

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：13501
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2017～2019
課題番号：17H03681
研究課題名(和文) ゲノム編集技術を基盤としたスフィンゴシン-1-リン酸の造血発生における機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of sphingosine-1-phosphate in hematopoietic development using genome editing technologies

研究代表者
川原 敦雄 (KAWAHARA, Atsuo)

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：10362518
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、脂質メディエーターであるスフィンゴシン-1-リン酸(S1P)の形態形成における生理機能を明らかにすることである。ゲノム編集技術を用い網羅的なS1PRの機能欠損ゼブラフィッシュ変異体を作製し、それらの表現型解析を行った。全てのS1PRを破壊した7S1PR変異体は胚性致死の表現型を示した。7S1PR変異体はS1PR2変異体で観察される二叉心臓に加えて、赤血球や血管細胞の形成不全といった造血・血管発生異常を示すことが明らかとなった。これらの結果は、S1Pシグナルが心臓発生のみならず造血・血管発生に重要な役割を担っていることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂質メディエーターであるスフィンゴシン-1-リン酸(S1P)の生理機能は十分には分かっていない。本研究では、ゲノム編集技術を用い全てのS1PRを破壊したゼブラフィッシュ変異体の表現型解析から、S1Pシグナルが造血および心血管発生に重要な役割を担うことを明らかにした。哺乳類において本研究で解明されたS1Pの新機能が保存されているかを調べることで、S1Pシグナルの総括的な理解が深まることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to reveal the physiological function of the lipid mediator, sphingosine-1-phosphate (S1P) during zebrafish organogenesis. We have established exhaustive S1PR knockout fish mediated by genome editing technologies and investigated the phenotypic analyses of these mutants. 7S1PR mutant, which was disrupted in all S1PRs, exhibited embryonic lethal. 7S1PR mutant showed not only cardia bifida like S1PR2 mutant, but also hypoplasia of vascular and erythroid cells. These results indicate that S1P signal plays important roles in hematopoietic and vascular development.

研究分野：発生生物学

キーワード：ゲノム編集技術 TALEN CRISPR/Cas9 スフィンゴシン-1-リン酸 S1P受容体 Spns2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、脂質メディエーターが生体内で様々な生理活性を發揮することが明らかになってきている。脂質メディエーターであるスフィンゴシン-1-リン酸(S1P)は、スフィンゴシンキナーゼ(sphk1, sphk2)が細胞膜由来のスフィンゴシンをリン酸化することにより生成される。細胞内で産生されたS1Pは細胞外へ分泌されると考えられていたが、その分泌機構は不明のままであった。我々は、心臓発生に異常を示すゼブラフィッシュ変異体の機能解析から、その原因遺伝子であるSpns2が生体内でS1P輸送体として機能することを明らかにした。さらに、ヒトSpns2もS1P輸送体として機能することを証明している。分泌されたS1Pは、標的細胞のS1P受容体(S1PR: S1PR1~S1PR5)を介し細胞増殖・細胞分化・細胞遊走などの生理活性を發揮する。S1Pを産生するスフィンゴシンキナーゼは、酵母・昆虫から脊椎動物に広く存在するのに対し、S1PRは脊椎動物のゲノムにおいてのみ見つかったので、無脊椎動物から脊椎動物へと進化した段階でS1Pの新規機能を獲得した可能性が考えられた。実際に、S1Pは、哺乳類において免疫系のT細胞に発現するS1PR1を介してリンパ球の再循環を制御している。また、S1Pは、ヒトの難治性疾患である癌や自己免疫疾患との関連性が指摘されており、S1Pの生理機能の解明はヒト疾患の病態の理解や新たな治療法の開発につながる可能性が高い。本研究は、モデル脊椎動物であるゼブラフィッシュを用いS1Pの形態形成における新規機能の解明に挑戦する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ゲノム編集技術(TALEN, CRISPR/Cas9)を用い網羅的なS1PR機能欠損ゼブラフィッシュ変異体を作製し、それらの表現型解析から形態形成におけるS1Pの生理機能を解明することである。ゼブラフィッシュのS1PRは、ゲノム上にS1PR1, S1PR2, S1PR3a, S1PR3b, S1PR4, S1PR5a, S1PR5bの7種の存在が確認された。我々は、全てのS1PRを単離し、初期発生における発現動態を調べた結果、各S1PRは相互に発現領域が重なるとともに、それぞれ特異的な発現を示すことを見出しており、S1PRは神経細胞、体節や造血・血管発生の際であるICM(intermediate cell mass)などに広範囲に発現していた。また、S1PR2機能欠損ゼブラフィッシュ変異体は二叉心臓の表現型を示したが、それ以外のS1PR単独変異体は顕著な形態形成異常を示さず、世代交代が可能であることが明らかとなった。本研究では、S1PR多重変異体を作製し、それらの表現型解析からS1Pシグナルの形態形成における新規機能を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、ゲノム編集技術を用いS1PRに対する網羅的な機能欠損ゼブラフィッシュ変異体を作製し、それらの表現型解析からS1Pの生理機能を解明する。

(1) ゲノム編集技術を用いたS1PR多重変異体の樹立

TALENベクター(pCS2TAL3DD/RR)の構築のため標的ゲノム切断部位を跨ぐようにDNA結合ドメインであるTALEモジュールをデザインし、2段階のTALEN構築システムを用いTALENベクターを構築した。構築したTALENベクターからセンス鎖およびアンチセンス鎖を標的とするTALEN mRNA(400pg)を調整し、ゼブラフィッシュ受精卵(1細胞期)に注入した。TALENを注入した胚の一部からゲノムDNAを調整し、ゲノム編集効率を測定するとともに、残りの胚を成魚まで育てた。F0変異体候補を野生型と交配することで導入された変異を固定し、ヘテロ二本鎖移動度解析で変異の性状を検討した後に、最終的にはPCR法で増幅したフラグメントをpGEM-T Easyベクターにサブクローニングし、シーケンス解析により変異を決定した。

CRISPR/Cas9法では、標的ゲノム部位に対するCRISPR RNA(crRNA)とtrans-activating crRNA(tracrRNA)を調整した。申請者が開発した速効型CRISPR/Cas9法であるcRNA, tracrRNAとCas9

タンパク質をゼブラフィッシュ受精卵に注入した。F0 胚の一部からゲノム DNA を調整し、ゲノム編集効率を測定するとともに、残りの胚を成魚まで育てた。F0 変異体候補を野生型と交配することで導入された変異を固定し、最終的には PCR 法で増幅したフラグメントを pGEM-T Easy ベクターにサブクローニングし、シーケンス解析により変異を決定した。各 S1PR が存在する染色体は、S1PR2 と S1PR5a は LG3 にマップされており、S1PR1, S1PR3a と S1PR4 は LG22 にマップされているので、樹立した変異体を基盤に速効型 CRISPR/Cas9 法を用い同じ染色体上に位置する S1PR を破壊し S1PR 多重変異体を樹立した。

ゲノム編集技術により誘導した変異の性状を解析する方法として、我々が開発したヘテロ二本鎖移動度解析を用いた。初期胚、または成魚の尾ビレの先端を切断し 50 mM NaOH (108 μ l) を加えてサーマルサイクラーにて反応(98°C, 10 min)させた後に 1M Tris-HCl (pH8.0) (12 μ l) を加えゲノム DNA を調整した。PCR 法で標的ゲノム部位(100pb 程)を増幅したサンプルを 12.5% ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動(10 mA, 100 min/1 枚)し、野生型アレルと変異型アレルを分離した。

(2) whole-mount *in situ* hybridization (WISH)法を用いた組織特異的遺伝子の発現動態解析

S1PR 機能欠損ゼブラフィッシュ(1 日胚)の固定胚を用い組織特異的遺伝子の発現動態解析を WISH 法により解析した。細胞周期遺伝子(p53, baxa, bcl2, cep55)、神経発生遺伝子(huC, cart-like, islet1, slurp-like1, slurp-like2, krox20, pax6)、心血管発生遺伝子(fli1a, flk1, gata6, nkx2.5, cmlc2, amhc, vmhc)、造血発生遺伝子(klf17, lysozyme C, mpo, myb, gata1, runx1, scl)に対する digoxigenin (DIG) でラベルしたアンチセンス RNA プローブを作製した。cep55, cart-like, slurp-like1 と slurp-like2 に関しては、独自に遺伝子の単離および初期発生における発現動態解析を行い、それらの解析結果は論文として発表した。

WISH 法では、最初にゼブラフィッシュ胚(25 hpf)を 4% paraformaldehyde (PFA)で固定した。次に、washing buffer (PBST)で洗浄後、hybridization buffer (HYB)で前培養した。さらに、DIG プローブを含む HYB で一晚培養した。胚を数回洗浄後、blocking buffer で 5000 倍に希釈した anti-digoxigenin-alkaline phosphatase (AP)溶液を加え培養した。PBST で胚を洗浄後、staining buffer で洗浄し、最終的に基質である BM Purple を加え、37°Cで標的 mRNA の発現を可視化した。胚を PBST で洗浄し、発色反応を停止させた。

4 . 研究成果

本研究では、以下に示す研究成果が得られた。

(1) ゲノム編集技術を用いた S1PR 二重変異体の樹立とそれらの機能解析

S1PR の初期発生における発現動態は、S1PR1 は神経細胞に、S1PR2 は心臓前駆細胞および中脳後脳境界部に、S1PR3a は眼のレンズ、S1PR3b は三叉神経節、S1PR5a は体節、S1PR5b は造血・血管発生場である ICM に特徴的な発現を示していた。我々は、ゲノム編集技術(TALEN, CRISPR/Cas9)を用い全ての S1PR (S1PR1, S1PR2, S1PR3a, S1PR3b, S1PR4, S1PR5a, S1PR5b)に対する機能欠損ゼブラフィッシュ変異体を作製した。S1PR2 単独変異体が二叉心臓の表現型を示したが、それ以外の変異体は初期発生過程に顕著な異常が認められなかった。次に、全ての組み合わせの S1PR 二重変異体を樹立し表現型解析を行った結果、S1PR3b-S1PR4 二重変異体が 4 日胚において造血細胞が減少することが観察された(図 1)。化学染色法による解析を行った結果、成熟した赤血球と好中球を示す染色が弱いことが明らかとなった。また、S1PR3b-S1PR4 二重変異体胚は、初期発生過程で造血細胞の数が減っていたが成魚まで生育できることが明らかにな

った。これらの結果は、他の S1PR による機能補完が機能している可能性を示唆していた。S1PR2 と S1PR5a が同じ LG3 にマップされ、S1PR1, S1PR3a と S1PR4 は同じ LG22 にマップされているので、樹立した S1PR 変異体を基盤に速効型 CRISPR/Cas9 法で S1PR 多重変異体を作製し、それらの表現型解析を行った。

(2) ゲノム編集技術による S1PR 多重変異体の樹立とそれらの機能解析

S1PR 変異体を基盤にした網羅的な S1PR 多重変異体の作製を行った結果、驚いたことに、S1PR2 を除く 6S1PR 多重変異体が成魚まで生育し世代交代が可能であることを見出した。最近、同じ遺伝子ファミリー間で機能補完が働く genetic compensation が見つかったがそれでは説明がつかない。これは、ゼブラフィッシュにおいては S1PR2 を除く S1PR が形態形成に必須ではない可能性も示唆していた。これに対し、全ての S1PR が破壊された 7S1PR 多重変異体は特徴的な形態形成異常を伴う胚性致死の表現型を示した。7S1PR 多重変異体を示す二又心臓の表現型は S1PR2 変異体と似ているが、心臓発生異常だけでなく尾部の底形成と造血細胞および血管細胞の発生異常が観察された(図 2)。これは、S1PR を介するシグナル伝達が尾部・血液血管発生を制御していることを示している。初期発生過程において赤血球の前駆細胞は体幹の動脈と静脈の間の領域で分化成熟し、動脈に侵入しながら循環系に移出する。7S1PR 多重変異体は血管の管腔形成に異常が認められ、赤血球前駆細胞の形成異常が認められた。化学染色法による解析でも、赤血球の分化異常が確認された。

WISH 法を用い組織特異的遺伝子の発現動態を解析することで、形態形成過程にどのような異常が認められるかを検討した。この解析過程で新規の組織特異的遺伝子である *cep55*, *cart-like*, *slurp-like1* および *slurp-like2* を単離し報告した。野生型と 7S1PR 変異体の間で発現動態を比較すると細胞周期遺伝子(*p53*, *baxa*, *cep55*)および神経発生遺伝子(*huC*, *cart-like*, *islet1*, *slurp-like1*)の発現に顕著な差は認められなかった。7S1PR 変異体において心臓発生遺伝子(*cmlc2*, *gata6*)の発現が両側に認められ二又心臓の表現型と一致した。7S1PR 変異体において血管発生遺伝子(*fli1a*)の発現不全を観察した。さらに、赤血球マーカー遺伝子(*klf17*, *gata1*)およびミエロイド系細胞マーカー遺伝子(*lysozyme C*, *mpo*)の発現が低下していることが明らかとなった。これらの結果は、S1PR を介する S1P シグナルがこれまで解析されていた心臓前駆細胞の移動の制御だけでなく、管腔形成を伴う血管発生や赤血球やミエロイド系細胞の分化・成熟における造血発生に必須の役割を担っていることを示している。

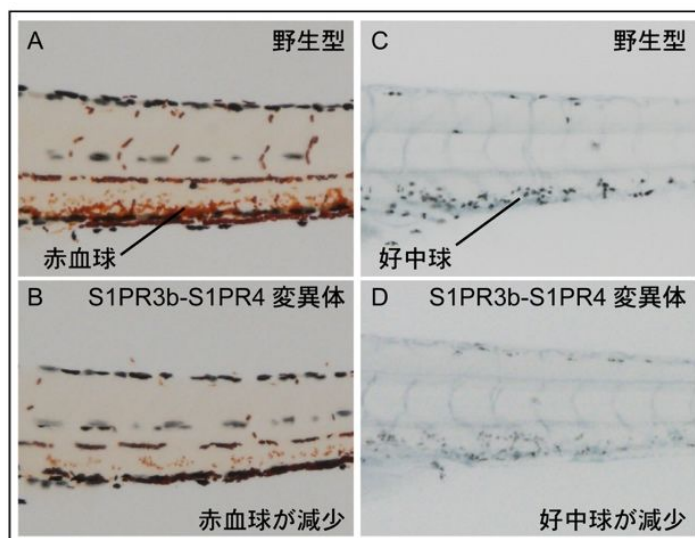


図 1. S1PR3b-S1PR4 変異体の表現型解析

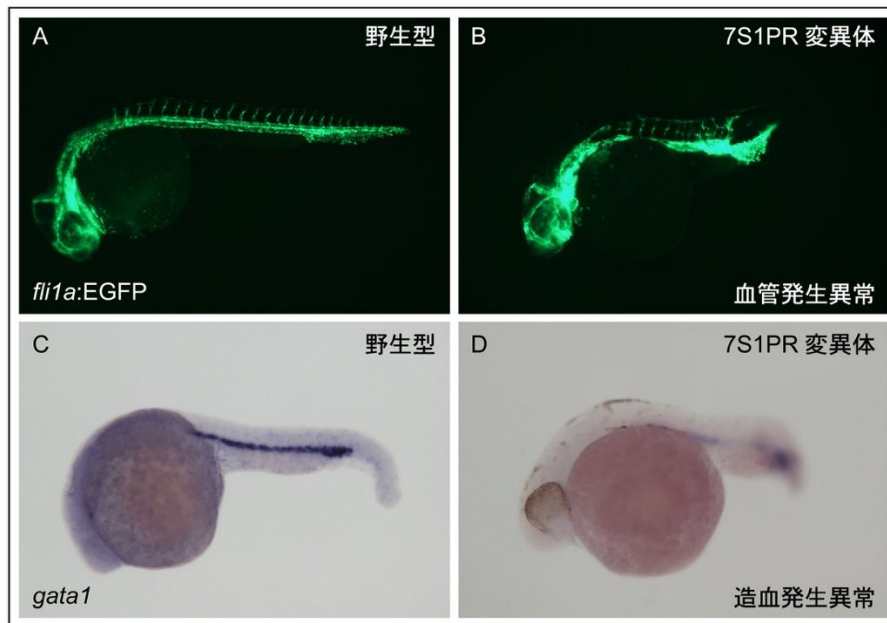


図 2. 7S1PR 変異体の表現型解析

(3) 考察および今後の研究方針

本研究では、ゲノム編集技術(TALEN, CRISPR/Cas9)を用い全ての S1PR を破壊した 7S1PR 変異体を作製し、その表現型解析を行った。S1PR2 変異体が二叉心臓の表現型を示すことから S1P シグナルが心臓前駆細胞の移動を制御していることは明らかであったが、7S1PR 変異体において尾部の低形成と造血細胞および血管細胞の発生異常が観察された。WISH 法を用いた組織特異的遺伝子の発現動態解析から、血管マーカー遺伝子(*fli1a*)の発現不全および赤血球 (*klf17*, *gata1*) とミエロイド系細胞 (*lysozyme C*, *mpo*)のマーカー遺伝子の発現が低下していることが明らかとなった。7S1PR 多重変異体は、血管の管腔形成に異常が見られることから、赤血球前駆細胞の形成異常との関連性が考えられた。造血細胞は血管細胞の近傍で分化・成熟が進行することから、造血細胞系譜を生成に重要な微小環境 (ニッチ) の機能異常を伴っている可能性が示唆された。本研究で明らかとなった S1P シグナルの造血発生における生理機能が哺乳類においても保存されているかを調べる必要がある。今後、7S1PR 変異体の機能解析から造血発生ニッチに関する新たな知見が得られることを期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kawahara A, Morita H, Yanagi K, Suzuki H, Mori T, Ohga R, Taimatsu K	4. 巻 30
2. 論文標題 Spatiotemporal expression of the cocaine- and amphetamine-regulated transcript-like (cart-like) gene during zebrafish embryogenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Gene Expression Patterns	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.gep.2018.08.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawahara A, Morita H, Yanagi K, Ishizuka T, Taimatsu K, Ohga R	4. 巻 30
2. 論文標題 Developmental expression of the slurp-like1/ly2.3/ly97.3 and slurp-like2/ly2.2/ly97.2 genes during zebrafish early embryogenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Gene Expression Patterns	6. 最初と最後の頁 32-36
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.gep.2018.08.006.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yanagi K, Sone R, Ohga R, Kawahara A	4. 巻 10
2. 論文標題 Involvement of the centrosomal protein 55 (cep55) gene in zebrafish head formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 642-649
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1111/gtc.12715.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Izuho Hatada, Atsuo Kawahara, Masahito Izawa, Masato Kinoshita, Taro Mito, Hiroshi Nagashima, Taichi Hoda, Sumihare Noji, Hiroshi Ochai, Asami Oji, Yuto Sakane, Tetsushi Sakuma, Yasunori Sasakura, Hideki Sezutsu, Takuma Sugi, Kenichi Suzuki, Takuya Tsubota, Masahiro Watanabe, Takashi Yamamoto, Keita Yoshida et al.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Humana Press	5. 総ページ数 245 (165-173)
3. 書名 Genome Editing in Animals	

1. 著者名 山本卓、佐久間哲史、川原敦雄、星島一幸、相田知海、伊川正人、刑部敬史、押村光雄、落合博、木下政人、佐々木えりか、佐藤守俊、鈴木賢一、長島比呂志、西増弘志、畑田出穂、藤井穂高、堀田秋津、真下知士、村中俊哉（他）	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 382 (221-234)
3. 書名 ゲノム編集実験スタンダード	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----