

学位論文審査結果の報告書

氏 名 千木 雄太

生 年 月 日 昭和・平成 元 年 6 月 3 日

本 籍 (国籍) 東京都

学位の種類 博 士 (農 学)

学位記番号 第 **229** 号

学位授与の条件 学位規程第 5 条該当
(博士の学位)

論 文 題 目 X i s t A リ ピ ー ト 領 域 の
ク ロ マ チ ン 結 合 能 と X 染 色 体
不 活 性 化

学位論文受理日 平成30年 1月16日

学位論文審査終了日 平成30年 2月20日

審 査 委 員

(主 査) 佐渡 敬



(副主査) 加藤 容子



(副主査) 川崎 努



(副 査)



(指導教員)

佐渡 敬



論文内容の要旨

雌雄で性染色体構成が異なるほ乳類は、メス (XX) が オス (XY) との間のX染色体連鎖遺伝子量の差を補償するため、2本のX染色体のうち一方を胚発生のごく初期に不活性化する。このX染色体全域にわたる不活性化は、メスにおいて一方のX染色体から転写されるXist RNAがそのX染色体を覆うことによって開始される。Xist RNAはRNAポリメラーゼIIによって転写され、核外輸送を促進するスプライシングやポリアデニル化などタンパク質をコードするmRNA同様のプロセッシングを受けるが、核外へ輸送されることなくX染色体に集積する。その後、Xist RNAと相互作用する因子によってX染色体に様々なエピジェネティック修飾が導入され、染色体の凝縮が起こり、不活性化が確立されていくと考えられている。最近、Xist RNAのX染色体への集積には、核マトリクスの主要構成成分であるhnRNP Uが関与することが報告された。hnRNP Uをメスの培養細胞でノックダウンすると不活性X染色体はXist RNAの集積を失う。しかし、そのXist RNAは依然核内に観察されたことから、Xist RNAはX染色体へ集積できなくてもクロマチンに結合しているように思われた。一方、これまでに不活性X染色体の凝縮に関わるタンパク質としてSmcHD1およびHBBiX1が同定されているが、X染色体の凝縮に関わるXist RNA中の配列は不明であった。千木君はX染色体への集積には依存しないXist RNAのクロマチン結合能は、X染色体の凝縮に関わる可能性があるのではないかと考え、本研究を行った。

不死化したマウス胚線維芽細胞でhnRNP Uの機能阻害を行い、その時のXist RNAの挙動を解析した。その結果、以前の報告にある通りhnRNP Uの機能を阻害するとXist RNAのX染色体への集積は失われるが、Xist RNAは依然核内に散在していることがRNA-FISHにより確認された。さらに分子生物学的な解析により、散在したXist RNAは核に留まり、クロマチンに結合していることを見出した。

次にhnRNP Uを介したXist RNAの不活性X染色体への集積とは独立したXist RNAのクロマチン結合能を担う配列を探索するために、NIH3T3細胞においてXist RNAの部分配列を強制発現する系を作製した。6-kbずつに3分割したXist RNAの断片を発現させたが、hnRNP U非依存的な挙動を示す断片を見出すことはできなかった。

そこで、ヒト培養細胞において既に報告されていたhnRNP UのCLIP-seqのデータの再解析を行い、hnRNP Uのより詳細な結合領域を探索することにした。その結果、hnRNP UはヒトXIST RNAのほぼ全域に渡って結合しているものの、5'側のAリピートと呼ばれる反復配列を含む領域ではその結合が乏しいことがわかった。Aリピート領域はXIST RNAの引き起こす不活性化に重要な役割を果たすと考えられる配列で、種間で高度に保存されていることから、マウスにおける当該領域 (950-nt) もhnRNP Uの結合が乏しいと考えられた。そこで、NIH3T3細胞における発現系を利用し、950-nt RNA断片の

挙動を解析した。その結果、950-nt断片がhnRNP Uの機能阻害を行った際のXist RNA同様、核内に散在するとともに、クロマチンに結合していることが示唆された。

950-ntのRNA断片の中には Xist RNAが引き起こすX染色体不活性化に必須なAリピート領域が含まれることから、この散在型のクロマチン結合とAリピート、およびX染色体不活性化との関連について、さらに解析を進めた。950-nt RNA断片中のAリピート領域に変異を導入した断片 (950-nt mut) および950-ntのアンチセンス鎖をコードするRNA断片 (950-nt as) をNIH3T3細胞で発現させ、それらの挙動を調べた。その結果、950-nt mut, 950-asのRNA断片はいずれもゲノム中の挿入部位で発現が認められるだけで、核内に散在する様子は観察されなかった。

950-nt, 950-nt mut, 950-nt asの各RNA断片の挙動について、発現レベルやコピー数の違い、ゲノム挿入部位の影響などを排除した形で調べるために、それぞれの発現コンストラクトをジーンターゲティングによってColl1a1遺伝子座に1コピーだけ導入したES細胞を作製した。その結果は、いずれもNIH3T3での発現誘導系と同様であった。

以上の解析から、本研究においてXist RNAはhnRNP Uを介したX染色体への集積とは独立にクロマチンに結合する能力を持つことがわかった。さらにこの結合には種間で保存され、Xist RNAによるX染色体不活性化を担う機能ドメインとして知られるAリピート領域が重要な役割を果たしていることが示唆された。Aリピートに変異を導入すると950-nt RNA断片の挙動に変化が生じたことから、今回明らかになったhnRNP U非依存的なXist RNAのクロマチン結合能がXist RNAが引き起こすX染色体不活性化に重要な役割を果たしている可能性がある。

論文審査結果の要旨

本学位論文研究では、ほ乳類のメスに特有な遺伝子発現制御機構であるX染色体不活性化において、中心的な役割を果たす長鎖ノンコーディングRNAであるXist RNAの作用機序の解明に向けた、新たな取り組みを行っている。X染色体にコードされるXist RNAは、メスの胚発生初期に一方のX染色体からのみ発現され、そのX染色体全域を覆う。これが足場となって、ヘテロクロマチンの形成や転写の抑制に関わる様々なタンパク質がXist RNAによって覆われたX染色体に呼び寄せられ、染色体全域にわたる不活性化を引き起こすと考えられている。RNAをブルダウンする技術や微量のタンパク質試料を用いた質量分析技術の進歩が大きなブレークスルーとなって、近年Xist RNAと相互作用する因子が数多く同定され、Xist RNAが染色体のヘテロクロマチン化を引き起こす分子基盤の解明が近い将来飛躍的に伸展すると期待されている。一方、Xist RNAがどのようにしてこれを発現するX染色体だけをシスに覆い、他方のX染色体を覆うことがないのか、X染色体上をどのように広がっていくのか、などXist RNAの局在や伝播の仕組みについてはあまり理解が進んでいない状況にある。しかし、2010年Hasegawa et al.によって、核マトリクスの主要構成因子の一つであるRNA結合タンパク質のhnRNP Uが、Xist RNAのX染色体への係留を担う重要な因子であることが報告され、その中で示されたデータのの一つが本学位論文研究に着手する大きなきっかけを与えている。hnRNP Uをメスの培養細胞でノックダウンすると不活性X染色体はXist RNAの集積を失うことをHasegawa et al.は示した。しかし、X染色体から外れたXist RNAは依然核内に観察されたことから、千木君はXist RNAはX染色体へ集積できなくてもクロマチンに結合しているのではないかと考え、その実態を明らかにするために本研究に着手した。

最初の取り組みとして、不死化したマウス胚線維芽細胞において、siRNAの導入によるhnRNP Uの機能阻害を行い、その時のXist RNAの挙動をRNA-FISHにより観察した。その結果、Hasegawa et al.の報告にある通りhnRNP Uの機能を阻害するとXist RNAのX染色体への集積は失われるが、Xist RNAは依然核内に散在していることが確認された。さらに細胞を細胞質、核、さらには核を核質とクロマチンに分画し、それぞれの画分のRNAを用いて、定量RT-PCRを行い、散在したXist RNAは核に留まり、クロマチンに結合していることを見出している。この結果は、千木君の仮説を強く支持するもので、以降の解析を推し進めることの妥当性を示す、非常に重要なデータとなっている。

次に、こうして見出されたXist RNAのクロマチン結合能を担う領域の探索に取りかかっている。そのために、Xist RNAの部分的な断片の発現をドキシサイクリンの添加によって誘導できるNIH3T3細胞の解析系を作りあげ、解析に用いた。まず、Xist RNAを3つの領域に分割し、おのおののRNA断片の挙動を解析した結果、いずれもhnRNP Uを介したクロマチン結合と分離することが困難であることが示唆された。そこで、千木君は既に公表されていたヒトの培養細胞を用いたhnRNP UのCLIP-seqの結果に着目し、ヒトXIST RNAに結合するhnRNP Uの分布を解析している。その結果、

hnRNP はXIST RNAのほぼ全域にわたって結合するものの、5' 端から0.9-kbの領域はhnRNP Uの結合が乏しいことを見出した。そこで、前述のNIH3T3細胞の解析系を用い、マウスの対応する領域950ntからなるRNA断片の挙動を調べると、これがhnRNP Uを阻害した細胞におけるXist RNAとよく似た挙動、すなわち核内の散在とクロマチンへの結合を示すことがわかった。この950nt領域は、Xist RNAによる染色体サイレンシングに不可欠なAリピートと呼ばれるヒトとマウスで保存された反復配列を含んでいたことから、千木君は950nt RNA断片のクロマチン結合能とAリピートの機能の関連について、さらに解析を進めた。

彼は、Aリピート領域に変異を導入したRNA断片と950nt断片の相補鎖をコードするRNA断片をNIH3T3細胞に発現させ、その挙動を調べたところ、これらが核内に散在することはなく、クロマチンへの結合を示さないことが示唆された。この解析によって、千木君は950ntが持つクロマチン結合能にはXist RNAの機能に不可欠なAリピート領域の存在が重要であるという結論に至っている。しかし、これら3断片の解析がNIH3T3に導入されたマルチコピーの発現コンストラクトからの発現に基づく解析であったため、千木君は最後により明確な形でこの結論を検証している。それはジーンターゲットングにより、これら3つの発現コンストラクトをゲノム上の単一遺伝子座に1コピーだけ導入し、発現レベルやコピー数の違い、ゲノム挿入部位の影響などを排除した形で調べるといふものである。得られた結果は、やはり彼の結論を支持するものであった。

以上の解析から、Xist RNAはhnRNP Uを介したX染色体への集積とは独立にクロマチンに結合する能力を持つことがわかった。さらにこの結合には種間で保存され、X染色体不活性化を担うXist RNAの機能ドメインとして知られるAリピート領域が重要な役割を果たしていることが示唆された。Aリピートに変異を導入すると950nt RNA断片の挙動が変化することから、今回明らかになったhnRNP U非依存的なXist RNAのクロマチン結合能はXist RNAが引き起こすX染色体不活性化に重要な役割を果たしている可能性がある。こうした結果をもとに千木君は、「Xist RNAはhnRNP UによってX染色体に集積する一方、Aリピート領域はそのクロマチン結合能によって、Xist RNAが足場を提供することで形成されるヘテロクロマチン領域に、順次近傍のクロマチンを引き込み、X染色体上の遺伝子を染色体全域にわたって不活性化していく」という新たなモデルを提唱している。これはAリピートの機能としてこれまでに全く議論されたことのない新しい可能性で、大変興味深い仮説と言える。本研究は様々な生命現象に関与することが指摘される長鎖ノンコーディングRNAの作用機序を考えるうえでも重要な成果で、今後の関連分野への波及効果が大きいと期待できる。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、審査にあたっては、論文に関する専攻内審査および公聴会など所定の手続きを経たうえ、平成30年2月20日、農学研究科教授会において、論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が十分であると認められた。