

令和 3 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06030

研究課題名(和文) 霊長類におけるX染色体不活性化機構の解明

研究課題名(英文) Study of X chromosome inactivation in the monkey embryos

研究代表者

岡本 郁弘(okamoto, ikuhiro)

京都大学・高等研究院・特定講師

研究者番号：40648424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：霊長類のX染色体不活性化(X Chromosome Inactivation: XCI)に關与するXIST RNAの機能を明らかにするために、カニクイザル雌胚より新規樹立した線維芽細胞株を用いて、XIST遺伝子の両アリルに変異を持つホモ変異株を作製し、XCIへの影響を解析した。その結果、XIST RNAはXCIが完了した不活性X染色体にヘテロクロマチン特異的ヒストン修飾の誘導に必要であるが、X連鎖遺伝子の発現抑制維持に線維芽細胞では必要ではないことを証明した。これらの結果から、ゲノム編集により作製したノックアウト細胞株を用いて、さらに霊長類のXCIメカニズムを解明できることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類の雌(XX)は発生初期に、2本のX染色体の1本上の遺伝子発現を協調的に不活性化(X Chromosome Inactivation: XCI)する。XCIはタンパク質に翻訳されないXIST RNAにより制御される。本研究成果は学術的にはヒトを含む霊長類のXCIにおけるXIST RNAの機能の一端を明らかにしたことに意義がある。社会的には女性特有のX連鎖遺伝病解明につながることに意義がある。

研究成果の概要(英文)：X chromosome inactivation (XCI) is induced by non-coding XIST RNA in female mammal cells. How the human XIST RNA controls XCI is less well characterized. Here, we use genome engineering to delete the XIST segments, including repeat, the promotes and non-repetitive exons in the cynomolgus monkey fibroblast cell line. Clones containing promoter deletion that display no XIST RNAs and no H3K27me3 enrichment on the inactive X chromosome(Xi). However we did not observe up-regulation of X-linked genes. Collectively, these data are consistent with the report that XIST is not required to maintain X-linked gene silencing at the Xi. With our results, we may facilitate elucidation of XCI mechanisms in non-human primate in general.

研究分野：エビジェネティック

キーワード：カニクイザル X染色体の不活性化 ゲノム編集 ノックアウト細胞

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の雌 (XX) は発生初期に、雌雄間の X 染色体遺伝子量を補正する為に、2本の X 染色体の 1 本上の遺伝子発現を協調的に不活性化する。この X 染色体の不活性化 (X Chromosome Inactivation : XCI) はシスに作用するノンコーディング RNA である XIST により制御される。

マウスでは、Xist の発現は 2 細胞期より父親アリルから開始し、4 細胞期以降、X 連鎖遺伝子の発現抑制が開始する。初期胚盤胞では全ての細胞で父親由来の X 染色体が不活性化される。この選択的不活性化は将来、胎盤などを形成する胚体外組織では維持されるが、後期胚盤胞の将来、内部細胞塊 (Inner Cell Mass : ICM) の胚体を形成する未分化細胞で Xist の発現が抑制され、X 連鎖遺伝子が再活性化される。着床後、エピブラストでランダムに片方の X 染色体より Xist の発現が上昇し XCI が誘導される。

ヒトでは、XIST の発現は 4-8 細胞期以降、両 X 染色体から開始し、胚盤胞期胚では XIST RNA は両 X 染色体を覆っているが、X 連鎖遺伝子の発現抑制は開始しない。近年、ヒト胚盤胞期胚では両 X 染色体において X 連鎖遺伝子発現量が半減していると報告され、マウスとは異なる機構により X 連鎖遺伝子量補正が行われているのではないかと議論になっている。これらの事から申請者はヒトを含む霊長類では、着床前と着床後において XCI は異なる機構により制御されているのではないかと問いを立てるに至った。

ヒト胚における XCI 開始研究は生殖医療の発展により着床前胚の解析は可能となったが、着床後初期胚の解析は不可能である。また、これまで多数の hES/hiPS 細胞株が樹立されてきたが、ほぼ全ての細胞株で既に XCI は完了しているため、現段階では培養条件下でヒト XCI 現象を再現出来ない。このような事から、ヒトの XCI 開始研究は困難である。そこで、本研究ではモデル動物であるカニクイザルを用いて霊長類の XCI における XIST RNA の機能を解明する。

2. 研究の目的

カニクイザル着床前胚においても XIST はヒト胚と同様に両 X 染色体から発現し、XIST RNA は両 X 染色体を覆っているが、X 連鎖遺伝子の発現は抑制していない。そこで、CRISPR/Cas9 システムを用いて、ゲノム編集により XIST RNA が両アリルから発現しない受精卵を作成し、着床前胚発生過程における XIST RNA の機能を解析する。さらに、霊長類における XCI は着床後に開始すると考えられるので、XIST ノックアウト早期着床胚における XCI を解析する。このようにして得られた結果を総合的に判断して、霊長類の XCI が開始する初期過程を解明する。

3. 研究の方法

XIST RNA の機能解明

XIST 遺伝子の 2 カ所に対し gRNA を設計し、Cas9 ヌクレアーゼにより切断することで、XIST 遺伝子の転写開始点領域をホモに欠損させ、XIST RNA が両アリルから発現し

ないカニクイザル着床前胚の作製を行う予定だったが、本研究期間内に受精卵の入手が困難となり、作製出来なかった。そこで、受精後35日目の雌着床後胚から繊維芽細胞株を新規に樹立し、*XIST* ノックアウト細胞株を複数株作製した。それらを用いて、*XIST* RNA の機能を解析した。これら細胞株についてさらに詳細に研究を行う予定である。

4. 研究成果

(1) カニクイザル *XIST* 遺伝子の構造解析

カニクイザル *XIST* 遺伝子の機能解析に必要な正確な配列情報を取得するために、実際に実験で使用している野生由来の個体群(ベトナム産、フィリピン産)に由来するゲノムDNAを用いて、ヒトの *XIST* 遺伝子の全配列情報を元にBLASTにかけ、正確なエクソン、イントロン構造及び全配列情報を明らかにした。その結果、ヒト(エクソンが6つ)と異なり、エクソンが7つ(5番目が新規エクソン)有ることが明らかとなった。(UCSC等のGenome Browser上の情報も2020年に同様に更新された。)

(2) カニクイザル正常繊維芽細胞株の樹立

正常な核型を安定して保持する購入可能なカニクイザル由来細胞株がないため、受精後35日目の雌着床後胚から繊維芽細胞を単離し、単一細胞を2% O₂, 5%CO₂の低酸素条件下で培養することにより、遺伝子操作を加えることなく安定して長期間培養可能な不死化細胞株を樹立した。これらの細胞株を用いて *XIST* ノックアウト細胞株を作製した。

(3) カニクイザル *XIST* 遺伝子ノックアウト細胞株の作製

成果(1)で得られた配列情報をと成果(2)で樹立した細胞株を利用して *XIST* 遺伝子における繰り返し配列A(遺伝子発現抑制に関与)、B+C(ポリコーム複合体のリクルートに関与)、新規エクソン5及びプロモーターをゲノム編集により欠失させ、両アリルに欠失を持つホモ変異株を作製した。今後、これらの細胞株を詳細に解析を進める予定である。

(4) カニクイザル *XIST* RNA の XCI 維持における機能

XIST RNA により不活性化を誘導されたX染色体はその後、細胞分裂を経ても安定に不活性化状態が維持される。XCI維持過程における *XIST* RNA の機能を解明するために成果(3)で作製したプロモーター領域欠失株におけるXCIを解析した。その結果、不活性X染色上から *XIST* RNA の消失とヘテロクロマチン特異的ヒストン修飾であるH3K27me3の消失を確認したが、両アリルからX連鎖遺伝子の発現およびBar bodyの消失は認められなかった。これらの結果からXCI維持過程において *XIST* RNA は不活性X染色体にヘテロクロマチン特異的ヒストン修飾の誘導に必要であるが、X連鎖遺伝子の発現抑制および凝縮の維持に必要ではないというヒトにおける先行研究報告と一致した。しかし、X連鎖遺伝子の発現はRNA FISHにより少数遺伝子しか解析していないので、今後、RNA-seqにより網羅的に解析を進める予定である。さらに *XIST* ノックアウト繊維芽細胞株作製用に設計したgRNAを用いてノックアウト胚を作製し、XCI開始における *XIST* RNA の機能を解析する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sasaki Kotaro, Oguchi Akiko, Cheng Keren, Murakawa Yasuhiro, Okamoto Ikuhiro, Ohta Hiroshi, Yabuta Yukihiro, Iwatani Chizuru, Tsuchiya Hideaki, Yamamoto Takuya, Seita Yasunari, Saitou Mitinori	4. 巻 35
2. 論文標題 The embryonic ontogeny of the gonadal somatic cells in mice and monkeys	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109075 ~ 109075
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.109075	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 Kojima Yoji, Yamashiro Chika, Murase Yusuke, Yabuta Yukihiro, Okamoto Ikuhiro, Iwatani Chizuru, Tsuchiya Hideaki, Nakaya Masataka, Tsukiyama Tomoyuki, Nakamura Tomonori, Yamamoto Takuya, Saitou Mitinori	4. 巻 4
2. 論文標題 GATA transcription factors, SOX17 and TFAP2C, drive the human germ-cell specification program	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202000974
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lsa.202000974	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 Io Shingo, Kabata Mio, Iemura Yoshiki, Semi Katsunori, Morone Nobuhiro, Minagawa Atsutaka, Wang Bo, Okamoto Ikuhiro, Nakamura Tomonori, Kojima Yoji, Iwatani Chizuru, Tsuchiya Hideaki, Kaswandy Belinda, Kondoh Eiji, Kaneko Shin, Woltjen Knut, Saitou Mitinori, Yamamoto Takuya, Mandai Masaki, Takashima Yasuhiro	4. 巻 in press
2. 論文標題 Capturing human trophoblast development with naive pluripotent stem cells in vitro	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stem.2021.03.013	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 Matsumoto S, Porter CJ, Ogasawara N, Iwatani C, Tsuchiya H, Seita Y, Chang YW, Okamoto I, Saitou M, Ema M, Perkins TJ, Stanford WL, Tanaka S.	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Establishment of macaque trophoblast stem cell lines derived from cynomolgus monkey blastocysts.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 6827
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-63602-7.	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 Sakai Y, Nakamura T, Okamoto I, Gyobu-Motani S, Ohta H, Yabuta Y, Tsukiyama T, Iwatani C, Tsuchiya H, Ema M, Morizane A, Takahashi J, Yamamoto T, Saitou M.	4. 巻 102(3)
2. 論文標題 Induction of the germ cell fate from pluripotent stem cells in cynomolgus monkeys.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biol Reprod	6. 最初と最後の頁 620-638
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioz205.	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 30.Yamashiro C, Sasaki K, Yabuta Y, Kojima Y, Nakamura T, Okamoto I, Yokobayashi S, Murase Y, Ishikura Y, Shirane K, Sasaki H, Yamamoto T, Saitou M.	4. 巻 362(6412)
2. 論文標題 Generation of human oogonia from induced pluripotent stem cells in vitro.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 356-360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.aat1674. Epub 2018 Sep 20.	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 Mutzel V, Okamoto I, Dunkel I, Saitou M, Giorgetti L, Heard E, Schulz EG.	4. 巻 26(5)
2. 論文標題 A symmetric toggle switch explains the onset of random X inactivation in different mammals.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat Struct Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 350-360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41594-019-0214-1.	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 Okamoto I.	4. 巻 1861
2. 論文標題 Combined Immunofluorescence, RNA FISH, and DNA FISH in Preimplantation Mouse Embryos.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 149-159
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_12.	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ikuhiro Okamoto
2. 発表標題 Developmental dynamics of X-chromosome inactivation in the crab-eating macaque embryos
3. 学会等名 Edith HEARD 17 years of e(Xist)ing at Curie (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ikuhiro Okamoto
2. 発表標題 Developmental dynamics of X-chromosome inactivation in the crab-eating macaque embryos
3. 学会等名 六甲医学研究会
4. 発表年 2019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
---------	---------