

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291078

研究課題名(和文) エピゲノムの維持と破綻のメカニズム

研究課題名(英文) Molecular basis for the maintenance of the epigenome and its failure

研究代表者

佐渡 敬 (SADO, Takashi)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：70321601

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：X染色体不活性化の維持機構に異常があると考えられたSmcHD1欠損マウスを用いて、ポリコム群タンパク質とは独立したエピジェネティック制御の維持機構について検討することを目的とした。当初、SmcHD1は不活性X染色体の維持に関わると考えられていたが、不活性化が一旦確立した細胞で、SmcHD1を破壊しても不活性状態は維持されることを見出した。このことから、SmcHD1は不活性化の「維持」というよりは、それを「維持」するために必要となるエピジェネティック状態の確立する過程で重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We attempted to study the molecular mechanism for the maintenance of epigenetic gene regulation by SmcHD1, which was suggested to be independent of more general polycomb group proteins. SmcHD1 was initially assumed to be involved in the maintenance of the inactivated X chromosome. Knockout of both copies of SmcHD1 in embryonic fibroblasts, which stably maintain the X-inactivated state, did not affect genes on the inactive X, suggesting that the X-inactivated state could be maintained in the absence of SmcHD1. SmcHD1 may rather play a role in the process of the establishment of X-inactivation by creating an appropriate chromatin environment required for the maintenance, and may be dispensable for the maintenance once such an environment was established.

研究分野：遺伝学

キーワード：エピジェネティクス ヘテロクロマチン 不活性X染色体 マウス

1. 研究開始当初の背景

蛋白質をコードする遺伝子の機能障害がX染色体不活性化に異常をもたらすメス特異的に胎生致死を引き起こす唯一のものとしてSmcHD1が知られている。SmcHD1はN末端側にATPaseドメイン、C末端側にSMC hingeドメインを持つ250kDaほどの蛋白質でSMCファミリーに属するが、その機能について分子レベルの解析は進んでいない。SmcHD1^{-/-}のメス胚ではX染色体不活性化の開始に目立った異常はないものの、致死となる妊娠中期頃までには不活性化されていたX染色体の再活性化が認められる。この時、不活性X染色体上のCpGアイランドのメチル化レベルは野生型に比べ低下していることから、SmcHD1はDNAメチル化の維持に関与していると考えられ、その機能の欠損が招くCpGアイランドの低メチル化が再活性化を引き起こす要因になっていると思われる。SmcHD1は雌雄ともに発現されているがSmcHD1^{-/-}のオスはメスと異なり正常に誕生することから、これが胚発生に必須な蛋白質ではないことがわかる。しかし、おそらくいずれの性においても細胞機能制御に何らかの役割を果たしている、メスはその機能をX染色体不活性化の維持機構に取り込んだと推察される。このような例として、線虫で雌雄同体(XX)とオス(XO)の双方で発現され、体細胞分裂の制御に関わるSMCファミリー蛋白質の一つが雌雄同体における遺伝子量補償にも必須な役割を果たしていることが報告されている。X染色体不活性化の機構は細胞のエピジェネティック制御全般に関わる機構と共通点が多いことを考えると、SmcHD1の機能欠損が引き起こす不活性X染色体の維持機構の異常を詳細に解析することは、胚発生や組織分化過程で多段階の制御を経て確立されるエピゲノムの維持機構やその破綻を招き得る要因の解明に寄与すると期待される。

2. 研究の目的

多段階のプロセスからなるX染色体不活性化は、胚発生初期に一方のX染色体から発現する非コードXist RNAがそのX染色体全体を覆うことで開始される。その後、このXist RNAを足場として様々なエピジェネティック制御因子がX染色体ヘリクルートされる。胎生期の不活性X染色体はそれらの作用によって段階的にエピジェネティック修飾を獲得し、不活性状態を確立・維持していると考えられる。いったんは不活性化されるX染色体が発生の進行とともに再活性化されてしまうSmcHD1^{-/-}のメス胚では、DNAメチル化を始めとするエピジェネティック制御の維持機構が損なわれていると予想されるが、再活性化の程度については十分検討されていない。本研究課題では、SmcHD1欠損胚において不活性化されるX染色体のエピジェネティック修飾を正常胚の不活性X染色体と詳細

に比較し、両者の違いを明らかにすることを目指した。CpGアイランドのメチル化レベルの差についてはすでに報告があるが、それ以外のエピジェネティック修飾については解析されていないので、複数のヒストン修飾についてX染色体上の分布を詳細に比較することを計画した。また、X染色体以外にも両者の違いがないか調べ、X染色体不活性化以外の機構におけるSmcHD1の寄与についても検討した。さらに、SmcHD1^{-/-}のメス胚における遺伝子発現プロファイルを野生型と比較し、不活性X染色体の再活性化の程度やゲノムワイドの発現異常を明らかにしようと考えた。

SmcHD1自体に着目した解析に加え、SmcHD1を含む蛋白質複合体についても解析を行った。私たちはこれまでSmcHD1と相互作用する蛋白質の単離と同定を試みてきた。その結果、既にいくつかの候補因子が得られており、それらが実際にSmcHD1と機能的な蛋白質複合体を形成し、X染色体不活性化の維持に寄与しているか調べるも計画した。SmcHD1およびこれと相互作用する因子がX染色体のエピジェネティクス制御の維持にどのような役割を果たしているか知るためには、ノックアウトやノックダウンによる機能障害のほか、機能障害後に野生型や変異型のトランスジーンを導入するレスキュー実験や生化学的な解析が重要と考えられる。このような解析を通して、DNAメチル化やヒストン修飾によってもたらされるクロマチン機能の質的変化の維持にSmcHD1とその共役因子がどのような役割を果たしているか明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

オーストラリア Walter & Eliza Hall, Institute of Medical Research の Marnie Blewitt 博士より分与を受けた点突然変異により SmcHD1 の機能が完全に失われた SmcHD1 欠損マウス胚における X 染色体不活性化の異常を RNA-FISH によって調べるとともに、メスのマウスが致死となる直接的な原因について組織学的標本作製し詳細に調べた。また、胚での解析が難しい場合は、機能欠損胚より作製した胚線維芽細胞 (MEF)、栄養膜幹 (TS) 細胞、あるいは胚性幹 (ES) 細胞樹立し、解析に用いた。さらに SmcHD1 欠損マウスと我々がこれまでの研究で作製した Xist 機能欠損マウス、およびモロシヌス亜種の JF1 系統マウスを適切に交配することで SmcHD1 のホモ欠損と同時に JF1 系統に由来する X 染色体がもっぱら不活性化された MEF を用意し、アレル特異的な発現解析やクロマチン解析を行った。

4. 研究成果

胚発生過程で、いったんは不活性化される X 染色体が発生の進行とともに再活性化され

てしまう *Smchd1*^{-/-} のメス胚では、DNA メチル化を始めとするエピジェネティック制御の維持機構が損なわれていると考えられた。本研究課題では、クロマチン機能の質的变化の維持に *Smchd1* とその共役因子がどのような役割を果たしているか明らかにすることを目的として研究に着手した。*SmcHD1* 欠損を持つメスはオスより早い段階で致死となることから、X 染色体不活性化の異常が指摘されていたが、致死となる直接的原因についてはこれまで十分な解析がされていなかった。我々は、妊娠中期以降の胎児および胎盤の組織学的解析を行った結果、致死となる時期までにメスの胎盤では巨大栄養膜細胞の数が著しく減少していることを見出した。これは、以前我々が報告している *Xist* の部分的機能欠損を持つ胎児の胎盤で観察された異常とよく似ていた。そこで、この *Xist* 変異と *SmcHD1* の関連を検討するため、この変異を持つ栄養膜幹 (TS) 細胞で *SmcHD1* の局在を免疫染色により調べたが、顕著な異常は認められず、両者の間に直接的な因果関係はないと判断した。これらの解析から、*SmcHD1* 欠損胚のメスが早期に致死となる直接の原因は胎盤における巨大栄養膜細胞の欠如であると結論付けられた。また、巨大栄養膜細胞は不活性 X 染色体の維持の異常による X 連鎖遺伝子の再活性化に、より感受性が高いことも示唆された。

SmcHD1 欠損マウスにおける不活性 X 染色体のエピジェネティックな状態を調べるために、13.5 日胎児に由来する胚線維芽細胞 (MEF) を用いて、様々なヒストン修飾 (H3K27me4, H3K9me2, H3K9me3, H4K20me1, H2aK119ub1, H4Ac) の免疫染色を行った。その結果、意外なことにいずれのヒストン修飾についても *SmcHD1* 欠損 MEF と野生型の MEF との間に有意な差が見いだされなかった。しかし、不活性 X 染色体の特徴の一つである S 期後期に限定される DNA 複製について調べたところ、*SmcHD1* 欠損 MEF では 60-70% の細胞で 2 本の X 染色体がいずれも典型的な活性 X 染色体の複製パターンを示していた。これが、不活性 X 染色体の再活性化の原因か結果は不明であるが、*SmcHD1* の欠損がもたらす影響の一つと考えられた。

SmcHD1 欠損胚から調製した MEF においては、不活性 X 染色体に集積することが知られるヒストン修飾が免疫染色で観察限り、正常胚の不活性 X 染色体と区別がつかなかったが、*SmcHD1* 欠損胚における再活性化した X 染色体のクロマチン状態を理解するためには、より詳細な解析が必要と考え、ヒストン H3K27me3, H3K9me3, *SmcHD1* 及びその相互作用因子である *Hbix1* に対する特異抗体を用いて、ChIP-seq を行った。その結果、*SmcHD1* 欠損 MEF と野生型の MEF の間で免疫染色では区別できないような局所的な差異が一部に見出された。

SmcHD1 欠損が招く再活性化がどの程度の規模で起きているか詳細に知るため、RNA-seq を行った。解析には不活性化される X 染色体が一方に限定されるよう細工するとともに、2 本の X 染色体を塩基多型で区別できる亜種間雑種の胚より調製した MEF をを用いた。この場合、活性 X 染色体と不活性 X 染色体それぞれに由来する転写産物を塩基多型で区別することができることになる。その結果、従来考えられていたよりも多くの遺伝子が不活性 X 染色体から発現していることがわかってきた。これはアレル特異的に遺伝子発現を解析することによって、以前行われたマイクロアレイを用いた解析に比べ高い解像度で解析することができたためと考えられる。さらに不活性 X 染色体の維持における *SmcHD1* の重要性を評価するため、CRISPR-Cas9 により MEF で *SmcHD1* の機能を阻害しその影響を調べた。こうした解析から得られた結果を基に、現在成果発表の準備を進めている。

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7件)

1. †Amakawa, Y., †Sakata, Y., Hoki, Y., Arata, S., Shioda, S., Fukagawa, T., Sasaki, H., and *Sado, T. A new *Xist* allele driven by a constitutively active promoter is dominated by *Xist* locus environment and exhibits the parent-of-origin effects. *Development* 142, 4299-4308 (2015). (査読あり)
2. Sarkar, M., Gayen, S., Kumar, S., Maclary, E., Buttigieg, E., Hinten, M., Kumari, A., Harris, C., Sado, T., and *Kalantry, S. An *Xist* Activating Antisense RNA Required for X-chromosome Inactivation. *Nature comm.* 6:8564 (2015). (査読あり)
3. Nakajima, T. and *Sado, T. Current view of the potential roles of proteins enriched on the inactive X chromosome. *Genes Genet. Syst.* 89, 151-157 (2014). (査読あり)
4. Pasque, V., Tchieu, J., Karnik, R., Uyeda, M., Sadhu Dimashkie, A., Case, D., Papp, B., Bonora, G., Patel, S., Ho, R., Schmidt, R., McKee, R., Sado, T., Tada, T., Meissner, A., and *Plath, K. X chromosome reactivation dynamics reveal stages of reprogramming to pluripotency. *Cell* 159, 1681-1697 (2014). (査読あり)

5. Kagawa, N., Hori, T., Hoki, Y., Hosoya, O., Tsutsui, K., Saga, Y., Sado, T., and *Fukagawa, T. The CENP-O complex requirement varies among different cell types. *Chrom. Res.* 22, 293-303 (2014). (査読あり)
6. Shinagawa, T., Takagi, T., Tsukamoto, D., Tomaru, C., Huynh, L. M., Sivaraman, P., Kumarevel, T., Inoue, K., Nakato, R., Katou, Y., Sado, T., Takahashi, S., Ogura, A., Shirahige, K., and *Ishii, S. Histone Variants Enriched in Oocytes Enhance Reprogramming to Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 14, 217-227 (2014). (査読あり)
7. *Sado, T. and Sakaguchi, T. Species-specific differences in X chromosome inactivation. *Reproduction* 146, R131-R139 (2013). (査読あり)

〔学会発表〕(計 37 件)

1. 佐渡 敬 哺乳類 X 染色体のエピジェネティクス. 第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会 合同年会フォーラム(招待講演), 2015, 12/1-4 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市).
2. 榊原祐樹 他 3 人. SmcHD1 機能欠損マウス胚における X 染色体不活性化. 第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会 合同年会, 2015, 12/1-4 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市).
3. 千木雄太 他 2 人. Xist RNA の核内係留因子を探索する系の確立. 第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会 合同年会, 2015, 12/1-4 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市).
4. 中島達郎 他 3 人. 部分的機能欠損 Xist アレルからの発現様式の組織差. 第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会 合同年会, 2015, 12/1-4 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市).
5. 佐渡 敬 機能欠損型 Xist RNA によって構築される偽ヘテロクロマチン. 第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会 合同年会ワークショップ(招待講演), 2015, 12/1-4 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市).
6. 長尾恒治 他 7 人. アレル特異的 ChIP-seq によるマウス不活性 X 染色体のクロマチン動態の解析. 第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会 合同年会ワークショップ(招待講演), 2015, 12/1-4 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市).
7. 大石裕晃 他 7 人. 胚性幹細胞における単アレル性発現遺伝子の由来とその転写制御. 第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会 合同年会, 2015, 12/1-4 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市).
8. 中島達郎 他 3 人. 部分的機能欠損 Xist アレルによる X 染色体不活性化の異常. 日本遺伝学会第 87 回大会, 2015, 9/24-26 東北大学(宮城県仙台市).
9. 佐渡 敬 他 5 人. マウス着床前胚における Xist の差次的発現. 日本遺伝学会第 87 回大会, 2015, 9/24-26 東北大学(宮城県仙台市).
10. 中島達郎 他 3 人. 部分的機能欠損 Xist アレルからの発現様式の組織差. 第 9 回日本エピジェネティクス研究会, 2015, 5/25-26 学術総合センター(東京都千代田区).
11. 榊原祐樹 他 3 人. SmcHD1 機能欠損マウス胚における X 染色体不活性化. 第 9 回日本エピジェネティクス研究会, 2015, 5/25-26 学術総合センター(東京都千代田区).
12. 長尾恒治 他 5 人. アレル特異的 ChIP-seq 法に依るマウス不活性 X 染色体のクロマチン動態の解明. 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014, 11-25-27 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).
13. 大石裕晃 他 4 人. ZFP57 による単アレル性遺伝子発現の制御機構. 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014, 11-25-27 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).
14. 佐渡 敬 ほ乳類類 X 染色体のヘテロクロマチン化機構の理解へ向けて. 第 1 回北陸エピジェネティクス研究会(招待講演), 2014, 11/18 金沢大学(石川県金沢市).
15. 千木雄太 他 2 人. Xist RNA の核内係留に寄与する領域の探索. 日本遺伝学会第 86 回大会, 2014, 9/17-19, 長浜バイオ大学(滋賀県長浜市).
16. 中島達郎 他 3 人. 部分的機能欠損 Xist アレルによる X 染色体不活性化の異常. 日本遺伝学会第 86 回大会, 2014, 9/17-19, 長浜バイオ大学(滋賀県長浜市).

17. 榊原祐樹 他 3 人 . SmcHD1 機能欠損マウス胚における X 染色体不活性化 . 日本遺伝学会第 86 回大会 , 2014 , 9/17-19 , 長浜バイオ大学 (滋賀県長浜市) .
18. 大石裕晃 他 4 人 . ZFP57 による単アレル性遺伝子発現の制御機構 . 日本遺伝学会第 86 回大会 , 2014 , 9/17-19 , 長浜バイオ大学 (滋賀県長浜市) .
19. 酒田祐佳 他 3 人 . 変異 Xist RNA が作るヘテロクロマチン様構造の詳細 . 日本遺伝学会第 86 回大会ワークショップ「マウス遺伝学が牽引する最先端生命科学」(招待講演) , 2014 , 9/19 , 長浜バイオ大学 (滋賀県長浜市) .
20. 中島達郎 他 3 人 . 部分的機能欠損 Xist アレルによる X 染色体不活性化の異常 . 第 8 回日本エピジェネティクス研究会年会 , 2014 , 5/25-27 , 東京大学 (東京都文京区) .
21. 酒田祐佳 他 3 人 . 変異 Xist RNA がもたらす X 染色体クロマチンドメインの変化 . 第 8 回日本エピジェネティクス研究会年会 , 2014 , 5/25-27 , 東京大学 (東京都文京区) .
22. 千木雄太 他 2 人 . Xist RNA の輸送制御機構解明へ向けた系の確立 . 第 8 回日本エピジェネティクス研究会年会 , 2014 , 5/25-27 , 東京大学 (東京都文京区) .
23. 小布施力史 他 5 人 . ヒトおよびマウスにおける不活性 X 染色体凝縮機構 . 第 8 回日本エピジェネティクス研究会年会 , 2014 , 5/25-27 , 東京大学 (東京都文京区) .
24. 大石裕晃 他 6 人 . マウス ES 細胞において Zfp57 が単アレル性遺伝子発現制御に果たす役割の解析 . 第 8 回日本エピジェネティクス研究会年会 , 2014 , 5/25-27 , 東京大学 (東京都文京区) .
25. 榊原祐樹 他 3 人 . smcH1 機能欠損マウス胚における X 染色体不活性化 . 第 8 回日本エピジェネティクス研究会年会 , 2014 , 5/25-27 , 東京大学 (東京都文京区) .
26. 佐渡 敬 哺乳類 X 染色体のエピジェネティクス . 第 36 回日本分子生物学会年会 (招待講演) , 2013 , 12/3-6 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市) .
27. 長尾恒治 他 6 人 . アリル特異的 ChIP-seq 法によるマウス不活性 X 染色体の解析 . 第 36 回日本分子生物学会年会 , 2013 , 12/3-6 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市) .
28. 榊原祐樹 他 2 人 . SmcHD1 機能欠損マウス胚における X 染色体不活性化 . 第 36 回日本分子生物学会年会 , 2013 , 12/3-6 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市) .
29. Takehisa Sakaguchi 他 3 人 . Cloning and molecular characterization of a mouse homolog of HBiX1. 第 36 回日本分子生物学会年会 , 2013 , 12/3-6 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市) .
30. Yuka Sakata 他 3 人 . Silent chromatin domain formed by Xist RNA defective in silencing in the mouse embryo. Riboclub 2013 , 9/22-25 ケベック (カナダ) .
31. Tatsuro Nakajima 他 3 人 . Defects in epigenetic regulation caused by partially dysfunctional Xist RNA. Riboclub 2013 , 9/22-25 ケベック (カナダ) .
32. Yuko Amakawa 他 5 人 . A new Xist allele driven by a constitutively active promoter: implication for the asymmetric expression of Xist in preimplantation mouse embryos. Riboclub 2013 , 9/22-25 ケベック (カナダ) .
33. 酒田祐佳 他 3 人 . 変異 Xist RNA がもたらす X 染色体クロマチンドメインの変化 . 日本遺伝学会第 85 回大会 , 2013 , 9/19-21 慶應義塾大学 日吉キャンパス (神奈川県横浜市) .
34. 中島達郎 他 3 人 . 部分的機能欠損 Xist RNA によるエピジェネティック制御異常 . 日本遺伝学会第 85 回大会 , 2013 , 9/19-21 慶應義塾大学 日吉キャンパス (神奈川県横浜市) .
35. 千木雄太 他 2 人 . Xist RNA の 5' 領域の配列は RNA を核内に保持させる . 第 15 回日本 RNA 学会 , 2013 , 7/24-26 ひめぎんホール (愛媛県松山市) .
36. 酒田祐佳 変異 Xist RNA による不活性化クロマチンの形成 . 日本エピジェネティクス研究会年会 , 2013 , 5/30-31 奈良県新公会堂 (奈良奈良市) .
37. 中島達郎 機能欠損をもつ Xist RNA は不活性 X 染色体の CpG メチル化を正常

に構築できる．日本エピジェネティクス
研究会年会，2013，5/30-31 奈良県新
公会堂（奈良県奈良市）．

〔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

佐渡 敬

（SADO, Takashi）

近畿大学 農学部 教授

研究者番号：70321601