

平成22年 4月23日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20700366
 研究課題名 (和文) 不活化 X 染色体を導入した哺乳動物におけるゲノム再プログラム化機構の解明
 研究課題名 (英文) Analysis of genomic reprogramming in mammals by utilizing inactive X chromosome.
 研究代表者
 中西 友子 (NAKANISHI TOMOKO)
 鳥取大学・医学部・助教
 研究者番号：10344863

研究成果の概要 (和文)：哺乳類の雌において、性染色体である X 染色体はゲノム再プログラム化に伴いクロマチン構造が大きく変化する。この X 染色体の変化を追跡するために、不活性化 X 染色体に豊富に存在することが知られる MacroH2A に蛍光タンパク質 GFP を融合させた発現コンストラクトを作製した。その結果、培養細胞やマウス初期胚において X 染色体のクロマチン状態の変化を蛍光で追跡可能なシステムを構築できたことから、このシステムは生殖系列細胞や未受精卵における再プログラム化過程の解析に役立つと考えられる。

研究成果の概要 (英文)：One of the sex chromosome, X chromosome, changes its chromatin structure during genomic reprogramming in mammalian females. We produced a construct that intensely labels inactive X chromosome by expressing GFP protein fused with MacroH2A that localizes abundantly on inactive X chromosome. It was able to trace the chromatin structure of X chromosome in culture cells and mouse early embryos by utilizing the construct. Our system would enable us to examine the process of genomic reprogramming in germ-line cells and oocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：発生工学・分子生物学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：GFP、X 染色体、不活性、再プログラム化、MacroH2A、エピゲノム変化、クロマチン構造、未受精卵

1. 研究開始当初の背景

生殖細胞は、次世代に遺伝情報を伝達する

役割をもつ。哺乳動物の場合、一部の細胞を除きすべての細胞の遺伝情報は等価であるため、生殖細胞が再び全能性を獲得するために

は、ゲノムの一次配列を超えた高次の制御、エピジェネティックな変化を必要とする。エピジェネティックな変化を受けるゲノム領域としてはインプリント遺伝子が数多く知られているが、最も分かりやすい変化が見られるのは X 染色体である。雌の生殖細胞では、雌雄の遺伝子量補正のために染色体のほぼ全長にわたって受けている不活化が全て解除される。解除された不活化は初期胚発生で再び形成されるが、その際には Xist RNA が X 染色体に結合、ポリコーン遺伝子複合体の誘導によるヒストン H3K9 および H3K27 のメチル化が広がり、その後 DNA のメチル化を経てヘテロクロマチン化が誘導される。このようなことから、X 染色体は再プログラム化過程やエピジェネティクス修飾に至る詳細な機構を解析するのに非常に適している。

申請者は性染色体と性決定の関心に興味を持ち、性染色体に GFP 発現ユニットを導入することで、マウス胚の性別を着床前に 100% 正確に判別できる系を開発してきた (Nakanishi et al. Genomics 2002; Isotani et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2005)。このマウスを用いれば、X 染色体上の GFP 遺伝子の発現を指標に、X 染色体の不活化を追跡することも可能であった (Gao et al. J. Invest. Dermatol. 2002)。

本研究では、この手法を発展させた形で、GFP を利用した不活化 X 染色体の選別にチャレンジし、再プログラム化能を持つ未受精卵への注入と組み合わせることで、不活化 X 染色体の再プログラム化機構や確立機構の解明を目標に研究を進めた。

2. 研究の目的

全能性を消失した体細胞の核を脱核した未受精卵に移植すると、体細胞核由来の個体を形成できる事実は、未受精卵の細胞質中にゲノムの全能性の再確立に関わる再プログラム化因子が存在することを示唆している。しかしクローン動物作製の成功率は数%と低く、体細胞核の再プログラム化は完全ではない。そこで本研究では、以下のことを目標に研究を行った。

(1) 不活化した X 染色体を未受精卵に導入したのちに追跡することで、不活化の解除 (再プログラム化) や確立をモニターできる系を作製する。

(2) そのシステムを利用して、未受精卵は再プログラム化能をどの程度保持しているのか? 未受精卵における再プログラム化因子

は卵形成のどの時期に形成されるのか? ということを明らかにする。

未受精卵におけるゲノム再プログラム化機構を X 染色体の構造変化というマクロな視点で解明し、クローン動物といった人工的な場合だけではなく、自然な状態の未受精卵や初期発生胚、生殖細胞におけるゲノムの初期化機構に関する理解も深める。

3. 研究の方法

MacroH2A と GFP の融合タンパク質を発現するコンストラクトは、pCAGGS ベクターに MacroH2A と GFP の cDNA を挿入して作製した。

MacroH2A-GFP の核内の局在は、作製したコンストラクトを筋芽細胞由来の C2C12 細胞やマウス初期胚に遺伝子導入することで解析を行った。また、MacroH2A-GFP の不活性 X 染色体との共局在に関しては、Xist RNA に対するプローブを用いた RNA FISH を利用して、共焦点顕微鏡 (オリンパス FV-1000) で解析した。

4. 研究成果

(1) X 染色体の不活化解除 (再プログラム化) や確立をモニターできる系の構築

① MacroH2A-GFP コンストラクトの作製

不活性 X 染色体には、(コアヒストン H2A の変異型)、SAF-A (核内に豊富に存在する足場タンパク質)、Eed (ヒストンのメチル化修飾を行うポリコーン複合体)、Xist RNA など、様々な因子が豊富に局在している。その中でも、標識が容易だと考えられた MacroH2A タンパク質と GFP が融合タンパク質として発現するコンストラクトを作製した。

作製したコンストラクトを筋芽細胞由来の C2C12 細胞に遺伝子導入したところ、ウェスタンブロット分析により、約 70 kDa の融合タンパク質が発現することが明らかとなった。また、蛍光顕微鏡で観察したところ、MacroH2A-GFP は核内に局在し、核内には強く光る点が 1 つ観察された。C2C12 細胞は不活性 X 染色体を 1 本保持していることが知られているため、不活性 X 染色体の指標となる Xist RNA の RNA FISH を試みた。その結果、Xist RNA の局在部位は強く光る点と一致したことから、MacroH2A-GFP を用いて不活性 X 染色体を標識できることが明らかとなった。

② RNA を利用した MacroH2A-GFP の胚盤胞における局在解析

次に、人工的に試験管内で合成した MacroH2A-GFP RNA を受精卵に注入し、不活性

X 染色体が確立されるマウス胚盤胞で MacroH2A-GFP の局在を解析した。その結果、胎盤を形成する栄養外胚葉において、MacroH2A-GFP は核内に局在し、強く局在する点を1つ核内に観察することができた。この点は、Xist RNA と共局在したことから、マウス初期胚においても、MacroH2A-GFP により、不活性 X 染色体を標識できることが分かった。

③ MacroH2A-GFP トランスジェニックマウスの作製

不活性 X 染色体のクロマチン状態が大きく変化する初期胚で、経時的に追跡できるシステムを確立するために、MacroH2A-GFP コンストラクトを用いてトランスジェニックマウスを作製した。得られた8ラインのマウスについて、それぞれサザンブロット分析、発現解析を行い、使用するラインを1ラインに絞った。

この雌マウスの皮膚では、核内に強く光る点を観察することができた。そこで、さらに詳しく解析するために、肝臓および腎臓の切片を作製した。その結果、核内の強い点は、雄では観察されなかったのに対し雌では観察されたことから、トランスジェニックマウスの体細胞で、MacroH2A-GFP を用いて不活性 X 染色体を標識できることが示唆された。

④ MacroH2A-GFP トランスジェニック胚における X 染色体クロマチン状態の追跡

マウスの雌の初期胚においては、2細胞期から父親由来の X 染色体が不活性化され始める。そこで、トランスジェニックマウスから受精卵を採取し、*in vitro* で胚盤胞期まで培養をし、経時的に MacroH2A-GFP と Xist RNA の局在を観察した。これまでに報告されているように、Xist RNA は、2細胞期胚から局在が見られた。MacroH2A-GFP は、4細胞期までは Xist RNA と共局在せず、8細胞期ごろから共局在するものが観察されるようになった。胚盤胞期では大部分の MacroH2A-GFP が Xist RNA と共局在した。

胚盤胞期の内部細胞塊では、不活性化された父親由来の X 染色体が再活性化されることが知られる。そこで内部細胞塊についても詳細に観察したが、核内には Xist RNA と共に強く光る MacroH2A-GFP の点が観察され、X 染色体の再活性化を観察することができなかった。*in vitro* ではなく、可能な限り *in vivo* で培養することで、体内での変化を詳細に追跡できると考えている。

以上のことより、X 染色体のクロマチン状態を経時的に解析できるシステムを確立することができた。

(2) 未受精卵における再プログラム化能や再プログラム化因子の解析

共同研究により、正常なマウス不活性 X 染色体を保持し、微小核を形成できる培養細胞株を供与していただき、MacroH2A-GFP を発現させたところ、この培養細胞でも不活性 X 染色体を標識できることが明らかとなった。微小核を形成させた後、強い緑色蛍光を示す不活性 X 染色体を微小核として他の染色体より選別して単離し未受精卵に導入することで、クローン動物作製時にみられる未受精卵での不活性 X 染色体の再プログラム化過程を追跡できると考えられる。

以上のことより、我々の作製した不活性 X 染色体標識システムにより、生殖系列細胞や未受精卵における再プログラム化過程を追跡できると考える。また、構築したシステムを利用することで、クローン動物といった人工的な場合だけではなく、自然な状態の未受精卵や初期発生胚、生殖細胞におけるゲノムの初期化機構に関する理解も深めることができると考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

① Kimura, M., Kim, E., Kang, W., Yamashita, M., Saigo, M., Yamazaki, T., Nakanishi, T., Kashiwabara, S.I., Baba, T. Functional roles of sperm hyaluronidases, HYAL5 and SPAM1, in fertilization in mice. *Biol Reprod.* **81**: 939-947 (2009) 査読有り

② Hirata, M., Amano, K., Miyashita, A., Yasunaga, M., Nakanishi T., Sato, K. Establishment and characterization of hepatic stem-like cell lines from normal adult rat liver. *J. Biochem.* **145**: 51-58 (2009) 査読有り

③ Nakanishi, T., Ishibashi, N., Kubota, H., Inoue, K., Ogonuki, N., Ogura, A., Kashiwabara, S., Baba, T. Birth of normal offspring from mouse eggs activated by a phospholipase C ζ protein lacking three EF-hand domains. *J. Reprod. Dev.* **54**: 244-249 (2008) 査読有り

[学会発表] (計5件)

①相馬淳美、中西友子、前田康彰、国分一男、

堀直裕、佐藤建三、MacroH2A-EGFP を利用したマウス初期胚における不活性 X 染色体の追跡、第 33 回日本分子生物学会年会、兵庫県、2009 年 12 月 9 日

②中西友子、前田康彰、相馬淳美、堀直裕、佐藤建三、マウス初期胚における脱メチル化能の解析、特定領域研究生殖サイクル若手勉強会 2009、静岡県、2009 年 8 月 27 日

③相馬淳美、中西友子、国分一男、堀直裕、佐藤建三、生殖系列細胞における不活性 X 染色体の追跡、特定領域研究生殖サイクル若手勉強会 2009、静岡県御、2009 年 8 月 27 日

④相馬淳美、中西友子、国分一男、堀直裕、佐藤建三、MacroH2A-EGFP を利用した生殖系列細胞における不活性 X 染色体の標識、第 32 回日本分子生物学会年会、兵庫県、2008 年 12 月 9 日

⑤相馬淳美、中西友子、国分一男、堀直裕、佐藤建三、MacroH2A を利用した不活性化 X 染色体の標識、第 1 回 生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク」「第 5 回 性分化機構の解明」合同領域会議、熊本県、2008 年 11 月 24 日

[その他]

http://www.med.tottori-u.ac.jp/p/igaku/gakka/seimei/bunshi/bunshi_home/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 友子 (NAKANISHI TOMOKO)
鳥取大学・医学部・助教
研究者番号：10344863

(2) 研究協力者

相馬 淳美 (SOMA ATSUMI)
鳥取大学・医学系研究科・博士前期課程