

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22770010

研究課題名（和文） マウス生活史を通してのX染色体不活性化-再活性化サイクルの解明

研究課題名（英文） Analysis of the X chromosome inactivation - reactivation cycle throughout the mouse life cycle

研究代表者

杉本 道彦 (SUGIMOTO MICHHIKO)

独立行政法人理化学研究所・動物変異動態解析技術開発チーム・開発研究員

研究者番号：10373317

研究成果の概要（和文）：

哺乳類雌において、X染色体は不活性化-再活性化を繰り返すことが知られている。本研究では Xist RNA の発現/局在の変化や DNA メチル化パターンを解析することで、将来の胚本体となるエピブラストにおける“再”不活性化のタイミングを明らかにし、さらに始原生殖細胞における再活性化に伴う不活性 X 染色体連鎖遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化パターンの変化を解明した。

研究成果の概要（英文）：

It is known that the X chromosome of female mammals shows inactivation-reactivation cycles throughout the life cycle, especially at the peri-implantation stage, the changes of the X chromosome activity occur during short period. In this study, it was indicated that the re-inactivation of the X chromosome in the epiblast, the future embryo proper, occurs just after implantation. Furthermore, the dynamics of the DNA methylation of the inactive X linked genes during the X reactivation in primordial germ cells was elucidated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：X染色体不活性化、マウス、初期胚発生、エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景
哺乳類では雌雄間に生じるX連鎖遺伝子量の

差を補正するため、雌では2本のX染色体のうち一方からの発現が染色体単位で抑制さ

れる (X 染色体不活性化)。ひとたび不活性化した X 染色体は安定的に娘細胞へと受け継がれていくが、着床前期/着床直後期の初期胚、および胚発生過程に生じる始原生殖細胞において、X 染色体の活性状態が変化する。つまり不活性状態から活性状態へ (あるいは活性状態から不活性状態へ) 切り替わることが明らかにされてきた。しかし、哺乳類は胎生という特有の発生様式をとる上、着床前後胚および発生過程の始原生殖細胞は非常に微小・微量であるため、不活性化/再活性化がどのように進行するのか、厳密に調べることが非常に困難であり、詳細は明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

X 染色体の活性状態の変化は、細胞の分化と密接に関連していることがわかっており、哺乳類ゲノムのエピジェネティック状態変化の重要な指標となっている。X 染色体不活性化機構を解明することは、エピジェネティクスにおける重要な課題の一つであるが、未だに X 染色体の活性が変化するその時にどのようなことが起こっているのか、明確にはわかっていない。本研究では、X 染色体不活性化-再活性化機構を解明するための基盤となる情報を得ることを目的として、着床期における不活性化のタイミングの同定と始原生殖細胞における X 再活性化の際の X 連鎖遺伝子の DNA メチル化パターンの変化の解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 初期胚での X 染色体不活性化のタイミング: X 染色体の活性が変化する時期である着床前後のマウス初期胚を経時的にサンプリングし、我々が独自に開発した whole-mount RNA FISH 法により Xist RNA の発現・各内局在を調べることで、時系列に沿った組織特異的 X 染色体活性変化の解析を行った。

①マウス: X 染色体不活性化に必須の制御因

子である Xist を欠損したマウス系統 (Δ Xist) と、日本産野生マウス由来である MSM/Ms 系統を用いた。 Δ Xist を持つ X 染色体は不活性化を起こすことが出来ないため、 Δ Xist ヘテロの雌マウスでは始原生殖細胞の前駆細胞も含め全ての細胞で正常 Xist を持つ X 染色体が必ず不活性化する。この Δ Xist と MSM/Ms の F1 固体では、MSM/Ms 由来の X 染色体が必ず不活性化する。 Δ Xist マウスの遺伝的バックグラウンドである C57BL/6 系統と MSM/Ms 系統の間に存在する SNPs を活性 X 連鎖アレルと不活性 X 連鎖アレルの識別に利用した。この交配系に始原生殖細胞で

EGFP あるいは mRFP を発現するトランスジェニックマウス (dePE-EGFP ならびに Blimp1-mRFP) を組み合わせることで、始原生殖細胞を蛍光顕微鏡下で識別できるようにした (図 1)。

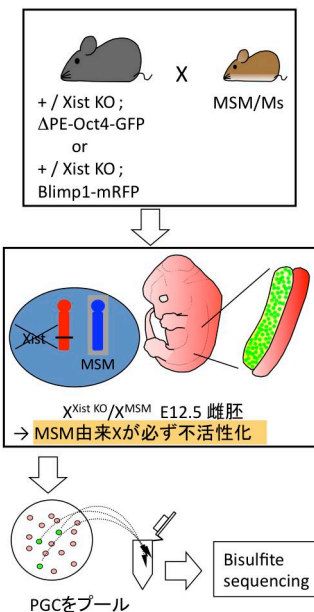


図1. Bisulfite sequencingによる DNA methylation解析

②バイサルファイトシーケンシング:-80°Cに保存しておいたサンプルに 10 μ l の 0.2 M EDTA とキャリアーとして 50 ng のプラスミド DNA を加え、65°Cで 5 分間インキュベートした。加熱融解した 10 μ l の 1.5 % low melting agarose を加え、氷上で冷却した 300 μ l の mineral oil に滴下し 5 分間冷却することでアガロースドロップを作製した。200 μ l の Lysis buffer (0.2 mg/ml Proteinase K,

0.1% SDS, 0.1 M EDTA, 50 mM Tris-HCL (pH 8.0))を加え、50°Cで16時間インキュベートした。TEでの洗浄後、PMSF処理により Proteinase K を抑制し、さらに TE で洗浄した後、バイサルファイト処理を行った (QIAGEN EpiTect bisulfite kit 付属の溶液を使用: 99°C 5 min-60°C 25 min-99°C 5 min-60°C 85 min-99°C 5 min-60°C 175 min-20°C hold)。アガロースビーズを TE で洗浄後、multiplex PCR により1サンプルからターゲット配列全てを同時に増幅した。それぞれのターゲットに対する Nested primer を個別に用いて PCR により増幅した。PCR 産物の TA クローニングを行い、各ターゲットに対して複数クローンの配列を解析した (図1)。

4. 研究成果

(1) 初期胚での X 染色体不活性化のタイミング: これまでの報告通り、雌の卵割期胚では全ての割球で Xist RNA の局在で示される不活性 X 染色体が確認された (図2)。

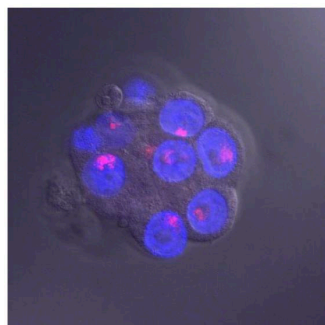


図2. 8細胞期胚におけるXist RNAの発現/局在

着床直前の胚盤胞ではすべての細胞で不活性 X 染色体が認められた (図3)。一方、着床直後の E4.5 胚では将来胎盤や胚膜を形成することになる

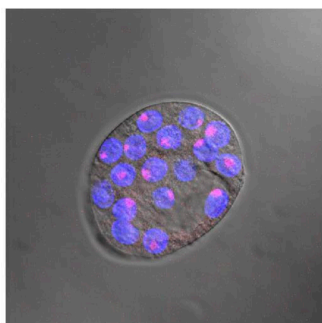


図3. 胚盤胞におけるXist RNAの発現/局在

胚体外組織では父親由来 X 染色体の不活性化状態が維持されていたが、将来胚本体を構成することになるエピブラスト細胞では Xist

RNA の局在が消失し、ほとんどの細胞でスポット状シグナルが2つ確認された (Fig4)。これは Xist のアンチセンス転写である Tsix の

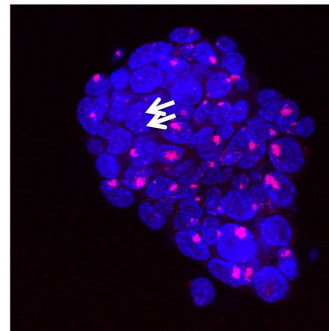


図4. E4.5胚におけるXist RNAの発現/局在 (矢印:エピブラストにおけるスポットシグナル)

転写を示している可能性が高い。さらに1日後の E5.5 胚では全てにエピブラスと細胞で Xist RNA の局在が検出されたが、一部の細胞でこの時期に特徴的な Xist RNA の発現・局在が検出された (図5)。以上の結果より、マウス初期

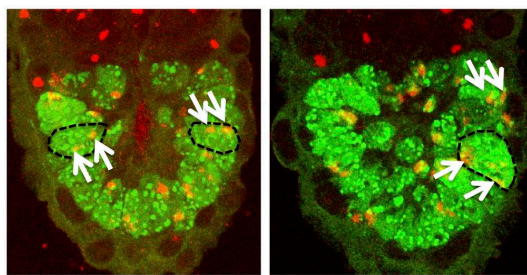
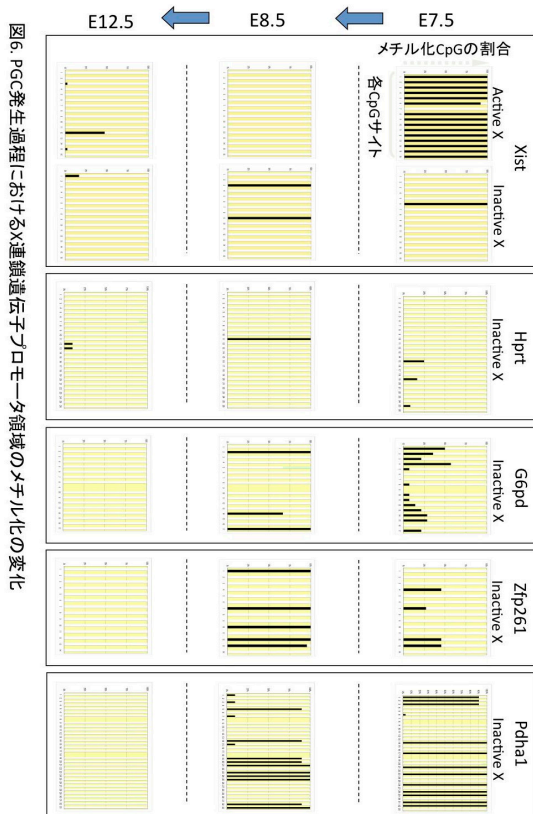


図5. E5.5胚におけるXist RNAの発現/局在 (矢印:このステージに特徴的なXist RNAの局在)

発生において起こる、“X 染色体の不活性化-再活性化-再不活性化サイクル”の初期ステップは着床という哺乳類特有の現象の前後に極めて短期間の間に起こり、さらに再不活性化の際に Xist は特徴的な発現/局在パターンを示すことがわかった。今後、着床期のエピブラストにおいて活性状態にあった X 染色体が特有の中間段階を経てどのような経過をたどって不活性化状態へと移行するのかを明らかにすることで、in vivo におけるランダム型不活性化のメカニズム解明に向けての重要な知見が得られると期待される。

(2) 始原生殖細胞の発生過程における DNA メチル化パターンの解析: 始原生殖細胞の発生過程において、不活性 X 染色体に局在していた Xist RNA の消失は E7.5 の時点です

に始まっており、E10.5 ではほぼすべての始原生殖細胞で消失していることがわかっている (Sugimoto and Abe,)。また、その際の X連鎖遺伝子の再発現は E7.75 でその兆候が認められるものの、後期始原生殖細胞においても一部で発現が抑制されたままであることもわかっている (Sugimoto and Abe,)。この際不活性 X 染色体活性化過程における X連鎖遺伝子の DNA メチル化パターンを調べたところ、E7.5 の時点で既に脱メチル化を起こしている遺伝子群とこの時期には体細胞と同定のメチル化を受けている遺伝子群が存在することがわかった (図 6)。E12.5 では調べたすべての遺伝子の DNA メチル化が



完全に消失していたが、X連鎖遺伝子の再活性化はE12.5では完全には起こっていないことから、この時期におけるX連鎖遺伝子の発現抑制の維持にはDNAメチル化以外の機構(ヒストン修飾など)が関与していることが強く示唆される。一方、不活性化を制御するXistのDNAメチル化を調べたところ、E8.5

の時点でほぼ完全に脱メチル化していたのに対し、E7.5では活性X染色体アレルはメチル化を受けており、不活性X染色体アレルは脱メチル化していた。つまり、Xistは始原生殖細胞における再活性化が起こる前の段階では体細胞と同様のDNAメチル化修飾を受けているにもかかわらず、わずか1日の間で完全に脱メチル化が起こることがわかった。Xist以外の多くの不活性X連鎖遺伝子群の脱メチル化の進行は始原生殖細胞の発生に伴い徐々に進行することから、細胞増殖に伴う受動的なDNA脱メチル化が起こっていると解釈できるが、一方でXistに関しては非常に短い期間で脱メチル化しており能動的な脱メチル化が起こっているとかんがえられる。この結果より、始原生殖細胞の発生過程において生じる全ゲノム的な脱メチル化の進行には受動的DNA脱メチル化と能動的DNA脱メチル化という異なるメカニズムによる脱メチル化が同時にかつ配列特異的に起こっている可能性が示唆される。

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 2 件)

①Matoba S., Inoue K., Kohda T., Sugimoto M., Mizutani E., Ogonuki N., Nakamura T., Abe K., Nakano T., Ishino F. and Ogura A.: RNAi mediated knockdown of *Xist* can rescue the impaired postimplantation development of cloned mouse embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 108(51): 20621-20626 (2011). (査読有)

②Inoue K., Kohda T., Sugimoto M., Sado T., Ogonuki N., Matoba S., Shiura H., Ikeda R., Mochida K., Fujii T., Sawai K., Otte A.P., Tian C., Yang X., Ishino F., Abe K. and Ogura A.: Impeding *Xist* expression from the active X chromosome improves mouse somatic cell nuclear

transfer. *Science* 330: 496-499 (2010).
(査読有)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 杉本道彦、近藤昌代、廣瀬美智子、小倉淳郎、阿部訓也「*t^{w5}*劣性致死変異の責任遺伝子 *Vps52* の機能解析/ Functional analysis of *Vps52*, a responsible gene for the *t^{w5}* recessive lethal mutation.」日本遺伝学会 83 回大会 2011 年 9 月 20 日～22 日、京都
- ② 阿部訓也、沼田興治、池田理恵子、杉本道彦、太田聡史「特異な進化履歴を持つマウス *t*-コンプレックスのゲノム構造解析/ Unexplored mouse genome: structure and evolution of the *t*-complex.」日本遺伝学会 83 回大会 2011 年 9 月 20 日～22 日、京都
- ③ Kuniya Abe, Koji Numata, Rieko Ikeda, Hirosuke Shiura and Michihiko Sugimoto. “Dynamics of epigenomic changes during development of early embryos and primordial germ cells in mice.” EMBO Workshop “50 Years of X-inactivation Research”. July 20-24, 2011. Oxford.
- ④ 杉本道彦、阿部訓也「マウス *t*-complex 劣性致死変異の同定により見えてきた *Vps52* の機能 -哺乳類初期発生における多能性細胞の分化制御因子としての役割-」日本遺伝学会 82 回大会 ワークショップ「マウス・ラットをモデルとした哺乳類遺伝学」、2010 年 9 月 20 日～22 日、札幌 (招待講演)

[その他]

ホームページ等

http://www.brc.riken.jp/lab/intro_heni.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉本 道彦 (SUGIMOTO MICHHIKO)

独立行政法人理化学研究所・動物変異動態解析技術開発チーム・開発研究員

研究者番号：10373317