

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500492

研究課題名(和文) 蛍光マウスを用いた X 染色体不活性化のバイオイメージングと幹細胞研究

研究課題名(英文) Live-cell imaging to monitor X-chromosome reactivation and stem cell research

研究代表者

小林 慎 (Kobayashi, Shin)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・非常勤講師

研究者番号：10397664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000 円、(間接経費) 1,170,000 円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の雌の発生に必須であることが知られている「X染色体不活性化」は、現在、幹細胞の多能性を評価することができる指標としても注目を集めている。しかし、これまで簡便なモニター法は報告されていない。本基盤研究ではX染色体の不活化状態に注目しそれを可視化することにより、幹細胞の状態を、細胞を生かしたまま評価することができる新しい系の構築を行った。これら成果は、X染色体不活化機構の解析などの基礎生物学研究以外に、体細胞の「リプログラミング」の実態の解明などにも役立ち再生医療にも貢献すると考える。

研究成果の概要(英文)：In stem cell research, reactivation of X chromosomes is recognized as an indicator of the pluripotent ground state of stem cells. However, there is no report of the monitoring method on this phenomenon. Therefore, we attempt to develop a novel method to monitor this phenomenon based on a live-imaging technique. This method would help us to understand the reprogramming process at the molecular level. The outcomes of this search will have considerable impact in medical care.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実権動物学

キーワード：遺伝子組換え動物 X染色体不活性化 イメージング

1. 研究開始当初の背景

ヒト iPS 細胞の樹立が報告され幹細胞研究に注目が集まり、再生医療への応用が期待されるようになってきた。将来的な再生医療応用のため、マウスをはじめ実験動物での幹細胞研究が盛んに行われるようになってきている。しかし、一口に幹細胞といっても複数の種類があることが分かってきており、分化能の違いがあることが分かってきた。これまでヒト ES 細胞として同定された「幹細胞」は、マウスの ES 細胞が持つ多能性はなく、限られた細胞種にしか分化できない。またこの細胞は、マウスのエピプラストから樹立された幹細胞である epiSC (epiblasto stem cell) (図 1) に非常に近い性質を持つことが分かってきた (Brons IG et al. Nature, 2007; Tesar PJ et al. Nature, 2007)。epiSC の特徴はキメラを作ることができない、Lif/Stat3 経路に反応しない、そして X 染色体の不活性化が起きている(図では活性化 X 染色体を Xa、不活性化 X 染色体を Xi とする。)などが上げられ、明らかにマウス ES 細胞とは異なる。しかし、epiSC は、特定の遺伝子 (Klf4 または Nanog) を一過性に過剰発現させたり、Lif/Stat3 経路を活性化するような条件で培養することにより、低率であるが ES 細胞にリプログラミングされることが報告された (Hanna J et al. Cell Stem Cell, 2009; Silva J et al. Cell 2009; Siqin B et al. Nature 2009)。再生医療への応用を考えると、epiSC と ES 細胞のエピジェネティックな状態の違いを分子レベルで理解し、いかに epiSC から効率的に ES 細胞を作出するかということが今後重要な課題である。しかし、どちらの細胞もいわゆる幹細胞マーカーである Oct4, Sox2 を発現しておりこれまでのマーカーでは両者の多能性を区別をすることは難しいのが現状である。

2. 研究の目的

X 染色体不活化は現在、幹細胞の多能性を評価することができる指標としても注目を浴びるようになってきたが、これまで簡便なモニター法は報告されておらず未開拓のまま残されていた。本基盤研究では X 染色体の再活性化を検出するモニタリング系を構築することを目的とする。この系を用いることにより「リプログラミング」過程を可視化し、その実態を分子レベルで解析することが可能になると期待できる。

3. 研究の方法

申請者らはこれまで、着床前の初期胚の性別を可能にするために、X 染色体に GFP トランスジーンを挿入したマウス (XGFP マウスと呼ぶ) を作製し、緑色蛍光の有無で雌雄の性別を行い、雌雄産み分けが可能な実験系を確立してきた。更にこの方法を利用し、雄と雌の初期胚の間で遺伝子発現を比較し、これまで雌雄の分化が始まると考えられて

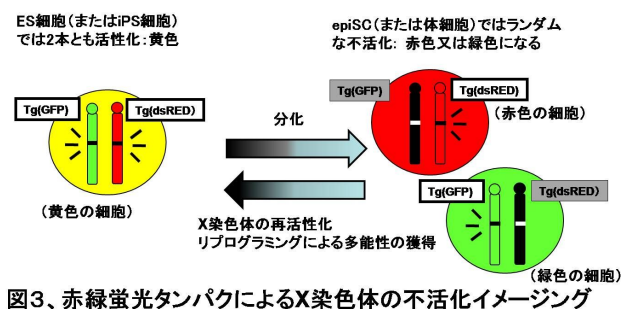
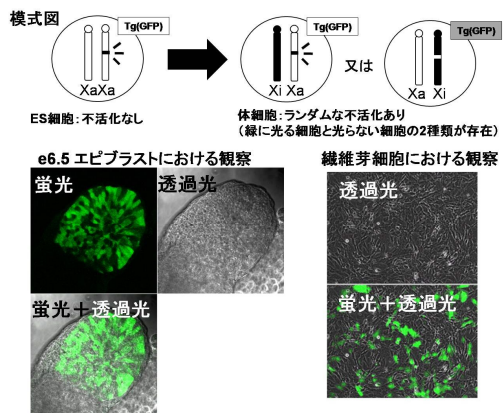
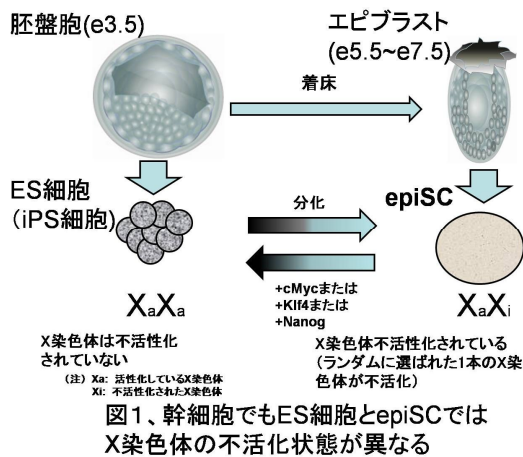
いた生殖巣の分化より、遙かに早い時期に遺伝子発現が異なることを明らかにしている。(Kobayashi, S et al. Curr. Bio, 2006; Kobayashi, S et al. Nucleic Acids Res. 2010, Kobayashi, S et al. PLOS ONE, 2013) この実験系は初期胚における雌雄の選別に有効であるが、同時に X 染色体に挿入された GFP 遺伝子の活性化状態を観察することにより、生きたマウスの個体や胚で X 染色体の不活性化状態をモニタリングできる。X 染色体の不活化とは哺乳類の雌が持つ 2 本の X 染色体の 1 本を不活性化することにより、雄と雌との間で活性化 X 染色体の本数を揃える機構であり、着床後はランダムに選ばれた 1 本の X 染色体が不活性化されることが知られている。実際、我々の実験系で着床後のエピプラストや繊維芽細胞を観察すると、確かに緑色蛍光に光る細胞がまだらに観察でき、報告されているランダムな不活化を確認できた(図 2)。この不活化モニタリングシステムを更に発展させることにより、リプログラミングにより一端起きた不活性化が、再活性化される過程を生きた胚や細胞で検出できると考えた。

4. 研究成果

これまで我々の実験系で用いている X^{GFP} マウスは X 染色体の不活性化が始まることは観察できるが、一度起きた不活性化が再び活性化され、2 本の X 染色体が活性化状態に戻る過程をモニタリングすることはできない。そこで、この問題を解決するため図 3 のように 2 本ある X 染色体それぞれに赤 (DsRed) と緑 (eGFP) の遺伝子を挿入することにより、一端起きたランダムな不活性化 (XaXi: 赤又は緑の細胞) がリプログラミングを受け再活性化 (XaXa: 黄色の細胞) される様子を生きた細胞で検出できると考えた。

本研究では、ES 細胞を用いて、標的部位に相同組み換えにより蛍光タンパクを挿入し、不活化状態を検出することを試みた。これまでの成果により、2 種類の核移行シグナル (NLS) を GFP タンパクに融合させ、その蛍光強度、および細胞内の局在パターンを検討し、最適な NLS を選択した。、蛍光タンパクをコードするレポーター遺伝子を染色体に挿入する時には、挿入位置や挿入方向がレポーター遺伝子の発現に影響を及ぼす可能性が考えられる。この点について評価するため、複数のベクターを作製した。挿入位置、挿入方向による蛍光タンパク発現への影響を、顕微鏡観察及び FACS にて検討し、最適なものを選択した。、得られた ES 細胞について未分化状態及び、分化誘導をかけた状態での蛍光強度の変化を調べた。この解析により、蛍光強度変化の少なく安定して蛍光が観察出来る組み替え ES 細胞を絞り込むことに成功した(未発表データ)。調べた範囲では、この系は上手く不活化状態をモニタリングでき

ることが確認できている。これら成果は、X染色体不活化機構の解析などの基礎生物学研究以外に、体細胞の「リプログラミング」の実態の解明にも役立ち再生医療にも大きく貢献すると考える。



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 14件)

1, Soma M, Fujihara Y, Okabe M, Ishino F, Kobayashi S. *Ftx* is dispensable for

imprinted X-chromosome inactivation in preimplantation mouse embryos

Sci Rep. 2014 Jun 5;4:5181. 査読あり

2, Kobayashi S, Totoki Y, Soma M, Matsumoto K, Fujihara Y, Toyoda A, Sakaki Y, Okabe M, Ishino F.

Identification of an Imprinted Gene Cluster in the X-Inactivation Center *PlosOne*

2013 Aug 6;8(8):e71222. 査読あり

3, Kobayashi S, Fujihara Y, Mise N, Kaseda K, Abe K, Ishino F, Okabe M. The

X-linked Imprinted Gene Family *Fthl17* Shows Predominantly Female Expression Following the 2-cell Stage in Mouse

Embryos *Nucleic Acids Res*. 38(11), 3672-81. (2010) 査読あり

4, Morioka Y, Fujihara Y, Okabe M.

Generation of precise point mutation mice by footprintless genome modification. *Genesis*. 2014 Jan;52(1):68-77. 査読あり

5, Okabe M. The cell biology of mammalian fertilization. *Development*.

2013 Nov;140(22):4471-9. 査読あり

6, Hasuwa H, Ueda J, Ikawa M, Okabe M. miR-200b and miR-429 function in mouse

ovulation and are essential for female fertility. *Science*. 2013 Jul

5;341(6141):71-3. 査読あり

7, Fujihara Y, Tokuhiko K, Muro Y,

Kondoh G, Araki Y, Ikawa M, Okabe M.

Expression of TEX101, regulated by ACE, is essential for the production of fertile mouse spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci*

U S A. 2013 May 14;110(20):8111-6. 査読あり

8, Fujihara Y, Satouh Y, Inoue N, Isotani A, Ikawa M, Okabe M. SPACA1-deficient male mice are infertile with abnormally shaped sperm heads reminiscent of globozoospermia. **Development.** 2012 Oct;139(19):3583-9. doi: 10.1242/dev.081778. 査読あり

9, Satouh Y, Inoue N, Ikawa M, Okabe M. Visualization of the moment of mouse sperm-egg fusion and dynamic localization of IZUMO1. **J Cell Sci.** 2012 Nov 1;125(Pt 21):4985-90. 査読あり

10, Fujihara Y, Kaseda K, Inoue N, Ikawa M, Okabe M. Production of mouse pups from germline transmission-failed knockout chimeras. **Transgenic Res.** 2013 Feb;22(1):195-200. 査読あり

11, Yamaguchi R, Fujihara Y, Ikawa M, Okabe M. Mice expressing aberrant sperm-specific protein PMIS2 produce normal-looking but fertilization-incompetent spermatozoa. **Mol Biol Cell.** 2012 Jul;23(14):2671-9. 査読あり

12, Inoue N, Nishikawa T, Ikawa M, Okabe M. Tetraspanin-interacting protein IGSF8 is dispensable for mouse fertility. **Fertil Steril.** 2012 Aug;98(2):465-70. 査読あり

13, Tokuhiko K, Ikawa M, Benham AM, Okabe M. Protein disulfide isomerase homolog PDILT is required for quality control of sperm membrane protein ADAM3 and male fertility [corrected].

Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Mar 6;109(10):3850-5. 査読あり

14, Isotani A, Hatayama H, Kaseda K, Ikawa M, Okabe M. Formation of a thymus from rat ES cells in xenogeneic nude mouse↔rat ES chimeras. **Genes Cells.** 2011 Apr;16(4):397-405. 査読あり

〔学会発表〕(計 5件)

1、小林慎, 十時泰, 相馬未来, 松本和也, 藤原祥高, 豊田敦, 榊佳之, 岡部勝, 石野史敏「X染色体不活性化中心(Xic)領域に発見したインプリント遺伝子のクラスター」第36回日本分子生物学会年会 2013年12月3-6日 神戸国際会議場

2、小林慎: 信州生命科学サマーセミナー 2013(長野・2013/7/23)「X染色体上に発見したインプリント遺伝子のクラスター」

3、相馬未来, 十時泰, 松本和也, 藤原祥高, 豊田敦, 榊佳之, 岡部勝, 石野史敏, 小林慎 「マウス着床前胚において雌でのみ発現する small RNA の探索」第35回日本分子生物学会年会 2012年12月11-14日

4、小林 慎: 第5回生殖研究若手の会(神奈川・2012/7/26-28) タイトル「雌雄の発生とX染色体上のインプリント遺伝子」

5、Shin Kobayashi: The 22nd CDB Meeting RNA Sciences in Cell and Developmental Biology II(Kobe・2012/06/11-13) Title "Discovery of female specific small RNAs in preimplantation embryos"

〔その他〕
東京医科歯科大学、エビジェネティクス分野
ホームページ

http://www.tmd.ac.jp/mri/epgn/shin_koba

[yashi.html](#)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小林 慎 (Kobayashi, Shin)
東京医科歯科大学、難治疾患研究所研究所、
非常勤講師
研究者番号：10397664

(2)研究分担者

岡部 勝 (Okabe, Masaru)
大阪大学、微生物病研究所、
教授
研究者番号：30089875