

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26840006

研究課題名(和文) X染色体不活性化に必要なXist機能付加因子及びリプログラミング因子の同定

研究課題名(英文) Functional screening of the genes involved in Xist function and pluripotency

研究代表者

大畑 樹也(OHHATA, Tatsuya)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：80616459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究期間中に、XTTGFP/XTTGFPマウス(XTTGFP：Xistの抑制因子であるTsixの発現誘導アリル+X染色体連鎖GFP遺伝子)とXTX/Yマウス(XTX：Xistの発現誘導アリル)を導入・交配し、XTTGFPXTX ESCを樹立した。その細胞のXTX側X染色体のHprt遺伝子座にCRISPR/Cas9法を用いてmCherry遺伝子をノックインした後、遺伝子機能欠失スクリーニングのためのCas9遺伝子を導入し、EpiSCに変換した。CRISPRライブラリーを増幅し、レンチウイルス感染実験系を確立した。

研究成果の概要(英文)：In the term, I introduced and mated XTTGFP/XTTFP female mice (XTTGFP: Tsix inducible and X-linked GFP allele) with XTX/Y male mice (XTX: Xist inducible allele) to establish XTTGFP/XTX Embryonic stem cells (ESCs). Subsequently, I knocked-in the mCherry gene using CRISPR/Cas9 system into the XTX allele and introduced the Cas9 gene into the ESC to obtain XTTGFP/XTXmcherry Cas9 ESC. The ESC was converted to EpiSC. CRISPR library was amplified, and then the screening system has been established.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：エピジェネティクス X染色体不活性化 ノンコーディングRNA

1. 研究開始当初の背景

X 染色体不活性化は長鎖非コード RNA である *Xist* によって開始されるが、*Xist* の機能発現には未知の機能付加因子が必要とされている。一方、iPS 細胞を代表とする多能性細胞への変換機構 (リプログラミング) の重要性は急速に高まっている。しかしながら、それらの研究は不明な点が多く残っていた。

2. 研究の目的

X 染色体不活性化は長鎖非コード RNA である *Xist* によって開始されるが、*Xist* の機能発現には未知の機能付加因子が必要とされている。一方、iPS 細胞を代表とする多能性細胞への変換機構 (リプログラミング) の重要性は急速に高まっている。本研究では、独創的なシステムを用いて *Xist* 機能付加因子及びリプログラミング因子を同時に網羅的に同定する。*Xist* 機能付加因子の同定は、X 染色体不活性化及び長鎖非コード RNA の分子機構といった基礎的研究分野への大きな貢献が期待できる。リプログラミング因子の同定は、iPS 細胞の品質向上や、効率の良いリプログラミング法の開発などに繋がり、再生医療分野への大きな貢献が期待できる。

3. 研究の方法

Xist 機能付加因子/リプログラミング因子の同定に用いる、*Xist/Tsix* 発現誘導 [Xa:TXmCherry / Xi:TTGFP] EpiSC を以下の方法で樹立した：(A) TTGFP/TTGFP マウス (Ohhata et al., Genes and Dev 2011) と TX/Y マウスを交配し、2i 培地を用いて TX/TTGFP 胚盤胞より ESC を樹立した。(B) 効率的な相同組換えを起こす事ができる CRISPR 法を用いて、TX が存在する X 染色体上の HPRT 遺伝子座に mCherry 遺伝子を挿入した (緑 + 赤で細胞は黄色を示す)。(C) EpiSC 培地に移し、EpiSC に変換した。EpiSC への分化に伴うランダムな不活性化によって、緑色のみもしくは赤色のみを示す EpiSC を得た。(D) 赤色を示す細胞を FACS にて回収し、目的の細胞、[Xa:TXmCherry/ Xi:TTGFP] EpiSC を得た。得られた細胞に Cas9 遺伝

子を導入した。

4. 研究成果

(1) [Xa:TXmCherry/Xi:TTGFP] EpiSC Cas9 細胞の樹立

Xist 機能付加因子/リプログラミング因子の同定に用いる、[Xa:TXmCherry / Xi:TTGFP] EpiSC の遺伝学的特徴は以下の通り：(A) [Xa:TXmCherry]: TX 及び mCherry 遺伝子が独立して活性 X 染色体 (Xa) 上にある。TX アリルはドキシサイクリン (Dox) の添加によって *Xist* の発現が誘導される。mCherry は赤色の蛍光を発し、X 染色体の不活性化状態を可視化できる (この X 染色体は活性状態なので、mCherry は発現し、細胞が赤く光る)。(B) [Xi:TTGFP]: TT 及び GFP 遺伝子が独立して不活性 X 染色体 (Xi) 上にある。TT アリルは Dox の添加によって *Tsix* の発現が誘導される。GFP は緑色の蛍光を発し、X 染色体の不活性化状態を可視化できる (この X 染色体は不活性化状態なので、GFP は発現しておらず、細胞は緑色に光らない)。(C) 発現誘導を可能にする為のトランスアクチベーター rtTA 遺伝子が、Rosa26 領域に組み込まれている (R26rtTA/R26rtTA。以下、表示省略)。方法に記載した方法にて、目的の細胞、[Xa:TXmCherry/Xi:TTGFP] EpiSC Cas9 を得た。

(2) CRISPR Library スクリーニング系の確立

本研究期間中に、CRISPR/Cas9 を利用した遺伝子破壊用のライブラリーが開発されたため、本申請実験を、遺伝子機能付加スクリーニングから、遺伝子機能欠失スクリーニングの系に変更した。Addgene 社を介して CRISPR ライブラリーを購入し増幅した。パッケージング細胞やパッケージングコンストラクトも入手し、レンチウイルス感染実験系を確立した。

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 6 件)

全て査読あり

Kotake Y, Kitagawa K, Ohhata T, Sakai

S, Uchida C, Niida H, Naemura M, Kitagawa M: Long Non-coding RNA, PANDA, Contributes to the Stabilization of p53 Tumor Suppressor Protein. *Anticancer Res.* 36: 1605-1611, 2016.

Matsunuma R, Niida H, Ohhata T, Kitagawa K, Sakai S, Uchida C, Shiotani B, Matsumoto M, Nakayama KI, Ogura H, Shiiya N, Kitagawa M: UV Damage-Induced Phosphorylation of HB01 Triggers CRL4DDB2-Mediated Degradation To Regulate Cell Proliferation. *Mol Cell Biol.* 36: 394-406, 2015.

Ohhata T, Matsumoto M, Leeb M, Shibata S, Sakai S, Kitagawa K, Niida H, Kitagawa M, Wutz A: Histone H3 Lysine 36 Trimethylation Is Established over the *Xist* Promoter by Antisense *Tsix* Transcription and Contributes to Repressing *Xist* Expression. *Mol Cell Biol.* 35: 3909-3920, 2015.

Nakajima T, Kitagawa K, Ohhata T, Sakai S, Uchida C, Shibata K, Minegishi N, Yumimoto K, Nakayama KI, Matsumoto K, Katou F, Niida H, Kitagawa M: Regulation of GATA-binding Protein 2 Levels via Ubiquitin-dependent Degradation by Fbw7: INVOLVEMENT OF CYCLIN B-CYCLIN-DEPENDENT KINASE 1-MEDIATED PHOSPHORYLATION OF THR176 IN GATA-BINDING PROTEIN 2. *J Biol Chem.* 290:10368-10381, 2015.

Kitagawa K, Shibata K, Matsumoto A, Matsumoto M, Ohhata T, Nakayama KI, Niida H, Kitagawa M: Fbw7 targets GATA3 through CDK2-dependent proteolysis and contributes to regulation of T-cell development. *Mol Cell Biol.* 34: 2732-2744, 2014.

Harada M, Kotake Y, Ohhata T,

Kitagawa K, Niida H, Matsuura S, Funai K, Sugimura H, Suda T, Kitagawa M: YB-1 promotes transcription of cyclin D1 in human non-small-cell lung cancers. *Genes Cells.* 19: 504-516, 2014.

[学会発表](計10件)

大畑樹也 マウス ES 細胞における *Xist* の発現抑制機構、日本遺伝学会、2014年9月、滋賀県長浜市、一般口演発表

大畑樹也 X 染色体不活性化を調節するノンコーディング RNA *Tsix* による遺伝子発現制御機構、名市大エピジェネティクス研究会、2014年9月、長野県南木曾町、招待講演

大畑樹也 未分化 ES 細胞の *Xist* 発現抑制機構、日本分子生物学会、2014年11月、神奈川県横浜市、ポスター発表

大畑樹也 *Tsix* 発現誘導細胞を用いた *Tsix* 分子機構の解析、X 染色体研究会、2015年3月27日、奈良県奈良市、一般口演発表

大畑樹也 アンチセンス RNA *Tsix* は H3K36me3 を *Xist* プロモーターに導入し *Xist* の発現を抑制している。日本 RNA 学会、2015年7月、北海道札幌市、一般口頭発表

大畑樹也 *Tsix* の機能解明に向けての現状と展望。第四回 X 染色体研究会、2016年3月、鳥取県米子市、一般口頭発表

Tatsuya Ohhata Histone H3 lysine 36 tri-methylation is established over the *Xist* promoter by antisense *Tsix* transcription and has a role in preventing *Xist* expression. International Symposium on Non-coding DNA and Chromosomal Integrity. August, 2015, Awaji-shi, Hyogo-ken, JAPAN (Poster presentation).

Tatsuya Ohhata Dynamics of repressive

chromatin conformation at the *Xist* promoter revealed by *Tsix*-inducible system, X chromosome inactivation - A tribute to Mary Lyon, October, 2016, Royal Society, London, UK (poster presentation).

Tatsuya Ohhata Investigating the molecular mechanisms of *Tsix* antisense RNA involved in the Regulation of X-chromosome inactivation、北陸エビジェネティクス研究会、2016年11月、福井県福井市、一般口演発表

大畑樹也 アンチセンス RNA *Tsix* は H3K36me3 を *Xist* プロモーターに導入し *Xist* の発現を抑制する、日本分子生物学会、2016年12月、神奈川県横浜市、ポスター発表

〔図書〕(計1件)

大畑樹也 他、化学同人 ノンコーディング RNA -RNA 分子の全体像を俯瞰する-
2016年7月

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

https://www.hama-med.ac.jp/uni_education_igakubu_igaku_seika1.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大畑 樹也 (OHATA Tatsuya)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：80616459