

# 学位論文要約

A novel Xist RNA-mediated chromosome inactivation model using a mouse artificial chromosome

(マウス人工染色体を用いた新規Xist RNA媒介染色体不活性化モデル)

(著者：稲岡大悟、砂村直洋、大平崇人、中山祐二、久郷裕之)

令和2年 Biotechnology Letters 掲載予定

雌雄間における性染色体情報の差を補償する機構として、哺乳類の雌ではX染色体不活性化機構が機能している。X染色体不活性化は、中心的な役割を果たす因子であるXist long non-coding RNA (lncRNA)が、染色体不活性化に必要なタンパク質を片方のX染色体特異的に集積させる機構であることが報告されている。近年、タンパク質の他に、染色体上に存在する反復配列であるlong interspersed nuclear element (LINE)がXist lncRNAの集積を媒介することが示唆されたが、反復配列であることから配列の削除や挿入による直接的な証明はされていない。本研究では、Xist lncRNAの機能検証を目的とした最小単位の染色体不活性化モデルとして、マウス人工染色体を用いた染色体不活性化モデル (Xist-MAC)を開発した。マウス人工染色体は、LINEを含めたゲノム要素を持たず、また、染色体上で機能している内在性遺伝子が存在しないことから、搭載した遺伝子の機能検証に相応しい資材である。

## 方法

Xist-MACの樹立に向けて、Xist遺伝子を完全に保持するBacterial artificial chromosomeから薬剤誘導性プロモーターを持つP1-derived artificial chromosomeに完全長のXist遺伝子に移した (Xist-PAC)。MACを保持するCHO細胞にXist-PACをリポフェクションすることで、MAC上に薬剤誘導性Xist遺伝子を搭載した (CHO Xist-MAC)。樹立したCHO Xist-MACを用いて、核型解析や定量性RT-PCRによるXist lncRNAの薬剤誘導評価、DNA-RNA FISHによる自己集積の評価を実施した。その後、微小核細胞融合法によりマウスES細胞へXist-MACを移入し、同様の評価を実施した。最後に、不活性化の評価をするために、マウス人工染色体上に存在する遺伝子(HygとEGFP)を対象とした、定量性RT-PCRによるmRNA発現量の測定とChIP-qPCRによるヒストン修飾変化の測定を実施した。

## 結 果

Xist-PACがCHO細胞へ正常に導入されたことを核型解析により評価した後、薬剤添加によるXist lncRNAの発現誘導を検証した。薬剤添加24時間後に評価した結果、薬剤未処理群と比較し有意に発現が亢進していることが認められた。また、DNA-RNA FISHの評価により、Xist lncRNAがマウス人工染色体周辺に自己集積している像を捉えた。続いて、マウスES細胞にXist-MACを移入した後、同様の評価を実施した。CHO Xist-MAC細胞と同様に、薬剤添加による有意な発現亢進や、マウス人工染色体への自己集積を認めた。最後に不活性化の評価のために分化誘導を0、24、72時間に分けて実施し、それぞれの分化段階におけるマウス人工染色体上に存在する遺伝子のmRNA発現量とヒストン修飾の変化を定量した。Hyg遺伝子については、分化誘導群である24、72時間においてmRNA発現量の有意な低下が認められた。また、不活性化マーカーであるH3K27me3の有意な増加も認めた。一方で、EGFPにおいては分化誘導によるmRNA量の低下は認められなかったが、H3K27me3の有意な増加は認められた。また、活性化マーカーであるH3K27acについてはHygとEGFPの両方において、有意な低下は認められなかった。

## 考 察

本研究では、X染色体不活性化機構を理解するための新しいモデルとしてXist-MACを開発した。不活性化評価において、H3K27me3では有意な増加が認められたが、H3K27acでは有意な変化が認められなかった。これらの結果は、Xist lncRNAを介したPRC2のリクルート機構は正常に機能したが、ヒストン脱アセチル化酵素であるHDAC3をリクルートするために必要な因子がXist-MAC上において不足しているため、脱アセチル化機構が十分に機能しなかったことを示唆する。また、EGFP遺伝子は分化誘導群においてもmRNA発現量の低下が認められなかった結果について、これはマウス人工染色体上でインシュレーター配列であるHS4に挟まれていることから、CTCFによるループアウトによりXist lncRNAの集積を回避した可能性が考えられる。これらの結果から、Xist-MACは最小限の因子で不活性化現象を模倣していることに加えて、Xist lncRNAが不活性化現象において要求する因子の探索に有効なツールであることが示唆された。

## 結 論

不活性化評価の結果から、Xist-MACは最小単位の染色体不活性化モデルであることが示された。Xist-MACは、Xist lncRNAが要求する因子の探索を可能にする有効な資材である。