

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25291076

研究課題名(和文) 始原生殖細胞における不活性X染色体再活性化メカニズムの解明

研究課題名(英文) The dynamics of X chromosome reactivation in female PGCs

研究代表者

岡本 郁弘(okamoto, ikuhiro)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40648424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の雌(XX)は、雄(XY)との間のX染色体遺伝子量を補正する為に、発生初期に2本のX染色体のうちの1本上の遺伝子発現を協調的に不活性化する。この不活性化はXist RNAによって開始される。しかし、内部細胞塊及び始原生殖細胞形成過程で不活性化X染色体は再活性化される。本研究では、試験管内再構成されたマウス始原生殖細胞様細胞における不活性X染色体の再活性化ダイナミクスを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：XX females silence one of their X chromosomes. This involves a process whereby a noncoding RNA known as Xist coats one of the X chromosome. An exception to this occurs in pluripotent lineages, the inner cell mass (ICM) and primordial germ cells (PGCs), where the inactive X undergo reactivation. Analyzing PGC-like cells (PGCLCs) induced from mouse embryonic stem cells (ESCs), we found that hallmarks of the inactive X change, providing a direct readout of X reactivation progression.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：マウス X染色体 再活性化 始原生殖細胞

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の雌 (XX) は、雄 (XY) との間の X 染色体遺伝子量を補正する為に、発生初期に 2 本の X 染色体のうちの 1 本上の遺伝子発現を協調的に不活性化する。この不活性化は Xist RNA によって開始される。しかし、内部細胞塊 (ICM) 及び始原生殖細胞 (PGCs) 形成過程で不活性化 X 染色体は再活性化される。このことから、Xist の発現抑制は細胞が未分化能を獲得する際に起こる再プログラム化と密接に関連があると考えられる。始原生殖細胞の試験管内再構成法を用いて、始原生殖細胞形成過程における不活性化 X 染色体再活性化を再現し、再活性化を解析するためのモデル系として用いる事により、再活性化機構の解明を目指す。

2. 研究の目的

本研究では試験管内再構成した始原生殖細胞を用いて、不活性 X 染色体再活性化のダイナミクスを明らかにする。それにより得られた情報を元に Xist の発現抑制に関与する因子を同定し、機能解析を行い、不活性 X 染色体の再活性化機構を明らかにする事を目的とした。

(1) 試験管内再構成した始原生殖細胞の不活性 X 染色体再活性化の解析

多能性幹細胞 (ESCs) より試験管内再構成法を用いて始原生殖細胞を誘導して再活性化を再現し、再活性化ダイナミクスの再現性を明らかにする。

(2) 始原生殖細胞における Xist 遺伝子発現抑制に関わる因子の同定

再活性化過程で特異的に上昇する遺伝子を Xist 遺伝子の発現抑制に関わる候補遺伝子として選定する。選定した候補遺伝子に対する誘導型ノックダウンを行い、Xist 発現抑制の有無を指標に抑制因子を同定する。

(3) 始原生殖細胞における Xist 遺伝子の発現抑制因子の機能解析

同定された結合部位を欠損するノックアウト ES 細胞を作製し、その細胞より始原生殖細胞を誘導し、Xist の発現抑制の有無を確認する。同時に、Tsix 非依存的に Xist の発現が抑制されている未分化幹細胞 (ESCs) における抑制因子の発現を上記 ES 細胞で確認して、Xist の発現抑制は共通のメカニズムにより制御されているかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

始原生殖細胞特異的に発現する Blimp1 遺伝子を mVenus で、Stella 遺伝子を CFP によって可視化されたレポータートランスジェニックマウスより作成された雌 ES 細胞を起点とし、試験管内再構成法で始原生殖細胞様細胞 (PGCLCs) を誘導する。誘導開始後、4 日目、6 日目の PGCLCs を蛍光を指標に FACS により回収する。回収した PGCLCs は RNA FISH により X 染色体の活性状態を解析した。

4. 研究成果

(1) 多能性幹細胞 (ESCs) より誘導した始原生殖細胞様細胞 (PGCLCs)、誘導開始後 6 日目の PGCLCs では Xist の発現はほぼ全ての細胞で消失していたが、X 染色体上遺伝子の両アリルからの発現はほとんどの細胞で認められなかった。このことから Day6 PGCLCs は、X 染色体上遺伝子の再発現はほとんど開始していない E7.5 から 9.5 の PGCs に相当することを見いだした。

(2) 始原生殖細胞様細胞 (PGCLCs) 誘導初期に半数の細胞で X 染色体が一本欠失する事を見いだした。本研究計画を開始当初、この現象を知らずに RNA FISH のみで X 再活性化を解析していた為に結果の解釈を大きく誤り、研究計画の進行が大幅に遅れた。ゆえに、始原生殖細胞様細胞 (PGCLCs) の X 再活性化解析は常に DNA FISH 等を組み合わせ、X 染色体数を確認しながら慎重に解析

を行う必要が有ると考えられる。

最近、始原生殖細胞様細胞 (PGCLCs)の新規長期培養法が開発された(主な発表論文)。これを用いて、誘導開始後4日目の始原生殖細胞様細胞 (PGCLCs)をさらに7日間培養した場合、ほぼ全ての細胞で不活性 X 染色体のマーカの一つである H3K27me3 のスポットが消失する事が報告された。ゆえに、この新規培養法を用いる事で始原生殖細胞様細胞 (PGCLCs)における不活性 X 染色体の再活性化を開始から完了まで試験管内で解析が可能であると考えられる。

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 8件)

Schulz EG, Meisig J, Nakamura T, Okamoto I, Sieber A, Picard C, Borensztein M, Saitou M, Bluthgen N, Heard E. The two active X chromosomes in female ESCs block exit from the pluripotent state by modulating the ESC signaling network. **Cell Stem Cell**. 14(2): 203-216. (2014). doi: 10.1016/j.stem.2013.11.022.

Nakamura T, Yabuta Y, Okamoto I, Aramaki S, Yokobayashi S, Kurimoto K, Sekiguchi K, Nakagawa M, Yamamoto T, Saitou M. SC3-seq: a method for highly parallel and quantitative measurement of single-cell gene expression. **Nucleic Acids Res**. 43(9): e60. (2015). doi: 10.1093/nar/gkv134.

Sasaki K, Yokobayashi S, Nakamura T, Okamoto I, Yabuta Y, Kurimoto K, Ohta H, Moritoki Y, Iwatani C, Tsuchiya H, Nakamura S, Sekiguchi K, Sakuma T, Yamamoto T, Mori T,

Woltjen K, Nakagawa M, Yamamoto T, Takahashi K, Yamanaka S, Saitou M. Robust in vitro induction of human germ cell fate from pluripotent stem cells. **Cell Stem Cell**. 17(2): 178-194. (2015). doi: 10.1016/j.stem.2015.06.014. Nakamura T, Okamoto I, Sasaki K, Yabuta Y, Iwatani C, Tsuchiya H, Seita Y, Nakamura S, Yamamoto T, Saitou M. A developmental coordinate of pluripotency among mice, monkeys and humans. **Nature**. 537(7618): 57-62. (2016). doi: 10.1038/nature19096.

Sasaki K, Nakamura T, Okamoto I, Yabuta Y, Iwatani C, Tsuchiya H, Seita Y, Nakamura S, Shiraki N, Takakuwa T, Yamamoto T, Saitou M. The germ cell fate of Cynomolgus monkeys is specified in the nascent amnion. **Dev Cell**. 39(2): 169-185. (2016).doi:10.1016/j.devcel.2016.09.00.

Ishikura Y, Yabuta Y, Ohta H, Hayashi K, Nakamura T, Okamoto I, Yamamoto T, Kurimoto K, Shirane K, Sasaki H, Saitou M. In Vitro derivation and propagation of spermatogonial stem cell activity from mouse pluripotent stem cells. **Cell Rep**. 17(10): 2789-2804. (2016). doi: 10.1016/j.celrep.2016.11.026.

Ranisavljevic N, Okamoto I, Heard E, Ancelin K. RNA FISH to study zygotic genome activation in early mouse embryos. **Methods Mol Biol**. 605:133-145. (2017). doi: 10.1007/978-1-4939-6988-3_9.

Ohta H, Kurimoto K, Okamoto I, Nakamura T, Yabuta Y, Miyauchi H, Yamamoto T, Okuno Y, Hagiwara M, Shirane K, Sasaki H, Saitou M. In

Vitro expansion of mouse primordial germ cell-like cells recapitulates an epigenetic blank slate. **EMBO J.** 2017 May 30. pii: e201695862. doi: 10.15252/embj.201695862

〔学会発表〕(計 3件)

哺乳動物における遺伝子量補償

北海道大学(大学院生向け、分子細胞生物学特論)、2013年6月21日

カニクイザル胚におけるX染色体不活性化のダイナミクス

神戸国際会議場

日本分子生物学会(ワークショップ)、2013年12月04日

哺乳類X染色体不活性化のエピジェネティクス

ハートピア熱海

新学術領域(性差)若手研究集会(シンポジウム)

2014年12月9-10日

④Developmental Dynamics of X-chromosome inactivation in the crab-eating macaque embryos

理研多細胞システム形成研究センター

CDB Symposium

2017年3月27-29日

〔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

6. 研究組織
(1)研究代表者
岡本郁弘(OKAMOTO, Ikuhiro)
京都大学・医学研究科・講師、40648424

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者