

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10687

研究課題名(和文) 絨毛細胞特異的遺伝子欠損マウスを用いた胎盤の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of placenta using tissue-specific knockout mice

研究代表者

板倉 敦夫 (Itakura, Apsua)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：70262897

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：PRMTは、タンパク質のアルギニン残基にメチル基を転移する翻訳後修飾酵素であり、転写やシグナル伝達、細胞の分化、増殖など多彩な機能を制御する。タイプ1 PRMTは非対称性ジメチルアルギニン(ADMA)の形成を触媒する。今回我々は、タンパク質、mRNA、PRMT1-*gal*レポーターマウスを用いたX-gal、また染色組織免疫染色など複数の手法により、PRMT1が母体と胎仔間の相互作用の場である胎盤迷路層で主に発現しており、PRMT1が胎生期では経時的に変化することを明らかとした。さらにADMAの胎盤での経時的変化を液体クロマトグラフィー質量分析法で示した。

研究成果の概要(英文)：Expression levels and the localization of PRMT1 mRNA and protein in placentas were investigated. In addition, the levels of methylarginines of placental proteins were quantified using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. PRMT1 mRNA and its protein were expressed at highest levels in mid-gestation stages, and their expression showed stepwise decrease in the late gestation. At E9, PRMT1 was observed in several different trophoblast cell (TC) subtypes. Furthermore, PRMT1 was mainly expressed in the labyrinth zone of TCs at E13. Finally, total methylarginines of proteins were significantly reduced in late gestation of placentas compared with mid-gestation stages. We found developmental changes in the placental expression of PRMT1 and in protein arginine methylation status during pregnancy. These findings provide fundamental information regarding placental PRMT1-mediated arginine methylation during the development.

研究分野：産婦人科学

キーワード：タンパク質アルギニン-N-メチル基転移酵素 遺伝子欠損マウス 絨毛細胞特異的ノックアウト 妊娠高血圧症候群

### 1. 研究開始当初の背景

妊娠時特異的に形成される胎盤は、母体の妊娠恒常性と胎児の正常な発育に極めて重要な役割を担っている。胎盤の主な構成細胞に絨毛細胞があるが、絨毛細胞の分化・増殖にはタンパク質の翻訳後修飾が関わっていることが近年判明してきた。

PRMT (protein arginine methyltransferase) は、タンパク質のアルギニン残基にメチル基を転移する翻訳後修飾酵素であり、転写やシグナル伝達、細胞の分化、増殖など多彩な機能を制御する。PRMT は s アデノシルメチオンをメチル基供与体としてモノメチルアルギニン (MMA: monomethylarginine) を介して、アルギニン側鎖の窒素原子のうち片方の窒素原子にメチル基を転移させる。タイプ 1 PRMT は非対称性ジメチルアルギニン (ADMA: asymmetric dimethylarginine) をタイプ 2 PRMT は対称性ジメチルアルギニン (SDMA: symmetric dimethylarginine) の形成を触媒することがわかっている。

タイプ 1 の中でも PRMT1 は哺乳動物細胞内の 85% のアルギニンメチル化反応を担う酵素であり、核と細胞質に局在する。PRMT1 は複数のバリエーションが存在し、中でもバリエーション 2 (v2) は核外移行シグナル配列を持ち、細胞質のみに局在する。近年、PRMT1 が細胞の分化・増殖や血管形成に関与することが判明しつつあるが、胎盤の構造や機能に対する役割は未解明である。

### 2. 研究の目的

PRMT1 の胎盤における細胞の分化・増殖あるいは血管形成に関する役割を明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

#### 実験動物

動物実験は国立大学法人筑波大学動物実験委員会の承認の元を実施し、筑波大学動物実験取扱規定と日本文部科学省管轄下にある日本学会協議の動物実験の適正な実施に向けたガイドラインに従って行った。マウスは気温 22℃、湿度 40-60% の環境にて飼育し、12 時間ごとの明暗周期が管理された環境で飼育を行った。

#### 使用抗体

抗 PRMT1 抗体: Millipore, 07-404、Abcam, 92299

抗 GAPDH 抗体: Cell Signaling Technology, 5174

抗ウサギ IgG-HRP 抗体: GE Healthcare, NA934

抗ウサギ IgG ビオチン結合抗体: Vector Laboratories, BA-1000

#### mRNA 解析

C57BL/6J マウス胎盤を胎生 9, 11, 13, 16, 19 と採取し RNA 抽出を行った。逆転写酵素を用いて RNA を鋳型とした DNA 合成を行い、その DNA を鋳型にして定量的リアルタイム PCR 反応を行った。

#### タンパク質解析

胎盤を 25µl の lysis バッファー (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8.0, 1% Nonidet P-40, 5% glycerol, 1x protease inhibitor cocktail) を加えてソニケーター (Cosmobio, Bioruptor UCD-250) で反応させた、反応後のサンプルを 4℃、14,000rpm で 10 分間遠心し、上清を回収した。上清を 25 µl の 2x Laemmli sample buffer (Bio-Rad) と混合し、95℃ で 5 分間加熱した。サンプルを 10% SDS-PAGE で泳動した後に PVDF 膜に転移した。PVDF 膜は抗体反応を 4℃で一晩行った。免疫反応は Luminata Forte Western HRP substrate (Millipore) によって増感し、X 線フィルム (Fujifilm) を用いて検出した。

#### X-gal 染色

採取した胎盤を 4% PFA/PBS で 15 分浸透固定し、10-30% ショ糖溶液中で段階的に浸漬した後、O.C.T. compound に包埋、凍結してクライオスタット (HM560; Micromer Cryostat, Thermo Scientific) で 10 µm の凍結切片を作製した。β-galactosidase 活性を検出するため、X-Gal 溶液 (1 mg/ml X-Gal, 5 mM ferrocyanide potassium, 5 mM ferricyanide potassium in the buffer solution (2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.02% NP-40 and 0.05% sodium deoxycholate in phosphate buffered saline (PBS))) に 37℃で一晩染色した。その後、エオジン染色し、光学顕微鏡で観察を行った。

#### 組織免疫染色

妊娠 9 日、13 日目の胎盤を 4% PFA/PBS にて、4℃で一晩固定した。組織をエタノールとキシレンで脱水し、パラフィンで包埋した。包埋したサンプルについて、クライオスタット (Thermo Scientific, HM560) を用いて暑さ 8µm のパラフィン切片を作製した。作製した切片はクエン酸溶液で賦活化し、5% BSA/0.05% Tween-20 にてブロッキングを行い、抗ラビット PRMT1 抗体にて 4℃で一晩反応させた。ビオチン化 2 次抗体に 1 時間室温で反応させた後に、ストレプトアビジン付加した Alexa647 抗体 (Thermo Fisher Scientific, S21374) を室温で 90 分反応させた。リポフスチンを消光させるためにサンプルを TrueBack Lipofuscin Autofluorescence Quencher reagent (Biotium) にて 1 分室温で反応させた。切片は共焦点顕微鏡 (Olympus, FV10i) で観察を行った。

#### LC-MS/MS

胎盤凍結破砕粉末からメタノール / クロロホルム抽出により、粗精製したタンパク質 100 g に対して、定沸点 6 規定塩酸を加え、内部標準として N-プロピル-L-アルギニン (N-PLA) を添加し、110℃、24 時間加水分解を行った。終了後減圧下で塩酸を留去し、HPLC 用精製水に溶解した加水分解物を液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析 (LC-MS/MS) に供した。分析機器には島津製作所の Nexera X2-LCMS-8050 を、また試料分離にはメルク社 SeQuant ZIC-HILIC column

(2.1 × 150 mm) (ガードカラムとして SeQuant ZIC-HILIC Guard Fitting (1.0 × 14 mm) を接続) を用いた。分離溶媒には、A : 1%アセトニトリル/1%ギ酸/98%水、B : 1%水/1%ギ酸/98%アセトニトリルを用い、40□でサンプル注入から1分間B 95%で維持し、9分間かけてB 5%にした。4分間B 5%を維持した後に、B 95%で7分間カラムを置換した。タンデム質量分析部の条件は下記の通りであった：ヒーティングブロック温度：400□、脱溶媒管 (DL) 温度：250□、イオン化部温度：300□、イオン化電圧：4.0 kV, 60 V、ヒーティングガス (空気) 流量：10 l/min、ネプライザーガス (窒素) 流量：3 l/min、ドライイングガス (窒素) 流量：10 l/min、CID (アルゴン) ガス圧力：230 kPa。質量分析はメチル化アルギニンの前駆体イオンに対して多重反応モニタリング (MRM) を行い、得られた生成物イオンを選択的に検出した。各分析対象化合物の標品を用いた MRM 遷移 (m/z) は、それぞれ MMA 189.15 > 70.15、ADMA 203.15 > 158.05、N-PLA 216.60 > 70.15 で、それぞれのカラム溶出時間 (分) は、10.51、10.31、9.55 であった。それぞれ経時的にイオン強度を描画することでマスクロマトグラムを得、注入量と得られたマスクロマトグラムの面積から検量線を作成した。試料中の各メチル化アルギニン量は、上記で求めた検量線を用いてそれぞれのピーク面積から N-PLA 量で補正した値を定量値とした。全ての分析及びデータプロセッシングには、LabSolutions ver. 5.60 ソフトウェア (島津製作所) を用いた。

#### 統計解析

各定量解析において、統計ソフト (GraphPad Prism version 5.6; GraphPad Software 社) を用いて統計解析を行った。

#### 4. 研究成果

PRMT1 の胎生期における経時的発現変化  
胎生期における PRMT1 の経時的発現変化を示すために、ウエスタンブロットと定量的リアルタイム PCR を用いて胎生 9,11,13,16,19 日におけるタンパク質量と mRNA 量を示した。

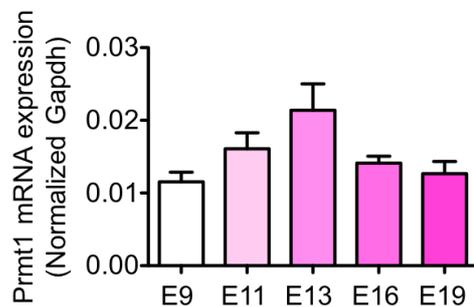


Figure 1A: 胎盤における PRMT1mRNA の発現

Figure1A に示すように PRMT1mRNA は胎生早期に高発現を示し、胎生後期には漸減した。

また、ウエスタンブロットによるタンパク質発現では PRMT1 variant1 は胎生早期に発現量が増加し胎生後期には発現が低下したが、PRMT1 variant2 は胎生後期に増加した。この結果は、PRMT1 の各バリエーションが胎生期によって異なる制御を示す可能性を示した。(Figure1B)

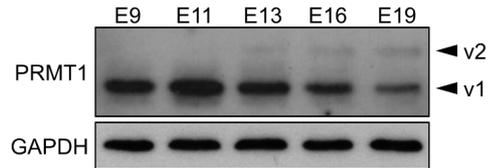


Figure 1B: 胎盤における PRMT1m 蛋白の発現

#### PRMT1 のプロモーター活性の確認

我々は PRMT1 プロモーター下に  $\beta$ -galactosidase レポーター遺伝子が挿入された PRMT1-KI マウスを用いて  $\beta$ -galactosidase 活性による PRMT1 プロモーター活性の胎生期の経時的变化を評価した。Figure2A に示すように X-gal 染色によって胎生 9 日では ectoplacental cone (EPC)、chorion、parietal trophoblast giant cell (P-TGC)、anitmestrial decidua に PRMT1 が発現していた。さらに、胎生 13 日では P-TGC、junctional zone、labyrinth に PRMT1 が発現を示すことに対して、decidua には発現しないことを示した (Figure2B)。

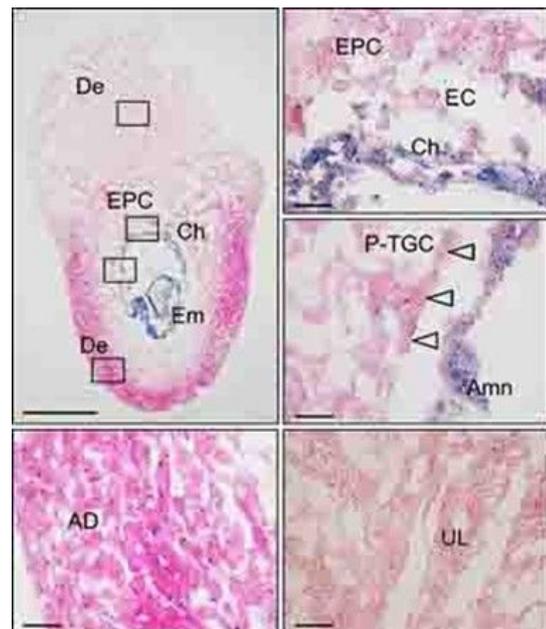


Figure 2A: 胎生 9 日胎盤における PRMT1-KI マウスを用いた  $\beta$ -galactosidase 活性タンパクの局在

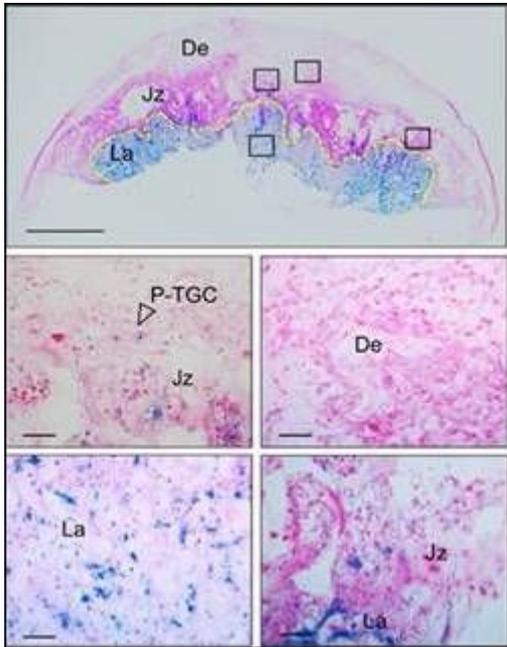


Figure 2B: 胎生 13 日胎盤における PRMT1-KI マウスを用いた  $\beta$ -galactosidase 活性タンパクの局在

#### 胎盤部位特異的な PRMT1 の発現

さらに、内在 PRMT1 の発現を解析するために胎生 9、13 日の胎盤で PRMT1 による蛍光免疫染色を行った。リポフスチンは蛍光免疫染色において、蛍光顕微鏡法で使用する全てのチャンネルにおいて明るい蛍光を発し、胎盤においても自家蛍光を発することが知られている。胎盤での自家蛍光をなくするために、リポフスチンに対する自家蛍光を消光させる試薬を用い、さらに長波長の蛍光波長がコンジュゲートされた 2 次抗体を使用することでより良い蛍光免疫染色像を得ることができた。胎生 9 日では、P-TGC、EPC、chorion の核に PRMT1 が発現したが、antimesometrial decidua には発現がみられなかった。胎生 13 日では labyrinth の細胞質に PRMT1 が発現し junctional zone には発現していなかった。(Figure 3A, B)

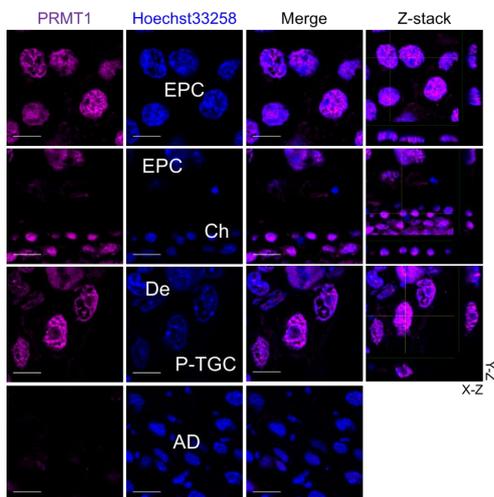


Figure 3A 胎生 9 日胎盤における PRMT1 蛍光免疫染色

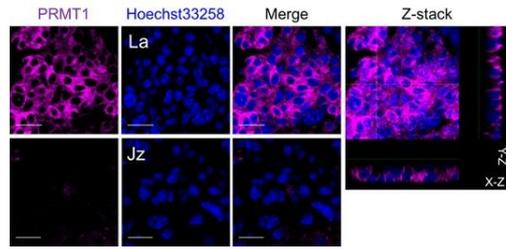


Figure 3B 胎生 13 日胎盤における PRMT1 蛍光免疫染色

最後に、各発生段階における PRMT1 の発現変化がアルギニンメチル化にも寄与しているかを調べるために LC-MS/MS によって MMA と ADMA のレベルを胎生 9、11、13、16、19 日で解析した。Figure 4 に示すように、MMA レベルは胎生期を通して明らかな変化はみられなかったが、ADMA レベルは胎生 11 日に最も高いレベルとなりその後胎生後期に向けて減少していくことが分かった。この結果は PRMT1 の発現レベルと ADMA レベルは同様の動態を示すことが示唆された。

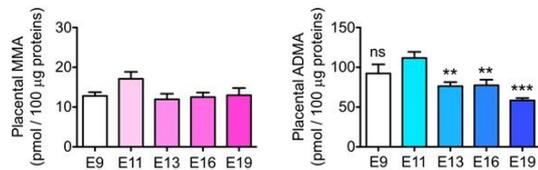


Figure 4: 胎盤における MMA と ADMA 発現

#### 考察

胎盤の PRMT1 は発生段階で異なった変化を示し、各段階で異なった細胞プロセスにおける役割が示唆された (Figure 1)。PRMT1 はヒトでは 7 つのスプライシングバリエーションが知られており、variant 1 と 2 が主となるバリエーションである。今回、PRMT1 variant 1 は胎生期初期から後期にかけて減少していくことに対して、variant 2 は胎生中期から増加していくことを示した (Figure 1B)。Figure 3 で示すように胎生 9 日では PRMT1 の発現は核に局限しているのに対し、胎生 13 日では細胞質に局限していた。これらの結果は PRMT1 の選択的スプライシングが各胎生期における核と細胞質間でのアルギニンメチル化のバランスを司る可能性を示唆している。

また、強力な血管弛緩物質として NO が知られている。胎盤形成においても NO は絨毛が侵入していく際に血管拡張、血管応答性の向上などと重要な働きをすることが分かっている。さらには、クロマチンの修飾を通して胎児のエピジェネティックなプログラミングにまで関わる事が分かってきた。正常妊娠では、血中 ADMA は分娩に向けて低下していく。とりわけ、今回分かったことは胎盤の ADMA も分娩に向けて低下していくことを示した。ADMA は NO の合成阻害として機能することが知られている。したがって、PRMT1 が妊娠中における ADMA を介した

NO 経路を調整しうる可能性が示唆された。PRMT1 のコンベンショナルノックアウトマウスは胎生初期で致死を示すことは知られていた。最近、PRMT1 が神経細胞、胎生期の血管形成、筋再生、先天性免疫機構に関わることが各細胞特異的ノックアウトマウスモデルを用いた研究で分かってきた。つまり、in vivo の研究により PRMT1 が胎生期、新生仔、ひいては出生後の機能維持に重要な働きをすることが分かってきた。胎生期、新生仔期における PRMT1 の生理学的機能は議論されてきたが、胎盤での PRMT1 はほとんど研究されてこなかった。今回の我々の結果は、胎盤での PRMT1 の経時的発現変化を解析した初めての報告であり、PRMT1 を介したタンパク質のアルギニンメチル化が母体胎児における恒常性の維持に関与している事の可能性を示唆したデータベースとなりうると考える。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Sato A, Kim JD, Mizukami H, Nakashima M, Kako K, Ishida J, Itakura A, Takeda S, Fukamizu A. Gestational changes in PRMT1 expression of murine placentas. *Placenta*. 2018;65:47-54. doi: 10.1016/j.placenta. 2018.04.001.

[学会発表](計2件)

高橋七瀬、牧野真太郎、奥野利明、横溝岳彦、板倉敦夫．ヒト陣痛前の羊水中プロスタグランジン E2 と PGE 合成酵素及び輸送体に関する研究 第 25 回日本胎盤学会

高水藍、竹田純、牧野真太郎、板倉敦夫．妊娠期間における遊走白血球数の変化 第 25 回日本胎盤学会

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

板倉 敦夫 (ITAKURA, Atsuo)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：70262897

##### (2)研究分担者

牧野 真太郎 (MAKINO, Shintaro)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：70570894

##### (3)連携研究者

深水 昭吉 (FUKAMIZU, Akiyoshi)

筑波大学大学院・生命科学研究科 生命環境学群 生物資源学類・教授

研究者番号：60199172

##### (4)研究協力者

佐藤 杏奈 (SATO, Anna)