

## 116. 生体内 X 染色体再活性化細胞の同定及び解析

大畑 樹也

Key words : X 染色体不活性化, エピジェネティクス,  
非コード RNA, 心臓

浜松医科大学 医学部 分子生物学講座

### 緒言

性染色体の一部は、雌雄異体の生物にみられる性の決定と分化を遺伝的に制御している。性染色体をもつ生物の宿命として、性染色体から発現される遺伝子量を雌雄間で“補償”する事が正常の発生に必須である。XX/XY システムの我々ほ乳類は、メスの X 染色体の片方が不活性化する事で、遺伝子量補償を行っている。この機構は X 染色体の不活性化と呼ばれている<sup>1)</sup>。一度不活性化された X 染色体は細胞分裂を経てもその不活性化状態が維持され、次世代の細胞に伝達される。しかしながら、胚盤胞の内部細胞塊、生殖細胞といった多能性・全能性をもった細胞では不活性化した X 染色体の再活性化が見られる。これは多能性・全能性の獲得にはエピジェネティックな状態を初期化する事が必要だからと思われる。

それでは、生殖細胞系などを除く全ての細胞、組織で X 染色体連鎖遺伝子量補償機構が本当に必要なのだろうか？また、例えば組織幹細胞などで、一時的に X 染色体がエピジェネティックな状態をより“初期的”な状態に戻すために生殖細胞系などと同様に X 染色体が再活性化される事はないだろうか？

我々は予備的解析により、発生中期の E13.5 日胚及び 4 ヶ月齢の心臓で、不活性化 X 染色体からの GFP 遺伝子発現を確認していた。しかしながら、①外来性の GFP 遺伝子だけではなく、本当に内在性 X 染色体上遺伝子にも X 染色体再活性化がおこっているのか？②もし内在性の遺伝子でも再活性化が起きているのであれば、遺伝子全体なのかそれともその一部なのか？といった新たな疑問も生じた。本研究では、これら疑問を実験的に検証した。

### 方法

#### 1. 実験マウス系統

X<sup>GFP</sup> 系統 no.38 及び no.50 は大阪大学の伊川正人先生より、JF1/MS マウスは国立遺伝学研究所の城石俊彦先生より、X<sup>GFP1</sup> 系統は近畿大学の佐渡 敬先生より譲渡された。

#### 2. 心臓からの GFP 陽性細胞単離と多型を用いた遺伝子発現の識別

E13.5 日の心臓を単離し、トリプシンによって細胞を分散、血清によりトリプシンを非動化し、セルストレイナーを用いて細胞片を取り除いた。GFP 陽性細胞を蛍光実体顕微鏡下で確認し、マウスピペットを用いて回収した。その細胞 6 つを集め 1 サンプルとし、杉本、阿部の方法を用いて、cDNA 合成、RT-PCR 反応、各種制限酵素切断を行い、多型を識別した<sup>2)</sup>。

### 結果

#### 1. X 連鎖 GFP トランスジェニック系統 no.50 における不活性化 X 染色体からの GFP 発現

成体 X<sup>ΔXist</sup>X<sup>TTGFP</sup> マウスを用いて、不活性化 X 染色体からの GFP 発現の再現性を確認した。X<sup>GFP</sup> マウスは、GFP 遺伝子が X 染色体の C3 バンドに挿入されている系統 no.50 を用いた (図 1A)<sup>3)</sup>。このマウスの母親由来 X 染色体上では、染色体不活性化を開始するのに必要な *Xist* 非コード RNA が欠失しているため (X<sup>ΔXist</sup>)、常に活性化 X 染色体に選ばれる。父親由来 X 染色体には GFP 遺伝子が組み込まれており (X<sup>GFP</sup>)、X 染色体不活性化によって常に GFP の発

現が抑えられる。また、父親由来 X 染色体にはドキシサイクリン投与により *Tsix* が誘導される TT アリル (*Tsix-Tet*) も有しているが<sup>4)</sup>、ドキシサイクリンを投与していないので TT アリルの影響はない。結果、このマウスでは、心臓以外の他の臓器からも GFP の発現が観察された (図 1B, 表 1)。特に、以前から確認されていた心臓に加え、骨格筋、膵臓でも顕著であった。また、胃、小腸、盲腸、大腸といった消化器官でも線上の GFP 発現が確認できた。その形状から、平滑筋ではないかと推測された。卵巣においても強い GFP 発現が確認されたが、これは正常な生殖細胞に観察される X 染色体再活性化を反映していると思われた。

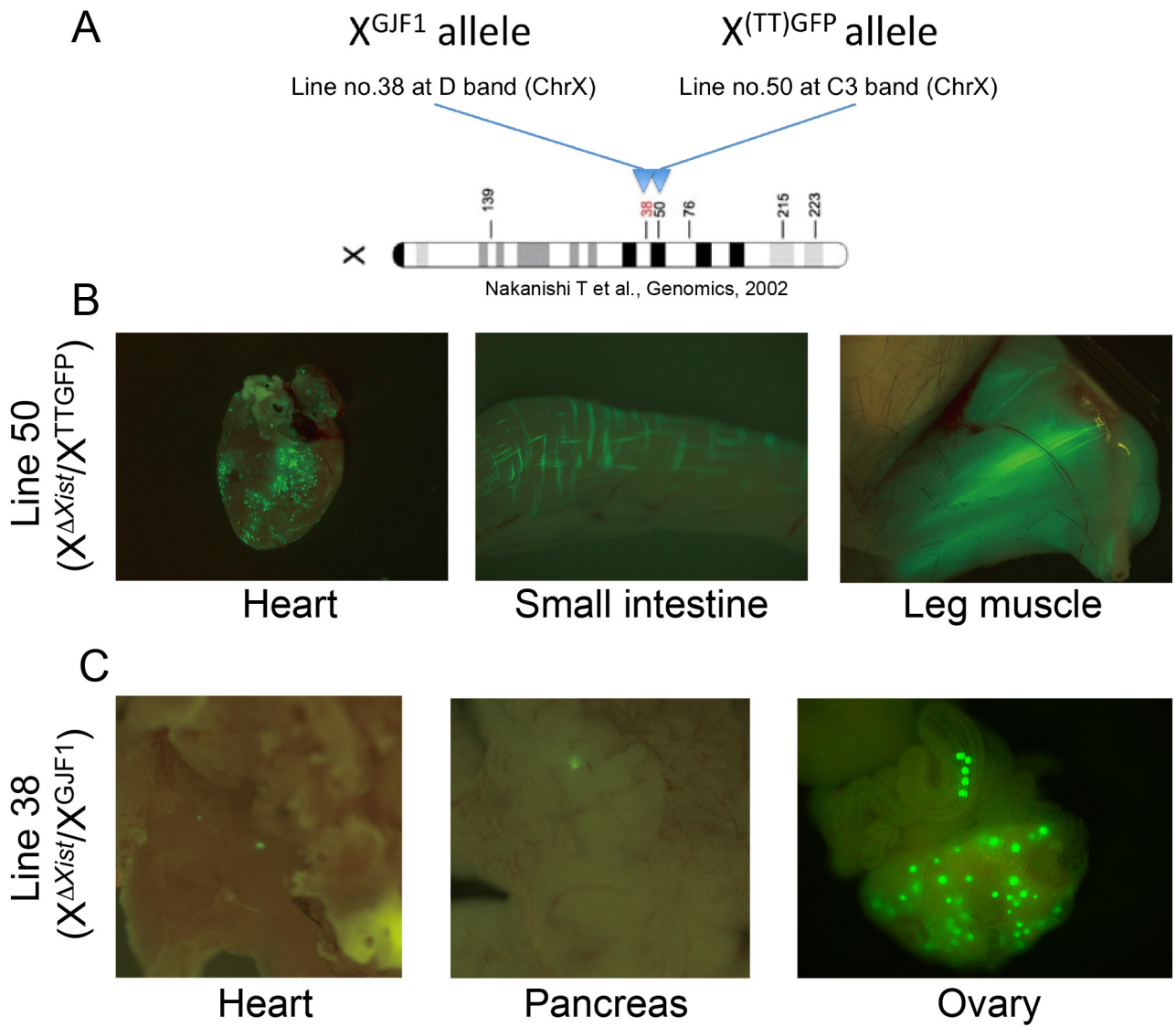


図 1. X 連鎖 GFP トランスジェニックマウスに観察された不活性化 X 染色体からの GFP 発現。  
 A) 系統 no.38 及び no.50 における GFP 遺伝子の X 染色体上への挿入部位<sup>3)</sup>。 B, C) 系統 no.50 (B) および no.38 (C) で確認された不活性化 X 染色体からの GFP 発現。 両系統間で共通して確認された GFP 発現組織は心臓、膵臓、卵巣 (未受精卵) であった。

表 1. 系統 no.50 ( $X^{TTGFP}$ ) と no.38( $X^{GJF1}$ ) との比較

GFP signals in various tissue			
		$\Delta Xist/TTGFP$ (line50)	$\Delta Xist/GJF1$ (line38)
	organ	GFP signal intensity	GFP signal intensity
skeletal muscle	breast muscle	strong	no signal
	belly muscle	strong	no signal
	leg muscle	strong	no signal
respiratory and circulatory organ	heart	strong	weak
	lung	weak	no signal
nervous system	brain	weak	no signal
digestive organ	liver	weak	no signal
	pancreas	strong	weak
	stmack	weak	no signal
	small intestine	weak	no signal
	cecum	weak	no signal
	large intestine	weak	no signal
Urinary and reproductive organ	kidney	no signal	no signal
	uterus	no signal	no signal
	ovary	strong	strong
blood and immue system	thymus	weak	no signal
	spleen	no signal	no signal
	fat	no signal	no signal

2.5 months

4 months

## 2. X連鎖GFPトランスジェニック系統 no.38における不活性化X染色体からのGFP発現

次に、系統 no.50 と同じ GFP 遺伝子を持つが、別の X 染色体上に組み込まれている、系統 no.38 を用いて同様の解析を行った (図 1A,  $X^{GJF1}$ )。この系統は、GFP 遺伝子が X 染色体の D バンドに組み込まれている。その結果、系統 no.50 で確認できた強い GFP 発現のほとんどが系統 no.38 では消失していた (表 1)。これに対して、心臓と脾臓のごく一部の細胞では、系統 no.38 においても GFP 陽性細胞が確認できた (図 1C, 表 1)。

## 3. 内在性 X 連鎖遺伝子は部分的に再活性化している

次に、JF1 の多型を用いた解析を行った。E13.5 日胚の  $X^{\Delta Xist}X^{GJF1}$  の心臓から GFP 陽性細胞を回収し (図 2A 及び 2B)、1 細胞 PCR 法および制限酵素切断を用いた多型判別法を用いて<sup>2)</sup>、活性化 X 染色体 ( $X^{\Delta Xist}$  アリル, *Mus musculus domesticus*) 及び不活性化 X 染色体 ( $X^{GJF1}$  アリル, その一部は JF1 系統, *Mus musculus molossinus* を含む) の内在性 X 連鎖遺伝子からの発現を解析した。結果、X 連鎖遺伝子 *Hprt* 及び *Rnf12* では、GFP 陽性細胞内で不活性化 X 染色体からの発現は確認できなかった。しかしながら、X 連鎖遺伝子 *Np15* では、不活性化 X 染色体からの部分的な発現が確認された (図 2C)。

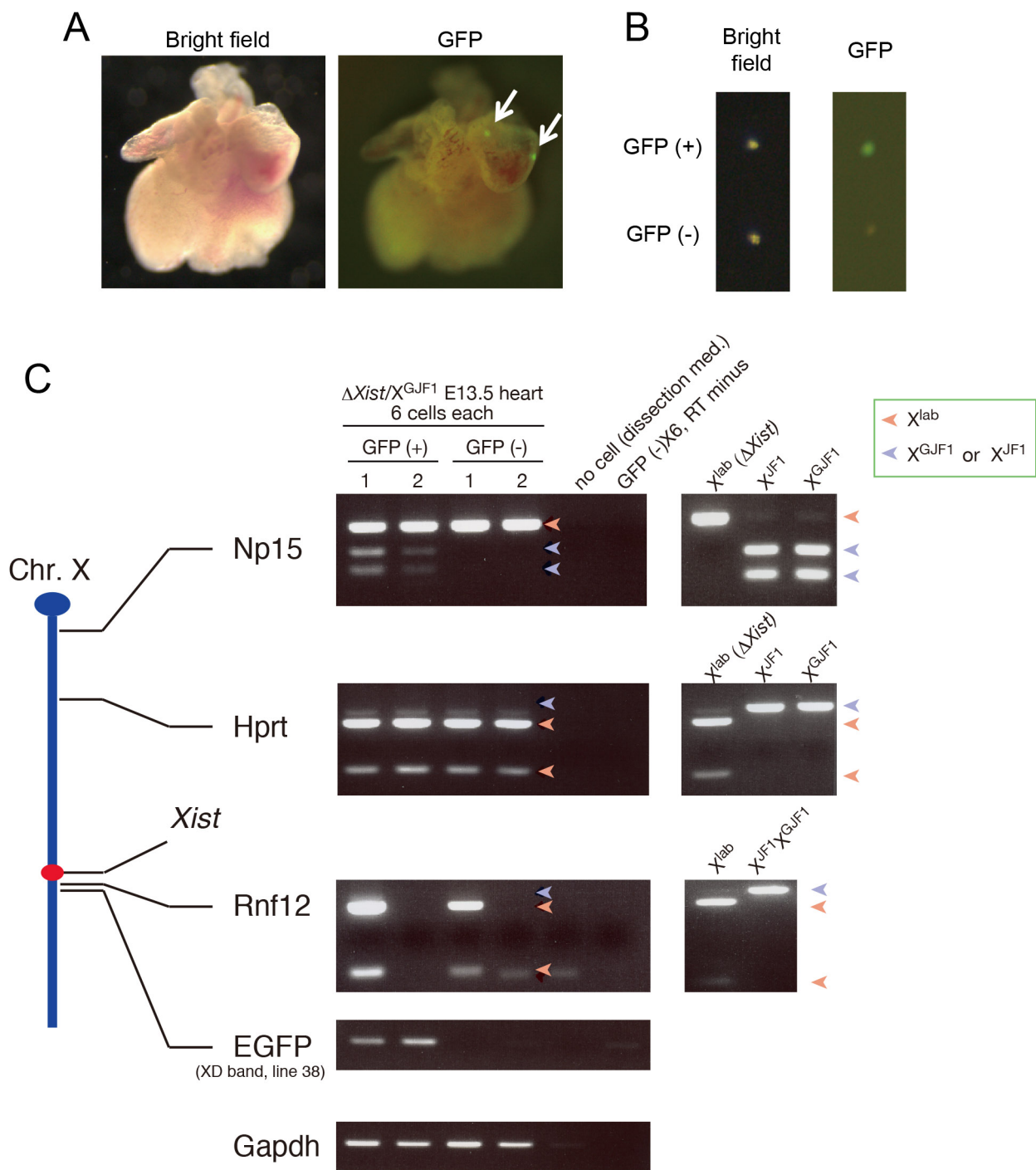


図2. 心臓の一部の細胞は部分的に再活性化している。

A)  $X^{\Delta Xist}X^{GJF1}$  の E13.5 日目の心臓。GFP 陽性細胞を矢印で示す。B) トリプシンにて分散した GFP 陽性細胞 (上) と陰性細胞 (下)。C) 多型を用いた不活性化 X 染色体からの内在性遺伝子発現の確認。GFP 陽性細胞では Np15 遺伝子が不活性化 X 染色体から部分的に再活性化している事がわかる。

## 考 察

今回の実験の結果、系統 no.50 では以前から確認されていた心臓に加え、骨格筋、脾臓といった別組織からも GFP 発現が観察された。同じトランスジーンを用いているにも関わらず、系統 no.50 で見られた強い GFP 発現のほとんどが no.38 で見られなかった事は、トランスジーンの挿入部位の違いが反映されている可能性が高い。例えば、系統 no. 50 のトランスジーンが X 染色体不活性化を間逃れやすい領域に挿入された事により、一部の細胞で GFP の発現が観察されたのかもしれない。

両系統間で共通して見られた GFP 発現は、再活性化がおこる生殖細胞を除いては、心臓及び脾臓の一部の細胞で確認された。心臓における内在性 X 連鎖遺伝子の発現を解析したところ、X 染色体遺伝子全体ではなく、その一部の遺伝子でしか再活性化は起きていなかった。これは、我々の同定した GFP 発現機構は、不活性化 X 染色体全体が再活性化する多能性・全能性細胞とは異なる事を示唆している。しかしながら、確かに GFP 陽性細胞では部分的に X 染色体不活性化状態が弛緩していた。これは、積極的・能動的に行われているのか（例えば分化・増殖能を持った組織幹細胞や前駆細胞といった特殊な細胞など）、あるいは偶発的・受動的に起こっているのか（長期に渡って細胞停止している心筋細胞でおこるエピジェネティクス状態の不安定化など。心臓疾患や心臓老化に関与？）今後明らかにしていきたい。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、浜松医科大学分子生物学講座の北川雅敏教授、松本美香、佐野文都である。最後に、ご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) Ohhata, T. & Wutz, A. : Reactivation of the inactive X chromosome in development and reprogramming. *Cell Mol. Life Sci.*, **70** : 2443-2461, 2013.
- 2) Sugimoto, M. & Abe, K. : X chromosome reactivation initiates in nascent primordial germ cells in mice. *PLoS Genet.*, **3** : e116, 2007.
- 3) Nakanishi, T., Kuroiwa, A., Yamada, S., Isotani, A., Yamashita, A., Tairaka, A., Hayashi, T., Takagi, T., Ikawa, M., Matsuda, Y. & Okabe M. : FISH analysis of 142 EGFP transgene integration sites into the mouse genome. *Genomics*, **80** : 564-574, 2002.
- 4) Ohhata, T., Senner, CE., Hemberger, M. & Wutz, A. : Lineage-specific function of the noncoding Tsix RNA for Xist repression and Xi reactivation in mice. *Genes Dev.*, **25** : 1702-1715, 2011.