

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06453

研究課題名(和文)多機能因子として哺乳類胚発生を制御するGARP complexの役割

研究課題名(英文)The role of GARP complex as a multi-functional regulator for the mammalian embryogenesis

研究代表者

杉本 道彦 (Sugimoto, Michihiko)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10373317

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内小胞輸送に関わるGARP complexの一つであるVps52を欠損させると、着床直後に致死となる。VPS52と結合するタンパク質をコードする遺伝子を個別に破壊すると、Vps52欠損胚と同様に着床直後に致死となるものがVps52も含めて3種、やや遅れて致死となるものが2種、大幅に遅れて致死になるものが1種であった。着床直後に致死となる変異胚を用いて単一細胞トランスクリプトーム解析を行ったところ、プログラム細胞死の1種であるフェロトーシスに関連する遺伝子の発現に変動が確認された。本研究によりGARP complexがフェロトーシス制御に関わっている可能性を示唆する結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GARP complexは細胞内小胞輸送に関わることが示されているが、その生物学的役割についてはほとんど解明されていない。本研究により、思いがけずGARP complexが哺乳類初期発生過程においてプログラム細胞死の1種であるフェロトーシス制御に関与する可能性を示唆する結果が得られた。フェロトーシスは新しく発見されたプログラム細胞死機構であり、そのメカニズムや生物学的意義は明確ではないが、様々な疾患との関連性や新たな抗がん剤の開発など、医学研究分野でも注目されている。本研究成果はGARP complexそのものの機能解明のみならずフェロトーシス機構を理解する一助となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Vps52 (a gene coding a component of GARP complex) deficient mouse embryos die just after implantation. Knockout mouse embryos deleting each gene coding proteins associating with VPS52 show lethality during embryogenesis, and genes are classified into three groups according to the timing of embryonic lethality; (1) die just after implantation similar to Vps52 deficient embryos (3 genes including Vps52), (2) die 1 day later than Vps52 deficient embryos (2 genes), and die at mid gestation (1 gene). By scRNA-seq analysis with knockout embryos of early lethal mutant mice, we identified that genes relating ferroptosis, one of programmed cell death mechanisms, were affected by deletion of those genes during early embryogenesis. These results suggest GARP complex may regulate the ferroptosis.

研究分野：発生遺伝学、エピジェネティクス、多能性幹細胞

キーワード：マウス 初期発生 細胞内小胞輸送 胚性致死 多能性幹細胞 scRNA-seq

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の発生を制御する新たなメカニズムを突き止める上で、胚性致死の表現型を現す変異マウスを解析することは非常に有効なアプローチである。申請者は、ニューヨークで捕獲された野生マウスより発見された胚性致死変異 *tw5* の責任遺伝子が *Vacuolar Protein Sorting 52* (*Vps52*) であることを突き止めた。*tw5* ホモ胚では着床直後に致死となることから、*Vps52* が哺乳類初期発生制御に関わっていることが明らかとなった (図1)。VPS52 は、VPS51、VPS53、VPS54 と共に Golgi-Associated Retrograde Protein (GARP) complex を形成することが知られており、細胞内においてエンドソームからトランスゴルジネットワークへの小胞輸送経路 (逆行性輸送) に関与することが酵母を用いた研究によって示されているが、多細胞生物において発生を制御する役割を担っていることは全く想定されていなかった。GARP complex を構成する新規因子を探索したところ、Coiled-Coil Domain Containing (CCDC) 132 および Tumor-Suppressing Subtransferable Candidate 1 (TSSC1) を新たに同定した。これら GARP complex 因子それぞれのノックアウトマウスはいずれも胚性致死であるが、致死のタイミングやその表現型より3つのグループに分類できることが判明した。*Vps51*、*Vps53* それぞれを欠失すると、*Vps52* 欠失と同様に着床直後 (受精後 6.5 日) に致死となるのに対し、*Vps54* GeneTrap (機能欠損と同等) は発生中期 (受精後 10.5 日) まで生存し、血管新生異常により致死となる。また、新規に同定した *Ccdc132* ならびに *Tssc1* を欠失すると、先述の2つのグループの間 (受精後 8.5 日) 頃に致死となることがわかった (図2)。ノックアウト胚が致死性の表現型を現す時期にそれぞれの因子が機能すると考えられることから、VPS51、VPS52、VPS53 は着床直後、VPS54 は発生中期、CCDC132、TSSC1 はその中間の時期に発生制御因子として働いていると考えられる。GARP complex の多機能発生制御因子としての役割を解明するためには、これら因子が発生過程の「どの細胞種で」「どのような分子機構に関わっているのか」を網羅的に明らかにすることが必要であった。

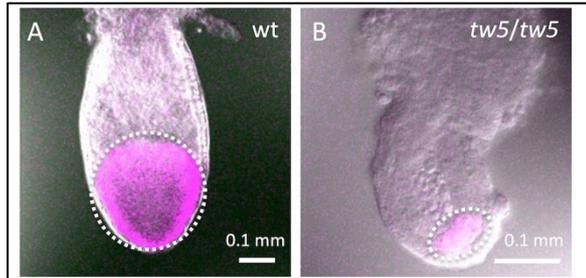


図1. *tw5* ホモ着床直後胚の表現型
野生型E6.5胚 (A) と比較すると、*tw5* ホモE6.5胚 (B) はエピプラスト (白破線円) に発育不全が認められる。

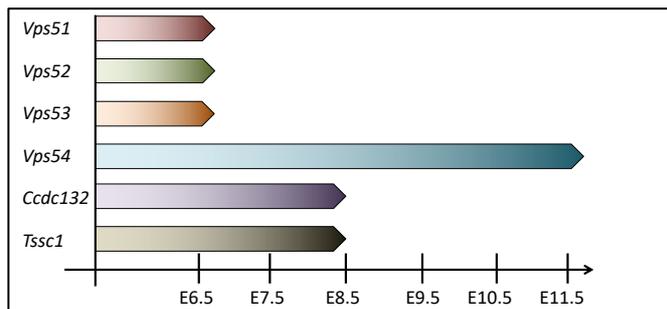


図2. GARP complex構成因子欠損胚が致死になるタイミング
Vps51、*Vps52*、*Vps53*変異胚はE6.5、*Vps54*変異胚はE11.5、*Ccdc132*、*Tssc1*変異胚はE8.0に致死となることがわかった。

2. 研究の目的

本研究は、哺乳類の発生過程において、GARP complex 構成因子がいつ・どの細胞で・どのような分子機構に関わっているのかを解明することで、多機能発生制御因子としてのGARP complex の役割を明らかにすることを目的とする。

GARP complex の機能に関しては、単細胞生物である酵母での研究より細胞内における逆行輸送に関わっていることが示されている程度であり、本研究はGARP complex が哺乳類胚発生を制御するという新たな側面からのアプローチによりその機能解明を目指すという点で、極めて学術的独自性の高い課題と言える。また、GARP complex は酵母から哺乳類・高等植物に至るまで広く保存されており、生命にとって極めて重要な因子であると考えられることから、本研究で得られる成果は、細胞内小胞輸送経路による哺乳類発生制御メカニズムの解明のみならず、あらゆる生命におけるGARP complex の普遍的機能解明の手がかりになる。

3. 研究の方法

申請者が新規に同定した因子も含め、GARP complex 構成因子は6種類ある。これら遺伝子の欠損胚において、致死性表現型が現れる直前・直後の胚におけるトランスクリプトーム解析を行った。欠損胚をまるごとサンプルとして用いた場合、各因子の欠失による細胞種特異的影響を正確に捉えることができないという問題があったため、micro-well sequencing systemを採用しているBD Rhapsodyを用いて単一細胞トランスクリプトーム解析 (single-cell RNA-seq) を行った。限られた予算内で複数サンプルでのscRNA-seqを実施するために、scRNA-seqの低コスト化の技術として、scRNA-seqサンプルのmultiplex化のためのUniversal Surface Biotinylation (USB) 法を開発、更にこれを応用してメタノール固定細胞を用いたmultiplex scRNA-seq技術

を開発し、解析に用いることで初期胚での scRNA-seq 解析を低コストで実施することが可能となった。得られた単一細胞トランスクリプトームデータをもとに、野生型胚と変異型胚の間で発現が変動している遺伝子を抽出した。

4. 研究成果

(1) USB 法の開発

多検体での scRNA-seq を行うにあたり、sample multiplexing はコスト削減とデータ比較の高精度化に有効な手段であるが、既存のキットは高額であるためコスト削減効果は限定的である。そこで、勘弁かつ低コストで実施可能な sample multiplexing 法である

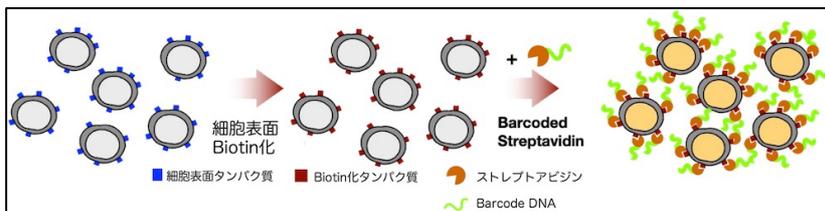


図3. USB法の概略図

細胞表面タンパク質をBiotin化した後、サンプルごとに固有のBarcode DNAを結合させたStreptavidinで処理することにより、あらゆる生物種のあらゆる細胞をBarcode DNAで標識することが可能。

USB 法を考案し、実証実験を行った。USB 法では、細胞表面を市販の Biotin 化試薬で処理した後、Barcode DNA 結合 Streptavidin を反応させることで、細胞表面にサンプル固有の Barcode DNA を付加させた後に、BD Rhapsody を用いて scRNA-seq 解析を行った (図 3)。マウス ES 細胞をモデル細胞として用いて実証実験を行った。既存の sample multiplexing kit は細胞表面抗原に対する抗体を用いた手法であるが、抗原を発現していない細胞の検出には使用できないが、USB 法ではどのような細胞でも検出可能であることを確認した (文献 1)。また、既存の kit はヒト・マウスにしか対応していないのに対し、USB 法はありとあらゆる生物種のすべての細胞に適用可能であることから、極めて有用な新技術であることが確認された。

(2) メタノール固定細胞での scRNA-seq 技術の開発

GARP complex 変異胚は細胞数が少ない着床直後胚期に致死となるため、scRNA-seq を行うためには大量の初期胚を準備する必要がある。しかし、既存のプラットフォームを用いるためには未固定生細胞を用いる必要があるため、現実的には実施困難であった。一方、細胞をメタノールで固定すると細胞質の RNA がある程度流出するものの -80°C で長期保存が可能である。初期胚細胞をメタノール固定後に -80°C で保存し、必要な細胞数をプールした後に解析に用いることができれば、微小初期胚でも既存のプラットフォームを用いて

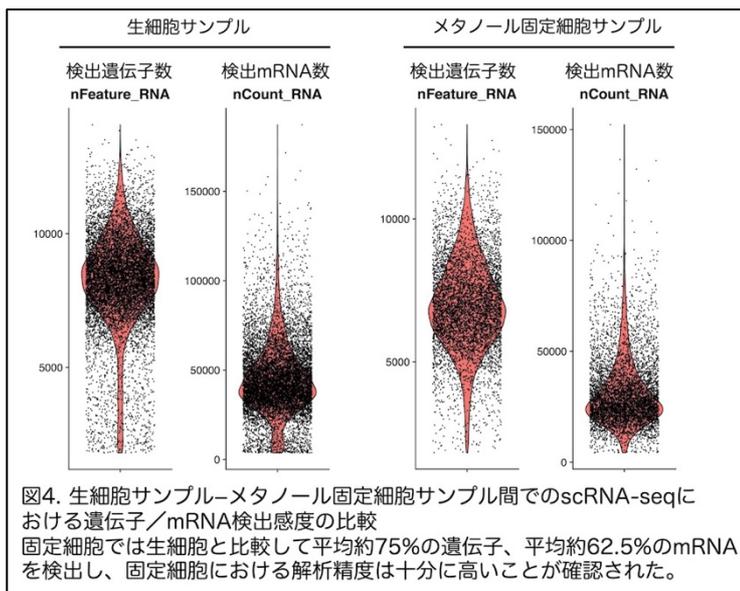


図4. 生細胞サンプル-メタノール固定細胞サンプル間でのscRNA-seqにおける遺伝子/mRNA検出感度の比較

固定細胞では生細胞と比較して平均約75%の遺伝子、平均約62.5%のmRNAを検出し、固定細胞における解析精度は十分に高いことが確認された。

scRNA-seq 解析を実施できると考え、分化誘導 iPS 細胞を用いて実証実験を行った。その結果、生細胞での解析では 1 細胞あたり平均約 8,000 種の遺伝子、平均約 40,000 コピーの mRNA を検出したのに対し、メタノール固定細胞での解析では 1 細胞あたり平均約 6,500 種の遺伝子、平均約 25,000 コピーの mRNA が検出された (図 4)。生細胞データとメタノール固定細胞データで UMAP 解析を行ったところ、両者のプロットは完全に一致した (図 5)。これは、メタノール固定処理によりある程度の RNA が流出するものの、高精度な単一細胞トランスクリプトーム解析が実現できていることを示す。

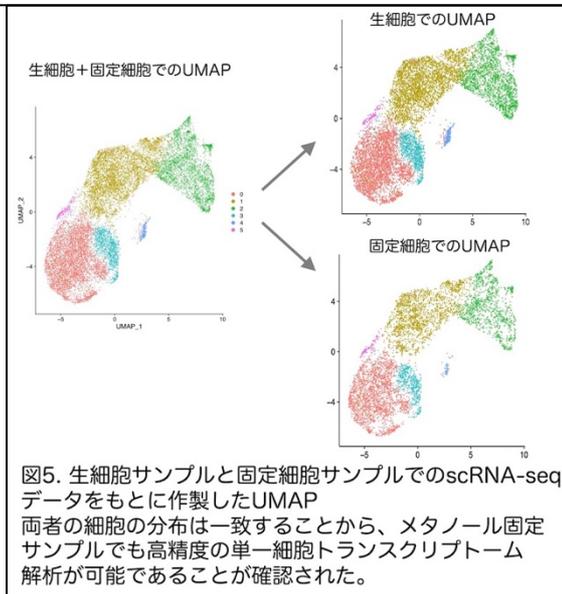


図5. 生細胞サンプルと固定細胞サンプルでのscRNA-seqデータをもとに作製したUMAP

両者の細胞の分布は一致することから、メタノール固定サンプルでも高精度の単一細胞トランスクリプトーム解析が可能であることが確認された。

(3) GARP complex 変異初期胚を用いた scRNA-seq 解析

開発した新技術を用いて、GARP complex の構成因子である *Vps51*, *Vps52*, *Vps53* の変異胚での

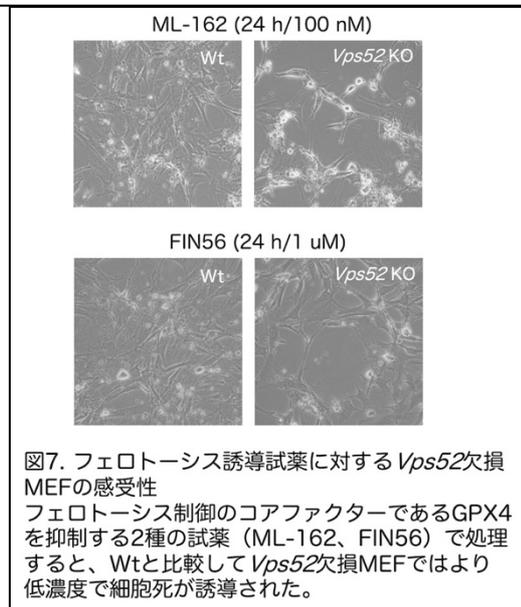
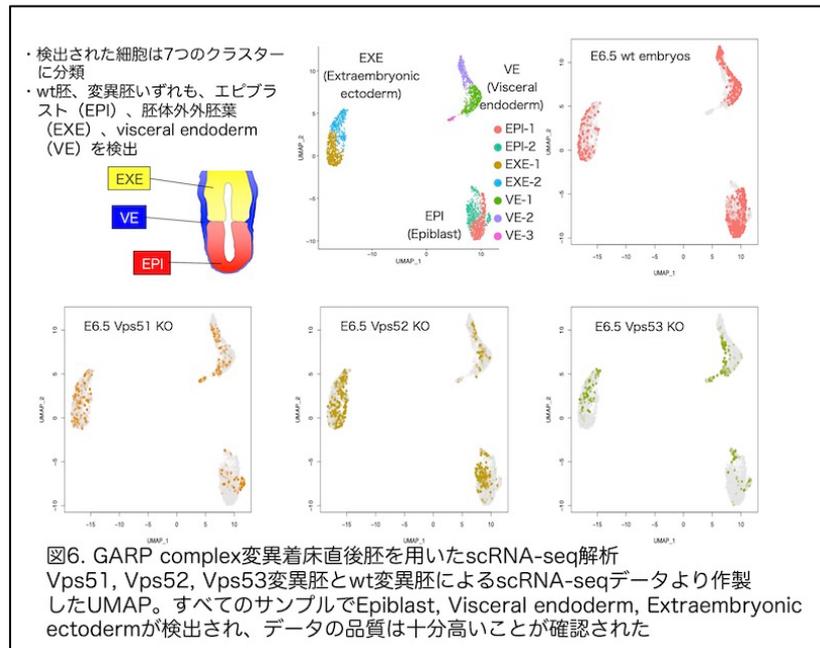
multiplex scRNA-seq を実施し、wt 胚との比較解析を行った (図 6)。着床直後胚を構成する 3 つの組織 (Visceral endoderm, Epiblast, Extraembryonic ectoderm) を明確に検出することができたことから、scRNA-seq 解析の精度が十分に高いことが確認された。細胞種ごとに細胞をグループ分けし、wt 胚と比較して 3 種の変異胚で共通して発現に変動がある遺伝子を抽出したところ、Epiblast と Extraembryonic ectoderm ではほぼ差がなかったのに対し、Visceral endoderm では

11 の変動遺伝子のうち 7 遺伝子がプログラム細胞死の 1 種であるフェロトーシスに関連するものであることがわかった。*Vps52* 欠損 mouse embryonic fibroblast (MEF) を樹立し、フェロトーシス誘導試薬に対する感受性を確認したところ、正常 MEF と比較して変異体 MEF では一部の誘導試薬に対する感受性が高まっていることが確認された (図 7)。これらの結果は、GARP complex は初期発生過程において、Visceral endoderm におけるフェロトーシス抑制制御に関わっている可能性を示唆している。

本研究により、「細胞内小胞輸送制御に関わる GARP complex がフェロトーシスとリンクしている」こと、「哺乳類初期発生過程においてフェロトーシスが影響している」こと、を示唆する結果が得られた。しかし、現時点では GARP complex とフェロトーシスとのつながりを直接的に証明できていないことから、今後の展開として、GARP complex がどのようにしてフェロトーシスを制御しているのかを解明していきたいと考えている。

<引用文献>

- ① Sugimoto et al., Universal Surface Biotinylation: a simple, versatile and cost-effective sample multiplexing method for single-cell RNA-seq analysis. DNA Research. 29(3), dsac017, 2022.



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sugimoto Michihiko, Tada Yuhki, Shichino Shigeyuki, Koyamatsu Saeko, Tsumaki Noriyuki, Abe Kuniya	4. 巻 29
2. 論文標題 Universal Surface Biotinylation: a simple, versatile and cost-effective sample multiplexing method for single-cell RNA-seq analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 DNA Research	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） 10.1093/dnares/dsac017	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 Kamatani Takashi, Hagizawa Hiroki, Yarimitsu Seido, Morioka Miho, Koyamatsu Saeko, Sugimoto Michihiko, Kodama Joe, Yamane Junko, Ishiguro Hiroyuki, Shichino Shigeyuki, Abe Kuniya, Fujibuchi Wataru, Fujie Hiromichi, Kaito Takashi, Tsumaki Noriyuki	4. 巻 284
2. 論文標題 Human iPS cell-derived cartilaginous tissue spatially and functionally replaces nucleus pulposus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomaterials	6. 最初と最後の頁 121491 ~ 121491
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biomaterials.2022.121491	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Michihiko Sugimoto, Yuhki Tada, Kuniya Abe
2. 発表標題 Universal Surface biotinylation (USB): A simple, versatile and cost-effective sample multiplexing method for single-cell RNA-seq analysis
3. 学会等名 35th International Mammalian Genome Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉本道彦、田邊祐喜、七野成之、小屋松冨子、妻木範行、阿部訓也
2. 発表標題 scRNA-seqにおけるサンプルマルチプレックス化のための新規細胞標識法
3. 学会等名 日本遺伝学会第94回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Michihiko Sugimoto, Dooseon Cho, Yuhki Tada, Kuniya Abe
2. 発表標題 Barcoding of MeOH-fixed cells by the USB method for sample multiplexing of scRNA-seq analysis
3. 学会等名 36th International Mammalian Genome Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 杉本道彦、田邇祐喜、趙杜善、阿部訓也
2. 発表標題 メタノール固定細胞を用いたマルチプレックスscRNA-seqのためのUSB細胞標識法
3. 学会等名 日本遺伝学会第95回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 杉本道彦
2. 発表標題 細胞内小胞輸送に関わるVps52の発現制御因子としての機能解明を目指して
3. 学会等名 第33回モロシヌス研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 杉本道彦、田邇祐喜、趙杜善、阿部訓也
2. 発表標題 マルチプレックスscRNA-seq解析のためのUSB細胞標識法～メタノール固定サンプルへの使用例～
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計2件

産業財産権の名称 細胞の標識方法	発明者 杉本道彦、阿部訓也	権利者 理化学研究所
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2023/004476	取得年 2023年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 細胞の標識法	発明者 杉本道彦、阿部訓也	権利者 国立研究開発法人理化学研究所
産業財産権の種類、番号 特許、2022-016576	取得年 2022年	国内・外国の別 国内

〔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
研究 分 担 者	田冨 祐喜 (Tada Yuhki) (10746382)	国立研究開発法人理化学研究所・研究DX基盤開発チーム・専門技術員 (82401)	

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