

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23651189

研究課題名(和文)染色体位置特異的遺伝子導入によるゲノム不活性化機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of genome inactivation mechanism using chromosomal site-specific gene integration

研究代表者

阿部 訓也 (ABE, KUNIYA)

独立行政法人理化学研究所・バイオリソースセンター・チームリーダー

研究者番号：40240915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、染色体位置特異的な遺伝子挿入の新技术を用いて、2本のX染色体の同一遺伝子座にそれぞれ異なる蛍光蛋白質遺伝子を挿入した雌マウス系統を確立した。このマウス個体では蛍光蛋白質発現により、不活性化現象を可視化することができるため、不活性化の成立や消去の過程、各臓器における不活性化の偏り等の解析を生細胞で解析することが初めて可能となった。
Xist遺伝子ノックアウトマウスとアジア産亜種マウスとの交雑個体からの雌体細胞を用いてChIP-Seq解析を行い、不活性Xと活性X染色体のエピジェネティック状態の差異を初めて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we first devised a site-specific gene integration method, and established two female mouse lines, whose two X chromosomes carry different fluorescent protein genes. X chromosome inactivation phenomenon can be visualized using these mouse lines. Processes of X inactivation and reactivation can be analyzed in living cells of these mouse lines for the first time.
Using female somatic cells isolated from hybrid individuals between Xist knockout mice and asian mouse subspecies, ChIP-Seq analysis of histone modifications has been conducted. Differences in epigenetic states between inactive X and active X has been revealed.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：X染色体不活性化 偽常染色体 エピジェネティクス 遺伝子導入技術

1. 研究開始当初の背景

哺乳類雌では2本あるX染色体の遺伝子量補正のため、一方のX染色体からの遺伝子発現を抑制する「不活性化」を行う。不活性化は個体発生過程のいずれかの時点で起きるが正確なタイミングは未だ未知である。ES細胞は初期胚由来の多能性幹細胞であるが、その未分化状態ではX染色体は2本とも活性を持つ。分化誘導後にどちらか一方がランダムに不活性化され、遺伝子座の2つのアレルのどちらかの発現が抑制をうける。この不活性化は不活性化中心と呼ばれる染色体領域から、末端の方向へ進行していくものと考えられている。

一方、哺乳類の性染色体X, Yは同一祖先から進化したが、現在は非常に異なった構造を持つ。しかし、X, Yそれぞれの染色体末端には99%以上の相同性を示す領域があり、常染色体のような遺伝的挙動を示すため「偽常染色体」と呼ばれている。X-Y染色体間ではこの領域で交叉が高頻度に行くとされている。また雌では偽常染色体はX染色体不活性化を免れることがわかっているが、そのメカニズムは全く未知である。偽常染色体領域の構造・配列はヒトで部分的にわかっているだけで、実験動物であるマウスではまったく不明であった。申請者(研究代表者)は理研脳科学総合研究センターの笠原和起博士と伴に、*HioMt*というメラトニン合成酵素遺伝子を単離する過程でこの遺伝子が偽常染色体領域にマップされることを見出し(*Kasahara, Abeら, PNAS 107, 6412-, 2010*),さらに偽常染色体の大部分を含んだBAC (Bacterial Artificial Chromosome)クローンの単離に成功し、その約80%の解読に成功していた。この研究と並行し、連携研究者である熊本大学の荒木喜美博士との共同研究として、X染色体上の同一の遺伝子座それぞれに異なる蛍光蛋白質遺伝子を導入し、蛍光発現パターンで不活性化を可視化する(2色ランダムに1色)システムの確立を行っていた。そこで、このシステムを発展させ、通常なら不活性化を受ける遺伝子座に偽常染色体領域、あるいはそのサブクローンを挿入することによりどのような影響が生じるか(例えば、不活性化の進行を回避することができるか)を検定する実験系構築の着想を得た。

2. 研究の目的

近年、個々の遺伝子それぞれではなく、広範

なゲノム領域単位のエピジェネティック制御が注目されている。哺乳類雌におけるX染色体不活性化現象はその代表的な例である。本研究では、染色体位置特異的な遺伝子挿入の新技术を用いて、X染色体不活性化プロセスを可視化するES細胞、遺伝子導入マウスを作製し、その解析を行う。また、X染色体上にありながら不活性化を受けないゲノム領域である偽常染色体領域のエピジェネティック状態を解析し、活性-不活性の境界領域の同定を行い、さらにこの偽常染色体領域全体、あるいは細分化したものをX染色体の特定の位置に挿入することにより、不活性化解除メカニズムの解明を試みる。

3. 研究の方法

1) X染色体不活性化可視化技術の確立; 前項で述べた手法を用いて、同一遺伝子座に異なる蛍光蛋白質遺伝子を挿入した雌細胞の作製を行う。不活性化中心から近位に約100kb、約30Mbと遠位に約26Mb離れた3つの遺伝子座を用いる。まずlox配列が部位特異的に挿入されたES細胞に蛍光蛋白質をユビキタスに発現させる発現ベクターを導入する。異なる蛍光蛋白質遺伝子が挿入されたES細胞からマウス個体を作製し、それらの個体を交配し、同一遺伝子座に異なる蛍光蛋白質遺伝子を導入した雌ES細胞を樹立する。これらのES細胞、およびマウス個体を用いてES細胞の分化過程、および個体胚発生過程でのX染色体不活性化の成立のタイミングを解析する。

生細胞でモニター可能な利点を活かし、不活性化成立前、成立後の細胞を選別することを試みる(2色同時に発現する細胞と1色それぞれの細胞をセルソーターを用いて選別)。選別・単離が成功すれば、成立前後の細胞の遺伝子発現やエピジェネティックステータスの解析を行う。

2) 偽常染色体のエピジェネティック状態の解析; 雌体細胞の一方のX染色体は不活性化を受けているが、偽常染色体領域はその場合も不活性化を受けない。どちらの染色体が不活性化を受けているか識別するために、*Xist*遺伝子ノックアウトマウスと垂種マウスとの交雑個体の雌体細胞を用いる(この交雑個体では、*Xist*ノックアウトアレルを持つX染色体は活性を持ち、一方のX染色体が必ず不活性化され、垂種ゲノムとの間には多数のSNPがあるので、不活性Xと活性Xを区別し

て解析することができる (Sugimoto & Abe, *PLoS genetics* 3, e116, 2007))。これを材料に、D ヒストン修飾の解析を ChIP-seq 法により行う (対照としては活性 X 染色体あるいは X 染色体を用いる)。この解析により、不活性化を受けている染色体領域とそれを免れている領域にエピジェネティック状態の違いがあるか、あるとしたらその境界はどこなのかを特定することを目指す。これらの比較解析により、不活性化された場合とそれが回避された場合のエピジェネティック状態を正確に規定することが可能になると考えられる。

3) 偽常染色体ゲノム断片挿入による X 染色体不活性化機構の解析

X 染色体不活性化は、不活性化中心から両側に伝搬されると考えられている。そこで、X 染色体にありながら不活性化を回避する偽常染色体領域の配列を、本来不活性化を受ける領域に挿入した場合、不活性化の確立、維持にどのような影響が表れるかをアッセイする。具体的には、偽常染色体全体を含む BAC クローン、あるいはそのサブクローンを位置特異的導入法によって挿入し、その効果をみる。導入するクローンは、亜種マウス BAC ライブラリーから得られたインサート長約 100kb のもので、偽常染色体領域の大半がクローン化されている。その約 8 割が配列が決定されており、まず完全長の配列決定を行った後、以下の実験を行う。BAC クローンあるいはそのサブクローンは、loxP 配列を持ち、このクローンを導入する細胞ゲノム中にもそれに対応する lox 配列が存在するため、Cre 組換え酵素を発現させることにより、クローンの位置特異的挿入が起きると期待される。BAC クローン等の大きなサイズの DNA の挿入については前例がないため、至的条件の検討を行う。挿入が確認された ES 細胞を分化させ、不活性化を誘導し、偽常染色体ゲノムの挿入により X 染色体不活性化が影響を受けるかを検討する (対照としては、偽常染色体以外の無関係な BAC を用いる)。

4. 研究成果

染色体位置特異的な遺伝子挿入の新技术を用いて、X 染色体不活性化プロセスを可視化する遺伝子導入マウスを作製した。研究方法の項に記したように、X 染色体に挿入を持つ 2 種類の遺伝子トラップ雄 ES 細胞を用いて、そ

れぞれに EGFP 緑色蛍光蛋白質遺伝子および tdTomato 赤色蛍光蛋白質を導入した計 4 種の ES 細胞株を作製し、それぞれからキメラ個体を作製し、導入遺伝子が伝達されたマウス個体系統を確立した。これを交配し、両方の蛍光蛋白質遺伝子がそれぞれの X 染色体に導入された雌個体を得た。また、同様の交配から得られた胚盤胞を用いて ES 細胞を樹立し、その中から EGFP、tdTomato 遺伝子を持つ雌 ES 細胞を選択し、核型解析の後、正常核型を持つ細胞株を選択し、その後の実験に使用した。

以上のようにして得られたマウスの雌成獣より各種臓器を摘出し、蛍光顕微鏡にて観察したところ、臓器を構成する個々の細胞ではランダム不活性化により、どちらか一方の蛍光蛋白質しか発現していないことが認められた。一方、不活性化が消去され、両方の X 染色体が活性化されている卵子では、EGFP、tdTomato の両方が発現していた。また、雌 ES 細胞の観察を行ったところ、未分化状態では、緑色、赤色双方の蛍光蛋白質が発現しており、分化誘導後、ランダム不活性化が生じ、その結果、どちらか一方の蛍光蛋白質の発現に収束していくことが認められた。ただし、試験管内分化系では、未分化状態の細胞も一部存在していた。生細胞であることの利点を活かし、セルソーターで、2 色からどちらか 1 色へ変換していく過程の追跡や、それぞれの細胞集団を単離することも可能であった。このように、当初の期待どおり、X 染色体不活性化状態を可視化するための 2 種類のマウス系統、ES 細胞を得ることに成功した。興味深いことに、それぞれの臓器全体を見ると、赤色、緑色の細胞が比較的均一に混在している臓器もあるが、臓器によっては、それぞれの X 染色体を持つ細胞が比較的大きな組織を形成し、大きな偏りを持つモザイクパターンを形成している例も認められた。これは、その臓器を形成する始原的な細胞が比較的少数であり、またそこから派生する細胞集団の活発な混合が臓器の形成過程で起きなかったため、このようなモザイクパターンの偏在が作られたものと考えられた。今後、このモザイクパターンの状態から、各種臓器形成過程における細胞系譜の追跡やモザイクパターンの偏在とそれぞれの臓器の働き (表現型) の関連を調べる、などの新しい研究分野が生み出されることが期待される。

本研究のもう一つの目的として、不活性化された X 染色体と活性 X 染色体のエピジェネティック状態の差異を調べる、さらに不活性 X

染色体上にありながら不活性化を免れることが知られている偽常染色体領域のエピジェネティック状態を調べることを行った。具体的には、Xist遺伝子ノックアウトマウスと亜種マウスとの交雑個体の雌体細胞を材料に各種のヒストン修飾に対するChIP-seq解析を行った。この交雑個体では、Xistノックアウトアレルを持つX染色体では、不活性化が起こらず、常に活性型となり、逆にもう一方のX染色体が必ず不活性化される。亜種マウスゲノムと通常マウス(Xistノックアウト)の間には多数の1塩基遺伝子多型(SNP)があるので、それらのSNPを利用し、ChIP後のDNA配列解析結果から、不活性Xと活性Xにおけるゲノム修飾を識別することができる。本研究では、雌交雑個体の肝臓を材料に、活性化マークであるヒストンH3K9のアセチル化(H3K9Ac)、H3K4トリメチル化(H3K4me3)、および抑制性修飾であるH3K9トリメチル化(H3K9me3)、H3K27トリメチル化(H3K27me3)の解析を行った。Xist KOゲノム、亜種マウスゲノムそれぞれのリファレンス配列に対して、ChIP-seqデータをマップし、MACSプログラムを用いて各修飾のピークコールを行い、同定されたピーク内にあるSNPを利用して、どちらの染色体由来かを判断した。手法の妥当性確認のため、マウス染色体7番のゲノム刷り込み遺伝子のヒストン修飾を調べ、この手法によりアレル特異性を判断できることを確認した。次にこの手法を用いて、H3K27me3とH3K4me3修飾について、X染色体と2つの常染色体(18番、19番)全域における分布を調べてみたところ、常染色体上では、2つの修飾ともアレル間の偏りは見られなかったが、X染色体上では、H3K4me3修飾が活性X染色体に、H3K27me3修飾が不活性X染色体に偏って存在することが明らかとなった。H3K9AcとH3K9me3修飾についても、活性化の指標であるH3K9Acが活性Xに、抑制マークであるH3K9me3が不活性Xに偏在していることが判明した。以上のような、不活性X、活性X染色体全域に渡って各種のヒストン修飾を調べた報告はなく、さらに詳細な解析を加えることにより、活性、不活性状態を規定するエピジェネティック状態、あるいは不活性X染色体上の異なる領域におけるエピジェネティック修飾の差異とその意義などに関する新知見が得られると期待できる。偽常染色体のヒストン修飾については、偽常染色体の配列決定が完了していないので、正確なデータはまだ得られていないが、ChIP-seqデータは取得できているので、偽常染色体の全配列が決定され次第、解析を実施する予定である。

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 17 件)
すべて査読あり。

1. Shiura H, Ikeda R, Lee J, Sato T, Ogonuki N, Hirose M, Ogura A, Ogawa T, and Abe K. Generation of a novel germline stem cell line expressing a germline-specific reporter in the mouse. *genesis* 51: 498-505, 2013. doi: 10.1002/dvg.22391.
2. Oikawa M, Matoba S, Inoue K, Kamimura S, Hirose M, Ogonuki N, Shiura H, Sugimoto M, Abe K, Ishino F, and Ogura A. RNAi-mediated knockdown of Xist does not rescue the impaired development of female cloned mouse embryos. *J. Reprod. Dev* 59: 231-237, 2013.
3. Maeda I, Okamura D, Tokitake Y, Ikeda M, Kawaguchi H, Mise N, Abe K, Noce T, Okuda A, and Matsui Y. Max is a repressor of germ-cell-related gene expression in mouse embryonic stem cells. *Nature communications* 4: 1754, 2013. doi: 10.1038/ncomms2780.
4. Ikeda R, Shiura H, Numata K, Sugimoto M, Kondo M, Mise N, Suzuki M, Grealley JM and Abe K. Large, male germ cell-specific hypomethylated DNA domains with unique genomic and epigenomic features on the mouse X chromosome. *DNA Research* 20: 549-565, 2013. doi: 10.1093/dnares/dst030.
5. Abbasi A, Khalaj M, Akiyama K, Yamanishi H, Kikuchi S, Hirose M, Yuzuriha M, Magari M, Degheidy HA, Abe K, Ogura A, Hashimoto H and Kunieda T. *Rev7* regulates function of DNA polymerase ζ in mouse development. *J. Biol. Chem* 288: 10459-10471, 2013. doi: 10.1074/jbc.M112.421966.
6. Kuroki S, Matoba S, Akiyoshi M, Matsumura Y, Miyachi H, Mise N, Abe K, Ogura A, Wilhelm D, Koopman P, Nozaki M, Kanai Y, Shinkai Y, and Tachibana, M.

Epigenetic regulation of sex determination by the histone demethylase *Jmjd1a*. *Science* 341: 1106-1109, 2013. doi: 10.1126/science.1239864.

7. Okamura D, Maeda I, Taniguchi H, Tokitake Y, Ikeda M, Ozato K, Mise N, Abe K, Noce T, Belmonte JCI, and Matsui Y. Cell-cycle gene-specific control of transcription has a critical role in proliferation of primordial germ cells. *Genes Dev* 26: 2477-2482, 2012. doi: 10.1101/gad.202242.112.

8. Sugimoto M, Kondo M, Hirose M, Suzuki M, Mekada K, Abe T, Kiyonari H, Ogura A, Takagi N, Artzt K, and Abe K. Molecular identification of t^{w5} : *Vps52* promotes pluripotential cell differentiation through cell-cell interactions. *Cell Reports* 2: 1363-1374, 2012. doi: 10.1016/j.celrep.2012.10.004

9. Semba K, Araki K, Matsumoto K-I, Suda H, Ando T Sei A, Mizuta H, Takagi K, Nakahara M, Muta M, Yamada G, Nakagata N, Iida A, Ikegawa Y, Araki M, Abe K, and Yamamura K. The ectopic expression of *Ptf1a* induces spinal defects, urogenital defects and anorectal malformations in Danforth's short tail mice. *PLoS Genet* 9: e1003204, 2012. doi: 10.1371/journal.pgen.1003204.

10. Numata K, Kohama C, Abe K, and Kiyosawa, H. Highly parallel SNP genotyping reveals high-resolution landscape of mono-allelic *Ube3a* expression associated with locus-wide antisense transcription. *Nucleic Acids Res* 39: 2649-2657, 2011. doi: 10.1093/nar/gkq1201

11. Hoki Y, Ikeda R, Mise N, Sakata Y, Ohhata T, Sasaki H, Abe K, and Sado, T. Incomplete X-inactivation initiated by a hypomorphic *Xist* allele in the mouse. *Development* 138: 2649-2659, 2011. doi:10.1242/dev.061226

12. Matoba 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. Natn. Acad Sci USA* 108: 20621-20626, 2011. doi: 10.1073/pnas.1112664108

〔学会発表〕(計 40 件)

1. 志浦寛相、阿部訓也 「マウス着床期における *Xist*/*Tsix* ダイナミクス」第 34 回日本分子生物学会年会 神戸 2013 年 12 月 3 日
2. 阿部訓也 「マウス多能性胚細胞・生殖細胞発生プログラムの包括的解析」第 9 回環境エピゲノミクス研究会 東京 2013 年 6 月 15 日
3. 池田理恵子、志浦寛相、沼田興治、細川美穂子、近藤昌代、中馬新一郎、阿部訓也 「マウス生殖細胞で発現する X連鎖遺伝子群に見出された特徴的なエピジェネティック修飾」日本遺伝学会第 84 回大会 福岡 2012 年 9 月 25 日

〔図書〕(計 2 件)

1. 阿部訓也 「新しいリサーチツールとしてのバイオイメージング(蛍光イメージングを中心に)」 「series モデル動物利用マニュアル 生物機能モデルと新しいリソース・リサーチツール」601-610 頁 株式会社エル・アイ・シー 2011 年

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.brc.riken.jp/lab/mcd/mcd/>

6. 研究組織
(1)研究代表者
阿部訓也 (Abe Kuniya)
独立行政法人理化学研究所・バイオリソースセンター・チームリーダー
研究者番号: 40240915
(3)連携研究者
荒木 喜美 (Araki Kimi)
熊本大学・生命資源研究・支援センター・准教授
研究者番号: 90211705