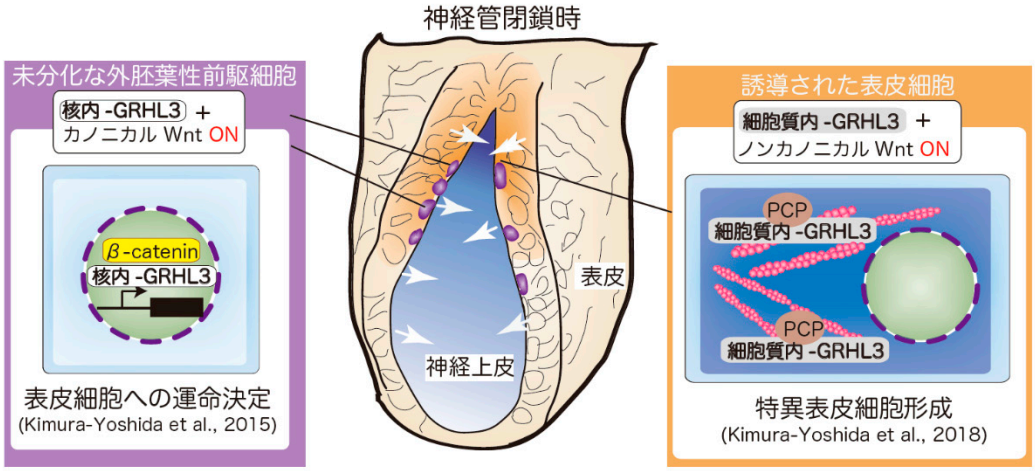
45	神経管閉鎖におけるGRHL3因子の局在制御因子の探索	吉田　千春

【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



45. 神経管閉鎖における GRHL3 因子の局在制御因子の探索

吉田　千春

大阪母子医療センター 研究所 病因病態部門

Key words：表皮形成，Wnt 経路，核 - 細胞質輸送，発生，神経管閉鎖不全

緒　言

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機序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［1］、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、強固な表皮細胞を形成する［1，2］。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解明を試みた。結果、細胞質局在制御には USP39 因子が、核内局在制御には EMG1 因子が働いていることがわかった。さらにこれら遺伝子の欠損マウスを作製し、*Grhl3* 変異マウスとのダブル変異マウスの表現型解析から、GRHL3 が核内（canonical Wnt 経路）や細胞質内（PCP 経路）で作用する際にそれら因子が協調的に働くこともわかった。

方法、結果および考察

1. GRHL3 と相互作用するタンパク質の同定

GRHL3 因子の核内や細胞質に局在するために必要なタンパク相互作用する因子の同定を行った。方法としては、GST-tag に GRHL3 を連結させたコンストラクトや、内在性 GRHL3 を直接認識するために特異的抗体を用いて免疫沈降させ、質量分析にて分子の同定を行った。具体的には、GRHL3 全長 cDNA に GST タグをつけたコンストラクトを作製し、大腸菌に発現させ、担体に固定化してアフィニティカラムを作製した。その後、このカラムに GRH L3 タンパクの核、細胞質の両領域で発現する表皮細胞株のエキストラクトを加え相互作用するタンパク質を結合させた。その後相互作用タンパク質を溶出させ、溶出したタンパク質を SDS-PAGE により分離、質量分析でタンパク質の同定を行った。また GRHL3 タンパクと細胞内で相互作用する分子を、免疫沈降後、質量分析を行うことで同定した。これら結果、脱ユビキチン化酵素の 1 つである USP39（*ubiquitin specific peptidase 39* と EMG1（*N1-specific pseudouridine methyltransferase*：*NEP1*）因子を同定した。

2. USP39 因子の GRHL3 タンパク質に対する局在制御解析

USP39 タンパク質は培養細胞内で細胞質に強く発現していることが報告されていた。そこで、細胞質における GRHL3 局在に影響を与えるのか検討を行った。GRHL3 の 3’側に蛍光タンパク質 EGFP を連結し、MCF7 細胞に細胞導入を行ったのち EGFP シグナルの局在を観察すると、細胞質と核内のどちらにもシグナルが検出された。この条件下で、USP39 をノックダウンさせるために *Dsi USP39* をトランスフェクションした結果、細胞質における GRHL3-EGFP の局在は劇的に消失し、核内でのみ強く局在することがわかった。このことは、USP39 因子が細胞質内における GRHL3 タンパク質局在を正に制御していることを意味している。

3. USP39 因子の生体内における機能解析

USP39 因子の遺伝子欠損マウスについての報告はこれまでなかったため、CRISPR/Cas9 のシステムを用いてノックアウトマウスの作製を行った。結果、*Usp39* 遺伝子ホモ欠損胚では、原条形成時期（受精後 6.5 日目）に形成異常が見られ、胚性致死となることがわかった（図 1）。具体的には、中胚葉（原条）の形成がほとんど見られず、将来の胚性領域が極めて小さくなるといった奇形となることがわかった（図 1）。

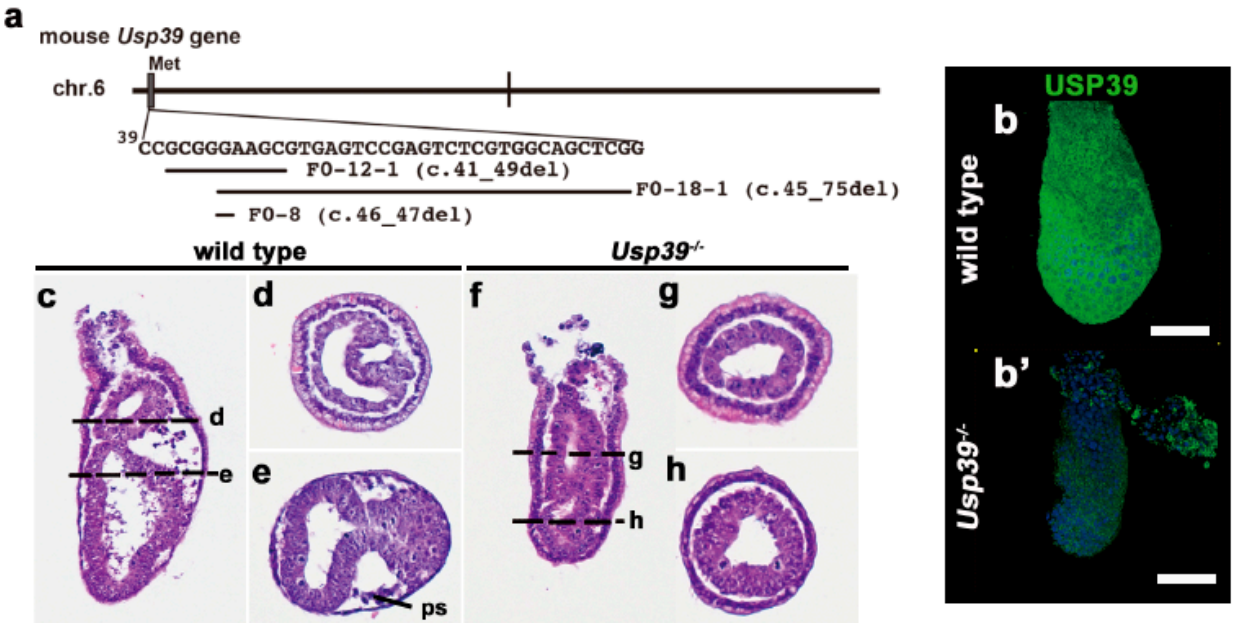


図 1. *Usp39* 遺伝子ホモ欠損マウス胚の病理学切片の様子と、その発現パターン

a） CRISPR/Cas9 のシステムで欠損させた領域の説明。

b、b'） USP39 抗体を用いた免疫組織学染色像の様子（6.5 日目胚）。

野生型胚（b）、*Usp39* 遺伝子ホモ欠損胚（b'）。スケールバー：100 μm。

c～h） E6.5 日目のヘマトキシリン-エオシン染色像。

野性型胚（c～e）、*Usp39* 遺伝子ホモ欠損胚（f～h）。

さらに *Usp39* 遺伝子ヘテロ欠損マウスと、*Grhl3* 遺伝子ヘテロ欠損マウスとを交配させることでダブルヘテロ変異マウスの作製を試みた。*Grhl3* ホモ欠損胎児では顕在性二分脊椎を 100%の発症率で見られ、さらに *Grhl3* ホモ欠損胎児では約 16%のホモ胚で瞼の閉鎖不全が見られる（図 2）。*Grhl3* $^{-/-}$;*Usp39* $^{+/-}$マウス胚では閉鎖不全の割合が 44%まで上昇することがわかった。このことは瞼閉鎖の過程において、*Grhl3* 遺伝子と *Usp39* 遺伝子が協調的に働いていることを意味している［3］。

3. EMG1 因子の GRHL3 タンパク質の局在制御解析

次に USP39 因子同様、EMG1 因子が GRHL3 タンパク質局在にどのように関わるのか検討を行った。MCF7 細胞を用いて、EMG1 抗体の発現解析を組織学免疫染色法で行った結果、細胞質でも若干のシグナルは見られたが、主に核内で発現が見られた。さらに *Emg1 siRNA* によってノックダウン細胞では核内で強く発現している GRHL3（全長）-EGFP の発現が、細胞質内へもシグナルが異所的に発現していることがわかった。以上の結果から、EMG1 因子は核内で強く発現し、さらに GRHL3 因子の核内への局在を促進していることが示唆された。

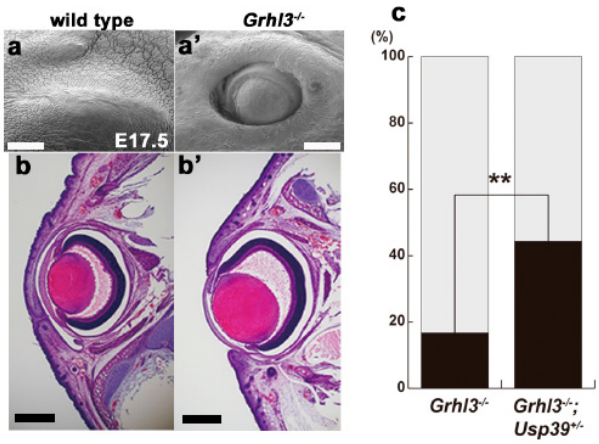


図 2. *Grhl3; Usp39* ダブル変異マウスでは瞼の閉鎖不全の割合が上昇する

a、a') E17.5 の閉鎖した瞼の走査型顕微鏡による撮影像。
野生型胚（a）、*Grhl3* ホモ欠損胚（a'）。スケールバー：300 μm。

b、b') 瞼閉鎖の矢状断面像。野生型胚（b）、*Grhl3* ホモ欠損胚（b'）。
スケールバー：500 μm。

c) ダブル変異マウスの優位に発症頻度を示した。**P<0.01（χ^2検定）。

EMG1 因子が GRHL3 因子の核内局在を制御している可能性が示唆されたことから、EMG1 因子の遺伝子欠損マウスを作製した。*Emg1* 遺伝子は既に他のグループによって変異マウスの報告はされている［4］。*Emg1* 遺伝子は受精後 3.5 日目で発現し、主に胚本体を形成する ICM（inner cell mass：内部細胞塊）で発現している（図 3）。遺伝子欠損マウスでは、桑実胚期（E3.5）から異常が見られ、着床前後では胚性致死となる。この *Emg1* ホモ変異胚を用いて、発現解析を行った結果、PCP 経路に関するマーカー因子（RHOA や、CELSER）の発現は一部認められるのに対し、canonical Wnt 経路（active β-catenin マーカー因子）は発現が完全に消失していることがわかった（図 3）。このことから *Emg1* 遺伝子ホモ欠損マウス胎児では着床前に胚性致死となり、canonical Wnt 経路（active β-catenin マーカー因子）に関しては発現が消失していることがわかった（図 3）。このことから、EMG1 因子は桑実胚期から発現し、canonical Wnt 経路に関わっていることが示唆された。

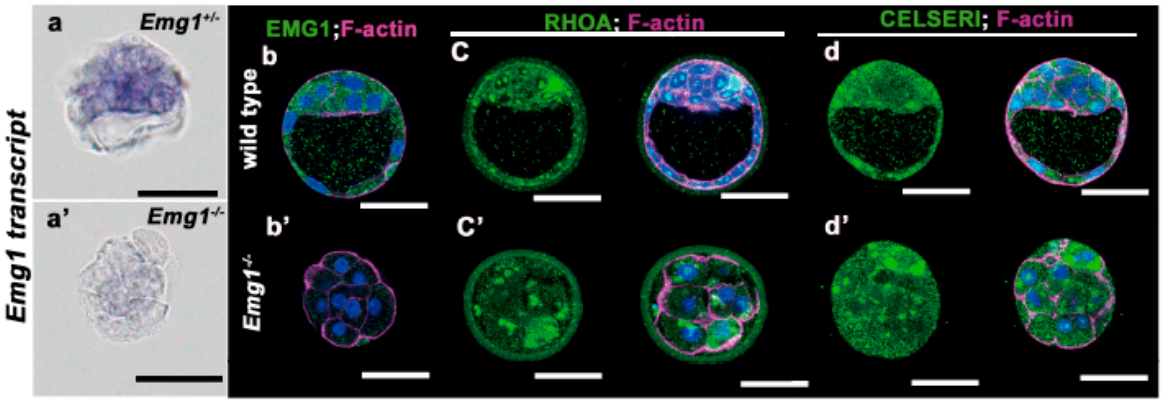


図 3. *Emg1* 遺伝子欠損マウス胎児の表現型解析

a、a') *Emg1* 遺伝子転写産物の発現解析（E3.5）。

b～d') 抗体を用いた各マーカー解析。EMG1（b、b'）、RHOA（c、c'）、
CELSER（d、d'）の発現解析。

スケールバー：50 μm。

さらに、*Grhl3* 遺伝子欠損マウスと *Emg1* 遺伝子欠損マウスとの交配によって、*Grhl3;Emg1* ダブル変異マウスの作製を行い、その表現型解析を行った。*Emg1* 遺伝子ホモ欠損マウスでは初期胚で胚性致死となるため、*Grhl3* ホモ欠損かつ *Emg1* ヘテロ変異マウスを作製し、$Grhl3^{-/-}$欠損胚との表現型比較を行った（図 4）。*Grhl3* ホモ欠損マウス胚では、100%の発症率で顕在性二分脊椎を発症する一方で、脳突出（craniorachischsis）も 10%程度の割合で発症することがわかっている（図 4）。そこで、脳突出の割合を $Grhl3^{-/-}$欠損胚と $Grhl3^{-/-};Emg1^{+/-}$欠損胚で比較検討の結果、$Grhl3^{-/-};Emg1^{+/-}$欠損マウスの方が発症率が 25%以上に上昇し、有意に発症率が上昇していることがわかった。このことは、EMG1 因子が神経管閉鎖過程、特に中脳、後脳領域における閉鎖過程に *Grhl3* 因子と協調的に働いていることを意味している。

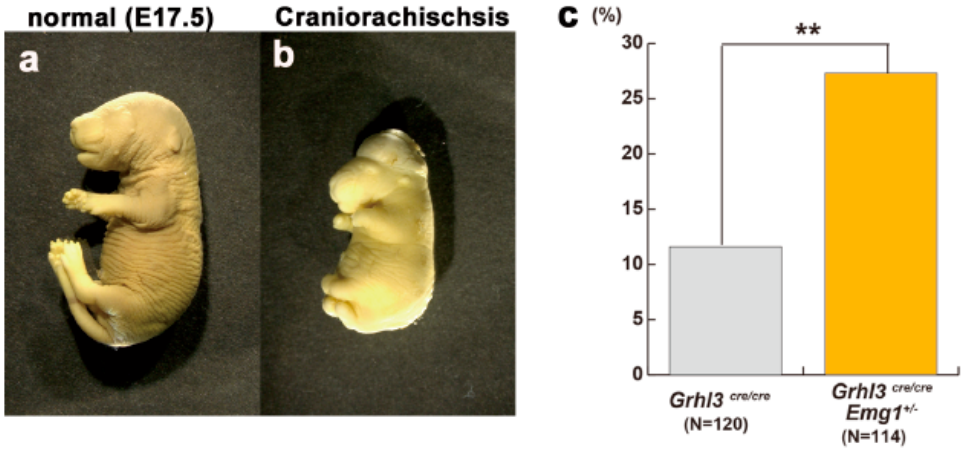


図 4. *Grhl3;Emg1* ダブル変異マウスの解析

a、b）E17.5 日目胎児の外見写真。b）は脳突出を発症している。

c）脳突出の発症の割合を示したグラフ。**P<0.01（χ^2検定）。

以上の結果から、GRHL3 因子の核内、細胞質内のそれぞれの局在を制御する因子が明らかになった。また細胞質内局在を制御する USP39 因子は PCP 経路と、核内局在に関わる EMG1 因子は canonical Wnt 経路と協調的に働く。つまり GRHL3 タンパク質が核-細胞質内を精密に局在に変えることで、表皮の分化と細胞動態変化といった 2 つのイベントをスムーズにスイッチングさせるために必要なパートナー分子を明らかに出来た。

文　献

1） Kimura-Yoshida C, Mochida K, Ellwanger K, Niehrs C, Matsuo I. Fate specification of neural plate border by canonical Wnt signaling and Grhl3 is crucial for neural tube closure. *EBioMedicine.* 2015;2:513–527. doi: 10.1016/j.ebiom.2015.04.012.

2） Kimura-Yoshida C, Mochida K, Nakaya MA, Mizutani T, Matsuo I. Cytoplasmic localization of GRHL3 upon epidermal differentiation triggers cell shape change for epithelial morphogenesis. *Nat. Commun.* 2018;9:4059. doi: 10.1038/s41467-018-06171-8.

3） Kimura-Yoshida C, Mochida K, Kanno SI, Matsuo I. USP39 is essential for mammalian epithelial morphogenesis through upregulation of planar cell polarity components. *Commun. Biol.* 2022;5:378. doi: 10.1038/s42003-022-03254-7.

4） Armistead J, Patel N, Wu X, Hemming R, Chowdhury B, Basra GS, et al. Biochimica et Biophysica Acta. *BBA—Molecular Basis of Disease. Elsevier B.V;* 2013;1852: 1029–1037. 10.1016/j.bbadis.2015.02.007