

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 17 年度博士課程 進学

姫野絵美

指導教員 塩田邦郎

論文題目：マウス胚性幹細胞における Lin28 の機能解析

緒言

哺乳類の胚発生過程では、胚盤胞の形成に伴い、内部細胞塊と栄養外胚葉の 2 つの細胞系譜への分岐が起こる。内部細胞塊は着床後主に胚体組織の細胞へと分化し、栄養外胚葉は主に胎盤の大部分を構成する栄養膜細胞へと分化する。マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) は内部細胞塊より樹立され、生殖細胞を含むすべての胚体細胞に分化する能力を有する。一方、マウス栄養膜幹細胞 (TS 細胞) は栄養外胚葉から樹立され、すべての栄養膜細胞に分化する能力を有する。ES 細胞と TS 細胞は共に、適切な条件下で自己複製能と分化多能性を維持したまま増殖させることが可能である。

これまで我々は、TS 細胞の分化に伴い発現が低下する遺伝子のひとつとして Lin28A 遺伝子を同定している。また、Lin28A は ES 細胞でも発現し、その分化に伴い発現量が低下することも明らかにし、Lin28A がこれらの幹細胞で何らかの重要な役割を担っている可能性を示唆していた。

Lin28A は線虫の発生を制御する異時性遺伝子 *lin-28* のホモログで、マウスゲノム上にはパラログである Lin28B も存在する。Lin28A および Lin28B は RNA 結合ドメインを有する。Lin28A および Lin28B が ES 細胞で microRNA let-7 の前駆体に結合す

ること、また筋芽細胞で Lin28A が IGF-2 mRNA に結合することが報告され、確かに Lin28 が RNA 結合タンパク質として機能し、かつ複数の種類の RNA をその標的とすることが明らかとなった。さらに近年、LIN28A、NANOG、SOX2 ならびに OCT4 の 4 遺伝子の導入によりヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) が作製され、LIN28A が体細胞核の分化多能性再獲得を促す因子であることが示された。これらのことから、マウス Lin28A および Lin28B が自己複製能や多分化能を持つ未分化幹細胞で何らかの重要な機能を担っていることが期待されたが、その詳細はいまだ明らかにされていない。

そこで本研究では、まず Lin28A の RNA 結合能に着目し、ES 細胞ならびに TS 細胞を用いて Lin28A の標的 mRNA を探索した。次に ES 細胞を用いた Lin28A、Lin28B の knockdown 解析を行い、ES 細胞における Lin28A と Lin28B の生理的機能を明らかにした。加えて、Lin28A knockdown ES 細胞株を樹立し、Lin28A が ES 細胞のエピジェネティック状態に影響を与える因子であることを明らかにした。

第一章 Lin28A 標的 mRNA の探索

Lin28A は ES 細胞と TS 細胞で共に発現し、分化に伴い発現が低下することから、その標的 RNA が 2 つの幹細胞の持つ自己複製能や多分化能の維持機構に関与する可能性が考えられた。Lin28A はこれらの幹細胞で共通した RNA を標的としているのか、あるいは異なる RNA を標的としてそれらの発現を制御しているのだろうか。本章では、Lin28A により制御される RNA を明らかにすることを目的に、抗 Lin28A 抗体による免疫沈降と遺伝子発現マイクロアレイを用いて Lin28A と複合体を形成する mRNA (Lin28A 標的 mRNA) の検索を行った。

まず、ES 細胞と TS 細胞それぞれの細胞溶解液から抗 Lin28A 抗体を用いた免疫沈降より得られた産物をアクリルアミドゲルで解析したところ、ES 細胞と TS 細胞で同じサイズのバンドとともに、異なるサイズのバンドも複数検出され、Lin28A はそれぞれの幹細胞で異なるタンパク質を含む複合体を形成していることが示唆された。この免疫沈降産物から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った結果、Lin28A 標的 mRNA として、ES 細胞で 14 遺伝子、TS 細胞で 65 遺伝子が同定された。これらの遺伝子には、これまで ES 細胞と TS 細胞で自己複製能や多分化能に直接関わるということが明らかにされている遺伝子は認められず、また共通して同定されたのは、機能未知の 1 遺伝子 (Gene Bank ID:BC010304) のみであった。同定された標的 RNA の発現量を、当研究室で過去に解析された ES 細胞と TS 細胞の遺伝子発現アレイの結果と照合すると、ほとんどの標的 RNA は、両幹細胞でともに同程度に発現しており、それぞれの幹細胞における発現量の高い mRNA が非特異的に結合して得られたのではないことが示された。以上の結果から、Lin28A は各々の幹細胞で特異的な mRNA と選択的に複合体を形成することが明らかになった。

第二章 Lin28 knockdown 解析

Lin28A の ES 細胞における生理的機能を明らかにするために、Lin28A mRNA に対する shRNA を発現するプラスミドベクターを用いて Lin28A knockdown 解析を行った。ベクター導入後 5 日までの transient knockdown では ES 細胞の増殖およびマーカー遺伝子の発現に変化は認められなかった。さらに Lin28A knockdown ES 株の樹立が可能であったことから、Lin28A は少なくとも未分化 ES 細胞の維持には必須ではないことが分かった。ところが、Lin28A の発現量 50% 以上低下している株では、Oct4 mRNA 量が 20% から 50% 上昇していることが分かった。一方、得られた Lin28A knockdown 株の中に Oct4 mRNA 量が低下している株も存在した。この株では Lin28B の mRNA 量が低下していたことから、それが Oct4 の発現量の低下の原因である可能性が考えられた。そこで Lin28B mRNA に対する siRNA を用いた Lin28B transient knockdown を行ったところ、Lin28B knockdown によって Oct4 mRNA 量が低下し、また Lin28A mRNA 量も低下していた。

以上の結果から、Lin28A は Oct4 mRNA 量を負に制御し、Lin28B は Oct4 と Lin28A mRNA 量を正に制御する因子であることが示された。Lin28A の transient knockdown では見られなかった Oct4 mRNA 量の変化が Lin28A knockdown 株で認められたことは、Lin28A による Oct4 の制御は複数の因子を介した間接的なものであるために、変化が現れるまでに時間がかかった可能性が考えられる。これは Lin28A 標的 RNA に Oct4 が含まれていなかったことから支持される。

ES 細胞において Oct4 の発現量を人為的に半分にすると外胚葉系に、逆に過剰発現させて 1.5 倍以上にすると内胚葉系の細胞に分化することが報告されている。すなわち、Oct4 mRNA 量が一定の範囲内に保たれることは、ES 細胞の自己複製能や多分化能の維持に重要な要素である。本章の研究により、Lin28A および Lin28B は Oct4 の発現量を一定の範囲内に保つことで ES 細胞の自己複製能や多分化能性の維持に寄与している可能性が考えられた。

第三章 Lin28A knockdown ES 細胞株のエピジェネティクス解析

DNA のメチル化は哺乳類ゲノムに見られる唯一の化学修飾で、ヒストン修飾とともにクロマチン構造を制御し、エピジェネティクス制御の中心となる。哺乳類のすべての細胞には固有の DNA メチル化領域が存在する。これらを集結した DNA メチル化プロファイルはゲノム DNA のエピジェネティック状態、すなわちエピゲノムの観点からみた細胞の特徴である。さまざまな細胞、組織の DNA メチル化プロファイルを比較すると、細胞種あるいは組織間でメチル化状態が異なる領域が存在する。この領域は組織特異的 DNA メチル化領域 (Tissue-dependent and Differentially Methylated Regions, T-DMR) と定義され、細胞や組織の特異性を示す。これまで、当研究室では

マウス ES 細胞、肝臓、腎臓および脳との比較から、ES 細胞で特異的に低メチル化にある T-DMR 1115 ヶ所と高メチル化にある T-DMR 2715 ヶ所を同定した。これらの ES 細胞特異的 T-DMR (ES-specific-T-DMR) は ES 細胞に特徴的なエピゲノム領域である。

本章では、エピゲノムの観点からみた ES 細胞の特徴である DNA メチル化プロファイルに Lin28A が及ぼす影響を検討するため、第 2 章で得られた Lin28A knockdown ES 細胞株を用いて DNA メチル化解析を行った。

ES-specific-T-DMR の中から 68 遺伝子座 (ES 細胞で特異的に低メチル化領域の 45 遺伝子と高メチル化領域 23 遺伝子座)、およびそれ以外 (以下 ES-non-specific-T-DMR) の 102 遺伝子座を選び、その上流域の HpyCH4IV 認識配列 (ACGT) のメチル化率を COBRA 法で測定した。その結果、Lin28A knockdown ES 細胞株では、コントロール ES 細胞株とメチル化状態の異なる領域が低メチル化領域から高メチル化領域まで幅広く認められた。また、Lin28A knockdown ES 細胞株におけるメチル化の変化は、低下と亢進の両方向の変化が引き起こされること、またその変化は各領域でランダムに起こるのではなく、それぞれの株である一定の方向へ変化する傾向をもつことが示された。さらに、Lin28A knockdown によるメチル化変化は ES-specific-T-DMR と ES-non-specific-T-DMR の両グループで認められ、両グループにおけるメチル化変化の傾向 (低下または亢進) は共通していた。

以上の結果から、Lin28A は ES 細胞特異的な ES-specific-T-DMR だけでなく、ES-non-specific-T-DMR を含んだ、ES 細胞の DNA メチル化プロファイル全体に影響を与え、固有のメチル化率の維持を保証する因子であることが示唆された。

総括

本研究では、複数の観点から ES 細胞における Lin28 の役割を検討した。Lin28A は ES 細胞で複数の標的 RNA と複合体を形成し、標的 RNA の制御に関与していると考えられた。また、Lin28A の発現量の低下によって ES 細胞のマスター遺伝子の 1 つである Oct 4 の発現量が増加する傾向が引き起こされた。一方、Lin28B の発現量の低下は Oct 4 および Lin28A の発現量の低下を誘導した。これらの結果により、Lin28A と Lin28B が Oct4 の発現量を一定の範囲に保つ機構に寄与していることが示唆された。

さらに、エピジェネティックな観点から ES 細胞における Lin28A の役割が明らかになった。Lin28A の発現量の低下は ES 細胞の DNA メチル化プロファイルの幅広い領域の変化を引き起こした。これにより、Lin28A は ES 細胞の DNA メチル化プロファイル制御に寄与する役割をもつことが示唆された。

遺伝子発現およびエピジェネティックな観点から、ES 細胞はある程度の不均一性を有しながらもそれがあある一定の範囲に制御された細胞の集団といえる。本研究により、Lin28A はこの制御機構の一部の機能を担うことが示された。