

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H00444

研究課題名(和文) マウスリソース開発が解明する胚葉形成と選択的スプライシングの生物機能

研究課題名(英文) Biological functions of alternative splicing on mouse gastrulation

研究代表者

杉山 文博 (Sugiyama, Fumihito)

筑波大学・医学医療系・特命教授

研究者番号：90226481

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,700,000円

研究成果の概要(和文)：原腸胚の各胚葉を可視化するMIERUマウスより高品質な胚性幹(Embryonic Stem, 以下ES)細胞を樹立した。四倍体胚とMIERU-ES細胞の胎齢7.5日および9.5日のキメラ胚は、正常な形態と期待通りのレポーター遺伝子の発現を示し、キメラ胚の満期産子も回収可能であった。このES細胞をもちいてRNA結合タンパクをコードする11遺伝子をそれぞれ欠損させたKO-MIERU-ES細胞を作出した。そのそれぞれからキメラマウス胚を作出し、その胚体内胚葉のトランスクリプトームのデータを得た。そのデータにおいて、各RNA結合タンパクの類似性や特異性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

選択的スプライシングとは、単一の遺伝子から複数種のmRNAを産生させることを可能にし、膨大な分子の多様性を作り出す極めて重要な機構である。選択的スプライシングは器官の発達に関わる。従って、スプライシングバリエーションの網羅的な理解がなくては、真の意味での組織や器官の発達の分子メカニズムの解明はない。しかしながら、原腸胚におけるスプライシングバリエーションの機能的意義は解明されていない。本研究にて、我々は各RNA結合タンパクによって制御される発生関連遺伝子を特定するとともに、各RNA結合タンパクの標的類似性と特異性を明らかにした。この成果は、遺伝子よりも更に細かい単位での胚発生の理解に貢献する。

研究成果の概要(英文)：High quality ES cells were established from MIERU mice visualizing each germ layer of the gastrula. Chimeric embryos of E7.5 and E9.5 derived from tetraploid embryos and MIERU-ES cells showed normal morphology and expression of reporter genes as expected, and a chimeric newborn could be obtained. Using these ES cells, KO-MIERU-ES cells were generated, each lacking 11 genes encoding RNA-binding proteins. Chimeric mouse embryos were generated from each of them, and transcriptome data of the definitive endoderm of the embryos were obtained. In the data, we found the similarity and specificity of each RNA-binding protein.

研究分野：実験動物学

キーワード：遺伝子改変マウス ゲノム編集 胚発生

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

選択的スプライシングとは、遺伝子発現制御機構のひとつであり、単一の遺伝子から複数種の mRNA を産生させることを可能にし、限られた数の遺伝子から、膨大な分子の多様性を作り出す極めて重要な機構である。ヒトの遺伝子の約 90~95%は選択的スプライシングを受ける。その内の 35%程度の遺伝子から多様なタンパク質アイソフォームが産生されると推定され、リーディングフレーム変更・mRNA の安定性・翻訳への影響などで機能が異なる多様なタンパク質アイソフォームが生成される。現在、選択的スプライシングは細胞の分化や細胞系譜の決定、器官の発達に関わることが知られている。従って、スプライシングバリエントの網羅的な理解がなくては、真の意味での組織や器官の発達の分子メカニズムの解明はない。しかしながら、原腸胚におけるスプライシングバリエントの機能的意義は解明されていない。その理由は、*in vivo*での胚葉特異的にエクソンの組み合わせまで理解できるトランスクリプトーム解析とその機能的証明が容易ではないためである。マウスにおいて選択的スプライシングに関わるスプライシング調節因子、Ptp1 (polypyrimidine tract binding protein 1)、Srsf2 (serine/arginine-rich splicing factor 2)、Srsf3、Elof1 (ELF1 homolog, elongation factor 1)などをノックアウト (KO)すると、胚齢 7.5 日 (E7.5)以前で胚発生が停止し、致死を起こすことが報告されている。さらに我々は、公開されている複数のデータベース内でも、複数の RNA 結合タンパク (RBP) 遺伝子 KO マウスで原腸形成異常が生じおり、胚葉形成における選択的スプライシングの重要性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、胚葉形成における選択的スプライシングの機能的意義を網羅的に解明することを目的とした。そのため、胚葉可視化 RBP ノックアウトマウスの原腸胚の胚葉特異的なトランスクリプトームデータベースを構築し、表現型との比較から胚葉形成に重要なスプライシングバリエントを抽出した。

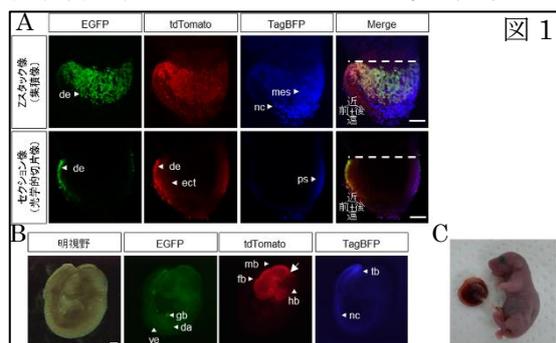
3. 研究の方法

我々は原腸胚の各胚葉を可視化する MIERU マウスを開発し (Exp Anim. 2019 Nov 6;68(4):499-509. doi: 10.1538/expanim.19-0031.)、外胚葉、内胚葉、原始線条 (中胚葉) に分化した細胞集団を異なる蛍光で分取可能とした。受精卵ゲノム編集はモザイクの可能性を完全に排除できないため、この MIERU マウスより高品質な胚性幹 (Embryonic Stem, 以下 ES) 細胞を樹立し、この MIERU ES 細胞にて RBP をそれぞれ KO した MIERU RBP-KO ES 細胞を樹立する戦略とした。各 MIERU RBP-KO ES 細胞を 4 倍体補完法によりキメラ胚へと発生させ、蛍光を指標に分取した標的胚葉細胞集団をトランスクリプトーム解析した。

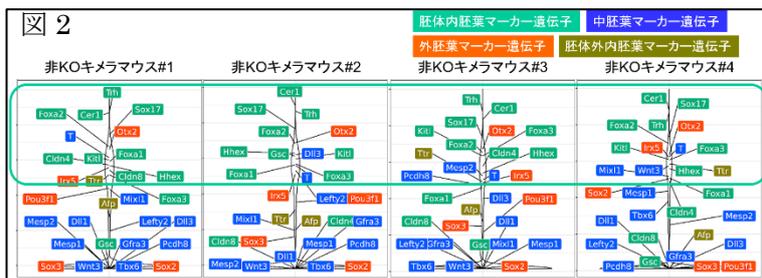
4. 研究成果

受精卵ゲノム編集では意図しない変異やモザイクの可能性を除けない。一方、ES 細胞内のゲノム編集では、個体化前の遺伝型解析により様々な変異をもつ不均一な細胞集団から目的の変異をもつ細胞を特定し選択的に用いることができる。また、四倍体の宿主胚と ES 細胞と凝集させる四倍体補完法により、三胚葉を含む胚のエピブラスト由来の細胞の供給源が ES 細胞のみである胚をファウンダー世代で解析することも可能となる。そこで MIERU-ES 細胞の樹立を試みた。ホモ接合型 MIERU マウスから精子および未受精卵を回収し体外受精させ、得られた 124 個の 2 細胞期胚を胚盤胞期まで培養した。正常に胚盤胞まで発生した 53 個の胚をフィーダー細胞上に播種した。出現した内部細胞塊由来の細胞を 2i/LIF 法で継代し増殖させることで、8 株の MIERU-ES 細胞が樹立された。MIERU-ES 細胞#30 は 8 株の中で最も高い増殖速度を示したことから、この株を以降の実験に使用することとした。

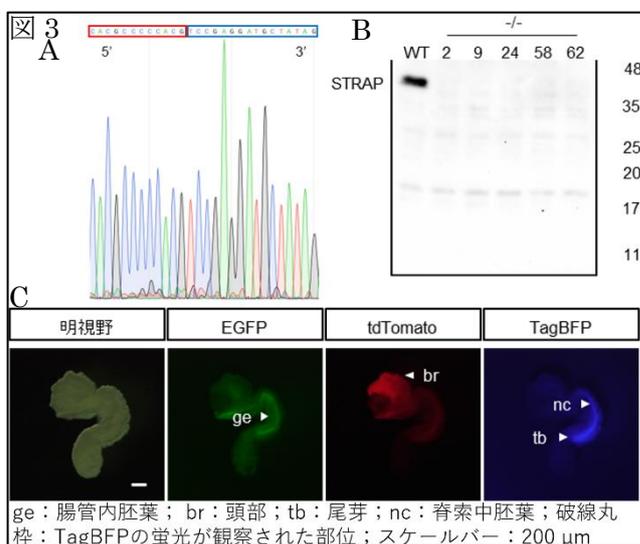
MIERU-ES 細胞の多能性を確認するため、その多能性を確認する最も厳格な方法である四倍体補完法によるキメラマウス作製を行った。四倍体胚と MIERU-ES 細胞#30 の胎齢 7.5 日のキメラ胚は、明視野の観察像において早期原始線条期から後期頭摺期の正常な形態を示した。蛍光観察でもキメラ胚は、3 種類のレポーター遺伝子がそれぞれ胚葉特異的な部位で確認された。共焦点顕微鏡解析でも解析した全ての胚が正常な形態と期待通りのレポーター遺伝子の発現を示した (図 1A)。胎齢 9.5 日のキメラ胚でも正常な形態とレポーター遺伝子の発現を示した (図 1B)。キメラ胚の満期産子も回収可能で、この胎仔は胎盤も形成された (図 1C)。以上の結果は、MIERU-ES 細胞はキメラ胚にて三胚葉の蛍光レポートが可能で、出生まで発生できるほど十分な多能性をもつことを示唆する。



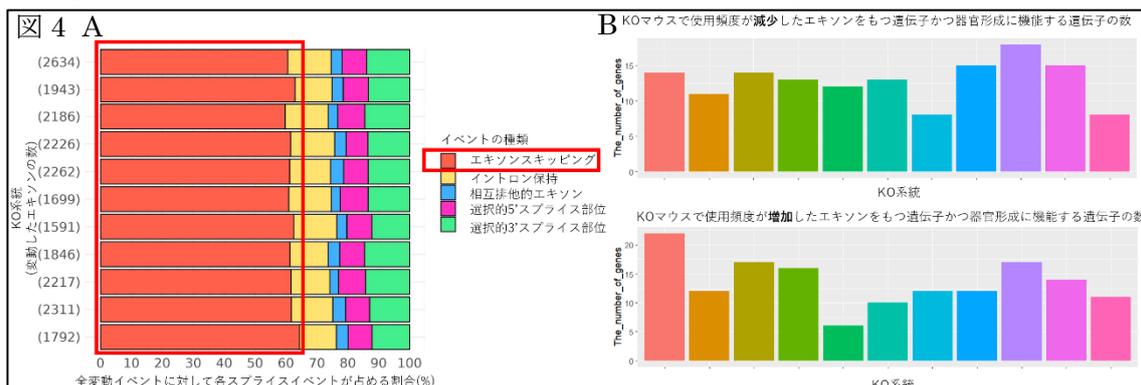
次に、標的とする胚葉のトランスクリプトーム解析プラットフォームの構築を試みた。単一の非KOキメラマウス原腸胚を一細胞化し、三胚葉可視化マウスES細胞に由来する蛍光を指標として標的の細胞集団を分取後、RNA-seqを実施した。この実験にて、最も高精度で分取できる胚葉が胚体内胚葉であることが分かり、これ以降の研究では胚体内胚葉を解析対象にすることとした。実際に回収された細胞集団を用いて、胚体内胚葉のトランスクリプトームを解析できたかを確認するため、回収した細胞で発現する全遺伝子に基づいたプロットを描画し、各胚葉のマーカー遺伝子を可視化した(図2)。他の胚葉のマーカー遺伝子群は低発現である一方、図2の緑枠のとおり、胚体内胚葉のマーカー遺伝子群は高発現を示した。この結果は検討した全4個体で同様であったため、本プラットフォームは胚体内胚葉のトランスクリプトーム解析に有用であると考えた。



トランスクリプトーム解析プラットフォームが確立できたため、次に、データベースを活用して、器官形成期に胚性致死を示す遺伝子の中から、RNA スプライシングまたは RNA 結合タンパク質に特に強く関わる 11 種類の遺伝子を抽出した。その後、MIERU-ES 細胞#30 でのゲノム編集で、各候補遺伝子 KO した。そのうちのひとつが *Strap* 遺伝子で CRISPR/Cas9 による遺伝子破壊マウス作製の webtool である K0nezumi を用いて 2 種類の gRNA を設定した。その sgRNA と Cas9 タンパク質をそれぞれ発現する *pX330-C Strap Target L* と *pX459 Strap Target R* を MIERU-ES 細胞#30 にトランスフェクションし、*Strap* のエキソン 2 を除去された *Strap* KO-MIERU-ES を作製した。サンガーシーケンス解析にて期待通りにエキソン 2 が欠失していること(図3A)、ウェスタンブロッティング解析にて STRAP タンパクの発現がないことを確認した(図3B)。この *Strap*^{-/-}-MIERU-ES を用いた四倍体補完法を実施し、*Strap* の全身性遺伝子破壊マウスにて既に形態学的異常があると報告されている胎齢 9.5 日において、キメラ胚を観察した結果、期待通りの異常表現型と蛍光レポーター発現が確認された(図3C)。この手法にて全 11 の KO-MIERU-ES 細胞を作出した。



四倍体補完法を組み合わせて、それぞれの KO-MIERU-ES 細胞に由来する KO キメラマウスシリーズを作製した。続けて、各 KO 系統で胚体内胚葉の細胞分取と RNA-seq (SMART-Seq) を実施し、得られたトランスクリプトームのデータから、非 KO 系統と比較して変動したスプライシングを抽出した。各 KO キメラの胚体内胚葉においてはおよそ 1500 から 2500 程度のスプライシングの変動が確認された。次に選択的スプライシングをイベントの種類ごとに分類した結果、どの系統においても、選択的エキソンの包含/除去を制御するエキソンスキッピングの変動が最も多く生じることが明らかとなった(図4A)。各 KO キメラの胚体内胚葉においてエキソンスキッピングが生じた遺伝子のうちに、器官形成に重要な遺伝子が含まれるかを解析した結果、KO において使用頻度が減少/増加した器官形成関連遺伝子がいずれの KO キメラにおいても認められ、その数はいずれも 5~20 程度とあまり差がないことが明らかになった(図4B)。



今後、これらの遺伝子におけるエキソンの機能的な重要性を確認していく予定である。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Dinh TTH, Iseki H, Mizuno S, Iijima-Mizuno S, Tanimoto Y, Daitoku Y, Kato K, Hamada Y, Hasan ASH, Suzuki H, Murata K, Muratani M, Ema M, Kim JD, Ishida J, Fukamizu A, Kato M, Takahashi S, Yagami KI, Wilson V, Arkell RM, Sugiyama F	4. 巻 10
2. 論文標題 Disruption of entire Cables2 locus leads to embryonic lethality by diminished Rps21 gene expression and enhanced p53 pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e50346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.50346	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 鈴木颯、村田知弥、大徳陽子、濱田優子、谷本陽子、水野聖哉、杉山文博
2. 発表標題 三胚葉形成を可視化するトリプルノックインレポーターシステムの開発
3. 学会等名 第69回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hayate Suzuki, Kazuya Murata, Yoko Daitoku, Yoko Tanimoto, Seiya Mizuno, Fumihiro Sugiyama
2. 発表標題 Establishment of triple knock-in reporter system to evaluate of three germ layers formation in mouse embryos
3. 学会等名 36th International Mammalian Genome Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木颯、濱田優子、谷本陽子、村田知弥、水野聖哉、杉山文博
2. 発表標題 三胚葉を同時に可視化するES細胞の作製
3. 学会等名 第94回日本生化学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hayate Suzuki, Tra Thi Huong Dinh, Yoko Daitoku, Kanako Kato, Yoko Tanimoto, Kazuya Murata, Seiya Mizuno, Fumihiro Sugiyama
2. 発表標題 A novel creation of reporter mouse model for visualizing germ layer formation
3. 学会等名 第54回日本発生生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木颯、Thi Huong Dinh Tra、大徳陽子、加藤花名子、谷本陽子、村田知弥、水野聖哉、杉山文博
2. 発表標題 三胚葉形成の評価に有用なES細胞の作製
3. 学会等名 第68回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>哺乳類の胎児発生に必要な遺伝子座を発見～Cables 2 と隣接遺伝子の不思議な関係～ https://www.tsukuba.ac.jp/journal/biology-environment/20210512140000.html 研究トピックス chrome-extension://efaidnbmnmbpccajpcgiclfindmkaj/https://www.md.tsukuba.ac.jp/top/data/current/img_current_topics82.pdf</p>

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
研究分担者	村田 知弥 (Murata Kazuya) (60713485)	筑波大学・医学医療系・助教 (12102)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	久野 朗広 (Kuno Akihiro) (60830122)	筑波大学・医学医療系・助教 (12102)	
研究分担者	水野 聖哉 (Mizuno Seiya) (10633141)	筑波大学・医学医療系・教授 (12102)	

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