

博士学位論文

マウス X 染色体不活性化の維持における
SmcHD1 の役割

近畿大学大学院

農学研究科バイオサイエンス専攻

市原 沙也

博士学位論文

マウス X 染色体不活性化の維持における

SmcHD1 の役割

令和 4 年 5 月 20 日

近畿大学大学院

農学研究科バイオサイエンス専攻

市原 沙也

目次

要約.....	1
Summary	6
第1章 序論.....	11
1-1. 遺伝子量補償	11
1-2. 条件的ヘテロクロマチンと構成的ヘテロクロマチン	13
1-3. マウスにおける X 染色体不活性化.....	15
第2章 結果.....	21
2-1. <i>Smchd1^{MD1MD1}</i> 胚からの EpiSC の樹立.....	21
2-2. <i>Smchd1^{MD1MD1}</i> EpiSC では不活性 X 上の大多数の遺伝子が抑制されている	29
2-3. EpiSC において免疫染色で可視化される不活性 X 染色体上の H3K27me3 と H2AK119ub は野生型よりも <i>Smchd1^{MD1MD1}</i> でより濃く染色される	37
2-4. <i>Lrif1</i> は EpiSC の不活性 X 染色体に集積せず、SmcHD1 欠損下ではヘテロクロマチンとの相互作用が失われる.....	42
2-5. 変異型 MEF において H3K27me3 が低い SmcHD1 依存的な X 連鎖遺伝子は EpiSC では H3K27me3 を獲得している.....	48
2-6. SmcHD1 欠損は EpiSC において不活性 X 上の H3K9me3 の集積の大幅な消失を招く.....	50
2-7. SmcHD1 の欠損による不活性 X 上の H3K27me3 への影響	58
第3章 考察.....	61
第4章 材料と方法.....	70
4-1. マウスの系統維持と交配.....	70
4-2. 細胞培養	70
4-3. RNA-FISH	71
4-4. RT-PCR によるアレル特異的遺伝子発現解析	72
4-5. Immuno-RNA FISH	72

4-6. 免疫蛍光染色	73
4-7. 蛍光強度の定量	74
4-8. アレル特異的 RNA-seq	74
4-9. ウェスタンブロッティング	76
4-10. クロマチン免疫沈降 (Chromatin immunoprecipitation) とアレル特異的 ChIP-seq	76
参考文献	82

要約

哺乳類のメスは胚発生初期に 2 本ある X 染色体うちの一方を不活性化することで、X 染色体を 1 本しかもたないオスとの間にある X 染色体連鎖遺伝子量の差を補償する (X 染色体不活性化, XCI)。XCI の過程では、将来不活性化される X 染色体からの *Xist* RNA の発現上昇をきっかけに、ヘテロクロマチン化に関わる様々なエピジェネティック制御因子がその X 染色体に呼び込まれ、段階的に不活性化が進行し、最終的に安定なヘテロクロマチンが構築されると考えられる。不活性 X 染色体に集積するタンパク質の 1 つである SmcHD1 は、XCI の維持や不活性 X の高次クロマチン構造の構築に重要であることが報告されている。最近の我々の解析から、*Smchd1* 欠損 (*Smchd1^{MD1/MD1}*) のマウス胚線維芽細胞 (MEF) では、いったん不活性化された不活性 X 上の遺伝子の約半数が脱抑制され、さらにそれらの遺伝子座では抑制型のヒストン修飾であるヒストン H3 の N 末端から 27 番目のリシン残基のトリメチル化 (H3K27me3) の集積が野生型に比べ有意に低下していることが分かった。これらのことから、SmcHD1 は不活性 X における H3K27me3 の構築あるいは維持に深く関わることを示唆された。しかし、これは XCI が確立された、分化した体細胞集団の MEF におけるスナップショットの解析であり、XCI の過程における染色体ワイドなクロマチン動態については依然不明であった。本研究では、胚発生過程の XCI における SmcHD1 の役割をより詳細に調べるため、XCI が始まって間もない時期の *Smchd1^{MD1/MD1}* 胚のエピブラストからエピブラスト幹細胞 (EpiSC) を樹立し、その XCI の様子を MEF と比較し、解析した。

I) EpiSC の樹立と遺伝子発現解析

胎生 6.5 日目 (E6.5) の野生型と *Smchd1*^{MD1/MD1} マウス胚のエピブラストから EpiSC を複数株樹立した。EpiSC を着床後のエピブラストのモデルと使うことの妥当性を評価するため、分化誘導前後の EpiSC における不活性 X の不活性化状態を 5 つの X 連鎖遺伝子について調べた。未分化な EpiSC では野生型と *Smchd1*^{MD1/MD1} ともにいずれの遺伝子も不活性 X では発現が抑制されていたのに対し、分化誘導後の *Smchd1*^{MD1/MD1} の EpiSC では 5 つの遺伝子のうち 3 つで不活性 X からの脱抑制が認められた。*Smchd1*^{MD1/MD1} の EpiSC では不活性 X 上で抑制されている遺伝子が、分化させると胚同様に脱抑制されることから、EpiSC は XCI が開始して間もない時期の細胞における SmcHD1 の機能を調べるモデルになると判断した。

次に RNA-seq により遺伝子発現を染色体ワイドに調べたところ、*Smchd1*^{MD1/MD1} EpiSC では *Smchd1*^{MD1/MD1} MEF で脱抑制されていた X 連鎖遺伝子の多くが抑制されていることが分かった。すなわち、EpiSC では MEF と異なり、SmcHD1 欠損下においても不活性 X 上の多くの遺伝子の抑制状態を概ね維持できていると判断した。

II) 不活性 X に集積する H3K27me3 と H2AK119ub は野生型よりも *Smchd1*^{MD1/MD1} の細胞でシグナル強度が増大する

これまでにマウスやヒトなど複数の動物種で H3K27me3 やヒストン H2A の N 末端から 119 番目のリシン残基のモノユビキチン化 (H2AK119ub) に代表される抑制型のヒストン修飾が、不活性 X に集積していることが報告されている。一方、別の抑制型ヒストン修飾であるヒストン H3 の N 末端から 9 番目のリシン残基のトリメチル化 (H3K9me3) は、ChIP-seq による解析では、マウスでもヒトでも不活性 X 上に集積していることが報告されているが、免疫蛍光染色による観察ではヒトやその他哺乳類の不活性 X では H3K9me3 の集積が認められるのに対し、マウスの不活性 X ではその集

積が認められないことが知られる。今回用いた EpiSC で不活性 X における H3K27me3 と H2AK119ub の集積を免疫染色で調べると、いずれの修飾も SmcHD1 の有無にかかわらず、MEF 同様不活性 X に集積していることがわかった。しかし、これら 2 つのヒストン修飾のシグナル強度を定量すると、EpiSC でも MEF でも野生型に比べ *Smchd1^{MD1/MD1}* 細胞では、有意な増大が認められた。H3K9me3 については、免疫染色と Immuno-RNA FISH で調べたが、EpiSC でも MEF 同様不活性 X にその集積は認められなかった。しかしながら、構成的ヘテロクロマチン領域に集積することが知られている H3K9me3 の分布を EpiSC と MEF で比較すると、EpiSC ではより核膜周辺に分布しており、両者の違いが見出された。

III) SmcHD1 相互作用因子 *Lrif1* は、SmcHD1 非存在下では核内で特定の集積を失う

SmcHD1 とその相互作用因子である *Lrif1* (ヒトでは HBiX1 と呼ばれる) は不活性 X に集積し、クロマチンの凝縮に関わることが報告されている。EpiSC と MEF でそれぞれのタンパク質の集積を免疫染色により調べると、SmcHD1 は EpiSC でも MEF でも野生型の細胞では不活性 X に集積する H3K27me3 と共局在を示すのに対し、*Lrif1* は MEF では SmcHD1 同様不活性 X に集積する H3K27me3 と共局在するものの、EpiSC では H3K27me3 が集積する領域のごく一部にしか集積せず、不活性 X 上でのその集積は限定的であることがわかった。興味深いことに、*Smchd1^{MD1/MD1}* の EpiSC と MEF では *Lrif1* の量は野生型と変わらないものの、核内で特定の局在を示さなくなることがわかった。II) の結果を含め、これらのことから、EpiSC と MEF の間では構成的ヘテロクロマチンと条件的ヘテロクロマチンの状態に一定の差があると考えられ、EpiSC のクロマチン状態は XCI が開始する前の細胞から XCI が安定に維持されている細胞への過渡期に対応することが示唆される。

IV) SmcHD1 依存的な X 連鎖遺伝子は EpiSC では H3K27me3 を獲得している

我々の以前の解析から、*Smchd1*^{MD1/MD1} MEF で H3K27me3 が減少し、脱抑制している遺伝子の多くが、野生型の胚盤胞で H3K27me3 の濃縮の程度が有意に低い遺伝子群に含まれることがわかっている。*Smchd1*^{MD1/MD1} MEF で H3K27me3 が減少し脱抑制している遺伝子について、H3K27me3 の集積を EpiSC で調べると、*Smchd1*^{MD1/MD1} 胚でも野生型と同等の H3K27me3 の集積が認められた。このことから *Smchd1*^{MD1/MD1} 胚で脱抑制される遺伝子は、XCI 開始後間もない細胞でいったんは H3K27me3 を獲得するが、SmcHD1 欠損のため、その状態を維持できず最終的に H3K27me3 を失い脱抑制されることが示唆される。

V) SmcHD1 の欠損は不活性 X 上の H3K9me3 の大幅な減退を招く

SmcHD1 欠損が不活性 X のエピジェネティック制御におよぼす影響をより詳細に調べるために、不活性 X 上の H3K27me3 と H3K9me3 の分布を ChIP-seq により調べた。免疫染色では H3K9me3 の不活性 X への集積は認められなかったが、ChIP-seq では野生型の EpiSC と MEF のいずれにおいても H3K9me3 の明らかな集積がいくつかのブロックとして確認され、その分布は H3K27me3 が集積して形成されるブロックと概ね相互排他的であった。一方、*Smchd1*^{MD1/MD1} EpiSC と MEF の不活性 X では H3K9me3 の集積が著しく減退し、その分布は極めて限定的なものとなり、H3K27me3 が H3K9me3 の減退した領域の一部に広がっていた。また、*Smchd1*^{MD1/MD1} 細胞で不活性 X 上に限定的に認められた H3K9me3 のピークは活性 X 上にもわずかにも限定的に認められる H3K9me3 のピークの位置と一致していた。

本研究で私は、XCIが始まって間もない時期のエピブラストから樹立した EpiSC と XCIが確立された体細胞集団の MEF を比較することで、エピジェネティック制御因子の1つである SmcHD1 の XCI の過程での機能を調べた。本研究は SmcHD1 の欠損が、XCI の開始によりいったんは不活性化される X 連鎖遺伝子の脱抑制を染色体ワイドに引き起こすことを示唆している。また、EpiSC におけるヘテロクロマチンは MEF のヘテロクロマチンとは異なる状態にあり、XCI が起こる前の細胞と安定な XCI を確立した細胞の過渡期の状態を反映していると考えられる。さらに SmcHD1 の欠損が EpiSC においても MEF においても不活性 X 上の H3K9me3 の著しい減退を招くことから、SmcHD1 が不活性 X 上に H3K9me3 が集積するブロックを形成するのに重要な役割を果たすことが示唆された。これまで、マウスの XCI における H3K9me3 の重要性は殆ど議論されてこなかったが、本研究の結果から、H3K9me3 が H3K27me3 とともに堅牢なヘテロクロマチンの構築を担うという、従来の想定されていなかった可能性が示唆された。これまでの報告から、XCI の過程で SmcHD1 は不活性 X の高次クロマチン構造の構築に寄与していると考えられてきたが、その詳しいメカニズムは不明であった。不活性 X の高次構造の構築は SmcHD1 に依存した H3K9me3 ブロックの正常な確立により促進され、この H3K9me3 が堅牢なヘテロクロマチンの基盤となっているのではないかと推察する。

Summary

Mammalian females inactivate one of their two X chromosomes during early embryogenesis to compensate for the difference in X-linked gene dosage between the sexes with only one X chromosome being transcriptionally active (X-chromosome inactivation, XCI). In the process of XCI, various epigenetic regulators involved in heterochromatinization are recruited to the X chromosome, leading to its chromosome-wide inactivation and the eventual establishment of stable heterochromatin. SmcHD1, one of the proteins that accumulates on the inactive X chromosome, has been reported to play important roles for the maintenance of XCI and the establishment of higher-order chromatin organization on the inactive X. Our recent analysis has shown that in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) prepared from *Smchd1*-deficient (*Smchd1*^{MD1/MD1}) fetuses, about half of the genes inactivated on the X chromosome early on upon the initiation of XCI are derepressed. In addition, the accumulation of H3K27me3, one of repressive histone modifications, was significantly diminished at these loci as compared to those in the wildtype. These results suggested that SmcHD1 is involved in the establishment or maintenance of H3K27me3 on the inactive X. However, this was a snapshot in MEFs, which consisted of heterogeneous differentiated somatic cells with XCI being established, and therefore, the chromosome-wide chromatin dynamics during XCI remained unclear. In this study, I established epiblast stem cells (EpiSCs) from the epiblasts of *Smchd1*^{MD1/MD1} embryos assuming them as a model of cells at the stage shortly after the onset of XCI and investigated the role of SmcHD1 in XCI during

embryogenesis by comparing the chromatin state of the inactive X between EpiSCs and MEFs.

I) Establishment of EpiSCs and gene expression analysis

EpiSCs were established from the epiblast of E6.5 wild-type and *Smchd1*^{MD1/MD1} mouse embryos. To evaluate the validity of using EpiSCs as a model for post-implantation epiblasts, the X-inactivated state in EpiSCs before and after differentiation was examined for five X-linked genes. In undifferentiated state their expression in both wild-type and *Smchd1*^{MD1/MD1} EpiSCs was repressed on the inactive X, whereas three out of the five genes were found to be derepressed on the inactive X in *Smchd1*^{MD1/MD1} EpiSCs after differentiation. This suggested that genes repressed on the inactive X in *Smchd1*^{MD1/MD1} EpiSCs became derepressed as they differentiated like mutant embryos. It seems, therefore, reasonable to assume that EpiSCs could serve as a model for early post-implantation epiblast and allow me to investigate the function of SmcHD1 in the kinetics of chromatin regulation during XCI.

Next, I examined gene expression chromosome-wide by RNA-seq and found that many of the X-linked genes that were derepressed in *Smchd1*^{MD1/MD1} MEFs were repressed in *Smchd1*^{MD1/MD1} EpiSCs. It is, therefore, likely that unlike MEFs, most of the X-linked genes in EpiSCs are repressed even in the absence of SmcHD1.

II) Fluorescence signals of H3K27me3 and H2AK119ub on the inactive X increase their intensity in *Smchd1*^{MD1/MD1} cells compared to wild-type cells

It has been reported that repressive histone modifications, such as H3K27me3 and H2AK119ub, accumulate on the inactive X in many animal species including mouse

and human. On the other hand, another repressive histone modification, H3K9me3, has been reported to accumulate on the inactive X in human and other mammals but not in the mouse by immunofluorescence staining although recent ChIP-seq analysis demonstrated that H3K9me3 was enriched on the inactive X in both human and mouse. The accumulation of H3K27me3 and H2AK119ub on the inactive X in EpiSCs used in this study was examined by immunostaining, and both modifications were found to accumulate on the inactive X as seen in MEFs regardless the presence or absence of SmcHD1. However, comparison of the signal intensity for these two histone modifications revealed that in both EpiSCs and MEFs, *SmcHD1^{MD1/MD1}* cells gave more intense signal than wild-type cells. Accumulation of H3K9me3 on the inactive X was detected in neither EpiSCs nor MEFs by immunostaining and Immuno-RNA FISH. It should be noted, however, that the distribution of H3K9me3, which is thought to be enriched at constitutive heterochromatin, was distinct between EpiSCs and MEFs. H3K9me3 in EpiSCs distributed in more nuclear periphery than that in MEFs, indicating some difference in chromatin state between these two cell types.

III) SmcHD1-interacting factor Lrif1 loses its specific accumulation in the nucleus in the absence of SmcHD1

SmcHD1 and its interacting factor Lrif1 (called HBiX1 in humans) have been reported to accumulate on the inactive X and to be involved in chromatin condensation. Immunostaining of each protein in EpiSCs and MEFs revealed that SmcHD1 accumulated on the inactive X in both EpiSCs and MEFs, whereas Lrif1 accumulated on the inactive X in MEFs, but only at a limited part of the inactive X in EpiSCs. Interestingly, in *SmcHD1^{MD1/MD1}* EpiSCs and MEFs, Lrif1 no longer shows

a specific localization in the nucleus, although the amount of the protein is essentially the same as in wild-type cells. These results, including those of II), suggest that there is a certain difference in nature of constitutive heterochromatin and facultative heterochromatin between EpiSCs and MEFs.

IV) SmcHD1-dependent X-linked genes acquire H3K27me3 in EpiSCs

In our previous reports, we found that the derepressed genes with reduced enrichment of H3K27me3 in *Smchd1^{MD1/MD1}* MEFs were among a group of genes with significantly lower enrichment of H3K27me3 in wild-type blastocysts during early development. Enrichment of H3K27me3 at loci of those derepressed in *Smchd1^{MD1/MD1}* MEFs was examined in EpiSC, and it was found that the enrichment of H3K27me3 in *Smchd1^{MD1/MD1}* EpiSCs was comparable to that in wild-type cells. This suggests that the genes that are derepressed in *Smchd1^{MD1/MD1}* embryos initially acquires H3K27me3 at the early stage of XCI but fail to maintain its status due to the lack of SmcHD1, and eventually lose H3K27me3 and become derepressed.

V) Loss of SmcHD1 leads to a significant reduction of H3K9me3 on the inactive X

To further investigate the effect of SmcHD1 deficiency on the epigenetic regulation of the inactive X, I carried out ChIP-seq to examine the distribution of H3K27me3 and H3K9me3 on the inactive X. Although immunostaining showed no accumulation of H3K9me3 on the inactive X, clear enrichment of H3K9me3 was observed in both wild-type EpiSCs and MEFs forming some blocks, which distribute roughly mutually exclusive with those of H3K27me3 on the inactive X. On the other hand, the enrichment of H3K9me3 was extensively diminished on the inactive X in *Smchd1^{MD1/MD1}* EpiSCs and MEFs with the distribution of H3K27me3 being partially

expanded into the region where H3K9me3 usually occupied. In addition, the regions that still retained some enrichment of H3K9me3 on the inactive X in *Smchd1^{MD1/MD1}* cells harbored the peak of limited enrichment of H3K9me3 on the active X.

In this study, I investigated the function of SmcHD1, one of the epigenetic regulators, in the process of XCI by comparing expression and chromatin state of the inactive X in EpiSCs established from the epiblast, which has just initiated XCI, with those in MEFs, in which XCI has been established. This study strongly suggests that the loss of SmcHD1 causes chromosome-wide derepression of X-linked genes that have been inactivated at the early phase of XCI. In addition, I found that lack of SmcHD1 leads to an extensive loss of H3K9me3 on the inactive X in EpiSCs and MEFs, suggesting that SmcHD1 underlies the formation of H3K9me3-enriched blocks on the inactive X. Although the importance of H3K9me3 for the epigenetic regulation of the inactive X has been largely overlooked in the mouse, this study suggests unprecedented possibility of H3K9me3, which may play a role in establishing robust heterochromatin state in combination with H3K27me3. Previous reports suggested that SmcHD1 contributes to organize higher-order chromatin structures of the inactive X during XCI, but the detailed mechanism has remained unclear. I speculate that construction of the higher-order structures of the inactive X might be facilitated by the establishment of H3K9me3 blocks, which serve as a fundamental structure of the robust heterochromatin.

第 1 章 序論

1-1. 遺伝子量補償

染色体から転写される遺伝子の発現量はその個体の生命活動に重大な影響を及ぼす。ヒトの場合、減数分裂期の染色体の不分離により、染色体を 1 本余分に持つ配偶子が作られ、それが正常な配偶子と受精すると、本来 2 本のペアからなる相同染色体が 3 本となるトリソミーが生じ、多くの場合流産となる。一部の出生に至る常染色体トリソミーのうち、21 番染色体のトリソミーはダウン症候群としてよく知られ、13 番染色体および 18 番染色体のトリソミーはそれぞれパトウ症候群、エドワード症候群として重篤な表現型を示す。哺乳類の性染色体構成は、メスでは X 染色体が 2 本の XX、オスでは X 染色体とオス決定遺伝子をもつ Y 染色体がそれぞれ 1 本ずつの XY である。メスの X 染色体が 2 本ともに転写活性を発揮すると、オスの 2 倍量の転写産物が作られることになるが、そのような遺伝子産物量の不均衡が生じるような状態では、常染色体の異数性同様にその個体は胎生致死となる。このような雌雄間での性染色体連鎖遺伝子量の差を補償するために生物は遺伝子量補償機構を備えている。

哺乳類では 2 本の X 染色体のうち一方を転写不活性にすることで、機能的な X 染色体の数をオスと同じ 1 本にする (X 染色体不活性化、XCI) (Lyon, 1961)。遺伝子量補償は哺乳類だけでなく、ショウジョウバエや線虫でもみられるが、そのやり方は異なる。ショウジョウバエもメスは X 染色体を 2 本持ち、オスは X 染色体と Y 染色体を 1 本ずつ持つが、哺乳類のようにメスが一方の X 染色体を不活性化させるのではなく、オスが X 染色体からの発現量をメスの 2 倍にまで高めることで、X 染色体連鎖遺伝子量の差を補っている (Mukherjee & Beermann, 1965)。線虫は X 染色体を 2 本持つ雌雄同体 (XX) と性染色体として X 染色体を 1 本だけ持つオス (XO) にわけられる。線虫の場合、雌雄同体の個体は 2 本の X 染色体の発現量とともに半分にまで低下させる

ことで、X 染色体を 1 本しか持たないオスとの間の X 連鎖遺伝子量の差を補償する (Plenefisch *et al*, 1989)。このように、生物により遺伝子量補償のメカニズムは多様だが、いずれの場合もエピジェネティックな制御が深く関わっている (図 1)。

	メス/ 雌雄同体	オス
哺乳類	X _x	XY
ショウジョウバエ	XX	X _Y
線虫	xx	XO

図 1 様々な生物種でみられる遺伝子量補償機構
その染色体からの転写量を簡易的に文字の大きさを示した。

1-2. 条件的ヘテロクロマチンと構成的ヘテロクロマチン

クロマチンはDNAがヒストン八量体に巻きついてつくるヌクレオソーム構造を基本単位とし、それが多数連なり、相互に作用し合うことで折りたたまれ、核内でより高次のクロマチン構造を形成する。生物の正常発生には、発生時期や細胞種に応じてゲノム上の異なる場所に、転写に関して活性なユークロマチンと不活性なヘテロクロマチンを適切に構築し維持することが重要である。ユークロマチンは弛緩した構造をとり、その開いたクロマチンに転写因子やRNAポリメラーゼなどが呼び込まれ、転写が行われる。一方、ヘテロクロマチンは堅く凝縮した構造をとってしばしば核膜周辺に存在し、その凝縮した様子は透過型電子顕微鏡では電子密度の高い黒っぽい斑紋として、蛍光顕微鏡では4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)で濃染される明るい斑紋として観察される。

さらにヘテロクロマチンは、条件的ヘテロクロマチンと構成的ヘテロクロマチンに大別される。条件的ヘテロクロマチンは発生段階や細胞の種類に応じてヘテロクロマチン化される領域で、その代表的な例が哺乳類のメス特有な不活性 X 染色体である。一方、構成的ヘテロクロマチンは、発生段階や細胞の種類に拘わらず常にヘテロクロマチン化されている領域で、ペリセントロメアやテロメア、あるいはトランスポゾン等の反復配列がこれにあたる。これらのヘテロクロマチンにはそれぞれに特徴的なヒストン修飾やタンパク質が集積する。条件的ヘテロクロマチンでは H3K27me3 や H2AK119ub などの抑制型ヒストン修飾の集積が見られるのに対し、構成的ヘテロクロマチンでは抑制型ヒストン修飾として H4K20me2/3 や H3K9me3 が集積する他、H3K9me3 を認識して呼び込まれるヘテロクロマチンタンパク質 HP1 なども見られる (Lachner *et al*, 2001; Peters *et al*, 2001; Schotta *et al*, 2004) (図 2)。

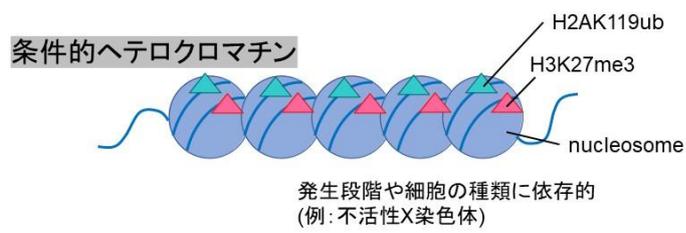


図2 条件的ヘテロクロマチンと構成的ヘテロクロマチン
 上段が条件的ヘテロクロマチン、下段が構成的ヘテロクロマチンの模式図。
 それぞれに異なるクロマチン修飾が施される。

1-3. マウスにおける X 染色体不活性化

胚発生初期に起こる XCI は、クロマチンの修飾や高次構造の大規模な変化を伴うため、胚発生過程や細胞分化過程におけるクロマチン制御機構を理解するための優れたモデルとして長年研究されている。マウス胚の場合、4-8 細胞期に父方由来 X 染色体 (Xp) の転写を抑制する形で XCI が始まる (Mak *et al*, 2004; Okamoto *et al*, 2004)。その後、胚盤胞期になると将来の胎盤などを作る胚体外組織の起源となる栄養外胚葉と将来の胎仔の起源となる内部細胞塊 (ICM) が形成される。栄養外胚葉の細胞では不活性化された Xp は安定に維持されるが、ICM に寄与した細胞群においては、それまで不活性化されていた Xp がいったん転写活性を回復する。これら ICM の細胞は胚盤胞が着床した後エピブラストと呼ばれる依然未分化な細胞集団を形成するが、その間にエピブラストの細胞では改めて XCI が起こる。しかし、この時は、親の由来に拘らずどちらか一方の X 染色体がランダムに不活性化される。

XCI の開始には X 染色体連鎖非コード遺伝子である *Xist* (Brockdorff *et al*, 1991; Borsani *et al*, 1991) が不可欠である (Marahrens *et al*, 1997; Penny *et al*, 1996)。*Xist* はどちらか一方の X 染色体からモノアレル性に発現が上昇し、その転写産物である *Xist* RNA がその X 染色体の全域を覆うように集積することで XCI を開始する。この *Xist* RNA を足場として X 染色体へ呼び込まれる様々なエピジェネティック制御因子によって、ヒストン修飾や DNA メチル化などのエピジェネティックな変化が引き起こされ、XCI が段階的に進行し、最終的に強固なヘテロクロマチンが形成されると考えられている (Csankovszki *et al*, 2001; Kohlmaier *et al*, 2004; Wutz & Jaenisch, 2000) (図 3)。そのようなエピジェネティック制御因子としてポリコーム抑制複合体 (Polycomb Repressive Complex) PRC1 と PRC2 が知られ、PRC1 によってヒストン H2A の 119 番目のリシン残基がモノユビキチン化 (H2AK119ub) されると、それ

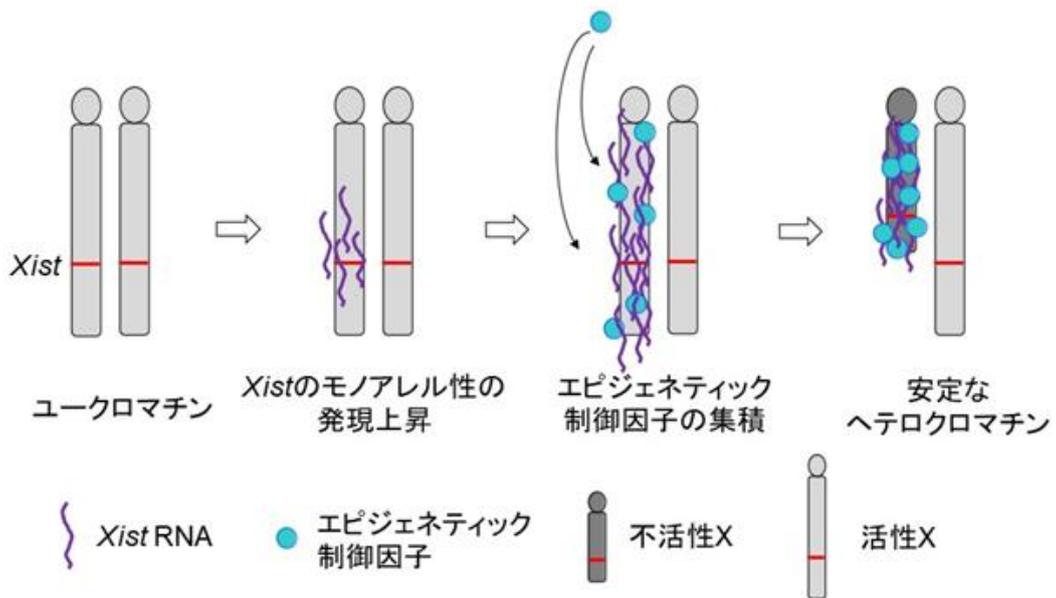


図3 マウスにおけるX染色体不活性化の流れ
 XCIは段階的に進行する。

を認識して PRC2 が呼び込まれ、ヒストン H3 の 27 番目のリシン残基がトリメチル化 (H3K27me3) されることが示唆されている (Fang *et al*, 2004; Plath *et al*, 2003; Napoles *et al*, 2004; Silva *et al*, 2003; Almeida *et al*, 2017; Erhardt *et al*, 2003)。しかし、不活性 X のヒストン修飾については種間の違いも指摘されている。ヒトを含むいくつかの真獣類や有袋類では H3K9me3 と H4K20me3 が不活性 X によく集積する様子が免疫蛍光染色で観察されるが (Chaumeil *et al*, 2011; Chadwick & Willard, 2004; Rens *et al*, 2010; Zakharova *et al*, 2011)、マウスではそれらのヒストン修飾の不活性 X への集積が同様の免疫染色では認められない。このことは、マウスにおける XCI の制御機構に関するヒストンの修飾の研究のほとんどが、PRC1 および PRC2 を介したものに集中している理由の一端と言える。H3K9me3 と H4K20me3 は、哺乳類の体細胞において、ペリセントロメリックヘテロクロマチンやテロメアなどの構成的ヘテロクロマチンに集積することが知られている (Peters *et al*, 2001; Schotta *et al*, 2004)。こうしたことから、多くの真獣類や有袋類が構成的ヘテロクロマチンと条件的ヘテロクロマチンの制御に一部共通のしくみを利用しているのに対し、マウスは例外的にそのような仕組みを共有していないという見方が支配的である。しかし、ChIP-seq を用いた最近の研究では、マウスの活性 X と比較して、不活性 X の広範な領域で H3K9me3 が集積していることが示されている (Keniry *et al*, 2016)。

H3K27me3 を触媒する PRC2 の活性に不可欠な主要構成因子の一つである EED の機能欠損マウス胚では、着床後の栄養膜細胞において不活性 X 上の遺伝子の脱抑制が観察されることから、H3K27me3 は XCI の開始には必須ではないが、その維持には重要であることが示唆されている (Kalantry & Magnuson, 2006; Kalantry *et al*, 2006; Montgomery *et al*, 2005; Wang *et al*, 2001)。また、DNA メチル化も不活性 X の不活性化状態の維持に寄与することが古くから知られている (Mohandas *et al*, 1981)。プロモーターやエンハンサーなどの制御領域にしばしば見出される CpG アイランドは、活

性 X に比べて不活性 X で高度にメチル化されており、5-アザシチジンのような DNA 脱メチル化剤で培養細胞を処理すると、不活性 X 上でそれまで抑制された遺伝子の散発的な再活性化が起こる。その一方、*de novo* DNA メチル化酵素を欠損したマウス胚のエピブラスト系列の細胞においては、ランダム型 XCI の開始は影響を受けないことも示されている (Sado *et al*, 2004)。これらの観察結果は、DNA メチル化が XCI の開始には必要ではないが、XCI の維持には重要な役割を果たしていることを示唆している。XCI の維持に関与していることが知られているもう一つの因子に、SmcHD1 がある (Blewitt *et al*, 2008)。SmcHD1 は SMC ファミリーに属するものの、標準的なものとは構造が異なるクロマチン制御因子で、不活性 X 上に集積する (図 4)。*Smchd1* の完全機能欠損変異アレルである *Smchd1^{MommeD1}* (以下、*Smchd1^{MD1}*) のホモ接合体のメスのマウス胚では、発生初期の XCI は正常に開始されるものの、いったん不活性化された X 染色体上の遺伝子の多くが、その後発生の進行とともに再活性化されてくるため、最終的に胎仔は妊娠中期に致死となる (Blewitt *et al*, 2008)。メスのホモ接合体変異胚における不活性 X 連鎖遺伝子の脱抑制は、CpG メチル化や H3K27me3 の減少を伴うことから、SmcHD1 は XCI の安定な維持に必要なエピジェネティックな状態の確立に関与していることが示唆されている (Sakakibara *et al*, 2018; Gendrel *et al*, 2012; Blewitt *et al*, 2008)。さらに最近の研究では、SmcHD1 が不活性 X の高次クロマチン構造の組織化に関与していることも示唆されており (Wang *et al*, 2018; Jansz *et al*, 2018a; Gdula *et al*, 2019)、SMCHD1 の機能障害がヒト体細胞における不活性 X の凝縮の程度を損ねるといふ我々の以前の報告と矛盾しない (Nozawa *et al*, 2013)。

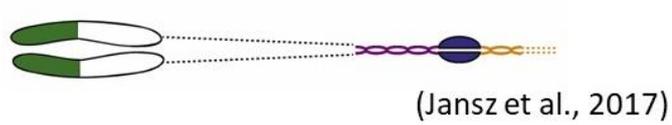


図 4 SmcHD1 の構造

SmcHD1 は N 末に GHKL 型の ATPase ドメイン、C 末にヒンジドメインを持ち、ホモダイマーを形成する。

当研究室の以前の報告では、SmcHD1 が不活性 X のエピジェネティックな状態の確立に重要な役割を果たすことが示されたが、その知見は基本的に *Smchd1^{MD1/MD1}* マウス胚線維芽細胞 (MEF) での観察に基づくもので、SmcHD1 の非存在下で、不活性 X 連鎖遺伝子の脱抑制をもたらす不活性 X のエピジェネティックな状態の異常がどのように引き起こされるかは不明であった (Sakakibara *et al*, 2018)。本研究では、XCI が開始して間もない着床後のエピブラストのモデルとして、*Smchd1^{MD1/MD1}* 胚から樹立したエピブラスト幹細胞 (EpiSC) を用いて、不活性 X のクロマチン状態とその抑制状態をさらに探索した。SmcHD1 欠損 MEF の不活性 X 上で脱抑制された遺伝子の多くは、SmcHD1 欠損 EpiSC では発現が抑制され、それらの遺伝子領域には H3K27me3 の集積も認められた。さらに、SmcHD1 を欠損した EpiSC や MEF では、野生型に比べ不活性 X 上の H3K9me3 の集積が大幅に失われ、H3K27me3 の分布も乱れていることがわかった。この発見は、マウスを用いた解析でこれまであまり着目されてこなかった H3K9me3 が XCI の維持に予想外の役割を果たしている可能性を示すものと言える。その知見をもとに、SmcHD1 が不活性 X 上に集積する H3K27me3 および H3K9me3 のブロックの形成に果たす役割と、堅牢なヘテロクロマチンの構築に及ぼす影響について考察した。

第2章 結果

2-1. *Smchd1*^{MD1/MD1} 胚からの EpiSC の樹立

SmcHD1 は、胎盤や一部の胚体外膜を生じる胚体外組織と、将来胎仔を形成する胚体組織の両方で XCI を安定的に維持するために必須であることが知られている。当研究室の以前の研究で、*SmcHD1* が存在しない場合、いったん不活性化された X 連鎖遺伝子が着床後の発生過程で徐々に脱抑制されていくことが示唆されている (Sakakibara *et al*, 2018)。さらに、アレル特異的 RNA-seq の結果、*Smchd1*^{MD1/MD1} MEF ではアレル性発現の解析が可能な不活性 X 上の遺伝子の約半分が発現していることが明らかになった (Sakakibara *et al*, 2018)。これらの結果は、*SmcHD1* 欠損胚では、発生初期に不活性化された X 連鎖遺伝子の多くが妊娠中期までに脱抑制されることを示唆しているが、染色体全体での脱抑制の動態は明らかになっていない。そこで私は、着床後間もない XCI を開始したばかりの細胞における不活性 X の状態を調べるためのモデルとして、エピブラスト幹細胞 (EpiSC) (Brons *et al*, 2007; Tesar *et al*, 2007) を使用することにした。EpiSC は、細胞レベルや分子レベルの表現型が着床後のエピブラスト、特に原腸陥入後期のエピブラストの前方原条に似ていることが示唆されている (Kojima *et al*, 2014; Chen *et al*, 2016)。

Xist の機能欠損アレルである *Xist*^{AA} (Hoki *et al*, 2009) または *Xist*^{lox} (Sado *et al*, 2005) と *Smchd1*^{MD1} の二重ヘテロ接合体のメスと *Smchd1*^{MD1} のヘテロ接合体で、JF1 系統 (*Mus musculus molosinus*) 由来の X 染色体 (X^{JF1}) を持つオスとの交配により得た胎生 6.5 日 (E6.5) 胚のエピブラストから EpiSC を樹立した (図 5) (材料と方法を参照)。*Xist* の機能欠損アレルは、C57Bl/6J 系統 (*Mus musculus domesticus*) 由来の X 染色体 (X^{B6-AA} または X^{B6-1lox}) に存在するため、これらの EpiSC における XCI は専ら X^{JF1} に偏って起きていた。さらに、これらの亜種の間には多くの一塩基

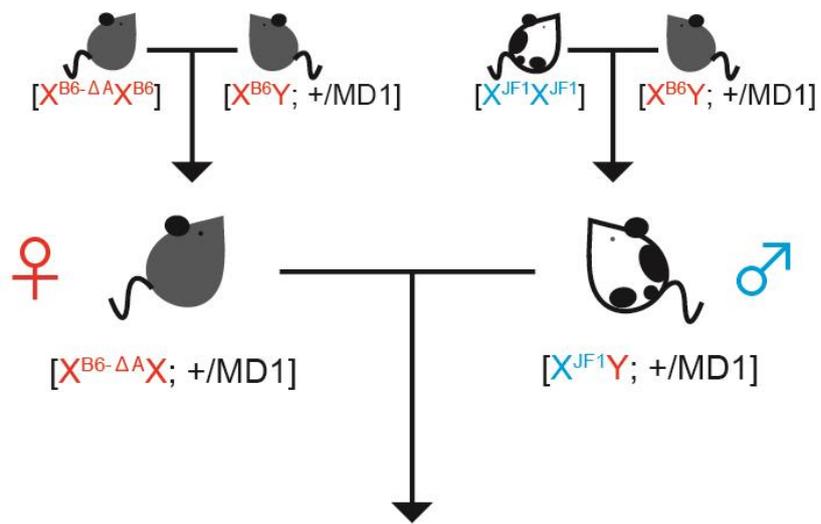


図5 マウス交配の概略図

本研究に用いた EpiSC および MEF を得るための交配。

多型 (SNP) や挿入/欠失 (INDEL) が存在するため、X連鎖遺伝子のアレルを区別した解析を行うことが可能であった。樹立した EpiSC 株のそれぞれについて PCR で遺伝子型を決定し、*Smchd1* アレルに関して野生型株とホモ接合体変異株それぞれ 1 株ずつの組み合わせ、すなわち [$X^{B6-\Delta A}X^{JF1}$; *Smchd1*^{+/+}] と [$X^{B6-\Delta A}X^{JF1}$; *Smchd1*^{MD1/MD1}]、もしくは [$X^{B6-1lox}X^{JF1}$; *Smchd1*^{+/+}] と [$X^{B6-1lox}X^{JF1}$; *Smchd1*^{MD1/MD1}] の組み合わせで、さらなる解析を行った。後述の RNA-seq では、樹立したこれらの EpiSC が典型的な EpiSC のマーカー遺伝子を発現していることを確認した (図 6)。

はじめに、SmcHD1を欠損した EpiSC における XCI の状態を知るために、2 色の蛍光標識を用いた RNA-FISH で *Xist* と X 連鎖遺伝子の 1 つである *Atrx* の発現を調べた。*Atrx* は、*Smchd1*^{MD1/MD1} 胚の着床後の発生過程で徐々に脱抑制することが示されている(Sakakibara *et al*, 2018)。野生型 EpiSC では、*Xist* を発現している細胞の大部分で、*Atrx* の発現が *Xist* RNA の集積により形成される *Xist* クラウドとは重ならないピンポイントのシグナルとして 1 つ検出され (図 7A、B)、不活性 X 上に集積する *Xist* RNA によって、*Atrx* は抑制されていることが示された。この状況は、*Smchd1*^{MD1/MD1} EpiSC でも基本的に同じであり、SmcHD1 が存在しなくても *Atrx* は不活性 X 上で抑制されていることが示唆された。これは、E13.5 の *Smchd1*^{MD1/MD1} 胎仔から調製した MEF においては、59%の細胞で *Atrx* が *Xist* RNA で覆われた不活性 X 上で脱抑制されていたという以前の我々の報告(Sakakibara *et al*, 2018)とは対照的であった。

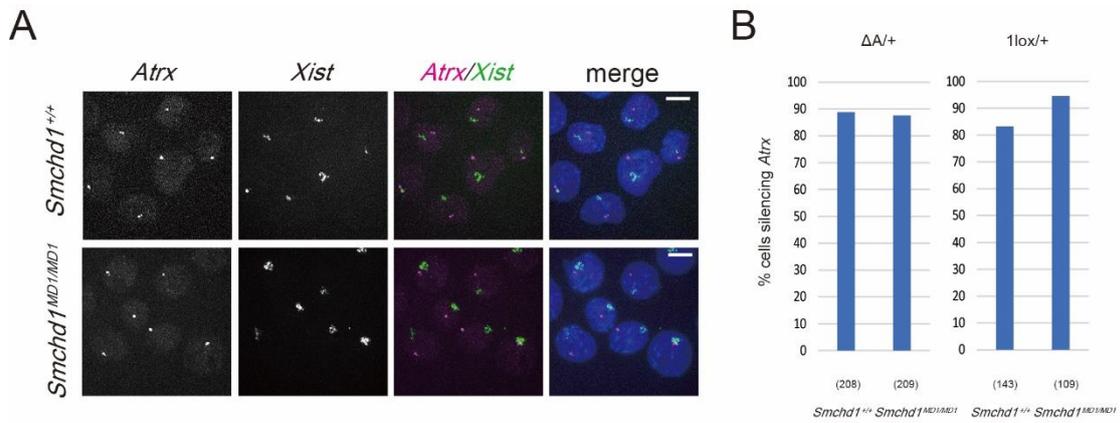


図7 *Smchd1^{MD1/MD1}* EpiSC における X連鎖遺伝子 *Atrx* の発現

(A) 野生型と *Smchd1^{MD1/MD1}* EpiSC における *Xist* (緑) and *Atrx* (マゼンタ)の発現を検出する RNA-FISH の代表的な写真。スケールバーは 10 μm を表す。

(B) 野生型と *Smchd1^{MD1/MD1}* EpiSC における、*Xist* クラウドと重ならない位置に1つの *Atrx* のピンポイントのシグナルが観察された核の割合。数えた核の数は括弧内に示した。*Xist^{ΔA/+}*と *Xist^{1lox/+}*どちらの遺伝的背景でも *Atrx* は *Smchd1^{MD1/MD1}* EpiSC で発現が抑えられている。

さらに分化誘導前後の EpiSC におけるいくつかの X 連鎖遺伝子のアレル性発現を調べるために、JF1 系統と B6 系統間の SNP がどちらかの系統で制限酵素認識部位と重なっているものを選び、それを含む断片を RT-PCR で増幅した後、得られた断片を制限酵素で消化した。前述のように、用いた EpiSC で不活化されているのは X^{JF1} のみであるため、JF1 型の制限断片の出現は不活性 X 上で遺伝子が適切に抑制されていないことを意味する。図 8 に示すように、野生型の EpiSC では、分化前、分化後いずれにおいても、調べた 5 つの遺伝子すべてが専ら B6 アレルから発現しており、不活性 X 上の遺伝子が安定に抑制されていることが示唆された。一方、分化前の *Smchd1*^{MD1/MD1} EpiSC では、これらの遺伝子は抑制されていたが、分化誘導後は、*Pdha1*、*G6pd*、*Hprt* で B6 アレルからの発現に加えて、JF1 アレルからの発現も認められた (図 8)。このような遺伝子の脱抑制は、*Xist* RNA の集積によって発生初期に不活性化された X 連鎖遺伝子が、発生の後期になって徐々に脱抑制されてくる *Smchd1* 欠損胚の表現型と一致していた。これらの結果は、XCI の比較的早い段階における SmcHD1 欠損の影響を調べるために、着床後間もない時期のエピブラストのモデルとして EpiSC を使うことの妥当性を支持するものと考えた。

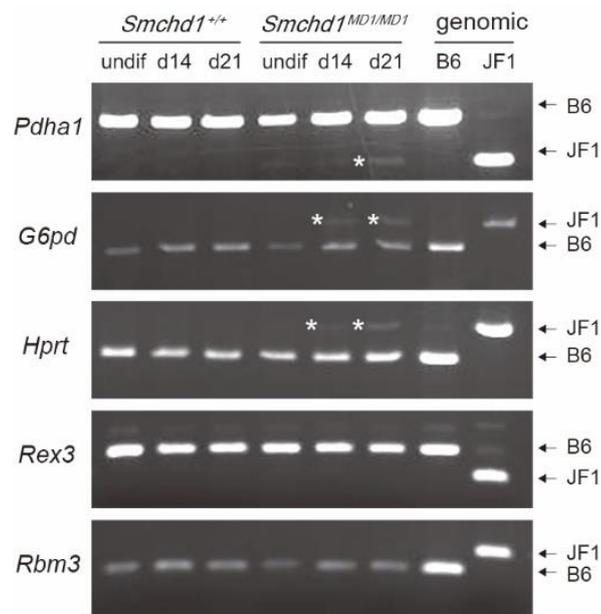


図 8 分化前後の EpiSC における X 連鎖遺伝子のアレル性発現

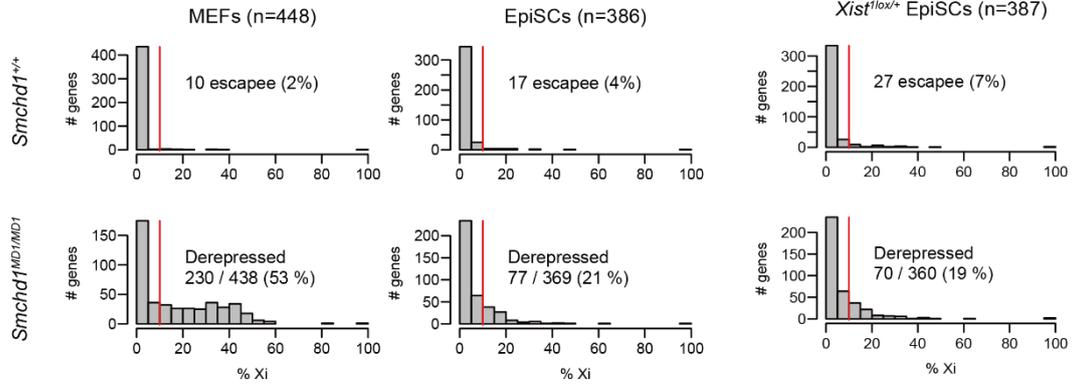
制限酵素認識部位に塩基多型を含む断片を RT-PCR により増幅し、それぞれ適切な制限酵素で消化し、電気泳動により X^{JF1}からの発現の有無を調べた。コントロールとして、B6 と JF1 のゲノム DNA の PCR 断片を消化したものも電気泳動した。*Pdha1* と *G6pd*、*Hprt* は分化した *Smchd1*^{MD1/MD1} EpiSC でのみ X^{JF1}からの発現がみられた。X^{JF1}からの脱抑制が認められたものは白のアスタリスクでハイライトした。

2-2. *Smchd1*^{MD1/MD1} EpiSC では不活性 X 上の大多数の遺伝子が抑制されている

SmcHD1 欠損 EpiSC における不活性 X の状態をさらに詳しく解析するために、アレル特異的 RNA-seq を行った。本研究で用いた EpiSC では、B6 由来の X で *Xist* が欠損しているため、もう一方の X^{JF1} が専ら不活性化されている。したがって、JF1 型の SNP や INDEL を含むリードが検出されれば、X^{JF1} が適切に不活性化されていないことになる。野生型と *Smchd1*^{MD1/MD1} の EpiSC の間で、それぞれの X 連鎖遺伝子について、不活性 X から発現している割合 (%Xi) [父方リード / (母方リード + 父方リード)] を比較した。%Xi が 10% 以上の遺伝子は、不活性 X 上でも発現している遺伝子とみなした (Peeters *et al*, 2014)。野生型の EpiSC では、大部分の遺伝子の %Xi が 10% よりも低く、予想通り不活性 X は実質的に不活性化されていることが示された (図 9A)。387 個の解析可能な X 連鎖遺伝子のうち、野生型 EpiSC では 18 個 (4.7%) がこのカテゴリーから外れており、これは野生型 MEF での数 (11/449 個、2.4%) と同程度であった。これらはまだ不活化されていなかったか、あるいは EpiSC 特異的に不活性化を免れる遺伝子である可能性がある。独立に樹立された EpiSC でも同様の結果が得られた (図 9B、C)。野生型とは対照的に、*Smchd1*^{MD1/MD1} EpiSC では X 連鎖遺伝子の 21% (77/369) で %Xi が 10% より高い値を示し、これらは不活性化されている X^{JF1} から誤って発現していると考えられた (図 9A)。このような不適切な発現は *SmcHD1* の欠損に起因すると考えるのが妥当であるが、これらの遺伝子が発生初期の段階で不活化された後に脱抑制されたのか、あるいはそもそも最初から不活性化されなかったのかは不明である。しかしながら、以下ではこれらの遺伝子を「脱抑制遺伝子」と呼ぶことにする。*Smchd1*^{MD1/MD1} EpiSC では、不活性 X 上の遺伝子の一部が脱抑制されてはいたが、累積分布図によると、野生型と *SmcHD1* 欠損の EpiSC の間の X 連鎖遺伝子発現の変化は、MEF での変化とは対照的に、常染色体上の遺伝子の発現

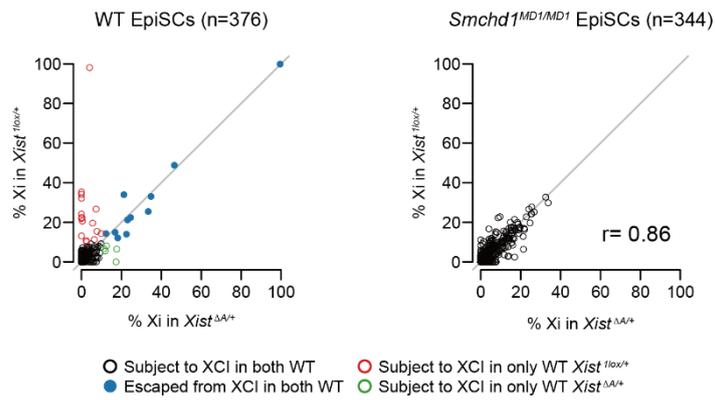
プロファイルと同等であったことから、*Smchd1^{MD1/MD1}* EpiSC における不活性 X 連鎖遺伝子の発現は実質的にはほとんど上昇していないことがわかる (図 9D)。

A



B

C



D

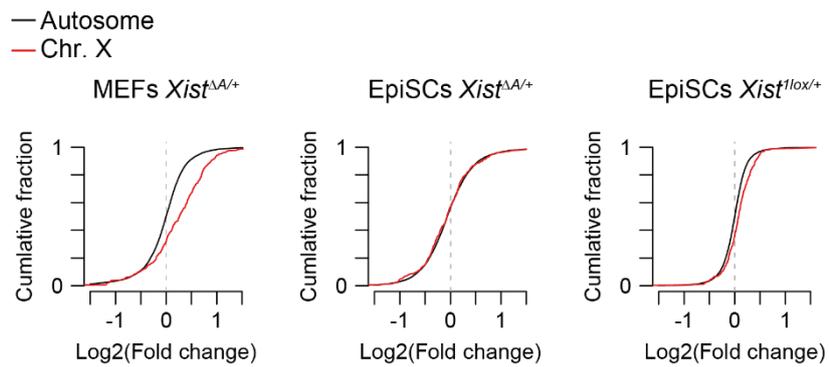


図 9 不活性 X 連鎖遺伝子における SmcHD1 欠損の影響は、EpiSC では *Xist*^{AA/+}と *Xist*^{lox/+}バックグラウンドの間で基本的に同じであった

(A, B) 野生型と *Smchd1*^{MD1/MD1} の MEF と EpiSC で解析可能な X 連鎖遺伝子のうち、それぞれの %Xi の値を示す遺伝子数を示したヒストグラム。遺伝子が不活性化されるとみなす判断のための閾値(%Xi = 10%)を赤色の線で表す。(A)は *Xist*^{AA/+}バックグラウンドの細胞で、(B)は *Xist*^{lox/+}バックグラウンドの細胞を用いた時の図。

(C) *Xist*^{AA/+}と *Xist*^{lox/+}のバックグラウンドに違いが不活性 X 上の遺伝子の脱抑制の程度の違いを生むかを調べるため、4 つの EpiSC 細胞株すべてで解析可能な 377 個の遺伝子の %Xi についてペアワイズに比較した散布図。(左) 野生型 EpiSC の 2 株いずれにおいても、344 個の遺伝子 (黒丸) は不活性 X 上で抑制され、12 個の遺伝子 (青丸) が XCI を免れていた。XCI を免れる遺伝子は *Xist*^{AA/+}のバックグラウンドでは 16 個 (赤丸)、*Xist*^{lox/+}バックグラウンドでは 5 個 (緑丸) であった。(右) 野生型におけるエスケープ遺伝子の数は *Xist*^{lox/+}バックグラウンドの方が *Xist*^{AA/+}よりも多かったが、344 個の遺伝子のうち、共通に抑制されている遺伝子についてはどちらの *Xist*バックグラウンドの *Smchd1*^{MD1/MD1} 株でも脱抑制の程度は同等であった (Pearson 相関係数、 $r = 0.86$)。

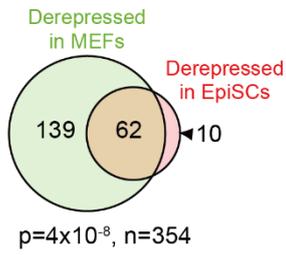
(D) MEF と 2 株の EpiSC について、それぞれ野生型と *Smchd1*^{MD1/MD1} における X 連鎖遺伝子と常染色体連鎖遺伝子の発現レベルの fold-change を累積分布図で表した。

図 10A は、野生型 EpiSC 株 2 つのいずれにおいても不活性 X 上で抑制されている解析可能な 354 遺伝子のうち、*Smchd1*^{MD1/MD1} MEF と *Smchd1*^{MD1/MD1} EpiSC で脱抑制されている遺伝子の重なりを示している。*Smchd1*^{MD1/MD1} EpiSC で脱抑制されていた 72 個の遺伝子のうち、*Smchd1*^{MD1/MD1} MEF で脱抑制された遺伝子は 62 個だった。すなわち、*Smchd1*^{MD1/MD1} MEF で脱抑制されていた 201 個の遺伝子のうち、139 個 (69%) は *Smchd1*^{MD1/MD1} EpiSC の不活性 X では抑制されていたということで、変異型 MEF で脱抑制される X 連鎖遺伝子の多くが、SmcHD1 非存在下の未分化エピブラストでは不活性化されていることが示唆された。これら EpiSC と MEF 間の違いは、細胞の発生段階に応じた遺伝子発現の差によるものであるという可能性も考えられる。これを評価するために、これらの脱抑制された遺伝子の活性 X からの発現量を野生型の遺伝的背景をもつ ESC、EpiSC および MEF の間で比較した。図 10B に示すように、354 個の解析可能な遺伝子のうち 2 個を除くすべての遺伝子が ESC、EpiSC、MEF のいずれにおいも活性 X から発現が認められ [FPKM (fragments per kilobase of exon per million fragments mapped) > 0]、EpiSC では不活性 X 上のほとんどの遺伝子が XCI によって不活性化されていることが示された。MEF でのみ脱抑制される遺伝子は EpiSC よりも MEF で発現が高い傾向が見られたが、いずれの細胞でも脱抑制される遺伝子にはそのような傾向は見られなかったことから、EpiSC と MEF の遺伝子制御の違いが、MEF での脱抑制の頻度が高いことに一部寄与している可能性が示唆された。また、*Smchd1*^{MD1/MD1} MEF で脱抑制される遺伝子の多くが、*Smchd1*^{MD1/MD1} EpiSC では不活性化されている遺伝子 (%Xi < 10%) に分類されはしていたものの、%Xi は比較的高い傾向にあったことから (図 10D)、それらの遺伝子はおそらく抑制されていたと考えるのが妥当と思われる。また、%Xi が相対的に高いこれらの遺伝子は、ゲノム上でクラスターを形成するわけでもなく、染色体全体に分布してい

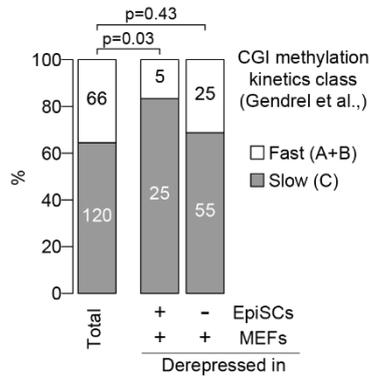
た (図 10E)。これらの結果から、*Smchd1*^{MD1/MD1} EpiSC における不活性 X の抑制状態は、野生型の EpiSC ほどには強固ではないことが示唆される。

SmcHD1 は、不活性 X 上の一部の遺伝子の DNA メチル化にも関与することが示唆されている (Gendrel *et al.*, 2012)。Gendrel らは、不活性 X 上の CpG アイランド (CGI) はメチル化されるタイミングが速い CGI と遅い CGI に分類され、それぞれが SmcHD1 に非依存的な経路と依存的な経路によって制御されていることを報告した (Gendrel *et al.*, 2012)。そこで、SmcHD1 欠損の EpiSC と MEF の両方で脱抑制される遺伝子の CGI と、MEF でのみ脱抑制される遺伝子の CGI のメチル化のタイミングについて検討した。我々のデータセット中で、CGI メチル化の動態に関する情報が得られる 186 遺伝子について見ると、メチル化されるタイミングが遅い CGI 近傍に見出される遺伝子には EpiSC と MEF の両方で脱抑制されるものが有意に多かった (図 10C)。

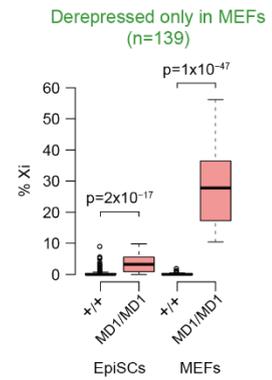
A



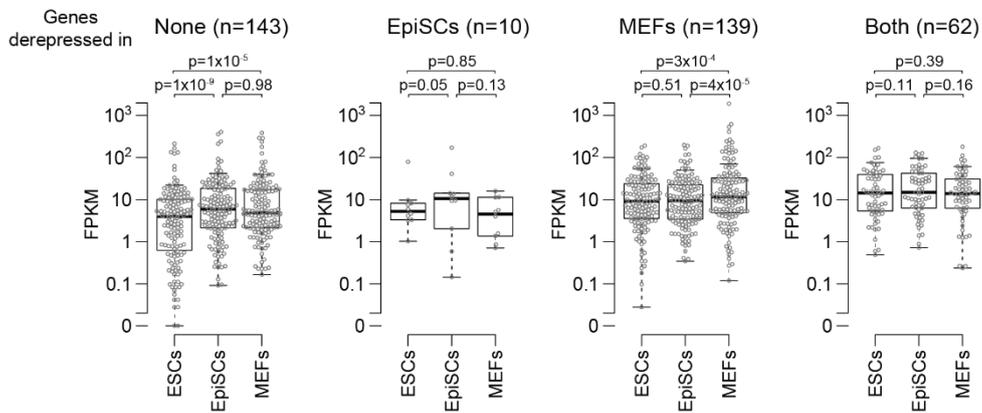
C



D



B



E

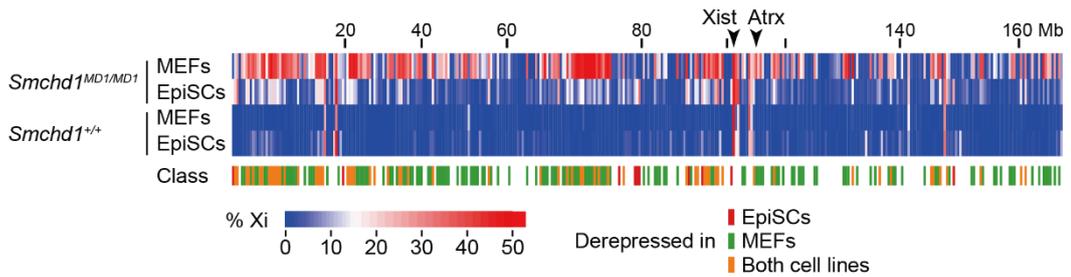


図 10 *Smchd1^{MD1/MD1}* EpiSC における不活性 X の染色体ワイドな遺伝子発現解析

(A) 野生型の EpiSC、2 株のいずれにおいても抑制されている 354 個の遺伝子のうち、*Smchd1^{MD1/MD1}* の MEF と EpiSC で脱抑制されている遺伝子の数とその重なりを表したベン図。p 値はカイ二乗検定により求めた。

(B) EpiSC、MEF およびこれらの両方で脱抑制される遺伝子が、野生型の遺伝的背景を持つ ESC、EpiSC、MEF の活性 X から発現される発現レベル (FPKM) を示す箱ひげ図。メス ESC における発現レベルは、活性 X 1 本分の発現レベルに調整した。p 値、Wilcoxon 検定 (paired, two-sided)。

(C) 分化中のメス ESC における CGI メチル化動態 (Gendrel *et al.*, 2012) と EpiSC および MEF における脱抑制の有無の関連。メチル化の時期が遅い CGI 近傍の遺伝子の割合を遺伝子の実数とともに示す。CGI のメチル化動態がわかる 186 遺伝子のうち、Gendrel ら (2012) が定義するところのクラス A+B (n=120) およびクラス C (n=66) に含まれる遺伝子がそれぞれ fast-methylating CGI および slow-methylating CGI の近傍に見いだされる。P 値、カイ二乗検定。

(D) *Smchd1^{MD1/MD1}* MEF でのみ脱抑制されている 139 個の遺伝子について、野生型と *Smchd1^{MD1/MD1}* の EpiSC および MEF における %Xi を箱ひげ図により示した。

(E) 野生型および *Smchd1^{MD1/MD1}* の EpiSC と MEF それぞれにおいて、解析可能な X 連鎖遺伝子それぞれの %Xi を遺伝子の染色体上の位置に対応させて示したヒートマップ。Class は各 X 連鎖遺伝子が (A) のベン図で示すカテゴリーのいずれに属するかをベン図での色に対応させて示した。

2-3. EpiSC において免疫染色で可視化される不活性 X 染色体上の H3K27me3 と H2AK119ub は野生型よりも *Smchd1^{MD1/MD1}* でより濃く染色される

以上の結果を受けて、私は EpiSC における不活性 X のエピジェネティックな状態を調べることにした。メスのマウスの体細胞では、不活性 X に H3K27me3 や H2AK119ub などの抑制型ヒストン修飾が集積していることが知られ、それらは各々の修飾に対する抗体を用いた免疫蛍光染色で容易に検出することができる (Fang *et al*, 2004; Plath *et al*, 2003; Silva *et al*, 2003; Erhardt *et al*, 2003; Napoles *et al*, 2004)。もう一つの抑制型のヒストン修飾である H3K9me3 については、ヒトをはじめとする哺乳類で不活性 X 上にその集積が認められるが (Chadwick & Willard, 2004; Chaumeil *et al*, 2011; Rens *et al*, 2010; Zakharova *et al*, 2011; Nozawa *et al*, 2013)、マウスでは同様の免疫蛍光染色を行ってもそのような集積は検出されない (Sado & Sakaguchi, 2013; Chaumeil *et al*, 2011)。始めに、H3K27me3 と H2AK119ub に対する抗体を用いて、野生型と *Smchd1^{MD1/MD1}* の EpiSC で免疫染色を行った。その結果、野生型だけでなく *Smchd1^{MD1/MD1}* の EpiSC でも、両修飾は核内で明瞭なシグナルとして 1 ヶ所に重なって集積しており、変異型 EpiSC でもこれらの修飾は不活性 X に集積していることが示唆された (図 11A)。変異型 EpiSC では、これらの修飾の蛍光がかなり強く観察されたので、野生型 EpiSC と変異型 EpiSC の間で、これらの修飾のシグナル強度を比較した。その結果、H3K27me3 と H2AK119ub の蛍光強度は、いずれも野生型 EpiSC よりも変異型の方で有意に高いことが明らかになった (図 11B)。同様の観察結果が MEF でも報告されており、これは、*Smchd1^{MD1/MD1}* と野生型の MEF の比較でも同様であった (図 11A、B)。しかし、これらの修飾の細胞全体におけるレベルをウェスタンブロッティングで調べると、*Smchd1^{MD1/MD1}* と野生型の EpiSC の間でも、それぞれ対応する MEF の間でも同程度であった (図 11C)。SmcHD1 欠損による遺伝子発現への影響を考えると、変異型 EpiSC と MEF におけるシグナル強度の増加は一見矛

盾しているが、これはクロマチン高次構造の何らかの変化が原因である可能性がある
(考察を参照)。

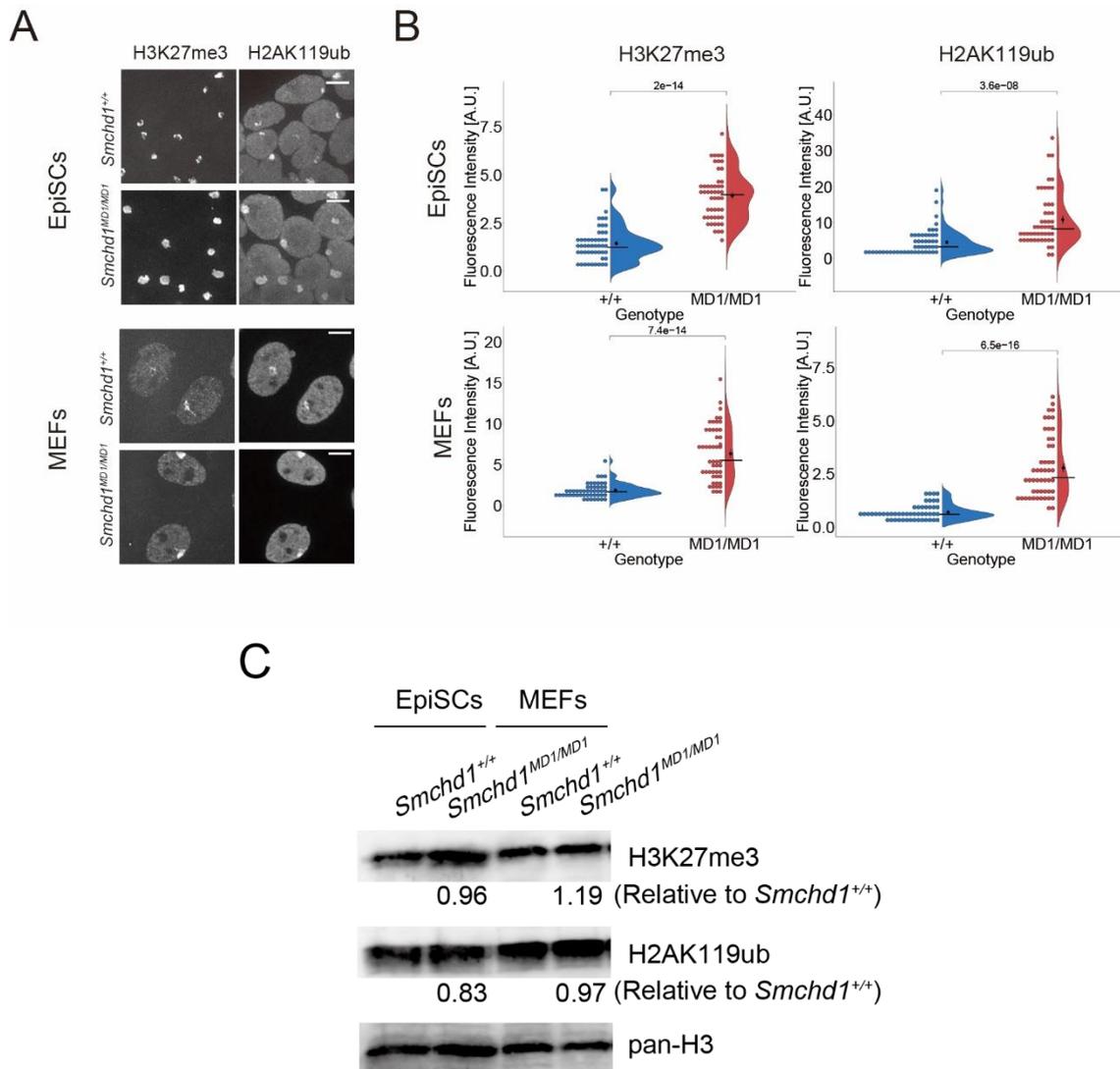


図 11 野生型と *Smchd1*^{MD1/MD1} の EpiSC と MEF におけるヒストン修飾

(A) 野生型と *Smchd1*^{MD1/MD1} の EpiSC と MEF における H3K27me3 と H2AK119ub の免疫蛍光染色。両修飾は遺伝子型に拘らず不活性 X に集積していた。スケールバーは 10 μ m を示す。

(B) H3K27me3 と H2AK119ub に対する免疫蛍光染色で検出される不活性 X のシグナル強度を、それぞれ野生型 (青) と *Smchd1*^{MD1/MD1} (赤) の EpiSC および MEF で比較した。p 値は Wilcoxon の順位和検定により求めた。黒丸と黒の横棒はそれぞれ平均と中央値を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

(C) ウェスタンブロッティングによる、野生型と *Smchd1*^{MD1/MD1} の EpiSC と MEF における H3K27me3 と H2AK119ub の細胞全体での発現レベルの比較。野生型に対する相対量を *Smchd1*^{MD1/MD1} のバンドの下に記した。各レーンには 20 μ g の全細胞抽出液を流した。

また、H3K9me3 についても H3K27me3 と組み合わせた免疫染色を行った。野生型および *Smchd1^{MD1/MD1}* の EpiSC では、H3K27me3 に対する抗体で検出される不活性 X が、H3K9me3 に対する抗体ではほとんど検出されなかった (図 12A)。これは、*Xist* の RNA を検出する RNA-FISH と H3K9me3 に対する免疫染色を併用して不活性 X を可視化した場合でも同様であった (図 12B)。これらの結果から、MEF 同様 EpiSC では H3K9me3 に対する抗体を用いた免疫蛍光染色では不活性 X を検出できないことがわかった。興味深いことに、EpiSC における H3K9me3 の集積は SmcHD1 欠損の有無にかかわらず、MEF とは異なる核内分布を示すことがわかった。MEF では、抗体によって検出される免疫蛍光シグナルが、いくつかの明瞭なクロモセンターを形成し、核の内部に分布しているのに対し、EpiSC におけるシグナルは核の辺縁部に分布していた (図 12C、D、E)。MEF と EpiSC における H3K9me3 の核内分布の空間的な違いを定量化するために、核ラミナのマーカーである Lamin B1 と組み合わせて H3K9me3 の免疫染色を行った (図 12C、E)。核内で閾値を超える H3K9me3 の全蛍光に対する、核辺縁部で Lamin B1 の蛍光と重なる H3K9me3 の蛍光の割合を測定した (図 12D)。その結果、遺伝子型にかかわらず、EpiSC では MEF に比べ H3K9me3 の分布が核の辺縁部に有意に偏っていることが示され、H3K9me3 に富むヘテロクロマチンの性質が、EpiSC と MEF などの分化した細胞間で異なる可能性が示唆された。

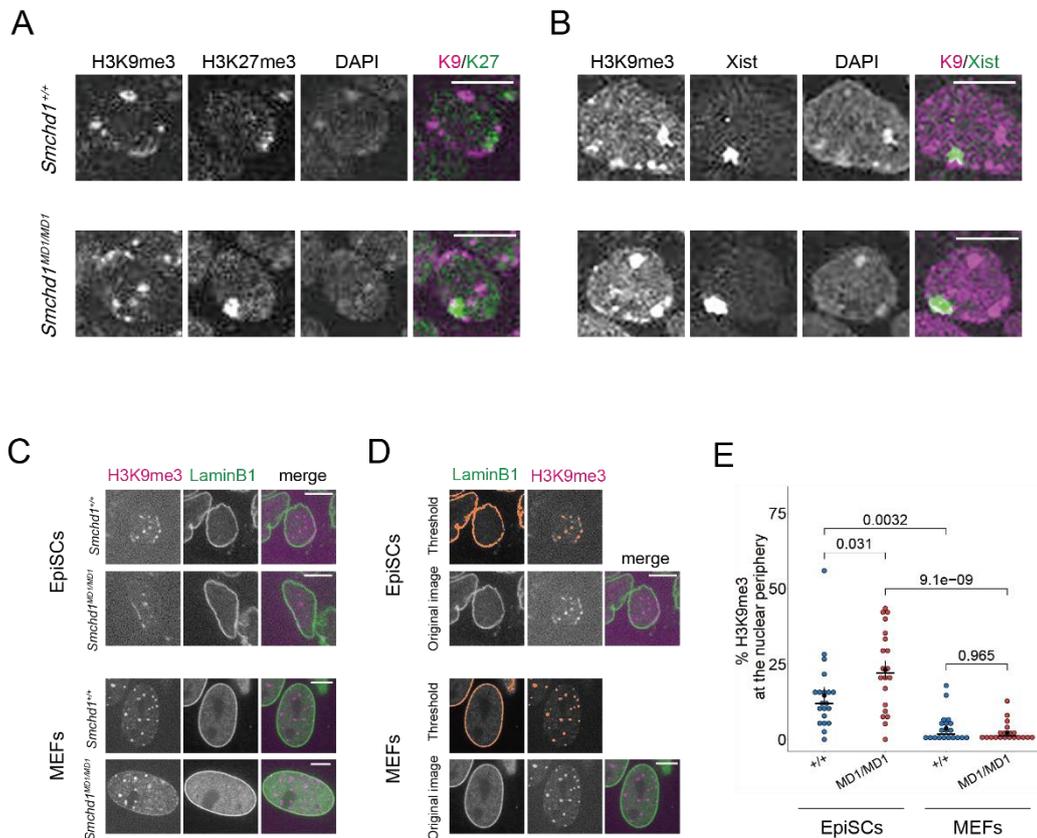


図 12 野生型と *Smchd1^{MD1MD1}* の EpiSC と MEF における H3K9me3 の核内分布

(A) 野生型と *Smchd1^{MD1MD1}* の EpiSC における H3K9me3 (マゼンタ) と H3K27me3 (緑) の免疫蛍光染色。写真は共焦点画像を 5 枚重ねた核 (z 軸方向に 1 μ m の厚み)。スケールバーは 10 μ m を示す。

(B) 野生型と *Smchd1^{MD1MD1}* の EpiSC における H3K9me3 (マゼンタ) と *Xist* RNA (緑) の Immuno-RNA-FISH。写真は共焦点画像を 5 枚重ねた核 (z 軸方向に 1 μ m の厚み)。スケールバーは 10 μ m を示す。

(C) 野生型と *Smchd1^{MD1MD1}* の EpiSC と MEF における H3K9me3 (マゼンタ) と LaminB1 (緑) の免疫蛍光染色。写真は共焦点 1 平面の画像。スケールバーは 10 μ m を示す。

(D) H3K9me3 と LaminB1 の共局在の程度の定量方法の例。画像ごとに H3K9me3 と LaminB1 の閾値をそれぞれ手動で設定し、オレンジ色でハイライトした。

(E) 野生型 (青) と *Smchd1^{MD1MD1}* (赤) の EpiSC と MEF の各々の核において検出される全 H3K9me3 のうち、LaminB1 でマークされる核膜周辺 (核ラミナ) に局在する H3K9me3 の割合をドットプロットにより示した。黒丸と黒の横棒はそれぞれ平均と中央値を示す。エラーバーは標準誤差を示す。p 値は Tukey 検定により求めた。

2-4. Lrif1 は EpiSC の不活性 X 染色体に集積せず、SmcHD1 欠損下ではヘテロクロマチンとの相互作用が失われる

分化したメスの細胞において、SmcHD1 とその相互作用因子である Lrif1 (ヒト HBiX1 のマウスオーソログ) はともに不活性 X に集積し、クロマチンの凝縮を促進することが示唆されている(Nozawa *et al*, 2013; Brideau *et al*, 2015)。これらのタンパク質それぞれに対する抗体を用いた免疫染色では、メスの MEF の不活性 X 上で強いシグナルが検出された (図 13A、13B、14A、14B)。Lrif1 は MEF においてクロモセーターを形成する DAPI 密度の高いヘテロクロマチン領域にも局在していたが (75.0%)、SmcHD1 がクロモセーターに検出される細胞の割合は Lrif1 に比べると少なかった (34.7%) (図 13A、14A)。そこで、SmcHD1 と Lrif1 が EpiSC において、不活性 X に局在するか調べるために、それぞれの抗体と H3K27me3 に対する抗体を組み合わせ免疫染色を行った。SmcHD1 の免疫蛍光シグナルは、野生型の EpiSC では予想通り H3K27me3 でマークされる不活性 X とほぼ重なっていたが (図 13A、13B)、Lrif1 のシグナルは不活性 X を表す H3K27me3 ドメインの限られた部分にしか検出されなかった (図 14A、14B)。そこで、Lrif1 が H3K27me3 ドメインに占める割合を EpiSC と MEF で比較すると、両者の間に大きな違いが見られた (図 14C)。また、SmcHD1 が H3K27me3 ドメインに占める割合を同様に比較すると、MEF よりも EpiSC の方がわずかに低いこともわかった (図 13C)。このように、H3K27me3 によって同定される不活性 X における Lrif1 と SmcHD1 の局在が EpiSC と MEF で異なることから、これらの細胞種の間では不活性 X のクロマチン状態が異なることが示唆される。また、興味深いことに、核内で特定の局在を示していた Lrif1 が *Smchd1^{MD1/MD1}* の EpiSC と MEF では、検出されなくなった (図 14A、14B)。しかし、ウエスタンブロッティングでは、EpiSC、MEF のいずれにおいても野生型と *Smchd1^{MD1/MD1}* の間で同程度のタンパク質が検出されることから、Lrif1 の局在の消失はその発現低下によるものではな

いと考えられた (図 14D)。これらの結果は、Lrif1 の局在が SmcHD1 に依存していることを示唆している。しかしながら、野生型 EpiSC では SmcHD1 が不活性 X に局在しているにもかかわらず、Lrif1 は不活性 X 上で限定的な局在を示すのみである理由は、現在のところ不明である。

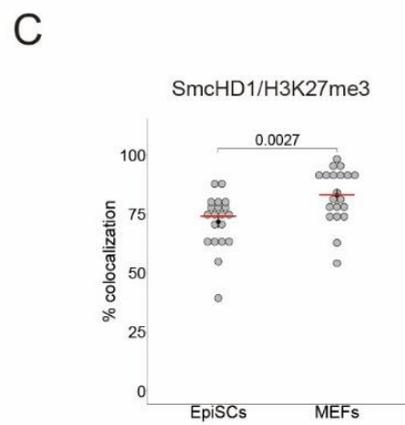
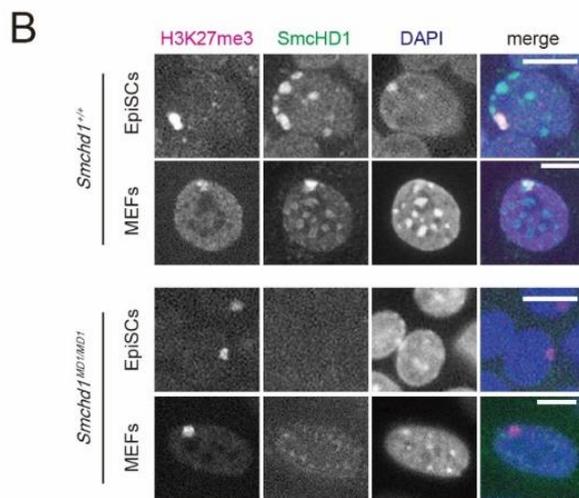
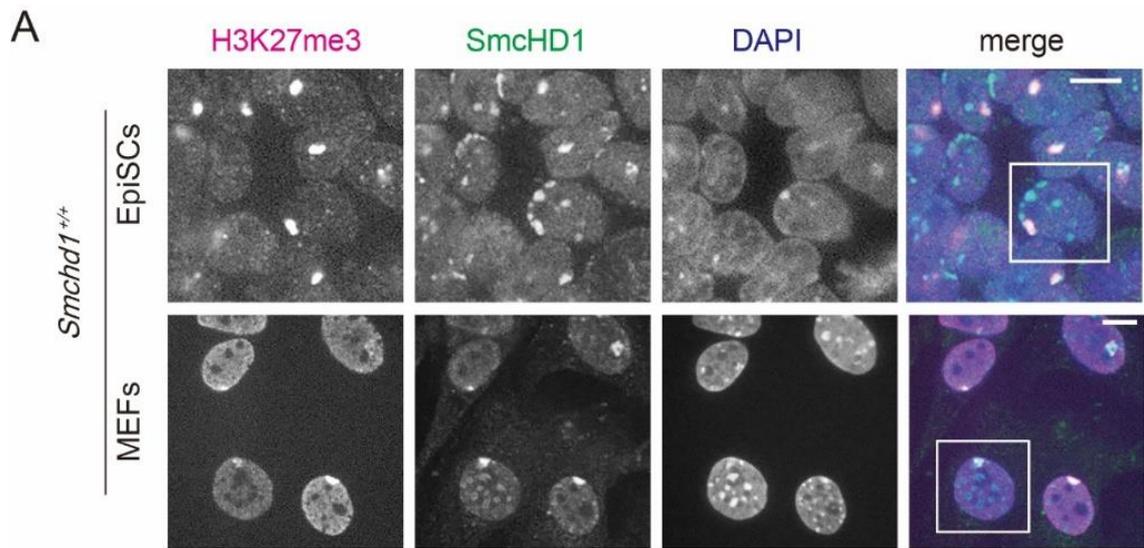


図 13 野生型と *Smchd1*^{MD1/MD1} の EpiSC と MEF における SmcHD1 の局在

(A) 野生型の EpiSC と MEF における H3K27me3 (マゼンタ) と SmcHD1 (緑) の免疫蛍光染色。写真は共焦点 1 平面の画像。四角で囲った核が(B)で示した核。スケールバーは 10 μm を示す。

(B) 野生型と *Smchd1*^{MD1/MD1} の EpiSC と MEF における H3K27me3 (マゼンタ) と SmcHD1 (緑) の免疫蛍光染色。写真は共焦点 1 平面の画像。スケールバーは 10 μm を示す。

(C) 野生型の EpiSC と MEF において、不活性 X を示す H3K27me3 の集積する領域に SmcHD1 の集積が占める割合をそれぞれの核ごとに示し、比較したドットプロット。黒丸と赤の横棒はそれぞれ平均と中央値を示す。エラーバーは標準誤差を示す。p 値は Wilcoxon の順位和検定により求めた。

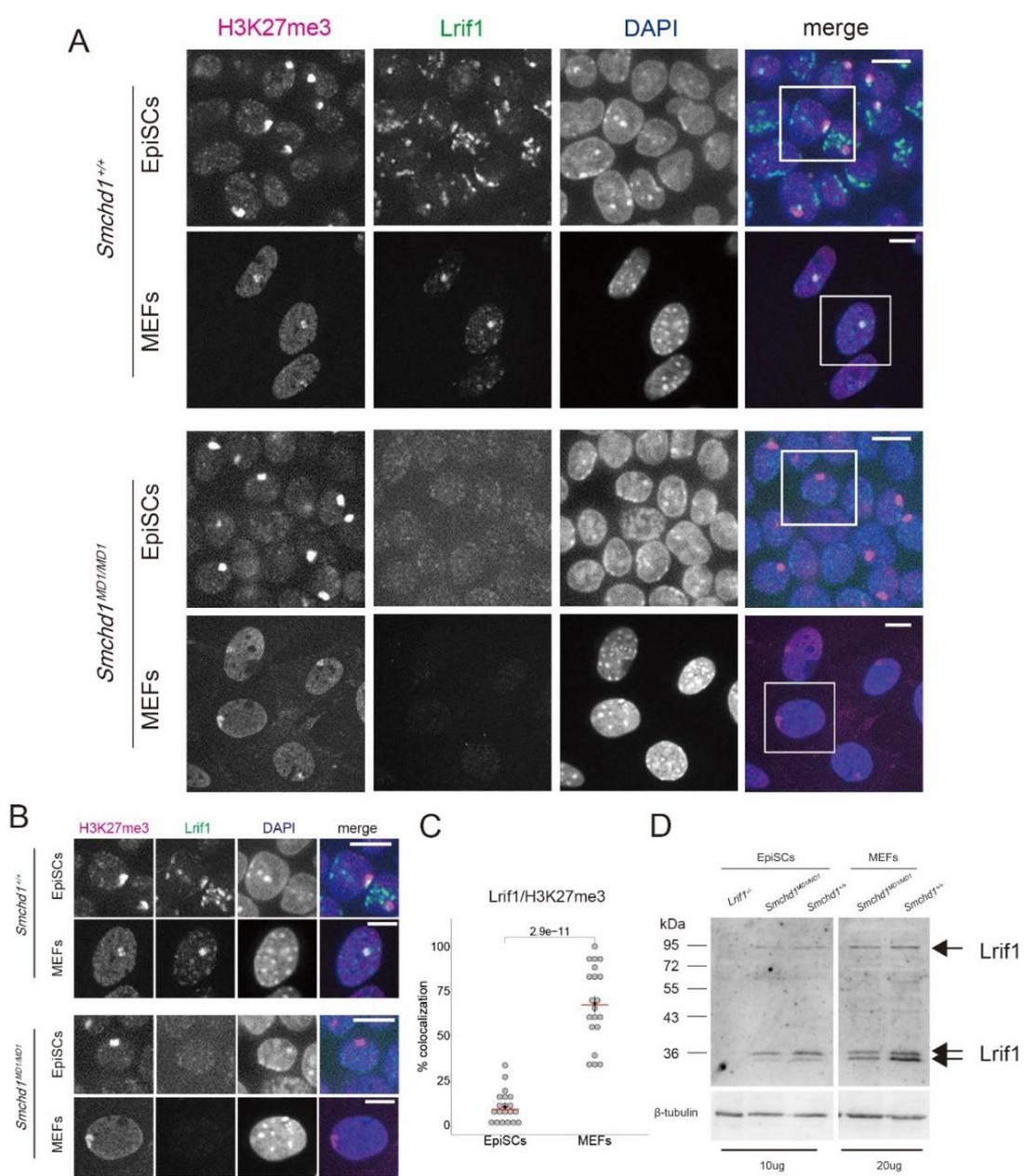


図 14 野生型と *Smchd1^{MD1/MD1}* の EpiSC と MEF における *Lrif1* の局在

(A) 野生型と *Smchd1^{MD1/MD1}* の EpiSC と MEF における H3K27me3 (マゼンタ) と *Lrif1* (緑) の免疫蛍光染色。写真は共焦点 1 平面の画像。四角の白線は(B)で用いた核を示した。スケールバーは 10 μm を示す。

(B) 野生型と *Smchd1^{MD1/MD1}* の EpiSC と MEF における H3K27me3 (マゼンタ) と *Lrif1* (緑) の免疫蛍光染色。写真は共焦点 1 平面の画像。スケールバーは 10 μm を示す。

(C)野生型の EpiSC と MEF において、不活性 X を示す H3K27me3 が集積する領域に *Lrif1* の集積が占める割合をそれぞれの核ごとに示し、比較したドットプロット。黒丸と赤の横棒はそれぞれ平均と中央値を示す。エラーバーは標準誤差を示す。p 値は Wilcoxon の順位和検定により求めた。

(D) 野生型と *Smchd1^{MD1/MD1}* の EpiSC と MEF における *Lrif1* のタンパク質量を比較したウエスタンブロット。

2-5. 変異型 MEF において H3K27me3 が低い SmcHD1 依存的な X連鎖遺伝子は EpiSC では H3K27me3 を獲得している

我々は以前、*Smchd1*^{MD1/MD1} の E13.5 の胎仔から調製した MEF で脱抑制される不活性 X 上の遺伝子は H3K27me3 の集積が比較的 low、その多くが胚盤胞期の野生型胚で H3K27me3 の集積が相対的に低い遺伝子群に含まれることを示した (Sakakibara *et al*, 2018)。この知見は、*Smchd1*^{MD1/MD1} 胚では、SmcHD1 が存在しないために、これらの X 連鎖遺伝子が H3K27me3 を獲得できない、あるいは着床後に獲得した H3K27me3 を維持できず、最終的に脱抑制されてしまうことを示唆している。これらの可能性を検討するために、着床後胚のエピブラストの状態を反映し、胚盤胞から妊娠中期への過渡期のクロマチン状態であると考えられる *Smchd1*^{MD1/MD1} EpiSC を用いて、H3K27me3 の集積状態を調べた。H3K27me3 に対する抗体を用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP) に続いて定量 PCR (qPCR) を行い、*Smchd1*^{MD1/MD1} MEF では脱抑制されているものの *Smchd1*^{MD1/MD1} EpiSC では抑制されている 2 つの X 連鎖遺伝子、*Hprt* と *Rlim* の遺伝子座における H3K27me3 の集積を調べた。その結果、これらの遺伝子座の *Smchd1*^{MD1/MD1} EpiSC における H3K27me3 の相対的な集積の程度は、野生型と同程度か、あるいはわずかに高いことが示された (図 15)。*Smchd1*^{MD1/MD1} MEF から調製したクロマチンを用いて同様の ChIP-qPCR を行うと、*Smchd1*^{MD1/MD1} MEF では野生型 MEF よりも H3K27me3 の集積の程度が低く、Sakakibara *et al* (2018) が報告した ChIP-seq と矛盾しない結果が得られた。この発見は、これらの 2 つの X 連鎖遺伝子座が、着床後の早い段階で XCI の進行に伴い H3K27me3 を獲得するものの、SmcHD1 がいないとその状態を維持できず、やがて脱抑制されるという可能性を示唆している。

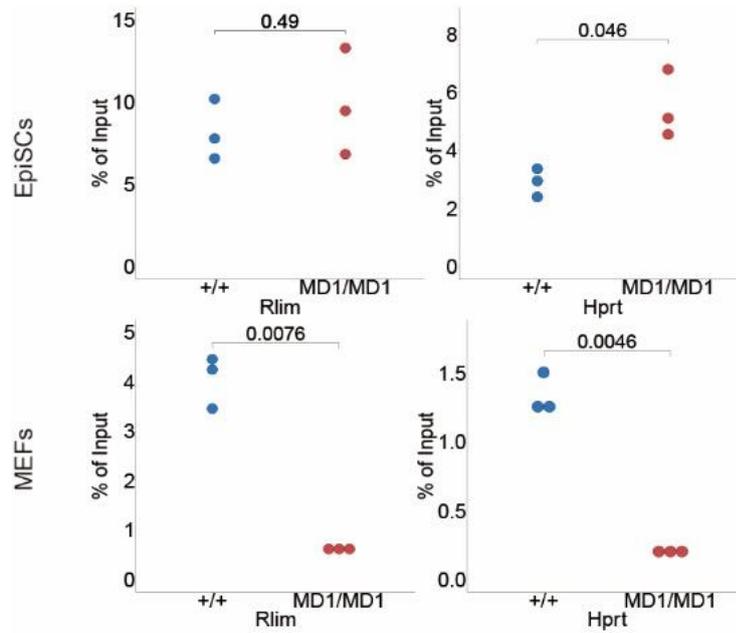


図 15 *Rlim* と *Hprt* 遺伝子座における H3K27me3 の濃縮の程度

H3K27me3 に対する抗体を用いた ChIP とそれに続く qPCR を行い、*Rlim* と *Hprt* 遺伝子座における H3K27me3 の濃縮の程度を、EpiSC と MEF についてそれぞれ野生型と *Smchd1*^{MD1/MD1} の間で比較した。p 値は Welch の t 検定により求めた。

2-6. SmcHD1 欠損は EpiSC において不活性 X 上の H3K9me3 の集積の大幅な消失を招く

SmcHD1 の欠損が EpiSC や MEF の不活性 X のエピジェネティック制御に与える影響をさらに調べるために、H3K27me3 と H3K9me3 の染色体上の分布をアレル特異的 ChIP-seq で調べた。野生型の EpiSC と MEF ではいずれにおいても、H3K27me3 は活性 X 上にはほとんど存在しなかったが、不活性 X では染色体全域にわたって分布し、遺伝子密度の高い領域と一致する形でいくつかのブロックを形成していた (図 16)。一方、H3K9me3 については、EpiSC では H3K27me3 同様、活性 X 上にほとんど存在しなかったが、MEF では活性 X 上の一部の限定的な領域に集積が認められた。そして、免疫染色では MEF でも EpiSC でも不活性 X 上に H3K9me3 の明らかな集積は認められなかったにもかかわらず、ChIP-seq では野生型の MEF の不活性 X に H3K9me3 が集積する、いくつかの明瞭なブロックが見出された。これは不活性 X 上に H3K9me3 の集積が認められることを示した Keniry らの以前の報告(Keniry *et al*, 2016)にある ChIP-seq の結果と矛盾しない結果と言える。野生型 EpiSC でも同様の結果が得られた (図 16A, B)。これらの H3K9me3 ブロックは、不活性 X 上で H3K27me3 のブロックと部分的に重なり合っている領域はあるものの、概ね H3K27me3 の集積が低めの領域に分布していた。*Smchd1^{MD1/MD1}* EpiSC の不活性 X における H3K27me3 の分布は、一見すると野生型と同等に見えるものの、実際には、図 16A の Overlay のトラックに示されるようにその分布領域はある程度広がっていた。同様の傾向は MEF でも見られた。最も興味深いのは、不活性 X 上の H3K9me3 の集積が *Smchd1^{MD1/MD1}* EpiSC では、著しく減退し、非常に限定的になっていることだった。そこで、野生型と *Smchd1^{MD1/MD1}* の EpiSC と MEF のそれぞれの不活性 X 上で H3K9me3 と H3K27me3 が集積する領域の割合を定量した (図 17A)。図 17A に示すように、野生型 EpiSC の不活性 X 上では、26.7%と 17.4%の領域がそれぞれ H3K9me3

と H3K27me3 のみで占められ、残りの大半にあたる 55.6%の領域では両ヒストン修飾の集積が認められた。しかし、*Smchd1^{MD1/MD1}* EpiSC では、野生型 EpiSC において H3K9me3 のみで占められていた領域の 1/3 が H3K27me3 に置き換わるだけでなく、残りの 2/3 の領域にも H3K27me3 が広がり H3K9me3 とともに集積していた。さらに、野生型 EpiSC では、H3K27me3 と H3K9me3 がともに集積している領域 (55.6%) の大部分が、*Smchd1^{MD1/MD1}* EpiSC では H3K9me3 の分布を失い、もっぱら H3K27me3 のみで占められるようになった。野生型と *Smchd1^{MD1/MD1}* の細胞における H3K27me3 と H3K9me3 の集積の程度を不活性 X 染色体全域にわたり 50kb 幅でペアワイズに比較した図 17B の散布図を見ると、*Smchd1^{MD1/MD1}* EpiSC においては H3K27me3 の集積が増加する一方で、H3K9me3 の集積は広範囲にわたって減退していることが明らかである。この状況は、変異型 MEF でも基本的に同じであった。また、不活性 X とともに活性 X と常染色体についてもそれぞれのヒストン修飾が占める割合を EpiSC と MEF で比較すると (図 17C)、H3K9me3 については、変異 EpiSC と MEF でそれぞれ野生型の不活性 X の 4 分の 1 と 2 分の 1 に減少し、活性 X と常染色体上についても MEF では野生型に比べわずかではあるが明らかな減少が観察された。一方、H3K27me3 が占める割合については、両細胞種で変異細胞の不活性 X においてのみ増大していた。MEF では EpiSC に比べて H3K9me3 の消失はそれほど大きくなかったが、それでも不活性 X 上の H3K27me3 の増加と拡張を伴っていた (図 17A, B, C)。これらの解析から、*Smchd1^{MD1/MD1}* EpiSC および MEF では、不活性 X 上で H3K9me3 が占める割合が減少し、H3K27me3 との置換や拡張が促進されていることが明らかとなった。さらに、変異 EpiSC では、不活性 X において H3K9me3 の集積が依然として認められる領域は、活性 X においても H3K9me3 の集積がわずかに認められる領域を内包していた (図 17D)。興味深いことに、MEF の不活性 X と活性 X を見ると、SmcHD1 欠損の背景では野生型に比べ H3K9me3 の集積の程度は低いものの、

H3K9me3 の分布する領域はほぼ同じであった。そして、EpiSC と MEF を比較すると、野生型の背景でも活性 X 上で H3K9me3 の集積とその領域の拡大が観察されることから、H3K9me3 ブロックの形成は活性、不活性を問わず X 染色体そのものの構造に影響を与えるのかもしれない。また、EpiSC の活性 X で H3K9me3 の集積が認められる領域は、活性 X と不活性 X のいずれにおいても最初に H3K9me3 が集積する部位で、不活性 X ではそこからさらに H3K9me3 の領域が拡大して大きなブロックを形成しているのかもしれない。*Smchd1^{MD1/MD1}* MEF では、H3K9me3 のブロックは減退してはいるものの、不活性 X 上に形成されてはいることから、SmcHD1 の欠損が必ずしも H3K9me3 の獲得と拡大を損ねるものではないことがわかる。また、SmcHD1 欠損 EpiSC と MEF における H3K9me3 の集積の低下は、不活性 X ほど顕著ではないものの常染色体領域でも観察されたことから不活性 X に限ったものではないという点も重要である (図 17B, E; 図 18)。これらの結果は、SmcHD1 の機能喪失が招く最も顕著な影響が、不活性 X における H3K9me3 の大幅な減退であることを示している。

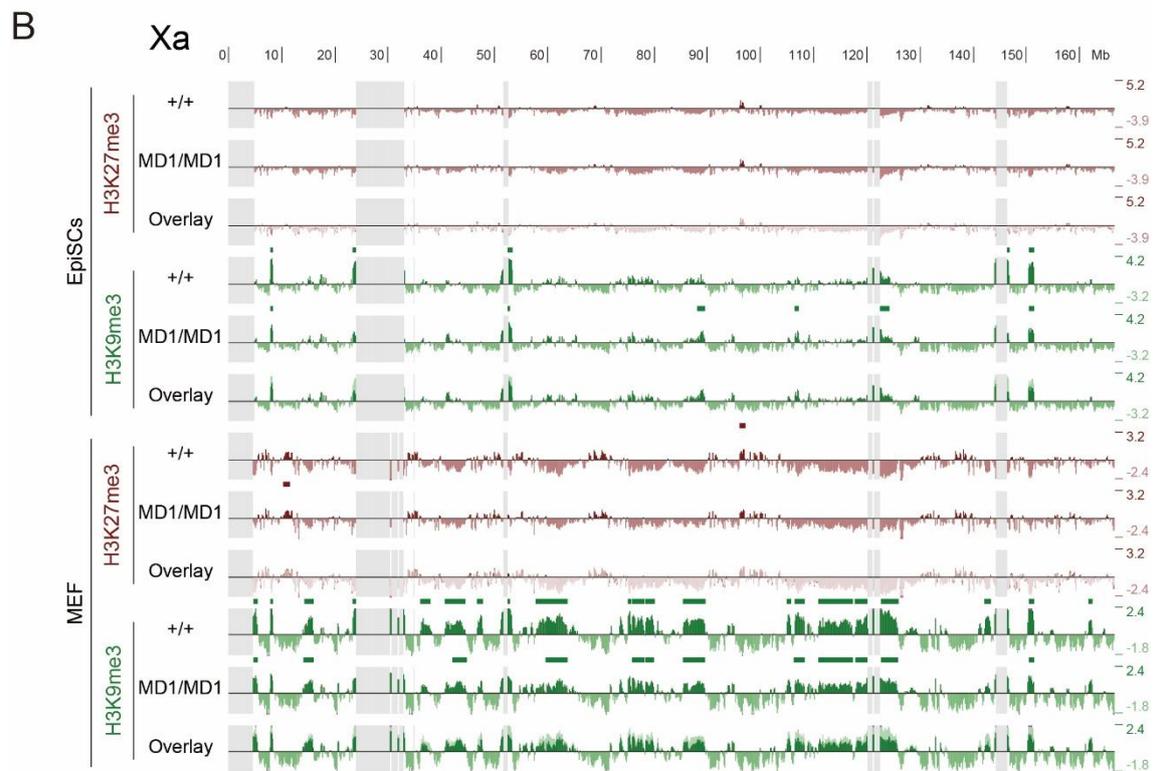
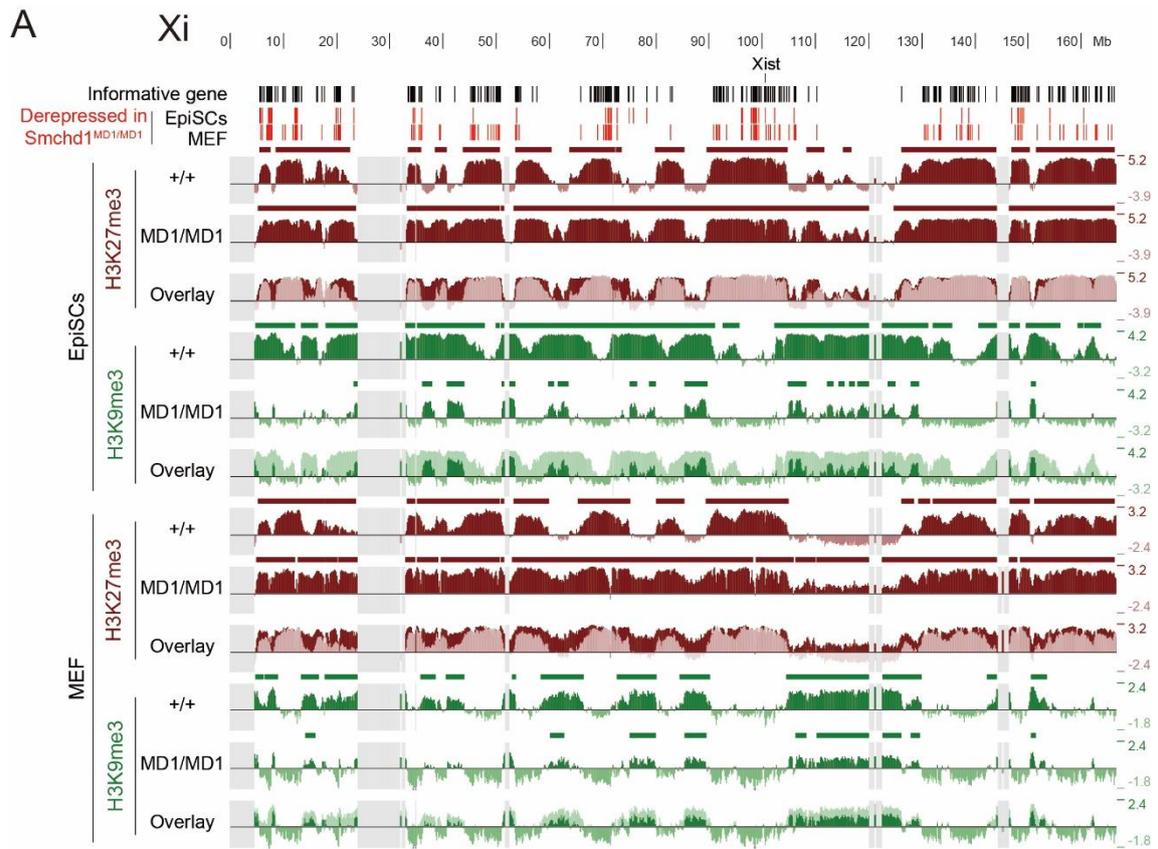
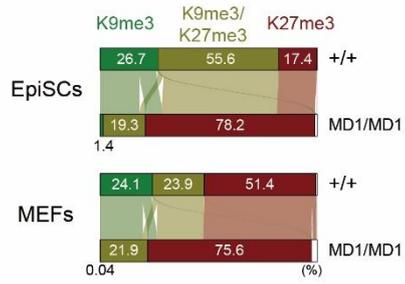


図 16 野生型と *Smchd1^{MD1/MD1}* の EpiSC と MEF における H3K27me3 と H3K9me3 の染色体ワイドな分布

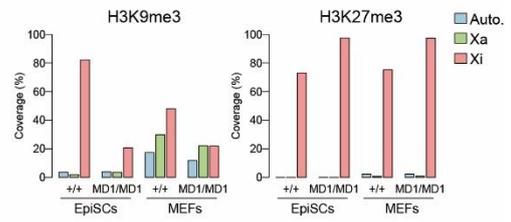
(A) ChIP-seq によって明らかにした、野生型および *Smchd1^{MD1/MD1}* EpiSC と MEF における不活性 X 上の H3K9me3 および H3K27me3 の分布。それぞれのヒストン修飾が野生型 MEF のゲノム全体の平均を超えるか下回るかで求めた濃縮の程度を、重複しない 150kb ビンごとの \log_2 (ChIP/Input) として、脱抑制される遺伝子の染色体上の位置とともに示す。それぞれのトラックの上を示された太線は、EDD (enriched domain detector) ドメインを表し、ゲノム全体の平均よりも高い濃縮した領域が、染色体に沿ってどの程度連続的に広がっているかを示している。オーバーレイで、野生型 (薄い色) と *Smchd1^{MD1/MD1}* (濃い色) の細胞におけるそれぞれの修飾の分布の違いを可視化。グレーはマッピング不可能な領域。

(B) ChIP-seq により明らかにした、野生型および *Smchd1^{MD1/MD1}* EpiSC と MEF の活性 X 上の H3K9me3 および H3K27me3 の分布。

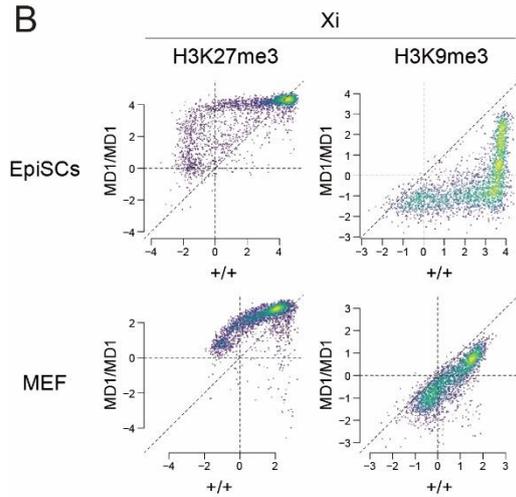
A



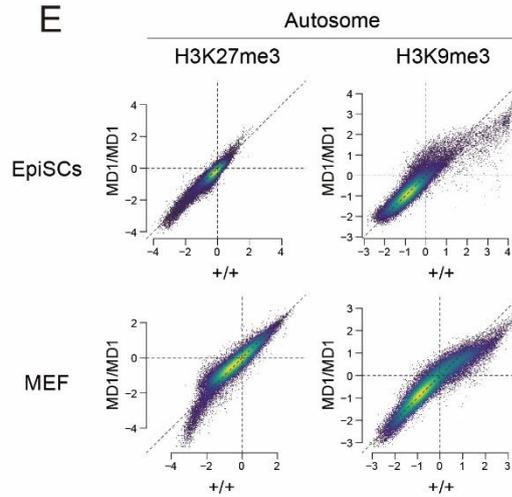
C



B



E



D

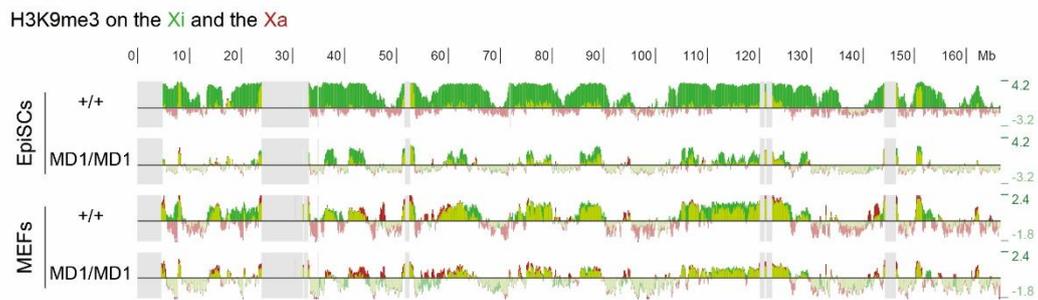


図 17 野生型と *Smchd1*^{MD1/MD1} の EpiSC と MEF における H3K27me3 と H3K9me3 の分布の定量的解析

(A) EpiSC (上) と MEF (下) それぞれにおいて、図 16A に示す EDD ドメインを利用して、不活性 X 上で H3K9me3、H3K27me3 が単独または重複して分布する領域それぞれの割合を野生型と *Smchd1*^{MD1/MD1} の間で比較した沖積図。

(B) EpiSC (上) と MEF (下) において、野生型と *Smchd1*^{MD1/MD1} それぞれの不活性 X における H3K27me3 (左) と H3K9me3 (右) の濃縮の程度を 50kb ごとに求め、ペアワイズに比較した散布図。

(C) EpiSC と MEF において、H3K9me3 と H3K27me3 の EDD ドメインが、不活性 X、活性 X および常染色体上全体に占める割合を野生型と *Smchd1*^{MD1/MD1} の間で比較した。マッピング可能なゲノム領域のみを考慮した。

(D) 野生型と変異型の EpiSC および MEF それぞれの活性 X (赤) と不活性 X (緑) の H3K9me3 のトラックを比較のため重ね合わせた。

(E) EpiSC (上) と MEF (下) において、野生型と *Smchd1*^{MD1/MD1} それぞれの常染色体全体における H3K27me3 (左) と H3K9me3 (右) の濃縮の程度を 50kb ごとに求め、ペアワイズに比較した散布図。

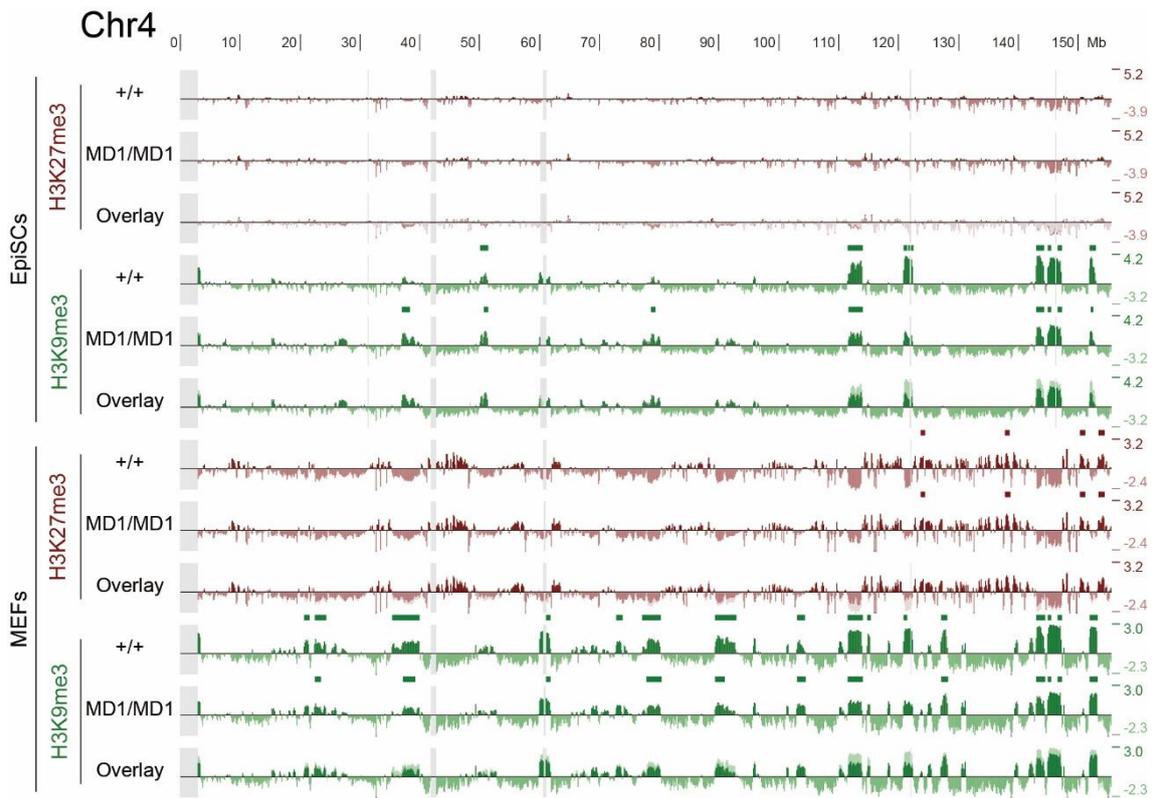


図 18 野生型と *Smchd1*^{MD1/MD1} の EpiSC と MEF の 4 番染色体における H3K9me3 の分布

ChIP-seq によって明らかにした、野生型および *Smchd1*^{MD1/MD1} EpiSC と MEF の 4 番染色体におけるヒストン修飾状態。各トラックと EDD ドメインは図 16A と同様に求めた。

2-7. SmcHD1 の欠損による不活性 X 上の H3K27me3 への影響

SmcHD1 欠損ホモ接合体の MEF の不活性 X で脱抑制される遺伝子は、H3K27me3 の集積が低いことを特徴とするが、これはそもそも H3K27me3 を獲得できなかったのか、それとも発生初期に獲得した H3K27me3 が後に失われたのかは不明であった。これについて、より深く洞察するために、変異型 MEF で脱抑制される遺伝子座の H3K27me3 の集積の程度を MEF と EpiSC で比較した。図 19A は、野生型と変異型の EpiSC および MEF の不活性 X において、異なるカテゴリーに属する代表的な遺伝子座の H3K27me3 と H3K9me3 の分布がどのようになっているかを示したものである。 *Atrx* や *Rlim* などの遺伝子は、変異型 MEF の不活性 X では H3K27me3 の集積が低く脱抑制されているのに対し、変異型 EpiSC の不活性 X では H3K27me3 の集積は高く、発現も抑制されていた ($\%Xi < 10\%$)。 *Ogt* のように変異型 EpiSC でも MEF でも抑制されていない遺伝子については H3K27me3 の集積の程度が低く、 *Fndc3c1* のように両方で安定に抑制されている遺伝子については H3K27me3 の集積の程度が高かった。また、不活性 X 上で発現される *Xist* と XCI を免れるいくつかのエスケープの遺伝子座では、EpiSC、MEF のいずれにおいても、野生型と変異型の両方で H3K27me3 の集積の程度は低かった。一方、EpiSC の *Atrx* や *Rlim*、EpiSCs と MEF の *Fndc3c1* などの遺伝子については、H3K9me3 が集積の有無は、必ずしも転写の状態とは相関していなかった。図 19B のボックスプロットに示すように、SmcHD1 欠損の背景で MEF でのみ脱抑制されるグループの遺伝子 (図 10A および 19B では緑で表現) は、EpiSC においては H3K27me3 の集積が高く、その程度は、EpiSC と MEF の両方で抑制されたままの遺伝子 (図 19B の白の遺伝子群) と同等であった。変異型 MEF において脱抑制されるこれらの遺伝子は、XCI の初期段階でサイレンシングのために H3K27me3 を獲得するが、SmcHD1 欠損胚ではその後の発生段階で H3K27me3 を失う類の遺伝子で、そのような胚の不活性 X は獲得した H3K27me3 を維持するのに

必要なクロマチン状態を構築できないものと考えられる。一方、H3K9me3 の濃縮の程度と遺伝子の抑制の間には、有意な相関は見られなかった (図 19C)。SmcHD1 の欠損が不活性 X 上の H3K9me3 の適切な分布を損なうことを考えると、H3K9me3 の消失が二次的に H3K27me3 の適切な集積と維持を損ない、最終的にいったんは不活性化された X 連鎖遺伝子の脱抑制を引き起こすのではないかと推察される。

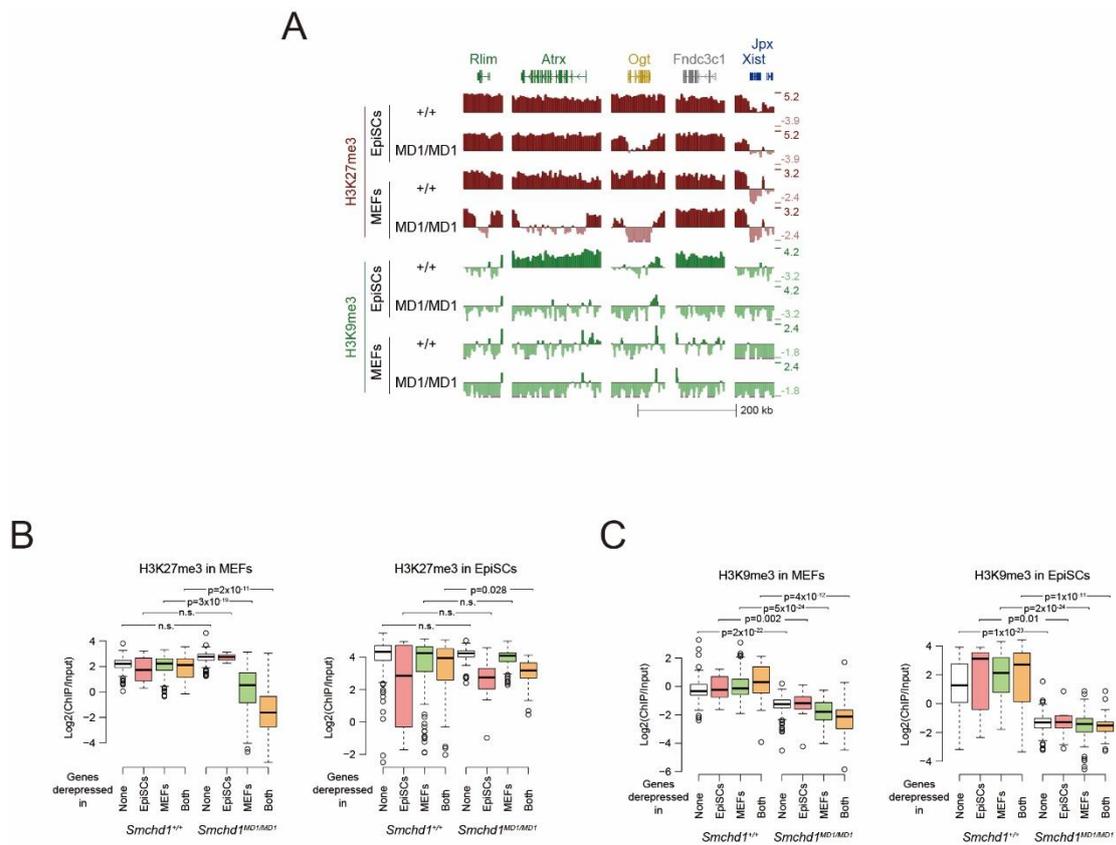


図 19 脱抑制している遺伝子座における H3K27me3 および H3K9me3 の濃縮の程度

(A) 野生型と *Smchd1*^{MD1/MD1} の EpiSC および MEF の不活性 X において、異なるカテゴリーの中から代表的な遺伝子座を選び、5kb のビンごとに求めた H3K27me3 と H3K9me3 の分布。*Rlim* と *Atrx* は、*Smchd1* 非存在下の EpiSC では抑制されているが MEF では脱抑制される遺伝子に属する。*Ogt* は EpiSC と MEF いずれの変異細胞でも脱抑制され、*Fndc3c1* はいずれにおいても安定に抑制されている遺伝子、*Xist* と *Jpx* はいずれの変異型においても XCI を免れる遺伝子に属する。

(B) MEF および EpiSC において、脱抑制の状態 (MEF 特異的、EpiSC 特異的、両方で抑制、両方で脱抑制) に応じて図 10A で分類した各グループの遺伝子の遺伝子本体の H3K27me3 の濃縮の程度を示す箱ひげ図。各ボックスの色は、図 10A に示したベン図における各グループの色と一致する。p 値、Wilcoxon 検定 (paired, one-sided)。n.s. : $p > 0.05$ 。

(C) MEF および EpiSC において、脱抑制の状態 (MEF 特異的、EpiSC 特異的、両方で抑制、両方で脱抑制) に応じて図 10A で分類した各グループの遺伝子の遺伝子本体の H3K9me3 の濃縮の程度を示す箱ひげ図。各ボックスの色は、図 10A に示したベン図における各グループの色と一致する。p 値、ウィルコクソン検定 (paired, one-sided)。

第3章 考察

メスのマウス胚では、胚発生過程において不活性化された X 染色体の安定な維持に SmcHD1 が重要な役割を担っていることが、いくつかの報告から示唆されている。SmcHD1 がない場合、メスの胚は妊娠中期に致死となるが、その原因の少なくとも一部は、発生初期に不活性化されていた X 連鎖遺伝子の脱抑制による胎盤の異常である。しかし、SmcHD1 を欠損したオスの胚も遺伝的背景が C57BL/6 のマウスでは周産期致死となることから (Leong *et al*, 2013)、SmcHD1 は雌雄ともに安定した遺伝子の抑制に不可欠で、メスはこのシステムを XCI の維持にも利用していると考えられる。我々の以前の報告から、SmcHD1 は不活性化された X 連鎖遺伝子の安定な抑制に必要なエピジェネティック状態の確立に関与していることが示唆されていたが、SmcHD1 の欠損が発生過程のヒストン修飾のダイナミクスにどのような影響を与えるかは不明であった。そこで、SmcHD1 が不活性 X のエピジェネティックな状態の確立に寄与するメカニズムを理解するために、XCI がすでに開始されているものの、MEF で見られるような完全に確立した状態には至っていないと考えられる着床後の未分化なエピブラストから樹立される EpiSC を用いた。EpiSC と MEF の間でみられた *Lrf1* の不活性 X への局在や H3K9me3 の核内分布の差異は、EpiSC のクロマチン状態が未分化な細胞から分化した細胞のクロマチン状態への過渡期にあるという考えを支持するものである。

野生型と *Smchd1^{MD1/MD1}* EpiSC のアレル特異的 RNA-seq により、*Smchd1^{MD1/MD1}* EpiSC では不活性 X 上の X 連鎖遺伝子の大半が抑制され、発現しているものは約 20% に過ぎなかったことから、*Smchd1^{MD1/MD1}* EpiSC の不活性 X では遺伝子の大部分が実質的に抑制されていることが分かった。これは、*Smchd1^{MD1/MD1}* MEF で不活性 X 連鎖遺伝子の半分以上が脱抑制されているのと対照的である。また、EpiSC で抑制されて

いるものについては H3K27me3 の集積が認められるのに対し、*Smchd1*^{MD1/MD1} MEF では、それらの遺伝子の一部が脱抑制され、ゲノム全体の平均よりも H3K27me3 の集積が低下していた。EpiSC が着床後のエピブラストにおけるエピジェネティックな状態をどの程度再現しているのかについては、さらなる研究が必要であるが、今回の結果は、*Smchd1*^{MD1/MD1} 胚の発生過程におけるエピブラストの細胞では分化誘導後の野生型 ESC 同様(Colognori *et al*, 2020)、*Xist* RNA によって覆われた X 染色体上の遺伝子は不活性化され、H3K27me3 を獲得するが、その後、散発的に H3K27me3 を失い脱抑制される可能性を示唆している。X 染色体の不活性化状態を安定的に維持するためには、抑制された遺伝子座に H3K27me3 が集積した状態を維持することが重要であると思われる。しかしながら、不活性 X がエピブラスト系列の細胞において安定に維持される EED 欠損胚の報告を考えると (Kalantry and Magnuson, 2006)、H3K27me3 の消失だけが SmcHD1 欠損 MEF における X 連鎖遺伝子の脱抑制の唯一の原因ということではなさそうである。以前の報告にもあるように、DNA メチル化が SmcHD1 を介した XCI の維持に関与しているのは明らかである。これまでのところ、EpiSC や MEF において、SmcHD1 の欠損が不活性 X に集積する H2AK119ub にどのような影響を及ぼしているかは不明であるが、SmcHD1 欠損 MEF では H3K27me3 だけでなく H2AK119ub も消失していて、これが不活性 X を不安定にしている可能性はある。

野生型と比較して観察される SmcHD1 欠損細胞の不活性 X におけるもっとも顕著なクロマチンの異常は、H3K9me3 の大規模な消失であった。しかし、それでも変異型 EpiSC では、不活性 X 上の限られた領域で活性 X を上回る H3K9me3 の集積が認められ、さらに、野生型に比べ減退してはいるものの、いくつかの H3KH9me3 ブロックが変異型 MEF でも形成されていたことは注目に値する。したがって、SmcHD1 欠損細胞では、不活性 X への H3K9me3 の集積そのものや最初に集積した部位からの伝播は必ずしも損なわれておらず、H3K9me3 の集積の程度や伝播が野生型に比べ不十分

ということなのかもしれない。とはいえ、野生型 EpiSC や MEF では、H3K9me3 の集積の有無が必ずしもその領域の遺伝子の活性と相関しないため、H3K9me3 の消失が不活性化された X 連鎖遺伝子の脱抑制に直接関与しているとは考えにくい。これまでに誘導性 *Xist* アレルをもつ未分化な ESC の分化誘導系を用いたいくつかの研究によって、*Xist* による抑制は、誘導後数時間で観察されるエンハンサーやプロモーター領域における H3K27ac の脱アセチル化に始まり、その後 PRC1 による H2AK119ub の集積、そして PRC2 による H3K27me3 の集積と続くことが示唆されている (Zylicz *et al*, 2018; Nesterova *et al*, 2019)。また、分化途上のメス ESC では、分化 5 日目までに H2AK119ub と H3K27me3 が不活性 X 上のほぼ同じ領域に集積し、その状態はその後維持されるが (Colognori *et al*, 2020)、それらの分布は野生型 EpiSC と MEF で観察された H3K27me3 の分布と高い相関が認められる (図 21A)。また、メスの ESC の分化過程において、SmcHD1 が不活性 X に局在し始めるのは 7 日目前後であること (Gendrel *et al*, 2012; Sakata *et al*, 2017、メスの MEF において SmcHD1 の不活性 X へのリクルートは H2AK119ub に依存していることが報告されている (Jansz *et al*, 2018b)。これらの知見を勘案すると、分化前のエピブラスト細胞においては、H2AK119ub を介して不活性 X にリクルートされ、蓄積した SmcHD1 が、不活性 X 上に適切な H3K9me3 ブロックを形成することに重要な役割を果たすとともに、H3K27me3 と H3K9me3 それぞれのヘテロクロマチンブロックの確立の促進にも重要な役割を果たしていると考えられる (図 20)。不活性 X 上に H3K9me3 のブロックが形成されることで H3K27me3 が占める領域が、そしておそらくは H2AK119ub が占める領域も制限されることになるが、その H3K9me3 のブロックの形成が損なわれると H3K27me3 の全体としての分布が乱れ、*Smchd1^{MD1/MD1}* の EpiSC と MEF に見られるような通常とは異なる H3K27me3 のブロックが形成されるのかもしれない。もし、H3K27me3 の維持に利用できる PRC2 の量が限られるのであれば、XCI の初期に抑制

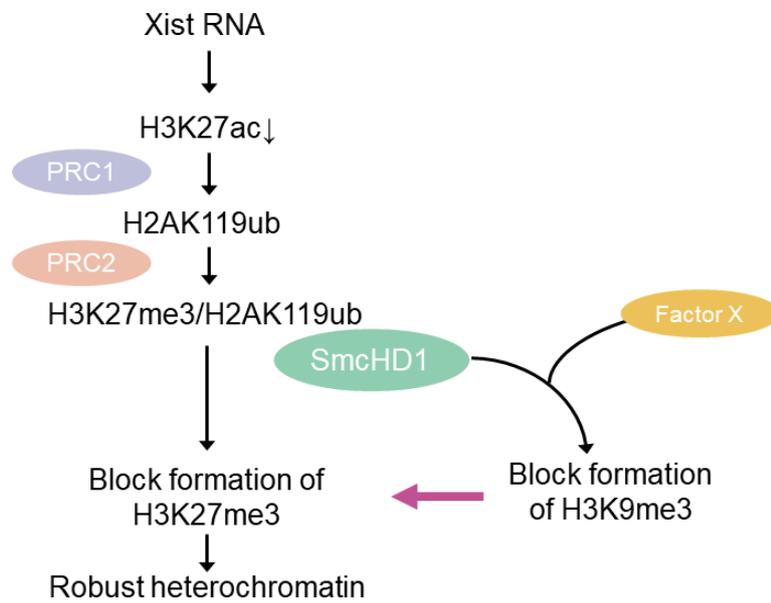


図 20 不活性 X はどのようにして SmcHD1 依存的な様式で H3K27me3/H3K9me3 ブロックを確立するのか

これまで報告されてきた知見に本研究で得られた発見を統合させた、XCI はどのように開始され、エピジェネティック修飾が制御されるかについてのモデル図。

された X連鎖遺伝子座に集積した H3K27me3 が、PRC2 の供給が追いつかないために一部失われ、時間の経過と共にそれらの遺伝子座が脱抑制されることが考えられる。あるいは、H3K9me3 の伝播とその後に形成された H3K9me3 のブロックが不活性 X のさらなる凝縮を促進し、非常に強固なヘテロクロマチンを作る可能性もある。H3K9me3 がないと、不活性 X が比較的弛緩したままとなり、それが抑制された特定の遺伝子座へ H3K27me3 の脱メチル化酵素のアクセスを許し、最終的にその脱抑制を招くのかかもしれない。H3K27me3 および H2AK119ub に対する抗体を用いた免疫蛍光染色による不活性 X のシグナル強度は、*Smchd1^{MD1/MD1}* の EpiSC および MEF では野生型と比較して著しく増強されていた。これは、変異型では不活性 X 上の H3K27me3 ブロックが見たところ拡大していることが原因かもしれない。あるいは、変異型では不活性 X のクロマチンの凝縮の程度が低いいため、それぞれの抗体が標的部位にアクセスしやすくなり、シグナル強度が増加した可能性も考えられる。

SmcHD1 については、これまでにクロマチンの高次構造の制御に果たす役割が示唆されている(Wang *et al*, 2018; Jansz *et al*, 2018a; Gdula *et al*, 2019)。Wang ら (2018) は、分化途上の野生型のメス ESC の不活性 X に関する Hi-C データの主成分分析 (PCA) により同定された S1/S2 と呼ばれるコンパートメントは、PCA で活性 X に同定される A/B コンパートメントとは異なるもので、それらは SmcHD1 がクロマチンを折りたたんで最終的に作り上げる 2 つの大きなメガドメインからなるコンパートメントに分かれていない不活性 X に特有の構造の形成途上の状態を反映したものではないかと考えた。これは SmcHD1 欠損 ESC から誘導した神経前駆細胞 (NPC) の不活性 X が、野生型の NPC の PCA で同定される不活性 X 特有のメガドメインの代わりに出現するコンパートメントが分化課程の ESC で見出された S1/S2 コンパートメントとよく似た構造であったことに基づいている(Wang *et al*, 2018)。S1 コンパートメントが、

ESC から分化した胚様体 (EB) だけでなく、SmcHD1 を欠損した NPC や不死化 MEF においても、不活性 X 上の H3K27me3 や H2AK119ub の分布領域と高い相関を示すことに加え、PRC1 が不活性 X を S1/S2 コンパートメントに分割することが示されている (Wang *et al*, 2019, 2018; Gdula *et al*, 2019)。図 21A および図 21B に示すように、本研究で用いた野生型 EpiSC および MEF の不活性 X 上で検出される H3K27me3 および H3K9me3 ブロックは、野生型 EB の不活性 X 上に出現した S1 および S2 コンパートメントとそれぞれ高い相関を示している。したがって、H3K27me3 あるいは H3K9me3 が集積する領域間の染色体内相互作用が、PCA による PC1 としての S1 および S2 コンパートメントの出現に関与している可能性が考えられる。SmcHD1 欠損 NPC を用いた Wang ら (2018) の知見を踏まえると、我々の変異 EpiSC および MEF における不活性 X は不活性 X 特異的なメガドメインを形成できず、コンパートメント化したままと考えるのが妥当であろう。しかし、H3K27me3 の拡張や H3K9me3 の消失が、SmcHD1 欠損 EpiSC や MEF における不活性 X 上の S1/S2 コンパートメントの分布に影響を与えるかどうかは現在のところ不明である。したがって、今後の研究では、*Smchd1^{MD1/MD1}* EpiSC や MEF を用いた Hi-C 解析を行うことで、H3K9me3 が S1/S2 コンパートメントの形成と不活性 X の高次クロマチン構造にどのように関わっているか、さらなる理解が得られることと思われる。また、野生型 および SmcHD1 欠損 ESC 由来の EB において、不活性 X 上の H3K9me3 の集積を調べることにより、H3K9me3 が不活性 X の高次クロマチン構造に与える影響も評価できるとと思われる。

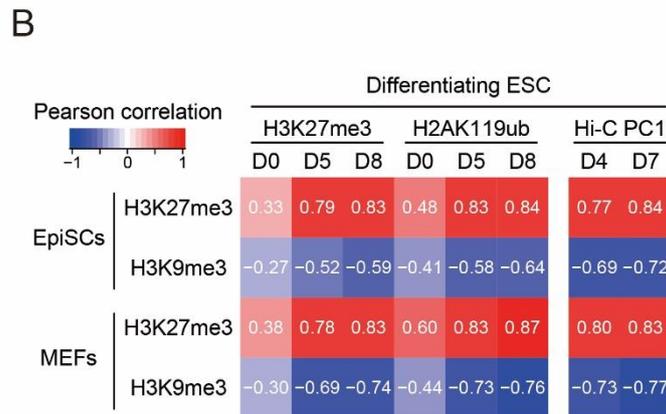
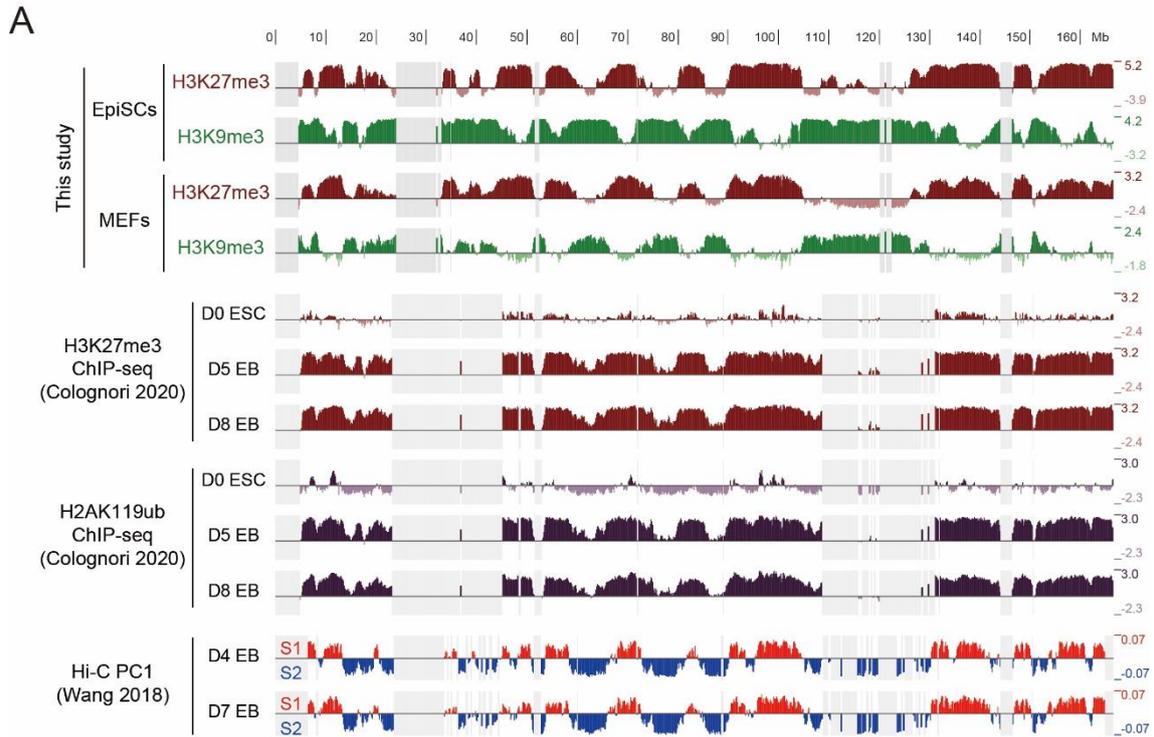


図 21 不活性 X 上の H3K9me3 ブロックは S2 コンパートメントと相関する

(A) 本研究で明らかになった EpiSCs と MEF の Xi 上の H3K27me3 と H3K9me3 の染色体分布を、Colognori ら (2020) が明らかにした将来不活性化される ESCs の X と EB の不活性 X における H3K27me3 と H2AK119ub の集積、および Hi-C 解析の結果 EB の不活性 X 上に PC1 として出現する S1/S2 コンパートメントの分布 (Wang *et al.*, 2018) と並列に並べ比較した。

(B) EpiSC/MEF における 50kb ビンごとの、H3K27me3 および H3K9me3 のそれぞれの濃縮の程度と、Wang ら (2018) による EBs として分化させた ESC の各分化日数における H3K27me3 および H2AK119ub それぞれの濃縮の程度との間のピアソン相関。同様に、Hi-C PC1 値との相関も評価した。

H3K9me3 は内在性レトロウイルス (ERV) の抑制に重要な役割を果たし、H3K9 トリメチル化酵素である SetDB1 の欠失による H3K9me3 の喪失は、マウス ES 細胞において多くのクラスの ERV の脱抑制を招くだけでなく、分化した細胞においてもある種の ERV の脱抑制を招くことが示されている (Kato *et al*, 2018; Matsui *et al*, 2010)。SmcHD1 の欠損により不活性 X 上の H3K9me3 が広範囲にわたって失われたことから、*SmcHD1^{MD1/MD1}* EpiSC において ERV の抑制に影響があるかどうかを検討した。しかし、SmcHD1 の欠損が EpiSC においてトランスポゾンの脱抑制を引き起こす証拠は得られなかった (data not shown)。

我々が知る限り、SmcHD1 と H3K9me3 の制御装置との相互作用を示す直接的な証拠はない。しかし、SmcHD1 が Lrif1 (ヒトにおける HBiX1) との相互作用を介して、H3K9me3 を認識して結合するタンパク質である HP1 と相互作用し得るという、我々の発見を含むこれまでの知見に基づくと、SmcHD1 と H3K9me3 の関連が見えてくるかもしれない (Nozawa *et al*, 2013; Brideau *et al*, 2015)。SmcHD1 と Lrif1 は、EpiSC の H3K9me3 に富むヘテロクロマチンに局在している。興味深いことに、Lrif1 は EpiSC と MEF のいずれにおいても SmcHD1 がないと、DAPI で濃染されるヘテロクロマチンへ局在しなくなることから、Lrif1 の DAPI で濃染されるヘテロクロマチンへの局在は SmcHD1 に依存することが示唆される。したがって、SmcHD1 は Lrif1 を介した HP1 との相互作用なしに、H3K9me3 に富むヘテロクロマチンと会合する別の方法を持っている可能性があると考えるのは不自然なことではないであろう。SmcHD1 と結合して不活性 X 上の H3K9me3 を制御する因子の候補は、DAPI で濃染されるヘテロクロマチンにおいて H3K9me3 の制御に関与する因子の中に見出されるかもしれない。

本研究は、マウスの XCI においてこれまでほとんど議論されず、見過ごされてきた H3K9me3 の重要性に一石を投じるものと言える。これまで構成的ヘテロクロマチン

は H3K9me3、条件的ヘテロクロマチンは H3K27me3 よって主に制御されると考えられることの多かった両ヒストン修飾であるが、本研究により不活性 X の抑制状態の安定な維持には SmcHD1 依存的な H3K9me3 ブロックの形成と H3K27me3 の適切な維持が重要であることが示唆された。このような制御機構が不活性 X だけのものであると考えるのは不自然で、同様なクロストークが条件的ヘテロクロマチンの制御に不偏的に関与している可能性が高い。

第4章 材料と方法

4-1. マウスの系統維持と交配

MommeD1 マウスについては(Blewitt *et al*, 2008)を参照。MommeD1 のコロニーの遺伝的背景は C57Bl/6 (B6)に置換されている。*Xist* の機能不全アレルは以前報告している *Xist^{AA}* と *Xist^{lox}* の二種類を用いた(Hoki *et al*, 2009; Sado *et al*, 2005)。これらのマウスの遺伝的背景も B6 に置換されており、ヘテロ接合体のメスと B6 系統のオスとの交配により維持した。JF1 マウスについては自家繁殖させ維持した。JF1 由来の X 染色体をもつ *Smchd1^{MD1}* についてヘテロ接合体のオス [*X^{JF1}Y*; *Smchd1^{+MD1}*] は、JF1 のメスと *Smchd1^{+MD1}* のオスとの交配により得た。*Xist^{AA}* あるいは *Xist^{lox}* と *Smchd1^{MD1}* についてダブルヘテロ接合体のメスは、どちらか一方の *Xist* 変異型についてヘテロ接合体のメスと *Smchd1^{MD1}* についてヘテロ接合体のオスの交配により得た。これらのオスとメスのマウスを交配し、 [*X^{B6-AA}X^{JF1}*; *Smchd1^{MD1/MD1}*] あるいは [*X^{B6-lox}X^{JF1}*; *Smchd1^{MD1/MD1}*] の胚から EpiSC の樹立と MEF の調製を行った。遺伝子型決定に用いたプライマー配列は表 1 に記した。すべてのマウスが、「近畿大学実験動物規定」に沿って適切に管理、使用された。

4-2. 細胞培養

E6.5 の胚からの EpiSC の樹立と培養は過去の報告に基づいて IWP-2 存在下で行った(Sugimoto *et al*, 2015)。15%KSR、1x 非必須アミノ酸、0.1 mM 2-メルカプトエタノール、0.5x ペニシリン/ストレプトマイシン、12 ng/mL bFGF、20 ng/mL Activin A、2 μM IWP-2 を含む DMEM/F-12 GlutaMAX 培地を用い、フィーダー細胞の上で培養した。継代は Accutase で細胞を解離する前に 10 μM Y27632 で 1 時間、細胞を処理した。EpiSC の分化誘導も Sugimoto *et al*. (2015) の報告に従って行った。26G の注射針

を用いて培養ディッシュ上の EpiSC コロニーに縦横格子状の引っ掻き傷を付けたのち、P200 チップでコロニーをディッシュからはがすことで細胞塊として EpiSC を回収し、EpiSC 用培地を含む FBS コートしたディッシュに移して、2 日間培養した。その後形成された複数のコロニーを同様に処理し、細胞塊として回収した EpiSC を 10% FBS と 1x 非必須アミノ酸、0.2 mM 2-メルカプトエタノール、0.5x ペニシリン/ストレプトマイシンを含む DMEM/F-12 GlutaMAX 培地で 7 日間浮遊培養し、胚様体を形成させた。7 日後、得られた胚様体をゼラチンコートした細胞培養ディッシュに移し、同じ培地でさらに 7 日間あるいは 14 日間接着培養し、胚様体から広がる細胞を分化、増殖させた。

4-3. RNA-FISH

Xist の cDNA 断片約 13kb を含むプラスミド p*Xist* ss12.9 と *Atrx* 遺伝子座を含む BAC クローン RP23-260I15 を、Nick Translation Kit (Abbott Molecular) を使用して Green dUTP または Cy3 dUTP で標識したものをプローブとした。標識したプローブは ProbeQuant G-50 Micro Columns (GE Healthcare) を用いて精製したのち、100 μ g の酵母 tRNA と 100 μ g のサカナ精子 DNA、BAC プローブの場合はさらに 50 μ g のマウス Cot-1 DNA とともにエタノール沈殿し、50 μ L のホルムアミドを加え 70°C で 10 分保温し溶解した。カルノア固定した細胞の場合は、2 x ハイブリダイゼーションバッファー (4 x SSC、4 mg/mL BSA、20%硫酸デキストランナトリウム) と 2 x ハイブリダイゼーションバッファーの半量の各プローブをカバーガラス上で混合し、標本上に伸展した。ペーパーボンドでカバーガラスのふちを囲い、湿潤箱にいれ 37°C で一晩保温しハイブリダイゼーションを行った。翌日 2 x SSC/0.05% Tween20 内でカバーガラスが自然に剥がれ落ちるのを待ち、42°C の 2 x SSC/50%ホルムアミド中で 10 分の洗浄を 2 回行い、42°C の 2x SSC/0.05% Tween20 中で 10 分の洗浄を 2 回行った。洗浄

後 VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI で封入し対比染色を行った。カバーガラス上で培養した細胞の場合は、4% パラフォルムアルデヒド (PFA) で室温、10分固定したのちに 0.5% Triton-X100/0.5% BSA/PBS で 30 分間膜透過処理とブロッキングを行い、70%と 100% EtOH で脱水し風乾したものをサンプルとした。適当な大きさのパラフィルムの上で上述のように混合したプローブのドロップを作り、細胞面を下にしてカバーガラスを被せ、全体にプローブを進展させた。湿潤箱にいれ 37°C で一晩保温しハイブリダイゼーションを行ったのち、2xSSC を加えパラフィルムを剥がし 45°C の 2x SSC/50%ホルムアミド中で 15 分の洗浄を 2 回を行い、45°C の 2x SSC/0.05% Tween20 中で 15 分の洗浄を 2 回行った。洗浄後は上述のように対比染色を行った。

4-4. RT-PCR によるアレル特異的遺伝子発現解析

1 μ g のトータル RNA を用い、ランダムヘキサマーをプライマーとし、SuperScript III (Invitrogen) で逆転写反応により cDNA を合成した。その後、制限酵素認識配列に塩基多型をもつ領域を表 1 に記したプライマーを用いて PCR により増幅した。PCR 産物をそれぞれ適切な制限酵素で消化した (*Pdha1* は *TaqI*、*G6pd* は *DraI*、*Hprt* は *HinA*、*Rex3* は *BsrGI*、*Rbm3* は *DdeI*)。

4-5. Immuno-RNA FISH

カバースリップ上で培養した細胞を 2% PFA/0.5% TritonX-100 で 10 分固定したのち、0.5% Triton-X100/0.5% BSA/PBS で 30 分間膜透過処理とブロッキングを行った。1u/ μ L RNase Out を含む H3K9me3 に対する抗体希釈液を用いて 4°C で一晩抗体反応を行った。翌日 0.05% Tween20/PBS で抗体を洗浄したのち、CF594 Goat anti-mouse IgG (Biotium) を用いて室温で 1 時間抗体反応を行った。0.05% Tween20/PBS で抗体を洗浄したのちに、

4%PFA で固定し、改めて 0.5% TritonX-100/PBS で 5 分間膜透過処理を行った。その後 2xSSC で洗浄し、先に記述したように RNA-FISH のプローブの反応を行った。

4-6. 免疫蛍光染色

カバースリップ上で培養した細胞を用意し、抗 SmcHD1 抗体を使う時は 0.4% PFA で 7 分間固定し、0.5%TritonX-100/PBS で 10 分間膜透過処理を行った。Blocking one (ナカライテスク) で 20 分間ブロッキングし、Signal Enhancer HIKARI A (ナカライテスク) で希釈した抗 SmcHD1 抗体 (終濃度 1/1000) を用いた。抗 Lrif1 抗体 (終濃度 1/1000) を使う時は 0.4% PFA で 10 分間固定し、0.5% BSA/0.5% TritonX-100/PBS で 30 分間膜透過処理とブロッキングを行った。H3K27me3 (終濃度 1/200)、H3K9me3 (終濃度 1/100)、および H2AK119ub (終濃度 1/200) に対する抗体を用いる場合は 4% PFA で 10 分間固定し、0.5% BSA/0.5% TritonX-100/PBS で 30 分間膜透過処理とブロッキングを行った。SmcHD1 を除いた全ての抗体は 0.05% Tween20/PBS で希釈した。SmcHD1 と共染色する時は抗 H3K27me3 抗体を Signal Enhancer HIKARI A (ナカライテスク) で希釈した。一次抗体については 4°C で一晩反応を行い、翌日 0.05% Tween20/PBS で細胞を洗浄したのちに、二次抗体に CF594 Goat anti-mouse IgG (Biotium) (終濃度 1/1000) と CF488A Goat anti-Rabbit IgG (Biotium) (終濃度 1/1000) を用いて室温で 1 時間反応を行った。蛍光画像は Olympus Disk Scanning Unit (DSU) を搭載した倒立顕微鏡 (IX71, Olympus) と EM-CCD カメラ (iXon, Andor) で撮影し、MetaMorph イメージングソフトウェア (Molecular Devices) で解析した。

Lrif1 に対する抗体は、Lrif1 の最後の 237 アミノ酸に His タグを付加した組換えタンパク質で免疫したウサギから得た血清を、その抗原を用いたアフィニティクロマトグラフィーにより精製した。本抗体の特異性は Lrif1 ノックアウト細胞を用いて確認した。本研究に使用した抗体を表 2 に記した。

4-7. 蛍光強度の定量

シグナル強度は ImageJ (1.52h) を用いて解析した。H3K27me3 および H2AK119ub に対する抗体で可視化された不活性 X のドメインの輝度は、(検出された不活性 X ドメインの面積×選択した不活性 X の平均蛍光輝度) - (検出された不活性 X ドメインの面積×その不活性 X をもつ核の核質の任意の面積の平均蛍光輝度) により求めた。

異なる抗体により可視化されたシグナルの共局在の定量は Metamorph ver 7 を用いて解析した。1 プレーンの画像中でそれぞれの抗体が検出するシグナルの閾値を画像ごとに手動で設定し、H3K27me3 と Lrif1、H3K27me3 と SmcHD1、H3K9me3 と Lamin B1 の組み合わせでそれぞれ閾値を上回る蛍光を示す領域の重なりを定量した。H3K27me3 と Lrif1 あるいは H3K27me3 と SmcHD1 の共局在については、独立した H3K27me3 のドメインを認識できる核のなかからランダムに選んだ。H3K9me3 と Lamin B1 の共局在については、核膜周辺に存在する Lamin B1 が明瞭に認識できるプレーンの核をランダムに選んだ。Wilcoxon の順位和検定と Tukey 検定は R (4.0.1) で行った。

4-8. アレル特異的 RNA-seq

フィーダー細胞の上で培養していた EpiSC を 1 時間 Y27632 で処理した後に Accutase を用いて細胞を解離させた。フィーダー細胞を除去するために、細胞懸濁液をゼラチンコートした培養ディッシュに移し 37°C の CO₂ インキュベーターに 30 分間静置した。EpiSC とフィーダー細胞ではゼラチンコートしたディッシュへの接着度合いが異なるため、30 分後穏やかに懸濁すると、EpiSC は容易に舞い上がるがフィーダー細胞は接着したままの細胞が多く観察される。フィーダー細胞をより取り除くために、ゼラチンコートした別のディッシュに細胞懸濁液を移し、もう一度同じ処理を施した。30 分後細胞懸濁液を穏やかに懸濁し、15 mL チューブに回収後、遠心分離によ

り得られたペレットを TRIzol (Ambion) で溶解した。得られた溶解液から TRIzol 添付のプロトコルに従ってトータル RNA を回収した。TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit (Illumina) に従ってライブラリーを調製し、イルミナプラットフォームを用いてペアードエンドの 101 bp の配列を得た。

アレル特異的な解析は Sakata et al. (2017) に従って行ったが、軽微な変更を加えた。(1) ペアードエンドのリードはシングルエンドのリードとして扱った。(2) レプリケートにおけるアレル特異的なリード数は合算した。(3) アレル特異的なリードが 10 以上ある遺伝子を不活性 X から発現している遺伝子と判断した。(4) アレルを区別せずに遺伝子発現レベルを FPKM として見積るために、Cufflinks v2.2.1 の cuffdiff に '--library-type ff-firststrand --multi-read-correct' のオプションを加えて用いた。MEF の RNA-seq のデータは以前報告している (Sakakibara et al., 2018)。各遺伝子について、母方由来 (B6 もしくは 129) と父方由来 (JF1) のアレル特異的なリードの数を数え、父方由来アレルの総発現量の割合を不活性 X からの発現を示す %Xi として計算した。アレル特異的な解析の際、Tmsb4x の多型は 9 個の連続したアデニンに 1 個のアデニン挿入というエラーを起こしやすいインデルのみであることに気付いた。そこで、Las1l と Dynlt3 (Sakata et al, 2017) に加えて Tmsb4x の 3 つの遺伝子を、さらなるアレル特異的な解析から除外した。一般的に受け入れられている閾値に従って (Peeters et al, 2014)、野生型の細胞の不活性 X からの %Xi が 10 % 以上あるものを、不活性 X から発現しているエスケープーとして分類した。エスケープーに分類されなかった遺伝子のうち、抑制されている遺伝子と脱抑制された遺伝子の区別は、不活性 X からの発現が総発現量の 10 % を閾値として、それを超えるか超えないかで判断した。細胞株間の比較には、全ての株間で適切な比較が可能な %Xi を示す遺伝子のみを用いた。図 9D では FPKM 値が 1 以上示すものを発現している遺伝子として考慮した。

ESC の発現プロファイルは、我々の最近の論文 (Takahashi *et al*, 2019)において、メス ESC 株、CBMS1 の 3 複製の平均値から求めた。

4-9. ウエスタンブロッティング

4-8. で記述したように、フィーダー細胞を除去した EpiSC あるいは MEF を、1x プロテアーゼ阻害カクテル (ナカライテスク) を含む RIPA バッファー (25 mM Tris · HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) で懸濁し、氷上に 10 分静置した。15,000 rpm、10 分、4°C で遠心分離した後に上清を回収した。SDS-PAGE と抗体によるバンドの検出は標準的な方法で行った。画像は ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare Life Science) で取得した。各バンドのシグナル強度は Image J の Gels tool を用いて求め、H3K27me3 あるいは H2AK119ub を示す各バンドの数値を各サンプルのヒストン H3 の数値で割って標準化した。

4-10. クロマチン免疫沈降 (Chromatin immunoprecipitation) とアレル特異的 ChIP-seq

ChIP-qPCR のサンプルについては、Nozawa *et al.*, (2013) の報告に基づいて、5% ホルムアルデヒドを含む DMEM で固定した MEF および EpiSC からクロマチンを調製し、抗 H3K27me3 抗体を用いて免疫沈降を行った。ChIP-qPCR に用いたプライマー配列は表 1 に記した。Welch の t 検定は R で行った。

ChIP-seq については、H3K27me3 あるいは H3K9me3 に対する抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行った後、NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit (New England Biolabs) を用いてプロトコルに従いライブラリーを作製した。ライブラリー調製用の精製 DNA については 100~300 bp の断片を、PCR 増幅後ライブラリーについては 200bp 前後の断片を AMPure XP (Beckman Coulter) 磁気ビーズを使用して濃縮した。このようにサイズ分画した断片を LabChip GX (Perkin Elmer) を用いて定量した。

ライブラリーをプールし、Illumina HiSeq 3000 を用いて、100 bp のペアードエンドリードを得た。ペアードエンドのリードはマッピングをする前に、cutadapt(Martin, 2011) と FLASH2 (Magoč & Salzberg, 2011) を用いてアダプター配列を除去するためのトリミングを行い、50 bp 以上のリードをシングルエンドのリードとして以降の解析に使用した。トリミングしたリードは bwa samse (Li & Durbin, 2009) を用いて Sakata et al. (2017) で報告されたように B6-129S1/JF1 系統特異的な二倍体ゲノムにマッピングした。このリファレンスゲノムは JF1 の染色体と 129S1 の X 染色体、B6 mm9 のリファレンスゲノムから構成されている。これには SNP だけでなく INDEL も含まれているので、各リードがマッピングされた位置については、系統の起源を維持したまま mm9 の座標に変換した。二倍体ゲノムは一倍体ゲノムに比べ、最適な場所に準ずる場所にマップされる可能性が 2 倍に高まるのでため(Miura *et al*, 2020)、そのような場所にマップされる一倍体ゲノム当たりのリード数を数えることで、一倍体ゲノムにマップした場合と同等になるよう再計算し、マッピング品質の改善を図った。ゲノム上のユニークな位置にマッピングされたリードのみを高い信頼度で用いるために、マッピング品質が低い (20 以下) リードは破棄した。PCR による重複と考えられるリードについては Samtools (Li *et al*, 2009)を用いて除去した。その結果、全てのリードが mm9 リファレンスもしくは各系統の染色体上の一か所のみマップされた。

なお、本研究で用いた細胞株では、樹立に用いる胚を得るために交配したマウスが B6 の遺伝的背景への戻し交配を長期間行ったものの、変異 *Xist* 遺伝子座の近傍には 129 系統のゲノム配列を保持している点と、胚が F2 世代に由来するため、すべての常染色体領域が B6/JF1 ハイブリッドであるとは限らないという点に注意が必要である (図 5 を参照)。したがって、それぞれの SNP/INDEL がどの系統に由来するものであるかを利用してリードの起源を割り出すには、それぞれの細胞株についてハプロタイプが必要である。X 染色体のハプロタイプは、以前報告したようにして推定した

(Sakata et al, 2017)。常染色体ハプロタイプについては、B6/JF1 ハイブリッドの領域は、インプットサンプルにおいて 500 kb のビンごとに全アレル特異的リード数に対する JF1 アレルの割合からおおまかに決定し、ハイブリッドと非ハイブリッド領域の境界は、インプットと ChIP サンプルにおける JF1 特異的リードの分布を目視で判断することによって推定した。各細胞株のハプロタイプを用い、ChIP サンプルとインプットサンプルで、染色体上の重複しないビンにおける母方特異的リード、父方特異的リード、全マッピングリードを別々に数え、RPKM (reads per kilobase per million mapped reads) として表現した。ChIP サンプルのインプットに対する濃縮の程度を $\log_2[(\text{ChIP RPKM}) / (\text{input RPKM})]$ として計算した。マッピングされたすべてのリードについては $\text{RPKM} < 0.1$ 、親特異的のリードについては $\text{RPKM} < 0.02$ となるビンはマッピング不可能として除外した。細胞株間のヒストン修飾の分布を直接比較しやすくするためには、ChIP による濃縮のプロファイルを、比べる 2 つの細胞の常染色体におけるプロファイル間の差の最頻値が 0 となるように野生型 MEF における濃縮のプロファイルで正規化した。各細胞株の各ヒストン修飾について、常染色体 50 kb ビンのアレルを区別しない濃縮プロファイルを用いて求めた 1 つの正規化係数を、染色体、ビンサイズ、親の由来にかかわらず、あらゆるプロファイルに適用した。最頻値は R パッケージの 'modeest' によって推定した。

UCSC ゲノムブラウザを用い、ゲノム座標上に ChIP による濃縮の程度をトラックごとにスケールとともに、ウィンドウオプション 'mean' を使って可視化した (Kent et al, 2002)。マッピングできないビンを濃縮がないものと解釈しないように、マッピング可能なビンに挟まれたマッピングできない単一のビンの場合については、その領域における ChIP による濃縮の程度を線形補間により推定した。それ以外の、連続するマッピング不可能なビンについては、すべての図でそれらのビンを薄い胚色で塗りつぶした。各 X 連鎖遺伝子の ChIP による濃縮の程度を解析するために、その gene body

をビンとして定義し、長さが 1kb 未満ものについてはリード数が少ないため除外した。H3K9me3 または H3K27me3 に富むドメインは Enriched Domain Detector (EDD) v1.1.19 (Lund et al., 2014) を用いて呼び出した。異なる細胞株間および異なる対立遺伝子間で比較できるよう、入力として正規化 $\log(\text{ChIP/Input})$ プロファイル、固定パラメータ ($\text{bin_size} = 50, \text{gap_penalty} = 30$)、各 H3K9me3 と H3K27me3 で野生型 MEF において $\text{FDR} < 0.05$ と定義したスコア閾値を用いていた。沖積図は、R パッケージ 'ggalluvial' を用いて作成した。

EB における H3K27me3 および H2AK119ub の公開アレル特異的 ChIP-seq データ (GSE135389; Colognori ら、2020) は、Cast および 129S1 SNP/indels を用いて上記のように処理した。EB における Hi-C データの PC1 値 (GSE99991; Wang et al., 2018) は、GEO (Gene Expression Omnibus) からダウンロードした。

表 1 本研究で用いたプライマー配列

Allele	Primer sequence (5'-3')
Genotyping	
<i>Smchd1</i> ⁺	Fwd: tcaataggtccccctcatca Rev: tggacgatcagctttgggtg
<i>Smchd1</i> ^{MD1}	Fwd: tcaataggtccccctcatca Rev: tggacgatcagctttgggta
<i>Xist</i> ⁺	Fwd: cggggcgcttggatggaaat Rev: gcagtcgagggacctaata
<i>Xist</i> ^{ΔA}	Fwd: cggggcgcttggatggaaat Rev: gcacaaccccgaaatgcta
<i>Xist</i> ⁺²	Fwd: gatgccaacgacacgtctga Rev: aaggactccaaagtaacaattca
<i>Xist</i> ^{lox}	Fwd: gatgccaacgacacgtctga Rev: cttagcgcagaagtcagcc
Allele expression	
<i>Rbm3</i>	Fwd: gccttggtgctaattattgcc Rev: caaggacatcgcaatccttta
<i>Pdha1</i>	Fwd: ttcagcgatatgetgacttt Rev: tggcaaggcatgaagtgata
<i>G6pd</i>	Fwd: ttctagttcctgggcttgga Rev: ttaatggcagggttgggata
<i>Hprt</i>	Fwd: tgtggccatctgcctagtaa Rev: cagccaacactgctgaaaca
<i>Rex3</i>	Fwd: tagatgggacctgatgcaga Rev: gaagctggtaacagggagaga
qPCR	
<i>Rnf12</i>	Fwd: tcggagaaccagagcaagag Rev: tcacatggtgccgggttcta
<i>Hprt</i>	Fwd: gcctaagatgagcgcaagttg Rev: tactaggcagatggccacagg

表 2 本研究で用いた抗体の情報

antibody	source	Identifier
Anti-H3K27me3	Wako	MABI0323
Anti-H3K27me3	Cell Signaling	9733T
Anti-H3K9me3	Wako	MABI0308
Anti-H3	Wako	MABI0301
Anti-H2AK119ub	Cell Signaling	8240S
Anti-SmcHD1	Sado-lab	Sakakikbara et al., 2018
Anti-Lrif1	This study	N/A
Anti-beta-tubulin	Merk	05-661
Anti-LaminB1	MBL	PM064

参考文献

- Almeida M, Pintacuda G, Masui O, Koseki Y, Gdula M, Cerase A, Brown D, Mould A, Innocent C, Nakayama M, *et al* (2017) PCGF3/5–PRC1 initiates Polycomb recruitment in X chromosome inactivation. *Science* 356: 1081–1084
- Blewitt ME, Gendrel A-V, Pang Z, Sparrow DB, Whitelaw N, Craig JM, Apedaile A, Hilton DJ, Dunwoodie SL, Brockdorff N, *et al* (2008) SmcHD1, containing a structural-maintenance-of-chromosomes hinge domain, has a critical role in X inactivation. *Nat. Genet.* 40, 663–669.
- Borsani G, Tonlorenzi R, Simmler MC, Dandolo L, Arnaud D, Capra V, Grompe M, Pizzuti A, Muzny D, Lawrence C, *et al* (1991) Characterization of a murine gene expressed from the inactive X chromosome. *Nature* 351: 325–329
- Brideau NJ, Coker H, Gendrel A-VV, Siebert C, Bezstarosti K, Demmers J, Poot RA, Nesterova TB & Brockdorff N (2015) Independent mechanisms target SMCHD1 to trimethylated histone H3 lysine 9-modified chromatin and the inactive X chromosome. *Mol. Cell. Biol.* 35: 4053–68
- Brockdorff N, Ashworth A, Kay GF, Cooper P, Smith S, McCabe VM, Norris DP, Penny GD, Patel D & Rastan S (1991) Conservation of position and exclusive expression of mouse Xist from the inactive X chromosome. *Nature* 351: 329–331
- Brons GI, Smithers LE, Trotter MW, Rugg-Gunn P, Sun B, Lopes SM de, Howlett SK, Clarkson A, Ahrlund-Richter L, Pedersen RA, *et al* (2007) Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 448: 191–195
- Chadwick BP & Willard HF (2004) Multiple spatially distinct types of facultative heterochromatin on the human inactive X chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 17450–17455
- Chaumeil J, Waters PD, Koina E, Gilbert C, Robinson TJ & Graves JAM (2011) Evolution from XIST-independent to XIST-controlled X-chromosome inactivation: Epigenetic Modifications in Distantly Related Mammals. *PLoS ONE* 6: e19040
- Chen G, Schell JP, Benitez JA, Petropoulos S, Yilmaz M, Reinius B, Alekseenko Z, Shi L, Hedlund E, Lanner F, *et al* (2016) Single-cell analyses of X Chromosome inactivation dynamics and pluripotency during differentiation. *Genome Res.* 26: 1342–1354
- Colognori D, Sunwoo H, Wang D, Wang C-Y & Lee JT (2020) Xist repeats A and B account for two distinct phases of X inactivation establishment. *Dev. Cell* 54: 21–32.e5
- Csankovszki G, Nagy A & Jaenisch R (2001) Synergism of Xist RNA, DNA methylation, and histone Hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation. *J. Cell Biology* 153: 773–784
- Erhardt S, Su I, Schneider R, Barton S, Bannister AJ, Perez-Burgos L, Jenuwein T, Kouzarides T, Tarakhovskiy A & Surani MA (2003) Consequences of the depletion of zygotic and embryonic enhancer of zeste 2 during preimplantation mouse development. *Development* 130: 4235–4248

- Fang J, Chen T, Chadwick B, Li E & Zhang Y (2004) Ring1b-mediated H2A ubiquitination associates with inactive X chromosomes and is involved in initiation of X inactivation. *J. Biol. Chem.* 279: 52812–52815
- Gdula MR, Nesterova TB, Pintacuda G, Godwin J, Zhan Y, Ozadam H, McClellan M, Moralli D, Krueger F, Green CM, *et al* (2019) The non-canonical SMC protein SmcHD1 antagonises TAD formation and compartmentalisation on the inactive X chromosome. *Nat. Commun.* 10: 30
- Gendrel A-VV, Apedaile A, Coker H, Termanis A, Zvetkova I, Godwin J, Tang YA, Huntley D, Montana G, Taylor S, *et al* (2012) Smchd1-dependent and -independent pathways determine developmental dynamics of CpG island methylation on the inactive X chromosome. *Dev. cell* 23: 265–79
- Hoki Y, Kimura N, Kanbayashi M, Amakawa Y, Ohhata T, Sasaki H & Sado T (2009) A proximal conserved repeat in the Xist gene is essential as a genomic element for X-inactivation in mouse. *Development* 136: 139–146
- Jansz N, Keniry A, Trussart M, Bildsoe H, Beck T, Tonks ID, Mould AW, Hickey P, Breslin K, Iminoff M, *et al* (2018a) Smchd1 regulates long-range chromatin interactions on the inactive X chromosome and at Hox clusters. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 25: 766–777
- Jansz N, Nesterova T, Keniry A, Iminoff M, Hickey PF, Pintacuda G, Masui O, Kobelke S, Geoghegan N, Breslin KA, *et al* (2018b) Smchd1 targeting to the inactive X is dependent on the Xist-HnrnpK-PRC1 pathway. *Cell Rep.* 25: 1912-1923.e9
- Kalantry S & Magnuson T (2006) The polycomb group protein EED is dispensable for the initiation of random X-chromosome inactivation. *PLoS Genet.* 2: e66
- Kalantry S, Mills KC, Yee D, Otte AP, Panning B & Magnuson T (2006) The Polycomb group protein Eed protects the inactive X-chromosome from differentiation-induced reactivation. *Nat. Cell Biol.* 8: 195–202
- Kato M, Takemoto K & Shinkai Y (2018) A somatic role for the histone methyltransferase Setdb1 in endogenous retrovirus silencing. *Nat. Commun.* 9: 1683
- Keniry A, Gearing LJ, Jansz N, Liu J, Holik AZ, Hickey PF, Kinkel SA, Moore DL, Breslin K, Chen K, *et al* (2016) Setdb1-mediated H3K9 methylation is enriched on the inactive X and plays a role in its epigenetic silencing. *Epigenet. Chromatin.* 9: 16
- Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM & Haussler and D (2002) The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res.* 12: 996–1006
- Kohlmaier A, Savarese F, Lachner M, Martens J, Jenuwein T & Wutz A (2004) A chromosomal memory triggered by Xist regulates histone methylation in X inactivation. *PLoS Biol.* 2: e171
- Kojima Y, Kaufman-Francis K, Studdert JB, Steiner KA, Power MD, Loebel DAF, Jones V, Hor A, de Alencastro G, Logan GJ, *et al* (2014) The transcriptional and functional properties of mouse epiblast stem cells resemble the anterior primitive streak. *Cell Stem Cell* 14: 107–120
- Lachner M, O’Carroll D, Rea S, Mechtler K & Jenuwein T (2001) Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 410: 116–120

- Leong HS, Chen K, Hu Y, Lee S, Corbin J, Pakusch M, Murphy JM, Majewski IJ, Smyth GK, Alexander WS, *et al* (2013) Epigenetic regulator Smc4 functions as a tumor suppressor. *Cancer Res.* 73: 1591–1599
- Li H & Durbin R (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* 25: 1754–1760
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R & Subgroup 1000 Genome Project Data Processing (2009) The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25: 2078–2079
- Lyon MF (1961) Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 190: 372–373
- Magoč T & Salzberg SL (2011) FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* 27: 2957–2963
- Mak W, Nesterova TB, Napoles M de, Appanah R, Yamanaka S, Otte AP & Brockdorff N (2004) Reactivation of the paternal X chromosome in early mouse embryos. *Science* 303: 666–669
- Marahrens Y, Panning B, Dausman J, Strauss W & Jaenisch R (1997) Xist-deficient mice are defective in dosage compensation but not spermatogenesis. *Genes Dev.* 11: 156–166
- Martin M (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *Embnet J.* 10–12
- Matsui T, Leung D, Miyashita H, Maksakova IA, Miyachi H, Kimura H, Tachibana M, Lorincz MC & Shinkai Y (2010) Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET. *Nature* 464: 927–931
- Miura H, Takahashi S, Shibata T, Nagao K, Obuse C, Okumura K, Ogata M, Hiratani I & Takebayashi S (2020) Mapping replication timing domains genome wide in single mammalian cells with single-cell DNA replication sequencing. *Nat. Protoc.* 15: 4058–4100
- Mohandas T, Sparkes RS & Shapiro LJ (1981) Reactivation of an inactive human X chromosome: Evidence for X inactivation by DNA methylation. *Science* 211: 393–396
- Montgomery ND, Yee D, Chen A, Kalantry S, Chamberlain SJ, Otte AP & Magnuson T (2005) The murine Polycomb group protein Eed is required for global histone H3 lysine-27 methylation. *Curr. Biol.* 15: 942–7
- Mukherjee AS & Beermann W (1965) Synthesis of ribonucleic acid by the X-chromosomes of *Drosophila melanogaster* and the problem of dosage compensation. *Nature* 207: 785–786
- Napoles M de, Mermoud JE, Wakao R, Tang YA, Endoh M, Appanah R, Nesterova TB, Silva J, Otte AP, Vidal M, *et al* (2004) Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. *Dev. Cell* 7: 663–676
- Nesterova TB, Wei G, Coker H, Pintacuda G, Bowness JS, Zhang T, Almeida M, Bloechl B, Moindrot B, Carter EJ, *et al* (2019) Systematic allelic analysis defines the interplay of key pathways in X chromosome inactivation. *Nat. Commun.* 10: 3129

- Nozawa R-S, Nagao K, Igami K-T, Shibata S, Shirai N, Nozaki N, Sado T, Kimura H & Obuse C (2013) Human inactive X chromosome is compacted through a PRC2-independent SMCHD1-HBiX1 pathway. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 566-573
- Okamoto I, Otte AP, Allis CD, Reinberg D & Heard E (2004) Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science* 303: 644–649
- Peeters SB, Cotton AM & Brown CJ (2014) Variable escape from X-chromosome inactivation: Identifying factors that tip the scales towards expression. *Bioessays* 36: 746–756
- Penny GD, Kay GF, Sheardown SA, Rastan S & Brockdorff N (1996) Requirement for Xist in X chromosome inactivation. *Nature* 379: 131–137
- Peters AHFM, O’Carroll D, Scherthan H, Mechtler K, Sauer S, Schöfer C, Weipoltshammer K, Pagani M, Lachner M, Kohlmaier A, *et al* (2001) Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* 107: 323–337
- Plath K, Fang J, Mlynarczyk-Evans SK, Cao R, Worringer KA, Wang H, Cruz CC de la, Otte AP, Panning B & Zhang Y (2003) Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science* 300: 131–135
- Plenefisch JD, DeLong L & Meyer BJ (1989) Genes that implement the hermaphrodite mode of dosage compensation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 121: 57–76
- Rens W, Wallduck MS, Lovell FL, Ferguson-Smith MA & Ferguson-Smith AC (2010) Epigenetic modifications on X chromosomes in marsupial and monotreme mammals and implications for evolution of dosage compensation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107: 17657–17662
- Sado T, Hoki Y & Sasaki H (2005) Tsix silences Xist through modification of chromatin structure. *Dev. Cell* 9: 159–165
- Sado T, Okano M, Li E & Sasaki H (2004) De novo DNA methylation is dispensable for the initiation and propagation of X chromosome inactivation. *Development* 131: 975–982
- Sado T & Sakaguchi T (2013) Species-specific differences in X chromosome inactivation in mammals. *Reproduction* 146: R131–R139
- Sakakibara Y, Nagao K, Blewitt M, Sasaki H, Obuse C & Sado T (2018) Role of SmcHD1 in establishment of epigenetic states required for the maintenance of the X-inactivated state in mice. *Development* 145, dev166462
- Sakata Y, Nagao K, Hoki Y, Sasaki H, Obuse C & Sado T (2017) Defects in dosage compensation impact global gene regulation in the mouse trophoblast. *Development* 144: dev.149138
- Schotta G, Lachner M, Sarma K, Ebert A, Sengupta R, Reuter G, Reinberg D & Jenuwein T (2004) A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Gene Dev.* 18: 1251–1262
- Silva J, Mak W, Zvetkova I, Appanah R, Nesterova TB, Webster Z, Peters AHFM, Jenuwein T, Otte AP & Brockdorff N (2003) Establishment of histone H3 methylation on the inactive X chromosome requires transient recruitment of Eed-Enx1 Polycomb group complexes. *Dev. Cell* 4: 481–495

- Sugimoto M, Kondo M, Koga Y, Shiura H, Ikeda R, Hirose M, Ogura A, Murakami A, Yoshiki A, Chuva de Sousa Lopes SM, *et al* (2015) A simple and robust method for establishing homogeneous mouse epiblast stem cell lines by Wnt inhibition. *Stem Cell Rep.* 4: 744–757
- Takahashi S, Miura H, Shibata T, Nagao K, Okumura K, Ogata M, Obuse C, Takebayashi S-II & Hiratani I (2019) Genome-wide stability of the DNA replication program in single mammalian cells. *Nat. Genet.* 51: 529–540
- Tesar PJ, Chenoweth JG, Brook FA, Davies TJ, Evans EP, Mack DL, Gardner RL & McKay RD (2007) New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 448: 196–9
- Wang C-Y, Colognori D, Sunwoo H, Wang D & Lee JT (2019) PRC1 collaborates with SMCHD1 to fold the X-chromosome and spread Xist RNA between chromosome compartments. *Nat. Commun.* 10: 2950
- Wang C-YY, Jégu T, Chu H-PP, Oh HJ & Lee JT (2018) SMCHD1 merges chromosome compartments and assists formation of super-structures on the inactive X. *Cell* 174: 406-421.e25
- Wang J, Mager J, Chen Y, Schneider E, Cross JC, Nagy A & Magnuson T (2001) Imprinted X inactivation maintained by a mouse Polycomb group gene. *Nat. Genet.* 28: ng574
- Wutz A & Jaenisch R (2000) A shift from reversible to irreversible X inactivation is triggered during ES cell differentiation. *Molecular Cell* 5: 695–705
- Zakharova IS, Shevchenko AI, Shilov AG, Nesterova TB, VandeBerg JL & Zakian SM (2011) Histone H3 trimethylation at lysine 9 marks the inactive metaphase X chromosome in the marsupial *Monodelphis domestica*. *Chromosoma* 120: 177–183
- Żylicz J, Bousard A, Žumer K, Dossin F, Mohammad E, Rocha S da, Schwalb B, Syx L, Dingli F, Loew D, *et al* (2018) The implication of early chromatin changes in X chromosome inactivation. *Cell* 176, 182-197.e23.

謝辞

本研究の遂行および本論文の執筆にあたり、多大なる御指導ならびに御助言を賜り、さらに本論文の御校閲の労を賜りました、近畿大学大学院農学研究科・バイオサイエンス専攻・動物分子遺伝学研究室教授、佐渡 敬 博士に深甚なる謝意を表します。

また、本論文を審査していただきました近畿大学大学院農学研究科・バイオサイエンス専攻・分子生物学研究室教授、篠原 美紀 博士、ならびに近畿大学大学院農学研究科・バイオサイエンス専攻・植物分子遺伝学研究室教授、川崎 努 博士に厚く御礼申し上げます。

さらに、バイオインフォマティクス解析や本研究を行う上で多くの助言や議論をして頂きました、大阪大学大学院理学研究科・生物科学専攻・染色体構造機能学研究室教授、小布施 力史 博士、ならびに同研究室准教授、長尾 恒治 博士に心から感謝申し上げます。また、

画像解析について何度も相談に乗ってくださり、多くの助言を頂きました、Rawin Poonperm 博士に心より御礼申し上げます。また、ChIP-seq のライブラリー作成について、その実験系の立ち上げにご尽力頂きました、堀 哲也 博士、小川 志帆 博士に深く感謝致します。

最後に、長年にわたり私の学生生活を支えてくださった両親と友人には、深く感謝の意と敬意を表します。

市原 沙也