, 7739, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-08019-5. 査読有

Jiang, W., Ishino, Y., Hashimoto, H., Keino-Masu, K., Masu, M., Uchimura, K., Kadomatsu, K., Yoshimura, T., and Ikenaka, K. Sulfatase2 Modulates Fate Change from Motor Neurons to Oligodendrocyte Precursor Cells through Coordinated Regulation of Shh Signaling with Sulfatase1. *Dev. Neurosci.* 39, 361-374, 2017. 査読有

Takashima, Y., Keino-Masu, K., Yashiro, H., Hara, S., Suzuki, T., van Kuppevelt, T.H., Masu, M., and Nagata, M. Heparan Sulfate 6-O-Endosulfatases, Sulf1 and Sulf2,

Regulate Glomerular Integrity by Modulating Growth Factor Signaling. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 310, F395-408, 2016. 査読有

〔学会発表〕(計6件)

榎和子、加藤千賀、三谷優太、石井万由子、林康紀、村谷匡史、水野聖哉、杉山文博、高橋智、加藤秀樹、榎正幸。先天的腓骨神経欠損マウスの原因遺伝子の同定。先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会。2019年1月30-31日、大津

Kazuko Keino-Masu, Chika Kato, Yuta Mitani, Yasunori Hayashi, Masafumi Muratani, Seiya Mizuno, Satoru Takahashi, Hideki Kato, Masayuki Masu. Molecular analysis of the mutant gene for the peroneal muscular atrophy mouse. 第41回日本神経科学大会。2018年7月26-29日、神戸

Sayaka Hashimoto, Takuya Okada, Ken Miya, Kazuko Keino-Masu, Masyauki Masu. Developmental defects of the habenula-interpeduncular circuit in double knockout mice for heparan sulfate endosulfatases Sulf1/2. 第41回日本神経科学大会。2018年7月26-29日、神戸

Sayaka Hashimoto, Takuya Okada, Kazuko Keino-Masu, Masyauki Masu. Heparan sulfate endosulfatases, Sulf1 and Sulf2, are required for habenula circuit development. 第40回日本神経科学学会大会。2017年7月20-23日、幕張

Masayuki Masu, Takuya Okada, Satoshi Nagamine, Fuyuki Kametani, Tatsuyuki Ohoto, Masato Hasegawa, Toin van Kuppevelt, Kazuko Keino-Masu. Desulfation of heparan sulfate is required for corticospinal tract formation. 第40回日本神経科学学会大会。2017年7月20-23日、幕張

Takuya Okada, Kazuko Keino-Masu, Fumikazu Suto, Kevin J. Mitchell, Masayuki Masu. 3D reconstruction of the corticospinal tract visualizes the whole image of widespread and markedly complex axon guidance defects in Sema6A-deficient mouse brains. 第39回日本神経科学学会大会。2016年7月20-22日、横浜

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/molneurobiol/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：榎 正幸

ローマ字氏名：MASU, Masayuki

所属研究機関名：筑波大学

部局名：医学医療系

職名：教授

研究者番号(8桁): 20243032

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。