

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26290028

研究課題名(和文) 胚着床に関連するExoc1遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of Exoc1 gene related to embryo implantation

研究代表者

八神 健一 (YAGAMI, Ken-ichi)

筑波大学・医学医療系・特命教授

研究者番号：40166476

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：自然発生WSマウスのはも変異体は早期胚性致死を示し、その原因遺伝子としてExoc1が示唆された。Exoc1遺伝子欠損マウスを作製したところ、WSはも変異体と同様に胚盤胞期に胚の致死が観察され、さらに胚盤胞の内部細胞塊に由来する細胞が増殖しないことが明らかとなった。次に、ゲノム編集技術により、WSマウスの変異領域のうち、Kit遺伝子上流からExoc1遺伝子の直前までの1.02Mbを欠損するマウスを作製したところ、胚盤胞期胚で致死を示さず、内部細胞塊に由来する細胞の増殖が確認された。これらの結果より、WSはも変異マウスで観察された早期胚性致死の原因はExoc1の欠損によるものと結論できる。

研究成果の概要(英文)：The homozygous WS mice, novel spontaneous mouse mutant with white spotting in the ventral body, showed peri-implantation lethal phenotype. Exoc1 gene was suggested as a prime candidate for this phenotype. We produced Exoc1 knockout mice, and the same peri-implantation lethal phenotype was observed in Exoc1<sup>-/-</sup> embryos. In addition, the polygenic effect without Exoc1 was investigated in genome-edited mutant mice carrying the 1.02 Mb deletion allele (the region from Kit to just upstream of Exoc1) in mice using the CRISPR/Cas9 system. This introduced mutation did not affect early embryonic development. These data indicate that Exoc1, which is located in the vicinity of the Kit gene, is the monogenic causative gene for peri-implantation lethality in the homozygous WS mice.

研究分野：実験動物学

キーワード：Exoc1 マウス 着床障害

### 1. 研究開始当初の背景

多数の実験用マウスを飼育・維持していると思いがけない異常表現形質が突如出現することがある。この異常表現形質が次の世代へと移行する場合、自然突然変異がその原因であると考えられる。毛に関わる異常表現形質はその発見が極めて容易であるため、古くより多くの自然突然変異系統が発見・解析されてきた。代表的なマウスとしては、*Foxn1* 遺伝子の自然突然変異が原因で無毛かつ無胸腺を示す *nude* マウスや *Fgf5* 遺伝子の自然突然変異が原因で長毛形質を示す *Angora* マウスなどが挙げられる。毛色に関する変異系統も多数存在する。*Tyr<sup>C-2J</sup>* などのアルビノ化の原因となる自然突然変異も報告されているが、中でも最もよく突然変異が発見される遺伝子の一つに *Kit* 遺伝子がある。現在までに 70 を超える突然変異が世界各地から報告されており、それらのヘテロ変異体の多くは腹部白斑と四肢や尾部の末端の色素欠損を示す。興味深いことにホモ変異体の表現形質は突然変異系統間で差がある。*Kit* 遺伝子のみを人為的に欠損させたノックアウトマウスと同様に、生後一週間前後に致死を示す自然突然変異系統がある一方で、軽微な変異のために、ホモ変異体の全ての毛で色素を欠くものの生存・繁殖可能な系統も報告されている。また、*Kit* 遺伝子だけでなく、その周辺に存在する遺伝子も含めて欠損しているために、ホモ変異体が胚発生の非常に早い時期に致死を示すような変異個体も報告されているがこの早期胚発生致死に関する分子メカニズムは全くの不明であった。

### 2. 研究の目的

我々の研究室のマウスコロニーにおいても、腹部白斑形質を示す個体が自然発生し WS マウスと名付けた(図 1)。この WS マウスと野生型マウスを交配した結果、腹部白斑形質の次世代への移行が確認されたため、この異常形質を支配している原因自然突然変異遺伝子を特定することを目的とする研究を行った。



### 3. 研究の方法

#### 3-1. WS における *Kit* 遺伝子変異の確認

腹部白斑の形質が *Kit* 遺伝子欠損マウスと酷似していたため、WS マウスにおいても、*Kit* 遺伝子に変異が生じていると予想した。そこでまず、抗 *Kit* 抗体を用いたウエスタンブロッティング解析を行った。なお、成体におい

ては、*Kit* 遺伝子は小脳で強く発現していることが知られているため、8 週齢以上の野生型もしくは WS マウスの小脳を本解析に用いた。

染色体レベルにおける遺伝子欠損変異を解析するために、M 期染色体における fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 解析を行った。M 期染色体標本を作製するために、WS マウスの脾臓を取り出し、脾臓細胞を 10% FBS in RPMI 培地中で 45 時間培養した。培養液にチミジンを加えることで細胞周期を同期させた。その後、R 分染パターンの染色像を得るために、固定する 3.5 時間前に BrdU を細胞へ取り込ませた。次に、コルセミドにより細胞周期を M 期で停止させ、メタノールと酢酸により、細胞を固定した。固定した細胞は、プレパラート上に展開し、UV 処理と熱処理を行い、FISH 解析用の染色体標本とした。作成した染色体標本をヘキスト 33258 で染色し、その後 Biotin-16dUTP や Cy3-dUTP で標識された大腸菌人工染色体 (bacterial artificial chromosome: BAC) プロンプを 37 °C で一晩かけてハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイズした染色体標本は洗浄し、ブロッキング溶液とアピジン-FITC 液を混和し、標本に 1 時間反応させた後、洗浄した。退色保護剤を滴下し、カバーガラスで覆いかぶせ、マニキュアによって封入した。蛍光シグナルは蛍光顕微鏡 BZ-9000 下で検出・解析した。なお、FISH にて *Kit* 遺伝子座・*Pdgfra* 遺伝子座・*Kdr* 遺伝子座・*Fgf5* 遺伝子座の存在を確認したが、各遺伝座を確認するための BAC クローンとして、RP23-142L11 ・ RP23-412J9 ・ RP23-135D23 ・ RP23-153I24 をそれぞれ用いた。

次に、より詳細に欠損領域を明らかにするために、C57BL/6 が遺伝背景で WS マウスを C3H マウスと交配し、その F1 個体における遺伝子多型を検査した。すなわち、白斑を示す F1 個体においては、欠損染色体は必ず C57BL/6 に由来するものであるから、非欠損領域では、C57BL/6 と C3H の両者に由来する遺伝子配列が存在するが、欠損領域では C3H に由来する遺伝子配列のみが存在することになる。そこで、*Kit* 遺伝子とその周辺の遺伝子が存在する染色体領域にある C57BL/6 と C3H 間の遺伝子多型を解析した。具体的には、rs33190439、rs29824030、rs33458703、rs31548445、rs31561146、rs6257272、rs33639811、rs38461911、rs33067522、rs3659819 の一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) を解析した。

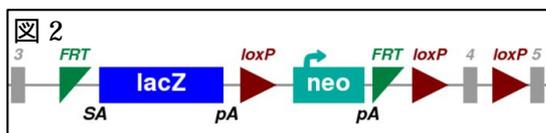
#### 3-2. ホモ WS 変異個体の致死時期の検討

上述の通り、*Kit* 遺伝子欠損体が生後すぐに致死を示すのに対し、ヘテロ WS 変異体同士の交配からは全くホモ WS 新生児が誕生しないために、ホモ WS 変異体は胚性致死を起こしている可能性が示唆された。そこでヘテロ

WS 変異体同士の交配し、胎齢 3.5 日と胎齢 7.5 日における各胚の遺伝型を PCR 解析により確かめた。また、更に、そこでヘテロ WS 変異体同士の交配から得られた胎齢 3.5 日胚を体外培養し、その増殖能を顕微鏡下で確認後、培養細胞からゲノム DNA を抽出し、それらの遺伝型を PCR 解析で確かめた。胎齢 3.5 日胚より RNA を抽出し、RT-PCR により *Kit* 遺伝子とその周囲に存在する遺伝子の発現を確認した。

### 3-3. *Exoc1* 遺伝子変異マウスの作出

上述の解析から、WS ホモ変異体が示す早期胚発生致死の原因遺伝子として、*Exoc1* が浮かび上がった。そこで、この *Exoc1* 遺伝子の単独欠損でも早期胚発生致死が生じるかを解析するために *Exoc1* 遺伝子欠損マウスの作製を行った。具体的には、European Conditional Mouse Mutagenesis Program (EUCOMM)より、図 2 に示す様な、*Exoc1* 遺伝子の第 3 イントロンに FRT 配列に挟まれた *LacZ* 遺伝子と *LoxP* 配列に挟まれたネオマイシン耐性遺伝子が導入され、第 4 エクソンが *LoxP* に挟まれた変異が片側の染色体のみで導入された ES 細胞(クローン # HEPD0703\_7\_C02)を購入した。



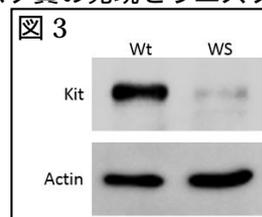
この ES 細胞よりキメラマウスを作製し、キメラマウスと全身で Cre 酵素を発現するマウスを交配することで、*Exoc1* が機能しないアレルをもつ *Exoc1* ヘテロノックアウトマウスを得た。この *Exoc1* ヘテロノックアウトマウス同士の交配から得られた胎齢 3.5 日胚とその体外培養細胞の遺伝型を PCR 解析で、形態を顕微鏡下で確認した。

### 3-4. ゲノム編集技術を利用したメガベース欠損マウスの作出

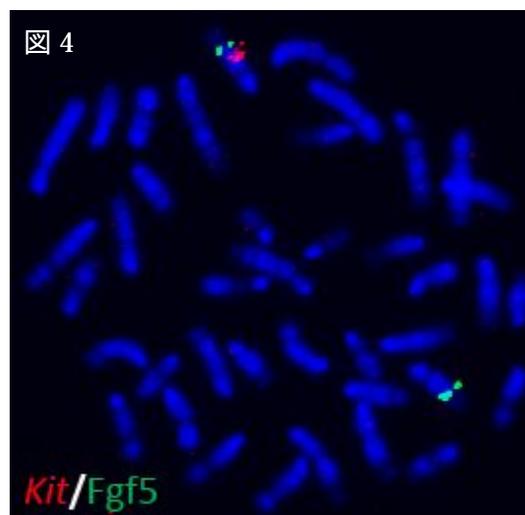
WS マウスが保持する変異とほぼ同じだが、*Exoc1* 遺伝子の欠損がない変異アレルを作出することを目的とする解析を行った。single guide RNA (sgRNA)と Cas9 の両者を発現する pX330 ベクターに *Exoc1* 遺伝子領域のすぐ上流の配列もしくは *Kit* 遺伝子領域のすぐ上流の配列を導入した。なお、受精卵の導入に先立ち、各 pX330 ベクターの切断活性は EGxxFP システム(*in vitro*)で評価した。この 2 種の pX330 ベクターを C57BL/6 マウスの前核期受精卵の雄前核に導入した。この受精卵を偽妊娠マウスの卵管に移植することで、*Kit* 遺伝子上流から *Exoc1* 遺伝子の直前までのおよそ 1.02 Mb の遺伝子領域がヘテロ様式で欠落したゲノム編集マウスを得た。このヘテロゲノム編集マウス同士の交配から得られた胎齢 3.5 日胚とその体外培養細胞の遺伝型を PCR 解析で、形態を顕微鏡下で確認した。

## 4. 研究成果

4-1. ヘテロ WS 変異体と野生型マウスの小脳における *Kit* タンパク質の発現をウエスタンブロットングで解析した結果、図 3 に示す通り、ヘテロ WS 変異体小脳では *Kit* タンパク質の発現が減少していることが明らかとなった。



この結果は WS マウスにおいて *Kit* 遺伝子に変異が起きている可能性を示唆する。そこで、遺伝型解析を行った。まず FISH 解析で、*Kit* 遺伝子の存在を確認した。その結果、片側の第 5 番染色体には *Kit* 遺伝子のシグナルが検出されなかった(図 4)。更に興味深いことに、

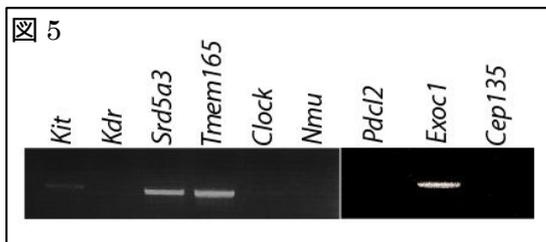


*Kit* 遺伝子の下流に存在する *Kdr* 遺伝子欠損も明らかになり、WS マウスにおいては、*Kit* 遺伝子だけでなく、その周囲の遺伝子も欠損している可能性が示唆された。そこで、*Kit* 遺伝子上流に位置する *Pdgfra* 遺伝子についても解析した結果、*Pdgfra* 遺伝子は存在していた。

更に欠損領域の詳細を探るために、多型解析を実施した結果、WS 変異染色体においては、*Kit*, *Kdr*, *Srd5a3*, *Tmem165*, *Clock*, *Pdcl2*, *Nmu*, *Exoc1*, *Cep135* の計 9 遺伝子を含む約 1.2 Mb のゲノム領域が欠損していることが明らかとなった。

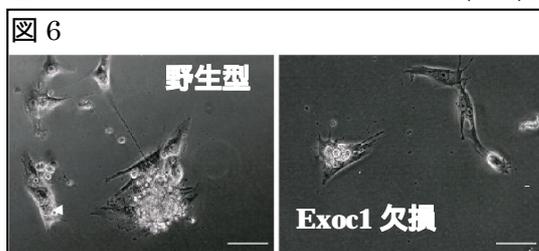
4-2. WS ヘテロ変異同士の交配より得た胚を各発生ステージにおいて解析した結果、胎齢 7.5 日ではすでに致死しており、胎齢 3.5 日(胚盤胞期胚)では生存していることが明らかとなった。そこで、この胚盤胞期胚を体外培養した結果、内部細胞塊に由来する細胞が増殖しないことが明らかとなった。これらの早期胚発生致死形質は *Kit* 遺伝子欠損マウスでは観察されない。つまり、*Kit* 遺伝子以外の欠損がこの異常形質の原因であると考えられた。そこで、この時期の胚において、WS マウスで欠損している遺伝子の発現を RT-PCR で解析した。その結果、図 5 に示す

様に、*Srd5a3* と *Tmem165* と *Exoc1* が発現していることが明らかとなった。



なお、当時から *Srd5a3* と *Tmem165* のノックアウトは早期胚発生致死を示さないとの報告があったため、*Exoc1* が WS ホモ変異体で観察される早期胚発生致死の原因遺伝子と考えられた。

4-4.そこで、*Exoc1* 遺伝子のみを欠損したマウスを作成し、その表現形質を観察した結果、WS ホモ変異体と同様の時期に致死を示すこと、さらに胚盤胞の内部細胞塊に由来する細胞が増殖しないことが明らかとなった(図6)。



以上の結果は、*Exoc1* 遺伝子が早期胚発生に必須であることを明確に示している。

4-5.しかしながら、WS 変異アレルで欠落している複数の遺伝子の多重欠損も早期発生致死の原因である可能性も残されていた。そこで、*Kit*, *Kdr*, *Srd5a3*, *Tmem165*, *Clock*, *Pdcl2*, *Nmu* の計 7 遺伝子を欠くマウスをゲノム編集技術を利用して作成し、その表現形質を解析した。その結果、このゲノム編集マウスは胎齢 3.5 日(胚盤胞期)で致死を示さず、また、胚盤胞の内部細胞塊に由来する細胞が増殖することも確認された。

これらの結果から、WS ホモ変異体で観察された早期胚発生致死の原因は *Exoc1* の欠損によるものだと結論づけた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Lineage-affiliated transcription factors bind the *Gata3* *Tce1* enhancer to mediate lineage-specific programs. Ohmura S, Mizuno S, Oishi H, Ku CJ, Hermann M, Hosoya T, Takahashi S, Engel JD. *J Clin Invest*. 126:865-78. 2016. 査読有

2. Peri-implantation lethality in mice carrying megabase-scale deletion on 5q3.3

is caused by *Exoc1* null mutation. Mizuno S, Takami K, Daitoku Y, Tanimoto Y, Dinh TT, Iijima S, Hasegawa Y, Takahashi S, Sugiyama F, Yagami K. *Sci Rep*. 5:13632. 2015. 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 水野聖哉、高橋智、杉山文博. CRISPR/Cas9 システムを用いた多様な遺伝子改変マウス作製の実験. 第 89 回日本生化学会大会, 仙台国際センター, 宮城(仙台), 2016 年 9 月 25 日.

2. 水野聖哉. 順・逆遺伝学的手法を駆使した変異マウスの異常形質原因遺伝子の解析. 第 63 回日本実験動物学会, ミューザ川崎, 神奈川(川崎), 2016 年 5 月 19 日.

3. 水野聖哉、高橋智、杉山文博、八神健一. CRISPR/Cas を用いたマウスゲノム編集の実験. 第 121 回日本解剖学会総会, ビッグパレットふくしま, 福島(郡山), 2016 年 3 月 28 日.

4. 水野聖哉、高見幸平、飯島沙織、加藤花名子、大徳陽子、谷本陽子、杉山文博、八神健一. 早期胚発生致死を示す WS 変異マウスにおける原因遺伝子の同定. 第 62 回日本実験動物学会, 京都テルサ, 京都(京都), 2015 年 5 月 29 日.

5. 水野聖哉、加藤花名子、飯島沙織、Dinh Thi Huong Tra、谷本陽子、大徳陽子、石田みゆき、依馬正次、伊川正人、高橋智、杉山文博、八神健一. CRISPR/Cas9 プラスミドを介したマウスゲノム編集の応用. 第 61 回日本実験動物学会, 札幌コンベンションセンター, 北海道(札幌), 2014 年 5 月 15 日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/lab-animal/>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

八神 健一 (YAGAMI Ken-ichi)

筑波大学・医学医療系・特命教授

研究者番号: 40166476

(2)研究分担者

杉山 文博 (Sugiyama Fumihiko)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号: 90226481

水野 聖哉 (MIZUNO Seiya)  
筑波大学・医学医療系・助教  
研究者番号：10633141

(3)連携研究者

高橋 智 (TAKAHASHI Satoru)  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号：50271896

外尾 亮治 (HOKAO Ryoji)  
動物繁殖研究所・理事長  
研究者番号：80156992