

令和 2 年 4 月 22 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14717

研究課題名(和文) 初期胚発生に必須なZfp281の胚体および胚体外組織形成における機能の解明

研究課題名(英文) Functional analysis of Zfp281 during early embryogenesis

研究代表者

石内 崇士 (Ishuchi, Takashi)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：80612100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：われわれ人を含む有胎盤哺乳類において、胎盤形成は次世代の生命の誕生およびライフサイクルの維持に欠かすことができない。本研究では、胎盤形成に重要と考えられる因子の同定を試み、その結果Zfp281を同定した。Zfp281はマウス生体内および培養下の胎盤幹細胞(TS細胞)において高発現し、その発現は分化とともに減少した。Zfp281のノックアウトマウスは胎生致死であり、早期の胎盤形成に大きな異常が認められた。Zfp281ノックアウトマウスおよびノックアウトTS細胞は転写パターンに異常を示したことから、Zfp281は転写調節を介して胎盤発生を制御することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

われわれ人を含む有胎盤哺乳類において、胎盤形成は次世代の生命の誕生およびライフサイクルの維持に欠かすことができない。しかしながら、胎盤発生を支持する遺伝子や分子機構の理解はあまりすすんでいない。そこで本研究では、胎盤発生に重要な遺伝子の同定を試み、その結果Zfp281を同定した。Zfp281は転写因子として機能し複数のターゲット遺伝子の発現調節を担うこと、さらに、Zfp281はヒストン修飾を担う分子複合体との相互作用を介してその機能を発揮することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Proper placental development is essential for mammalian reproduction. However, the molecular mechanisms underlying the placental development is poorly understood. In this study, we identified Zfp281 as a key factor. Zfp281 was preferentially expressed in mouse trophoblast stem (TS) cells in vivo and in vitro, and its expression was down-regulated upon differentiation. Zfp281 knockout mice showed embryonic lethality and severe defects in early placental development. The transcriptome of Zfp281 knockout embryos and TS cells in vitro displayed impaired patterns, suggesting that Zfp281 controls placental development through transcriptional regulation.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：胎盤発生 エビジェネティクス 転写因子

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胚体外胚葉は発生の進行に伴って多種の栄養芽細胞(トロホブラスト)を供給しつつ胎盤を形成していく。このような胎盤の正常な発生は哺乳類の胎児の発生、つまり次世代の生命の誕生に欠かすことのできない要素であるが、胎盤形成の基礎となる分子機構については詳細に理解されていない。過去に行われた研究により、TS細胞の形成やその未分化性の維持に必須な遺伝子がいくつか同定されている。そのうち Cdx2 遺伝子に代表されるような TS細胞の未分化性の維持に必須な遺伝子は、ES細胞に導入された場合に ES細胞を TS様細胞へと変化させることが報告されている(Niwa et al., Nat Genet 2000)。われわれは既知の遺伝子の他にも未だに解析がなされていない重要な遺伝子があるのではないかと考え、遺伝学的スクリーニングにより ES細胞を TS様細胞へと変化させる活性をもつ遺伝子を同定することを試み、その結果 Zfp281 転写因子を同定した。そして、以下の結果を得た。

- (1) Zfp281 遺伝子は過剰発現された場合に ES細胞を TS様細胞へと変化させる活性を示す。
- (2) Zfp281 は in vivo および in vitro の両方で未分化 TS細胞において高発現する。
- (3) Zfp281 ノックアウトマウスは胎生初期に胚体と胚体外組織の両方に発生異常を示す。

2. 研究の目的

本研究課題では、胚発生において重要な役割を担うことが示唆された Zfp281 についてより詳細な解析を行い、胚体組織へと分化する細胞と胚体外組織へと分化する細胞においてどのような機能的分離あるいは機能的共通性があるのかを明らかにすることを目的とした。しかしながら、本研究課題の採択後に、Zfp281 の胚体組織における機能を解析した論文が発表されたため(Huang et al., eLife 2017)、本研究では Zfp281 の胚体外組織における機能を重点的に解析することにした。

3. 研究の方法

本研究では主に以下に述べる方法を用いて研究を遂行した。

- (1) 胎盤幹細胞(TS細胞)において重要となる転写因子をマウス ES細胞に過剰発現した場合に、ES細胞が TS-like 細胞へと変換されることが知られていた。そこで、Zfp281 の ES細胞における過剰発現の効果を検討する。
- (2) Zfp281 ノックアウトマウスの表現型解析によって、生体内における Zfp281 の機能を探った。
- (3) Zfp281 ノックアウト TS細胞を樹立し表現型解析を行った。
- (4) RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行った。
- (5) ChIP-seq による Zfp281 のターゲット遺伝子の同定を行った。

4. 研究成果

(1) Zfp281 を ES細胞に過剰発現させ、その後 FGF を含む TS細胞培養用に培地を交換することで、Zfp281 が TS-like 細胞を産生する活性があるかを検討した。この実験系においては、TS細胞で特異的に発現する Elf5 遺伝子にハイグロマイシン耐性遺伝子をノックインを施したレポーター ES細胞を用いた。その結果、ポジティブコントロールとして用いた Cdx2 よりはかなり効果は弱いものの、Zfp281 の過剰発現で TS-like 細胞のコロニーが形成されることがわかった。さらに、qRT-PCR により、Zfp281 の過剰発現が、Cdx2 や Elf5 等の TS細胞に特異的に発現する遺伝子群の発現上昇を促すことが明らかとなった。また、Zfp281 は DNA 結合に重要な zinc finger モチーフを有するが、これを欠損させると、TS-like 細胞を生じさせる活性が消失したことから、Zfp281 の DNA 結合活性の重要性が示唆された。

(2) Zfp281 の TS細胞における内在性の発現を調べた。培養下における TS細胞では、Zfp281 は核内に集積していたが、一部分化した TS細胞においてはその発現が減弱していることが観察された。そこで、TS細胞を人為的に分化させたところ、Zfp281 の発現は時間依存的に減少した。TS細胞の未分化性維持には FGF シグナルと Activin シグナルが重要であることがわかってきたため、これらのシグナル経路の Zfp281 発現に与える影響を阻害剤を用いた実験により検討した。その結果、FGF シグナルをブロックした場合に Zfp281 の顕著な発現減少が見られた。このことから、Zfp281 の未分化 TS細胞における発現維持には FGF シグナルが貢献していることが明らかとなった。

(3) Zfp281 の生体内における発現を検討した。免疫染色により、Zfp281 は生体内の胎盤幹細胞に相当する E6.5 から E7.5 の胚体外胚葉において顕著に発現していたが、より分化のすすんだ胎盤系列の細胞ではその発現はほとんど認められなかった。このことから、Zfp281 は生体内においても未分化な胎盤幹細胞において高発現することがわかった。

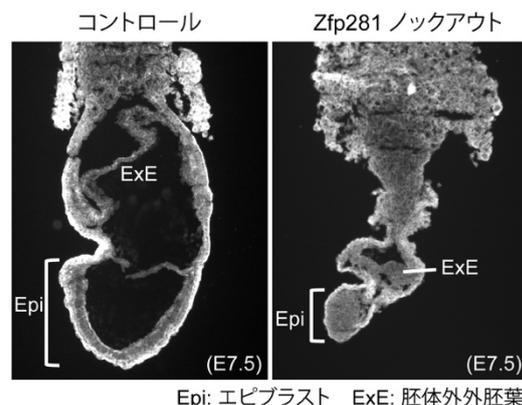


図1 E7.5 マウス胚における発生異常

(4) Zfp281 の機能を解明するために Zfp281 のノックアウトマウスを作製した。ノックアウトは、CRISPR-Cas9 システムを用いて行った。Zfp281 のヘテロ変異体同士の交配により、ホモノックアウトの個体が得られるかを検討したが、ホモノックアウトの仔は生まれなかった。このことから、Zfp281 のノックアウトマウスは胎生致死であると結論づけた。表現型をより詳細に調べるために、E6.5 から E9.5 までの胚の解析を行った。その結果、Zfp281 ノックアウトマウスは E8.5 から E9.5 のあたりで致死となっていることがわかった。さらに、E6.5 胚では一見して正常な形態を維持はしているものの、その大きさが小さく、さらに E7.5 胚においては、胚体外外胚葉の発生が著しく未発達なままとなっていることがわかった (図 1)。

(5) 観察された胎盤発生異常の背景を調べるために E8.5 のノックアウトマウスから胎盤部位を回収し、RNA-seq を行った。その結果、発現変化の見られる遺伝子のほとんどは発現現象を示し、その中には胚体外外胚葉に由来する絨毛膜 (chorion) や迷路層 (labyrinth layer) のマーカー遺伝子の発現が現象しており、ノックアウトマウスではこれらの部位が未発達であることと一致していた。また、キメラマウスを用いた実験から、Zfp281 の胚体外系列における発現が胚発生にとって必須であることが明らかとなった。

(6) Zfp281 ノックアウトマウスから TS 細胞を樹立し、RNA-seq 解析を行った。その結果、Zf281 の欠損により数多くの遺伝子の発現が変動することがわかった。興味深いことに、Zfp281 を欠損しても、TS 細胞の培養は問題なかったが、TS 細胞を分化させた際の分化マーカーの発現に異常が見られた。したがって、Zfp281 は、未分化 TS 細胞の維持そのものにおいては必須ではないが、分化能の維持には必要となる因子であることが示唆された。

(7) Zfp281 がどのように転写制御に関わるのかを明らかにするために、TS 細胞を用いて ChIP-seq を行った。その結果、Zfp281 は多くの遺伝子のプロモーターに結合することがわかった。また、Zfp281 ノックアウトにより発現低下する遺伝子のプロモーターにおいても Zfp281 の結合が見られたことから、Zfp281 は直接的にそれらの遺伝子の発現制御に関わることが示唆された。

(8) Zfp281 の結合部位とヒストン修飾との相関を調べた結果、Zfp281 は H3K4me1 および H3K4me3 の集積するゲノム領域に結合することがわかった。そこで、Zfp281 と H3K4 メチル化を担う MLL/COMPASS 複合体との相互作用を共免疫沈降法により検討したところ、Zfp281 がそれらと相互作用することが明らかとなった。

(9) マウスにおいて Zfp281 が胎盤発生に重要であることが示唆されたことから、Zfp281 のヒトホモログである ZNF281 の重要性についても検討することにした。培養下のヒト TS 細胞において ZNF281 をノックダウンしたところ、未分化 TS 細胞において高発現する遺伝子群が発現低下すること、さらに分化に応じて発現上昇する遺伝子群が発現上昇することを見出した。

以上の結果から、Zfp281 は転写制御を介して胎盤発生に寄与していると結論づけ、論文発表した (Ishiuchi et al., Cell Reports 2019)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishiuchi Takashi, Ohishi Hiroaki, Sato Tetsuya, Kamimura Satoshi, Yorino Masayoshi, Abe Shusaku, Suzuki Atsushi, Wakayama Teruhiko, Suyama Mikita, Sasaki Hiroyuki	4. 巻 27
2. 論文標題 Zfp281 Shapes the Transcriptome of Trophoblast Stem Cells and Is Essential for Placental Development.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1742-1754
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2019.04.028	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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takashi Ishiuchi
2. 発表標題 Zfp281 shapes the transcriptome of trophoblast stem cells and regulates placental development
3. 学会等名 第16回幹細胞シンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Ishiuchi, Hiroaki Ohishi, Tetsuya Sato, Shusaku Abe, Teruhiko Wakayama, Mikita Suyama, Hiroyuki Sasaki
2. 発表標題 Zfp281-dependent epigenetic and transcriptional regulation in trophoblast stem cells is essential for placental development
3. 学会等名 第12回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Ishiuchi
2. 発表標題 Epigenetic and transcription factor-mediated pathways in developmental regulation
3. 学会等名 IES meeting（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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
研究協力者	佐々木 裕之 (Sasaki Hiroyuki)		
研究協力者	若山 照彦 (Wakayama Teruhiko)		
研究協力者	須山 幹太 (Suyama Mikita)		
研究協力者	鈴木 淳史 (Suzuki Atsushi)		