

Akt シグナルが ES 細胞から 2 細胞期様細胞への変換に及ぼす影響

Effect of Akt signaling on the transition from ES cells to 2-cell-like cells

北村 穂乃香¹・古田 明日香²・中村 肇伸^{1,2,3}

¹長浜バイオ大学大学院バイオサイエンス研究科

²長浜バイオ大学バイオサイエンス学部アニマルバイオサイエンス学科

³長浜バイオ大学ゲノム編集研究所

Honoka Kitamura¹, Asuka Fruta², Toshinobu Nakamura^{1,2,3}

¹ Graduate School of Bio-Science, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology

² Department of Animal Bio-Science, Faculty of Bio-Science, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology

³Genome Editing Research Institute, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology

要旨

ES 細胞は、胚盤胞の将来胚体を形成する内部細胞塊から樹立された細胞であり、胚体外組織への分化能を失った多能性細胞であると信じられてきた。しかし、ES 細胞には 2 細胞期胚で一過的に活性化する遺伝子群を発現する亜集団が存在し、この「2 細胞期様細胞」は、初期の着床前胚に移植した場合に、内部細胞塊だけではなく、栄養外胚葉にも寄与し、分化全能性を有することが報告された。現在までに、幹細胞の未分化性の維持や体細胞核リプログラミング過程において、Akt シグナルが重要な役割を担っていることが明らかにされている。そこで、本研究では Akt シグナルが ES 細胞から 2 細胞期様細胞への変換に及ぼす影響を検討した。

ES cells are derived from the inner cell mass of the blastocyst, and have been believed to be pluripotent cells that maintain the ability to make embryonic cells but not extra-embryonic tissues. However, it has been reported that there is a sub-population of ES cells that express a group of genes that are transiently activated in 2-cell stage embryos, and these "2-cell-like cells" have totipotency, the ability to differentiate both in the embryonic and extra-embryonic cells. To date, it has been shown that Akt signaling plays an important role in the maintenance of undifferentiated stem cells and in the process of somatic cell nuclear reprogramming. In this study, we examined the effect of Akt signaling on the transition from ES cells to 2-cell-like cells.

1. ES 細胞に含まれる 2 細胞期様細胞の可視化

ES 細胞に含まれる 2 細胞期様細胞は内在性のレトロウイルスの一種である Murine endogenous retrovirus with leucine tRNA primer (MuERV-L) を発現することが知られている。そこで、MuERV-L の発現を制御する LTR の下流に赤色蛍光タンパク質である tdTomato をコードする遺伝子を繋いだコンストラクト (2C::tdTomato)¹⁾ を受精卵の雄性前核にマイクロインジェクションした。その結果、過去の報告

通り、全能性を有する 2 細胞期胚において tdTomato の蛍光が確認できた (図 1)。MuERV-L は着床前の発生過程において 2 細胞期から一過的に発現することが知られており、2C::tdTomato により、内在性の MuERV-L の発現を再現できることが明らかとなった。次に、ES 細胞に 2C::tdTomato を遺伝子導入し、薬剤選択により安定細胞株を作製した。その結果、ごく一部の細胞が tdTomato 陽性になることが分かった。また、tdTomato 陽性細胞をソーティングし、qRT-PCR により内在性の MuERV-L の発現を確認したところ、tdTomato 陽性細胞でのみ MuERV-L の発現を確認することができた (図 1)。これらのことから、ES 細胞に含まれる 2 細胞期様細胞を可視化することが可能となった。

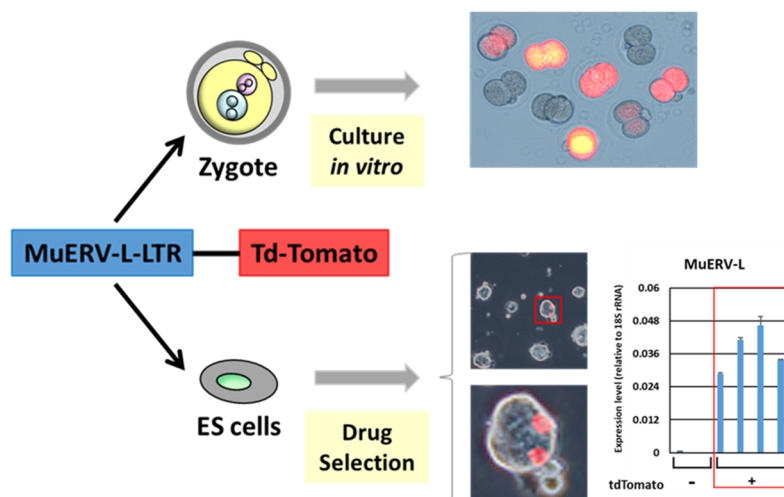


図 1 ES 細胞に含まれる 2 細胞期様細胞の可視化

受精卵の雄性前核に MuERV-L の発現を制御する LTR の下流に tdTomato をコードする遺伝子を繋いだコンストラクト (2C::tdTomato) をマイクロインジェクションし、2 細胞期における tdTomato の発現を検討した (上部写真)。ES 細胞に 2C::tdTomato を遺伝子導入し、薬剤選択により安定細胞株を作製した (下部写真)。tdTomato 陽性細胞をソーティングし、qRT-PCR により内在性の MuERV-L の発現を確認した。(下部グラフ)。

2. Akt を条件的に活性化できる ES 細胞の作製

ES 細胞において、Akt の酵素活性を迅速に ON/OFF するために、Akt-Mer 融合タンパク²⁾を用いた。Akt-Mer は、活性化型 Akt とエストロゲン受容体のリガンド結合領域の変異体 (Mer) との融合タンパク質である。Akt-Mer を発現する ES 細胞では、Mer のリガンドとなる 4OHT (4-hydroxytamoxifen) の添加・除去により Akt の酵素活性が可逆的に制御できることが明らかにされている³⁾。4OHT 非存在下では、Akt-Mer に HSP90 (heat shock protein 90) が結合することにより、不活性化状態になる。一方、4OHT 存在下では、4OHT が Mer と結合することにより、Mer が構造変化を起こし、HSP90 から解離する。解離した Akt-Mer は細胞膜でリン酸化され活性化状態となる (図 2A)。2 細胞期様細胞を可視化できる ES 細胞に pCAGpuro/Akt-Mer 発現ベクター遺伝子導入し、薬剤選択により安定細胞株を作製した。この ES 細胞において、Akt-Mer のリン酸化は、4OHT 添加 30 分後から始まり、2 時間後にはプラトーに達し、24 時間後とほぼ同程度のリン酸化が観察された (図 2B)。これらのことから、4OHT の添加により Akt-Mer のリン酸化は非常に速やかに誘導され、そのリン酸化は 24 時間後においても維持していることが明らかとなった。

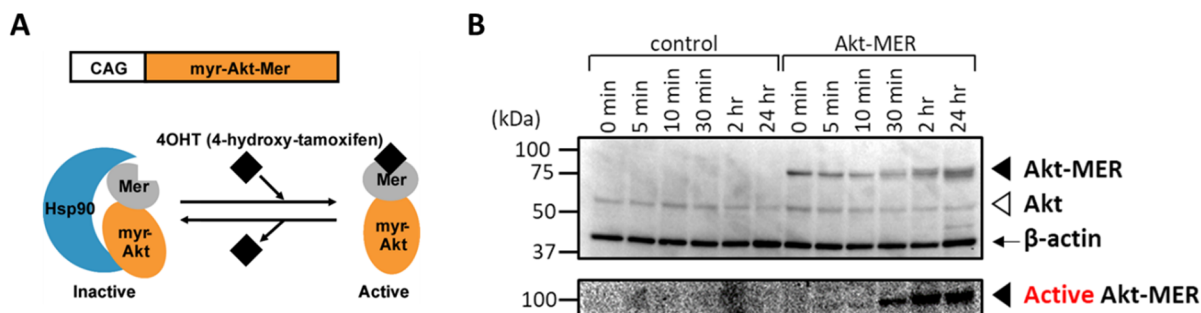


図2 Aktを条件的に活性化できるES細胞の作製

(A) 4OHT非存在下では、Akt-MerにHSP90が結合することにより、不活性化状態になる。一方、4OHT存在下では、4OHTがMerと結合することにより、Merが構造変化を起こし、HSP90から解離する。解離したAkt-Merは細胞膜でリン酸化され活性化状態となる。(B) 4OHT添加後のAkt-MERの活性化状態を、抗リン酸化Akt抗体を用いたウエスタンブロッティングにより検討した。

3. AktがES細胞から2細胞期様細胞への変換に及ぼす影響

ES細胞から2細胞期様細胞を誘導する過程において4OHTを添加することにより、Akt-Merを活性化した。その結果、2細胞期様細胞誘導5日目において、2細胞期様細胞の指標となるtdTomato陽性細胞の割合が顕著に低下することが明らかとなった(図3)。これまでの研究から、Aktシグナルを活性化することにより、ES細胞の未分化性をLIF非存在下で維持できること⁴⁾、ES細胞と体細胞の細胞融合における体細胞核リプログラミングの効率を増幅すること³⁾、始原生殖細胞からEG細胞への脱分化を促進すること⁵⁾、iPS細胞の樹立効率が上昇すること⁶⁾、が報告されており、多能性細胞の誘導や維持に重要であることが考えられる。したがって、Aktシグナルは、2細胞期細胞を誘導する条件下でも多能性細胞を維持する役割を果たす可能性が示唆された。

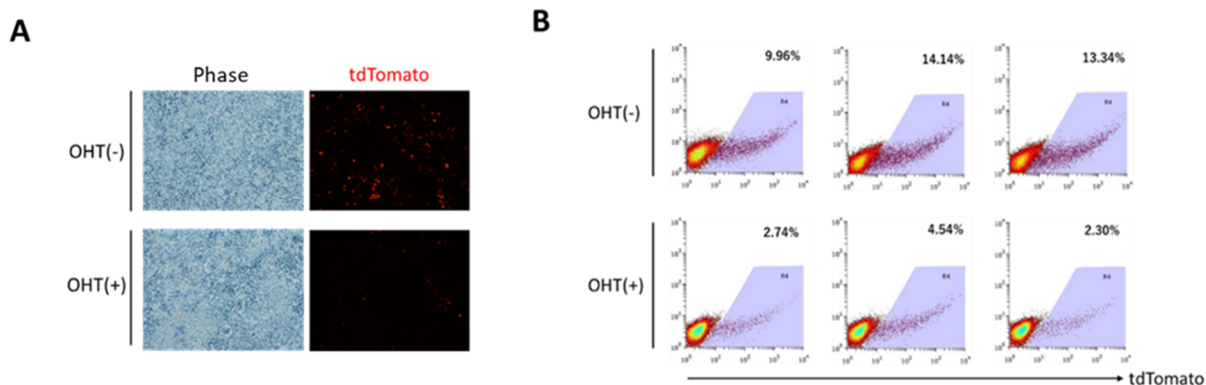


図3 AktがES細胞から2細胞期様細胞への変換に及ぼす影響

ES細胞(MuERV-L-LTR-tdTomato: Akt-MER)を、KSRを含む培地中でMERのリガンドであるOHT(4-hydroxytamoxifen)存在下で5日間培地交換せずに培養した。tdTomatoをMuERV-L陽性細胞の指標として蛍光観察(A)、FACS解析(B)を行った。

4. Tbx3 が ES 細胞から 2 細胞期様細胞への変換に及ぼす影響

Akt は、ES 細胞の未分化性の維持に関わるサイトカインである LIF により活性化されることが知られている⁷⁾。また、ES 細胞において Akt の下流分子として知られている Tbx3 は、多能性幹細胞において未分化性の維持や生殖系列への分化能の改善に重要な役割を果たすことが明らかにされている⁸⁾。そこで、Tbx3 が ES 細胞から 2 細胞期様細胞への変換に及ぼす影響を検討した。そのために、Tbx3 の発現を Venus で可視化でき、TetON システムによりその発現を条件的に誘導できるベクターを構築した(図 4A)。このベクターを HEK293T 細胞にトランスフェクションし、24 時間後に Dox (doxycycline) を添加し、さらに 24 時間培養後、Tbx3 の発現を Venus の蛍光とウエスタンブロッティングにより検討した。その結果、Dox 依存的に Venus (図 4B) と Tbx3 タンパク質 (図 4C) の発現が誘導できることが明らかとなった。

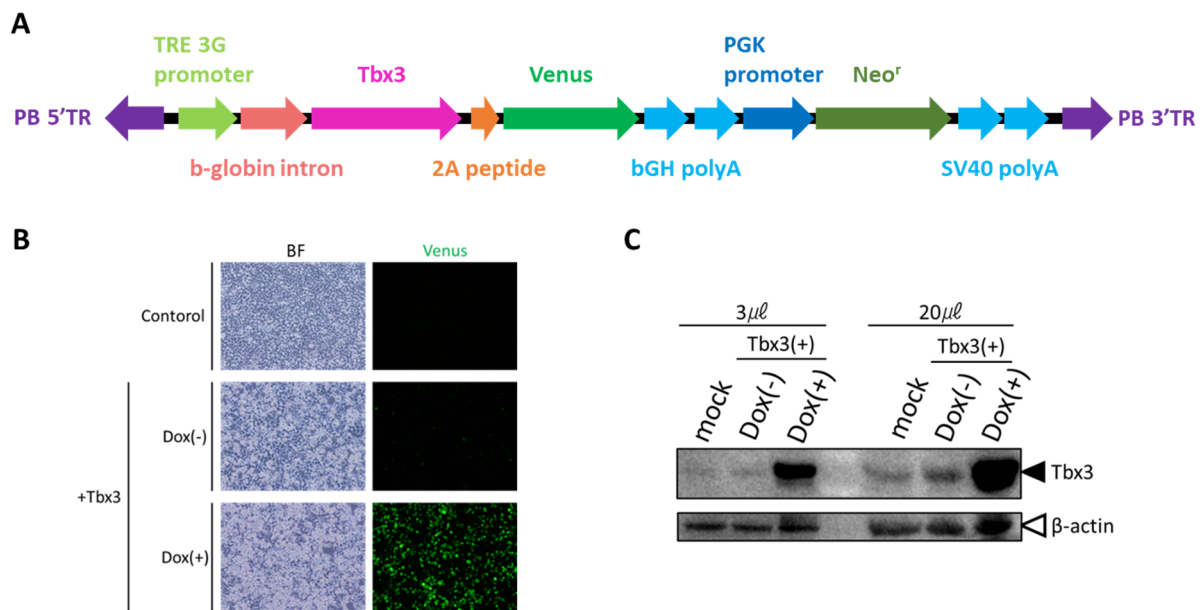


図 4 Tbx3 を条件的に発現する実験系の構築

HEK293T 細胞に PB-TRE3G-Tbx3-2A-Venus-PGK-neo (A) と PB-CAG-Tet3G をコトランスフェクションし、Dox 存在下または非存在下で 24 時間培養し、Venus の発現を蛍光顕微鏡で観察した (B)。また、Tbx3 タンパク質の発現はウエスタンブロッティングにより検討した (C)。

次に、ES 細胞 (MuERV-L-LTR-tdTomato: Akt-MER) に PB-TRE3G-Tbx3-2A-Venus-PGK-neo と PB-CAG-Tet3G を遺伝子導入し、薬剤選択により安定細胞株を作製した。この ES 細胞 (MuERV-L-LTR-tdTomato: Akt-MER: TetON-Tbx3-venus) を用いて、Tbx3 が ES 細胞から 2 細胞期様細胞への変換に及ぼす影響を検討した。その結果、Dox を添加しない条件では、Venus 陰性細胞における tdTomato 陽性細胞の割合は、5.06% ($4.62/93.06 \times 100$) であった。これに対して、Dox を添加した場合には Venus 陽性細胞における tdTomato 陽性細胞の割合が 2 ng/mL、10 ng/mL、および 100 ng/mL において、それぞれ 5.48% ($1.97/35.98 \times 100$)、14.70% ($3.71/25.24 \times 100$)、および 12.44% ($3.88/31.19 \times 100$) となり、いずれの場合にも、Dox を添加しない条件よりも高くなることが明らかとなった (図 5)。これらのことから、Akt は Tbx3 以外の下流分子を介して、ES 細胞から 2 細胞期様細胞への変換を抑制することが示唆された。

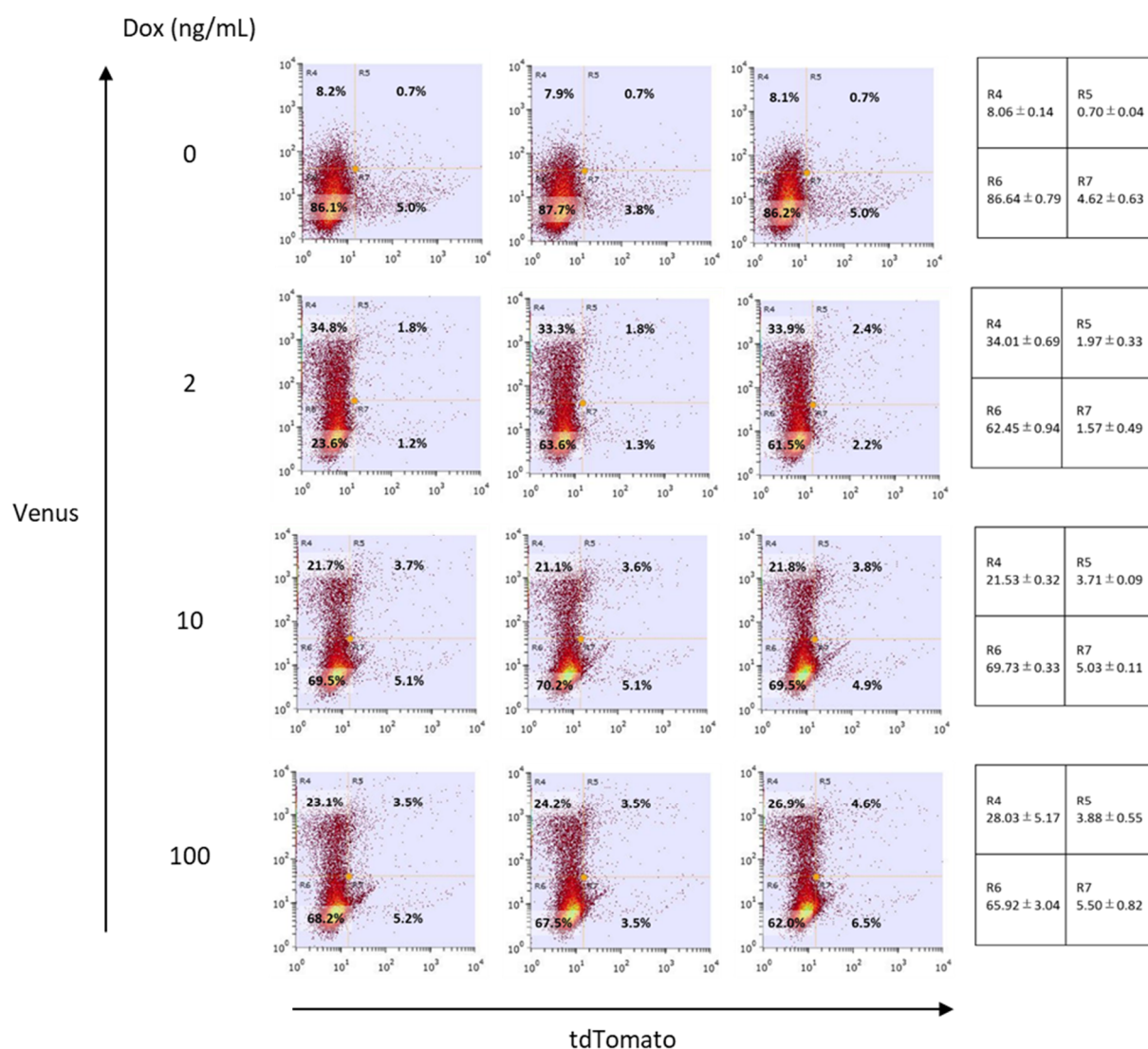


図5 Tbx3 が ES 細胞から 2 細胞期様細胞への変換に及ぼす影響

ES 細胞 (MuERV-L-LTR-tdTomato: Akt-MER: TetON-Tbx3-venus) を、KSR を含む培地中で Dox (2, 10, または 100 ng/mL) 存在下で 5 日間培地交換せずに培養した。Venus と tdTomato の蛍光を FACS を用いて解析した。

参考文献

- 1) Macfarlan TS, Gifford WD, Driscoll S, Lettieri K, Rowe HM, Bonanomi D, Firth A, Singer O, Trono D, Pfaff SL., Embryonic stem cell potency fluctuates with endogenous retrovirus activity., **Nature**. 487, 57-63, (2012).
- 2) Kohn AD, Barthel A, Kovacina KS, Boge A, Wallach B, Summers SA, Birnbaum MJ, Scott PH, Lawrence Jr JC, Roth RA., Construction and characterization of a conditionally active version of the serine/threonine kinase Akt., **J Biol Chem**. 273, 11937-11943, (1998).
- 3) Nakamura T, Inoue K, Ogawa S, Umehara H, Ogonuki N, Miki H, Kimura T, Ogura A, Nakano T., Effects of Akt signaling on nuclear reprogramming., **Genes Cells**. 12, 1269-1277, (2008).
- 4) Watanabe S, Umehara H, Murayama K, Okabe M, Kimura T, Nakano T., Activation of Akt signaling is sufficient to maintain

pluripotency in mouse and primate embryonic stem cells., **Oncogene**. 19, 2697-2707, (2006).

- 5) Kimura T, Tomooka M, Yamano N, Murayama K, Matoba S, Umehara H, Kanai Y, Nakano T., AKT signaling promotes derivation of embryonic germ cells from primordial germ cells., **Development**. 135, 869-879, (2008).
- 6) Sekita Y, Sugiura Y, Matsumoto A, Kawasaki Y, Akasaka K, Konno R, Shimizu M, Ito T, Sugiyama E, Yamazaki T, Kanai E, Nakamura T, Suematsu M, Ishino F, Kodera Y, Kohda T, Kimura T., AKT signaling is associated with epigenetic reprogramming via the upregulation of TET and its cofactor, alpha-ketoglutarate during iPSC generation., **Stem Cell Res Ther**. 12, 510, (2021).
- 7) Niwa H, Ogawa K, Shimosato D, Adachi K., A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells., **Nature**. 460, 118-122, (2009).
- 8) Han J, Yuan P, Yang H, Zhang J, Soh BS, Li P, Lim SL, Cao S, Tay J, Orlov YL, Lufkin T, Ng HH, Tam WL, Lim B., Tbx3 improves the germ-line competency of induced pluripotent stem cells., **Nature**. 463, 1096-1100, (2010).