

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2016

課題番号：25712034

研究課題名(和文) 組織発生過程におけるGARP complexの役割

研究課題名(英文) Roles of the GARP complex during mammalian development

研究代表者

杉本 道彦 (Sugimoto, Michihiko)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・助教

研究者番号：10373317

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,700,000円

研究成果の概要(和文)：GARP complexの既知構成因子ならびに我々が新規に同定した因子の機能欠損マウスを用いて表現型解析を行ったところ、これら遺伝子が機能的に3つのグループに分類されることがわかった。これはGARP complexが発生過程において構成因子を取り替えることで様々な役割を果たすことを示す新たな発見である。さらに、GARP complexの組織発生過程における役割を解明するモデルとして、肝臓特異的Vps52欠損解析を行ったところ、オートファジー関連遺伝子の肝臓特異的欠損胚と同様の表現型を呈することを突き止めた。これはGARP complexがオートファジーと関連があることを示す重要な証拠と言える。

研究成果の概要(英文)：To elucidate roles of GARP complex during mammalian development, we obtained previously established mutant mouse lines for components of the GARP complex and generated knockout mouse lines for genes that we newly identified as components of the GARP complex. From phenotypes of mutant embryos, we found that these genes could be classified into three groups. These results suggest that the GARP complex plays various roles by exchanging components during mammalian development. Furthermore, we carried out liver specific Vps52 knockout analysis for a model for identification of the role of the GARP complex during tissue development. Liver specific Vps52 knockout embryos showed very similar phenotypes to liver specific knockout embryos for an autophagy related gene. These results provide new evidence that the GARP complex seems to regulate autophagy.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：マウス 初期発生 多能性幹細胞 細胞分化 組織発生 細胞内小胞輸送

### 1. 研究開始当初の背景

GARP complexはタンパク質の細胞内局在異常を示す酵母変異体のスクリーニングにより同定されたタンパク質、VPS52、VPS53、VPS54より構成されるタンパク質複合体で(Conibear and Stevens, 2000)、その後新たにVPS51が構成因子に加わった。これらタンパク質は単細胞生物の酵母から哺乳類に至るまで保存されていることから、細胞の生存自体に重要な役割を果たしていると考えられていたため、多細胞生物の発生との関連性には注目されていなかった。一方、野生マウスより発見されたマウス初期胚致死変異の責任遺伝子がVps52であることを我々が突き止め、GARP complexが哺乳類初期発生を制御する重要な役割を担っていることが明らかとなった(Sugimoto *et al.*, 2003, Sugimoto *et al.*, 2012)。さらに、Vps52が細胞間相互作用を介して多能性幹細胞の分化にも関わっていることを示す結果も得られていることから、GARP complexは様々な細胞・組織の分化制御に関わっていると考えられる。

### 2. 研究の目的

(1) Vps52コンディショナルノックアウトマウスを用いて、各組織で特異的にGARP complexの機能を消失させることで、マウスの組織発生過程におけるGARP complexの役割を突き止めることを目的とした。

(2) 我々が新たに同定したVPS52と結合するタンパク質(CCDC132ならびにTSSC1)は全く機能が調べられておらず、ノックアウトマウスも存在していなかった。これらをコードする遺伝子を破壊し、その他のGARP complex gene欠損マウスの表現型と比較することで、マウス発生過程におけるGARP complexの構成因子それぞれの役割を突き止めることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) Vps52コンディショナルノックアウトマウスと組織特異的Cre発現マウスを交配し、組織特異的Vps52欠損胚の表現型を解析する。

① 利用可能な組織特異的Cre発現マウスが実際に組織特異的に解析に利用できるかをR26Rレポーターマウスを交配して確認し、組織特異性の高い系統を用いて解析を行う。

② 組織切片作製、ウエスタンブロッティングなどを行い、表現型を確認する。既存のノックアウトマウスの表現型と比較することで、該当組織におけるGARP complexの機能を明らかにする。

(2) GARP complexの構成因子の内、ノックアウトマウスが入手不可能なものに関して、新規にノックアウトマウスを作製し、既存の変異マウスの表現型解析と合わせ、それらの比較を行う。

### 4. 研究成果

(1) 本研究では組織特異的なVps52欠損による組織レベルでの表現型解析を行うため、Creドライバーマウスでの組織特異性は非常

に重要となってくる。というのも、もし対象の組織におけるCREタンパク質の発現が不完全であった場合、Vps52が欠損されなかった細胞だけでその組織の機能を十分に補うことが出来る可能性があるためである。そこで、組織特異的Creドライバーマウスにおける、CREタンパク質発現の組織特異性を検証した。その結果、AQP2-Creマウス(腎臓発現)ならびにPtfla-Creマウス(膵臓発現)におけるCREタンパク質の発現は完全ではないことがわかった。一方、Alb-Creマウス(肝臓発現)のCREタンパク質の発現は肝臓に限局しており、発生過程において効率よく組織特異的組織換えが起こっていることが確認できた(図1)。



図1. Alb-Creマウスにおける組織換えの組織特異性の検証。(左) R26Rマウス(Alb-Creを持たない)、(右) R26R; Alb-Cre。

この結果を踏まえ、Alb-Creを用いてVps52を肝臓特異的に欠損させたところ、一見すると正常に出生するように見受けられたものの、生後4日以内にはほぼ全て死亡し、多くは生後1-2日で死亡した。そこで、出生直前のE18.5胚の肝臓の組織学的解析を行ったところ、正常胚では肝細胞の成熟とともに生じる空胞(脂肪と推察される)が認められるのに対し、欠損胚ではそういった空胞は認められず、成熟前の未熟な肝細胞の状態であることがわかった(図2)。このことから、VPS52は

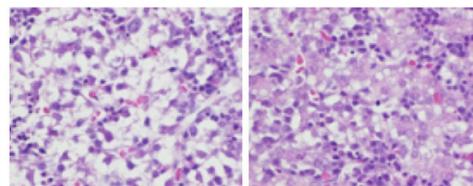


図2. 肝臓特異的Vps52欠損マウス胚の表現型。E18.5胚の肝臓のHE染色像。(左) Vps52<sup>flox/flox</sup>、(右) Vps52<sup>flox/flox</sup>; Alb-Cre。

肝細胞の分化・成熟過程で重要な役割を果たしていると考えられる。さらに、この表現型は、オートファジーと関連がある遺伝子を肝臓特異的に欠損させたときの表現型に極めて類似していることがわかった(未発表)。これらの結果は、VPS52がオートファジーの制御に何らかの形で関与しており、オートファジー経路を介して肝細胞の発生を制御している可能性を示唆している。

(2) GARP complex と関連する 6 遺伝子のうち、*Vps51*, *Ccdc132*, *Tssc1* を欠損させたマウス系統は存在していなかったため、これらを欠損させたマウス系統を CRISPR/Cas9 システムを利用して作製した。*Vps52* ノックアウトマウス系統、*Vps53* ノックアウトマウス系統、*Vps54* 遺伝子トランプマウス系統と合わせ、これらの表現型解析を行った。*Vps52*, *Vps53* ノックアウト胚はともにエピプラストの発達不全により E6.5 に致死となることが確認された (図 3)。一方、*Vps54* 機能欠損遺伝子

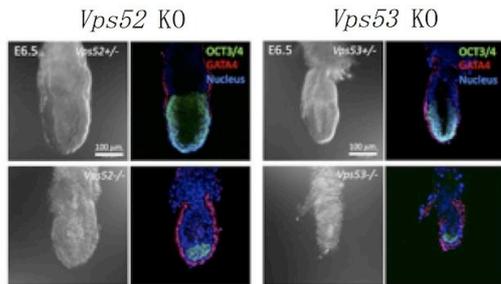


図3. *Vps52* ノックアウト E6.5 胚 (左)、*Vps53* ノックアウト E6.5 胚 (右) の表現型。OCT3/4 (緑)、GATA4 (赤)、核 (青)。

トランプマウス胚は E12.5 に致死となることが判明した。遡って解析したところ、胚本体に形態的な表現型が現れる前の E10.5 の時点で、卵黄嚢における著しい血管形成不全が観

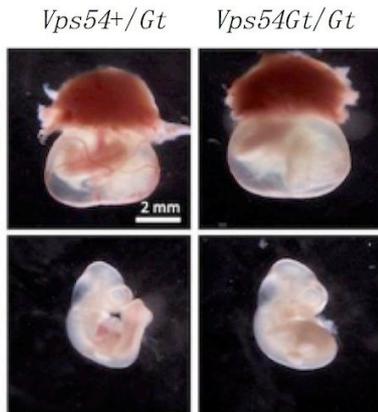


図4. *Vps54* 遺伝子トランプ E10.5 胚の表現型。(左) ヘテロ胚、(右) ホモ胚。

察された (図 4)。さらに、*Vps51*, *Ccdc132*, *Tssc1* 欠損胚の表現型を確認したところ、*Vps51* 欠損胚は *Vps52* 欠損胚、*Vps53* 欠損胚と同様にエピプラストの発達不全により E6.5 に致死となるが、*Ccdc132* 欠損胚、*Tssc1* 欠損胚はともに E8.5 に致死となることがわかった (図 5)。興味深いことに、*Ccdc132* 欠損胚、*Tssc1* 欠損胚では、visceral yolk sac が波打った特徴的な形態を示していた。これは、内側の外胚葉組織の発達が悪い状況下で visceral endoderm の細胞が増殖したためと考えられる。GARP complex 遺伝子を欠損させた際の表現型より、これら因子を 3 つに分類できることがわかった (図 6)。これまで GARP complex は全ての構成因子が常に協調的に機

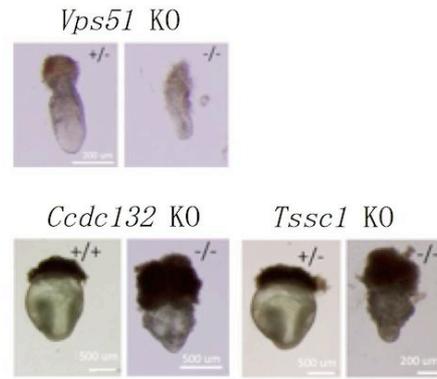


図5. *Vps51* KO (E6.5), *Ccdc132* KO (E8.5), *Tssc1* KO (E8.5) の表現型。

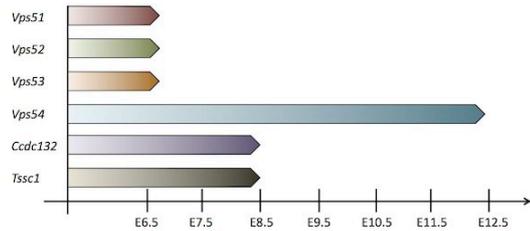


図6. GARP complex 遺伝子欠損胚が致死になるタイミング。

能すると考えられていたが、これらの結果より、GARP complex は構成因子を入れ替えることで発生過程の様々なステージ・組織で多面的な役割を果たしていることが示唆される。

本研究の結果を元に考察すると、VPS51, VPS52, VPS53 の 3 つが GARP complex の主要因子であると推察される。そして、CCDC132 と TSSC1、ならびに VPS54 が必要に応じて加わることで、GARP complex は哺乳類発生過程において多様な役割を果たすと考えられる。

#### <引用文献>

- ① Conibear E. and Stevens T.H. *Vps52p*, *Vps53p*, and *Vps54p* from a novel multisubunit complex required for protein sorting at the yeast late Golgi. (2000). *Mol. Biol. Cell*, 11, 305-323.
- ② Sugimoto M. *et al.* Tetraploid embryos rescue the early defects of  $t^{w5}/t^{w5}$  mouse embryos. (2003). *Genesis*, 37, 162-171.
- ③ Sugimoto M. *et al.* Molecular identification of  $t^{w5}$ : *Vps52* promotes pluripotential cell differentiation through cell-cell interactions. (2012). *Cell Rep.* 2, 1363-1374.

#### 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 7 件)

- ① Kaori Motomura, Mami Oikawa, Michiko

Hirose, Arata Honda, Sumie Togayachi, Hiroyuki Miyoshi, Yasuhide Ohinata, Michihiko Sugimoto, Kuniya Abe, Kimiko Inoue, Atsuo Ogura. Cellular dynamics of mouse trophoblast stem cells: Identification of a persistent stem cell type. (2016). *Biol. Reprod.* 94, 122. 査読有, DOI: 10.1095/biolreprod.115.137/125

- ② Michihiko Sugimoto, Masayo Kondo, Yumiko Koga, Hirosuke Shiura, Rieko Ikeda, Michiko Hirose, Atsuo Ogura, Ayumi Murakami, Atsushi Yoshiki, Susana M. Chuba de souse Lopes, Kuniya Abe. A simple and robust method for establishing homogenous mouse epiblast stem cell lines by Wnt inhibition. (2015). *Stem Cell Rep.* 4, 744-757. 査読有, DOI: 10.1016/j.stemcr.2015.02.014
- ③ Michihiko Sugimoto. Developmental genetics of the mouse *t*-complex. (2014). *Genes Genet. Syst.* 89, 109-120. 査読有, DOI: 10.1266/ggs.89.109
- ④ Michihiko Sugimoto, Masayo Kondo, Michiko Hirose, Misao Suzuki, Kazuyuki Mekada, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, Atsuo Ogura, Nobuo Takagi Karen Artzt, Kuniya Abe. Molecular identification of *t<sup>w5</sup>*: *Vps52* promotes pluripotential cell differentiation through cell-cell interactions. (2012). *Cell Rep.* 2, 1363-1374. 査読有, DOI: 10.1016/j.celrep.2012.10.004
- ⑤ Shogo Matoba, Kimiko Inoue, Takashi Kohda, Michihiko Sugimoto, Eiji Mizutani, Narumi Ogonuki, Toshinobu Nakamura, Kuniya Abe, Toru Nakano, Fumitoshi Ishino, Atsuo Ogura. RNAi-mediated knockdown of *Xist* can rescue the impaired postimplantation development of cloned mouse embryos. (2012). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108, 20621-20626. 査読有, DOI: 10.1073/pnas.1112664108

[学会発表] (計 15 件)

- ① Michihiko Sugimoto, A simple and robust method for establishing homogeneous mouse epiblast stem cell lines by Wnt inhibition, 2016 Asian Mouse Mutagenesis Resource Association & Asian Mouse Phenotyping Consortium, 20-21, Jul., 2016, Hakone (Japan)
- ② Michihiko Sugimoto, WNT inhibition facilitates the establishment of stable and homogeneous EpiSCs, 29th International Mammalian Genome Conference, 8-11, Nov., 2015, Nov.,

Yokohama (Japan)

- ③ 杉本 道彦, EpiSC 樹立における Wnt シグナル抑制の効果、日本遺伝学会第 87 回大会、2015 年 9 月 24-26 日、東北大学川内北キャンパス (宮城県・仙台市)
- ④ 杉本 道彦, *t* ハプロタイプ胚性致死変異 *t<sup>w5</sup>* の同定-発生制御因子としての *Vps52* の機能解明を目指して-、モロシヌス研究会、2015 年 7 月 3-4 日、かんぼの宿有馬 (兵庫県・神戸市)
- ⑤ Michihiko Sugimoto, A simple and robust method for establishing homogeneous mouse EpiSC lines by Wnt inhibition, 第 48 回日本発生生物学学会大会、2015 年 6 月 2-5 日、つくば国際会議場 (茨城県・つくば市)
- ⑥ 杉本 道彦, *Vps52* および関連遺伝子のマウス胚発生における役割、日本遺伝学会第 86 回大会、2014 年 9 月 17-19 日、長浜バイオ大学 (滋賀県・長浜市)
- ⑦ 杉本 道彦, マウス *t*-complex 致死遺伝子の同定、日本遺伝学会第 85 回大会、2013 年 9 月 19-21 日、慶應義塾大学日吉キャンパス (神奈川県・横浜市)
- ⑧ 杉本 道彦, 多能性幹細胞の分化制御因子としての *Vps52* 遺伝子の役割、日本遺伝学会第 85 回大会、2013 年 9 月 19-21 日、慶應義塾大学日吉キャンパス (神奈川県・横浜市)
- ⑨ Michihiko Sugimoto, Molecular identification of *t<sup>w5</sup>*: *Vps52* promotes pluripotential cell differentiation through cell interactions, 第 46 回日本発生生物学学会大会、2013 年 5 月 28-31 日、くにびきメッセ (島根県・松江市)
- ⑩ 杉本 道彦, マウス *t*-complex 致死変異より同定された *Vps52* の発生制御遺伝子としての役割、第 60 回日本実験動物学会、2013 年 5 月 15-17 日、つくば国際会議場 (茨城県・つくば市)
- ⑪ 杉本 道彦, マウス *t*-complex にマップされる胚性致死遺伝子 *t<sup>w5</sup>* の同定と機能解析、モロシヌス研究会、2013 年 6 月 28-29 日、理化学研究所バイオリソースセンター (茨城県・つくば市)
- ⑫ 杉本 道彦, *tw5* 変異マウスの解析で明らかになった *Vps52* 遺伝子の多能性幹細胞分化制御因子としての役割、日本遺伝学会第 84 回大会、2012 年 9 月 24-26 日、九州大学医学部 (福岡県・福岡市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

杉本 道彦 (SUGIMOTO, Michihiko)  
熊本大学・生命資源研究・支援センター・助教

研究者番号: 10373317