

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2017～2021

課題番号：17H06426

研究課題名（和文）性染色体ヘテロクロマチンが規定する性スペクトラム

研究課題名（英文）Sex spectrum defined by sex chromosomal heterochromatin

研究代表者

長尾 恒治（Nagao, Koji）

大阪大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：60426575

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 78,156,000円

研究成果の概要（和文）：性染色体ヘテロクロマチンによる性スペクトラムの定位の機構を明らかにするため、不活性X染色体のヘテロクロマチン構造に必要なSMCHD1の機能を明らかにしました。SMCHD1は、分化の過程でX染色体の不活性化を維持するために必要であること、不活性X染色体全域に渡って形成される抑制型ヒストン修飾パターンの形成に必要なことを明らかにしました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類では、雌雄間で数が異なるX染色体上の遺伝子量を補償するため、雌では2本あるX染色体のうち一方のX染色体では、遺伝子発現が発生のごく初期から染色体全域に渡って不活性化されます。このため女性の体細胞には、男性と異なり巨大なヘテロクロマチンである不活性X染色体が保持されているという特徴があります。そのため、不活性X染色体が構築され、維持される仕組みや、不活性X染色体が核内の他の遺伝子に与える影響への理解が進むことで、女性に偏る疾患の予防・治療へと繋がります。

研究成果の概要（英文）：To understand the sex spectrum, it is necessary to capture the smallest element of the sex spectrum establishment, which is defined by genetic factors in each cell. To elucidate the mechanism of the sex spectrum defined by sex chromosome heterochromatin, we clarified the role of SMCHD1 required for the heterochromatin structure of the inactive X chromosome. SMCHD1 is essential for the stable silencing of the inactive X chromosome during embryonic differentiation and the formation of repressive histone modification patterns across the inactive X chromosome.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：性スペクトラム エピジェネティクス X染色体不活性化

1. 研究開始当初の背景

ヒトの性同一性障害や性分化疾患などに見られるような多様な性の存在は、個体を構成する器官の間における性スペクトラム上の位置の乖離や異常な移動として捉えることができる。性スペクトラム上での定位と移動の分子機構の理解には、細胞・器官・個体という階層や、遺伝による自律・内分泌による同調・環境による修飾と攪乱という要因を、統合的に理解する必要がある。それらを紐解くには、遺伝的要因によって規定される細胞の性スペクトラム上の位置という性スペクトラム成立の最小要素を捉えられなければならない。この実体は、細胞自身が持つ性染色体によって自律的に制御される遺伝子発現パターンと考えることができる。

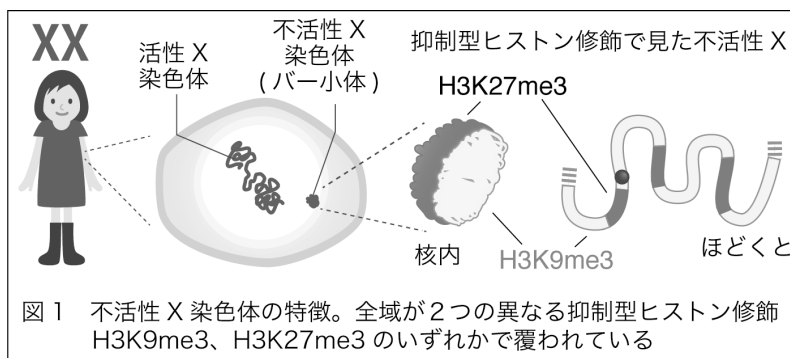
性染色体を遺伝的要因と考える上で、性染色体上の遺伝子だけでなく、性染色体自体の特殊な環境も想定する必要がある。X染色体を2本持つ哺乳類のメスの体細胞は、遺伝子量補償のため、X染色体のうち一方を不活性化X染色体というヘテロクロマチン構造（バー小体と呼ばれる）として核内に保持している。このX染色体不活性化により、雌におけるX染色体上の遺伝子量は、雄と同等になるとされるが、X染色体不活性化の不完全さゆえに、雌雄間だけでなく、雌の細胞の間でもX染色体上の遺伝子発現が異なっている。また、不活性化X染色体という巨大なヘテロクロマチンが、核内のヘテロクロマチン化因子のプールを変化させることで常染色体上のヘテロクロマチン形成能を変化させ、常染色体上の遺伝子の発現を制御している、という可能性も考えられている。このように、細胞自身の持つ不活性化X染色体の状態は、性スペクトラム上の位置を制御する要因になりうると考えられる。

2. 研究の目的

代表者が見出した不活性X染色体のコンパクトなヘテロクロマチン構造（バー小体）を作るのに必要なSMCHD1-HBiX1複合体を中心とする解析により、これらがどのように不活性X染色体や、常染色体上の遺伝子を制御しているのかを解明する。女性の細胞がもつヘテロクロマチン、不活性化X染色体の構築、維持のメカニズムを通して、性スペクトラムの理解を推進する。

3. 研究の方法

ヒトの細胞株、マウス個体や個体から樹立した細胞株を用い、不活性X染色体のコンパクトなヘテロクロマチン構造（バー小体）を作るのに必要なSMCHD1-HBiX1複合体に代表されるX染色体不活性化に関わる因子の欠損下で見られる表現型を明らかにする。アレル特異的な次世代シーケンサー解析法を用いたRNA-seq、ChIP-seq法を駆使することにより、不活性化X染色体における遺伝子発現、ヒストン修飾に代表されるエピゲノムの状態を明らかにする。特に、2つの異なる抑制型ヒストン修飾H3K9me3とH3K27me3が排他的に不活性X染色体全域を覆う、という代表者が見出している不活性X染色体特有のエピゲノムパターンに着目する（図1）。同時に、それら細胞における常染色体における遺伝子発現の状態から、不活性X染色体の状態が常染色体上の遺伝子に与える影響を明らかにする。また、SMCHD1、HBiX1などの因子自身の機能を、ChIP-seq、細胞染色による細胞内局在観察、タンパク質間相互作用解析、部分欠損変異体の機能解析を通して、明らかにすることでSMCHD1-HBiX1の機能メカニズムを明らかにしていく。



4. 研究成果

(1) Smchd1は不活性X染色体の発現抑制の維持と、不活性X染色体特有のエピゲノムパターンを作り出すのに必要である。

不活性 X 染色体のコンパクトなヘテロクロマチン構造（バー小体）を作るのに必要な SMCHD1-HBIx1 複合体が、不活性 X 染色体の遺伝子発現抑制にどのように関わっているのかを明らかにするため、Smchd1 を欠損するマウス個体に由来する胎児線維芽細胞（MEFs）における不活性 X 染色体由来の遺伝子発現や、不活性 X 染色体上のエピゲノムの状態を、野生型の個体と比較した。Smchd1 欠損マウスを使うことで、ヒトの体細胞を用いた解析では不可能であった、X 染色体不活性化の開始前から Smchd1 を欠損する場合の表現型を、解析することが可能となった。

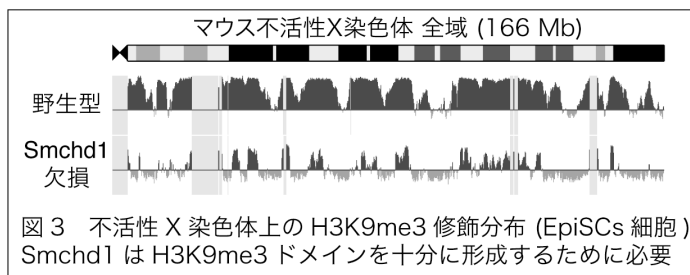
Smchd1 欠損 MEFs における不活性 X 染色体上の遺伝子発現を解析したところ、X 染色体上の約半数の遺伝子が脱抑制していることが明らかになった。これらの遺伝子の特徴を探索したところ、X 染色体不活性化の過程で不活性化されにくい遺伝子が標的となっており、さらにその遺伝子上では、抑制型のヒストン修飾 H3K27me3 が失われていることが明らかになった (Sakakibara et al., 2018 *Development*)。

上記の解析の過程で、X 染色体不活性化を受ける代表的な遺伝子 Atrx の脱抑制が、MEFs を単離した E13.5 より前の発生段階の Smchd1 欠損マウス個体が見られなかったことから、より発生の早い時期のモデル細胞として、Smchd1 欠損マウスからエピプラスト幹細胞（EpiSCs E6.5）を樹立し、MEFs と比較した。その結果、Smchd1 欠損 MEFs で見られた不活性 X 染色体の脱抑制の表現型が、Smchd1 欠損 EpiSCs では非常に弱いこと、将来 MEFs で失われる H3K27me3 修飾が、EpiSCs

不活性Xの発現抑制	E6.5	E13.5	発生
	EpiSCs	MEFs	
野生型	++	++	
Smchd1欠損	+	-	

図2 Smchd1欠損マウスにおけるX染色体不活性化
Smchd1は不活性X染色体の発現抑制の維持に必要な

では起こっていることを見出した (図 2)。このことから、Smchd1 は、発生が進む過程において X 染色体が不活性化された状態を維持するために、必要であることが明らかとなった。驚いたことに、不活性 X 染色体全体が二つの抑制型ヒストン修飾 H3K9me3 と H3K27me3 で全体が覆われるという、不活性 X 染色体に特徴的のエピゲノムパターンは、EpiSCs でも MEFs でも異常をきたしており、Smchd1 欠損下では、H3K9me3 修飾の領域が減退しており、それを埋めるように H3K27me3 修飾の領域が増大することが明らかとなった (図 3)。このことから、Smchd1 は不活性 X 染色体特有の H3K9me3 ドメインの形成に必要であり、このドメインが適切に形成されていることが、将来に渡って X 染色体の不活性化を維持するのに必要であると考えられた (Ichihara et al., 2022 *Development*)



(2) 不活性 X 染色体の転写、エピゲノム解析を可能とするアリル特異的解析法の構築

次世代シーケンサーを用いて、不活性 X 染色体の上で起こる転写やエピゲノムの状態を解析するには、多型を用いて二本の相同染色体を区別するアリル特異的解析が行われる。しかしアリル特異的解析には、エラーが生じやすいことが知られている。その主要な要因が、対象とする細胞の多型情報のエラーであり、未同定の不活性 X 染色体異常の表現型を明らかにするには、その精度を担保することが重要であるとの結論に至った。そこで、全ゲノムシーケンスデータから多型情報を整備した上で、高精度のアリル特異的解析を可能とする次世代シーケンサー解析系を構築した (Sakata, Nagao et al., 2017 *Development*)。この解析系を用いることで、上記の Smchd1 の成果だけでなく、不活性 X 染色体に関する様々な知見を生み出すことが可能となった。

2-1. Xist RNA の機能領域 A-repeat が *in vivo* (個体マウス) における X 染色体不活性化に必要であること、一方不活性化に Xist の A-repeat を必要としない遺伝子も存在すること、X 染色体不活性化の破綻により常染色体上の遺伝子の発現も異常となることが明らかとなった (Sakata, Nagao et al., 2017 *Development*)

2-2. 単一細胞における DNA の複製の様式をアリル特異的に解析にすることによって、不活性 X 染色体の特徴である後期 DNA 複製様式を、単一細胞レベルが明らかとなった (Takahashi et al., 2019 *Nat. Genet.*; Miura et al., 2020 *Nat. Protoc.*)

2-3. マウス個体における胚胎外組織における X 染色体不活性化の状態を解析することで、ポリコム複合体 PRC1 と PRC2 のいずれもが不活性化の維持に必要であることが明らかとなった (Masui et al., 2023 *Nat. Cell Biol.*)

(3) SMCHD1 や HBiX1 を原因遺伝子とする疾患の同定

共同研究により、SMCHD1 が先天性下垂体機能低下症の原因遺伝子の一つであること、LRIF1/HBiX1 が上腕肩甲骨型筋ジストロフィーの原因遺伝子の一つであることを同定した (Kinjo et al., 2020 *Sci. Rep.*; Hamanaka et al., 2020 *Neurology*)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Isobe Shin-Ya, Hiraga Shin-ichiro, Nagao Koji, Sasanuma Hiroyuki, Donaldson Anne D., Obuse Chikashi	4. 巻 36
2. 論文標題 Protein phosphatase 1 acts as a RIF1 effector to suppress DSB resection prior to Shieldin action	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109383 ~ 109383
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.109383	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Asakawa Haruhiko, Kojidani Tomoko, Yang Hui-Ju, Ohtsuki Chizuru, Osakada Hiroko, Matsuda Atsushi, Iwamoto Masaaki, Chikashige Yuji, Nagao Koji, Obuse Chikashi, Hiraoka Yasushi, Haraguchi Tokuko	4. 巻 15
2. 論文標題 Asymmetrical localization of Nup107-160 subcomplex components within the nuclear pore complex in fission yeast	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1008061
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1008061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi Saori, Miura Hisashi, Shibata Takahiro, Nagao Koji, Okumura Katsuzumi, Ogata Masato, Obuse Chikashi, Takebayashi Shin-ichiro, Hiratani Ichiro	4. 巻 51
2. 論文標題 Genome-wide stability of the DNA replication program in single mammalian cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Genetics	6. 最初と最後の頁 529 ~ 540
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41588-019-0347-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sakakibara Yuki, Nagao Koji*, Blewitt Marnie, Sasaki Hiroyuki, Obuse Chikashi, Sado Takashi* (*Corresponding author)	4. 巻 145
2. 論文標題 Role of SmcHD1 in establishment of epigenetic states required for the maintenance of the X-inactivated state in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev166462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.166462	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Terui Riki, Nagao Koji, Kawasoe Yoshitaka, Taki Kanae, Higashi Torahiko L., Tanaka Seiji, Nakagawa Takuro, Obuse Chikashi, Masukata Hisao, Takahashi Tatsuro S.	4. 巻 32
2. 論文標題 Nucleosomes around a mismatched base pair are excluded via an Msh2-dependent reaction with the aid of SNF2 family ATPase Smarcd1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes & Development	6. 最初と最後の頁 806 ~ 821
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/gad.310995.117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakata Yuka*, Nagao Koji*, Hoki Yuko, Sasaki Hiroyuki, Obuse Chikashi, Sado Takashi (*Equal contribution)	4. 巻 144
2. 論文標題 Defects in dosage compensation impact global gene regulation in the mouse trophoblast	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 2784 ~ 2797
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.149138	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Isobe Shin-Ya, Nagao Koji, Nozaki Naohito, Kimura Hiroshi, Obuse Chikashi	4. 巻 20
2. 論文標題 Inhibition of RIF1 by SCA1 Allows BRCA1-Mediated Repair	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 297 ~ 307
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2017.06.056	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hamanaka Kohei, Sikrova Darina, Mitsuhashi Satomi, Masuda Hiroki, Sekiguchi Yukari, Sugiyama Atsuhiko, Shibuya Kazumoto, Lemmers Richard J.L.F., Goossens Remko, Ogawa Megumu, Nagao Koji, Obuse Chikashi, Noguchi Satoru, Hayashi Yukiko K., Kuwabara Satoshi, Balog Judit, Nishino Ichizo, van der Maarel Silvere M.	4. 巻 94
2. 論文標題 Homozygous nonsense variant in LRIF1 associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurology	6. 最初と最後の頁 e2441 ~ e2447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/WNL.00000000000009617	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kinjo Kenichi, Nagasaki Keisuke, Muroya Koji, Suzuki Erina, Ishiwata Keisuke, Nakabayashi Kazuhiko, Hattori Atsushi, Nagao Koji, Nozawa Ryu-Suke, Obuse Chikashi, Miyado Kenji, Ogata Tsutomu, Fukami Maki, Miyado Mami	4. 巻 10
2. 論文標題 Rare variant of the epigenetic regulator SMCHD1 in a patient with pituitary hormone deficiency	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10985
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-67715-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miura Hisashi, Takahashi Saori, Shibata Takahiro, Nagao Koji, Obuse Chikashi, Okumura Katsuzumi, Ogata Masato, Hiratani Ichiro, Takebayashi Shin-ichiro	4. 巻 15
2. 論文標題 Mapping replication timing domains genome wide in single mammalian cells with single-cell DNA replication sequencing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Protocols	6. 最初と最後の頁 4058 ~ 4100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41596-020-0378-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ichihara Saya, Nagao Koji*, Sakaguchi Takehisa, Obuse Chikashi, Sado Takashi* (*Corresponding author)	4. 巻 149
2. 論文標題 SmcHD1 underlies the formation of H3K9me3 blocks on the inactive X chromosome in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev200864
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.200864	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Masui Osamu, Corbel Catherine, Nagao Koji, Endo Takaho A., Kezuka Fuyuko, Diabangouaya Patricia, Nakayama Manabu, Kumon Mami, Koseki Yoko, Obuse Chikashi, Koseki Haruhiko, Heard Edith	4. 巻 25
2. 論文標題 Polycomb repressive complexes 1 and 2 are each essential for maintenance of X inactivation in extra-embryonic lineages	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 134 ~ 144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41556-022-01047-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長尾恒治、榊原祐樹、柴田幸子、野澤竜介、坂口武久、木村宏、佐渡敬、小布施力史
2. 発表標題 Smchd1-Hbix1依存的な不活性化 X染色体の区画化
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長尾恒治
2. 発表標題 Smchd1-Hbix1依存的な不活性化 X染色体の区画化
3. 学会等名 第6回 X染色体研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長尾恒治、榊原祐樹、柴田幸子、野澤竜介、元田裕佳里、坂口武久、木村宏、佐渡敬、小布施力史
2. 発表標題 Smchd1-Hbix1依存的な不活性化 X染色体の区画化
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会（ConBio2017）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長尾恒治
2. 発表標題 Smchd1-Hbix1依存的な不活性化X染色体の区画化
3. 学会等名 第5回 X染色体研究会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------