

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07498

研究課題名(和文) 表現型が雌雄差を示す長鎖ノンコーディング RNA ノックアウトマウスの解析

研究課題名(英文) Analysis of long non-coding RNA knockout mice that shows substantially female-specific phenotype.

研究代表者

小林 慎 (Kobayashi, Shin)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：10397664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類ではタンパク質をコードしない長鎖non-coding RNA (lncRNA)が遺伝子発現調節等の機能を持つことが分かってきたが、個体レベルでの生理機能は不明な点が多い。我々が作製した、Fat60/Ftx lncRNAのノックアウト(KO)マウスはヒト小(無)眼症に似た表現型を示し、このlncRNAが個体発生に機能を持つことを突き止めた。興味深いことに、表現型は雌のみで現れ明確な雌雄差を示す。今回、我々はKOマウスに、雌の個体発生に必須なエピジェネティック制御である「X染色体の不活性化」の異常があることを突き止め、Fat60/Ftx lncRNAの新たな機能を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題では、タンパク質をコードしない非コードRNA(non-coding RNA, ncRNA)であるFat60/Ftx lncRNAのノックアウトマウスが、エピジェネティクス制御である「X染色体の不活性化」の異常を示すことを突き止めた。このKOマウスは、これまで不活性化制御の中心分子と考えられてきたXist lncRNA以外に、初めて見つかった、「X染色体の不活性化」異常を示すlncRNAのKOマウスであり、X染色体不活性化機構をlncRNAの観点から包括的に理解するために、非常に重要な知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：In mammals, long non-coding RNAs (long ncRNAs, lncRNAs) that do not encode proteins are thought to have regulatory functions of gene expression, but their physiological functions in mice remains unclear. In this research, We show that Fat60/Ftx lncRNA KO mice have a phenotype similar to human microphthalmia, indicating this lncRNA has a role in eye development. Interestingly, the phenotype appears only in females, showing a clear sex difference. Here, we found that Fat60/Ftx KO mice showed an abnormality in "X chromosome inactivation," known as an epigenetic regulation essential for female development, and revealed a new function of Fat60/Ftx lncRNA in mice development.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：長鎖ノンコーディングRNA 雌雄差 疾患モデルマウス 小(無)眼症 X連鎖疾患

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の雌では2本あるX染色体のうち1本が不活性化されることにより、雄と雌の間で活性を持つX染色体の本数が揃う機構が存在する。この機構は雌の発生に必須であり、「X染色体の不活性化」と呼ばれるエピジェネティック制御である。その制御の実態はDNAのメチル化等の化学修飾であることが示されているが、X染色体上の全遺伝子の発現スイッチをOFFにする詳細な機構については*Xist*と呼ばれるlncRNAが重要な役割を果たすこと以外不明な点が多い。

我々は、*Xist* 以外に不活性化に働く因子を探し、不活性化が始まるマウス初期胚(胚盤胞)に注目し、雌でのみ発現する遺伝子としてゲノム・インプリントを受けるlncRNA (*Fat60/Ftx*)を発見した。驚くべきことにこのlncRNAは*Xist*同様、不活性化を受けるX染色体自身から発現する。更に、既に報告のあったX染色体上の不活性化制御領域に位置することから、この結果を不活性化機構に働く新たな候補因子として報告した(Kobayashi S, 2013, PLOS ONE)。更に*Fat60/Ftx* lncRNAの生理機能を探る為、ノックアウト(KO)マウスを作製したところ、これまで報告されたX染色体不活性化の変異マウスとは異なり、雌のKOマウスは致死にはならず、雌個体が生まれることを明らかにした(Soma, M, 2015, Sic. Rep.)。一方予想しなかったことに、雌のKOマウスは、ヒト小(無)眼症に似た表現型を示すことが分かった(図1)。更に発生を遡り、胎仔期のKOマウスを詳しく調べると、既に眼球発生において異常があることが判明した(図2)。この異常は雌のみで検出され、雄では観察されないことから、明らかな性差がある。このように*Fat60/Ftx* KOマウスは、これまで報告されたX染色体の不活性化の異常を示すマウスとは全く異なる表現型を示すことが分かった。本研究課題では、雌のKOマウスに特異的に起こる小眼球症の発症メカニズムの解明を、X染色体不活性化に注目し取り組んだ。

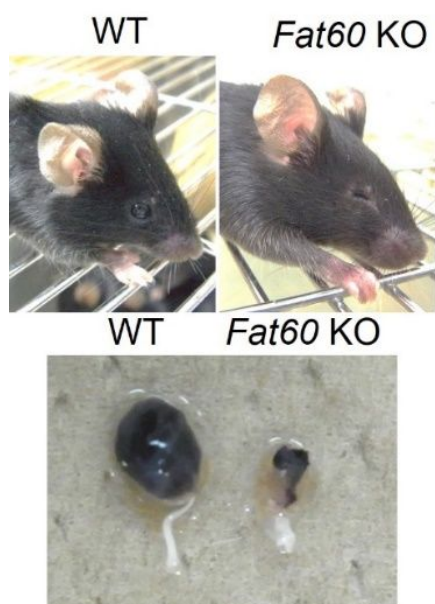


図1、*Fat60* KO マウスにおける
無眼・小眼症の表現型(成体)

(上段)外観の比較(下段)眼を摘出し比較

Fat60 lncRNA KOマウスでは、ヒト小(無)眼球症に似た、表現型を示すことを明らかにした。興味深いことに、この表現型は雌のみで現れる。



2 . 研究の目的

我々が作製した、新規lncRNA *Fat60/Ftx* の KO マウスは目が小さくなる小眼球症に似た表現型を示し、この lncRNA が個体発生に機能を持つことを突き止めた。興味深いことに、表現型は雌のみで現れ明確な雌雄差を示す。なぜ性差を示すのであろうか？。雌雄差を生み出す原因となる、候補としては、「性ホルモン」、「ゲノムインプリント」に加え、「X染色体の不活性化」と呼ばれるエピジェネティックな現象が考えられる。我々は、KO マウスの詳細な遺伝子発現解析から、このマウスの示す雌特異的な異常が、どのような原因で起きるのか、特に X 染色体不活性化機構との関係に注目して、本課題で明らかにすることを目的とした。

3 . 研究の方法

これまで、KO マウスの解析から、小眼球症の表現型は既に、胎児期から現れることを明らかにした。雌の KO マウスに特異的に起こる表現型異常の、メカニズムを解明するため、以下の方法に取り組んだ。

小眼球症の異常が起こる以前の胎児の眼球を用いて、全遺伝子の網羅的発現解析を行い、遺伝子発現異常の全体像を捉える。

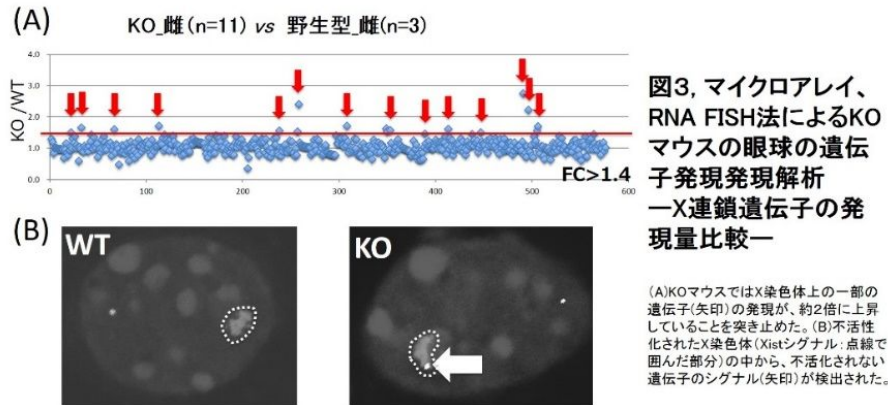
異常を示す遺伝子群の、リアタイム PCR および、RNA-FISH 解析、RFLP 解析などの詳細な発現解析から、X 染色体不活性化の異常の有無を検出する。

4 . 研究成果

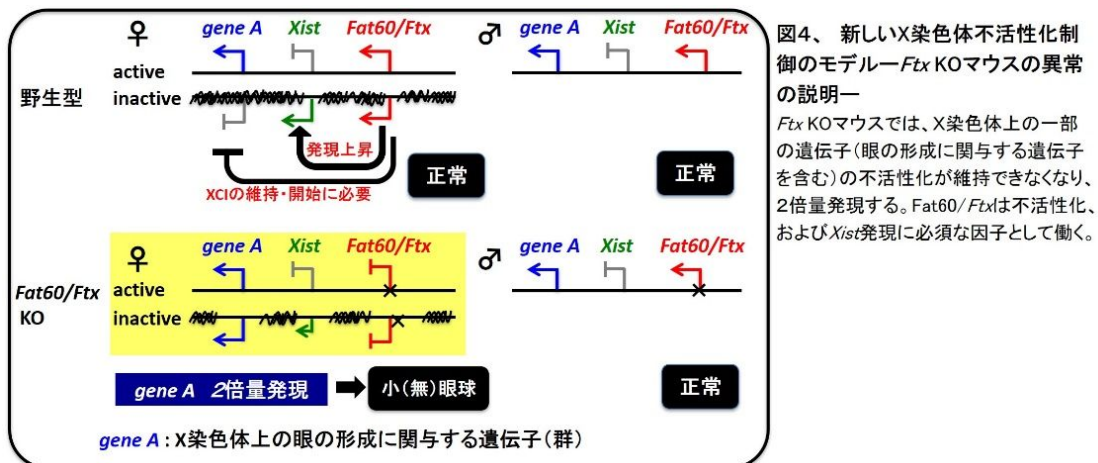
KO マウスの胎児の解析から、KO マウスの眼球の異常には、目がほぼない個体から、野生型と見分けがつかない個体まで、表現型のバラツキがあることを明らかにした。形態的に正常な雌の眼球 (n=11) で遺伝子発現を DNA マイクロアレイで調べたところ、共通して X 染色体上の一部の遺伝子の発現が、KO マウスで野生型マウスに比べ約 2 倍に上昇していることを突き止めた(図 3-A)。更にこれらが X 染色体の不活性化の異常を示すのか調べるために、発現上昇した遺伝子について X 染色体からの転写を直接検出できる RNA-FISH 法を用いて解析した。その結果、本来なら発現するはずのない不活性化された X 染色体(図 3-B、点線部分)自体から遺伝子が漏れ出て発現することが確認できた(図 3(B)矢印)。これらの結果はまぎれも

無く X 染色体の不活性化の異常を示しており、*Fat60/Ftx* lncRNA は X 染色体不活性化に必須であることを明らかにした。

上記のように、我々は *Fat60/Ftx* KO マウスの分子生物学的解析から、*Fat60/Ftx* KO マウスで、X 染色体上の一部遺伝子が不活性化されない異常があることを突き止めた。lncRNA KO マウス表現型が発生で明確な雌雄差を示し、更に lncRNA が X 染色体の不活性化に働くことを明らかにした例は *Xist* KO マウス以外に初めてである。*Fat60/Ftx* KO マウスは X 染色体不活性化制御機構を lncRNA の観点から包括的に理解する為に非常に重要な材料であることを明らかにした。



加えて、KO マウスの DNA マイクロアレイの詳細な解析結果から、*Fat60/Ftx* KO マウスは、なぜ雌でのみ小眼球症を発症するのか？その発症メカニズムモデルを提唱した(図4)。従来の定説では、「X 染色体の不活性化」の異常は、雌は致死となり生まれてこないと考えられてきたが、我々の結果はこの常識を覆し、部分的な「X 染色体の不活性化」の異常は、雌でのみ起こる遺伝性疾患の原因となることを世界で初めて示した。この成果は、「X 染色体の不活性化」のようなエピジェネティクスのメカニズム異常と遺伝性疾患発症との因果関係を明らかにするものであり、今後のヒト遺伝性疾患を対象としたエピジェネティクス解析の重要性、発展性を示す結果である。上記の結果は、*Hosoi et al. Nature Commn.*, 2018 として発表した。



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 7件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Hosoi Y, Soma M, Shiura H, Sado T, Hasuwa H, Abe K, Kohda T, Ishino F, Kobayashi S	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Female mice lacking Ftx lncRNA exhibit impaired X-chromosome inactivation and a microphthalmia-like phenotype.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 4618
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-018-06327-6.	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 Kobayashi S	4. 巻 1861
2. 論文標題 Live Imaging of X-Chromosome Inactivation and Reactivation Kinetics.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 73-89
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-4939-8766-5_7.	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 Takahashi S, Kobayashi S, Hiratani I.	4. 巻 75(7)
2. 論文標題 Epigenetic differences between naive and primed pluripotent stem cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Mol Life Sci.	6. 最初と最後の頁 :1191-1203
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00018-017-2703-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 該当する
1. 著者名 Kobayashi S.	4. 巻 59(6)
2. 論文標題 Live imaging of X chromosome inactivation and reactivation dynamics.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Dev Growth Differ.	6. 最初と最後の頁 493-500
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12365.	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

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kobayashi S
2. 発表標題 Impaired X-inactivation caused by lack of Ftx lncRNA exhibits non-Mendelian inheritance of microphthalmia phenotype in mice.
3. 学会等名 EMBL epigenetics & chromatin, Heidelberg, 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林 慎
2. 発表標題 「細胞の脱分化・リプログラミングを1細胞レベルで可視化」
3. 学会等名 Bio Japan 2020
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林 慎
2. 発表標題 Impaired X-inactivation caused by targeted deletion of Ftx lncRNA exhibits non-Mendelian inheritance of microphthalmia phenotype in mice.
3. 学会等名 第13回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke Hosoi ¹ , Miki Soma ¹ , Hirosuke Shiura ¹ , Takashi Sado ⁴ , Hidetoshi Hasuwa ⁵ , Kuniya Abe ³ , Takashi Kohda ¹ , Fumitoshi Ishino ¹ , Shin Kobayashi ^{1,2}
2. 発表標題 The Ftx lncRNA is required for normal eye development and random X chromosome inactivation in mice.
3. 学会等名 JAJ RNA 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林慎
2. 発表標題 表現型が性差を示すFat60 long non-coding RNA KOマウスの解析
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 小林 慎 (1,2)、細井勇輔 (2)、志浦 寛相(2)、山縣 一夫 (3)、高橋 沙央里 (2)、藤原祥高(3)、岡部勝(3)、石野史敏(2)、五島直樹 (1)
2. 発表標題 X染色体再活性化ライプイメージングシステムを用いた幹細胞研究
3. 学会等名 第17回産総研・産技連LS-BT合同発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林慎
2. 発表標題 X染色体再活性化のライプイメージングを可能にする“momijiマウス”の開発と応用
3. 学会等名 第5回 X染色体研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小林 慎 1, 細井 勇輔 1, 志浦 寛相 1, 山縣 一夫 2, 高橋 沙央里 1, 藤原 祥高 2, 幸田 尚 1, 岡部 勝 2, 石野 史敏 1
2. 発表標題 発生におけるX染色体の不活性化および再活性化ダイナミクスのライプイメージング
3. 学会等名 第11回日本エピジェネティクス研究会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

産業技術総合研究所・細胞分子工学研究部門 動的創薬モダリティ研究グループ web page
<https://unit.aist.go.jp/cmb5/group/8-9Group.html>

小林慎 研究紹介
<http://staff.aist.go.jp/kobayashi.shin/>

論文産総研プレスリリース
「性差を示す疾患の原因究明に新しい手がかり」
https://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2018/pr20180926/pr20180926.html

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
研究分担者	幸田 尚 (Kohda Takashi) (60211893)	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授 (12602)	
研究分担者	石野 史敏 (Ishino Fimitoshi) (60159754)	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授 (12602)	

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
---------	---------