

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790189

研究課題名(和文)哺乳類神経堤発生におけるヘリカーゼ関連因子の機能

研究課題名(英文)Function of a helicase-related factor during mouse neural crest development

研究代表者

渡邊 裕介(Watanabe, Yusuke)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：20562333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：Sno1はマウス胚神経堤細胞で発現しており、神経堤細胞系譜でのSno1 KOマウス胚では細胞死が増加し、顔面の低形成を起こすことが観察された。また、Sno1はヒストン結合タンパク質と相互作用することが明らかとなった。Sno1は転写活性化能を有すること、Sno1タンパク質のC末領域は、DNA損傷部位に集積するということが明らかとなった。以上の結果から、Sno1は発生中の神経堤細胞において、遺伝子の転写活性化、DNAの損傷-修復に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Sno1 is expressed in neural crest cells of mouse embryo, and Sno1 conditional KO embryos in neural crest lineage showed increased cell death and hypoplastic craniofacial structure. I found that Sno1 interacts with a Histone binding protein. Sno1 can activate gene transcription, and Sno1-C terminal region accumulates at the site of DNA-double strand breaks. Taken together, Sno1 might be involved in gene transcription and DNA-damage repair in developing neural crest cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：神経堤 発生 マウス

## 1. 研究開始当初の背景

Strawberry Notch (以下、Sno) は核タンパク質であり、N 末と C 末に種間を超えて保存された DExH と SAT というヘリカーゼに特徴的なモチーフを含む。ショウジョウバエの Sno 変異体は複眼構造、脚、羽など Notch 変異体と類似した表現型を示し (Coyle-Thompson CA & Banerjee U, 1993, Majumdar A et al., 1997) また Sno は Notch シグナリングのメディエーターである Su(H) (ショウジョウバエの RBPjk ホモログ)らと複合体を形成し、転写抑制を解放することから (Tsuda L et al., 2002) Sno は Notch シグナリング関連因子として報告されている。脊椎動物には Sno1、Sno2 の orthlog が存在するが、そのいずれについても胚発生、器官形成における機能は明らかではない。

私は、Sno1 が核局在するヘリカーゼ関連因子であることから、DNA 修復に関与している可能性があるかを検討してきた。その結果、細胞核に DNA 損傷を与えた際の Sno1 タンパク質の応答性を観察した際に、Sno1-C 末側がレーザー照射部位へ集積する性質を見出すことができた。この結果は、Sno1 が DNA 損傷 - 修復過程に関与している可能性を示唆している。胚・器官発生期においては、多くの DNA 修復因子が発現しており、それらの欠失胚解析から DNA 損傷とその修復機能の胚発生における重要性が示されている (Review, Pachkowski BF et al., 2011)。Sno1 と Notch シグナリングの関与、そして転写制御と DNA 損傷 - 修復という観点から、哺乳類胚発生・器官形成を解析することは意義深い。

マウス胚発生における Sno1 の発現パターンについては未報告であるが、私は、Sno1 が着床前から核において強く発現し、着床後胚においても発生段階に応じてダイナミックに発現を変化させていることを観察している。特に、Sno1 が鰓弓や顔面部といった神経堤細胞に由来する組織において強く発現してい

ることに注目し、神経堤細胞における Sno1 の機能について解析を進めることとし、Sno1 ノックアウト (KO) マウスを独自に作製している。その結果、Sno1 KO マウス胚は着床前 (胎生 3.5 日) に胚盤胞を形成せずに致死となるデータを得ており (未発表データ) 神経堤における Sno1 の機能を解析するために *Wnt1-Cre* マウスを用いて神経堤細胞での Sno1 コンディショナルノックアウト (cKO) マウスを作製した。その結果、*Sno1;Wnt1-Cre* cKO マウス胚では著しい顔面部・鰓弓の低形成が観察され、また神経堤細胞での細胞死が増加し、神経堤細胞が正常に分布していないことを確認した (未発表データ)。これらの表現型解析から、Sno1 は神経堤細胞発生において必須の因子であることが考えられるが、その一方で Sno1 の作用機序、分子メカニズムは不明のままである。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ヘリカーゼ関連因子である “Strawberry Notch 1 (Sno1)” による哺乳類神経堤発生の制御機構を明らかにすることである。申請者は、Sno1 が転写活性化に関与すること、酸化ストレスにより誘導した DNA 損傷部位に Sno1 が速やかに集積する性質を持つこと、神経堤での Sno1 欠失胚では細胞死が増加し、顔面の低形成を起こすことを結果として得ている。本申請研究では、Sno1 の生化学的な活性と神経堤における機能を解明するため、以下の3点を目的とする。

- (1) Sno1 の結合因子を同定する。
- (2) Sno1 を含む複合体が、標的因子の転写や DNA 修復をどのように制御しているのかを解明する
- (3) 哺乳類神経堤発生において Sno1 複合体が果たす役割とその意義について理解する。

## 3. 研究の方法

- (1) Sno1 タンパク質断片をナノ磁性ビーズに結合させ、ビーズに各種細胞抽出液を反応さ

せ、結合タンパク質を精製 - 質量分析することにより結合タンパク質を同定する。

(2) Sno1 の遺伝子発現と DNA 損傷-修復における生化学的活性を解析する。in vitro のルシフェラーゼアッセイの系を用いて、Sno1 が転写活性化能を有するか解析する。また、薬剤処理により DNA 損傷を誘導した細胞でのコロニーフォーメーションアッセイを、Sno1 の機能阻害実験により解析する。

(3) 神経堤系譜での *Sno1;Wnt1-Cre* cKO マウス胚の表現型解析をより詳細に行う。

#### 4 . 研究成果

(1) Sno1 の機能の分子メカニズムを解明するために、Sno1-C 末領域に His タグを付加したタンパク質を精製し、磁性ナノビーズに結合した後に、胎生 10.5 日目マウス胚から採取した細胞抽出液と反応させて Sno1-C 末領域と相互作用するタンパク質の質量分析により同定した。また、同定したタンパク質と Sno1 タンパク質の相互作用を、共免疫沈降法によっても確認した。こうして得られたタンパク質として、ヘリカーゼ因子の 1 つが Sno1 の N 末領域、C 末領域と相互作用していることが明らかとなった。さらに、Sno1 結合タンパク質を検索したところ、ヒストン結合タンパク質の 1 つが同定された。同定したヘリカーゼやヒストン結合タンパク質は、遺伝子の転写制御や DNA 損傷-修復に関与していることが報告されており、Sno1 がヘリカーゼ関連因子であることも含めると、Sno1 がヘリカーゼやヒストン結合タンパク質と共に、クロマチンのリモデリング等に関与していることを示唆している。

(2) Sno1 はヘリカーゼドメインを含む核タンパク質であるため、遺伝子の転写制御における機能について、ルシフェラーゼアッセイを用いて解析した。その結果、Sno1 は非常に高い転写活性化能を示すことが明らかとなり、転写の制御に関与していることが覗えた。ま

た、HeLa 細胞へのレーザー照射により DNA 損傷を誘導した際に、Sno1-C 末領域は DNA 損傷部位へ集積することが、私の解析から明らかとなっている。このことは、Sno1 が DNA 損傷-修復に関与している可能性を示しており、さらなる解析を試みた。HeLa 細胞を DNA アルキル化剤である MMS (methyl methanesulfonate) 処理することにより DNA 損傷を誘導した際に、*Sno1* siRNA により内在性 Sno1 をノックダウンすると、生存する細胞のコロニー数が有意に減少した。この結果は、Sno1 が DNA 損傷-修復過程に関与し、細胞の生存に重要な因子であることを示している。

(3) Strawberry Notch1 (*Sno1*) はマウス胚発生期において、神経堤細胞と神経堤細胞に由来する組織で発現している。*Sno1* の哺乳類神経堤細胞における機能を解析するために、*Sno1* の神経堤細胞特異的ノックアウトマウス (*Sno1;Wnt1-Cre* cKO) を作製し、その表現型解析を行なった。その結果、胎生 10.5 日目 11.5 日目では、*Sno1;Wnt1-Cre* cKO マウスでは神経堤細胞の発生直後からの細胞死のため、顔面部、鰓弓部の著しい低形成が観察された。インクインジェクションによって鰓弓動脈発生を観察した結果、鰓弓動脈の発生は遅延していた。また、Neurofilament 染色による神経系の観察では、三叉神経節と末梢神経節が低形成となっていた。その後、*Sno1;Wnt1-Cre* cKO マウス胚は、胎生 12.5 日目で致死となった。

以上の結果を総括すると、Sno1 は核内でクロマチンの構造変化に関与し、転写、DNA 損傷-修復を制御している可能性が示され、神経堤発生において *Sno1* の欠失が細胞死を引き起こしているのではないかと考えられた。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2件)

Aoki Y, Niihori T, Banjo T, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Ogata T, Takada F, Yano M, Ando T, Hoshika T, Barnett C, Ohashi H, Kawame H, Hasegawa T, Okutani T, Nagashima T, Hasegawa S, Funayama R, Nagashima T, Nakayama K, Inoue S, Watanabe Y, Ogura T, Matsubara Y  
Gain-of-function mutations in *RIT1* cause Noonan syndrome, a RAS/MAPK pathway syndrome  
American Journal of Human Genetics, 93(1):173-80. (2013) doi: 10.1016/j.ajhg.2013.05.021. (査読有り)

Watanabe Y, Zaffran S, Kuroiwa A, Higuchi H, Ogura T, Harvey RP, Kelly RG, Buckingham M  
*Fgf10* regulation in the second heart field by Tbx1, Nkx2-5 and Islet1 reveals a genetic switch for down-regulation of transcription in the myocardium.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 109(45):18273-80. (2012) doi: 10.1073/pnas.1215360109. (査読有り)

〔学会発表〕(計 5件)

Yusuke Watanabe. Strawberry Notch1, a helicase-related chromatin factor, regulates development of mouse preimplantation development. 第8回研究所ネットワークシンポジウム、京都大学医学部創立百周年記念施設「芝蘭会館」、2013年6月27日～28日。

Yusuke Watanabe, Yoshikazu Hirate, Hiroshi Sasaki, Toshihiko Ogura. Strawberry Notch 1, a helicase-related factor, is required for development of mouse preimplantation embryo. The 61st NIBB Conference, Cellular Community in Mammalian Embryogenesis. Okazaki Conference Center. 2013年6月10日～12日。

Yusuke Watanabe, Minoru Omi, Toshihiko Ogura. Strawberry Notch1 involves in mammalian preimplantation development. 第35回分子生物学会年会、福岡国際会議場、2012年12月11日～14日。

渡邊裕介、Nkx2-5, Islet1, Tbx1 による二次心臓形成領域での Fgf10 の発現制御機構。第11回心血管発生研究会、福島県郡山市、2012年10月19日。

Yusuke Watanabe, Minoru Omi, Toshihiko Ogura. Strawberry Notch1 is required for mouse preimplantation development. 第45回発生・第64回細胞生物学会合同年会、神戸国際会議場、2012年5月28日～31

日。

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

渡邊 裕介 (WATANABE YUSUKE)  
東北大学・加齢医学研究所・助教  
研究者番号：20562333

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：