

機関番号：17102

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20370004

研究課題名 (和文) 哺乳類における不活性クロマチン形成機序

研究課題名 (英文) Establishment of silent chromatin in mammals

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

研究成果の概要 (和文)：

哺乳類のメスに特有な X 染色体不活性化は、2本の X 染色体の一方において *Xist* 遺伝子の発現が亢進し、転写産物であるノンコーディング RNA がその X 染色体をシスに覆うことによって開始される。ジーンターゲットングによって *Xist* が X 染色体不活性化の開始に必須であることが示されているが、*Xist* RNA がどのように染色体のサイレンシングを引き起こすかについてはよくわかっていない。我々が以前ジーンターゲットングによって作製した *Xist* の改変アレルの一つである *Xist<sup>VS</sup>* は、これまでに知られる改変アレルと異なり、部分的なサイレンシング能を保持していることがわかった。胚体外組織、胚体組織ともに *Xist<sup>VS</sup>* から発現された変異 *Xist* RNA はその X 染色体をシスに覆い、不活性化プロセスを開始するものの、その結果構築される X 染色体の不活性化状態は不完全なものと考えられた。この不活性化状態は不安定で、胚体外組織の一部の細胞や胚体組織の細胞においては、変異 X 染色体が最終的に再活性化してしまうことが示唆された。*Xist<sup>VS</sup>* はこれまでに例のない部分的機能欠損アレルであり、今後 *Xist* RNA の被覆以降 X 染色体のクロマチン修飾がどのように確立されていくか調べるためのツールとして非常に有用と思われる。本研究の成果は *Development* 誌に受理された。

研究成果の概要 (英文)：

X chromosome inactivation (X-inactivation) in female mammals is triggered by differential upregulation of the *Xist* gene on one of the two X chromosomes and subsequent coating of the X in cis with its noncoding transcripts. Although targeted mutation clearly showed that *Xist* is essential for X-inactivation to occur in cis, the molecular mechanism by which *Xist* RNA induces chromosome silencing is largely unknown. Here, we demonstrate that an *Xist* mutant generated previously by gene targeting, *Xist<sup>VS</sup>*, is unique in that it retains a partial function to silence the X chromosome. Although *Xist<sup>VS</sup>* is differentially upregulated and its mutated transcript coats the X chromosome in cis in embryonic and extraembryonic tissues, X-inactivation thus initiated does not seem to be fully established. The state of such incomplete inactivation is probably unstable and the mutated X apparently ends up reactivated in a subset of extraembryonic tissues and, perhaps, early epiblastic cells. *Xist<sup>VS</sup>*, which can be referred to as a partial loss of function mutation, would provide an opportunity to dissect the molecular mechanism of *Xist* RNA-mediated chromosome silencing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2009年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			

総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000
----	------------	-----------	------------

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学，遺伝・ゲノム動態

キーワード：遺伝学，ゲノム，発生・分化

### 1. 研究開始当初の背景

ほ乳類のメスで正常発生に必須なエピジェネティック制御のひとつとして知られる X 染色体不活性化 (XCI) は，胎盤などの胚体外組織では父性 X に限定される (インプリント型 XCI) のに対し，胎仔を作る胚体組織では由来にかかわらずランダム (ランダム型 XCI) なものとなる．これらどちらの XCI においても，X 染色体連鎖 *Xist* 遺伝子の転写産物である機能性 non-coding RNA (*Xist* RNA) が自身を発現する X 染色体全域をシスに覆うことによって不活性化を引き起こす (図 1 上段)．*Xist* はその機能阻害実験から不活性化の開始に必須であることが示されているが，多段階の過程を経て達成される染色体ワイドの不活性化機構はほとんどわかっていなかった．

私たちは *Xist* 遺伝子座にさまざまな改変を導入したマウスを作製し，その影響について解析していたが，研究開始当初までにそれらの 1 つが *Xist* の作用機序解明の突破口になると期待できる部分的機能欠損アリルであることが示唆されていた．*Xist* の作用機序の解明がなかなか進まない原因の 1 つに，それまで国外のグループおよび我々自身が作製してきた *Xist* 改変アリルが，いずれもその改変 X 染色体の不活性化能を損ねる完全機能欠損アリルであったことがあげられる (図 1 中段)．一方，当時我々が着目した新たな部分的機能欠損アリル (*Xist*<sup>IVS</sup>) を持つ X 染色体は，XCI の開始自体には目立った異常を示さないものの，最終的に構築される不活性クロマチンの状態に何らかの異常があると考えられた (図 1 下段)．

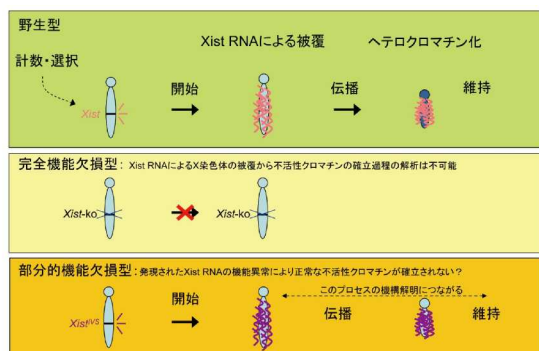


図 1

### 2. 研究の目的

本申請研究では，我々が作製したこれまでに類のない部分的機能欠損 *Xist* アリル (*Xist*<sup>IVS</sup>) をもつメスマウス胚における XCI の異常をさまざまな角度から解析することによって，*Xist* RNA の作用機序とそれが構築する不活性クロマチンの形成機構の理解を目指した．

### 3. 研究の方法

① *Xist*<sup>IVS</sup> を父親から受け継いだメス胚 (+/*Xist*<sup>IVS</sup>)，およびホモ接合体の表現型について外見的特徴を観察するとともに，組織標本も作製し詳細に解析する．

② +/*Xist*<sup>IVS</sup> 胚の胚体外組織における XCI の様子を細胞遺伝学的，細胞生物学的，および分子生物学的な解析により調べる．

③ +/*Xist*<sup>IVS</sup> の胚盤胞より TS 細胞を樹立し，*Xist*<sup>IVS</sup> によって引き起こされる XCI がどのような影響を受けているか，細胞遺伝学的，細胞生物学的，および分子生物学的な解析により調べる．さらに，マイクロアレイにより，X 染色体ワイドの遺伝子発現レベルについて調べる

④ *Xist*<sup>IVS</sup> が胚体組織における XCI にどのような影響をおよぼすか，組織学的解析，免疫染色，分子生物学的解析を行い評価する．

### 4. 研究成果

#### ① *Xist*<sup>IVS</sup> を受け継いだ胚の表現型

*Xist*<sup>IVS</sup> を父親から受け継いだヘテロ接合体 (+/*Xist*<sup>IVS</sup>) のメス胚は，妊娠中期の胎生 12.5-13.5 日程度で致死となる．一方，母由来に *Xist*<sup>IVS</sup> を受け継いだヘテロ接合体 (*Xist*<sup>IVS/+</sup>) のメスは正常に生まれ，子どもも作る．しかし，*Xist*<sup>IVS/+</sup> の個体では，もっぱら野生型 X 染色体が不活性化していた．このことから，+/*Xist*<sup>IVS</sup> 胚が致死となるのは胚体外組織におけるインプリント型 XCI の異常と考えられた．ところが，着床後間もない E7.5 日の +/*Xist*<sup>IVS</sup> 胚を見ると，同腹の野生型のオスと区別がつかないことから，この時期の +/*Xist*<sup>IVS</sup> 胚の胚体外組織では *Xist* の完全機能欠損アリルを父親から受け継いだ場合と異なり，かなり正常に近いレベルの XCI が起きていると予想された．以上のことから，*Xist*<sup>IVS</sup> によって引き起こされる胚体外組織のインプリント型 XCI は，1) 不完全であるものの，着床後間もない胚の発生を損なうほ

どのものではない。しかし、妊娠中期の胚体外組織の発生を支えるには不十分である、という可能性、もしくは 2) 着床後間もない時期はほぼ完全であるが、その状態の維持が困難で、時間経過とともに再活性化が進行し、最終的に妊娠中期を超えて発生を進めることはできない、という可能性が考えられた。

## ② *Xist<sup>IVS</sup>* によって引き起こされる XCI は不完全である

+/*Xist<sup>IVS</sup>* の胚体外組織における XCI の程度を知るために、減数分裂期の組換えを利用し *Xist<sup>IVS</sup>* と *lacZ* を連鎖させた X 染色体 (*X<sup>IVS:lacZ</sup>*) を作製した。これを父由来に持つ E7.5 日胚の胚体外組織における *lacZ* の抑制の程度を調べることで、XCI の程度を評価した。*lacZ* のみを持つ野生型 X (*X<sup>lacZ</sup>*) 父親から受け継いだ場合は、胚体外組織における *lacZ* の発現は予想通り抑えられていたのに対し、*X<sup>IVS:lacZ</sup>* を受け継いだ場合は、*lacZ* の発現が顕著であった。これは、胚体外組織におけるインプリント型 XCI が正常には起こっていないことを示していた。さらに内在性遺伝子についても制限酵素認識部位の多型をもつ F1 ハイブリッドを利用し調べた結果、いくつかの遺伝子で通常検出されない父性 X からの発現が認められた。これらの解析により、*Xist<sup>IVS</sup>* によって引き起こされる XCI は不完全であることが強く示唆された。

## ③ 分化後の TS 細胞では *Xist<sup>IVS</sup>* により引き起こされた XCI が安定には維持されない

胚体外組織において *Xist<sup>IVS</sup>* アリルが引き起こす X 染色体不活性化の異常について、分子生物学的、および細胞生物学的に解析するため、胚体外組織系列の培養細胞株である TS 細胞の樹立を試みた。試行錯誤の末、野生型のオスと *Xist<sup>IVS</sup>* /Y のオスを野生型のメスとそれぞれ交配して得られた胚盤胞から、最終的にメスの TS 細胞を野生型 1 株、+/*Xist<sup>IVS</sup>* を 4 株、オスの TS 細胞を 3 株樹立することができた。まず、これらの細胞を用いて染色体の複製タイミングを調べた結果、メスの TS 細胞では野生型、+/*Xist<sup>IVS</sup>* を問わず、いずれも細胞遺伝学的に確認できる不活性 X 染色体をもっていることが分かった。また、*Xist* RNA の発現の様子を RNA-FISH によって調べたところ、野生型と+/*Xist<sup>IVS</sup>* の間に顕著な違いは認められなかった。さらに、不活性 X 染色体の特徴であるヒストン H3K27me3 についても両者の間に差異は認められなかった。ところが、TS 細胞を分化させると、野生型では *Xist* RNA の発現、H3K27me3 の局在について分化前と大きな変化はなかったのに対し、+/*Xist<sup>IVS</sup>* では、*Xist* RNA、H3K27me3 とともに陽性の核の数が顕著に減

少することが分かった。これらの結果は、分化した TS 細胞では *Xist<sup>IVS</sup>* からの変異型 *Xist* RNA によって引き起こされた XCI を維持できず再活性化されたことを示唆している。

最後に分化誘導前の TS 細胞では、*X<sup>IVS</sup>* は野生型の X と同等に不活性化されているのか、あるいはそもそも不完全であるのか調べるため、分化前後の TS 細胞を用いた発現アレイ解析を行った。その結果、*Xist<sup>IVS</sup>* アリルによって引き起こされる XCI は分化誘導前の TS 細胞においても不完全であることがわかったが、それでも野生型の不活性 X にかなり近い状態であった。一方、分化誘導後の変異 TS 細胞では、分化前には野生型同様に抑えられていた遺伝子の発現が増大していたことから、再活性化が起こっていることが強く示唆された。

## ④ *Xist<sup>IVS</sup>* は胚体組織においても XCI の異常を招く

次に *Xist<sup>IVS</sup>* は胚体組織においてもある程度の XCI を引き起こすことができるか調べた。ヘテロ接合体を用いると胚体組織では野生型 X がもつばら不活性化される可能性があったので、ホモ接合体を用い、どちらの X 染色体が不活性化される X として選択されても、*Xist<sup>IVS</sup>* の効果を調べられるようにした。着床後間もない胚の組織学的解析からは、胚体組織の起源であるエピブラスの細胞が著しく減少していることがわかった。すなわち、胚体組織は胚体外組織よりも不活性化の異常が重篤に思われた。しかし、RNA-FISH を行うとそれらの細胞でも *Xist* の二者択一的な発現が認められ、X 染色体不活性化自体は開始していることが強く示唆された。この結果は、*Xist<sup>IVS</sup>* ホモ接合体の ES 細胞で分化誘導後、X 染色体不活性化が開始されることから支持された。しかし、胚体組織の一部の細胞では、胚体外組織と同様不活性 X 染色体のマーカーである *Xist* RNA や H3K27me3 が消失しており、再活性化が起きていることが示唆された。

## ⑤ まとめ

これらのことから、部分的機能欠損変異アリルは胚体組織、胚体外組織どちらにおいても不活性化を引き起こす能力を持つが、その不活性化状態はおそらく不完全で、その状態に対する寛容性が胚体組織と胚体外組織で異なることが重篤さの違いに現れていると考えられた。本研究から、*Xist<sup>IVS</sup>* が招く X 染色体不活性化の異常は、この変異アリルから発現される *Xist* RNA の機能が不十分であることによって引き起こされることが強く示唆された。この変異型 RNA は

今後 *Xist* RNA の作用機序を解き明かしていくためのプラットフォームとして有用と考えられる。本研究の成果は *Development* 誌に受理された。

#### 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4件)

①Hoki, Y., Ikeda, R., Mise, N., Sakata, Y., Ohhata, T., Sasaki, H., Abe, K., and Sado, T., Incomplete X-inactivation initiated by a hypomorphic *Xist* allele in the mouse., *Development*, 査読あり, 印刷中.

②Watanabe, T., Tomizawa, S., Mitsuya, K., Totoki, Y., Yamamoto, Y., Kuramochi-Miyagawa, S., Iida, N., Hoki, Y., Murphy, P.J., Toyoda, A., Gotoh, K., Hiura, H., Arima, T., Fujiyama, A., Sado, T., Shibata, T., Nakano, T., Lin, H., Ichianagi, K., Soloway, P.D. and Sasaki, H., Role for piRNAs and non-coding RNA in de novo DNA methylation of the imprinted mouse *Rasgrf1* locus., *Science*, 査読あり, Vol. 332, 2011, 848-852.

③Watanabe, 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., *Developmental Cell*, 査読あり, vol. 20, 2011, 364-375.

④Inoue, 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*, 査読あり, Vol. 330, 2010, 496-499.

[学会発表] (計8件)

①Sado, T. (2010, 5/10-12), A Partial Loss of Function Mutation in the Mechanism of X Chromosome Inactivation. The 19th CDB Meeting, 兵庫.

②尼川裕子, 保木裕子, 佐々木裕之, 深川竜郎, 佐渡敬 (2010, 5/28-29) 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,

米子.

③酒田祐佳, 尼川裕子, 保木裕子, 佐々木裕之, 佐渡敬 (2010, 5/28-29)

*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, 米子.

④佐渡敬, 保木裕子, 池田理恵子, 三瀬名丹, 大畑樹也, 佐々木裕之, 阿部訓也 (2010, 7/27-29)

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, 東京.

⑤佐渡敬 (2010, 9/20-23)

*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, 札幌.

⑥酒田祐佳, 尼川裕子, 保木裕子, 佐々木裕之, 佐渡敬 (2010, 9/20-23)

*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, 札幌.

⑦佐渡敬 (2010, 12/7-10)

*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, 神戸.

⑧酒田祐佳, 尼川裕子, 保木裕子, 佐々木裕之, 佐渡敬 (2010, 12/7-10)

*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, 神戸.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者 ( )

研究者番号：

(2)研究分担者 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：