

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2009～2013

課題番号：21115005

研究課題名(和文) Xist RNA作用マシナリーの調節機構

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of Xist RNA machinery

研究代表者

佐渡 敬(Sado, Takashi)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：70321601

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 74,200,000円、(間接経費) 22,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では哺乳類のX染色体不活性化に中心的な役割を果たすXist RNAの作用マシナリーを理解するために、不活性X染色体に局在するタンパク質とその相互作用因子に着目し、それらがXist RNAの機能発現にどのような役割を果たすかについて解析を行った。その結果、染色体の複製プログラムの制御についてさらに検討することの重要性が見いだされた。また、作製したXist RNAの局在制御に関わるタンパク質の欠損マウスに由来する各種培養細胞を樹立したことで、今後のXist RNAマシナリーのさらなる理解へ向けた道筋をつけた。

研究成果の概要(英文)：In this mission, we attempted to figure out the regulatory mechanisms of Xist RNA machinery, which has been known for many years to play a pivotal role in X chromosome inactivation in female mammals. Especially, we focused on the potential role of the proteins, which has been shown to localize to the inactive X, and their interacting partners in Xist RNA-mediated chromatin silencing. The findings indicates the importance of further studies of the potential role of factors involved in replication programming in the Xist RNA machinery. In addition, we have paved the way to our further understanding of the Xist RNA machinery by deriving various cell lines from the mice we established by knocking out a protein involved in the regulation of Xist RNA deposition to the inactive X.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、ゲノム・遺伝子動態

キーワード：非コードRNA 発生・分化 クロマチン 遺伝学

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類で保存された約 1000 にも及ぶ高分子非コード RNA の多くは、生理機能が不明である中、*Xist* RNA は、X 染色体全域にわたって結合することでそのヘテロクロマチン化を引き起こすことが知られていたが、相互作用因子を含めた *Xist* RNA の機能発現制御機構 (*Xist* 作用マシナリー) については、あまりよく分かっていなかった。

ヒストン修飾に関わるポリコーム群 (PcG) 蛋白質複合体が *Xist* RNA 依存的に不活性 X 染色体に局在することが示されていたが、これらは不活性状態の維持に関わると考えられ、X 染色体のヘテロクロマチン化に直接関わると思われる因子については報告がなかった。しかし、当該研究課題開始当初、染色体の機能制御に重要な役割を果たす SMC 蛋白質の関連因子である SmcHD1 が不活性 X 染色体に局在することが見出された。線虫では SMC 関連因子が遺伝子量補償複合体の構成因子として X 染色体の活性制御に不可欠であることも報告されていたこともあり、この SmcHD1 を含む複合体が哺乳類の X 染色体不活性化に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

また、不活性 X 染色体に局在する別の蛋白質として、核マトリクスの主要成分のひとつである RNA 結合蛋白質 hnRNP U が本領域計画研究の研究分担者である中川らの解析によって、*Xist* の X 染色体への局在に関わる可能性が見出されていた。*Xist* RNA の機能発現の大前提である X 染色体への局在制御機構についてはどのような因子が関与しているかも含め、ほとんどわかっていなかったため、この hnRNP U の機能解析がその糸口になると思われた。

## 2. 研究の目的

クロマチンと相互作用し、その領域のエピジェネティック修飾を制御すると考えられる高分子非コード RNA は、*Xist* RNA のほかにもいくつも見出されており、RNA を介したクロマチン制御は遺伝子発現を制御する重要な機構の一つとして広く知られるところとなっていた。本研究では、相互作用因子を含めた *Xist* RNA の機能発現制御機構 (*Xist* 作用マシナリー) をモデルとして、高分子非コード RNA 作用マシナリーの多様な調節機構の一端を明らかにすることを目指した。そのために、不活性 X 染色体に局在する蛋白質に着目し、それらが *Xist* RNA の機能発現にどのような効果を持つかが明らかすることを計画した。特に染色体の機能制御に関わる SMC ファミリー蛋白質と類似の構造を持ち不活性 X 染色体の維持に重要と考えられる SmcHD1 およびこれと相互作用する因子、*Xist* RNA の局在制御に関わると考えら

れる hnRNP U に着目し、解析を進めることとした。

## 3. 研究の方法

SmcHD1 欠損が招く X 染色体不活性化の維持機構の異常の程度を知るために、X 染色体連鎖遺伝子の発現を RNA-FISH や qRT-PCR によって詳細に調べるとともに、メスの胎生致死を引き起こす直接的な原因を明らかにするため組織学的解析を行った。また、SmcHD1 欠損が招くエピジェネティック修飾の異常の有無を明らかにするため、これまで不活性 X 染色体の特徴として知られる様々なヒストン修飾について免疫染色により詳細に調べた。

SmcHD1 と相互作用する因子を同定するために、抗 SmcHD1 抗体を用いた免疫沈降を行い、得られた沈降物の質量分析を行った。その結果得られた候補因子については、SmcHD1 との相互作用の有無、不活性 X 染色体に局在するかなどについて、培養細胞を用いて評価した。また、ヒトにおいて SMCHD1 と相互作用することが共同研究者によって見出されていた HBI1 の機能を明らかにするため、このマウスオソログを単離するとともに、ノックアウトマウスを作製し、詳細な解析を行った。

*Xist* RNA の X 染色体への局在に関わることを示唆された hnRNP U の条件的ノックアウトマウスを作製し、*Xist* RNA の機能発現における hnRNP U の役割、特に *Xist* RNA による染色体コーティングが担う X 染色体不活性化の開始と維持にどのような影響をおよぼすかに着目し、胚およびそれに由来する MEF や ES 細胞を用いて解析することを計画した。

## 4. 研究成果

マウスにおいて SmcHD1 の機能欠損はメスの胚における X 染色体不活性化の維持機構を損ない、胚発生過程でいったんは不活性化された X 染色体連鎖遺伝子の脱抑制を招く。そのようなメス胚は、妊娠中期で致死となるが、これまでその直接の原因は不明であった。私たちは、Blewit 博士 (Walter and Elilza Hall institute of Medical Research, Melbourne) より、SmcHD1 欠損マウスの分与を受け、致死となる前後の胚の組織学的解析を行った。その結果、メスの胚では胎盤において巨大栄養膜細胞の数に著しい減少が認められた。SmcHD1 欠損のオス胚ではそのような減少は認められなかったことから、メスの胚が妊娠中期で致死となる主要な原因は、巨大栄養膜細胞が正常に形成されないためと考えられた。以前我々は *Xist* の部分的機能欠損アレル (*Xist<sup>IVS</sup>*) から転写された *Xist<sup>IVS</sup>* RNA が

X染色体を覆い不活性化を引き起こすものの、その状態を維持できず再活性化を招き、妊娠中期で致死となることを報告しているが、この場合も巨大栄養膜細胞に影響が見られている (Hoki et al., *Development*, 2011). そこで、*Xist*<sup>IVS</sup> RNA の異常と SmcHD1 の関連を調べるため、*Xist*<sup>IVS</sup> RNA を発現する栄養膜幹 (TS) 細胞を用いて、SmcHD1 の免疫染色を行ったが、SmcHD1 は *Xist*<sup>IVS</sup> RNA で覆われる X 染色体に局在することが示唆された。このことから、*Xist*<sup>IVS</sup> RNA の機能不全が SmcHD1 の機能と直接関連する可能性は低いように思われた。とはいえ、これら 2 種類の変異マウスの表現型は、栄養膜巨大細胞が不活性 X 染色体の再活性化に特に感受性が高いことを示唆している。

SmcHD1 欠損胚で観察される不活性 X 染色体上の遺伝子の脱抑制とヒストン修飾の関連を調べるため、SmcHD1 欠損胚より調製した胚線維芽細胞 (MEF) を用いて免疫染色を行った。ところが、調べたヒストン修飾 (H3K27me3, H3K9me2, H3K9me3, H4K20me1, H2AK119ub, H4ac) についてはいずれも、SmcHD1 欠損 MEF の不活性 X 染色体で顕著な異常は認められなかった。しかし、免疫染色で検出できる染色体全体にわたる影響が顕著でなくても、クロマチンレベルの解析では差が見られる可能性があるため、現在 ChIP-seq 解析を進めている。

これまでに見いだされた興味深い異常として、野生型 MEF では不活性 X 染色体が S 期の後期に複製されるのに対し、SmcHD1 欠損 MEF では複製時期が S 期の前・中期にシフトしていることが挙げられる。これが X 染色体連鎖遺伝子の脱抑制の原因か結果かは不明であるが、*Xist* RNA の機能発現における複製プログラミング制御因子の役割を今後検討していくことの重要性が見出されたと考えている。SmcHD1 と *Xist* RNA の相互作用について検討するために行った RIP や CLIP では、これまでのところポジティブな結果は得られていない。

共同研究者らによってヒト SMCHD1 の相互作用因子として見いだされた新規タンパク質 HBiX1 の機能について、ヒト培養細胞において siRNA による機能阻害を行った結果、HBiX1 が不活性 X 染色体のコンパクションに関与していることが示唆されたが、少なくとも解析に用いた X 染色体不活性化が確立した細胞においては不活性 X 染色体上の遺伝子の脱抑制は認められなかった (Nozawa et al., *Nat. Mol. Struct. Biol.*, 2013)。これと並行して我々は、マウスオーソログ Hbix1 の機能欠損マウスをジーンターゲットングによって作製し、胚発生過程における *Xist* RNA の機能発現に Hbix1 欠損がどのような影響をおよぼすか調べた。ところが、

SmcHD1 欠損マウスの場合と異なり Hbix1 欠損マウスは雌雄とも見たところ正常で、生殖能力についても異常は認められなかった。ヒトの場合と同様、内在性のマウス Hbix1 が免疫染色によって不活性 X 染色体に局在するとともに、培養細胞で過剰発現した Hbix1 と内在性 SmcHD1 の間で相互作用が確認されたことなどを考えると、Hbix1 欠損マウスの表現型に異常が認められなかったことは意外であった。遺伝的背景のばらつきによる影響を排除するために、C57Bl/6 系統と戻し交配を繰り返し、9 世代目のヘテロ接合体同士 (99.8%が C57Bl/6 の遺伝的背景) の交配から得られたホモ接合体についても異常は認められなかった。現在は、Hbix1 と SmcHD1 の二重欠損マウスが SmcHD1 欠損単独のものに比べ表現型がさらに重篤になるかどうか調べるための交配を続けている。

hnRNP U の条件的機能欠損マウスもジーンターゲットングにより作製した。機能欠損アレルに関してホモ接合体は雌雄ともに胎生致死であることがわかったが、その時期や雌雄差の有無など詳細については、まだ十分解析できていない。また、条件的に cre リコンビナーゼを発現するマウスとの交配も行い、条件的機能阻害を行うための準備を進行中である。今後この改変マウス胚およびこれに由来する MEF や ES 細胞の解析によって、*Xist* RNA の局在制御を介した *Xist* RNA マシナリーの理解が進むものと期待される。

## 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 11 件) すべて査読有。  
Shinagawa T, Takagi T, Tsukamoto D, Tomaru C, Huynh LM, Sivaraman P, Kumarevel T, Inoue K, Nakato R, Katou Y, Sado T, Takahashi S, Ogura A, Shirahige K, Ishii S. Histone variants enriched in oocytes enhance reprogramming to induced pluripotent stem cells. ***Cell Stem Cell***. 2014 Feb 6;14(2):217-27. doi: 10.1016/j.stem.2013.12.015.

Kagawa N, Hori T, Hoki Y, Hosoya O, Tsutsui K, Saga Y, Sado T, Fukagawa T. The CENP-O complex requirement varies among different cell types. ***Chromosome Res.*** 2014 Jan 31. [Epub ahead of print]

Sado T, Sakaguchi T. Species-specific differences in X chromosome inactivation in mammals. ***Reproduction***. 2013 Aug 12;146(4):R131-9. doi:

10.1530/REP-13-0173. Print 2013 Oct. Review.

Nozawa RS, Nagao K, Igami KT, Shibata S, Shirai N, Nozaki N, Sado T, Kimura H, Obuse C. Human inactive X chromosome is compacted through a PRC2-independent SMCHD1-HBiX1 pathway. **Nat Struct Mol Biol.** 2013 May;20(5):566-73. doi: 10.1038/nsmb.2532. Epub 2013 Mar 31.

Yamamoto Y, Watanabe T, Hoki Y, Shirane K, Li Y, Ichiiyanagi K, Kuramochi-Miyagawa S, Toyoda A, Fujiyama A, Oginuma M, Suzuki H, Sado T, Nakano T, Sasaki H. Targeted gene silencing in mouse germ cells by insertion of a homologous DNA into a piRNA generating locus. **Genome Res.** 2013 Feb;23(2):292-9. doi: 10.1101/gr.137224.112. Epub 2012 Nov 6.

Sado T, Brockdorff N. Advances in understanding chromosome silencing by the long non-coding RNA *Xist*. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** 2013 Jan 5;368(1609):20110325. doi: 10.1098/rstb.2011.0325. Review.

Hoki Y, Ikeda R, Mise N, Sakata Y, Ohhata T, Sasaki H, Abe K, Sado T. Incomplete X-inactivation initiated by a hypomorphic *Xist* allele in the mouse. **Development.** 2011 Jul;138(13):2649-59. doi: 10.1242/dev.061226. Epub 2011 May 25.

Watanabe T, Tomizawa S, Mitsuya K, Totoki Y, Yamamoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Iida N, Hoki Y, Murphy PJ, Toyoda A, Gotoh K, Hiura H, Arima T, Fujiyama A, Sado T, Shibata T, Nakano T, Lin H, Ichiiyanagi K, Soloway PD, Sasaki H. Role for piRNAs and noncoding RNA in de novo DNA methylation of the imprinted mouse *Rasgrf1* locus. **Science.** 2011 May 13;332(6031):848-52. doi: 10.1126/science.1203919.

Watanabe T, Chuma S, Yamamoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Totoki Y, Toyoda A, Hoki Y, Fujiyama A, Shibata T, Sado T, Noce T, Nakano T, Nakatsuji N, Lin H, Sasaki H. MITOPLD is a mitochondrial protein essential for nuage formation and piRNA biogenesis in the mouse germline. **Dev Cell.** 2011 Mar 15;20(3):364-75. doi:

10.1016/j.devcel.2011.01.005.

Inoue K, Kohda T, Sugimoto M, Sado T, Ogonuki N, Matoba S, Shiura H, Ikeda R, Mochida K, Fujii T, Sawai K, Otte AP, Tian XC, Yang X, Ishino F, Abe K, Ogura A. Impeding *Xist* expression from the active X chromosome improves mouse somatic cell nuclear transfer. **Science.** 2010 Oct 22;330(6003):496-9. doi: 10.1126/science.1194174. Epub 2010 Sep 16.

Inoue K, Ogonuki N, Mekada K, Yoshiki A, Sado T, Ogura A. Sex-reversed somatic cell cloning in the mouse. **J Reprod Dev.** 2009 Oct;55(5):566-9. Epub 2009 Jul 14.

[学会発表](計44件)  
佐渡 敬. X染色体の不活性化の分子機構. 第138回染色体研究会, 2009, 6/13.東京.

Sado, T. Toward the understanding of molecular events underlying X-inactivation. The 24th Naito Conference on Nuclear Dynamics and RNA[II](招待講演), 2009, 6/23-26.北海道.

尼川裕子 他3名. マウスのメス生殖細胞における*Xist*発現消失時期の遅延はX染色体再活性化を遅らせる. 日本遺伝学会第81回大会, 2009, 9/16-18.長野.

保木裕子 他3名. X染色体不活性化機構の部分的機能欠損変異. 日本遺伝学会第81回大会, 2009, 9/16-18.長野.

佐渡 敬. 哺乳類のメス生殖細胞における不活性X染色体の再活性化. 第82回日本生化学会大会, 2009, 10/21-23.兵庫.

保木裕子 他3名. A partial loss of function mutation in the mechanism of X chromosome inactivation. 第32回日本分子生物学会年会, 2009, 12/9-12.兵庫.

尼川裕子 他3名. Prolonged expression of *Xist* retards X chromosome reactivation in mouse germ line. 第32回日本分子生物学会年会, 2009, 12/9-12.神奈川.

Hoki, Y., et al. A partial loss of function mutation in the mechanism of X chromosome inactivation. Keystone Symposium (A8), 2010, 1/17-22.タオス(

USA).

Amakawa, Y., et al. Prolonged expression of *Xist* retards X chromosome reactivation in mouse germ line. Keystone Symposium (A8), 2010, 1/17-22. タオス (USA).

Sado, T. A Partial Loss of Function Mutation in the Mechanism of X Chromosome Inactivation. The 19th CDB Meeting, 2010, 5/10-12. 兵庫.

酒田祐佳 他 4 名. *Xist* RNA の 5' 領域の X 染色体不活性化における役割. 第 4 回 日本エピジェネティクス研究会, 2010, 5/28-29. 鳥取.

尼川裕子 他 4 名. 胚体外組織における父由来 X 染色体のインプリント. 第 4 回 日本エピジェネティクス研究会, 2010, 5/28-29. 鳥取.

佐渡 敬 他 6 名. X 染色体不活性化の部分的機能欠損変異の解析. 第 12 回 日本 RNA 学会年会, 2010, 7/27-29. 東京.

佐渡 敬. *Xist* RNA の作用機序の理解へ向けて. 日本遺伝学会 第 82 回大会, 2010, 9/20-23. 北海道.

酒田祐佳 他 4 名. *Xist* RNA の 5' 領域の X 染色体不活性化における役割. 日本遺伝学会 第 82 回大会, 2010, 9/20-23. 北海道.

佐渡 敬. *Xist* RNA の機能不全が招く X 染色体不活性化の異常. 第 33 回日本分子生物学会年会, 第 83 回日本生化学会大会, 2010, 12/7-10. 兵庫.

酒田祐佳 他 4 名. *Xist* RNA の 5' 領域の X 染色体不活性化における役割. 第 33 回日本分子生物学会年会, 第 83 回日本生化学会大会, 2010, 12/7-10. 兵庫.

坂口武久 他 4 名. ヒト不活性化 X 染色体に局在する新規タンパク質のマウスホモログの単離と解析. 第 5 回日本エピジェネティクス研究会年会, 2011, 5/19-20. 熊本.

酒田祐佳 他 4 名. *Xist* RNA の 5' 領域の X 染色体不活性化における役割. 第 5 回日本エピジェネティクス研究会年会, 2011, 5/19-20. 熊本.

T. Sado et al. Incomplete X-inactivation Initiated by a Hypomorphic *Xist* Allele in the Mouse. The 16th annual meeting of the RNA society and the RNA society of Japan

13th annual meeting, 2011, 6/14-18. 京都.

T. Sado. X-inactivation initiated by *Xist* RNA defective in silencing in the mouse embryo. 3rd X-inactivation Conference (招待講演), 2011, 7/20-24. オックスフォード (UK).

T. Sakaguchi et al. X-inactivation in female mice deficient for macroH2A1 and macroH2A2. 3rd X-inactivation Conference, 2011, 7/20-24. オックスフォード (UK).

Y. Sakata et al. X-inactivation triggered by *Xist* RNA deleted for the 5' Sequence in the mouse embryo. 3rd X-inactivation Conference, 2011, 7/20-24. オックスフォード (UK).

佐渡 敬. マウス雌生殖細胞における X 染色体の再活性化. 日本遺伝学会第 83 回大会 (招待講演), 2011, 9/20-23. 京都.

酒田祐佳 他 4 名. *Xist* RNA の 5' 領域の X 染色体不活性化における役割. 日本遺伝学会第 83 回大会, 2011, 9/20-23. 京都. (ベストペーパー賞)

佐渡 敬. 変異型 *Xist* RNA が招く X 染色体不活性化の異常. 第 14 回日本 RNA 学会年会, 2012, 7/18. 宮城.

佐渡 敬. Epigenetic Regulation of the Mammalian X chromosome. 第 71 回日本癌学会学術総会 (招待講演), 2012, 9/21. 北海道.

佐渡 敬. *Xist* RNA の作用機序解明へ向けた遺伝学的アプローチ. 日本遺伝学会第 84 回大会 (招待講演), 2012, 9/26. 福岡.

中島達郎. *Xist* の部分的機能欠損アレルによって不活性化を開始した X 染色体の CpG メチル化. 日本遺伝学会第 84 回大会, 2012, 9/25. 福岡.

酒田祐佳. 変異型 *Xist* RNA による不活性化クロマチンドメインの形成. 日本遺伝学会第 84 回大会, 2012, 9/25. 福岡.

佐渡 敬. Defects in X-inactivation initiated by mutant *Xist* RNA in the mouse embryo. 第 35 回日本分子生物学会年会 (招待講演), 2012, 12/14. 福岡.

佐渡 敬. *Xist* RNA defective in chromosome silencing in the mouse. 第 85

回日本生化学会大会(招待講演),2012,12/15 . 福岡 .

酒田祐佳 . 変異 *Xist* RNA による不活性化クロマチンドメインの形成 . エピジェネティクス研究会 , 2013 , 5/30-31 . 奈良 .

中島達郎 . 機能欠損を持つ *Xist* RNA は不活性化 X 染色体の CpG メチル化を正常に構築できない . エピジェネティクス研究会 , 2013 , 5/30-31 . 奈良 .

千木雄太 他 2 人 . *Xist* RNA の 5'領域は RNA を核内に保持させる 第 15 回日本 RNA 学会 , 2013 , 7/24-26 . 愛媛 .

酒田祐佳 他 3 人 . 変異 *Xist* RNA がもたらず X 染色体クロマチンドメインの変化 . 日本遺伝学会第 85 回大会 , 2013 , 9/19-21 . 神奈川 .

中島達郎 他 3 人 . 部分的機能欠損 *Xist* RNA によるエピジェネティック制御の異常 . 日本遺伝学会第 85 回大会 , 2013 , 9/19-21 . 神奈川 .

Sakata, Y. et al. Silent chromatin domain formed by *Xist* RNA defective in silencing in the mouse embryo. Riboclub 2013, 2013, 9/22-25 . ケベック(カナダ) .

Nakajima, T. et al. Defects in epigenetic regulation caused by partially dysfunctional *Xist* RNA. Riboclub 2013, 2013, 9/22-25 . ケベック(カナダ) .

Amakawa Y. et al. A new *Xist* allele driven by a constitutive active promoter: implication for asymmetric expression of *Xist* in preimplantation mouse embryos. Riboclub 2013, 2013, 9/22-25 . ケベック(カナダ) .

佐渡 敬 . 哺乳類 X 染色体のエピジェネティクス . 第 36 回日本分子生物学会年会(招待講演) , 2013 , 12/3-5 . 兵庫 .

長尾恒治 他 6 人 . アリル特異的 ChIP-seq 法によるマウス不活性化 X 染色体の解析 . 第 36 回日本分子生物学会年会 , 2013 , 12 , 3-5 . 兵庫 .

榊原祐樹 他 2 人 . SmcHD1 機能欠損胚における X 染色体不活性化 . 第 36 回日本分子生物学会年会 , 2013 , 12/3-5 . 兵庫 .

Sakaguchi T. et al. Cloning and molecular

characterization of mouse Hbix1. 第 36 回日本分子生物学会年会 , 2013 , 12/3-5 . 兵庫 .

〔図書〕(計 1 件)

佐渡 敬 . 卵子学 (森崇英総編集) 第 IV-14 章: 卵子と X 染色体 . 2011 .

6 . 研究組織

(1)研究代表者 佐渡 敬

(Takashi Sado)

九州大学 生体防御医学研究所・准教授

研究者番号 : 70321601