

審査の結果の要旨

氏名 酒巻 雄司

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。本論文では、RNA/DNA 結合ドメインをもつタンパク質である LIN28A の TS 細胞における機能解明を目的とし、*Lin28a* ノックダウン TS 細胞の作製とそれらを用いた研究が行われた。本論文は 3 章からなる。

第一章では、*Lin28a* のノックダウンによる、未分化 TS 細胞における遺伝子発現への影響が解析された。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。*Lin28a* ノックダウン TS 細胞 (*Lin28a* KD TS 細胞) を作製し、RNA-seq 法による網羅的遺伝子発現解析を行った結果、トランスクリプトームの比較では *Lin28a* KD TS 細胞とコントロールとを区別することはできないことが明らかになった。すなわち、TS 細胞では、LIN28A の発現量低下は mRNA の発現量に大きな影響を与えない事が示された。しかしながら、一部の遺伝子発現量には有意な差があり、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。これらの遺伝子発現は、*Lin28a* KD TS 細胞における *Lin28a* の強制発現を行っても回復する事がなかった。この結果から、LIN28A による mRNA の安定化以外の機構によって、*Mest* や *Cdkn1c* の発現が LIN28A 依存的に維持されている可能性が示された。

第二章では、*Lin28a* のノックダウンによる、分化誘導後の TS 細胞における影響が解析され、第一章で発現の低下が認められていた *Cdkn1c* は、分化誘導後も発現が上昇しないことが明らかにされた。分化栄養膜細胞の一種である栄養膜巨細胞では、CDKN1C による CDK1 の阻害が細胞分裂の停止と多倍体化を誘導する。分化誘導後の *Lin28a* KD TS 細胞とコントロールとを比較すると、細胞数が有意に多いこと、また、多倍体化した細胞の割合が有意に少ないことが明らかとなった。これらの結果は既報にある *Cdkn1c* ノックアウト TS 細胞の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分化 TS 細胞の表現型に異常をもたらしている事が示唆された。

Mest および *Cdkn1c* は共にインプリント遺伝子である。インプリント遺伝子の発現制御には DNA メチル化が深く関与するが、近年、LIN28A が DNA 脱メチル化を誘導する TET1 と相互作用し、転写が活性化されている遺伝子のプロモーター付近の脱メチル化状態を維持していることが、ES 細胞を用いた研究により示されている。そこで第三章では、*Lin28a* KD TS 細胞における *Mest* および *Cdkn1c* 遺伝子座の DNA メチル化状態が解析された。その結果、*Lin28a* のノックダウンにより、両遺伝子座の DNA メチル化状態が大きく亢進していることが明らかになった。その他のインプリント遺伝子の DNA メチル化も解析されたが、それらには *Lin28a* KD TS 細胞でも有意な差は認められなかった。また、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、TS 細胞ではそれは認められなかった。これらの結果は、ES 細胞とは異なり、TS 細胞では LIN28A によって低メチル化状態が維持される領域は一部の遺伝子に特異的であることを示す。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ことから、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因子によって決められている可能性が示された。

本研究により、LIN28A は分化誘導後の TS 細胞の形質発現に重要な機能を有することが明らかにされた。栄養膜巨細胞の異常は、胎盤過形成や子癩前症様症状を惹起することが報告されている。本研究の結果は、LIN28A が特に *Cdkn1c* 遺伝子のインプリント状態の維持を介して栄養膜細胞の正常性の維持に関わることを明らかにしたもので、ほ乳類における胎盤形成の制御機構に新たな知見をもたらすものである。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。