

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08513

研究課題名(和文) マウス個体発生におけるPtch1とXIAPによる細胞死抑制メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism of cell death suppression by Ptch1 and XIAP during mouse embryogenesis

研究代表者

青戸 一司 (aoto, kazushi)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：60360476

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)：マウス個体発生におけるPtch1のC末端と、結合タンパク質XIAPなどによる細胞死抑制機構の生理的役割の解明を目的として、Ptch1-CのXIAP結合部位の変異マウスを作製したが表現型は観察されなかった。しかしながら、i-GONAD法を用いて、Ptch1のC末に2xHAタグを挿入したマウスを作製し、Ptch1の局在変化を観察したところ、HA抗体により線毛での局在変化を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヘッジホッグシグナルの受容体Ptch1は、奇形と高発癌性の基底細胞母斑症候群(ゴーリン症候群)の原因遺伝子である。本研究は、奇形発症の機序を理解する助けとなるだけでなく、Ptch1機能欠失による発癌の抑制を行える可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：To analyze physiological function of inhibiting cell death by Ptch1-XIAP association, we generated mutant mice of XIAP binding site with Ptch1 C terminus. But that Ptch1-dIBS mice did not show any phenotype. However, We also generated knock-in mice of two HA tag (2xHA) in Ptch1 C terminal, which are able to observe Ptch1-2xHA localization in cilia.

研究分野：発生学

キーワード：ソニックヘッジホッグ(Shh)シグナル伝達経路 patched1 脳神経管の細胞死抑制 CRISPR-Cas9法 GONAD法 XIAP エレクトロポレーション 繊毛

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ソニックヘッジホッグ(Shh)シグナル伝達経路の受容体 Patched1(*Ptch1*)の機能異常は、ヒト先天性異常と密接に関わっており、Shh シグナル亢進を示す基底細胞母斑症候群 (Gorlin 症候群) と、Shh シグナル抑制を示す全前脳症の原因遺伝子である。Gorlin 症候群では細胞死が減少し、高頻度に腫瘍が発生するが、全前脳症では細胞死によって正中構造が消失する。これらのことから、個体発生において、Ptch1 は Shh 依存的に細胞死の調節に関与していると考えられる。

細胞死調節に関わる分子メカニズムとして、Ptch1 は、リガンドがない状態では細胞死を誘導することができる依存性受容体 (dependence receptor)であることが報告されている。Shh 非存在下では、Ptch1 の C 末端 (Ptch1-C) にある細胞死の実行因子 Caspase の切断部位 (Asp1312) が切断されて、脳神経細胞において細胞死を促進する (Thibert, *Science*, 2004, Mille, *Nature Cell Biol.*, 2009)。しかしながら、Shh 存在下に、Ptch1 を介した細胞死の抑制に関わる分子の全体像は不明なままである。

これまで、Shh シグナル伝達経路の変異マウス (Shh, Ptch1, Gli3) の解析を通して、顎顔面・脳神経の発生における Shh シグナリングの役割を解析してきた (*Dev Biol.* 2009, *Birth Defects Res Part A: Clin and Mol Tera.* 2008, *Dev. Biol.* 2002)。更に、Ptch1-C と相互作用するタンパク質についてプロテオーム解析を行い、Ptch1-C に特異的に結合する分子を多数単離・同定した (*Hum Mol Genet* 2015)。中でも、Shh シグナルの直接の標的でもある X-linked inhibitor of apoptosis protein(XIAP) に注目し、Ptch1-C の XIAP 結合部位 (IBS; IAP binding site) (図1の矢印) を介して、Shh 存在下で Ptch1 と結合し、Shh 非存在下では分離することで細胞死を調節していることを明らかにした (*Hum. Mol. Genet.*, 2015)。

また、細胞培養の系を用いて、Ptch1 と XIAP の結合、および Ptch1-C の Caspase による切断が細胞表面の繊毛で起こることも確認した。Shh シグナルの主要分子はすべて繊毛に局在することが報告されている。

さらに、マウス胚の培養系で、XIAP の阻害剤 (Embellen) の添加によって前脳の正中中部で細胞死が起こり、全前脳症様の表現型を示すことを明らかにした (*Hum. Mol. Genet.*, 2015)。

この研究をさらに発展させ、マウス個体発生において、XIAP によって調節される Ptch1-C を介した細胞死抑制機構の生理的役割とその分子メカニズムを明らかにする。

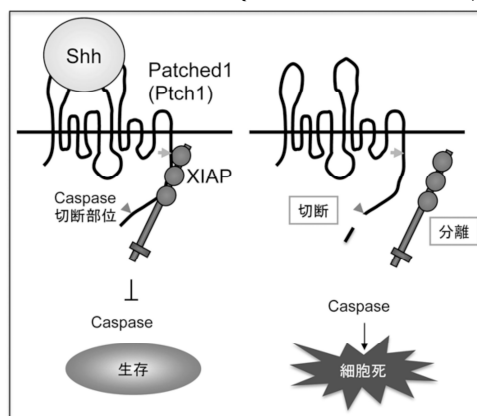


図1 : Ptch1 と XIAP の細胞死制御モデル

2. 研究の目的

本研究では、マウス個体発生における Patched1 (Ptch1) の C 末端と、結合タンパク質 X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) などによる細胞死抑制機構の生理的役割の解明を目的とする。具体的には、1) CRISPR-Cas9 法によって Ptch1-C の XIAP 結合部位の変異マウスを作製し、個体発生における Ptch1-XIAP による細胞死抑制の生理的役割とその分子メカニズムを解明する、2) Ptch1 と XIAP へのタグノックインマウスを作製し、Ptch1 と XIAP の繊毛での局在変化を明らかにする。

3. 研究の方法

マウス個体発生において Ptch1 / XIAP の細胞死調節機構の生理的役割を明らかにするため、CRISPR-Cas9 ゲノム編集法を用いて、Ptch1-C の XIAP 結合部位の変異マウスを作製する。このマウスで起こると思われる細胞死をさらに Caspase 切断部位を変異させることによって細胞死から保護できるかどうかを試みる。これまでに Ptch1-C と XIAP が繊毛で共同在することを明らかにしており (*Hum. Mol. Genet.*, 2015)、タグをノックインしたイメージングマウスを作り局在変化を観察する。さらに、Ptch1 と XIAP の結合・分離に働く分子を同定することによって、Ptch1 / XIAP による細胞死調節に関わる分子メカニズムの全貌を明らかにする。

CRISPR-Cas9 ゲノム編集法を用いて、短期間で、安い費用で (1 系統 5 万円以下) 変異体マウスを作製する。既にエレクトロポレーションによるマウス個体の受精卵へ CRISPR-Cas9 を導入するシステムを整備した。この方法を用いて 25% の確率でホモノックインマウスを作製できていることから、Ptch1-C 変異体マウスも短期間で作製可能である。

(1) Ptch1-C の XIAP 結合部位の変異マウスの作製

個体発生における XIAP によって調節される Ptch1 の細胞死制御機構を明らかにするために、Ptch1-C の XIAP 結合部位 (Ala-Val-Pro-Pro の 4 アミノ酸) を除去した変異マウスを CRISPR-Cas9 のエレクトロポレーション法によって作製する。妊娠確定日の 0.5 日齢で採卵した ICR の

受精卵をCas9 タンパク質、guide RNA、一本鎖オリゴ (single-strand oligonucleotides、ssODNs) の3種混合溶液で満たした1mm gap の電極間に入れて、NEPA21(ネッパジン)を用いてスーパーエレクトロポレーションを行う。1日培養後、2細胞期に発生が進んだ卵を選別し、偽妊娠用雌マウスの卵管に戻し変異マウスを得る。ssODNs には、XIAP 結合配列を取り除いたXIAP 結合部位の隣接領域と相同配列をもつ120塩基を用いる。Founder マウスのサンガーシークエンスを行い、目的の変異を有するマウスを選別する。次世代以降のマウスの遺伝子型判定は、ヒト遺伝子解析で用いられる高解像度融解曲線分析法 (High Resolution Melting 法)、あるいはPCR 産物のT7 エンドヌクレアーゼ1(T7E1)による切断後のポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて行う。

(2) Ptch1-C のXIAP 結合部位の変異マウスの形態形成及び細胞死の観察

作出したPtch1-C のXIAP 結合部位の変異マウスの表現型解析を行う。形態形成の異常を明らかにするために、実体顕微鏡を用いた形態観察・撮影、骨軟骨、筋腱、軟組織の観察が行えるマイクロCT 撮影、骨軟骨染色を行う。また、発生期に異常が観察できる場合は、免疫染色、in situ hybridization 法を用いて、Shh シグナル分子、脳神経管形成に関わる標的遺伝子の発現を確認する。更にPtch1-C と関連した細胞死を明らかにするために、一般的な細胞死を検出できるCleaved caspase3 の抗体染色及びTUNEL 法と、ミトコンドリア経路の細胞死を特定できるCleaved caspase9、Cytochrome C の抗体染色と、ウェスタンブロットで発現の比較を行う。

(3) XIAP 結合部位変異マウスの細胞死の抑制

作出したXIAP 結合部位変異マウスは、XIAP による細胞死抑制機構が働かず、Ptch1-C がCaspaseによって切断を受けて細胞死を促進すると考えられる。そこで、Caspase 切断部位との二重変異体マウス (Asp1312Asn) を作製し、XIAP による細胞死抑制が、Caspase によるPtch1-C の切断抑制を介した作用であるかを確認する。

(4) 細胞生存に伴うPtch1 の繊毛でのイメージングマウスの作製

Ptch1 はヘッジホッグシグナル伝達経路の活性化・不活性化に依存して、細胞表面の繊毛での局在を大きく変えることが報告されている (Rahatgi, Science, 2007)。また、申請者は、培養細胞を用いて、Ptch1-C とXIAP が繊毛で共局在することを明らかにした (Human Mol Genet, 2015)。これらのことから、マウス個体の細胞死調節においても、Ptch1 とXIAP は繊毛で局在を変えることが予想される。そこで、CRISPR-Cas9 ゲノム編集法を用いて、Ptch1 のN末端にFlag タグを挿入したノックインマウス (Flag-Ptch1) と、XIAP のN末端にHA タグを挿入したノックインマウス (HA-XIAP) を作製する。これらのマウスを用いて、Ptch1 とXIAP の繊毛での局在観察、細胞生死、ヘッジホッグシグナルの活性化・不活性化の解析が可能となる。

(5) 細胞生存に伴うPtch1 とXIAP の結合・分離に働く分子の同定

Ptch1 のN末端にFlag タグを挿入したノックインマウス (Flag-Ptch1) 或いは、Flag タグのPtch1-C のみ (Flag-Ptch1-C) を発現したマウス神経芽細胞株 (Neuro2a) から抗Flag 抗体を用いて、Ptch1 に結合するタンパク質複合体を免疫沈降し、プロテオミックスによって同定する。Flag-Ptch1 の野生型と、XIAP 結合部位の変異型のプロテオミックスの結果を比べることによって、Ptch1 とXIAP の細胞死調節機構に関わる分子を特定する。

(6) Ptch1/XIAP と同定した分子による細胞生存調節機構を探る

Ptch1/XIAP と同定した分子との関係を明らかにするために、細胞やマウス個体 (Flag-Ptch1、HA-XIAP) での免疫染色による共発現の観察を行う。また、分子間の相互作用機序を確認するために、培養細胞からのライセートを用いて免疫沈降法による生化学的解析を行う。

(7) Ptch1-C の変異マウスでの腫瘍形成

Ptch1 ヘテロマウスでは、Gorlin 症候群と同様に、30%の個体で脳腫瘍、皮膚癌などが多発する。一般に細胞の生死と腫瘍形成は関連することから、作製したPtch1-C の変異マウスでも腫瘍形成の頻度が変化するかどうかを観察する。発生した腫瘍組織でShh シグナルが亢進しているかどうか、細胞死関連因子の発現が変化しているかどうかをqPCR、ウェスタンブロットティングで調べる。

4. 研究成果

(1) Ptch1-C のXIAP 結合部位の変異マウスの作製

マウス受精卵へin vitroエレクトロポレーションによって、CRISPR-Cas9薬剤と一本鎖オリゴドナーDNA(ssODN)を導入し、1日培養後に、2細胞期に発生した卵を仮親のレシピエントマウスの卵管へ戻してやった (図2A)。変異が入っているかどうかを、領域特異的なプライマーセット

(Ptch1-dIBS-F/R)、ダイレクトシーケンシングによって12塩基の欠失 (Ala-Val-Pro-Proアミノ酸相当)を確認した(図2B)。

(2-3, 7) Ptch1-C の変異マウスの形態形成、細胞死の観察、腫瘍形成

作製したマウスを交配してホモ変異マウス (*Ptch1*^{dIBS/dIBS}) を作製した。2年を超えて観察を行ったが、マウスの外観や切片による脳の形態異常は観察されず、野生型と比較した生存割合も変化がなく、腫瘍形成も観察されなかった。また、この*Ptch1*^{dIBS/dIBS}マウスは、雄雌ともに野生型マウスと交配可能で、産子数の異常も観察されなかった。このことから、Ptch1のC末のIBSはマウス個体ではXIAPとの結合には必須ではないと考えられる。

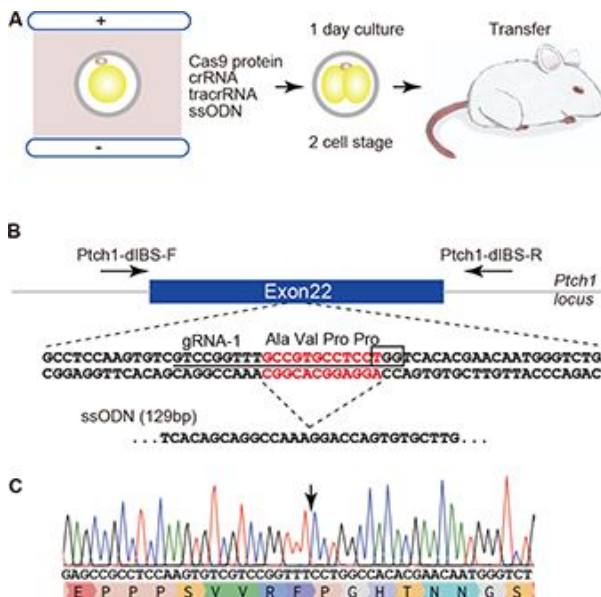


図2:Ptch1-dIBSマウスの作製結果

(4-6) 細胞生存に伴うPtch1 の繊毛でのイメージングマウスの作製

Ptch1^{dIBS/dIBS} と並行して、Ptch1 のでの繊毛での局在をマウス個体での観察するためのイメージングマウス (*Ptch1*^{2xHA}) の作製をおこなった。このマウスの作製法として、妊娠が確定した雌マウスの卵管膨大部に CRISPR-Cas9 の溶液を注入し、エレクトロポレーションによって受精卵のゲノムに変異を与える方法 (GONAD 法) を用いた (図3A)。これまでこの方法で 50 系統以上の変異マウス作製ができた。

同様な方法で、Ptch1 の C 末端への 2xHA タグ挿入マウス (*Ptch1*-2xHA) の作製を試みた。作製後、変異が入っているかどうかを、領域特異的なプライマーセット (Ptch1-check-F/R)、ダイレクトシーケンシングによって 2xHA の挿入、を確認した (図3B、3C、3D)。

更にこのマウス胚からマウス胎児線維芽細胞 (MEF) を樹立して、細胞免疫染色法により繊毛での Ptch1-2xHA の局在を観察した (図4)。細胞免疫染色の結果、Ptch1-2xHA タンパク質は、繊毛のマーカー Acetylated-tubulin と共局在を示した。この結果は、Ptch1-2xHA がこれまで報告されている局在を示している。

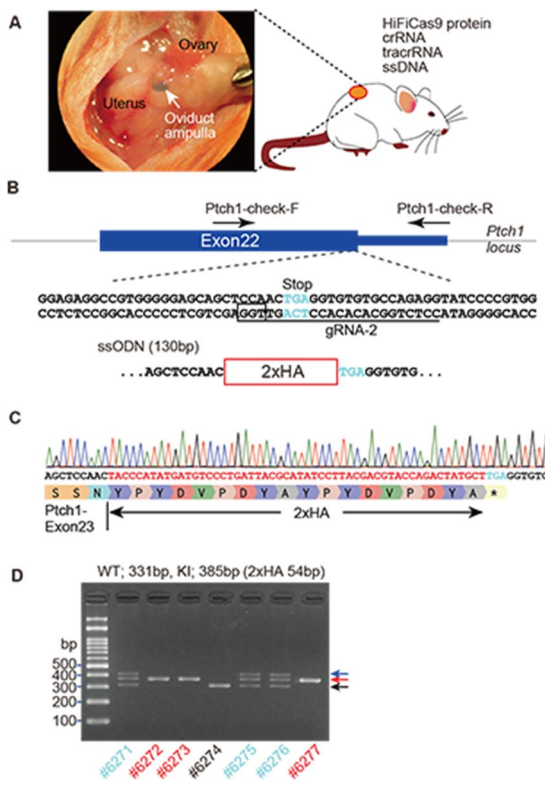


図3:Ptch1-2xHA マウスの作製結果

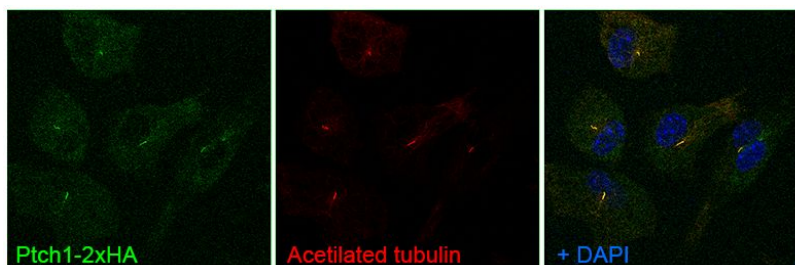


図4:Ptch1-2xHA の繊毛での局在

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Miyamoto Sachiko, Aoto Kazushi, Hiraide Takuya, Nakashima Mitsuko, Takabayashi Shuji, Saitsu Hirotomo	4. 巻 -
2. 論文標題 Nanopore sequencing reveals a structural alteration of mirror image duplicated genes in a genome editing mouse line	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Congenital Anomalies	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cga.12364	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Takabayashi Shuji, Aoshima Takuya, Kabashima Katsuya, Aoto Kazushi, Ohtsuka Masato, Sato Masahiro	4. 巻 8
2. 論文標題 i-GONAD (improved genome-editing via oviductal nucleic acids delivery), a convenient in vivo tool to produce genome-edited rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12059
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-30137-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Belal Hazrat, Nakashima Mitsuko, Matsumoto Hiroshi, Yokochi Kenji, Taniguchi-Ikeda Mariko, Aoto Kazushi, Amin Mohammed Badrul, Maruyama Azusa, Nagase Hiroaki, Mizuguchi Takeshi, Miyatake Satoko, Miyake Noriko, Iijima Kazumoto, Nonoyama Shigeaki, Matsumoto Naomichi, Saitsu Hirotomo	4. 巻 39
2. 論文標題 De novo variants in RHOBTB2, an atypical Rho GTPase gene, cause epileptic encephalopathy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Human Mutation	6. 最初と最後の頁 1070 ~ 1075
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/humu.23550	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakashima M, Kato M, Aoto K, Shiina M, Belal H, Mukaida S, Kumada S, Sato A, Zerem A, Lerman-Sagie T, Lev D, Leong HY, Tsurusaki Y, Mizuguchi T, Miyatake S, Miyake N, Ogata K, Saitsu H, Matsumoto N.	4. 巻 83
2. 論文標題 De novo hotspot variants in CYFIP2 cause early-onset epileptic encephalopathy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Ann Neurol.	6. 最初と最後の頁 794-806
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ana.25208.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mutoh H, Kato M, Akita T, Shibata T, Wakamoto H, Ikeda H, Kitaura H, Aoto K, Nakashima M, Wang T, Ohba C, Miyatake S, Miyake N, Kakita A, Miyake K, Fukuda A, Matsumoto N, Saitu H.	4. 巻 102
2. 論文標題 Biallelic Variants in CNPY3, Encoding an Endoplasmic Reticulum Chaperone, Cause Early-Onset Epileptic Encephalopathy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Am J Hum Genet.	6. 最初と最後の頁 321-329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajhg.2018.01.004.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Akita Tenpei, Aoto Kazushi, Kato Mitsuhiro, Shiina Masaaki, Mutoh Hiroki, Nakashima Mitsuko, Kuki Ichiro, Okazaki Shin, Magara Shinichi, Shiihara Takashi, Yokochi Kenji, Aiba Kaori, Tohyama Jun, Ohba Chihiro, Miyatake Satoko, Miyake Noriko, Ogata Kazuhiro, Fukuda Atsuo, Matsumoto Naomichi, Saitu Hiroto	4. 巻 5
2. 論文標題 De novo variants in CAMK2A and CAMK2B cause neurodevelopmental disorders	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Annals of Clinical and Translational Neurology	6. 最初と最後の頁 280 ~ 296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/acn3.528	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hiraide Takuya, Nakashima Mitsuko, Yamoto Kaori, Fukuda Tokiko, Kato Mitsuhiro, Ikeda Hiroko, Sugie Yoko, Aoto Kazushi, Kaname Tadashi, Nakabayashi Kazuhiko, Ogata Tsutomu, Matsumoto Naomichi, Saitu Hiroto	4. 巻 137
2. 論文標題 De novo variants in SETD1B are associated with intellectual disability, epilepsy and autism	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Human Genetics	6. 最初と最後の頁 95 ~ 104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00439-017-1863-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 青戸一司、高林秀次、宮崎岳大、才津浩智
2. 発表標題 GONAD法を用いたゲノム編集スマールタグノックインマウス作製による脳・顔面発生の解析：標的特異抗体の不必要の方法
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青戸一司、高林秀次、宮崎岳大、才津浩智
2. 発表標題 GONAD法を用いたスモールタグノックインマウスの作製とその応用
3. 学会等名 第4回ゲノム編集学会
4. 発表年 2019年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------