

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 8 日現在

機関番号：84408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K06685

研究課題名(和文) 表皮形成時においてGrhl3 因子と相互作用するタンパク質の機能解析

研究課題名(英文) Identification of partner molecules that bind directly to GRHL3 factors during epidermal differentiation.

研究代表者

吉田 千春 (Yoshida, Chiharu)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪母子医療センター(研究所)・病因病態部門・主任研究員

研究者番号：60360666

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は神経管閉鎖時における表皮形成に二つの重要なプロセスがあると提唱してきた。まず「未分化外胚葉細胞から表皮細胞へ運命決定される」過程、それに続いて「特異な表皮細胞を作り出す」過程である。表皮形成のマスター因子Grhl3因子は、表皮細胞への運命決定時には核内局在し転写因子としてカノニカルWnt経路と作用する。その後表皮細胞内で、GRHL3因子は細胞質内へと局在を移し、ノンカノニカルWnt経路(PCP経路)と共に働き細胞骨格に富んだ特異な表皮細胞を形成する。そこで、これら結果を基盤にGrhl3因子の核から細胞質への移行に、どのような分子が関与しているのか解明を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が明らかにした一つの分子が核から細胞質へ局在を変えることで異なるシグナル経路を活性化し、細胞分化と細胞形態変化を制御するシステムは表皮に限らず、他の器官形成や癌、免疫においても同様な機序が働いている可能性がある。このシステムが明らかにできれば非常に新規性が高い知見となる。

一方、神経管閉鎖不全は外科的手術以外に治療法は無く、妊娠時の葉酸服用という予防的な医療が進められているが葉酸の補充では予防し得ない二分脊椎が存在し、現況以上の大幅な発症頻度の減少は期待出来ない。そこで本研究が遂行されることで神経管閉鎖不全症候群の新規な発症予防法・症状の軽減緩和方法に道を開くことを期待している。

研究成果の概要(英文)：We have proposed that there are two key processes in epidermal formation during neural tube closure. First, there is the “fate determination of undifferentiated ectodermal cells to epidermal cells,” followed by the “generation of specific epidermal cells. Grhl3 gene, the master factor for epidermal formation, is localized in the nucleus at the time of epidermal cell fate determination and interacts with the canonical Wnt pathway as a transcription factor. Subsequently, GRHL3 factor localizes to the cytoplasm and works with the non-canonical Wnt pathway (PCP pathway) to form specific epidermal cells rich in cytoskeleton. Based on these results, we aim to elucidate what molecules are involved in the migration of GRHL3 factor from the nucleus to the cytoplasm.

研究分野：発生生物学

キーワード：神経管閉鎖不全 脱ユビキチン酵素 マウス 表皮形成

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、神経管閉鎖時における表皮形成には二つの重要なプロセスがあること提唱してきた。最初は「未分化外胚葉細胞から表皮細胞へ運命決定される」過程と、それに続いて「特異な表皮細胞を作り出す」過程である（図1）。本申請課題では、後者の特異表皮細胞を作り出す過程で働く分子メカニズムについて解明することを目指している。これまでの研究成果から、表皮形成のマスター因子として働く *Grainyhead-like 3 (Grhl3)* は、表皮細胞への運命決定時には核内に局在し転写因子としてカノニカルWnt経路と作用する (Kimura-Yoshida *et al.*, 2015)。その後、誘導された表皮細胞で、GRHL3因子は細胞質内へと局在を移し、ノンカノニカルWnt経路と共に働くことで細胞骨格に

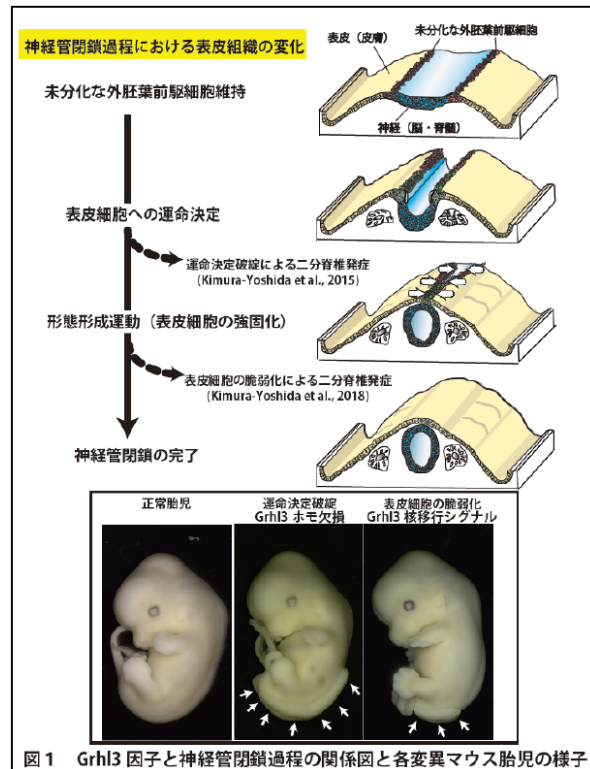


図1 Grhl3 因子と神経管閉鎖過程の関係図と各変異マウス胎児の様子

富んだ、強固な表皮細胞、「特異表皮細胞」を形成することを明らかにした (Kimura-Yoshida *et al.*, 2015, 2018) (図2)。しかし、GRHL3タンパク質の精密な核-細胞質の局在制御に関しては、全くその制御メカニズムについては不明であった。

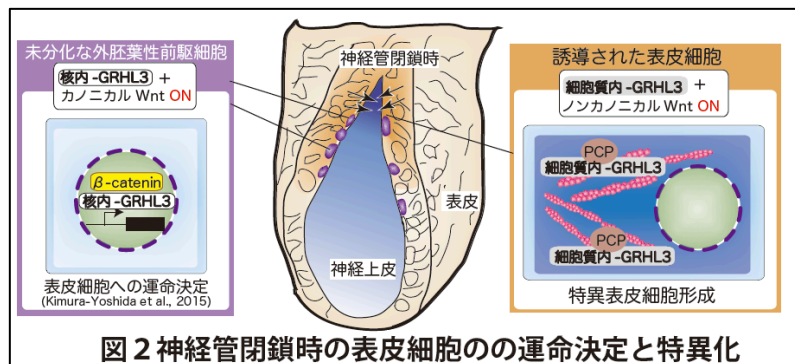


図2 神経管閉鎖時の表皮細胞の運命決定と特異化

2. 研究の目的

これらの結果を基盤に *Grhl3* 因子の核から細胞質への移行に、どのような分子が関与しているのか解明したい。本課題を遂行することで、細胞分化から、形態形成へ移行する間にどのようなシステムを使って、これら二つの過程を連動させているのか解明でき、新しい発生機構を明らかにできると考えている。

3. 研究の方法

細胞質のGRHL3と相互作用するタンパク質の同定

GRHL3因子の細胞質に局在するために必要なタンパク相互作用する因子の同定を行った。方法としては、GST-tagにGRHL3連結させたコンストラクトや、内在性GRHL3を直接認識するために特異的抗体を用いて免疫沈降させ、質量分析にて分子の同定を行った。具体的には、GRHL3全長cDNAに

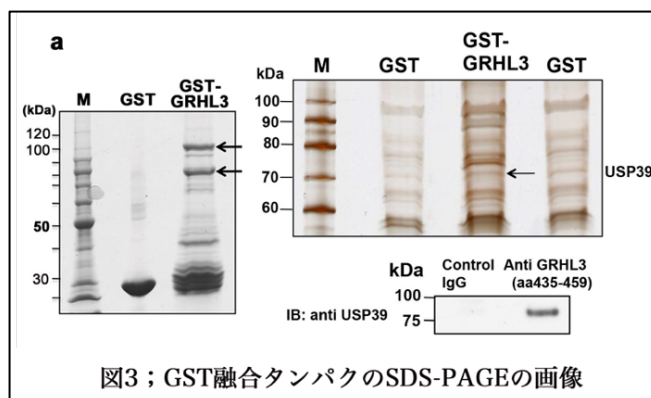


図3；GST融合タンパクのSDS-PAGEの画像

GSTタグをつけたコンストラクトを作製し、培養細胞に発現させ、担体に固定化してアフィニティカラムを作製した。その後、このカラムにGRHL3タンパクの核、細胞質の両領域で発現する表皮細胞株のエキストラクトを加えて相互作用するタンパク質を結合させた。その後アフィニティ精製により相互作用タンパク質を溶出させ、溶出させたタンパク質をSDS-PAGEにより分離、質量分析でタンパク質の同定を行った。得られたタンパク質がGRHL3タンパクと相互作用するのか、免疫沈降により確認を行った。

細胞質局在制御因子の機能解析

次に、GRHL3タンパクの核から細胞質への移行に関わる候補因子を数個に絞り、GRHL3因子の局在が、これら候補因子によって制御されているのか検討した。

上記実験結果から、GRHL3因子の局在を制御している可能性がある因子に対して、遺伝子欠損マウスを作製し、その表現型解析をおこなった。また、作製した遺伝子改変マウスとカノニカルWnt経路や、ノンカノニカルWnt経路関連因子欠損マウスらと交配させダブル変異マウスを作製し、どのような異常が見られるのか検証した。また核移行シグナルをロックインした *Grhl3* 遺伝子改変マウス (*Grhl3*^{NLS^{KI}}マウス; Kimura-Yoshida *et al.*, 2018) や *Grhl3* スル変異マウスらと、今回作製したマウスを交配させダブル変異マウスを作製し、表現型解析を行った。

4. 研究成果

細胞質のGRHL3と相互作用するタンパクの同定

GRHL3 タンパクと相互作用する因子の同定をおこなった結果、脱ユビキチン化酵素の一つである *ubiquitin specific peptidase 39 (Usp39)* が同定された。この遺伝子の発現解析をマウス初期胚を用いて検討した結果、原条形成時期である受精後 6.5 日目で既に胚全体で発現していることを確認した。

細胞質局在制御因子の機能解析

同定された *Usp39* 遺伝子が GRHL3 タンパクの細胞質局在に関与しているのか、*Usp39* ノックダウン細胞株 (*Usp39* siRNA) を用いて、GRHL3-EGFP の発現解析をおこなった (図4)。結果、GRHL3 タンパクが細胞質に局在するために必要な C 末側 (UB-like ドメイン) に蛍光タンパク EGFP を連結したコンストラクトでは、本来細胞質で局在する EGFP タンパクが、*Usp39* siRNA によって核へと局在を変えることがわかった (図4)。このことから、*Usp39* 因子は GRHL3 タンパクの細胞質に局在するための制御に関わっていることが明らかとなった。

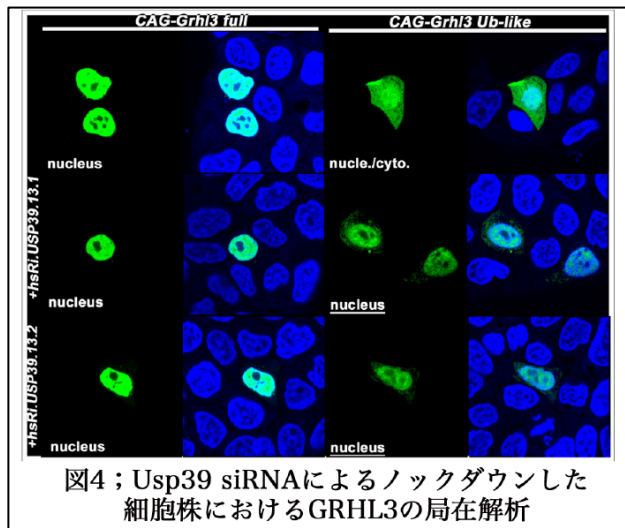


図4 ; *Usp39* siRNA によるノックダウンした細胞株における GRHL3 の局在解析

さらに、*Usp39* 遺伝子の生体内における機能を明らかにするため、*Usp39* 遺伝子欠損マウスを作製した (図5)。*Usp39* 欠損マウス胚では、原条形成時期 (中胚葉形成時期; 受精後6.5日) 頃には、野生型胚と比較し明らかな形成異常が見られることがわかった (図5)。野生型で見られる中胚葉形成が、*Usp39* ホモ変異胚では見られず、胚性領域が小さく退縮していることがわかった (図5)。

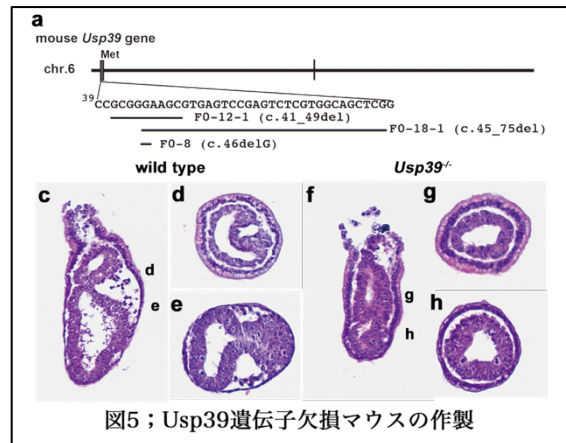


図5 ; *Usp39* 遺伝子欠損マウスの作製

最後に、作製した *Usp39* 因子とノンカノニカル Wnt 経路 (PCP 経路) との関与を検証するため、*Usp39* と PCP 経路関連マウスなどを交配し、ダブル変異マウスの作製をおこなった (図6)。結果、*Usp39* 遺伝子欠損マウスと各変異胚 (*Grhl3* スル変異マウス、*Grhl3*-NLS (核移行シグナル) ノックインマウス、*Vangl2* 変異マウスなど) を交配させることによって、PCP 関連変異マウスで見られる形成異常が、

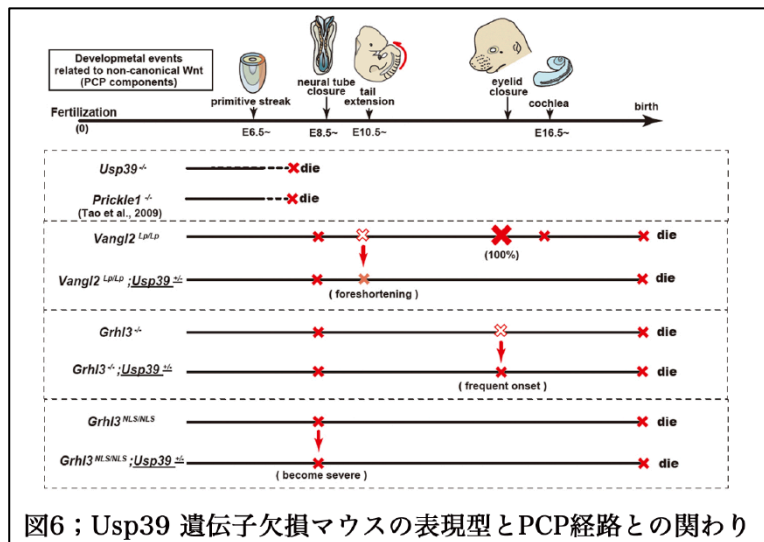


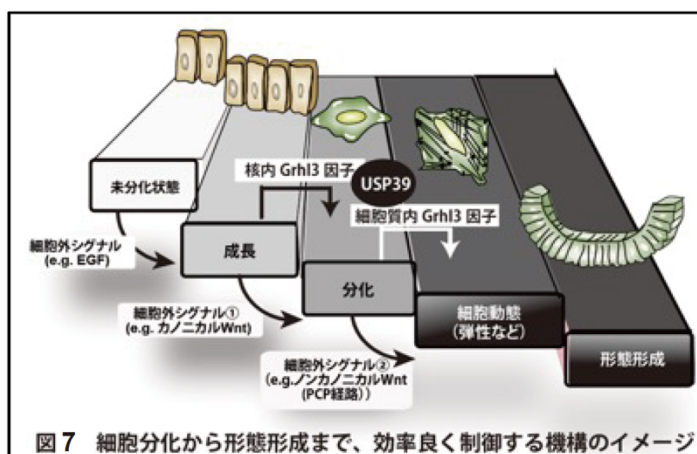
図6 ; *Usp39* 遺伝子欠損マウスの表現型と PCP 経路との関わり

さらに重篤化することがわかった (図6)。このことは、Usp39因子がPCP経路に対して活性化するための機能を持つことを意味する。

以上の結果から、GRHL3因子と相互作用するタンパクとして同定されたUSP39因子はGRHL3の細胞質局在を制御し、その結果、PCP経路の安定的な伝達に作用していることが示唆された (Kimura-Yoshida *et al.*, 2023)。

5. 考察

これら実験結果から、表皮形成に重要な役割を持つGRHL3因子が核から細胞質へと移行させることで、協調的に働くシグナル経路を自在に変えるといった新たなシステムを提示することができた。つまり、一つの分子 (GRHL3因子な



ど) がその局在を変えることで、未分化状態→分化→細胞動態を変える、という一連の形態形成をスムーズに移行させる新規メカニズムであると考えている (図7)。

これら知見は、表皮形成におけるGRHL3因子の機能解析に限らず、他の因子においても起こり得るメカニズムであり、例えば癌の進行・転移、神経発生など様々な生命現象にこの分子機序が存在しているのではないかと考えている。今後さらに他の分野の研究発展が期待される。

引用文献

Kimura-Yoshida, C., Mochida, K., Ellwanger, K., Niehrs, C., and Matsuo I. Fate specification of neural plate border by canonical Wnt signaling and *Grhl3* is crucial for neural tube closure. *EBioMedicine* **2**, 513-527 (2015).

Kimura-Yoshida, C., Mochida, K., Nakaya, M. A., Mizutani, T and Matsuo I. Cytoplasmic localization of GRHL3 upon epidermal differentiation triggers cell shape change for epithelial morphogenesis. *Nat. Commun.* **9**, 4059 (2018)

Kimura-Yoshida, C., Mochida, K., Kanno, S., Matsuo, I. *USP39* is essential for mammalian epithelial morphogenesis through upregulation of planar cell polarity components. *Communications biology.*, **5**, 378 (2022).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Isao Matsuo, Chiharu Kimura-Yoshida, Yoko Ueda.	4. 巻 377
2. 論文標題 Developmental and mechanical roles of Reichert's membrane in mouse embryos	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Philos Trans R. Soc Lond B Biol Sci.	6. 最初と最後の頁 20210257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1098/rstb.2021.0257	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 Kimura-Yoshida C, Mochida K, Kanno SI, Matsuo I.	4. 巻 378
2. 論文標題 USP39 is essential for mammalian epithelial morphogenesis through upregulation of planar cell polarity components	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03254-7	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 -
1. 著者名 Tsume-Kajioka M, Kimura-Yoshida C, Mochida K, Ueda Y, Matsuo I.	4. 巻 64
2. 論文標題 BET proteins are essential for the specification and maintenance of the epiblast lineage in mouse preimplantation embryos.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Biology.	6. 最初と最後の頁 1-25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12915-022-01251-0	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 -
1. 著者名 Matsuo I, Kimura-Yoshida C.	4. 巻 2303
2. 論文標題 Identification of Cell Autonomous and Non-Cell Autonomous Functions of Heparan Sulfate Glycosaminoglycan Chains by Creating Chimeric Mouse Embryos	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods in molecular biology.	6. 最初と最後の頁 579-593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1398-6_44.	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 -

1. 著者名 Ueda, Y., Kimura-Yoshida, C., Mochida, K., Tsume, K., Kameo, Y., Adachi, T., Lefebvre, O., Hiramatsu, R., Matsuo, I.	4. 巻 19
2. 論文標題 Intrauterine Pressures Adjusted by Reichert's Membrane Are Crucial for Early Mouse Morphogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Report.	6. 最初と最後の頁 107637
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.107637.	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 該当する

1. 著者名 Kitadate Y, Jorg D. J. Tokue M., Maruyama A., Ichikawa R., Tsuchiya S. Segi-Nishida E., Nakagawa T., Uchida A., Kimura-Yoshida C., Mizuno S., Sugiyama F., Azami T., Ema M., Noda C., Kobayashi S., Matsuo I., Kanai Y., Nagasawa T., Sugimoto Y., Takahashi S., Simons B. D., Yoshida S.	4. 巻 24
2. 論文標題 Competition for Mitogens Regulates Spermatogenic Stem Cell Homeostasis in an Open Niche	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell	6. 最初と最後の頁 79 ~ 92.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stem.2018.11.013	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 該当する

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 木村-吉田千春、持田京子、菅野新一郎、松尾勲
2. 発表標題 哺乳動物の上皮形成過程において、脱ユビキチン化酵素USP39因子は平面内極性(PCP経路) 構成因子を活性化することで機能する
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 (幕張メッセ)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoko Ueda, Chiharu Kimura-Yoshida, Kyoko Mochida, Mami Tsume, Yoshitaka Kameo, Taiji Adachi, Lefebvre Olivier, Ryuji Hiramatsu, Isao Matsuo
2. 発表標題 Principles in the symmetry breaking in animal and plant development Embryo shape change from sphere to egg-cylinder mediated by intrauterine pressures is crucial for mouse primary axis formation.
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 MBSJ2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 爪麻美、木村 - 吉田千春、上田陽子、持田京子、松尾勲
2. 発表標題 BRD4はJAK/STAT標的遺伝子の転写活性化を介してマウス着床前胚におけるエピプラストの特異化に必要である
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 MBSJ2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村 吉田 千春、上田 陽子
2. 発表標題 マウス胚を用いた力学測定の実践
3. 学会等名 日本動物学会関東支部 第73回大会 公開シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Isao Matsuo, Chiharu Kimura-Yoshida, Yoko Ueda
2. 発表標題 Intrauterine mechanical environment produced by smooth muscle contractions for early mouse morphogenesis
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 第98回日本生理学会大会 合同大会 細胞・組織のメカニクス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ueda Y., Kimura-Yoshida C., Matsuo I.
2. 発表標題 マウス胚卵円筒形成に必要な子宮内の力学的環境
3. 学会等名 第52回日本発生生物学会大会 (大阪) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kimura-Yoshida C., Mochida K., Nakaya M., Mizutani T., Matsuo I.
2. 発表標題 GRHL3タンパクの細胞質における局在が上皮細胞の分化過程から形態形成過程へと進行させる
3. 学会等名 第52回日本発生物学会大会 (大阪)
4. 発表年 2019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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関