

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08587

研究課題名(和文) マウス胚発生におけるメチル化DNA結合タンパク質CIBZの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of methylated DNA-binding protein CIBZ in mouse embryogenesis

研究代表者

松田 永照 (Matsuda, Eishou)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：00335481

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子CIBZの生理機能を調べるため、CIBZのヘテロ欠損($fl/+$)マウスの作製と解析を行った。その結果、野生型の胎仔と比較して、 $fl/+$ 胎仔が胎生6.5日目(E6.5)から細胞死の亢進と細胞増殖の阻害により縮小し始め、E9.5で死に至ることを示した。初期胚発生を模倣する実験では、 $fl/+$ 胚は着床前までの発生は正常を示すが、着床後の胚発生は遅延を示した。さらに、胚盤胞から樹立した $fl/+$ のES細胞は野生型と比較して、CIBZの発現は半分に低下したがES細胞の特徴である未分化性を維持した。以上のことから、CIBZの発現はマウス初期胚の発生に必須であることが明らかにされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類では、DNAメチル化は遺伝子の発現制御を介して細胞の増殖や分化、細胞死などの運命決定に重要な役割を果たすことが知られている。DNAメチル化機構の柱であるメチル化酵素が初期胚の発生に必須であることが示されている一方で、もう一つ柱であるメチル化DNA結合タンパク質(MBP)をコードする遺伝子群の欠損マウスでは初期胚の発生に異常が示されなかったため、胚発生におけるMBPの重要性が明らかにされていない。本研究では、MBPの中で初めてCIBZがマウス初期胚の発生に必要なこと、CIBZのゲノムのコピー数が重要であることを明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。

研究成果の概要(英文)：To investigate the physiological function of the transcription factor CIBZ, we generated and analyzed CIBZ heterozygous ($fl/+$) mice. Compared to wild-type fetus, $fl/+$ fetus began shrinking at 6.5 gestational day (E6.5) accompanied by increased cell death and decreased cell proliferation, and died at E9.5. In vitro culture of embryo experiments mimicking early embryonic development, $fl/+$ embryos showed normal development before implantation, whereas exhibited a marked delay of growth after implantation. Furthermore, $fl/+$ ES cells established from blastocysts were maintained in a undifferentiated state despite the expression of CIBZ was reduced by half compared to wild type ES cell. These observations demonstrate that the expression of CIBZ is critical for early embryonic development.

研究分野：転写

キーワード：初期胚発生 DNAメチル化 メチル化DNA 結合タンパク質 転写因子 細胞増殖 細胞死 ES細胞 胚盤胞

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)新規メチル化 DNA 結合タンパク質 (MBP) を同定する必要性

DNA メチル化は、DNA メチル化酵素とメチル化 DNA 結合タンパク質 (MBP) から構成されており、遺伝の発現調節を介して細胞の増殖と分化、細胞死を制御している。DNA メチル化酵素 (維持メチル化酵素 Dnmt1、de novo 型メチル化酵素 Dnmt3a/Dnmt3b) のノックアウト (KO) マウスは胎生 9.5 日目 (E9.5) に致死が示されたため、MBP も初期胚発生に必要であることが示唆された。ところが、既知の MBP をコードする遺伝子の欠損マウスでは初期胚の発生に大きな異常を示す報告がなかったため、この時期における MBP の重要性が分かっていない。

(2) CIBZ ヘテロ欠損マウスによる胎生致死の可能性

研究代表者らが同定した CIBZ は BTB ドメインを持つジンクフィンガー型の MBP であり、マウスの ES などの細胞やマウスの各組織にコピキタスに発現している (Sasai et al; 2005)。これまでに細胞レベルにおいて CIBZ は、マウス細胞で CIBZ の発現を低下させることにより、細胞死マーカーである cleaved caspase-3 の発現上昇によるアポトーシスの亢進 (Oikawa et al., 2008)

ES 細胞の未分化因子 Nanog の発現誘導を介して ES 細胞の増殖促進 (Nishii et al., 2012) 心筋分化因子 Mesp1 の転写を抑制することで ES 細胞の心筋細胞への分化抑制 (Kotoku et al., 2016) などが明らかにされている。CIBZ の発現は細胞の生存や増殖に必須であることから、マウス胚の発生にも CIBZ の発現は重要であることが予想され、CIBZ の KO マウスの作成を試みた。CIBZ の KO マウスを作成するため、コンベンショナルな方法を試みた。しかし、出生マウスの中には CIBZ のヘテロ欠損胎仔が存在しなかったため、胎生致死であることが示唆された。

2. 研究の目的

CIBZ ヘテロ欠損 ($\Delta fl/+$) マウスの作成と解析を行い、マウスの胚発生における CIBZ の機能を明らかにする。

3. 研究の方法

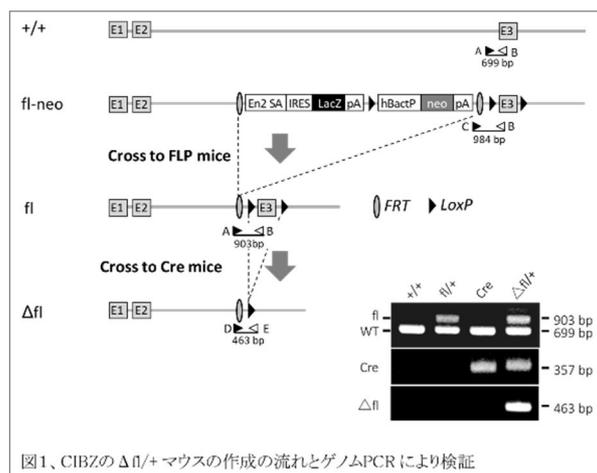
(1) CIBZ の $\Delta fl/+$ マウスの作成、胎仔の形態学および組織学的な解析

(2) 生化学、分子生物学と細胞生物学な手法を用いて CIBZ の $\Delta fl/+$ マウスの表現型の解析

4. 研究成果

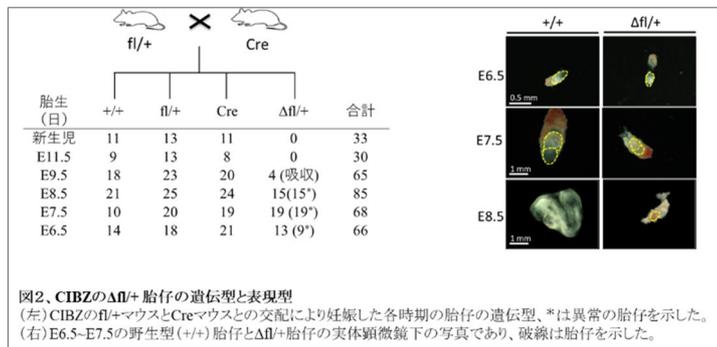
(1) CIBZ の $\Delta fl/+$ マウスの作成

胎生致死を回避するため、欧州条件変異マウス作成プロジェクトより入手した Cre-loxP システムを用いたベクターで CIBZ の fl-neo/+ マウスを作成した。この fl-neo/+ マウスと Flp マウスとの交配で fl/+ マウスを作成した (図 1)。fl/+ マウスは野生型 (+/+) マウスと比較して、形態や行動、生殖能力などにおいて顕著な差はなかった。fl/+ マウスと Cre を全身に発現する (CAG Cre: 以下は Cre と略す) トランスジェニックマウスとの交配により生まれてくる仔マウスはメンデルの法則に従って、4 つの遺伝型 (+/+, Cre、fl/+, $\Delta fl/+$) が同じ割合で存在することが予想される。生まれた仔マウスの中に、 $\Delta fl/+$ 以外の遺伝型は存在したが、 $\Delta fl/+$ の存在は確認できなかったため (図 1 ~ 2)、CIBZ のヘテロ欠損マウスは胎生致死になることが強く示唆された。



(2) CIBZ の $\Delta fl/+$ 胎仔の異常になる時期の検証と表現型の解析

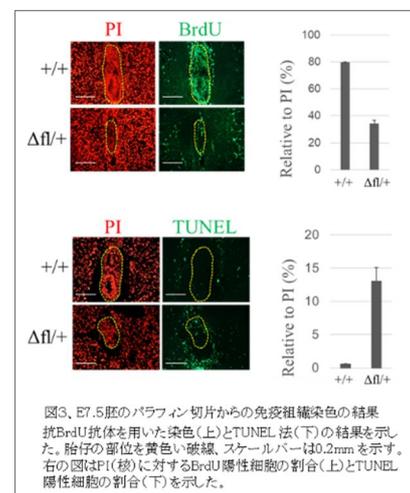
CIBZ の $\Delta fl/+$ 胎仔が胎生致死になる時期を調べるために、 $fl/+$ マウスと Cre マウスとの交配により得られた胎仔 (E11.5:30 個; E9.5:65 個) の解析を行った (図 2)。その結果、 $\Delta fl/+$ の遺伝型は確認できなかったが、他の遺伝型は同じ割合で存在したことから、



$\Delta fl/+$ 胎仔の死亡時期は E9.5 前後であることが分かった。CIBZ の $\Delta fl/+$ 胎仔が異常になる時期を調べるために、 $fl/+$ マウスと Cre マウスとの交配により得られた E6.5~E8.5 胎仔 (E6.5:66 個、E7.5:68 個、E8.5:85 個) を解析した。その結果、E6.5~E8.5 の胎仔は、全ての遺伝型がほぼ同等の割合で確認できた。 $\Delta fl/+$ 胎仔が同腹子の野生型の胎仔と比較して、E6.5 では縮小し始め、E7.5~E8.5 では縮小が進行して、E9.5 で死に至ることが示された (図 2)。

(3) CIBZ ヘテロ欠損胎仔の表現型の原因解明

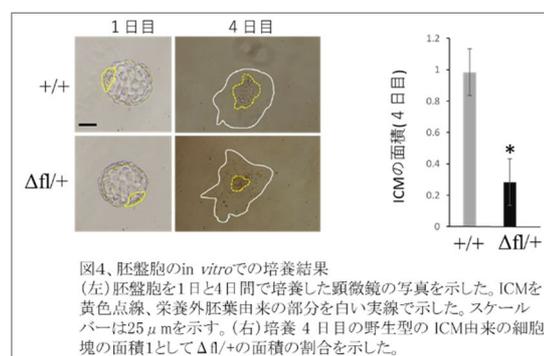
細胞増殖の低下もしくは細胞死の亢進は CIBZ のヘテロ欠損による胎仔の異常をきたす原因である可能性が考えられる。細胞増殖を検証するために、増殖中の全周期で発現する Ki67 と、G1 期から S 期に移行する増殖細胞のみを特異的に検出する BrdU という二つの細胞増殖マーカーを用いて免疫組織蛍光染色を行った。その結果、E6.5~E8.5 の胎仔において、Ki67 陽性細胞の割合は $\Delta fl/+$ と野生型の胎仔では有意な差がなかったが、 $\Delta fl/+$ 胎仔の BrdU 陽性細胞の割合は野生型の胎仔より有意に低下した (図 3 上)。これらのことから、CIBZ のヘテロ欠損による胎仔の形態異常の原因の一つは、G1 期から S 期への移行阻害による胎仔細胞の増殖低下であることが分かった。



CIBZ のヘテロ欠損による細胞死が亢進するかを検証するため、抗 cleaved Caspase-3 抗体を用いる組織免疫染色法と、細胞死を特異的に検出する TUNEL 法を行った。その結果、いずれの方法においても、E6.5~E8.5 の $\Delta fl/+$ 胎仔の死細胞の割合は野生型の胎仔より有意に低下していること (図 3 下) が分かった。他の遺伝型 ($fl/+$ と Cre) の胎仔における死細胞の割合は野生型と有意な差はなかった。これらのことから、CIBZ のヘテロ欠損による胎仔の異常はアポトーシスの亢進も原因の一つであることが分かった。

(4) CIBZ のヘテロ欠損が胚盤胞の発生に与える影響

CIBZ の発現が胚盤胞の発生に与える影響を調べるため、 $fl/+$ マウスと Cre マウスとの交配により摘出した 2 細胞期胚を M16 培地による 3 日間の培養で形成した胚盤胞の解析を行った。その結果、遺伝型の違い (+/+, Cre, $fl/+$, $\Delta fl/+$) による形態的な変化は観察されなかった。しかし、胚盤胞の着床を模倣する方法として胚盤胞を ES 細胞培地で *in vitro* で培養して解析を行った。その結果、培養 4 日目の胚盤胞では CIBZ の $\Delta fl/+$ 胚は野生型と比較して、胎仔個体の形成に



寄与する内部細胞塊 (ICM) 由来の部分の有意な縮小と cleaved caspase-3 の発現上昇が示されたが、胎盤の形成に寄与する栄養外胚葉由来の部分に関しては、その大きさと cleaved caspase-3 の発現上昇が確認されなかった (図 4)。以上のことから、CIBZ の発現は 2 細胞期胚から胚盤胞までの胚発生には必要ないが、胚盤胞の ICM の発生に重要であることが強く示唆された。

(5) CIBZ のヘテロ欠損 ES 細胞の樹立と解析

CIBZ のヘテロ欠損が ICM の発生にどのような影響を与えるかを調べるため、胚盤胞の ICM から ES 細胞株の樹立と解析を試みた。CIBZ の fl/+ マウスと Cre マウスの交配により得られた胚盤胞をフィーダー細胞上で数回継代培養を行うことによって 3 種類の ES 細胞株 (+/+、fl/+ と Δfl/+) を樹立した。定量 PCR と Western blotting で調べた結果、Δfl/+ の ES 細胞での CIBZ の発現 (mRNA とタンパク質) は野生型や fl/+ の ES 細胞より 1/2 に低下した。樹立した 3 種類の ES 細胞は未分化な ES 細胞の特徴 (境界が明瞭な丸い輪郭) が観察され、未分化性マーカー (ALP と Oct3/4) の発現に顕著な差はなかった。一方で、異なる ES 細胞の未分化マーカー (Nanog と Sox2) の発現は Δfl/+ の ES 細胞では低下したことから、CIBZ のヘテロ欠損 ES 細胞は未分化性が維持されるが分化に傾きやすいことが示唆された。

<引用文献>

Sasai N, Matsuda E, Sarashina E, Ishida Y, Kawaichi M. Identification of a novel BTB-zinc finger transcriptional repressor, CIBZ, that interacts with CtBP corepressor. *Genes Cells*. 10:871-885, 2005.

Oikawa Y, Matsuda E, Nishii T, Ishida Y, Kawaichi M. Down-regulation of CIBZ, a novel substrate of caspase-3, induces apoptosis. *J Biol Chem*. 283:14242-14247, 2008.

Nishii T, Oikawa Y, Ishida Y, Kawaichi M, Matsuda E. CtBP-interacting BTB zinc finger protein (CIBZ) promotes proliferation and G1/S transition in embryonic stem cells via Nanog. *J Biol Chem*. 287:12417-12424, 2012.

Kotoku T, Kosaka K, Nishio M, Ishida Y, Kawaichi M, Matsuda E. CIBZ Regulates Mesodermal and Cardiac Differentiation of by Suppressing T and Mesp1 Expression in Mouse Embryonic Stem Cells. *Sci Rep*. 6:34188, 2016.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----