

## 研究課題別評価

1 研究課題名: Non-coding RNA とエピジェネティックな修飾の協調的遺伝子発現制御

2 研究者氏名: 佐渡 敬

研究員: 大畑 樹也 (研究期間 H.15.4~H.18.3)

技術員: 保木 裕子 (研究期間 H.15.4~H.18.3)

3 研究のねらい:

最近の研究から, non-coding RNA が遺伝子発現制御やクロマチン構造制御に重要な役割を果たしていることがわかってきた。ほ乳類におけるエピジェネティックな遺伝子発現制御機構の1つとして知られる X 染色体不活性化においても non-coding RNA が中心的な役割を果たしていることが知られる。X 染色体不活性化はメスの胚発生過程で細胞分化にともなって起こる。その不活性化に先立って一方の X 染色体から発現される *Xist* RNA は機能性 non-coding RNA と考えられ、その X 染色体全域にわたってシスに結合し、ヘテロクロマチンの構築に関わるタンパク質をリクルートすることで染色体ワイドの不活性化を引き起こすと考えられる。また、この *Xist* 遺伝子座には、*Xist* の発現をシスに制御するアンチセンス non-coding 遺伝子である *Tsix* が存在することも明らかとなっている。

X 染色体不活性化は、これまで最もよく研究されてきた安定な遺伝子発現抑制システムの1つであるが、その分子機構は未だ不明な点が多い。当該プロジェクトでは、ジーンターゲットングにより遺伝子改変を施したマウスを作製し、その胚を用いて(1) *Tsix* による *Xist* 遺伝子座のアンチセンス制御機構、(2) *Xist* RNA による不活性クロマチンの構築機構、について分子レベル、あるいは細胞レベルの解析を行い、X 染色体不活性化機構の鍵を握る *Xist* RNA と *Tsix* RNA の機能に迫り、その知見をもとに non-coding RNA が DNA やヒストンの修飾と協調的に作り上げる遺伝子発現制御機構やクロマチン構造制御機構の理解を目指した。

4 研究成果:

(1) *Xist* 発現制御における DNA メチル化の意義

研究開始当初私たちは、*Tsix* RNA が *Xist* 遺伝子座のエピジェネティックな修飾の構築に関わるのではないかと考えていたが、もしそうであれば、そうした修飾の一つである DNA メチル化が *Xist* の発現制御、あるいは X 染色体不活性化自体にどのようなインパクトを持つか調べることは当該研究の方向性をうらなう上で非常に重要であると思われた。そこで、*de novo* DNA メチル化酵素欠損マウス、および ES 細胞における X 染色体不活性化について詳細な検討を行った。

*Xist* の発現が抑制されている活性 X 染色体上では、*Xist* プロモーター領域の CpG 配列は高度にメチル化されているのに対し、*Xist* が転写されている不活性 X 染色体上では、その領域に CpG 配列のメチル化はほとんど認められない。従来 *Xist* アリル間の二者択一的な DNA メチル化が、X 染色体不活性化の開始に先立つ *Xist* の片アリル性の発現亢進に重要な役割を果たしていると考えられていた。*de novo* DNA メチル化酵素欠損マウス胚は、胎生 9.5 日目 (E9.5) ごろに致死となるが、この時期のメス胚で *Xist* プロモーター領域のメチル化レベルを調べると、通常胚盤胞期以降起こる *de novo* メチル化が起こらないため、両アリルともメチル化レベルは低いままで、野生型のメス胚で見られるような二者択一的なメチル化は認められなかった。ところが、ミュータント胚で *Xist* の発現を RNA-FISH によって調べると、雌雄ともに *Xist* の発現が正常に制御されていた。さらに X 染色体の複製タイミング解析や免疫染色など細胞遺伝学的な解析結果からも *de novo* メチル化酵素の欠損による X 染色体不活性化機構の異常は認められなかった。つまり、ミュータント胚では、*Xist* プロモーター領域の二者択一的なメチル化は構築されず両アリルとも低メチル化状態であるにもかかわらず、*Xist* の片アリル性の発現制御機構に顕著な影響は認められず、X 染色体の不活性化も正常に進行することがわかった。以上のことから、*Xist* の二者択一的なメチル化は不活性化に先立つ片アリル性の発現を誘導するための主要な機構ではないことが強く示唆された。また、X 染色体不活性化の開始および不活性化状態の伝播にも *de novo* DNA メチル化は必要ではないことが示された。これまで維持型 DNA メチル化酵素欠損マウス胚を用いた解析から、X 染色体不活性化によって不活性化した遺伝子および活性 X 染色体上の *Xist* の安定な発現抑制に DNA メチル化の維持が重要であることは示されていたが、本研究により不活性化の鍵を握る *Xist* の片アリル性の発現亢進を引き起こす主要な機構は DNA メチル化ではなく、むしろヒストン修飾のような他の修飾であることが強く示唆された。

## (2) *Tsix* による *Xist* 遺伝子座のクロマチン制御

胎盤などのいわゆる胚体外組織においては、父性 X 染色体が選択的に不活性化し、母性 X は決して不活性化しない (インプリント型 X 染色体不活性化)。ところが、母親に由来する *Tsix* 欠損を持つマウス胚は、胚体外組織において本来発現することのない母性 *Xist* アリルの異所的な発現を招き、その結果雄では唯一の X 染色体がメスでは双方の X 染色体が不活性化するため着床後間もなく死亡する。こうした *Tsix* 欠損マウスの解析から、*Tsix* が *Xist* の発現を負に制御する因子であることが明らかとなったが、その分子基盤は依然不明であった。

本研究では、*Tsix* の欠損が *Xist* の発現異常を引き起こす分子機構を明らかにするため、*Tsix* 欠損が *Xist* 遺伝子座のクロマチンに及ぼす影響を調べた。雌雄の胚において *Tsix* 欠損 X 染色体上の *Xist* プロモーター領域の DNA メチル化、クロマチン構造、ヒストン修飾を解析した結果、*Tsix* の機能を阻害すると、*Xist* プロモーター領域は抑制型のクロマチン構造を構築できず、弛緩したク

ロマチン構造をとることがわかった。上述のように、DNAメチル化自体は *Xist* の片アリル性発現を誘導する主要な機構ではないと考えられるが、*Tsix* が *Xist* プロモーターのエピジェネティックな修飾に深く関わることで *Xist* の発現を制御しているというさきがけ研究採択当初の私たちの作業仮説はおおむね妥当であったと言える。

### (3) 胚体組織における *Tsix* 非依存的 *Xist* 抑制機構

母由来 *Tsix* 欠損が胚体組織においても胚体外組織同様  $X^{\Delta Tsix}$  の不活性化を引き起こすかは不明であった。私たちは、4倍体に由来する細胞が胚体外組織にのみ寄与できることを利用した、いわゆる4倍体レスキューの実験を行うため、 $X^{\Delta Tsix}$  ヘテロ接合体のメスに由来する8細胞期胚と4倍体の野生型4細胞期胚の凝集キメラ胚を偽妊娠マウスの子宮に戻した。その結果、通常着床後間もなく致死となるはずの  $X^{\Delta Tsix}X$  および  $X^{\Delta Tsix}Y$  の子どもが誕生することが示された。 $X^{\Delta Tsix}Y$  が誕生したことは、*Tsix* 欠損が胚体組織では、*Xist* の異所的発現を引き起こしその X 染色体を不活性化させることはないことを示している。すなわち、胚体外組織の場合とは異なり胚体組織では *Tsix* 欠損によってたとえ *Xist* の異所的発現が引き起こされても、細胞が X 染色体のカウンティング機構によってその不適切な発現を感知し *Xist* の発現を抑えてしまう機構が備わっていることを示唆している。

### (4) ヒストンメチル化酵素 G9a 欠損マウスにおける X 染色体不活性化

ヒストンメチル化酵素 G9a は転写に抑制的な効果を持つヒストン H3-Lys9 のメチル化を触媒する酵素の1つである。私たちは、*Xist* RNA がヒストンメチル化酵素や他の転写抑制因子を X 染色体ヘリクルートすることで染色体ワイドのヘテロクロマチン化を引き起こすという可能性検討することを計画した。ヒストンメチル化酵素 G9a がこの過程に直接関与するか調べるため、京都大学ウィルス研究所眞貝洋一教授との共同研究で、G9a 欠損マウスにおける X 染色体不活性化を解析した。G9a 欠損マウス胚は胚性致死であるものの体節期初期までは発生を進めることから、X 染色体不活性化の開始には問題ないと考えられた。そこで、いったん不活性化した X 染色体の不活性化状態の維持に G9a 欠損がどのような影響をおよぼすかに着目して解析を行った。まず、G9a 欠損の遺伝的背景に *Xist* 欠損 X 染色体 ( $X^{\Delta Xist}$ ) とマーカー遺伝子を持つ X 染色体 ( $X^{GFP}$ ) を導入し、発生初期に起こる不活性化を専ら  $X^{GFP}$  に限定させた。このようなメス胚 ( $X^{\Delta Xist}X^{GFP}$ ) で、いったん不活性化された  $X^{GFP}$  の再活性化が起こるか調べた。その結果、G9a が機能しなくてもいったん不活性化した X 染色体の不活性化状態は安定に維持されることがわかった。しかし、G9a と他の H3-Lys9 メチル化酵素が重複した機能を持つ可能性は否定できず、不活性 X 染色体の維持における H3-Lys9 メチル化の役割についてはさらなる解析が必要である。

## 5 自己評価:

*Tsix* による *Xist* のアンチセンス制御機構に関する解析は研究開始当初の計画からそれることなく比較的順調に進み、私たちの作業仮説が概ね妥当であったことを明らかにすることができたという点で、当初の目標は達成できたと考えている。この成果をもとに新たに着手した2つのプロジェクトについても現在投稿準備を進めており、当該プロジェクト自体も今後順調に発展していくと思われる。*Xist* によるヘテロクロマチン構築機構に関する解析については、*Xist* と相互作用する因子を単離することを計画したわけであるが、関連分野の研究の予想を上回る急速な展開により、次々とそのような因子が報告され当初の計画を中止せざるを得なくなった。しかし、不活性 X 染色体のヒストンメチル化における *Xist* RNA の意義は依然不明であり、この問題にアプローチすることを念頭に最初に行ったヒストンメチル化酵素 G9a 欠損マウス胚における X 染色体不活性化の解析は関連分野の研究者に価値ある情報を提供できたとは思っている。

研究課題のほかに私が目標したことは、当該研究を推進するための研究系を自前で確立することであった。その点で、私たちの研究の中核をしめる遺伝子改変マウス作製技術を自分達の手で確立し、一定の成果を挙げることができたことには非常に満足している。当該研究は全てさきかけ研究の支援でグループに加わってもらった2人のメンバーとともに3人で行ったものであるが、一致団結して充実した研究を展開できたと考えている。

## 6 研究総括の見解:

エピジェネティクスはポストゲノム解読時代の重要なテーマとして急速に関心を集め、現在 non-coding RNA を中心に展開されつつある。本研究はその基盤を構成している“しくみ”の解明に迫り、制御因子の単離においては一步譲ったものの注目すべき成果をあげることが出来たとみてよい。問題はこれからであり、RNA ワールド中心に推移する現在の研究の趨勢は、次第にその枠を拡大しつつある。Genome 対 Phenome という生物多様性の中核的テーマの解明に迫り得る壮大な構想へと発展することを期待する。既発表論文の質は高い。

## 7 主な論文等:

### 論文・総説

1. Ohhata, T., Hoki, Y., Sasaki, H., and Sado, T. *Tsix*-deficient X chromosome does not undergo inactivation in the embryonic lineage in males: implications for *Tsix*-independent silencing of *Xist*. *Cytogenet. Genome Res.* (in press).
2. Sado, T., Hoki, Y., and Sasaki, H. (2005). *Tsix* silences *Xist* through modification of chromatin structure. *Dev. Cell*, 9, 159–165.

3. Sado, T. and Ferguson-Smith, A. C. (2005). Imprinted X inactivation in the preimplantation mouse embryos. *Hum. Mol. Genet.*, 14, Spec. 1, R59–64.
4. Ohhata, T, Tachibana M., Tada, M., Tada, T., Sasaki, H., Shinkai, Y., and Sado, T. (2004). X-inactivation is stably maintained in mouse embryos deficient for histone methyltransferase G9a. *genesis* 40,151–156.
5. Sado, T., Okano, M., Li, E., and Sasaki, H. (2004) *De novo* DNA methylation is dispensable for the initiation and propagation of X chromosome inactivation. *Development* 131, 975–982.

他, 論文2編・日本語著書および総説5編

#### 招待講演

1. CNRS, Jacques Monod Conference “Epigenetics in development and disease: perspectives from multiple organisms” Aussois (France), January 2006.