

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12239

研究課題名（和文）Trim43が放射線による受精卵発生停止に与える分子機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of Trim43 in radiation-induced arrest of fertilized egg development

研究代表者

金井 昭教（Kanai, Akinori）

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任准教授

研究者番号：60549567

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究において低線量放射線が着床前期胚に与える影響を、初期胚の時期特異的な発現を示し、細胞分裂に関わる可能性のある遺伝子としてTrim43遺伝子群に着目して解析を行った。Trim43抗体の作製を行い、タンパク質を特異的に認識していることが確認された。また、Trim43KOマウスの作製を行い、4-8細胞期胚でのmRNA-Seq解析を行った。遺伝子発現解析からTrim43が細胞周期や細胞分裂に影響があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

妊娠期における放射線被曝影響は、胎児の発育期によって著しく異なることが明らかにされているが、妊娠期における低線量放射線が与える影響に関しては未だ不明な点が多い。本研究によって、Trim43遺伝子がマウスの初期胚において細胞周期、細胞分裂に関わっていることが示唆された。ヒト受精卵においても同様に放射線の影響を受けた際にTrim43が発生停止に関わっていることが予想される。受精卵への影響の分子機構を調べるためにKOマウスを用いた遺伝子解析を進めることで今後詳細な解析を進めるつもりである。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed the effects of low-dose radiation on early implantation embryos, focusing on the Trim43 genes that are expressed in a time-specific manner in early embryos and may be involved in cell division. Trim43 antibody was produced and found to specifically recognize the protein. In addition, Trim43KO mice were generated and mRNA-Seq analysis was performed in 4-8 cell stage embryos. Gene expression analysis suggested that Trim43 affects the cell cycle and cell division.

研究分野：分子生物学

キーワード：放射線 受精卵 次世代シーケンサー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

低線量放射線の被曝が人体に与える影響に対する不安は、社会的に大きな問題となっている。着床前期発生過程は放射線高感受性期であり、流産が引き起こされる可能性が高いものの、死を免れ着床に至った胚は、発生遅延や奇形を生じることなく正常個体として生まれることが報告されている。しかしながら、妊娠期における低線量放射線が与える影響に関しては未だ不明な点が多い。

申請者らは高線量放射線照射であればマウス受精卵は1細胞期に発生停止してしまうが、0.1 Gy 程度の低線量照射域では高線量照射やさらに低い低線量放射とは異なる初期胚発生停止の挙動を見出すことが出来た。しかし、着床前期のような胚においては解析可能な細胞数が非常に少なく限られている。近年 Single-cell mRNA-Seq (D. Ramsköld et al. Nat. Biotechnol. 2012、A. K. Shalek et al. Nature 2013) に代表されるように1細胞生物学が徐々に可能となってきてきた。マウス初期胚の系に適用することでこれまで知らなかった初期胚の遺伝子発現変化を捉えることが出来るようになり、そのメカニズムに関わる遺伝子を推定できるようになった。我々もそのような遺伝子の中から、初期胚の時期特異的な発現を示し、細胞分裂に関わる可能性のある遺伝子として *Trim43* (tripartite motif-containing 43) 遺伝子群に着目をした。

### 2. 研究の目的

目的: *Trim43* 遺伝子群が放射線による受精卵発生停止に与える分子機構の解明

これまでの研究で媒精後5時間が放射線感受性期である可能性を示唆しており、特に低線量放射線照射において胚盤胞期胚以前での発生停止が見られている。

近年、次世代シーケンサーを用いた解析技術が向上し、シングルセルから少数細胞における遺伝子発現解析が可能となってきた。受精卵に放射線照射を行った桑実胚のトランスクリプトーム解析から申請者らは発生停止に関わる遺伝子として *Trim43* 遺伝子群を同定した。本研究では *Trim43* 遺伝子群の低線量放射線照射による着床前期発生過程における発生停止メカニズムの分子学的解明を行い、妊娠期への影響を明らかにする。

### 3. 研究の方法

抗体が存在していないマウス *Trim43* に関しては、ペプチド抗体作製用の配列を検討し *Trim43b* ポリクローナル抗体を作成した。作製した抗体の評価を行うために、培養細胞に *Trim43b*、Flag-*Trim43b* を強制発現させた細胞抽出液を用いてウエスタンブロッティングを行った。

*Trim43* 欠損マウスについてはこれまで論文で報告されておらず、データベース等への登録も行われていない。分担研究者(長町)の協力で *Trim43* 欠損マウス作製を行った。*Trim43* は Tripartite モチーフを持つタンパク質のひとつであり、マウスでは *Trim43a*、*Trim43b*、*Trim43c* が存在している。それぞれがゲノム上の同じローカスに存在し、ホモロジーは核酸レベルで97%、タンパク質レベルでも92%を超えている。*Trim43* 遺伝子全てを欠損させる共通領域を用いて、*Trim43* 欠損マウスの作製を行った。*Trim43* 欠損マウスを用いた体外受精によって受精卵を採取した。受精卵は4-8細胞期胚を野生型マウス、*Trim43* 欠損マウスから各4個ずつ集め、各胚を Smart-Seq 法を用いて次世代シーケンス用 mRNA-Seq ライブラリを作製した。ライブラリは illumina NovaSeq 6000 を用いてシーケンスを行い、発現解析を行った。

### 4. 研究成果

ペプチド抗体作製用の配列を検討し、*Trim43b* ポリクローナル抗体を作製した。抗体の評価を行うために ELISA (図1) 及びウエスタンブロッティング (図2) を行った。ELISA において、*Trim43b* 免疫後に抗体価が上昇していることが確認された。ウエスタンブロッティングにおいては52 kDa 付近にバンドが確認され、Flag タグが付加されることによってサイズの大きくなった特異的なバンドが確認されていることから、免疫後血清において *Trim43b* を特異的に認識していることが確認された。

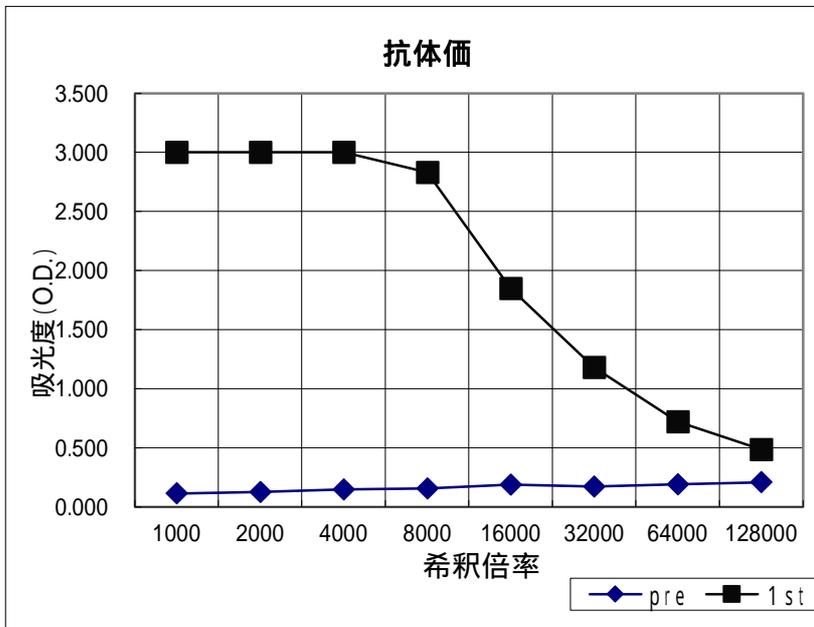


図1 免疫前血清 (pre) と免疫後血清 (1st) の ELISA による抗体価測定

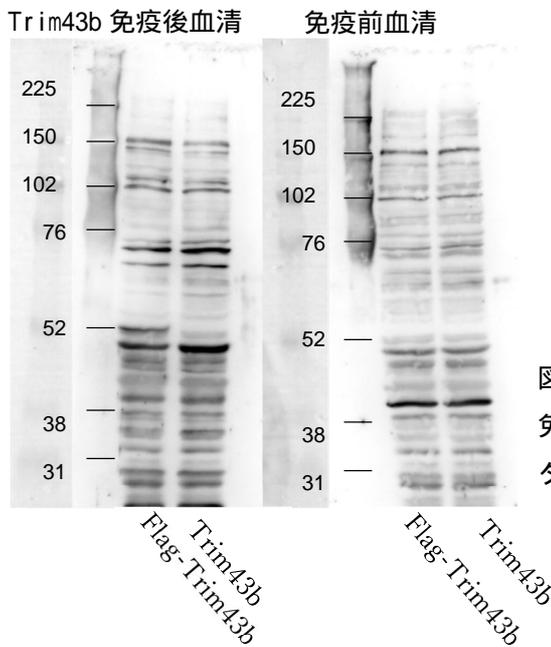


図2 Trim43b 免疫後血清 (左図) と免疫前血清 (右図) を用いたウエスタンブロットティング

*Trim43* 遺伝子群が受精卵に与える影響を確認するために、*Trim43* 欠損マウスの作製を行った。体外受精を行い、4-8 細胞期胚を野生型マウス、*Trim43* 欠損マウスから各 4 個ずつ集めて mRNA-Seq 解析を行った。欠損マウスでは *Trim43* 遺伝子の Exon 領域がデリレーションされており、遺伝子はフレームシフトをおこしてタンパク質として機能していないことが確認された (図 3)。遺伝子発現解析を行ったところ欠損マウスで発現が上昇している遺伝子は 526 遺伝子、発現が減少している遺伝子は 131 遺伝子であった。これら発現変動している遺伝子について Gene Ontology 解析を行ったところ、欠損マウスにおいて G1/S transition of mitotic cell cycle、chromosome segregation といった Gene Ontology Term が有意に抽出されており、細胞周期や細胞分裂に影響があることが示唆された。今後、これらの遺伝子について詳細に解析を進めていく予定である。

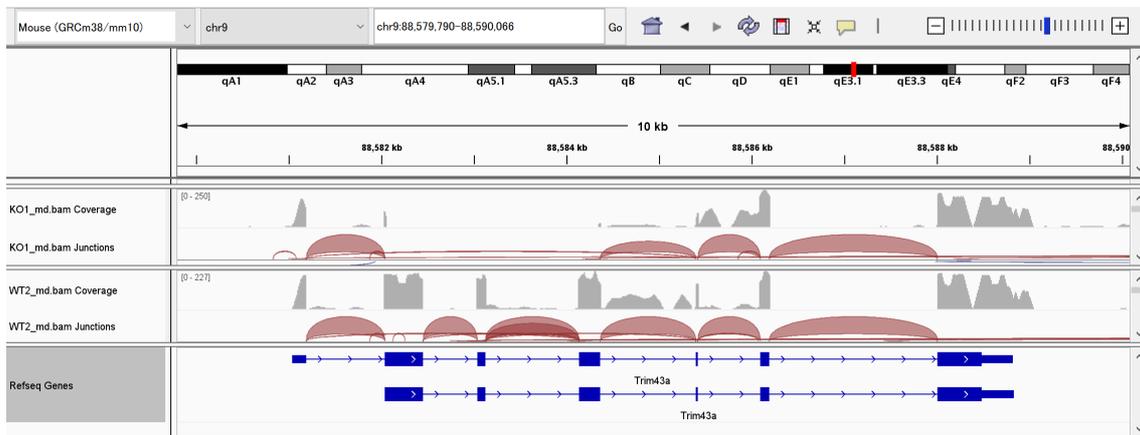


図3 *Trim43* KO マウス(上段)と WT マウス(下段)の *Trim43a* 遺伝子領域での 4-8 細胞期胚 RNA-Seq

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Atsushi Tanaka, Taizo A Nakano, Masaki Nomura, et al. (31人中16番目)	4. 巻 140
2. 論文標題 Aberrant EVI1 splicing contributes to EVI1-rearranged leukemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 875 ~ 888
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2021015325	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 Kobatake Kohei, Ikeda Kenichiro, Nakata Yuichiro, Yamasaki Norimasa, Kanai Akinori, Sekino Yohei, Takemoto Kenshiro, Fukushima Takafumi, Babasaki Takashi, Kitano Hiroyuki, Goto Keisuke, Hayashi Tetsutaro, Sentani Kazuhiro, Teishima Jun, Kaminuima Osamu, Hinata Nobuyuki	4. 巻 40
2. 論文標題 DDX41 expression is associated with tumor necrosis in clear cell renal cell carcinoma and in cooperation with VHL loss leads to worse prognosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations	6. 最初と最後の頁 456.e9 ~ 456.e18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.urolonc.2022.07.001	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 該当する
1. 著者名 Tomoya Isobe, Masatoshi Takagi, Aiko Sato-Otsubo, et al. (57人中28番目)	4. 巻 13
2. 論文標題 Multi-omics analysis defines highly refractory RAS burdened immature subgroup of infant acute lymphoblastic leukemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4501
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-32266-4	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 Shinriki S, Hirayama M, Nagamachi A, Yokoyama A, Kawamura T, Kanai A, Kawai H, Iwakiri J, Liu R, Maeshiro M, Tungalag S, Tasaki M, Ueda M, Tomizawa K, Kataoka N, Ideue T, Suzuki Y, Asai K, Tani T, Inaba T, Matsui H.	4. 巻 36
2. 論文標題 DDX41 coordinates RNA splicing and transcriptional elongation to prevent DNA replication stress in hematopoietic cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 2605 ~ 2620
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-022-01708-9	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 Tungalag Saruul, Shinriki Satoru, Hirayama Mayumi, Nagamachi Akiko, Kanai Akinori, Inaba Toshiya, Matsui Hirota	4. 巻 -
2. 論文標題 Ribosome profiling analysis reveals the roles of DDX41 in translational regulation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-023-03558-2	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 Shimabukuro Kiiichi, Fukazawa Takahiro, Kanai Akinori, Kawai Hidehiko, Mekata Kengo, Hirohashi Nobuyuki, Kakimoto Naoya, Tanimoto Keiji	4. 巻 11
2. 論文標題 Low-Dose-Rate Irradiation Suppresses the Expression of Cell Cycle-Related Genes, Resulting in Modification of Sensitivity to Anti-Cancer Drugs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 501 ~ 501
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11030501	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 Takeshi, Kanai Akinori, Komuro Akiyoshi, Amano Hisayuki, Ota Kazushige, Honda Masahiko, Kawazu Masahito, Okada Hitoshi	4. 巻 3
2. 論文標題 KDM4B promotes acute myeloid leukemia associated with AML1 ETO by regulating chromatin accessibility	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FASEB BioAdvances	6. 最初と最後の頁 1020 ~ 1033
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fba.2021-00030	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 Takahashi Satoshi, Kanai Akinori, Okuda Hiroshi, Miyamoto Ryo, Komata Yosuke, Kawamura Takeshi, Matsui Hirota, Inaba Toshiya, Takaori-Kondo Akifumi, Yokoyama Akihiko	4. 巻 10
2. 論文標題 HB01-MLL interaction promotes AF4/ENL/P-TEFb-mediated leukemogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.65872	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 Miyamoto Ryo, Kanai Akinori, Okuda Hiroshi, Komata Yosuke, Takahashi Satoshi, Matsui Hiroataka, Inaba Toshiya, Yokoyama Akihiko	4. 巻 10
2. 論文標題 HOXA9 promotes MYC-mediated leukemogenesis by maintaining gene expression for multiple anti-apoptotic pathways	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.64148	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 Yamamoto Keita, Najima Yuhō, Iizuka Hiroko, Harada Yuka, Sadato Daichi, Kanai Akinori, Matsui Hiroataka, Inamoto Kyoko, Mukae Junichi, Shingai Naoki, Toya Takashi, Igarashi Aiko, Shimizu Hiroaki, Kobayashi Takeshi, Kakihana Kazuhiko, Sakamaki Hisashi, Ohashi Kazuteru, Harada Hironori, Doki Noriko	4. 巻 144
2. 論文標題 Successful Cord Blood Transplantation for Idiopathic CD4+ Lymphocytopenia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Haematologica	6. 最初と最後の頁 698 ~ 705
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000516347	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4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Akinori Kanai, Ryota Matsuoka, Daisuke Matsubara, Ayako Suzuki, Yutaka Suzuki
2. 発表標題 Single cell spatial transcriptome analysis of LCNEC (Lung Cancer) using STOmics
3. 学会等名 2024 Advances in Genome Biology and Technology General Meeting (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 金井昭教、松岡亮太、松原大祐、鈴木絢子、鈴木穰
2. 発表標題 1細胞空間遺伝子発現解析STOmicsによる肺がん(LCNEC)解析
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Akinori Kanai, Ryota Matsuoka, Daisuke Matsubara, Ayako Suzuki, Yutaka Suzuki
2. 発表標題 Single cell spatial transcriptome analysis of LCNEC (Lung Cancer) using STOmics
3. 学会等名 The 14th International Workshop on Advanced Genomics. (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 金井昭教、鈴木穂
2. 発表標題 1細胞空間解析につながる空間遺伝子発現解析技術
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022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
研究分担者	長町 安希子 (Nagamachi Akiko)  (20585153)	広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教  (15401)	

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
---------	---------