

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640114

研究課題名(和文)人工染色体を用いた長鎖非コードRNA関連分子の同定

研究課題名(英文) Identification of long non-coding RNA associated protein complexes using mouse artificial chromosome

研究代表者

久郷 裕之 (KUGOH, HIROYUKI)

鳥取大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40225131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、CHO細胞内においてXist RNAを発現する人工染色体の構築を行った。しかし、Xist RNAの薬剤依存的な発現動態を示したが遺伝子抑制効果は認められなかった。一方、Xistゲノム領域を搭載したヒト21番染色体上では、Xist RNAの発現および不活性染色体マーカーのH3K27me3の局在が認められた。このことより、ヒト21番染色体上にDNA/lncRNA/タンパク複合体の再現が示唆された。さらに、染色体を回収するタグとしてCRISPR/Cas9システムを応用し、FLAG/dCas9-EGFPを作製し染色体回収用のタグシステムの構築に成功した。

研究成果の概要(英文)： In this study, we established NIH/3T3 and HeLa cells containing MAC and human chromosome 21 that express Xist RNA by a doxycycline (Dox). Xist RNA territories were observed both on MAC and human chromosome 21 by Dox-dependent Xist expression. However, genes that contain selectable marker located on MAC were expressed despite on cis-accumulation of Xist RNA on MAC. On the other hand, it was observed accumulation of H3K27me3 on human chromosome 21 expressing Xist RNA. These results suggest that the establishment of XCI by Xist RNA may play an important role in a special chromatin region as elements for cis-silencing on chromosome. In addition, we developed tool for recovery of human chromosome 21 expressing Xist RNA using FLAG/dCas9-EGFP.

研究分野：染色体工学

キーワード： long noncoding RNA Xist LIT1/KCNQ10T1 chromosome MAC

1. 研究開始当初の背景

細胞内においてタンパク質をコードしている RNA は、3%未満であり、他の 97%以上はタンパク質をコードしない、非コード RNA である。近年、様々な生命現象や染色体起因疾患に非コード RNA の関与が明らかにされ、その分子機構の解明が進んできた。その結果、未知の機能性非コード RNA が引き起こすエピジェネティックな変化が生物の多様性あるいは細胞内のゲノム機能に重要な制御分子として働いていることが推測されてきた。

その中でも、長鎖非コード RNA (long non-coding RNA; lncRNA) として知られている X 染色体の不活性化に關与する *XIST* RNA やゲノム刷り込みに關与する *KCNQ1OT1/LIT1* は、転写された染色体全体あるいは局所的に集積し、集積した遺伝子群を抑制するユニークな特徴を有する。しかし、1)自身が転写された染色体をどのように識別しているのか 2)配列が異なる遺伝子にどのように集積するのか 3)遺伝子抑制を回避する遺伝子が存在するなど、その制御分子機構には不明な点が多く残されている。

この最大の問題は、これらの RNA あるいは DNA 配列と共役するタンパク質複合体の同定が困難であり、未だ共役因子群の補完がなされていないためである。近年、PICCh 法や CLIP 法などの新たな複合体解析技術が報告されている。しかし、これらの技術の多くがリピート配列を標的としており、*in vitro* での複合体解析技術に留まる。

従って、*XIST* RNA や *KCNQ1OT1/LIT1* RNA の制御分子機構およびその現象を理解する上で、細胞内の生理的環境下において DNA/lncRNA/タンパク質複合体を再現し、その複合体の網羅的に同定可能な技術開発が必要である。

2. 研究の目的

(1)細胞内において染色体上に DNA/lncRNA/タンパク質群の複合体を再現し、タグシステムを用いて細胞内から標的染色体のみの回収を試みる。その後、質量分析解析により目的の染色体上に集積した複合体の網羅的同定を目指す。

(2)同定された複合体と標的 lncRNA との関連性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 薬剤誘導性 *Xist* PAC の作製

大腸菌内の相同組換え

Xist または *KCNQ1OT1/LIT1* のゲノム領域を保持する BAC は、相同組換えタンパク質を発現する大腸菌 DY380 内に保持されている。薬剤誘導性プロモーター、染色体搭載用 loxP カセットおよび標的ゲノムの相同領域を保持する PAC を大腸菌内へ導入し、組換

え反応により標的ゲノム領域を有する PAC コンストラクトを取得した。*Xist*、*KCNQ1OT1/LIT1* ゲノム領域はそれぞれ BAC 由来のものを使用し、薬剤誘導性プロモーターは、pTRE3G(Clontech 社)を使用した。取得した PAC コンストラクトは、PCR および制限酵素処理によりスクリーニングを行った。

(2) CHO 細胞内において人工染色体上へ *Xist* ゲノム領域の搭載

人工染色体上への PAC コンストラクト搭載

人工染色体は、CHO 細胞内に保持されている。CHO 細胞へ作製した PAC コンストラクトを導入し、部位特異的組換え Cre/loxP システムを用いて人工染色体上への搭載を行った。その後、薬剤選択により得られたクローンの PCR スクリーニングを行った。PCR スクリーニング陽性クローンにおいて、人工染色体と *Xist* PAC を蛍光標識した DNA-Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) 解析し、導入された PAC コンストラクトが人工染色体上へ座しているかを評価した。

薬剤誘導による *Xist* RNA の発現解析

リバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子 (rtTA) および誘導薬剤を添加し、*Xist* RNA 発現動態を qRT-PCR 解析および DNA/RNA-FISH 解析により評価した。

(3) *Xist*-MAC を保持する NIH/3T3 細胞の樹立

CHO 細胞から NIH/3T3 細胞への *Xist*-MAC 移入

微小核細胞融合 (microcell-mediated chromosome transfer : MMCT) 法により *Xist*-MAC を CHO 細胞から NIH/3T3 細胞へ移入した。薬剤選択により取得したクローンは、PCR および DNA-FISH 解析によりスクリーニングを行った。

Xist RNA の局在解析

薬剤誘導条件下において人工染色体 DNA および *Xist* RNA を蛍光標識した DNA/RNA-FISH 解析を行った。シグナルのスペクトルは、共焦点レーザー顕微鏡を用いて画像を取り込み、計測した。

薬剤誘導による *Xist* RNA および人工染色体上に座する薬剤選択遺伝子の発現解析

誘導薬剤を添加し、*Xist* RNA および薬剤耐性遺伝子の発現動態を qRT-PCR 解析により評価した。

(4) CHO 細胞内においてヒト 21 番染色体へ *Xist* ゲノム領域の搭載

ヒト 21 番染色体上への PAC コンストラクト搭載

(2)と同様に行った

Xist RNA 誘導性ヒストン修飾の局在解析
誘導薬剤添加条件下において、蛍光標識した human Cot1 DNA を用いて、ハイブリダイゼーションを行う。その後、抗 H3K27me3 抗体の免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いてヒト 21 番染色体と H3K27me3 の局在を評価した。

(5) 免疫沈降用 Cas9 作製

FLAG/dCas9-EGFP の作製

Ca9 は psLQ1658-dCas9-EGFP(Addgene 社)、FLAG タグは pFLG-CMV4(Promega 社)由来のものを資材として用い、制限酵素およびライゲーションにより作製した。

NIH/3T3 細胞における

FLAG/dCas9-EGFP の局在解析

NIH/3T3 細胞へ FLAG/dCas9-EGFP および mouse major satellite リピートを標的とした gRNA を共導入した。24hrs 後、蛍光顕微鏡により EGFP の局在を生細胞内で評価した。その後、DAPI 染色により、DAPI により強く染まる mouse major satellite リピートと EGFP の局在を共焦点レーザー顕微鏡により評価した。

4. 研究成果

(1) 薬剤誘導性 *Xist* PAC の作製

標的とするそれぞれの lncRNA は、転写された染色体上に *cis* 集積し、クラスターレベルあるいは染色体レベルで遺伝子の発現抑制を引き起こす特徴を有する。そのため、強制発現系あるいは遺伝子自身が有するプロモーターでは、人工染色体上に存在する薬剤選択マーカーが抑制されてしまう。

そこで、大腸菌内の組換え反応を利用し、人工染色体へ搭載する *Xist* ゲノム領域を有する PAC の改変を行った。その結果、薬剤誘導性プロモーターを上流に持つ *Xist* PAC の作製に成功した。

KCNQ1OT1/LIT1 においても同様のストラテジーにより改変した PAC 作製に取り組んでいる。

(2) CHO 細胞内において人工染色体上へ *Xist* ゲノム領域の搭載

CHO 細胞内で Cre/loxP システムによる人工染色体上へ改変した *Xist* PAC の搭載を行った。薬剤選択により得られたクローンにおいて *Xist* PAC が人工染色体上に座しているかを評価するため、DNA FISH 解析を行った。その結果、*Xist* PAC DNA シグナルは人工染色体 DNA シグナルと共局在を示した(図 1a)。

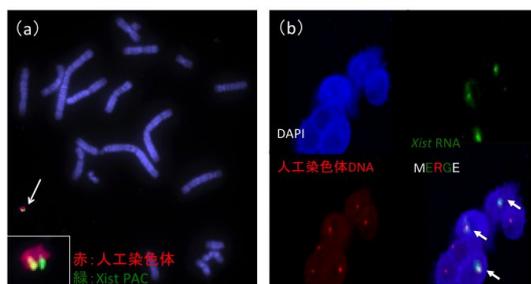
加えて、誘導薬剤添加により *Xist* RNA の発現を評価した結果、薬剤依存的な *Xist* RNA の発現が認められた。

また、DNA/RNA-FISH 解析により人工染

色体上への *Xist* RNA 集積を評価した。その結果、薬剤依存的に発現した *Xist* RNA シグナルと人工染色体 DNA シグナルは共局在を示した(図 1b)。

これらの結果より、構築した人工染色体は、薬剤依存的に *Xist* RNA を発現し、その RNA は人工染色体上に集積することが示唆された。このことをもって *Xist* ゲノム領域を保持する人工染色体(*Xist*-MAC)の完成とした。

図1. *Xist*が搭載された人工染色体を保持するCHO細胞の解析



(3) *Xist*-MAC を保持する NIH/3T3 細胞の樹立

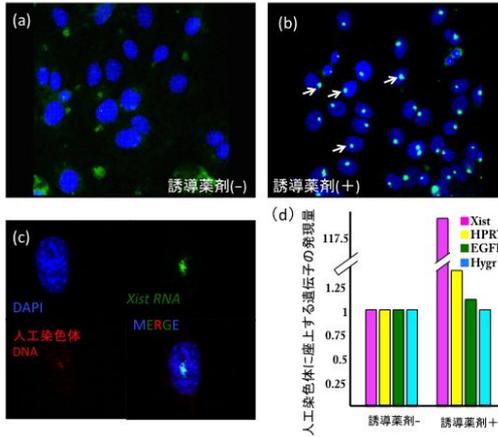
MMCT 法を用いて、*Xist*-MAC を CHO 細胞から NIH/3T3 細胞へ移入した。移入された NIH/3T3 細胞において人 *Xist*-MAC の有無を確認するため、DNA FISH 解析を行った。その結果、NIH/3T3 細胞において *Xist* PAC DNA シグナルと人工染色体 DNA シグナルの共局在が認められた。このことより、NIH/3T3 細胞内において *Xist*-MAC の存在を確認した。

加えて、薬剤依存的に発現した *Xist* RNA の人工染色体上への集積動態を評価するため、DNA/RNA FISH 解析を行った。その結果、*Xist* RNA シグナルは人工染色体 DNA シグナルと共局在を示した(図 2a-c)。この結果より、薬剤依存的に発現した *Xist* RNA による人工染色体上への集積が示唆された。

人工染色体上には、*Xist* ゲノム領域以外の遺伝子(HPRT, EGFP, Hygr)が座しており、これらの遺伝子の発現動態をモニターすることで *Xist* RNA による遺伝子抑制効果の評価できる。そこで、誘導薬剤存在下における人工染色体上の遺伝子発現を評価した。しかしながら、いずれの遺伝子においても発現減少は認められなかった(図 2d)。また、免疫蛍光染色法を用いた人工染色体上のヒストン修飾 H3K27me3 局在を評価したが、その局在は認められなかった。

これらの結果より、薬剤依存的に発現した *Xist* RNA は人工染色体上へ集積を示すが、集積した遺伝子の発現抑制(染色体の不活性化)を引き起こさないことが示唆された。

図2. Xist-MACを保持するNIH/3T3細胞の解析



(4) CHO 細胞内においてヒト 21 番染色体へ Xist ゲノム領域の搭載

(1)、(2)の結果より人工染色体には、Xist により誘導される遺伝子抑制に必要な配列が欠損しており、抑制効果を示さなかったと仮説を立てた。この仮説より、続いて全ゲノム領域がそのまま保持されているヒト 21 番染色体上に改変された Xist PAC の導入を試みた。

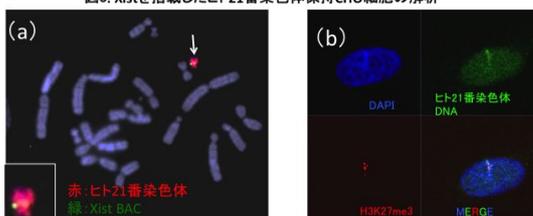
CHO 細胞内において Cre/loxP システムにより、Xist PAC をヒト 21 番染色体上に搭載した。薬剤選択により得られたクローンにおいて Xist PAC がヒト 21 番染色体上に座しているかを評価するため、DNA FISH 解析を行った。その結果、Xist PAC DNA シグナルはヒト 21 番染色体 DNA シグナルと共局在を示した(図 3a)。

また、誘導薬剤を添加し Xist RNA の発現を評価した結果、薬剤依存的な Xist RNA の発現が認められた。

加えて、Xist RNA により誘導される遺伝子抑制性ヒストン修飾 H3K27me3 の局在を免疫染色と DNA-FISH 解析を用いて評価した結果、ヒト 21 番染色体上に H3K27me3 の局在が認められた(図 3b)。これらの結果より、Xist PAC を搭載したヒト 21 番染色体上では、Xist RNA による染色体不活性化、すなわち、DNA/lncRNA/タンパク複合体の再現が示唆された。これをもって、Xist ゲノム領域を搭載したヒト 21 番染色体の完成とした。

KCNQ1OT1/LIT1 においても同様のストラテジーにより、ヒト 21 番染色体上へ導入を試みる。

図3. Xistを搭載したヒト21番染色体保持CHO細胞の解析

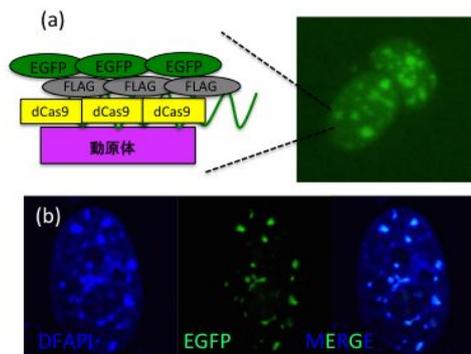


(5) 免疫沈降用 Cas9 作製

これまで LacO/LacI システムによる染色体回収を試みてきたが、長大なリピート配列の不安定性から、新たに CRISPR/Cas9 システムを用いたストラテジーへ変更した。

Cas9 の切断活性を失活させ、タグとして EGFP および FLAG を融合させた FLAG/dCas9-EGFP を作製した。作製した FLAG/dCas9-EGFP の有効性を確認するため、マウス major satellite リピートを標的とした gRNA とともに NIH/3T3 細胞へ導入した。その結果、NIH/3T3 細胞内において複数の EGFP foci が認められた(図 4a)。また、FLAG/dCas9-EGFP と gRNA を導入した NIH/3T3 細胞を DAPI 染色した結果、EGFP は DAPI 染色により強く染まる領域と共局在を示した(図 4b)。このことより、作製した FLAG/dCas9-EGFP が gRNA 依存的に major satellite リピートへ集積したことが示唆された。このことをもって、染色体回収用 FLAG/dCas9-EGFP の完成とした。

図4. FLAG/dCas9-EGFP の作製



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 1 件)

砂村直洋、久郷裕之 長鎖ノンコーディング RNA による染色体ドメインレベルの遺伝子発現制御 細胞工学, 査読(無), vol.34, No.1, 14-23, 2015, 秀潤社

[学会発表](計 2 件)

1. H. Kugoh, T. Deguchi, N. Sunamura, T. Ohhira, M. Oshimura and Yuji Nakayama Molecular mechanism of cancer development by long non-coding RNA. ACC5 (Asian Chromosome Colloquium), Bangkok, Thailand, Kasetsart University, April 29-May 1, 2015

2. N. Sunamura, D. Inaoka, T. Ohira, Y. Nakayama, M. Oshimura and H. Kugoh Identification of long non-coding RNA Xist associated protein complexes using mouse artificial chromosome (MAC). ACC5 (Asian

Chromosome Colloquium), Bangkok, Thailand,
Kasetsart University, April 29-May 1, 2015

〔図書〕(計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者 久郷裕之 (Hiroyuki Kugoh)
鳥取大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 : 40225131

研究協力者

大平嵩人
砂村直洋
稲岡大悟