

研究報告書

「Long non-coding RNA による転写抑制機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年10月～平成27年3月

研究者: 増井 修

1. 研究のねらい

近年の研究から、RNA の中にはタンパク質へと翻訳を受ける mRNA(または coding RNA) の他にも、タンパク質に翻訳されることなくしてその機能を発揮する一群があることが明らかになっており、non-coding RNA と呼ばれている。それらの中にはゲノム DNA からの転写を調節してその機能を制御する物も数多く存在しており、「non-coding RNA による転写の調節」というエピジェネティクスの一分野を形成して、生物の発生段階や疾病の発症に密接に関係している。従って、この non-coding RNA によるゲノム DNA からの転写調節のメカニズムを明らかにすることは、生物の基本を理解することにつながるだけでなく、がんや不妊症などの疾患の治療法の作用点となることが期待される。

「Non-coding RNA による転写の調節」の一例として、「Xist long non-coding RNA による X 染色体不活性化」という現象が挙げられる。すなわち、我々を含む哺乳類では性染色体である X 染色体と Y 染色体が大きく異なっており、X 染色体が 1000 個近い遺伝子を含むのに対して Y 染色体は 100 個程度の遺伝子しか含まないことから、その転写される遺伝子産物の量を補正して雌(XX)と雄(XY)の間で同一にする必要があり、実際に哺乳類の雌の各細胞では2つある X 染色体のうちの1つがその染色体全体の転写を遮断されて不活性化を受けていることが知られており、X 染色体不活性化と呼ばれている。この X 染色体不活性化は X 染色体上にコードされる Xist (X-inactive specific transcript) 遺伝子座から転写される Xist RNA が、細胞核内に留まり、自身が転写された X 染色体を覆うように巻き付くことで不活性化を行っているが、その不活性化の分子メカニズムについてはよく分かっていない。

本研究では Xist RNA にタグ配列を付加することによって、RNA の可視化や、RNA 結合タンパク質の同定といった、non-coding RNA を解析するための新しい技術開発を行うと同時に、Xist RNA が標的遺伝子や染色体全体の転写を不活性化する分子メカニズムを明らかにすることを目標とする。Xist long non-coding RNA の作用メカニズムが明らかになることで、他の non-coding RNA による転写調節機構にも共通する作用原理が明らかになるものと期待される。

2. 研究成果

(1) 概要

我々は内在性 Xist 遺伝子座に、タグ配列である MS2 ステムループ配列を挿入したメスのマウス胚性幹細胞を作製し、このタグ配列に特異的に結合する蛍光蛋白質を発現させることで Xist RNA を生細胞で GFP シグナルとして可視化できる細胞を作製した。細胞周期において、分裂期では各染色体が凝集した後に娘細胞に分配されるというダイナミックな過程を経るが、この時の Xist RNA の挙動はよく分かっていなかったことから、我々はこの細胞を用いて

細胞周期の各時期での Xist RNA の形態を詳細に調べた。その結果、間期の細胞では Xist RNA は不活性 X 染色体全体に局在するのに対し、分裂期では Xist RNA は不活性 X 染色体から排除されるがその辺縁部に留まることが明らかになった。このように Xist RNA が分裂期においても不活性 X 染色体の辺縁に留まるのは、娘細胞が次の間期に入る時に再度迅速に不活性 X 染色体を包み込み、不活性化状態を安定に維持することに寄与していると考えられる。

また、我々はこの Xist RNA 可視化系を用いて SIM(構造化照明法)に基づく超解像顕微鏡による解析を行った。通常の蛍光顕微鏡を用いて解析されていた Xist RNA は、数マイクロメートルの「Xist RNA domain」と呼ばれる大きな構造体を形成するものとして知られていたが、超解像顕微鏡を用いることで実際にはさらに微細な粒子状構造の集合体であることが明らかとなった。

我々はこの Xist タグ化システムを用いて、Xist RNA に結合するタンパク質を同定するための実験系の開発を行った。それらの Xist RNA 結合タンパク質の中には Xist RNA による標的遺伝子の転写抑制に関与しているタンパク質が含まれることが予想される。変異型ビオチンリガーゼを Xist RNA のタグ部分に結合した細胞を作製し、Xist RNA の近傍に存在しているタンパク質群にビオチン化修飾を導入できる実験系を構築した。この実験系によりビオチン化されたタンパク質は、ビオチン-アビジンの特異的な結合を利用して精製することが可能となる。我々はこの実験系を用いて実際に多くのタンパク質がビオチン化を受けることを確かめたので、現在これらのビオチン化されたタンパク質が何なのかを質量分析器を用いて同定する実験を進めている。

本さきがけ研究により我々は、これまでに明らかにならなかった Xist RNA の生細胞での挙動に新しい知見を与え、また Xist RNA に結合して標的遺伝子のサイレンシングに関わるタンパク質群を同定するための新しい実験系の開発を行った。これらを用いて Xist RNA の作動機構が明らかになるだけでなく、今後、他の long non-coding RNA にも共通する作動原理を明らかにできるものと期待される。

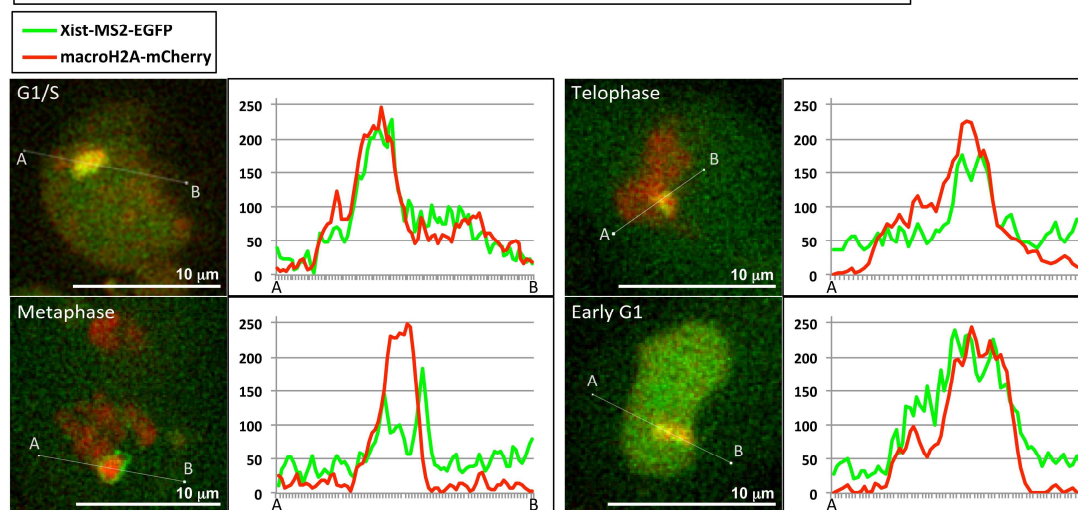
(2) 詳細

(研究テーマ1) Xist RNA のライブイメージング

Xist RNA は細胞周期が間期の細胞では X 染色体を覆うように細胞核内に局在しており、その状態は細胞分裂を経て娘細胞にも安定に受け継がれることが分かっている。ところが細胞分裂中の Xist RNA の挙動は明らかになっておらず、この点を明らかにすることはエピジェネティック修飾が細胞分裂を経て親細胞から娘細胞にどのように伝達されるのかという観点からも重要であると考えられる。これまでの研究では化学的に固定した細胞を用いた解析しか行われておらず上記の疑問に対する答えははっきりと出ていなかったことから、我々はまず Xist RNA をライブで観察できる実験系を構築してその細胞分裂中の挙動を明らかにすることを試みた。雌のマウス ES 細胞の内在性 Xist 遺伝子座に RNA タグ配列である MS2 stem loop をノックインしたものを作製し、さらにこの細胞に MS2 stem loop に特異的に結合する MS2CP-GFP を安定に発現させることによって、Xist RNA を GFP シグナルとして蛍光顕微鏡で検出できる実験系を構築した。この細胞を用いて12時間程度の長さのライブイメージングを行い、細胞分裂を行っている細胞での Xist RNA の挙動を観察した。その結果、Xist RNA は

分裂期の細胞でも不活性 X 染色体上に局在することが観察されたが、間期の細胞と大きく異なる点として、Xist RNA は間期では不活性 X 染色体全体に局在するのに対して、分裂期では染色体部分から排除されてはいるがその辺縁部に留まっていることが観察された(図1)。このことから、Xist RNA は分裂期の凝集した染色体部分から排除されるが、直接または間接的な結合を介して X 染色体辺縁部に留まることが示唆された。このことにより Xist RNA は細胞分裂直後の娘細胞で迅速に X 染色体を包み込んで不活性化状態の安定的な維持に関与しているものと考察された。これらの研究成果は当初さきがけ研究の計画として提案していたものであり、所定の目標を達成できたものと考えている。

図1:細胞周期を通じた Xist RNA の長時間ライブイメージング解析



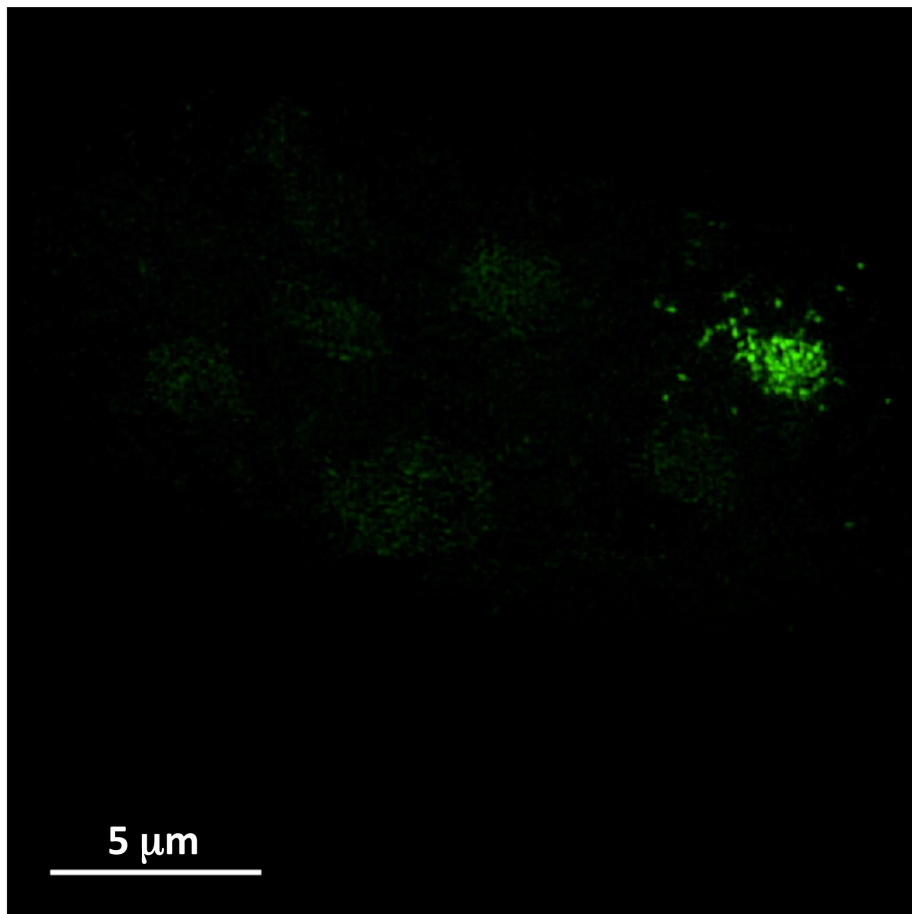
Xist-MS2-GFP ES 細胞を9日間分化させて不活性 X 染色体を形成させた後に、20分間隔で13時間のライブイメージングを行った。それらの動画から分裂を行った細胞を選別して、細胞周期の各フェーズを抜粋してラインヒストグラム解析を行った。macroH2A は不活性 X 染色体のマーカーとして用いた。

間期では Xist-GFP は不活性 X 染色体全体の上に局在するが、分裂期では染色体の中心部から排除されて辺縁部に局在することが分かる。

次に我々は、この Xist RNA を GFP として可視化できる実験系を発展させる形で、超解像顕微鏡を用いた解析を行った。上述のように Xist RNA は間期の細胞では不活性 X 染色体全体を覆うような存在しており、この Xist RNA が形成する構造体は Xist RNA domain と呼ばれている。我々を含めた複数のグループのこれまでの解析から Xist RNA domain は連続した大きな核内構造体であると考えられていたが、これらの結果は主に通常の蛍光顕微鏡を用いて行われて来たものであり、そこには光学上の空間分解能の限界である 200 nm (水平方向) という制限が常に付随している。この限界を克服するために、ここ数年の間に超解像顕微鏡という一連の顕微鏡システムが実用化されてきたことから、我々はこの超解像顕微鏡を用いて Xist RNA を解析してその詳細な構造を明らかにすることを試みた。超解像顕微鏡はその原理の違いから大きく3種類ほどが存在しているが、それらの中から我々は生細胞イメージングにも使用でき、比較的扱いやすい構造化照明法(Structured illumination: SIM)に基づく顕微鏡を使用した。固定した細胞、Xist-MS2-GFP 生細胞、の双方を解析した結果、どちらにおいても Xist RNA domain はこれまでに観察されていたひと塊の集合体からさらに解像され、細かい粒

子状の構造体が集合して形成されていることが明らかになった(図2)。我々はさらにこれらの構造体が不活性 X 染色体を構成するクロマチン因子のどれかと共局在しているかどうかを、主に超解像顕微鏡を用いて解析したが、これまでのところポリコーム複合体や Smchd1 といったタンパク質は Xist RNA の粒子状構造とは強い共局在を示さないことが判明している。これらの超解像顕微鏡による一連の解析は、当初のさきがけ研究計画には含まれてはなかったが、「Xist RNA のライブイメージング」を発展させる形で取り組み、一定の成果を挙げることができたと考えている。

図2: Xist-MS2-GFP の超解像ライブイメージング像



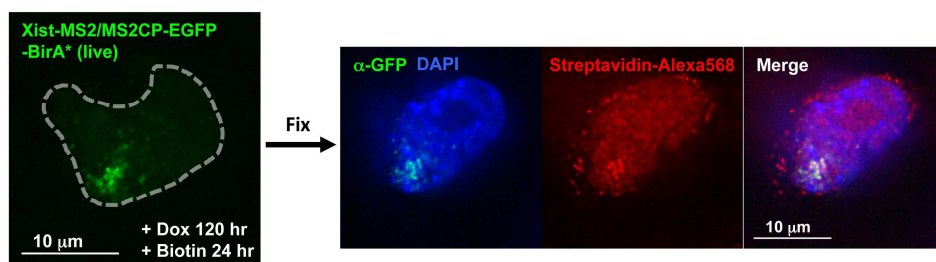
Xist-MS2-GFP ES 細胞を7日間分化させて不活性 X 染色体を形成させた後に、超解像顕微鏡 OMX で構造化照明法による超解像画像を取得した。Xist RNA が微細な粒子状の構造が集合したものであることが分かる。

(研究テーマ2) Xist RNA 結合タンパク質の同定

Xist RNA による X 染色体不活性化のメカニズムはこれまでにほとんど分かっていない

が、その大きな理由として Xist RNA に直接結合してその下流の不活性化に関わっているであろう因子の同定が行われていないことが挙げられる。このことは Xist RNA が極端に不溶性であり、通常の生化学的な複合体精製を困難していることに起因していると考えられる。この点を回避するために、本研究では BioID という方法を用いて Xist RNA に結合するタンパク質因子を同定するための実験を行った。BioID は Kyle J. Roux らによって開発された方法で、標的とするタンパク質に変異型ビオチンリガーゼを融合させておくことで、そのタンパク質に隣接するタンパク質のリジン残基をビオチン化する方法であり、それらのビオチン化されたタンパク質はビオチンとアビジンの特異的な結合を用いて精製同定することが可能である。我々は、我々の開発した Xist-MS2 システムを用いて Xist RNA に変異型ビオチンリガーゼを結合した細胞を作製した。この細胞を用いて Xist RNA domain でのタンパク質のビオチン化が誘導されることを確かめたので(図3)、現在これらのビオチン化されたタンパク質を精製して同定する作業を進めている。この Xist RNA 結合タンパク質の同定実験は、当初は RNA タグを用いて単純に沈降精製する実験系を計画していたが、Xist RNA が不溶性であることから断念し、それに変わる方法として開発を行った。その分より時間を消費することとなり、最終目標である Xist RNA に結合するタンパク質の同定にまではまだ至っていない。予想以上に時間を消費することとなったが、目標に向けて進んでおり、さきがけ研究期間終了後も目標の達成を目指して行く。

図3: Xist-BioID による Xist RNA domain へのビオチン化の導入



Dox 添加により XistWT-MS2 を発現するマウス ES 細胞を Dox 存在下で5日間分化誘導した。

最後の24時間に Biotin を培地中に加えておくことで変異型ビオチンリガーゼ (BirA*) による Xist 近傍タンパク質のビオチン化を行った。図ではまずライブイメージングにより Xist-MS2-GFP の画像を取得し、その直後に細胞を固定して免疫染色を行い Biotin 化されたタンパク質を検出した。緑と赤のシグナルがほぼ一致することが見て取れる。

3. 今後の展開

本研究ではマウス ES 細胞を用いて Xist RNA の可視化解析を行ったが、本来 X 染色体不活性化が生じるマウス初期胚では、他の多くのエピジェネティック修飾がそうであるように、その形成はよりダイナミックに制御されている。例えば、受精後には4細胞期から必ず父親由来の X 染色体が不活性化を受け(インプリント型)、その後内部細胞塊においてこのインプリント型の X 染色体不活性化が解除された後に、再び今度はランダムに父親由来か母親由来のどちらかの X 染色体が不活性化を受ける(ランダム型)ことが知られている。これらの過

程には Oct4/Nanog/Sox2 などの万能性因子や Rnf12 などが関与することが分かっており、複雑かつ精巧な制御システムを構築しているものと考えられる。今回我々が作製した Xist RNA 可視化の実験系を現在マウス個体に導入しており、将来はこのシステムを用いることでマウス初期胚での Xist RNA の発現のリアルタイム解析と、それを制御する因子の発現との相関関係を明らかにすることができるであろう。

また、我々が今回行った超解像顕微鏡によるライブイメージングは、現存の超解像顕微鏡を用いた研究を、固定細胞を用いた 3D(XYZ)のレベルから、4D (3D + Time)、さらには 5D (4D + multi-color) へと進化させる先鞭的な研究となるものと期待される。これらの研究にはハードウェア面の進歩が平行して進むことが欠かせないが、それを見越した研究を進めていき、RNA に対する今後のスタンダードな解析手法の1つとして確立させることを目指す。

今回のさきがけ研究では期間内に Xist に結合するタンパク質の同定にまでは至らなかったが、今回我々が構築した Xist-BioID のシステムを用いてビオチン化したタンパク質を質量分析器で同定し、それらの機能の解析を行っていく予定である。これによって Xist を始めとする non-coding RNA による標的遺伝子の制御メカニズムが明らかになっていくと期待される。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

当初提案したさきがけ研究の目的のなかで、「Xist RNA のライブイメージング」についてはほぼ達成できた物と考えている。さらにそれを発展させて「超解像ライブイメージング」の実現に端緒を付けることも達成した。「Xist RNA 結合タンパク質の同定」については、研究期間の途中で技術的な障壁にぶつかったが、熟考して工夫をすることによってその壁を越えることができた。最終的な目的であるタンパク質種の同定には至っていないが、そこへ向かう道筋を付けることはでき、一定の成果をあげることができたものと考えている。

本さきがけ研究では、RNA のライブイメージング、RNA 結合タンパク質の新規同定方法、という RNA 分子に対する2つの新しい解析技術を構築することに成功した。今後、これらの技術が non-coding RNA を含む他の RNA 分子にも応用されることが期待され、生体での RNA の果たす役割を明らかにして行くことに貢献するであろう。また、本研究で開発を始めた超解像ライブイメージングの手法は、今後 RNA だけでなくタンパク質分子にも同様に適用されて行くと考えられ、今後は分子生物学の新しい解析手法として定着して行くことが期待される。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

X 染色体の転写を不活性化する分子機構を明らかにするために、Xist RNA のライブイメージングを試みた。まず検出できる系を確立し、この系を用いて細胞周期の細胞内動態を観察することに成功した。その結果 Xist RNA は周期で局在が変わり、分裂期では不活性 X 染色体の辺

縁部に局在し、間期では全体に広がって存在することが明らかとなった。間期について超解像顕微鏡による観察をおこなったところ、細かい粒子状の構造体が観察された。この構造体とタンパクの局在を調べたところ、H3K27me3 と最も強局在することが分かった。システムが確立されたようなので、今後 Xist RNA がどのようにして染色体の不活性化を起こすのか、その機構の解明に向け全力で取り組んで欲しい。Long non-coding RNA の代表格である Xist RNA が先導して成果がでることを期待する。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Escamilla-Del-Arenal M, da Rocha ST, Spruijt CG, **Masui O**, Renaud O, Smits AH, Margueron R, Vermeulen M, Heard E. “Cdy1, a New Partner of the Inactive X Chromosome and Potential Reader of H3K27me3 and H3K9me2”. *Mol Cell Biol*. 2013 vol. 33, 5005–5020.
2. O’Loughlen A, Muñoz-Cabello AM, Gaspar-Maia A, Wu HA, Banito A, Kunowska N, Racek T, Pemberton HN, Beolchi P, Laval F, **Masui O**, Vermeulen M, Carroll T, Graumann J, Heard E, Dillon N, Azuara V, Snijders AP, Peters G, Bernstein E, *Gil J. “MicroRNA regulation of Cbx7 mediates a switch of Polycomb orthologs during ESC differentiation”. *Cell Stem Cell*. 2012 vol. 6, 33–46.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

(学会発表)

- ・ **Masui O**, Schulz E, Fuyuko K, Gribnau J, Heard E, Koseki H. “Analysis of Xist RNA using RNA-tagging” 第66回日本細胞生物学会大会(奈良市)2014年6月
- ・ **Masui O**, Schulz E, Fuyuko K, Gribnau J, Koseki H, Heard E. “Live-cell imaging of Xist RNA” EMBO Conference Series; Nuclear Structure and Dynamics(L’Isle sur la Sorgue, France)2013 October
- ・ **Masui O**, Bonnet I, Le Baccon P, Brito I, Pollex T, Murphy N, Hupe P, Barillot E, Belmont A, Koseki H, Heard E. “Live cell imaging of random X-inactivation” Mouse Molecular Genetics (Pacific Grove, USA) 2012 October

(著作物)

- ・ **増井 修**, 古関明彦 “ポリコム複合体と染色体・核内構造” *細胞工学*. 2012, vol 31, 887-893.

(受賞)

- ・ 最優秀ポスター賞
Mouse Molecular Genetics (Pacific Grove, USA) 2012 October