

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月22日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590364

研究課題名（和文） 胎盤組織特異的な smallRNA の同定とその生理機能の解明

研究課題名（英文） Identification of placenta specific small RNA

研究代表者

秦健一郎（Kenichiro Hata）

独立行政法人国立成育医療研究センター・周産期病態研究部・部長

研究者番号：60360335

研究成果の概要（和文）：

初年度は、複数の trophoblast stem 細胞株を、FGF4 存在下に未分化な状態を維持したまま培養して total RNA を回収し、更にカラム精製とポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、高品質の 20-40mer の分子量の RNA 画分を抽出した。初年度から次年度にかけて、抽出した small RNA 分子に対して、アダプターライゲーションとそれに続き逆転写反応と PCR を行い、small RNA 分子を増幅してライブラリー化した。次年度は、このライブラリーを用い、small RNA 分子の配列を網羅的に解析した。また、DNA マイクロアレイを用いて、small RNA を同定した。

次年度から最終年度は、引き続きライブラリーの網羅的解析を行い、TS 細胞と胎盤で高発現する miRNA ファミリーを抽出し、並行して候補 miRNA の発現組織特異性を再検証した。抽出した miRNA ファミリーの一部は、数十個の miRNA が存在する miRNA クラスター由来の産物であり、E9.5 の胚体外組織で特殊な発現制御を受けていた。本研究で同定した miRNA が、発生時期と組織特異的に、特殊な遺伝子発現状態として制御されている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We prepared total RNA from several trophoblast stem cell lines under FGF4 contained medium condition to keep undifferentiated state. Then collected total RNA were purified by column and polyacrylamide gel electrophoresis to pick up highly purified 20-40 mer small RNA fractions. These purified small RNA molecules were ligated with special adaptors and then revers transcription and PCR were done with adapter-ligated RNA molecules to make the small RNA libraries of trophoblast stem cell lines. The libraries were sequenced and analyzed by small RNA micro arrays. Sequencing and microarray data showed some miRNA families were expressed in both trophoblast stem cells and placental tissues. A part of miRNAs are derived from a miRNA cluster in extraembryonic tissues of E9.5 specifically. Our finding suggests that the miRNAs could be regulated uniquely in mouse development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：胎盤、small RNA、エピジェネティクス、TS細胞、DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

<胎盤の発生にはエピジェネティックなゲノム機能制御が重要である>

DNAメチル化をはじめとするエピジェネティックなゲノム機能制御は、哺乳類の発生と生存に必須の機構である。エピゲノム機構破綻によって起こる代表疾患であるゲノムインプリンティング異常症や、エピゲノム異常モデルマウスでは、胎児のみならず胎盤にも形成異常が観察されることが報告されているが、それらの個々の分子メカニズムの詳細は解明されていない。

実際に我々が作製した Dnmt3L 変異マウスは、卵子で確立されるインプリンティング遺伝子の DNAメチル化が失われるため、母アリの DNAメチル化によって制御されるインプリンティング遺伝子群の発現制御が全て破綻する。その結果、異常卵子由来の胚では、胎児の発育異常と共に、栄養芽細胞の分化異常を来し、胎盤も著名な形成不全を呈することを報告した (Dev Biol, 297; 361, 2006)。この結果は、個々のインプリンティング遺伝子 (p57kip2, Mash2, Peg10 等) の発現異常モデルマウスでも、胎盤形成異常が観察される事実と合致する。インプリンティング現象のみならず、X染色体不活性化にかかわる機構を破綻させたモデルマウスは、胚体外組織の分化異常を呈して着床前後の時期に致死である。このように、胎盤分化に必須の遺伝子群の発現制御には、DNAメチル化やヒストン修飾等のエピジェネティックな制御機構が特に重要な役割を担っていることが明らかになっている。

<胎盤では small RNA によるレトロウイルス様配列の抑制が行われている可能性が示唆される>

上述のように、DNAメチル化による遺伝子発現が胎盤の発生に必須である事が示されているが、一方で、胎盤のゲノムは、他の組織と比較すると全体に低 DNAメチル化状態であることが知られている。その生理的意義は明らかでないが、胎盤の発生に必要なレトロウイルス様配列を持つ遺伝子の発現に対する寛容性を担保している可能性が考えられる。ヒト胎盤の構成因子である合胞体栄養膜細胞の分化には、Syncytin 遺伝子の発現が必須であると推測されている。マウスやヒツジなど他の哺乳類でも同様に、レトロウイルス様の配列を持つ遺伝子が、胎盤の発生に必

須の役割を担っていることが示されている。通常、このようなレトロウイルス様の配列をもつ領域は、DNAメチル化により発現が高度に抑制されている。しかし胎盤では、正常な発生にこのようなレトロウイルス様の配列を持つ遺伝子が必要なため、DNAメチル化による発現抑制を免れている必要がある。しかし、ゲノムワイドな低 DNAメチル化状態を維持するということは、当然ながら細胞障害性のある他のレトロウイルス様配列領域の転写を活性化する危険も同時に孕む。この危険を回避するために、胎盤には DNAメチル化に依存しないレトロウイルス様配列の抑制機構が存在していると予想される。この予想を裏付けるように、実際に、レトロトランスポゾンが発現している卵子や胚盤胞期までの初期胚には、内在性レトロウイルス由来のセンス鎖と共に、アンチセンス鎖産物も存在している。これらの細胞や胚で Dicer 遺伝子機能を阻害した報告では、レトロウイルス由来配列の発現が上昇することから、卵子や初期胚では、センス鎖とアンチセンス鎖が siRNA を形成し、RNAi 経路を介した抑制系が存在すると考えられている。また最近、マウスのオス生殖細胞で、Piwi ファミリータンパク質と複合体を形成してレトロトランスポゾンの抑制に働いている small RNA が同定され、piRNA と名づけられた。低 DNAメチル化状態を維持する胎盤でも同様に、small RNA を介した経路によって、細胞障害性のある配列の発現抑制を行っている可能性が推測される。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究は、胎盤組織特異的な small RNA 配列を網羅的に取得し、その生理機能を解析することで、胎盤の発生分化にかかわる small RNA の同定と、胎盤の特殊なエピジェネティクス環境を支える分子メカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

<TS細胞を用いた small RNA 分子の網羅的同定>

胎盤組織からの回収と比較して、TS細胞は再現性のある均一な細胞集団が得られるという実験上の利点がある。TS細胞から small RNA 分子を回収し、小規模な配列解析を行い、small RNA 配列の網羅的同定を進めた。

<胎盤特異的 small RNA の同定と発現変動解析>

上記網羅的手法によって同定された small RNA 配列情報と併せて、他の組織や分化 TS 細胞を用いたマイクロアレイ解析を行い、TS 細胞や分化状態に特異的な small RNA を同定した。TS 細胞で同定された胎盤特異的 miRNA および piRNA は、in vivo で発生段階別に発現の有無を確認した。miRNA は、Applied Biosystems 社の完成型 miRNA に対する特異的プライマーを用いて定量解析を行った。

<同定された胎盤特異的 small RNA の機能解析>

同定された miRNA の標的遺伝子の、胎盤の発生分化に伴う発現変動を解析した。

<新規 small RNA の同定>

研究計画 1 で同定された配列には、未知の small RNA が含まれている可能性がある。これらの配列を二次構造予測やゲノム上へのマッピングによって予測し、in vivo でそれらが生理的機能を持っている可能性を検証することを試みた。

4. 研究成果

初年度は、複数の trophoblast stem 細胞株を、FGF4 存在下に未分化な状態を維持したまま培養して total RNA を回収し、更にカラム精製とポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、高品質の 20-40mer の分子量の RNA 画分を抽出した。初年度から次年度にかけて、抽出した small RNA 分子に対して、アダプターライゲーションとそれに続き逆転写反応と PCR を行い、small RNA 分子を増幅してライブラリー化した。次年度は、このライブラリーを用い、small RNA 分子の配列を網羅的に解析した。また、DNA マイクロアレイを用いて、small RNA を同定した。

次年度から最終年度は、引き続きライブラリーの網羅的解析を行い、TS 細胞と胎盤で高発現する miRNA ファミリーを抽出し、並行して候補 miRNA の発現組織特異性を再検証した。抽出した miRNA ファミリーの一部は、数十個の miRNA が存在する miRNA クラスター由来の産物であり、宿主遺伝子は E9.5 の胚体外組織で特殊な発現制御を受けていた。本研究で同定した miRNA が、宿主遺伝子の発生時期と組織特異的に、特殊な遺伝子発現状態を制御されている可能性が示唆された。

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 3 件)

秦健一郎 胎盤形成のエピジェネティクス, 臨床産婦人科 65, 243-247, 2011

Tomizawa S et al. Dynamic stage-specific changes in imprinted differentially methylated regions during early mammalian development and prevalence of non-CpG methylation in oocytes. Development 138, 811-820, 2010

Henckel, A. et al. Histone methylation is mechanistically linked to DNA methylation at imprinting control regions in mammals. Hum Mol Genet. 18, 3375-3383, 2009

[学会発表] (計 2 件)

招請講演

秦健一郎 ジェネティクスを越えてエピジェネティクスへ-周産期のエピジェネティクス 遺伝医学合同学術集会 2011年 6月 17日 京都

秦健一郎 発育不全とエピジェネティクス 群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点シンポジウム 2012年 1月 12日 前橋

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
なし

[その他]
特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秦健一郎 (Kenichiro Hata)

独立行政法人国立成育医療研究センター・周産期病態研究部・部長

研究者番号: 60360335

(2) 研究分担者 該当者なし

()

研究者番号:

(3) 連携研究者 該当者なし

()

研究者番号: