

令和元年6月19日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11097

研究課題名(和文)細胞融合抑制タンパク：サブレスシンのノックアウトマウス作製

研究課題名(英文) Establishment of murine knock-out model for cell fusion suppressor: suppressyn

研究代表者

杉本 潤 (sugimoto, jun)

広島大学・医歯薬保健学研究所(医)・助教

研究者番号：10315476

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)：胎盤特異的な発現をするタンパク：サブレスシンは、細胞融合を抑制する機能をもつことが推定されている。しかし、生体内での生理機能を証明するには、サブレスシンノックアウトマウスを用いたin vivoでの検証が必要であった。今回、サブレスシンに相当するマウス遺伝子(配列は異なるがタンパク機能が同じ遺伝子)を単離・同定し、この遺伝子を欠損するノックアウトマウスを作製した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、ヒトで細胞融合を抑制するタンパク：サブレスシンを世界で初めて報告していた。今回、本研究によりマウスで同じように細胞融合を抑制するタンパク：マウスサブレスシンS (mSuppressyn-S)を単離・同定している。これまでその存在が明らかではなかった細胞融合抑制に関わるタンパクをヒトとマウスで証明したことは、胎盤の合胞体形成メカニズムを解明するうえで重要な手がかりになると考える。この点は特筆すべきところであり、本研究解析により産婦人科領域の基礎研究に大きく貢献できると考える。

研究成果の概要(英文)：Suppressyn is one of the first human proteins to be identified that inhibits cell-cell fusion. In vivo manipulation of this protein to allow determination of physiological relevance, requires the establishment of a suppressyn knockout mouse. To accomplish this, we identified and isolated a murine equivalent of human suppressyn that displayed anti-fusogenic effects in vitro. Then we established murine knockout model for mouse suppressyn using genome editing technology. Further functional analyses using suppressyn knockout mouse are now underway and should help to define the role for human suppressyn in placental health and disease.

研究分野：分子生物学

キーワード：サブレスシン 胎盤絨毛細胞 細胞融合 内在性レトロウイルス

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトサプレシンは、細胞融合を抑制するタンパクとして世界で初めて同定された機能タンパクである。胎盤特異的な発現をするこのタンパクは、細胞融合により形成される栄養膜合体細胞(シンシチオトロフォブラスト)の融合過程を、負(抑制的)に調節していると考えられる。このタンパクの機能解析は、ヒトの生理機能を明らかにする上で非常に重要で、特に胎盤形成に関わるタンパクであることから、産婦人科領域でその解析が急がれる研究課題であった。ただ、これまでの機能解析は培養細胞株を用いた *in vitro* の解析であったことから、生体内環境に近い状態(*in vivo*)での解析が求められていた。

### 2. 研究の目的

サプレシンと胎盤形成の関係を明らかにする唯一の方法は、ノックアウトマウスを作製し *in vivo* で本タンパクの機能を証明することである。ヒトサプレシンに相同なマウス遺伝子を単離し、ノックアウトマウスによる表現型解析を行うことで、サプレシンタンパクの生理機能を明らかにしようと考えた。

### 3. 研究の方法

最初に、マウスゲノム中に存在が示唆される、細胞融合抑制遺伝子(マウスサプレシン)の単離・同定を試みた。しかし、ヒトサプレシンに相当するマウス遺伝子の単離の難しさは、配列が種を超えて保存されていないことである。(サプレシン遺伝子配列は霊長類のみに存在しマウスにはない) このことから単純に遺伝子配列からその相同遺伝子を見いだせる単一遺伝子とは方法が異なる。マウスゲノム中に存在する内在性レトロウイルス配列の中からサプレシン遺伝子とは配列レベルで相同性はないが、同じ細胞融合抑制能をもつ遺伝子配列(タンパク)を単離しなければならない。

マウスサプレシン遺伝子を効率的に単離・同定するため、胎盤で発現するレトロウイルス配列を包括的に検証できる次世代シーケンサー(RNAseq)解析を用いて候補遺伝子の単離を試みた。データベース上に登録されているマウス胎盤由来 RNAseq 解析結果を検証した結果、胎盤で発現する複数の内在性レトロウイルス由来配列を見出した。

これらの配列を解析し、タンパクをコードすると予想される配列をクローニングすることで、細胞融合抑制効果を検証した。まず半定量的 RT-PCR 法により、各配列の発現臓器を明らかにした。さらに、2種類の細胞株にこれら候補配列を強制発現させ、ウエスタンブロット法により翻訳産物の有無を検証した。次に、これら細胞に syncytin-A, syncytin-B を一過性に発現させ、細胞融合抑制効果を検証した。4つの候補遺伝子のうち1つ(仮称:C11)に融合抑制効果が確認されたことから、このC11マウス由来レトロウイルス配列を候補マウスサプレシンと考えた。

この候補マウスサプレシン遺伝子を欠損させたマウスを作製するため、ゲノム編集技術(CRISPR/Cas9 システム)を用いて、C11 遺伝子座領域に GFP 配列をノックインさせた。これにより、C11 遺伝子を欠失させ、さらにこの遺伝子が発現していた組織で GFP が緑色に発光するマウスが作製される。C11 遺伝子ゲノム領域と GFP 配列を含んだノックイン用ベクターコンストラクトを作製後、マウス受精卵へのインジェクションを筑波大学生命科学動物資源センターに依頼した。この結果、ファウンダーマウス(片方の染色体で遺伝子欠損が確認されているマウス)の雄4匹を得ている。さらに交配を繰り返した結果、現段階において雌雄両マウスで両アリル(両染色体)に欠損を持つサプレシンノックアウトマウスを得た。

### 4. 研究成果

本研究代表者は、ヒトで細胞融合を抑制するタンパク:サプレシンを世界で初めて報告した。また、マウスではこれまで確認されていなかった細胞融合抑制タンパクを、初めて単離・同定し、マウスサプレシン S (mSuppressyn-S)と命名している。これまでその存在が明らかではなかった細胞融合抑制に関わるタンパクをヒトとマウスで証明したことは、胎盤の合体形成メカニズムを解明するうえで重要な手がかりになると考える。

今回、RNAseq 解析を用いたマウス内在性レトロウイルス配列の解析により、胎盤で発現が予測される4つの候補配列を得ることができた。これらの配列から、タンパク質をコードしているゲノム領域を予測し、この4つの候補遺伝子をクローニングした。半定量的 RT-PCR によりこれら候補遺伝子の発現を解析した結果、いずれも胎盤での発現が確認された。しかし、胎盤特異的な発現を示す C15 以外に、他の臓器でもその発現が確認される遺伝子(C7, C11, C15)も存在した。(図1)

これらの候補遺伝子を、2種類の細胞中で強制発現させ、翻訳産物の有無を確認した結果、いずれの配列も確かにタンパク質に翻訳されることが明らかとなった。今回の研究課題遂行に

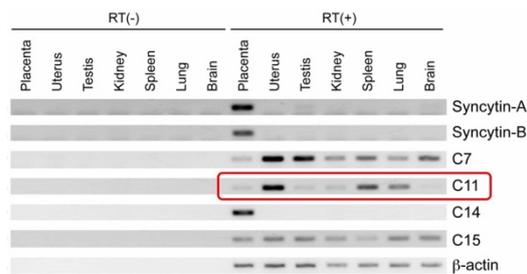


図1 候補遺伝子の各組織における遺伝子発現

より、これまで報告されていなかった新規のマウス内在性レトロウイルス遺伝子を4つ単離、同定したことになる。(図2)

次に、これら候補遺伝子の細胞融合抑制効果を検証した。これまで、マウスで細胞融合を促進する遺伝子として syncytin-A, syncytin-B が報告されている。これら二つの細胞融合促進遺伝子に対する抑制効果の有無をそれぞれ 293T 細胞と MDCK 細胞を用いて検討した。Syncytin-A に対する抑制効果の結果を図3に示す。予想通り、親株である 293T 細胞、ベクター配列のみを形質転換した細胞では、syncytin-A による細胞融合により、巨大化し、

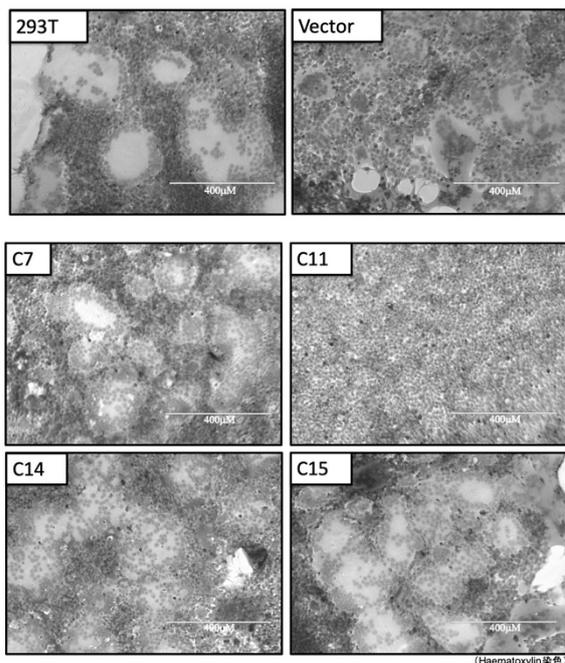


図3 Syncytin-Aに対する細胞融合抑制効果の検証

組織を緑色に光らせることができる。今回、このための特殊なベクターを構築後、筑波大学生命科学動物資源センターにゲノム編集技術を用いた遺伝子形質転換マウスの作製を依頼した。この結果、ファウンダーマウス(片方の染色体で遺伝子欠損が確認されているマウス)の雄4匹を得ている。さらにこれらファンダーマウスと野生型マウスの交配を繰り返すことで、雌雄両マウスで両アリル(両染色体)に欠損を持つマウスを得た。(図4)

現在、これらホモで欠損を伴う雌雄ノックアウトマウスを用いて、さらなる交配実験を継続中である。今後、マウスサプレシン-S 遺伝子欠損マウスにおける妊娠維持、胎盤形成へ影響を検証しようと考えている。

ヒトゲノム配列の約50%を占めるといわれるトランスポゾン配列は、その存在意義が見直され、ようやく研究対象としての重要性が認識され始めた。また、トランスポゾンの一つである内在性レトロウイルスの解析も、近年精力的に行われるようになった。本研究では、このマウス内在性レトロウイルスに由来する配列のひとつが、これまでその存在が明らかでなかったマウスの細胞融合抑制タンパクであることを見出した。本来、ヒト内在性レトロウイルス配列は霊長類に特異的に存在し、他の哺乳類(マウス)には存在しない。しかし、マウスゲノム中に、配列は異なるが機能が同じ内在性レトロウイルス配列が存在する可能性が指摘されており、実際、このマウスサプレシン遺伝子(仮称:マウスサプレシン-S)を我々がヒトに続き世界で初めて単離・同定した。ヒトとマウスにおいて細胞融合抑制遺伝子:サプレシンの存在を明らかにしたことは、このタンパクの存在意義を強く証明しており、細胞融合抑制タンパクの生理学的意義を考える上で非常に重要な知見であると考えられる。

このノックアウトマウスの表現型により、サプレシンタンパクの生理機能が明らかになれば、胎盤の形成不全をとまなう各種疾患の発症メカニズムが解明される可能性がある。特に妊娠高血圧症、子宮内胎児発育遅延、不育症など、これまでその原因が明らかでなかった疾患発症機

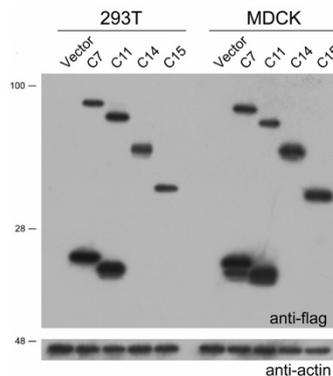


図2 安定発現細胞における各候補タンパクの発現様式

多核になった細胞が観察された。候補遺伝子4つの結果では、C7, C14, C15が同じように多核を伴う巨大な融合細胞が確認されるのに対し、C11細胞では全く細胞融合の形跡が見られなかった。このことから、候補遺伝子C11は細胞融合抑制能を持つ候補マウスサプレシンであると考えられた。また、ここでは図として示さないが、syncytin-B に対する融合抑制能を検討した結果、同じようにC11はsyncytin-Bによる細胞融合を抑制することが明らかとなっている。以上のことから、このC11遺伝子をマウスサプレシン-S(mSuppressyn-S)と命名(仮称)した。

次にこの候補マウスサプレシン-Sのゲノム領域を欠損させたノックアウトマウスの作製を遂行した。今回、遺伝子欠損の導入方法として、GFP配列をマウスサプレシン-Sゲノム領域に挿入した。これにより、遺伝子欠損を引き起こすと同時に、この遺伝子のプロモーター配列下流にGFP遺伝子が挿入されることで、もともとマウスサプレシン-Sタンパクが発現していた組

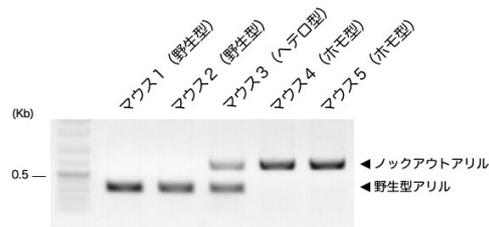


図4 mSuppressyn-Sノックアウトマウスのスクリーニング

序解明への貢献が期待される。さらに、このサプレシンの融合抑制機能をターゲットとした創薬研究は、これら疾患の予防・治療法開発に大きく寄与する可能性があり、本研究はその基礎をなす重要な研究課題であると考え。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計0件）

〔学会発表〕（計3件）

1. 杉本 潤、Danny Schust、内在性レトロウイルス：胎盤での発現とその生理学的意義 第25回日本胎盤学会（2017）
2. 杉本 潤、金城忠嗣、松波雅俊、木村亮介、青木陽一、陣野吉廣、Schust Danny、胎盤絨毛初代培養細胞の包括的遺伝子発現解析 第25回日本胎盤学会（2017）
3. 杉本 潤、Danny Schust、中川 草、小田高也、陣野吉廣、マウスサプレシン遺伝子の単離・同定 第24回日本胎盤学会（2016）

〔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：

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：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

※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、研究者個人に帰属されます。