

【目的】我々は神経管閉鎖時における表皮形成には2つの重要なプロセスからなることを提唱してきた。1つ目は「未分化外胚葉細胞から表皮細胞へ運命決定される」過程、2つ目は「特異な表皮細胞を作り出す」過程である。本課題では、これら2つの過程をスムーズにスイッチさせる分子システムを明らかに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) タンパク質は、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経路と作用し、その後誘導された表皮細胞では、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) と共に働くことで細胞骨格に富んだ、強固な表皮細胞、「特異表皮細胞」を形成する (Kimura-Yoshida et al., 2018)。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、全く不明であった。そこで、これらの知見を基盤に 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を解明することを試みた。つまり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際に、異なるシグナル経路をスイッチングさせ、スムーズに連動させる分子機序を解明できると考えており、新しい分子メカニズムを明らかにできると期待している。

【方法】培養細胞内で GRHL3 因子と直接結合する因子を網羅的に同定した。得られた候補因子を幾つか絞って組織内における発現解析を行った。発現解析の結果から GRHL3 因子同様、表皮で発現の認められた因子に対して、CRISPR/Cas9 システムを用いて遺伝子欠損マウスを作製した。表現型解析では主に顕在性二分脊椎の発症の有無を検証した。さらにこれら作製した変異マウスと *Grhl3* 遺伝子変異マウスを交配させダブル変異マウスを作製し、その表現型解析を行った。最終的には canonical Wnt 経路や PCP 経路との関わりを検証した。

【結果】GRHL3 因子と直接結合する因子として、脱ユビキチン化酵素の一つである *ubiquitin specific peptidase 39* (*Usp39*) と、核移行に関わる新規の因子が得られた。ダブル変異のマウス作製、さらにそれら表現型解析等によって、USP39 因子は GRHL3 の細胞質局在を制御し、発生期の様々な器官において PCP 経路の活性化に作用していることが示唆された。また新規に同定した核内局在制御因子は、Grhl3 因子とのダブル変異マウスの表現型では脳突出の表現型が高頻度に見られた。以上の結果から、Grhl3 因子の表皮形成過程における核-細胞質内局在は、これらの因子によって制御されており、この制御により表皮形成の Wnt 経路のスイッチがスムーズに連動している可能性が強く示唆された。

神経管閉鎖時の表皮形成における GRHL3 因子の 2 つの働き

