

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06484

研究課題名（和文）Xist RNA核内動態の生細胞解析

研究課題名（英文）Xist RNA dynamics in living cells

研究代表者

佐藤 優子（Sato, Yuko）

東京工業大学・科学技術創成研究院・助教

研究者番号：70435882

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：不活性X染色体をもつマウスMC12細胞に、Xist RNAに対するプローブを導入して生細胞動態を観察した。また、不活性X染色体に高度に濃縮されるH3K27me3のライブイメージングにより、不活性染色体領域の細胞周期を通じた変化を検出した。さらに、gRNA-dCas9システムを用いたX染色体領域の可視化と組み合わせ、クロマチン領域の動態には、転写がエピジェネティクス修飾よりも影響を及ぼすことを明らかにした。この結果は、ユークロマチンおよびヘテロクロマチンドメイン動態の比較からも裏付けられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞核内のXist RNA、不活性X染色体、および抑制性ヒストン修飾の局在や変化は、これまで主に固定細胞を用いて検出されてきており、生細胞内動態を調べた報告はまだない。変化のタイミングに注目する場合、同一細胞内での経時的変化の観察が不可欠であり、ライブイメージング技術が求められていた。また、細胞を固定する過程で細胞核やクロマチン構造が変化する可能性は否定できない。本研究で開発した生細胞プローブを用いることで、高解像度の時間・空間分解能の解析が可能となり、クロマチン研究にとどまらず細胞生物学に広く貢献することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Mouse MC12 cells that harbor inactive X chromosomes were probed against Xist RNA to observe the live cell dynamics. Changes in the levels of H3K27me3, which is highly enriched in the inactive X chromosome were also detected throughout the cell cycle, by using H3K27me3-specific live-imaging probe. Combined with visualization of X chromosome regions using the gRNA-dCas9 system, we further showed that transcription has more influence on the dynamics of chromatin regions than epigenetic modifications. This result was supported by a comparative analysis of euchromatin and heterochromatin domain dynamics.

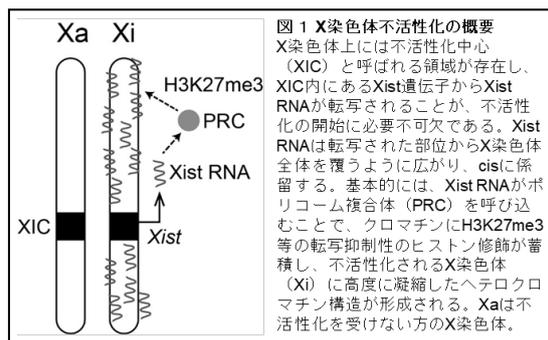
研究分野：細胞生物学

キーワード：クロマチン エピジェネティクス ライブイメージング 長鎖ノンコーディングRNA X染色体不活性化

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ヒトやマウスの性染色体は雄 XY、雌 XX で構成されており、雌の細胞には2本の X 染色体が存在する。ヒト X 染色体はおよそ 1 億 6,300 万塩基対であり 1000 個以上の遺伝子を含んでいる。分化した雌細胞では片方の X 染色体をほぼ全域で不活性化することで遺伝子量の補正を行っている。この X 染色体の不活性化は、エピジェネティックな遺伝子制御の代表的な例であり、長鎖非コード RNA



(lncRNAs; long noncoding RNAs)、DNA メチル化、ヒストンタンパク質の翻訳後修飾、ヒストンバリエーション等が関与する (図1)。

1960年代に X 染色体不活性化現象が観察されて以降、多くの研究グループが不活性化メカニズムの解明に取り組んできている。これまでの研究から、X 染色体上に不活性化中心 (XIC; X inactivation center) と呼ばれる領域が存在し、XIC 内にある *Xist* (inactive X specific transcripts) 遺伝子から lncRNA である Xist RNA が転写されることが、不活性化の開始に必要不可欠であることが分かっている。Xist RNA は転写された部位から X 染色体全体を覆うように広がり、cis に係留する。基本的には、Xist RNA がポリコーム複合体を呼び込むことで、クロマチンに H3K27me3 等の転写抑制性のヒストン修飾が蓄積し、凝縮したヘテロクロマチン構造が形成される。しかし各ステップにおいて具体的にどの因子が作用するのかについては未だ不明な点が多く、鍵となる因子の同定が進められている。特に、Xist RNA が cis に X 染色体全体に広がり係留を維持するメカニズムは依然として不明である。*Xist* 遺伝子を常染色体上に挿入した実験では、Xist RNA は常染色体上の発現部位からその染色体全体に広がることから、Xist RNA の蓄積は塩基配列特異的ではないことが分かっている。また不活性 X 染色体上に蓄積した Xist RNA が、RNAaseH や DNase 処理後の細胞核にも残存することから、核構造タンパク質との強い相互作用が示唆されている。さらに、幹細胞分化過程において *Xist* 発現のタイミングは極めて狭い時間枠に制御されていることから、Xist RNA は転写されてから効率よく cis に染色体上に広がる仕組みが存在すると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、Xist RNA の細胞核内動態に着目し、生きた細胞の中で Xist RNA とヒストン修飾などを観察し、Xist RNA 依存的ヘテロクロマチン形成メカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

マウス *Xist* 遺伝子配列に特異的に結合するモルフォリノプローブ (Xist MO) を作製し、その細胞核内局在が RNA FISH により検出される Xist RNA と同様であることを確認した (図2)。本研究ではこのプローブを用いて生細胞中の Xist RNA 動態を

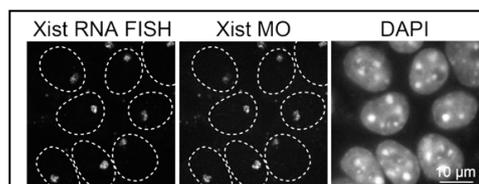


図2 モルフォリノヌクレオチドプローブのXist RNAに対する特異性の確認
MC12細胞を固定し、RNA FISHを行った。Xist RNA FISHプローブと同時にモルフォリノプローブ (Xist MO) を加え反応させた。Xist RNAは細胞核 (点線枠) 内の不活性化X染色体への集積が観察された。Xist MOの細胞核内局在は、Xist RNA集積とほぼ完全に重なった。

観察する。また、CRISPR/dCas9 システムを使った X 染色体上のゲノム領域の可視化プローブ、およびヒストン修飾に対する生細胞プローブ mintbody と同時に Xist RNA を観察することで、Xist RNA の細胞核内動態を明らかにする。

4. 研究成果

(1) Xist RNA 動態の観察

不活性 X 染色体を持つマウス胚性がん細胞 MC12 へ Xist MO をビーズローディング法により導入して、タイムラプス観察を行った (図 3)。不活性 X 染色体マーカーとして H3K27me3 特異的 mintbody (H3K27me3-mintbody) を発現させて Xist MO と同時に観察したところ、Xist MO は、細胞周期間に H3K27me3 との共局在が見られたが、分裂期には染色体から離れ、間期に入ればしばらくすると再び不活性 X 染色体上に集積した。

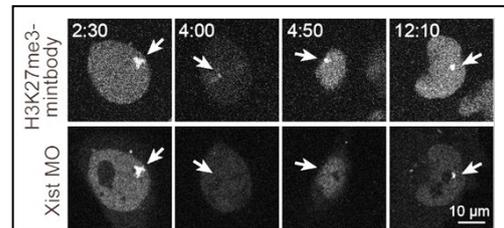
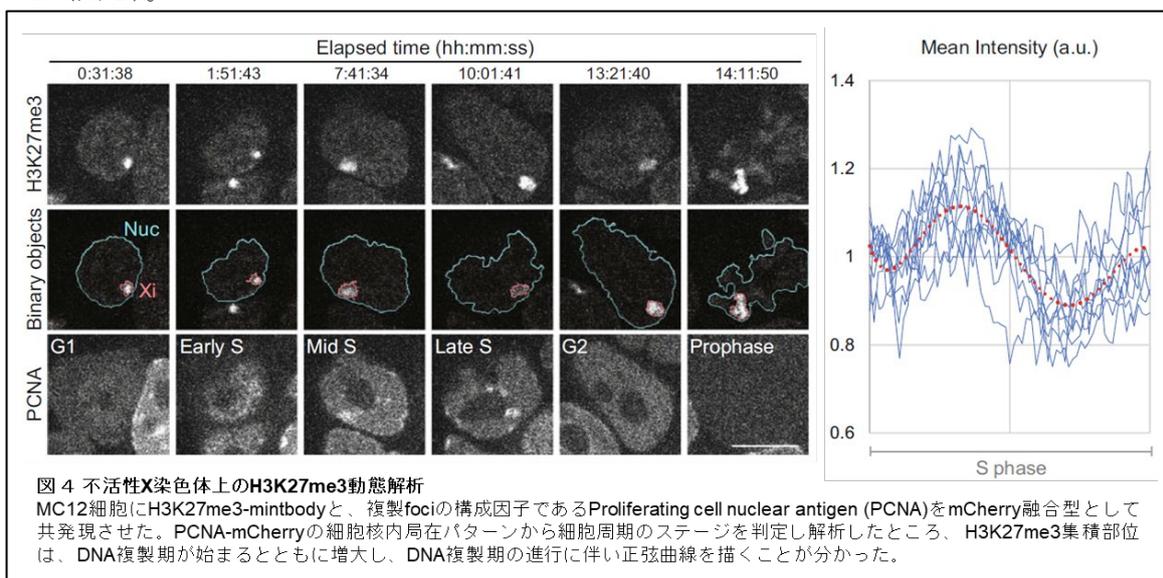


図 3 モルフォリノプローブを用いたタイムラプス観察
不活性X染色体マーカー (H3K27me3-mintbody) を発現するMC12細胞に、モルフォリノプローブ (Xist MO) を導入し、タイムラプス観察を行った。撮影開始からの経過時間を上部に示した (時間:分)。H3K27me3は細胞周期を通して不活性X染色体上 (Xi) に集積が見られた (矢印)。一方で、Xist MOは分裂期 (4:00) には染色体から離れ、間期の進行とともに再びXi上に集積した。

(2) H3K27me3 動態の観察

MC12 細胞に核移行シグナル付加型 H3K27me3-mintbody を発現させ、細胞核内の H3K27me3 集積動態を共焦点顕微鏡を用いてタイムラプス観察した。細胞周期マーカーとして、複製 foci の構成因子である Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) を mCherry 融合型として共発現させた。顕微鏡取得画像から、細胞ごとの不活性 X 染色体上の H3K27me3 集積部位の体積、形、蛍光輝度値の継時変化の解析を行った。PCNA-mCherry の細胞核内局在パターンから細胞周期のステージを判定し、10 細胞分の解析データをまとめた。H3K27me3 集積部位は DNA 複製期が始まるとともに体積が増大し、修飾レベルは正弦曲線を描くことが分かった (図 4)。



(3) X 染色体上のクロマチン動態の解析

MC12 細胞に、① Xist 遺伝子近傍 (3.5 kb 下流)、② Dxz4 遺伝子近傍、③ セントロメア近傍に対する gRNA と、dCas9-Halo を発現させて各遺伝子領域を生細胞内で可視化し、生細胞内動態 (Mean square displacement: MSD) の計測を行った。gRNA/dCas9-Halo のシグナルは、それぞれの標的に対して細胞核内で 2 か所に foci として観察され、同時に発現させた

H3K27me3-mintbody (または H4K20me1-mintbody) のシグナルと重なっているか否かにより、不活性 X 染色体上の遺伝子領域かどうかを判断した。約 56 ミリ秒間隔で gRNA/dCas9-Halo のタイムラプス観察を行い、foci の軌跡を解析することで、MSD を求め、時間間隔に対する変化をプロットした。フィッティングにより拡散係数と指数因子を求めたところ、3 か所の遺伝子領域はいずれも不活性 X 染色体上では、動きがより拘束されていることが分かった (図 5)。

転写阻害薬 triptolide を添加した場合は、不活性 X 染色体上の Xist 遺伝子近傍領域 (ChrX8) が動きやすくなったこと

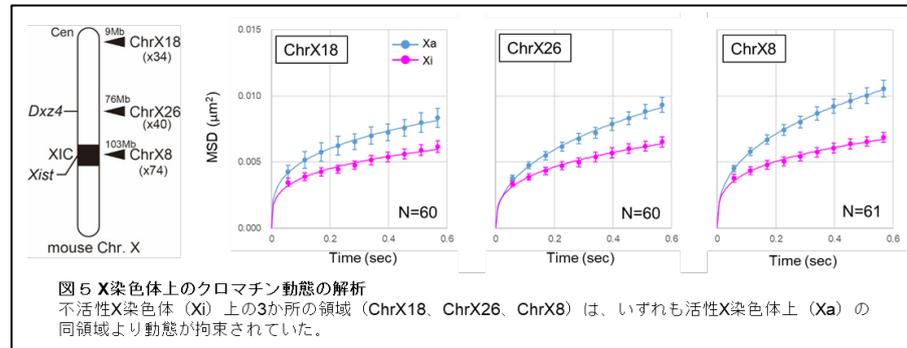


図 5 X染色体上のクロマチン動態の解析
不活性X染色体 (Xi) 上の3か所の領域 (ChrX18, ChrX26, ChrX8) は、いずれも活性X染色体上 (Xa) の同領域より動態が拘束されていた。

ことから、Xist 遺伝子の転写により動きが拘束されていることが示唆された。次に、ヒストン修飾のクロマチン動態への影響について、修飾酵素阻害剤の添加により調べた。不活性化 X 染色体に高度に蓄積されている抑制性ヒストン修飾 H3K27me3 を除去するため、責任酵素である Ezh1/2 阻害剤 (DS-3201) を添加して 4 日間培養した。この処理により H3K27me3 は検出できないレベルまで低下させて、前年度と同様に gRNA/dCas9 システムによる DNA 領域の動態観察を行った。その結果、H3K27me3 を除去した場合でも、不活性 X 染色体上の DNA 領域の動態は拘束されており、変化はほとんど見られなかった (図 6)。

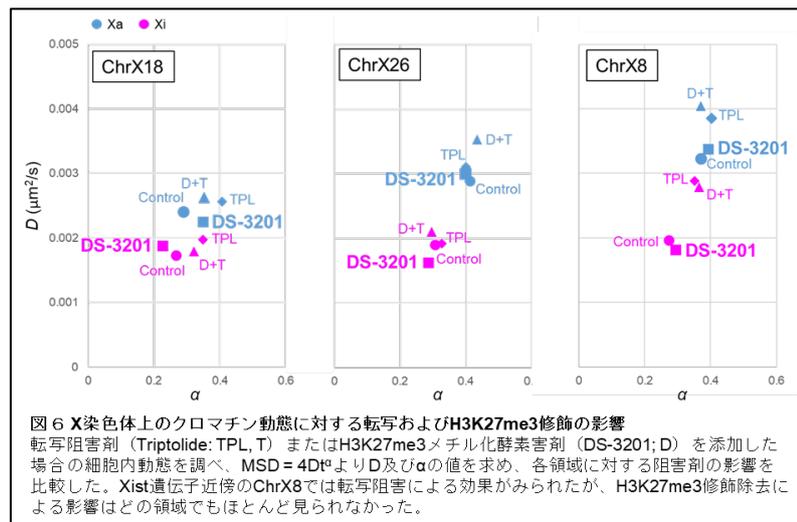
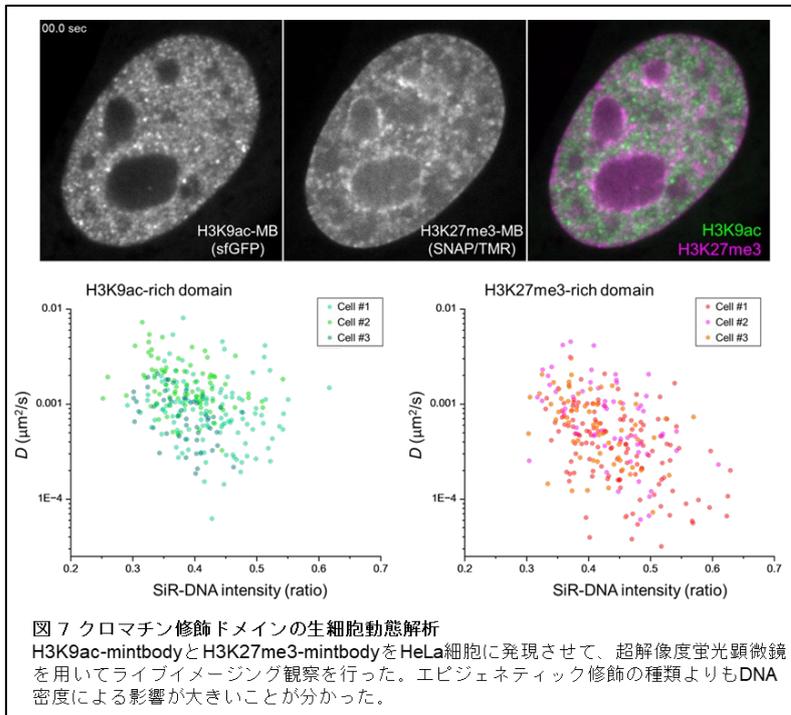


図 6 X染色体上のクロマチン動態に対する転写およびH3K27me3修飾の影響
転写阻害剤 (Triptolide: TPL, T) またはH3K27me3メチル化酵素阻害剤 (DS-3201; D) を添加した場合の細胞内動態を調べ、MSD = 4D^αよりD及びαの値を求め、各領域に対する阻害剤の影響を比較した。Xist遺伝子近傍のChrX8では転写阻害による効果のみがみられたが、H3K27me3修飾除去による影響はどの領域でもほとんど見られなかった。

(4) クロマチン修飾ドメインの動態解析

これまでの結果から、不活性 X 染色体上の動態の抑制には、クロマチン修飾はほとんど影響しないことが示唆された。そこで次に、ユークロマチンドメインとヘテロクロマチンドメインの可視化を行い、動態を調べることにした。今年度はクロマチンドメインのライブイメージングを行うための実験系を樹立した。H3K9ac-mintbody と H3K27me3-mintbody を HeLa 細胞に発現させて、超解像度蛍光顕微鏡を用いてライブイメージングにより検出した。H3K27me3-mintbody による輝点は、核膜直下や核小体近傍に多く局在していた。また、Cy3-dUTP を取り込ませた細胞では、DNA 複製機中期 (mid-S 期) の複製ドメインとの一致が見られた。これらの特徴は、これまで抗 H3K27me3 抗体を用いた免疫染色により観察されているパターンであり、抑制性クロマチンの局在箇所と一致することが示された。一方で、転写活性の高いクロマチンドメインを H3K9ac 特異的 mintbody を用いて検出したところ、H3K27me3 ドメインと同様に核内に複数の輝点が観察されたが、概して H3K27me3 ドメインとは排他的な局在性を示した。輝点のサイズを蛍光シグナルの広がりから計測したところ、H3K27me3 ドメインは直径約 0.38 マイクロメートル、H3K9ac ドメインは直径約 0.30 マ

マイクロメートルであった。H3K27me3 ドメインについて、個々のドメインに一番近い H3K9ac ドメインとの距離の統計をとると、50%の頻度で 0.28 マイクロメートルであったことから、両者の一部はオーバーラップすることが示唆された。また、H3K9ac ドメインと H3K27me3 ドメインの細胞内動態を調べたところ、拡散係数 ($\mu\text{m}^2/\text{s}$) はそれぞれ 0.0013 ± 0.001 、 0.0007 ± 0.0007 であり、エピジェネティック修飾の種類よりも DNA 密度による影響が大きいことが分かった (図 7)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kuznetsova Ksenia, Chabot Noémie M., Ugolini Martino, Wu Edlyn, Lalit Manan, Oda Haruka, Sato Yuko, Kimura Hiroshi, Jug Florian, Vastenhouw Nadine L.	4. 巻 33
2. 論文標題 Nanog organizes transcription bodies	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 164 ~ 173.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2022.11.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ohishi Hiroaki, Shimada Seiru, Uchino Satoshi, Li Jieru, Sato Yuko, Shintani Manabu, Owada Hitoshi, Ohkawa Yasuyuki, Pertsinidis Alexandros, Yamamoto Takashi, Kimura Hiroshi, Ochiai Hiroshi	4. 巻 13
2. 論文標題 STREAMING-tag system reveals spatiotemporal relationships between transcriptional regulatory factors and transcriptional activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 7672
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-35286-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Dai Yancen, Sato Yuko, Zhu Bo, Kitaguchi Tetsuya, Kimura Hiroshi, Ghadessy Farid J., Ueda Hiroshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Intra Q-body: an antibody-based fluorogenic probe for intracellular proteins that allows live cell imaging and sorting	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 9739 ~ 9748
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2sc02355e	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Sato Yuko, Kimura Hiroshi	4. 巻 2350
2. 論文標題 Multiplexed Imaging of Posttranslational Modifications of Endogenous Proteins in Live Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 31 ~ 41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1593-5_3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato Yuko, Kimura Hiroshi	4. 巻 2329
2. 論文標題 Dynamic Behavior of Inactive X During the Cell Cycle as Revealed by H3K27me3-Specific Intracellular Antibody	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 237 ~ 247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1538-6_17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato Yuko, Nakao Masaru, Kimura Hiroshi	4. 巻 70
2. 論文標題 Live-cell imaging probes to track chromatin modification dynamics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 415 ~ 422
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jmicro/dfab030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Uchino Satoshi, Ito Yuma, Sato Yuko, Handa Tetsuya, Ohkawa Yasuyuki, Tokunaga Makio, Kimura Hiroshi	4. 巻 221
2. 論文標題 Live imaging of transcription sites using an elongating RNA polymerase II-specific probe	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 e202104134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.202104134	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kimura Hiroshi, Sato Yuko	4. 巻 74
2. 論文標題 Imaging transcription elongation dynamics by new technologies unveils the organization of initiation and elongation in transcription factories	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Opinion in Cell Biology	6. 最初と最後の頁 71 ~ 79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ceb.2022.01.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tjalsma Sjoerd J D, Hori Mayako, Sato Yuko, Bousard Aurelie, Ohi Akito, Raposo Ana Claudia, Roensch Julia, Le Saux Agnes, Nogami Jumpei, Maehara Kazumitsu, Kujirai Tomoya, Handa Tetsuya, Bages Arnal Sandra, Ohkawa Yasuyuki, Kurumizaka Hitoshi, da Rocha Simao Teixeira, Zylicz Jan J, Kimura Hiroshi, Heard Edith	4. 巻 22
2. 論文標題 H4K20me1 and H3K27me3 are concurrently loaded onto the inactive X chromosome but dispensable for inducing gene silencing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e51989
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.202051989	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Uchino Satoshi, Ito Yuma, Sato Yuko, Handa Tetsuya, Ohkawa Yasuyuki, Tokunaga Makio, Kimura Hitoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Visualizing transcription sites in living cells using a genetically encoded probe specific for the elongating form of RNA polymerase II	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 441582
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2021.04.27.441582	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Yuko Sato, Yuma Ito, Satoshi Uchino, Makio Tokunaga, Hiroshi Kimura
2. 発表標題 Chromatin mobility of X-linked loci and its epigenetic regulation
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤優子、内野哲志、伊藤由馬、前原一満、大川恭行、徳永万喜洋、木村宏
2. 発表標題 生細胞プローブを用いた不活性化X染色体動態と転写制御の解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuko Sato, Satoshi Uchino, Hiroshi Kimura
2. 発表標題 Chromatin mobility of X-linked loci and its transcription regulation
3. 学会等名 The 30th Hot Spring Harbor International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤優子、木村宏
2. 発表標題 Xist RNAの生細胞動態解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関