

平成 30 年 5 月 7 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14668

研究課題名(和文)性染色体による相同組換え制御の検証とその分子機構の解明

研究課題名(英文)Regulatory mechanism of homologous recombination in a Sex-chromosome-dependent manner

研究代表者

北川 雅敏 (Kitagawa, Masatoshi)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：50294971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は「メスES細胞はオスに比べてHRの効率が低い」可能性に気づき、本研究でそれを検証し、さらに性染色体性に依存した相同組換え制御遺伝子を同定することを目的とした。まず、同じバックグラウンドのオス、メスのES細胞を樹立してHRの効率を比較することが必要と考えた。JF1マウスのメスと129bc3マウスのオスを交配してXX(JF1/129)ES、XY(JF1/129)ESを各2クローン樹立することに成功した。これを用いて相同組換え効率の測定を行い、オスがメスに比べて高い傾向を示したが、相同組換えが起こったコロニー自体が極端に少なく、現時点では正確な評価はできないと判断するに至った。

研究成果の概要(英文)：We noticed the possibility of "the efficiency of HR is lower in female ES cells compared to male". In this study, we tried to confirm it and further aimed to clarify the mechanism. First, to establish the same background male and female ES cells, we crossed JF1 mouse females with 129bc3 mouse male and successfully established 2 clones of XX (JF 1/129) ES, XY (JF 1/129) ES. The homologous recombination efficiency was measured using these clones. The male showed a tendency higher than females but it was judged that the colonies themselves with homologous recombination themselves were extremely small and it was not possible to accurately evaluate at the present time.

研究分野：分子生物学

キーワード：相同組換え X染色体不活性化

1. 研究開始当初の背景

現在の生命科学発展の基盤となったマウス ES 細胞を用いたジーンターゲティング技術において、ターゲティングベクターと宿主遺伝子の組換えは、細胞の持つ相同組換え (HR: homologous recombination) 能を利用している。ジーンターゲティングにおいて、我々が一般に使う ES 細胞はオスである。その理由の一つとして、XX の片側の X は脱落して X0 になりやすく、germ line に入る確率が低下することが挙げられる。ES 細胞は HR の効率が高いと信じられていたが、我々はメス ES 細胞はオスに**比べて HR の効率が極端に低い**ことを明らかにした(図1)。6番染色体 ROSA26 領域に相同組換えにて遺伝子を挿入すると、オスの ES 細胞は 10%程度の高効率で目的の HR 体が得られる。しかし、同じ条件にも関わらず、メスの ES 細胞での HR の成功率はオス ES 細胞のわずか 1/33 以下だった。偶然見つけたこの現象の原因は全く不明であるが、申請者は性染色体に HR を制御する機能があるのではと考えてた。体細胞や成体幹細胞では過剰な X 染色体性遺伝子の発現による弊害を防ぐため、メスでは片方の X 染色体が *Xist* の発現により不活性化し、オスの X 染色体遺伝子の発現量とほぼ同程度に制御されている。一方で、メス ES 細胞や iPS 細胞では両 X 染色体が活性状態にある。メス ES 細胞はオスに比べて HR の成功率が低い原因としては、X 染色体に HR を抑制する遺伝子が存在し、両 X が活性化しているメス ES で発現が高い、あるいは Y 染色体に HR を促進する遺伝子が存在する可能性もある(図2)。本研究では同じバックグラウンドを持つ ES 細胞を樹立して、それを用いて本現象を詳細に検証し、性染色体性相同組換え制御 (HRSC: HR associated Sex chromosome-linked) 機構に迫る。本研究は乳がん、卵巣がん等女性腫瘍研究への貢献が期待出来る。Yildirim 等は *Xist* KO マウス (XaXa) において高頻度に造血系腫瘍が発症することを報告している(Yildirim et al *Cell* 2013)。また、女性患者のがん細胞において両 X 染色体の高頻度の活性化が起こっている (Kitagawa et al *Curr Drug Targets* 2012, Chaligne and Heard *FEBS Lett* 2014)。ここでは「両 X 染色体が活性化した細胞は X 染色体に存在するがん化を促す遺伝子が過剰発現することでがん化する」と考えられている。我々はそれに加えて、本研究で提案するように

「両 X 染色体の活性化により HRR 能が低下し、がん関連遺伝子等の変異が蓄積し、染色体不安定性が増加して、発がんを促す、あるいは転移能等発がん後の悪性度の増大に関与する」と考えている。本研究で性染色体由来 HR 修復制御遺伝子を見いだせば、女性腫瘍の発症 / 進展の未知の部分の明らかにかにすることができる。

図1. 相同組換えの成功率 (%)

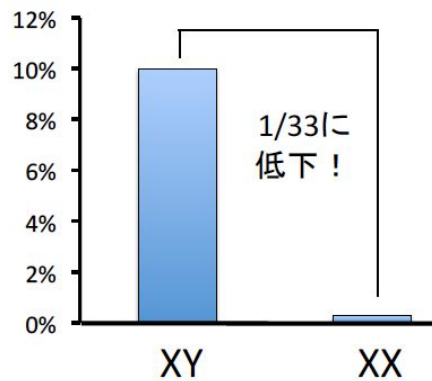
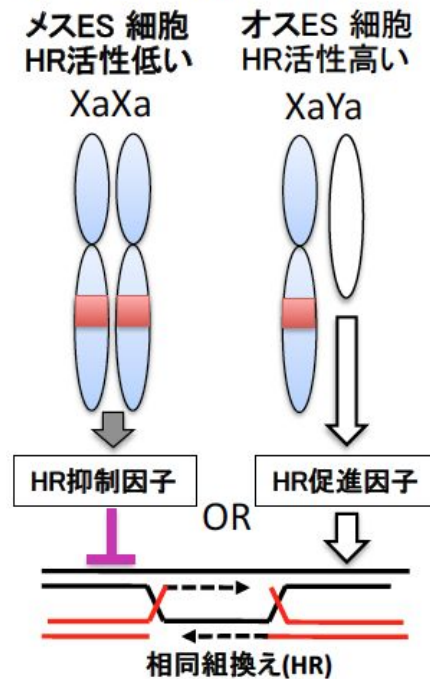


図2. ESでのHR活性の雌雄差



2. 研究の目的

我々が一般に使う ES 細胞はオスで、我々はメス ES 細胞はオスに**比べて HR の効率が極端に低い**ことに気がついた。ROSA26 領域に相同組換えにて遺伝子を挿入すると、メスの ES 細胞での HR の成功率はオス ES 細胞のわずか 1/33 以下だった。この「メス ES 細胞はオスに**比べて HR の効率が極端に低**

い」ことは異なるバックグラウンドの ES を用いた結果であり、同じバックグラウンドの ES 細胞で HR の効率を比較することが必要である。よって本研究ではまず、同じバックグラウンドの ES 細胞を樹立して、これを用いてターゲティングベクターを遺伝子導入し、相同組換え効率を解析する。「メス ES 細胞はオスに**比べて HR の効率が低い**」ことが確認された場合、その原因を明らかにする。たとえば、X 染色体に HR を抑制する遺伝子が存在し、両 X が活性化しているメス ES で発現が高い可能性、あるいは Y 染色体に HR を促進する遺伝子が存在する可能性が考えられ、性染色体性に依存した相同組換え制御遺伝子を同定する。

3. 研究の方法

1. 同じバックグラウンドのオスおよびメスの ES 細胞の樹立

X0 の出現を抑える為に JF1 マウスのメスと 129bc3 マウスのオスを交配してハイブリッドとする。受精後 4.5 日後に卵管から 8 細胞期細胞を採取し、KOSM で 2 日間培養後、2i+/LIF の条件下、MEF 上に蒔き、コロニーを作製して、クローニングした。Y-linked gene の Zfy を PCR で解析し、各クローンの雌雄を判定した。さらに DNA fish で XX(JF1/129), XY(JF1/129)を検証した。

2. 相同組換え効率の測定

Rosa26 領域は使われているため、Nanog-2A-GFP を Nanog 遺伝子に相同組換えする効率を解析することにした。1 で樹立したオス/メスの ES 細胞に、Nanog-2A-GFP を electroporation で導入し、puromycin 耐性になった細胞における GFP 陽性クローンの出現頻度を求め、相同組換え効率を算出した。

4. 研究成果

未分化な状態の XX(JF1/129)ES、XY(JF1/129)ES を各 2 クローン樹立することに成功した。これらを用いて相同組換え効率の測定を行った結果、オスがメスに比べて高い傾向を示した。しかしながら、相同組換えがおこったコロニー自体が極端に少なく、XY(JF1/129)においても標準的なオスの ES(J1)の出現頻度から著しく低下していた。よって残念ながら正確な評価はできないと判断した。本実験では X0 の出現を押さえる為にハイブリッドを用いたが、JF1/129 のハイブリッドにしたことが HR の効率の低下を引き起こしたと考えている。今後はシンプルに 129 同士の交配で XX, XY の ES 細胞の樹立を行い、上記の方法で相同

組換え効率を解析する予定である。確認がとれた後、性染色体性に依存した相同組換え制御遺伝子を同定することになる。

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 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hama-med.ac.jp/education/fac-med/dept/mol-biol/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北川 雅敏 (KITAGAWA, Masatoshi)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号: 5 0 2 9 4 9 7 1

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

大畑 樹也 (OHATA, Tatsuya)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号: 8 0 6 1 6 4 5 9

丹伊田 浩行 (NIIDA, Hiroyuki)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 2 0 3 3 6 6 7 1

北川 恭子 (KITAGAWA, Kyoko)
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号：20299605