

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24248048

研究課題名(和文) 栄養膜幹細胞におけるリプログラミング因子LIN28Aの機能解析

研究課題名(英文) Studies on the role of LIN28A in mouse trophoblast stem cell

研究代表者

田中 智 (Tanaka, Satoshi)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：90242164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,100,000円

研究成果の概要(和文)：マウスTS細胞におけるLIN28Aの生理的機能を明らかにすることを目的に、RIP-SeqによるLIN28A結合RNAの網羅的な同定と、LIN28Aの発現抑制実験(KD)を行った。LIN28A結合mRNAは、ヒトES細胞で同定されていた標的RNAと大きく異なっており、生理的機能も細胞種により異なると考えられた。KDは幹細胞の維持に影響しなかったが、分化誘導すると細胞死が誘導された。TS細胞において、LIN28Aは分化誘導直後の生存に重要である。

研究成果の概要(英文)：To elucidate a role of LIN28A, an RNA-binding protein, in mouse trophoblast stem cells, we identified LIN28A-binding mRNAs by RIP-seq analysis. The LIN28A-binding mRNAs revealed by the present study were largely different from those identified in human ES cells, implying that a physiological role of LIN28A is different between TS and ES cells. Knockdown of LIN28A only slightly perturbed gene expression profile of TS cells. However, LIN28A KD TS cells mostly died within 24 hours after induction of differentiation. These results suggested that LIN28A is required for cell survival in early phases of trophoblast cell differentiation.

研究分野：細胞生化学

キーワード：栄養膜幹細胞 LIN28A RNA結合タンパク質 TS細胞

1. 研究開始当初の背景

ほ乳類胚の細胞は、胚盤胞形成時におこる最初の細胞分化により、内部細胞塊 (ICM) と栄養芽層 (TE) の2つの組織を形成する。マウスでは、それぞれの組織から胚性幹細胞 (ES 細胞) と TE 栄養膜幹細胞 (TS 細胞) が樹立されており、これらの幹細胞株の分化能は、それぞれが由来する組織の性質をよく反映している。例えば、キメラ胚において ES 細胞が TE 由来の胎盤栄養膜細胞に寄与することは無く、逆に、TS 細胞が ICM に由来する胚体や生殖細胞に寄与することもない。これらの幹細胞株に共通して発現するタンパク質には、分化運命とは関係なく、幹細胞としての性質の維持に何らかの機能を果たすものがあることが期待される。

以前の研究において、我々は、TS 細胞を用いたサブトラクションスクリーニングにより未分化状態特異的遺伝子として線虫 *Lin-28* のマウスホモログ *LIN28A* を同定した。*LIN28A* は ES 細胞でも発現しており、やはり分化に伴い発現が減少する。また、ヒト *LIN28A* はヒト iPS 細胞作製におけるリプログラムファクターの1つでもある。これらのことから、我々は *LIN28A* に注目し、TS 細胞と ES 細胞に共通する何らかの生理的機能を有するのではないかという仮説を立てた。

LIN28A タンパク質は RNA 結合ドメインを有する。*let-7* miRNA 前駆体への結合と、それによる成熟型 *let-7* miRNA の生成阻害に関する機構は特に盛んに解析されており、*let-7* 発現阻害を介した始原生殖細胞の分化制御や、がんへの関わりなどが示唆されている。また、EC 細胞から神経細胞の分化を促進しグリア細胞の分化を抑制するが、この機能には *let-7* 発現制御は無関係であるとの報告もある。*LIN28A* 結合 RNA には *Igf2* やヒストン *H2a* 遺伝子などの mRNA も含まれ、mRNA の安定化と翻訳の促進作用が報告されている。また、Peng らは、ヒト ES 細胞における *LIN28A* 結合 RNA の網羅的同定を行い、*LIN28A* 結合 RNA にリボソームタンパクや代謝酵素をコードする mRNA が有意に多く濃縮されていることを報告している (Peng *et al.* *Stem Cells*, 29:496-504, 2011)。

一方、TS 細胞における、*let-7* miRNA 以外の *LIN28A* 結合 RNA に関する報告は無い。

そこで本研究計画では、TS 細胞を用いて *Lin28a* の発現操作を行い、細胞表現型への影響を解析することとした。また、抗 *LIN28A* 抗体を用いた RNA 免疫沈降法 (RIP) により、TS 細胞における *LIN28A* 結合 RNA の同定を行った。

2. 研究の目的

大規模シーケンサーを用いた RIP-Seq による *LIN28A* 結合 RNA の網羅的な同定と、TS 細胞における *LIN28A* の発現操作を軸とした実験から、TS 細胞における *LIN28A* の

生理的機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス TS 細胞の維持と分化誘導

マウス TS 細胞は、既報に従い、25 ng/ml FGF4、1 µg/ml heparin、およびマウス胎仔繊維芽細胞培養上清 (MEF-CM) を含む培地で継代維持した。またこれらの因子を除くことで分化を誘導した。

(2) 抗 *LIN28A* 抗体を用いた RNA 免疫沈降 (RIP)

マウス TS 細胞溶解液から、抗 *LIN28A* 抗体 (Protein tech 社製) を結合させたマグネットビーズを用いて *LIN28A*/RNA 複合体を回収し、そこから *LIN28A* 結合 RNA を抽出した。得られた RNA の一部から cDNA ライブラリーを作製し、MiSeq (illumina 社) による大規模シーケンスに供した (RIP-seq)。また、同様にして抽出した RNA から常法に従って cDNA を調製し、定量的 PCR による RIP-seq の validation を行った。

(3) *LIN28A* ノックダウン TS 細胞株の作製

マウス *Lin28a* mRNA を標的とする shRNA を発現するプラスミドベクターを作製し、エレクトロポレーションにより TS 細胞に導入した。用いたベクターには抗 Zeocin 遺伝子が搭載されている。Zeocin 添加培地で安定形質転換株を選択し、出現した TS 細胞コロニーをピックアップして複数の *LIN28A* ノックダウン TS 細胞クローンを得た。

(4) RT-qPCR

常法に従い RNA から cDNA を合成し、定量 PCR (qPCR) により RNA の発現量 (存在量) を解析した。解析には 7500 Real Time PCR system (life technologies) を用いた。合成反応には Thunderbird SYBR® qPCR mix (TOYOBO) を 1 反応あたり 10 µl 用い、同一サンプルについて 3 反応ずつ行った。

プログラムは 95°C 1 分 (初期変性)、(95°C 15 秒 (変性)、60°C 1 分 (結合・合成)) × 40 で行い、増殖曲線が全てのサンプルにおいて指数的に増加している時点のサイクル数を算出してサンプル間の因子量を相対的に比較した。

(5) 生細胞、および死細胞の染色

PBS で洗浄した TS 細胞を、0.5 µM カルセイン/1 µM エチジウムホモダイマー/PBS を用いて室温で 30~45 分間染色し、生細胞 (カルセイン・緑色蛍光) と死細胞 (エチジウムホモダイマー・赤色蛍光) を同時に観察した。

4. 研究成果

(1) TS 細胞における *LIN28A* 結合 RNA の同定

抗 LIN28A 抗体を用いた RNA 免疫沈降 (RIP) を行い、得られた RNA の配列を大規模シークエンスにより網羅的に決定した。その結果、2104 遺伝子の mRNA が RIP により有意に高く濃縮されたと判断された。これらを Peng らの既報にあるヒト ES 細胞における LIN28A 結合 mRNA と比較すると、その大部分が異なっていた (図 1)。すなわち、LIN28A は両幹細胞で共通の標的 RNA を持つのではなく、各幹細胞特異的に標的となる RNA が異なる。このことから、LIN28A が果たしている主な生理的機能も、TS 細胞と ES 細胞間では異なるものと考えられた。

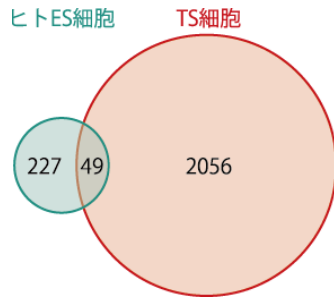


図 1 マウス TS 細胞とヒト ES 細胞における LIN28A 結合 mRNA の遺伝子数。RIP-seq で同定された LIN28A 結合 mRNA は、マウス TS 細胞とヒト ES 細胞では大きく異なる。

TS 細胞における LIN28A 結合 mRNA の遺伝子オントロジーを解析したところ、有意に濃縮されたと判断された遺伝子オントロジーの上位には、1) ATP およびプリン塩基結合、2) タンパク質分解、3) リン酸化・脱リン酸化があった。TS 細胞において、LIN28A はこれらの生理現象を間接的に調節していることが示唆される。

さらに、LIN28A が TS 細胞の未分化状態の維持に関わっていることを期待して、TS 細胞の未分化マーカーである Cdx2 の mRNA が LIN28A 結合 mRNA に含まれるかどうかを検証した。2 種の抗 LIN28A 抗体 (Protein tech 社製、Thermo 社製) を用いてそれぞれ独立に RIP を行い、得られた産物における Cdx2 mRNA の存在量をリアルタイム PCR により測定したところ、全 RNA、あるいは

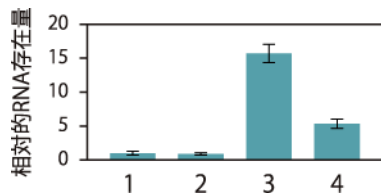


図 2 RIP による Cdx2 mRNA の濃縮。2 種類の抗 LIN28A 抗体を用いた RIP 産物 (カラム 3, 4) では、全 RNA (カラム 1)、およびノーマル IgG による RIP (カラム 2) に比べ Cdx2 mRNA が濃縮されていた。

ノーマル IgG を用いて RIP した場合に比べ有意に濃縮されていた (図 2)。LIN28A は Cdx2 mRNA にも結合しており、その転写後調節に関与していることが期待される。

(2) LIN28A ノックダウン (KD) TS 細胞株の作出

LIN28A の発現抑制が TS 細胞におよぼす影響を知るために、shRNA 発現ベクターを用いて LIN28A のノックダウンを試みた。予備検討では分化や細胞死の誘導がなかったことから、shRNA を恒常的に発現する KD 株を作製することとし、9 個の独立したラインを得た。うち 1 ラインでは KD 効果が認められず、LIN28A の発現量は、LacZ に対する shRNA を発現するコントロールラインと同等のままであったが、他の 8 ラインでは LIN28A 発現量の低下が確認された。これらの LIN28A KD ラインでは未分化状態特異的遺伝子である Cdx2 の発現量が低下傾向にあり (図 3)、LIN28A が Cdx2 mRNA の発現量の安定化に寄与していることが示された。

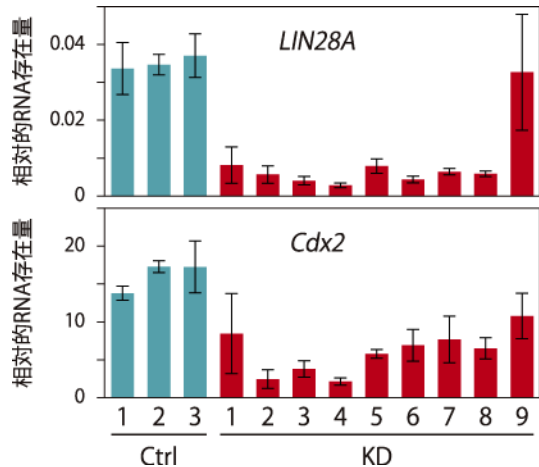


図 3 LIN28A ノックダウン TS 細胞株における Cdx2 の発現。コントロール (Ctrl) 3 ラインとノックダウン株 (KD) 9 ラインにおける LIN28A および Cdx2 の発現を解析した。

Cdx2 は未分化 TS 細胞の維持に重要な遺伝子であるとされている。しかし、本研究で得られた LIN28A KD ラインでは分化マーカー遺伝子の発現は有意に上昇しておらず、未分化状態の破綻は起こっていないものと考えられた。これは、KD 効果の最も大きい 3 ラインを用いたトランスクリプトーム解析の結果、KD ラインがコントロールと区別されないことから支持される (図 4)。これらの結果は、TS 細胞の未分化状態が、ある程度の Cdx2 の発現量があれば維持されることを意味する。また、LIN28A も少なくとも一定量以上の発現があれば TS 細胞の維持には十分であることを示す。

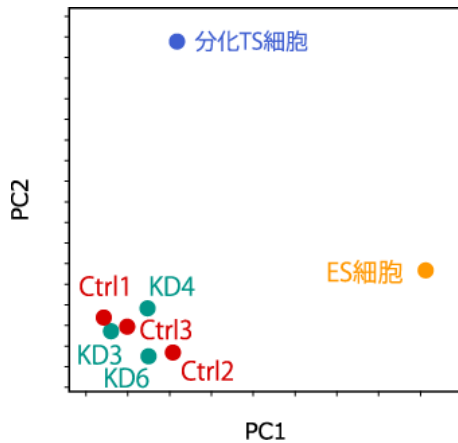


図4 トランスクリプトームによる主成分分析。コントロール (Ctrl) 3 ラインとノックダウン株 (KD) 3 ラインは、互いに類似するトランスクリプトームを有する。

(3) LIN28A KD TS 細胞株の表現型解析

TS 細胞は、未分化維持に必要な因子である FGF4 を除くことで、主に栄養膜巨細胞への分化が誘導される。LIN28A KD 株においても、FGF4 除去後分化マーカーの上昇が認められた。すなわち、これらの細胞では分化能も維持されていた。しかし、KD 株はいずれもコントロール株に比べ増殖速度が遅く、また、分化誘導 24 時間後の生存率が著しく低下していた (図 5)。LIN28A は、未分化 TS 細胞の増殖や、分化 TS 細胞の生存において重要な機能を果たしていることが示唆される。RNA-seq の結果から LIN28A KD ラインで発現量が有意に減少していると判断される遺伝子の中に、Cdkn1c (p57, Kip2) があった。Cdkn1c は栄養膜巨細胞の分化・生存に必須であると報告されている。RIP-seq では LIN28A タンパク質と Cdkn1c mRNA の直接の相互作用を示唆する結果が得られていないことから、LIN28A は、間接的に Cdkn1c の発現量を調節することで栄養膜巨細胞の分化を制御している可能性がある。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

- ① Yuji Sakamaki, Koji Hayakawa and Satoshi Tanaka. RNA binding protein Lin28a interacts with various mRNA in the mouse trophoblast stem cells. World Congress on Reproductive Biology 2014, Sept 2-4/2014, Edinburgh, UK.

[図書] (計 0 件)

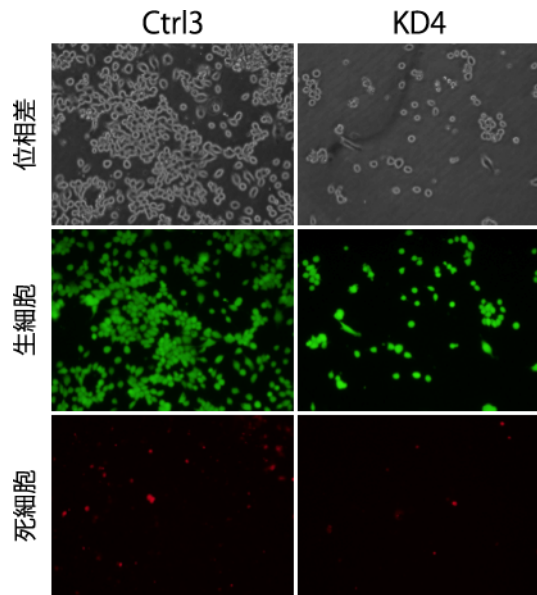


図5 分化誘導 24 時間後の細胞の生存。同数の細胞を播種後、FGF4 の除去により分化を誘導した。分化誘導 24 時間後には、コントロールライン (Ctrl3) に比べ、LIN28A KD ライン (KD4) では顕著な細胞数の減少が観察された。エチジウムホモダイマーを用いた死細胞の簡易染色では、コントロールでも死細胞が観察され、その割合は両群で同等であった。細胞死は分化誘導直後に誘発され、染色前の洗浄操作で、KD4 ではすでに大部分の死細胞が除去されているものと考えられる。

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 智 (TANAKA SATOSHI)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
准教授
研究者番号：90242164

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

秦 健一郎 (HATA KENICHIRO)
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