

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09839

研究課題名(和文) RNA結合タンパク質Quakingによる網膜初期発生の分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular Mechanism of Early Retinal Development by the RNA-binding Protein Quaking

研究代表者

森藤 暁 (Moritoh, Satoru)

立命館大学・薬学部・助教

研究者番号：20647234

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：RNA結合タンパク質Quaking (Qki)の網膜における機能解析のため、本研究で、CRISPR/Cas9法により、Qki破壊ES細胞株を作出し、3次元網膜分化させたところ、Rx-GFP陽性の網膜前駆細胞が分化し、眼胞様構造が観察されたため、Qkiが網膜初期発生前に必須ではないことがわかった。また、個体レベルでの機能解析のため網膜特異的Qki コンディショナルノックアウトマウスを作製し、免疫染色による組織解析を行ったところ、Qkiを網膜特異的にノックアウトできていることがわかった。現在、さらに詳細な解析を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究でのRNA結合タンパク質Quakingに着目した網膜発生の個体レベルでの機能解析により、網膜発生や分化の理解が深まることで、将来的に網膜分化系の改良など再生医療や創薬のための重要な基礎研究となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：To analyze the function of the RNA-binding protein Quaking (Qki) in the retina, we generated Qki-disrupted ES cell lines by the CRISPR/Cas9 method and differentiated them into 3D retinal cells. Rx-GFP positive retinal progenitor cells differentiated and an optic vesicle-like structure was observed, unlike in the Qki knockdown experiment. These results indicate that, contrary to initial expectations, Qki is unlikely to be involved in early retinal developmental stages such as retinal progenitor cell formation and optic vesicle formation. Therefore, for functional analysis at the in vivo level, retina-specific Qki conditional knockout (CKO) mice were generated by crossing Qki flox mice with retina-specific Cre mice, and histological analysis by immunostaining revealed that Qki was knocked out in the retina-specific manner. We are currently conducting a more detailed analysis.

研究分野：眼科学

キーワード：マウス 網膜 3次元網膜 Quaking コンディショナルノックアウト

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Quaking(Qki)は、RNA 結合タンパク質として知られ、選択的スプライシング、Circular RNA の産生、microRNA のプロセッシング、mRNA の翻訳など RNA 代謝の様々な過程に機能している。遺伝子ノックアウトマウスが胎生致死となること、オリゴデンドロサイトなどのグリア細胞分化に重要な役割を果たすことで知られている。Qki は、上皮間葉転換(EMT)においても、全 Circular RNA の 1/3 の生成を制御するなど、細胞形質転換に重要な働きを果たすことが明らかとなり、がんや自閉症などとのヒト疾患とのかかわりも示唆されている。本研究代表者の所属する立命館大学薬学部神経発生システム研究室(小池千恵子教授/本研究分担者)では、Qki の網膜発生における詳細な発現パターンを解析し、網膜において主に網膜前駆細胞とミュラーグリア細胞において発現していることを明らかにしている(Suiko *et al.* 2016)。本研究代表者らは、網膜における機能解析のため、3次元網膜において Qki ノックダウン実験を行っており、マウス Qki が網膜初期発生に重要な機能を持つ可能性を示唆する予備的な結果を得ていた。

2. 研究の目的

現在までに網膜における Qki の機能解析の報告はないため、Qki 遺伝子の網膜発生における役割を明らかにすることを本研究の目的とする。このため、ES/iPS 細胞からの 3次元網膜分化法を用いた、試験管内で生体内の網膜発生を模倣することができる実験系を用いた解析を進めるとともに、マウス個体でのレベルでの機能解析のために、Qki を網膜特異的に欠損させたコンディショナルノックアウト(cKO)マウスでの解析を行う。

3. 研究の方法

本研究では、網膜発生の分子機構の解明のため、これまでに網膜における機能解析の報告がない Qki 遺伝子に着目し研究する。迅速な遺伝子機能解析のため、個体に比べて遺伝子改変が容易な ES/iPS 細胞からの 3次元網膜分化法を中心技術として用いる。また、Qki flox マウスを入手し、コンディショナルノックアウト(cKO)マウスによる個体での解析を実施する。

4. 研究成果

令和2年度

これまでに、レンチウイルスにより、Qki が強くノックダウンされたマウス ES 細胞株のクローン1株については、3次元立体網膜分化法により網膜へと分化させると、眼胞形成以前で発生が停止するという表現型が得られている。この表現型が Qki のノックダウンによって得られることを証明するため、本年度は、さらに複数の Qki ノックダウンクローンを得ることを試みた。マウス ES 細胞株へのレンチウイルスのノックダウンベクターの感染実験を行った結果、複数の感染クローンが得られたが、ウエスタンブロット解析により Qki の発現抑制のレベルが十分でなく、これらのノックダウンクローンは眼胞期を越えて網膜へと分化し、Qki のノックダウンが網膜初期発生に影響するのかどうかについては、はっきりとした結論を得ることができなかった。また、Qki が強くノックダウンされたクローンに、レンチウイルスで、shRNA 耐性変異を導入した Qki cDNA を CMV プロモーターで過剰発現させるために、感染実験を行い、いくつかの得られたクローンで、ウエスタン解析を行ったが、CMV プロモーターがサイレンシングされやすいためか、顕著に Qki が過剰発現したクローンは得られず、3次元網膜にも分化させてみたが、眼胞形成以前で発生が停止しており、表現型がレスキューされる結果は得られなかった。そこで、ノックダウンではなく、CRISPR/Cas9 により、ノックアウトクローンを作製することを試みることにした。Qki をターゲットにした CRISPR/Cas9 プラスミドを作製し、エレクトロポレーションによって、マウス ES 細胞株 EB5 に導入し、シングルコロニーのコロニーピックアップ後、Qki 抗体でウエスタンブロットを行ったところ、複数株のマウス ES 細胞株のノックアウトクローン候補が得られた。

令和3年度

CRISPR/Cas9 法により、令和2年度で行った実験で、マウス ES 細胞株で、Qki ノックアウトクローンを最終的に1クローン単離することができた。このクローンから、タンパク質、DNA の回収を行い、ウエスタン解析・シーケンズ解析によって Qki 遺伝子の破壊の確認を行ったところ、このクローンにおいて Qki のノックアウトが確認された。この株においては、細胞増殖能は、野生型と同様で、Nanog や Oct4 といった幹細胞の未分化マーカーが発現していることから、この株は未分化維持されており、通常の ES 細胞と同様に増殖することが分かった。この Qki ノックアウトクローンを3次元網膜に分化させたところ、初回は、網膜様構造への分化が停止するという表現型を得たが、2回目以降は、網膜様構造が観察され、野生型細胞が混入したためかなど、3次元網膜の表現型についてははっきりとした結論がだせなかった。このため、別の Qki ノックアウトクローンの単離を行うことにした。また、Qki KO マウスを理研 BRC より入手した。Qki KO マウスは、胚性致死であるが、致死になる E9.5-E10.5 における眼の表現型については報

告されていないため、凍結切片により、E9.5 での *Qki* KO マウスのホモ個体の眼について調査を開始した。さらに、海外の研究者より、*Qki* flox マウスを取り寄せており、近日中にマウスの清浄化が終わるため、立命館大学の動物施設に搬入し、解析を開始する予定となった。

令和4年度

これまでの解析で、コロニーピックアップ法により、*Qki* 破壊 ES 細胞を作製したが、*Qki* 破壊クローンに野生型の ES 細胞が混入した可能性が考えられたため、今年度は、網膜前駆細胞を GFP で標識できる Rx-GFP 株で、ゲノム編集プラスミドをエレクトロポレーション後、限界希釈法により、*Qki* 破壊 ES 細胞クローンを得ることとした。ウエスタン解析で同定した、2つの異なる gRNA 配列由来の *Qki* 破壊 ES 細胞クローンを3次元網膜分化法で、網膜分化を行ったところ、どちらのクローンでも眼胞様の突出が観察され、一方の gRNA 配列由来のクローンでは、GFP の蛍光も観察された(図1)。これらのことから、*Qki* が網膜前駆細胞形成期や眼胞突出期などの網膜初期発生期に重要な役割を持っているとは考えにくいことがわかった。個体レベルでの *Qki* の機能解析のため、カナダの Stephan Richard 博士より、*Qki* flox マウスを入手することとした。カナダの動物施設での微生物検査から、立命館大学の動物施設への直接の搬入は困難だったため、カナダから実験動物中央研究所へ空輸してもらい、実験動物中央研究所で体外受精によるマウスの清浄化を行ってもらったのち、立命館大学に搬入した。*Qki* flox マウスと網膜特異的発現の Cre マウスとの掛け合わせから網膜特異的 *Qki* cKO マウスを作製し(図2)、免疫染色による組織解析を行ったところ、*Qki* を網膜特異的にノックアウトできていることがわかった。現在、さらに詳細に解析を行なっている。

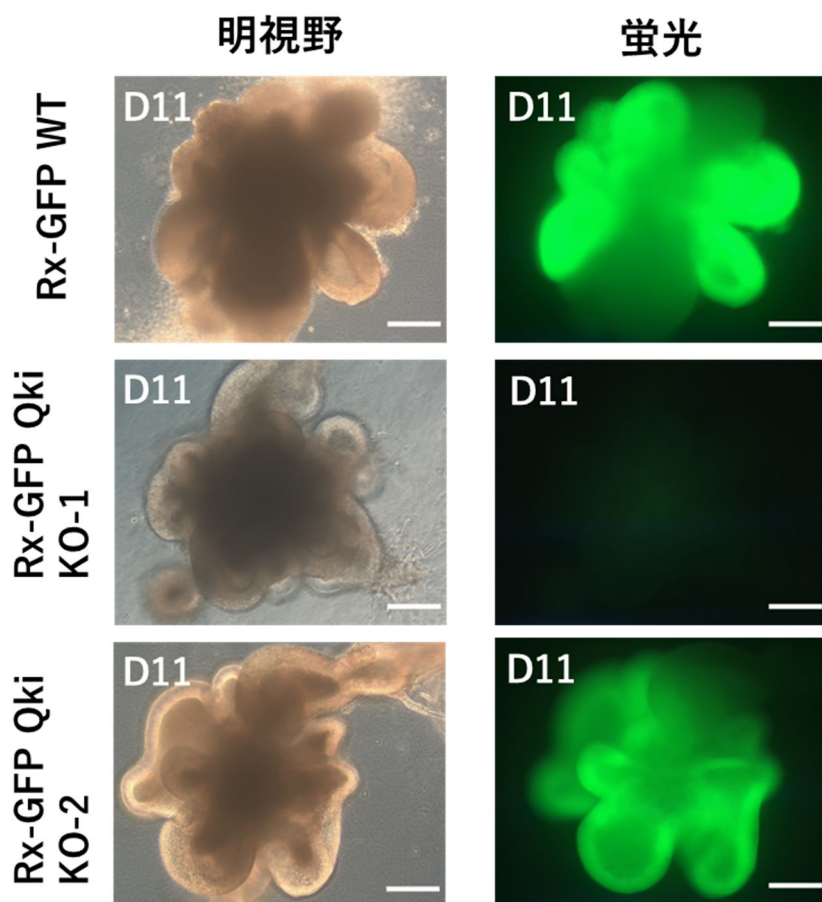


図1 *Qki* ノックアウト株の3次元網膜分化実験の結果
分化後11日目(D11)で撮影を行った。Scale bar = 150 μ m

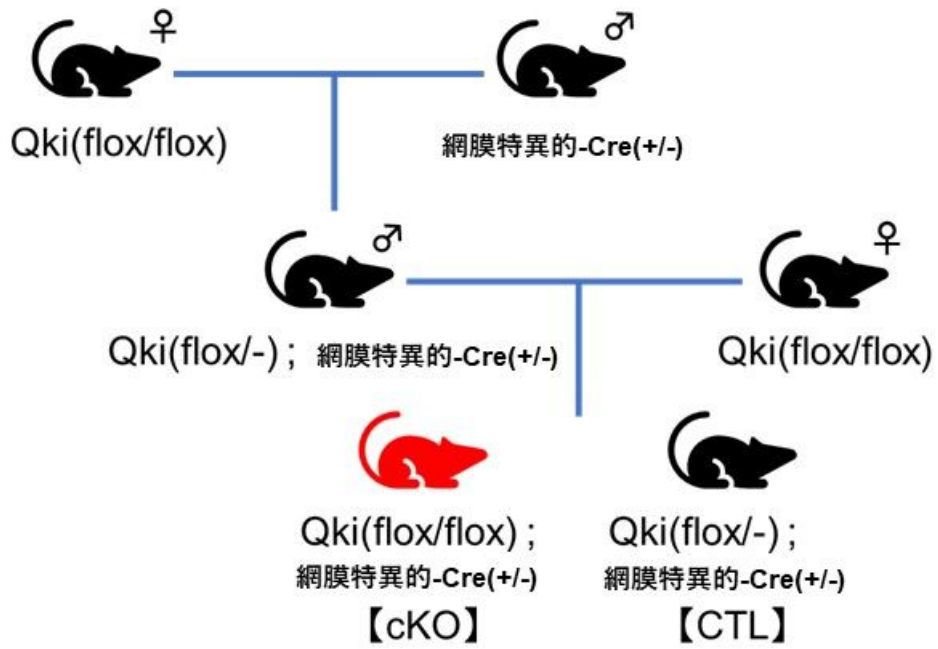


図2 網膜特異的 Qki cKO マウスを得るための交配手順

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	小池 千恵子 (Koike Chieko) (80342723)	立命館大学・薬学部・教授 (34315)	
研究分担者	川村 晃久 (Kawamura Teruhisa) (90393199)	立命館大学・生命科学部・教授 (34315)	

	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	草野 亜胤 (Kusano Ain)	立命館大学・薬学部・大学院生 (34315)	

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