

## 論文の内容の要旨

応用動物科学 専攻  
平成 26 年度博士課程 進学

氏名 酒巻 雄司  
指導教員名 田中 智

論文題目 栄養膜幹細胞における LIN28A の機能に関する研究

### 要旨

#### 緒言

マウスの栄養外胚葉から作製された栄養膜幹細胞 (TS 細胞) は胎盤を構成する全ての栄養膜細胞に分化する能力を持つ。RNA 結合ドメインをもつタンパク質として知られる *Lin28a* は、当研究室において、TS 細胞が未分化時に発現する遺伝子の一つとして同定され、分化に従い減少することが明らかにされている。LIN28A は RNA に限らず DNA とも結合することが示されているが、TS 細胞においては *Lin28a* をノックダウンしても未分化状態の維持及びその分化能には顕著な影響が認められなかったことが報告されており、その TS 細胞における機能については明らかにされていない。また、この報告は形態学的観察に基づくものであり、分化前後の遺伝子発現や表現型に関する十分な解析がなされているとは言えない。

そこで本研究では、*Lin28a* ノックダウン TS 細胞株を作製し、コントロール株との比較を詳細に行うことで得られた差異を基に、TS 細胞における LIN28A の機能の一端を明らかにすることを目的とした。

#### 第一章

第一章では未分化 TS 細胞における LIN28A の役割を解析した。LIN28A は種々の mRNA と結合し、その安定性や発現レベルに寄与することが胚性幹細胞 (ES 細胞) を用いた実験によって示されていた。そこで、まず、TS 細胞内で抗 LIN28A 抗体を用いた RNA 免疫沈降とそれに続く大規模シーケンスによって同定された標的 mRNA の候補が、*Lin28a* のノックダウンによってどのように変化するかを解析した。その結果、これらの mRNA は、*Lin28a* のノックダウンを行ってもその大部分 (85%) が変化を示さなかった。また、コントロールとの全 mRNA の比較を行ったクラスタリング解析ではノックダウン株とコン

トロール株を明確に区別することは出来なかった。これらの結果から、TS 細胞内における LIN28A と mRNA の相互作用は TS 細胞の幹細胞性の維持には必須でないこと、及び *Lin28a* のノックダウンは TS 細胞内のトランスクリプトームを大きく変えるものではないことが明らかになった。一方、個々の遺伝子に着目すると、未分化状態で高発現する *Mest* や分化誘導後に発現が上昇する *Cdkn1c* の劇的な減少が確認された。これらの遺伝子はこれまで *Lin28a* の下流遺伝子としては報告されておらず、またその mRNA 量は *Lin28a* を一過的及び恒常的に強制発現するレスキュー実験を行っても回復することがなかった。この結果から、*Lin28a* のノックダウンによって TS 細胞内で長期的あるいは不可逆的な変化が起こっていることが示された。

## 第二章

第二章では分化誘導後の TS 細胞における LIN28A の役割を解析した。TS 細胞における *Lin28a* の発現は、LIN28A と同じく未分化時に高発現する *Cdx2* や *Sox2* と異なり、分化誘導後緩やかに減少することが分かっている。このため、第一章で示唆された *Lin28a* のノックダウンによる一部の遺伝子の発現低下の影響が分化時に現れる可能性が考えられた。既報では *Lin28a* ノックダウン TS 細胞が分化誘導後も形態学的な異常を示さないとされていたため、ここでも主に遺伝子発現に着目した解析を行った。興味深いことに、*Lin28a* ノックダウン TS 細胞においては分化誘導に伴う細胞周期の抑制遺伝子である *Cdkn1c* の発現レベルの上昇がほとんど見られないことが判明した。栄養膜細胞の一種である栄養膜巨細胞においては、CDKN1C によって CDK1 が阻害され、G2/M 期がスキップされることによって endoreduplication が起こり、多倍体化することによって核が巨大化することが判明している。したがって、*Cdkn1c* の発現量が有意に低下している *Lin28a* ノックダウン TS 細胞においては endoreduplication を起こす細胞が減少している可能性が考えられる。実際、コントロールとノックダウン株の細胞を同数播種して分化誘導を行ったところ、6 日後にはノックダウン細胞の数が有意に多くなる結果が得られた。この結果は *Cdkn1c* の発現が上昇しないために endoreduplication ではなく通常の細胞分裂を伴う核分裂が行われていることを示唆していた。このことを確認するため、核内 DNA の総量について調べたところ、ノックダウン株 3 株のうち 2 株において多倍体化している細胞がコントロール株と比較して少ないことが判明した。これらの結果は *Cdkn1c* ノックアウト TS 細胞に見られる表現型と類似しており、*Lin28a* のノックダウンが *Cdkn1c* の発現を低下させることで TS 細胞の分化に異常をもたらしていることが示された。

## 第三章

*Mest*、*Cdkn1c* は共にインプリント遺伝子である。LIN28A が持つ RNA 結合モチーフの一つである Cold shock domain は RNA だけでなく、DNA とも結合できることが示されている。また、ES 細胞では転写が活性化状態にあるプロモーターに結合し、TET1 と相互

作用して付近の脱メチル化を促すことが報告されている。第一章でノックダウンによる不可逆的な変化が示唆されていたことと、インプリント遺伝子の発現制御に DNA メチル化が密接に関与していることから、この章では LIN28A が TS 細胞のメチル化状態に与える影響を解析した。まず、先に述べた *Mest* と *Cdkn1c* のプロモーター領域のメチル化解析を行ったところ、これらの領域は *Lin28a* ノックダウン TS 細胞において高メチル化されていることが判明した。一方、他の幾つかのインプリント遺伝子 (*H19*, *Snrpn*, *Meg3*, *Peg3*, *Peg5*) のプロモーター領域のメチル化解析を行ったところ、これらの領域においては有意な差が見られなかった。ES 細胞における *Lin28a* のノックダウンはゲノム全体の高メチル化を起こすことが報告されているが、興味深いことにノックダウン TS 細胞とコントロールとの間のゲノム全体のメチル化量に有意な差は確認できなかった。しかしながら、遺伝子発現量の劇的な減少を伴わないものの、非インプリント遺伝子である *Elf5* のプロモーター領域はメチル化率が上昇していた。これらの結果は、LIN28A によって低メチル化状態が維持される領域は特異的に定められていることを示す。また、LIN28A 抗体を用いたインプリント遺伝子領域の ChIP 解析では、ノックダウンによるメチル化への影響の有無にかかわらず、LIN28A の結合を示す結果が得られた。従って、LIN28A はこれらの領域に直接または間接的に結合しているものの、DNA 低メチル化の維持に LIN28A が必要か否かは他の要因で決められることが示された。

## 総括

本研究の結果より、TS 細胞の正常な分化形質の発現に LIN28A が必須であることが示された。*Lin28a* のノックダウンは一部のインプリント遺伝子に DNA メチル化の変化を伴う遺伝子発現量の変化を引き起こした。栄養膜巨細胞における *endoreduplication* の欠失は、細胞質の巨大化や各種マーカー遺伝子の発現とは独立しているものの、胎盤過形成や子癩前症様症状を引き起こすことが報告されている。*Lin28a* ノックアウトマウスでは出生率の低下と成長遅延及び体重の減少が起こることが示されているが、本研究結果は、LIN28A の発現低下による CDKN1C の著しい減少によって胎盤に異常が生じていることを強く示唆している。また、*Mest* 遺伝子もその発現する父性アレルの欠失によって胎盤の重量が減少することが報告されている。本研究の結果は、TS 細胞における LIN28A が *Cdkn1c* 及び *Mest* のインプリント状態の維持に必要なエピジェネティック制御因子であることを示すものである。