

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14615

研究課題名(和文) マウスES細胞の神経分化抵抗性に関する新規遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of the novel gene involved in neuronal differentiation resistance in mouse ES cells

研究代表者

吉田 純子 (Yoshida, Junko)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：30769196

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：変異に伴いマウスES細胞の神経分化に異常をきたす機能未知のzinc finger protein (Zfp) 遺伝子を同定し、その分子メカニズムとマウス胎児個体における機能について調べた。質量分析により、本Zfp遺伝子産物が別のZfp遺伝子産物やNuRD複合体と相互作用することが示唆された。また、神経分化誘導時の経時的な1細胞RNA-seqの結果から、野生型と本Zfp遺伝子の破壊株で、ES細胞の未分化維持に重要なOct4の発現変動に大きく差があることがわかった。マウス胎児個体の解析では、本Zfp遺伝子を破壊したマウスの脳の6層構造に異常がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトiPS細胞を用いた再生医療が現実のものとなってきた。しかし、ヒトiPS細胞からの神経分化誘導については、多くの時間を要するのが現状である。我々が同定したZfp遺伝子は過去に機能的報告のない新規遺伝子であるため、本Zfp遺伝子の強制発現による神経分化誘導は、単に神経分化誘導を加速化させるだけでなく、従来の神経分化誘導法とは異なるパスウェイで作用する可能性が高い。本Zfp遺伝子にはヒトのホモログが存在するため、このホモログを用いた神経分化誘導系は、将来的に再生医療へ応用できる可能性がある。さらには、他の系譜の体細胞から神経細胞へのdirect reprogrammingへの応用も期待される。

研究成果の概要(英文)：We identified a novel zinc finger protein (Zfp) gene with an unknown function that, when mutated, causes abnormalities in the neural differentiation of mouse ES cells, and investigated its molecular mechanism and function in individual mouse fetuses. Mass spectrometry suggested that this Zfp gene product interacts with other Zfp gene products and NuRD complexes. Furthermore, single-cell RNA-seq analysis during neural differentiation of ES cells revealed that the expression pattern of Oct4, a gene essential for maintaining ES cell pluripotency, differs significantly between the wild-type and the Zfp mutant cells. Analysis of fetal mice revealed that disruption of this Zfp gene causes abnormalities in the six-layer structure of the brain.

研究分野：分子生物学、実験動物学、幹細胞生物学

キーワード：神経分化異常 zinc finger protein 順遺伝学 神経デフォルトモデル ES細胞 細胞分化 分化抵抗性 1細胞解析

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。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 幹細胞の新規メカニズム探索の必要性和順遺伝学的手法について

iPS 細胞の実用化に向けて、様々な組織や臓器を作製するための研究が盛んに行われているが、現段階では作製効率も安全性も未だ十分とはいえない。この状況を打開するには、ES/iPS 細胞の未分化維持や分化の運命決定に関わる新規分子メカニズムを理解することが必要である。その際に非常に有効な手段として順遺伝学的方法が挙げられる。順遺伝学的方法では、まず初めにランダムに遺伝子を破壊した株を多数作製し、その中から、表現型をもとにスクリーニングを行い、その後どの遺伝子に変異が存在していたかを同定する。この方法では、遺伝子破壊に研究者の恣意が介入しないため、予想しないまったく新しい遺伝子機能の手掛かりが得られる可能性が大きい。

そこで我々は、ES 細胞において順遺伝学的に網羅的遺伝子スクリーニングを可能にすべく、gene trap ベクターを用いた「両アレル変異マウス ES 細胞ライブラリー」を構築した (Horie, Kokubu, [Yoshida et al. Nature Methods 8:1071, 2011](#))。このライブラリーをスクリーニングすることで、既に強い分化抵抗性を示すことが報告されているポリコム複合体の一つの Eed や、MAP キナーゼ経路を構成する Grb2 及び Ptpn11 と匹敵する強さの分化抵抗性を示す新規 zinc finger protein (Zfp) 遺伝子を同定した。

(2) 新規 zinc finger protein (Zfp) 遺伝子の生理機能探索の意義

本 Zfp 遺伝子の破壊株と過剰発現株を作製して様々な系譜へ分化誘導したところ、破壊株では特に神経分化マーカーの発現が遅れ、驚いたことに胎盤分化マーカーの上昇を認めた。逆に、過剰発現株では神経分化マーカーの発現上昇が早まった。よって、本 Zfp 遺伝子は胚発生の初期において、胎盤への分化を抑制し神経分化を誘導すると考えられる。哺乳類の初期胚発生において、最初の細胞系譜の分岐点は、胎盤方向もしくは embryo 方向のどちらに分化するかが決定される点である。本 Zfp 遺伝子の研究は、受精後の発生過程で如何にして細胞系譜の非対称性が生じるかという、学術的な重要な問いに答えるための糸口になると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「破壊することで神経分化抵抗性の表現型を呈する新規遺伝子 Zfp 遺伝子の機能を明らかにすること」である。ES 細胞や内部細胞塊は、外部からの刺激因子を受けない場合は神経細胞に分化することが知られており、「神経デフォルトモデル」と呼ばれている。しかし、その分子メカニズムの詳細は不明であり、Zfp521 (Kamiya D et al. *Nature* 470:503, 2011) などの極少数の制御因子の報告にとどまる。本 Zfp 遺伝子の過剰発現株では神経分化マーカーの発現上昇が早まり破壊株では胎盤分化マーカーが発現すること、本 Zfp 遺伝子が未分化 ES 細胞で高発現なことを合わせて考えると、本 Zfp 遺伝子は、長らく本体が不明であった「神経デフォルトモデル」を担う分子である可能性が示唆されるので、この可能性についても検証していく。

3. 研究の方法

(1) 分子メカニズムの解明

① 質量分析による本 Zfp 遺伝子と相互作用する因子の探索

質量分析法により、本 Zfp 遺伝子と相互作用する分子を同定する。Flag-tag 付きの Zfp 遺伝子の過剰発現株を用いて、抗 Flag 抗体にて質量分析を行う。質量分析で同定した分子については、それらをさらに過剰発現または発現阻害することにより、機能的に重要な分子を特定し、本 Zfp 遺伝子が規定する分化プログラムを明らかにする。

② RNA-Seq による神経分化誘導時の本 Zfp 遺伝子発現ネットワーク解析

未分化状態および神経分化誘導後での Zfp 遺伝子破壊株、過剰発現株、野生型 ES 細胞の RNA-Seq を行い、主成分分析などを行うことで、分化誘導時に動く背後のネットワークを探索していく。

(2) マウスの個体 (胎児) での機能解析

① 本 Zfp 遺伝子のホモ変異マウスの全身での表現型解析

我々は CRISPR/Cas9 システムを利用して 2 系統のヘテロ変異マウスを樹立した。交配によりホモ変異マウスを得たところ、生後 24 時間以内に死亡することがわかった。この死因を特定するために、胎生 18.5 日での全身の組織および胎盤の HE 染色による解析を行う。

② 本 Zfp 遺伝子のホモ変異マウスの神経組織解析

出産後早期に死亡するマウスは、神経系に欠陥があるケースが多数報告されている。そこで、まず脳のニッスル染色および免疫染色により、脳の組織解析を行う。

4. 研究成果

(1) 分子メカニズムの解明

① 質量分析による本 Zfp 遺伝子と相互作用する因子の探索

Flag-tag 付きの Zfp 遺伝子の過剰発現株を用いて、抗 Flag 抗体にて質量分析を行った結果、NuRD 複合体を形成する分子群との相互作用が認められた。NuRD 複合体は ES 細胞の分化の際に重要な機能を果たす分子であることが知られている。また NuRD 複合体以外に、本 Zfp 遺伝子が別の Zfp 遺伝子と強く相互作用していることが示唆された。そのため、CRISPR/Cas9 を用いてこれらの Zfp 遺伝子を両方とも破壊したところ、本 Zfp 遺伝子の単独破壊よりもさらに強い神経分化抵抗性を呈した。このことから、これら 2 つの Zfp 遺伝子が機能的な複合体を形成している可能性が示唆された。今後は、これら 2 つの Zfp 遺伝子によって形成される複合体と NuRD 複合体の関係およびその機能について、詳細に解析していく予定である。

② RNA-Seq による神経分化誘導時の本 Zfp 遺伝子発現ネットワーク解析

まず、未分化状態および神経分化誘導後の Zfp 遺伝子破壊株、過剰発現株、野生型 ES 細胞の bulk の RNA-seq を行った。Zfp 遺伝子と共に発現量が変動する遺伝子群を解析したところ、脳の発生に必要なことが知られている遺伝子や、神経疾患の原因遺伝子の可能性が示唆されている遺伝子などが同定された。しかし bulk の RNA-seq では、神経以外に分化した細胞集団も混在するため結果が明瞭ではなく、情報解析において予想以上に苦慮した。

そこで、我々は Zfp 遺伝子破壊株および野生型マウス ES 細胞の神経分化誘導時の経時的な 1 細胞 RNA-seq (分化誘導 Day0、Day5、Day7、Day14) を行った。これらの情報解析を行い、Trajectory 解析と擬似時間解析を行った結果、Zfp 遺伝子の破壊株では神経分化マーカーの発現が遅延することがわかった。また、Trajectory 解析において、未分化状態を維持するのに重要な役割を果たす Oct4 の発現変動が、Zfp 遺伝子の破壊株と野生型 ES 細胞で大きく異なることがわかり、詳細を解析中である。さらに、クラスタリングの結果から、Zfp 遺伝子破壊株に特異的なクラスタを同定することができた (図 1 のクラスタ 5)。このクラスタのマーカー遺伝子を解析したところ、胎盤で発現している遺伝子がいくつか見られ、Zfp 遺伝子破壊株では神経分化誘導時に一部の細胞集団が胎盤方向へ分化する可能性が示唆された。現在詳細を解析している。

また、文科省・先進ゲノム支援の支援を得て、Zfp 遺伝子破壊株と野生型細胞の分化誘導時の 1 細胞 ATAC-seq を行う機会を得た。現在、1 細胞 RNA-seq との統合解析により哺乳類の最初の細胞系譜の分岐を規定する遺伝子ネットワークの同定を試みている。

(2) マウスの個体 (胎児) での機能解析

① 本 Zfp 遺伝子のホモ変異マウスの全身での表現型解析

18.5 日胚において、全身 (脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、胸腺、腎臓、腸管) と胎盤の組織染色を行い、生まれた直後 (1 日以内) に死亡する原因を探索することを試みたが、野生型マウスと比較して特に変化が見られず、死因を特定するには至らなかった。

② 本 Zfp 遺伝子のホモ変異マウスの神経組織解析

脳のニッスル染色および免疫染色により、脳の組織解析を行ったところ、脳の 6 層構造に異常が見られた。具体的には、Zfp 遺伝子のホモ変異マウスでは、intermediate zone (IZ) が狭く、subventricular zone (SZ) が広い傾向が見られた。しかしまだ検体数が少ないため、今後はさらに検体数を増やして解析し、統計的に有意な差が認められるかを検証していく必要がある。

(3) 本研究の意義

本研究により、当該 Zfp 遺伝子が神経分化に重要な役割を果たしていること、また、この機能を果たすために、NuRD 複合体、別の Zfp 遺伝子、Oct4 と相互作用をすることが重要であることがわかった。今後はこれらの分子と Zfp 遺伝子の関係についてさらに詳細に解析し、1 細胞 RNA-seq 解析と ATAC-seq 解析の統合解析によって哺乳類の最初の細胞系譜の分岐を規定する遺伝子ネットワークの同定を試みる予定である。またマウス胎児脳での機能解析も進めていく予定である。

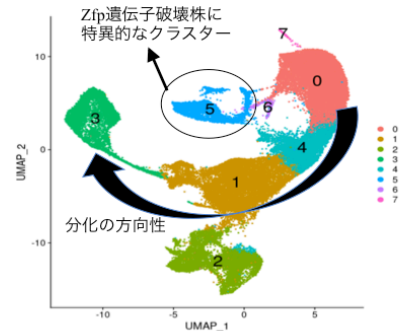


図 1. 1 細胞 RNA-seq のクラスタリング結果

野生型および Zfp 遺伝子破壊株を、神経分化 Day0、5、7、14 の全てでクラスタリングした結果を示す。クラスタ 0、4 が未分化細胞、1 が神経幹細胞、3 が成熟神経細胞である。破壊株はクラスタ 0、4 に多く、分化遅延の表現型が推測された。クラスタ 5 には破壊株を多く認め、詳細を解析中である。

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------