

筑波大学

博士（医学）学位論文

iPS 細胞誘導における  
X 染色体再活性化機構の解明

2 0 2 1

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

相澤 志穂

## 要約

### [目的]

クロマチン構造の形成や構造変換により遺伝子発現が適切に制御され、正常な発生や生命活動が行われる。これらの機構における異常は重大な疾患につながる事が報告されている。代表的なクロマチン構造であるユークロマチンからヘテロクロマチンへの構造変換に関しては、X染色体の不活性化をモデルに多くの知見が蓄積している一方、ヘテロクロマチンからユークロマチンへの変換は、未だ多くが不明なままである。本研究では、iPS細胞誘導の過程で起きるX染色体の再活性化 (X chromosome reactivation, XCR)をモデルに、ヘテロクロマチンからユークロマチンへの変換機構を解明することを目的とする。

これまでXCRの検出は、主にRNA FISHや免疫染色により行われてきたが、これらの感度は低く、XCRにおける転写の再開を正しく検出できていないと考えられる。これに対して私は既に、2本のX染色体に存在するSNPを利用し、不活性化X染色体 (Xi) からの転写を感度良く定量するSNP cDNA typingを確立している。また本研究室では、多能性の程度を制御しながらリプログラミングを誘導できる3S reprogramming systemを有している。よって、3S reprogramming systemを用いてリプログラミングのスピードを緩め、SNP cDNA typingを用いてXCRの開始を感度良く捉えることで、XCRの過程をより詳細に解析できると考えた。そこで私は、XCRの過程にある細胞を段階的に回収、比較し、転写再開が起きる領域を同定後、その領域に結合する分子を同定し、その分子の機能解析を元に、XCRにおける転写再開の分子機構を明らかにすることを試みた。

### [方法]

まず、3S reprogramming systemを用いて、リプログラミング進行度の異なる細胞を誘導した。SNP cDNA typing を用いてXiからの転写を確認し、転写再開の過程にあると考えられる細胞群を得た。そして、これらの細胞群に対してアレルを読み分けながらRNA-seqを行い、Xiの各領域からの詳細な転写プロファイルを取得し、その結果より転写が再開する領域を特定した。

さらに、XCRが開始する領域では、転写再開に関わる因子が結合していると考えられるため、ChIP-seqのデータベースを用いて、それらの領域に結合する因子を転写再開関連候補因子として絞り込んだ。これら候補因子の実際のXCRへの関与を確認するために、候補因子を発現制御しながらリプログラミングによるXCRの誘導を行なった。そして、XCRへの関与が確認された分子が、転写再開を引き起こす機構を解析した。

## [結果]

RNA-seqで得られた結果より，Xi上の各遺伝子からの経時的な転写量の変化を求めた．そして全遺伝子の発現変化を元に，転写の再開が早い遺伝子を絞り込んだところ，すべての遺伝子が，X染色体170 Mb中の0.5 Mbの領域に集中していた．そこで，この領域を転写の再開が起きる領域と結論し，Xtreme (X-transcriptional reactivation manifesting element) と名付けた．次に，Xtremeに結合するタンパク質を，データベースを用いて確認したところ，KDM1A，KDM4C，NELFA，OTX2，TCF12の5つの候補因子が得られた．これら5つの候補因子を，shRNAにて発現抑制しながらXCR誘導を行ったところ，*Kdm1a*，*Nelfa*，*Otx2*の発現抑制が，有意に転写の再開を促進することが明らかとなった．その中のKDM1Aに着目し，ChIP-seqによりKDM1AのXtremeへの結合を確認したところ，Xtremeの中でも特に転写再開の早い遺伝子のプロモーター，エンハンサー領域において，転写再開に伴うようにKDM1Aの結合がなくなることがわかった．KDM1AはヒストンH3のリジン脱メチル化酵素としての機能を持つため，酵素活性中心に結合するKDM1A阻害剤による転写再開への影響を確認したところ，酵素活性を失う事によりXCRにおける転写の再開が促進されることが明らかとなった．

## [考察]

XCRにおけるKDM1Aの結合変化と，酵素活性の阻害によるXCR促進から，XCR開始には，KDM1Aが転写開始領域から離れ，その酵素活性を失うことが重要であると考えられる．また，XtremeはX染色体全域と比較して，オープンな構造を取っており，さらに同様の遺伝子制御を受けると考えられている，単一のTAD (Topologically associating domain) に含まれていることが，この領域に含まれる複数の遺伝子の転写再開が起きやすい理由となっている可能性がある．

## [結論]

本研究では，定量的なXCR検出系を用いて，XCR進行度の異なる細胞を回収したことにより，リプログラミングにおいてXCRが開始するXtreme領域を明らかにした．Xtremeはオープンな構造を持つため，様々な分子の結合が容易であると考えられる．中でも転写再開に関わる因子がXtremeに結合し，KDM1Aの結合が外れることで，ヒストンメチル化が増加し，転写が再開すると考えられる．

## 略語

129	<i>Mus musculus</i> 129S1/Sv1mJ
6-TG	6-thioguanine
AP	Alkaline Phosphatase
B6	<i>Mus musculus</i> C57BL/6J
<i>Cast</i>	<i>Mus musculus</i> CAST/EiJ
cDNA	complementary DNA
cHC	constitutive heterochromatin
ChIP	Chromatin immunoprecipitation
DD	destabilizing domain
DDW	double distilled water
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	deoxy ribonucleic acid
dNTP	deoxynucleotide triphosphate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ESC	Embryonic stem cell
fHC	facultative heterochromatin
FBS	Fetal Bovine Serum
FISH	Fluorescence in situ hybridization
GTP	Guanosine triphosphate
H3K27me3	H3K27 trimethylation
HAT	Hypoxanthine, Aminopterin and Thymidine
IMP	Inosine monophosphate
iPS 細胞	induced pluripotent stem cell, 人工多能性幹細胞
KD	Knock Down
LA	Lysogeny Agar
LIF	Leukemia inhibitory factor
LB	Lysogeny Broth
MEF	mouse embryo fibroblast
MET	mesenchymal epithelial transition
mESC	mouse embryo stem cell
MNP	Multi-Nucleotide Polymorphisms
ncRNA	non-coding ribonucleic acid
NPC	Neural progenitor cell
PBS	Phosphate buffered saline

PCR	polymerase chain reaction
PHC	pericentromic heterochromatin
PRPP	5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphate
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
Rac1	RAS-related C3 botulinus toxin substrate 1
Rho	rhodopsin
RNA	ribonucleic acid
RPKM	Reads Per Kilobase per Million mapped reads
RT-qPCR	Reverse transcription quantitative Polymerase Chain Reaction
SeVdp	Sendai virus defective and persistent
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
Sp	<i>Mus spretus</i>
TAD	Topologically Associating Domain
TBP	TATA binding protein
TCP	Tranylcypromine
TF	Transcription factor
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane
TSS	Transcription start site
Xa	activated X chromosome
Xi	inactivated X chromosome
XCI	X chromosome inactivation
XCR	X chromosome reactivation
XES	<i>Xist</i> entry site
Xic	X-inactivation center
<i>Xist</i>	inactive X specific transcripts
Xtreme	X-transcriptional reactivation manifesting element

## 本論文で登場する主な遺伝子

<i>Bgn</i>	Biglycan
<i>Car5b</i>	Carbonic anhydrase 5b, mitochondrial
<i>Cdh1</i>	Cadherin-1
<i>Cdh2</i>	Cdh2
<i>c-Myc</i>	Cellular myelocytomatosis oncogene
<i>Ddx3x</i>	DEAD box helicase 3, X-linked
<i>Dppa4</i>	Developmental pluripotency associated 4
<i>Eif2s3x</i>	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3, structural gene X-linked
<i>Epcam</i>	Epithelial cell adhesion molecule
<i>Esrrb</i>	Estrogen related receptor beta
<i>Firre</i>	Functional intergenic repeating RNA element
<i>Ftsj1</i>	FtsJ RNA methyltransferase homolog 1
<i>Fut4</i>	Fucosyltransferase 4
<i>Gpkow</i>	G-patch domain and KOW motifs
<i>Hdac</i>	Histone deacetylase
<i>Hprt</i>	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase
<i>Kdm1a</i>	Lysine demethylase 1a
<i>Kdm4c</i>	Lysine demethylase 4c
<i>Kdm5c</i>	Lysine demethylase 5c
<i>Klf4</i>	Kruppel like factor 4
<i>Lamp2</i>	Lysosomal associated membrane protein 2
<i>Mecp2</i>	Methyl-CpG binding protein 2
<i>Mid1</i>	Midline 1
<i>Msn</i>	Moesin
<i>Nanog</i>	Nanog homeobox
<i>Nelfa</i>	Negative elongation factor complex member A
<i>Ocln</i>	Occludin
<i>Oct4</i>	Octamer-binding transcription factor 4
<i>Otx2</i>	Orthodenticle homeobox 2
<i>Pbdc1</i>	polysaccharide biosynthesis domain containing 1
<i>Pecam1</i>	platelet/endothelial cell adhesion molecule 1
<i>Prdm14</i>	PR domain containing 14
<i>Rex1</i>	RNA exonuclease 1

<i>Rlim</i>	Ring finger protein, LIM domain interacting
<i>Rsx</i>	RNA-on-the-silent X
<i>Shroom4</i>	Shroom family member 4
<i>Snail</i>	Snail family transcriptional repressor 1
<i>Syn1</i>	Synapsin I
<i>Sox2</i>	SRY (sex determining region Y)-box 2
<i>Tcf12</i>	Transcription factor 12
<i>Tfe3</i>	Transcription factor E3
<i>Timpl</i>	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1
<i>Twist1</i>	Twist basic helix-loop-helix transcription factor 1
<i>Wdr13</i>	WD repeat domain 13
<i>Wdr45</i>	WD repeat domain 45
<i>Zeb2</i>	Zinc finger E-box binding homeobox 2
<i>Zfy1</i>	Zinc finger protein 1, Y-linked



## 目次

1. 序章 .....	12
1.1. 遺伝子制御のためのクロマチン構造 .....	12
1.2. fHC 形成モデルとしての X 染色体の不活性化 .....	12
1.3. 発生における X 染色の再活性化 (XCR) .....	13
1.4. リプログラミングにおける XCR .....	14
1.5. 本研究の目的と戦略 .....	15
1.6. XCR の定量法 .....	15
1.7. XCR 状態の異なる細胞の誘導 .....	16
1.8. 本研究の目的と計画 .....	16
2. 実験方法および実験材料 .....	18
2.1. MEF 細胞の単離 .....	18
2.2. 細胞の準備 .....	19
2.2.1. DNA 抽出 .....	19
2.2.2. ジェノタイピング .....	19
2.3. 細胞培養 .....	19
2.3.1. MEF 細胞の培養 .....	19
2.3.2. 薬剤選択 .....	20
2.3.3. iPS 細胞誘導 .....	20
2.3.4. iPS 細胞の培養・細胞回収 .....	21
2.4. 遺伝子発現解析 .....	21
2.4.1. RNA 抽出 .....	21
2.4.2. cDNA 合成 .....	21
2.4.3. 定量 PCR .....	21
2.5. SNP cDNA typing .....	22
2.5.1. プライマー・プローブの設計 .....	22
2.5.2. 遺伝子コピー数の定量 .....	22
2.5.3. SNP cDNA typing .....	23
2.6. Allele-specific RNA-seq .....	24

2.6.1. RNA サンプル回収 .....	24
2.6.2. クオリティチェック .....	24
2.6.3. ライブラリ DNA の作成, DNA シーケンシング, およびデータ処理.....	24
2.6.4. 結果解析.....	25
2.7. 既報公開データを用いた Xtreme 部位の解析 .....	25
2.7.1. Allele-specific Hi-C (GSE72697) .....	25
2.7.2. Allele-specific ATAC-seq (GSE71156).....	25
2.8. Xtreme 部位に結合する転写再開関連候補因子の絞り込み.....	26
2.9. Knock down 実験 .....	26
2.9.1. shRNA のデザイン .....	26
2.9.2. shRNA 産生レトロウイルスベクターの作成.....	26
2.9.3. レトロウイルス感染 .....	26
2.10. Allele-specific ChIP-seq .....	27
2.10.1. クロマチン回収.....	27
2.10.2. クロマチン免疫沈降 .....	27
2.10.3. ライブラリ DNA の作成, DNA シーケンシング, およびデータ処理.....	27
2.11. 統計処理.....	28
3. 結果 .....	29
3.1. これまでの研究.....	29
3.2. XCR に対する山中四因子の影響の確認.....	30
3.3. High-K 条件を用いたリプログラミング .....	31
3.4. リプログラミングが遅延した細胞の誘導 .....	32
3.5. Allele-specific RNA-seq による転写再開領域の同定 .....	33
3.6. Xtreme における転写再開の確認 .....	35
3.7. XCR 評価のための新たな probe の作成.....	35
3.8. Xtreme 領域の特異性.....	36
3.9. 領域から因子へ, 転写再開に関連する因子の同定.....	37
3.10. KDM1A による転写再開の阻害 .....	39
3.11. KDM1A 関連複合タンパク質の阻害による転写再開への影響 .....	39
3.12. KDM1A 酵素活性阻害による転写再開の促進.....	40

4. 考察 .....	42
4.1. 本研究の独自性.....	42
4.2. XCR と多能性の関連 .....	43
4.3. Xtreme の位置の必要性.....	44
4.4. ヒトにおける Xtreme.....	47
4.5. 転写再開を引き起こす機構 .....	48
5. 図.....	51
6. 結論 .....	77
7. 表.....	78
8. 参考文献.....	81
9. 謝辞 .....	87
10. 出典 .....	89

## 1. 序章

### 1.1. 遺伝子制御のためのクロマチン構造

生物の発生や生命活動に、適切な遺伝子発現の制御は不可欠である。ゲノム DNA はその領域に応じて独特のクロマチン構造を作り、必要なエピジェネティック修飾の付加を受けることによって、遺伝子発現を効率よく制御する (Barrero et al., 2010)<sup>1</sup> (Fig. 1a)。最も代表的なクロマチン構造が、転写の活性化に関わるユークロマチンや、転写の不活性化に関わるヘテロクロマチンである。なかでもヘテロクロマチンは構造ヘテロクロマチン (constitutive heterochromatin, cHC) と条件的ヘテロクロマチン (facultative heterochromatin, fHC) に大別される。cHC は、テロメアやセントロメアなどに多くみられ、不活性化状態を維持しながら DNA 構造の安定化に寄与する一方、fHC は、場合に応じてユークロマチンに変化し、転写が起きることが分かっている (Trojer and Reinberg, 2007)<sup>2</sup>。このような fHC の変換は、発生や生命活動に重要であり、その破綻は、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー等の疾患につながる (Hahn et al., 2010)<sup>3</sup>。しかし、fHC 変換の機構、特に fHC からユークロマチンへ変換するメカニズムは不明である。

### 1.2. fHC 形成モデルとしての X 染色体の不活性化

ユークロマチンから fHC を形成する過程は、哺乳類の雌の発生の過程で起きる、X 染色体の不活性化 (XCI) をモデルとして考えることができる (Wutz, 2011)<sup>4</sup>。哺乳類の雌の体細胞では、X 染色体を一本しか持たない雄との遺伝子量補償のため、2本のうち1本の X 染色体がヘテロクロマチン化し、その転写が抑制される (Lyon, 1961)<sup>5</sup>。この際、X 染色体上の *Xist* というノンコーディング RNA (ncRNA) が、将来 Xi となる X 染色体から発現し、その染色体全体を覆いながら様々なタンパク質をリクルートし、DNA メチル化やヒストン修飾を促進し、転写抑制状態を完成させる (Simon et al., 2013; Clemson et al., 1996; Williams et al., 2011; Csancovszki et al., 2001; McHugh et al., 2015)<sup>6,7,8,9,10</sup>。 *Xist* の導入により自由に転写の不活性化を誘導できる。例えば、哺乳類の雄細胞に存在するただ一本の X 染色体や、任意の常染色体も、 *Xist RNA* の導入により不活性化されることが報告されている。したがって *Xist* は、XCI に関して非常に大事な役割を果たすと考えられている (Lee et al., 1999)<sup>11</sup>。

XCI は発生の過程において 2 回起きることが報告されている。一回目は 4 細胞期において父親由来の X 染色体を不活性化するインプリント型 XCI、2 回目

はその後両方の X 染色体が共に活性化している状態からランダムに起きるランダム型 XCI である (Sado et al., 2001)<sup>12</sup>. *Xist* RNA は両方の XCI に関与しているが、その機能が保存されているのは真獣類以上の哺乳類である (Sado et al., 2013)<sup>13</sup>. ランダム型 XCI を獲得するまでは、常に父親由来の X 染色体が不活性化を受けるため、母親由来の X 染色体に大きな変異がないことが重要であった (Chaumeil et al, 2011)<sup>14</sup>. しかし、ランダム型 XCI では父親由来の X 染色体が活性化している細胞と母親由来の X 染色体が活性化している細胞がランダムに存在するため、どちらかの X 染色体上に生存に不利な大きな変異があっても、もう一方が正常であれば、それを補填することが可能になっている. なお、*Xist* 獲得前の真獣類以前で父親由来の X 染色体の不活性化に関わる因子として *Rsx* という ncRNA が報告されており、*Rsx* による XCI と *Xist* による XCI では、使用されるヒストン修飾が異なることより (Rens et al., 2010; Chaumeil et al, 2011)<sup>15,14</sup>, XCI を引き起こす機構が異なることが予測される. *Xist* RNA 獲得後は、X 染色体の保存度が高いことから、ランダムな XCI が生命維持に正の役割を果たしたと考えられている.

両方の XCI とともに胎児発生の初期に起きる現象であり細胞数が少ないため、*vivo* における解析を行なうのは困難であった. しかし特にランダム型 XCI はエピブラストが多能性を失う過程で起きるため、分化と共役する現象であると考えられてきた. そこで *in vitro* では多能性細胞の分化により XCI を誘導し解析を行なうことが試みられてきたが、分化を均一に誘導することは困難であった. しかしここで、*Xist* RNA の主な機能が明らかになり、*Xist* RNA 導入により XCI が誘導できる事が報告されたことで *in vitro* において容易に XCI を研究できるようになった (Wutz and Jaenisch, 2000)<sup>16</sup>. 現在は活性化状態を維持している雌 ES 細胞の一方の X 染色体に対して *Xist* RNA を導入することで引き起こされる XCI を研究対象とすることが主流となっている. なお、ES 細胞に対して *Xist* RNA を導入して XCI を誘導した場合でも多能性を維持することより、分化と XCI は独立であることが明らかとなっている. このように、XCI ではすでに優れた誘導系が確立されており、これまでに多数の知見が報告されている.

### 1.3. 発生における X 染色の再活性化 (XCR)

X 染色体における転写制御は非常にダイナミックな現象である. 先述したように発生の過程で合計 2 回の XCI が起きる一方、XCR は 3 回起きる (Ohhata and Wutz, 2013)<sup>17</sup>. 1 回目は 2 細胞期で減数分裂により不活性化された X 染色体が再活性化される (Huynh and Lee, 2003)<sup>18</sup>. 2 回目はエピブラストにおけるインプリント型 XCI からの再活性化 (Patrat et al, 2009)<sup>19</sup> であり、そして 3 度目は卵

形成前の始原生殖細胞における再活性化である (Sugimoto and Abe, 2007)<sup>20</sup>. 特に2回目のXCRが起きる時期の同定は、遅れているように思えるが、これはXCRが胎児発生の初期に起きるため細胞数が少なく、高度な技術がなければ解析が不可能であったからである. XCRをモデルとして、fHCからユークロマチンへの変換機構を解析することが期待される一方、その解析の難しさゆえ機構の解明は進んでいない. ところが近年、高い分化能と自己増殖能を持つ人工多能性幹細胞 (iPS細胞) (Takahashi et al., 2006)<sup>21</sup> を体細胞から誘導するリプログラミングの過程でXCRが起きることが報告され (Maherali et al., 2007; Kobayashi et al., 2016; Tran et al., 2018)<sup>22,23,24</sup>, iPS細胞を用いたXCRの機構の解明が試みられるようになった (Pasque et al., 2014)<sup>25</sup>.

#### 1.4. リプログラミングにおけるXCR

以降、本論文では、iPS細胞誘導過程をリプログラミングと呼ぶことにする. 発生過程のXCRと比べて、リプログラミングにおけるXCRでは細胞数が多く確保できるなど、解析しやすい系であると考えられたが、誘導された細胞の不均一性と2本のX染色体の区別の困難さゆえ、リプログラミングにおけるXCRに関しても、詳細な機構は明らかになっていない. 近年、報告されている複数の研究結果より、XCRはXCI同様段階的な順序を踏むプロセスであり、転写の再開は特定の領域で開始し、そのX染色体全体に広がっていくと考えられている (Talon et al., 2019)<sup>26</sup>. 一方、発生過程におけるインプリント型XCIからの活性化と、リプログラミングにおけるXCIからの活性化の両方において、*Xist* RNAが不活性化X染色体 (Xi) を覆っている状態で複数の遺伝子の転写が再開することが示された (Borensztein et al., 2017; Janiszewski et al., 2019)<sup>27,28</sup>. このように*Xist* RNAとXCRとの関連には未だ不明な点が多い. これまでの知見から、XCRはリプログラミング後期に起きると考えられており (Pasque et al., 2014)<sup>25</sup>, PRDM14やNANOG, DPPA4等の多能性関連転写因子がXCRに関わることが報告されている (Navarro et al., 2010; Payer et al., 2013; Pasque et al., 2014)<sup>29,30,25</sup>. ところが私はこれまでの研究において、以上のタンパク質がまだ存在しない、リプログラミングの初期から中期にXCRが開始することを明らかにした. なお、これはその後2019年にJaniszewskiらも報告している現象である<sup>28</sup>. 以上より、上述した多能性関連転写因子以外にもXCRを制御する因子が存在することが示唆される.

## 1.5. 本研究の目的と戦略

本研究は、リプログラミングにおける XCR の機構を明らかにすることを目的とする。上述のように、XCR は XCI 同様、転写は特定の領域から再開し、その染色体全体に広がっていくという共通の過程を辿ると考えられている (Fig. 1b)。このことから XCR の開始では、転写が再開している遺伝子と転写が起きていない遺伝子が混在していると考えられる。私は、XCR の機構を明らかにするに当たり、XCR の開始に着目して以下のような戦略を考えた。XCR の開始にある細胞を回収し転写の再活性化が開始する領域を同定後、その領域に結合する分子に着目し、XCR 誘導に関与する分子を決定する。そして、その分子の機能解析を元に、XCR 開始の分子機構を明らかにすることを試みた。以上の戦略の中で最も難しいと考えられるのは、XCR の開始を捉えることであった。これには、XCR の検出方法に関する問題と、Xi より転写が開始してから、転写産物が増えるまでの過程が短すぎることの両方の問題が存在する。

## 1.6. XCR の定量法

XCR の検出方法に関して、これまで X 染色体の活性化状態を解析するためには Fig. 1c に示すような、免疫染色による H3K27me3 等の転写抑制修飾の消失の確認、または RNA FISH による *Xist* RNA cloud の検出や、X 染色体上遺伝子の転写の確認が行われてきた (Chaumeil et al., 2003, Chadwick et al., 2003, Okamoto et al., 2004)<sup>31,32,33</sup>。しかし、*Xist* RNA に対する FISH や転写抑制修飾に対する免疫染色は、X 染色体が不活性化状態であることの証明であるため、これら修飾と実際の再活性化の明確な順番や関連性を明らかにするのは困難である。さらに、転写再開直後の Xi からの転写産物は極微量であると考えられるため、RNA FISH による X 染色体関連遺伝子の転写確認により、XCR 開始を捉えることも現実的ではない。そこで私は、これまでの研究で確立した SNP cDNA typing を用いて XCR の検出を行なうことにした。この方法は、両アレルからの転写産物を蛍光付きプローブで区別し qPCR にて検出するため、微量の転写産物を、アレルを区別しながら定量することが可能である (Fig. 1d; 3.1. 結果で詳述)。

## 1.7. XCR 状態の異なる細胞の誘導

XCR 開始の過程を引き伸ばして、XCR の開始を捉えることができるようにするためには、当研究室独自の 3S reprogramming system を用いることにした。3S reprogramming system では、SeVdp (Sendai virus defective and persistent) ベクターと低分子化合物 Shield1 を用いて、KLF4 タンパク質の存在量を調整しながら iPS 細胞誘導を行うことができる (Nishimura et al., 2014)<sup>34</sup>。この時使われる SeVdp (fKOSM) は Fig. 1e に示すような構造で、KLF4 タンパク質の N 末端側に、発現量調整を行うための Destabilizing Domain (DD) をコードする配列を融合させている。このドメインを持つ融合タンパク質は通常、ユビキチン・プロテアソームによる分解の対象となるが、培地中に低分子化合物 Shield1 を添加することで融合タンパク質の分解が妨げられる (Banaszynski, 2006)<sup>35</sup>。融合タンパク質の存在量は Shield1 濃度に依存的であるため、この濃度を様々に変化させることにより KLF4 タンパク質の存在量を制御してリプログラミングを行うことができる。このような系を用いて KLF4 の発現制御を行ないながら iPS 細胞を誘導した結果、KLF4 存在量に応じて多能性の異なる iPS 細胞が得られる事が明らかにされている (Nishimura et al., 2014)<sup>34</sup>。したがって、KLF4 存在量を減らしながらリプログラミングを行うことで、KLF4 量が多いときよりも多能性の低い細胞を誘導することができる。これは、KLF4 量を減らすことでリプログラミングの速度を遅くしていることでもあり、リプログラミングの過程で起きる XCR も遅くなるため、その過程を詳細に捉えやすくなると考えた。さらに、この系を用いたリプログラミング効率は高く、リプログラミングの過程で比較的均一な細胞群が得られることも確認されており、不均一に起きる XCR の過程を均一化する効果も期待される。

## 1.8. 本研究の目的と計画

本研究の目的は、XCR をモデルとして fHC からユークロマチンへの変換機構を明らかにすることである。特に XCR の開始に着目して、再活性化が開始する領域を同定し、さらにその領域に着目することで、XCR の誘導に関与する分子を同定する。そして、その分子がどのように Xi からの転写を開始させるかを明らかにする。

大まかな研究の道筋を、Fig. 1f に示す。これまでの研究において、XCR 検出のための新たな系の確立は終了している。次に、3S reprogramming system を用いて多能性が異なる細胞の誘導を行い、SNP cDNA typing を用いてその XCR の進行度を評価する。その結果、XCR 開始を含め XCR の進行度が異なる細胞群



が複数回収できたら、それらに対してアレルを読み分けながら RNA-seq を行い、Xi, Xa の両 X 染色体上の全領域に対する転写プロファイルを確認し、それを元に、Xi で転写が再開する領域を特定する。転写再開に関わる因子は、その領域に結合する分子中に含まれると考えられるため、既存のデータベースを用いてその領域に結合する候補因子を探索する。そして、候補因子を発現抑制しながらリプログラミングを行い、転写の再開に対する影響を評価し、XCR 開始の分子機構を明らかにする。

## 2. 実験方法および実験材料

特に断りのないとき、試薬はナカライテスクのものを用いている。

### 2.1. MEF 細胞の単離

本研究で用いた MEF は 3 種類ある。XCR の解析を行うためにリプログラミング誘導したものは、*Hprt* 欠損のメス B6 と Wild type のオスをかけ合わせて得られた bsMEF であり、SNP cDNA typing の検量線作成に用いたのが B6 MEF と Sp MEF である。MEF を得る妊娠マウスとしては、理研バイオリソースセンターに依頼し、*Hprt* 欠損の B6 の雌 (RBRC02467) (Yoshiki et al., 2009)<sup>36</sup> に、Wild Type の Sp の雄 (RBRC00208) をかけあわせたもの、もしくは Sp 同士をかけあわせたものを用いた。また、Wild type の B6 MEF を得るためには、日本 SLC から *Mus musculus* C57BL/6NCrSlc の妊娠マウスを得た。

まず、妊娠 13-4 日目のマウスを頸椎脱臼で屠殺した。クリーンベンチ内で子宮を取り出し PBS(-) で洗浄後、個々の胎児を分離し、1 匹ずつ 100 mm<sup>2</sup> dish に移し再度洗浄した。胎児の頭、手足、尾を切り取り、残りの部位をハサミで細かく切り刻み、PBS(-) を加えて 50 mL チューブへ移し、4°C、1,500 rpm で 5 分間遠心処理を行った。なお、切り取った部分は別に、ジェノタイピングで使用するため 1.5 mL チューブで保存した。得られた沈殿に 2.5 mL の TrypLE Express (Life Technologies) を加えて懸濁し、37°C で 15 分間インキュベートした。5 mL の MEF medium を加えて懸濁し、全量を 15 mL チューブに移し、2 分間室温で静置した。上清を回収し、4°C、1,500 rpm で 5 分間遠心処理を行った。沈殿を PBS で洗浄し、再度 4°C、1,500 rpm で 5 分間遠心処理を行った。沈殿を 8 mL の MEF medium に懸濁し、100 mm<sup>2</sup> dish にて 37°C、5% CO<sub>2</sub>、5% O<sub>2</sub> の条件下で培養し、細胞ストックを得た。

PBS(-) は「ダルベッコ PBS(-) ニッスイ (ニッスイ製薬)」9.6 g を 1 L の超純水に溶解し、121°C で 15 分間オートクレーブしてから用いた。MEF medium には DMEM (4.5 g/L D-(+)-Glucose, L-Glutamine, phenol red) + 10% Fetal Bovine Serum (Hyclone or Biosera) + 1 U/mL ペニシリン・ストレプトマイシンを用いた。

また、産業技術総合研究所の小林慎先生のご厚意により、*Hprt* にそれぞれ eGFP と mCherry が挿入された Momiji MEF を譲渡していただいた (Kobayashi et al., 2016)<sup>23</sup>。mCherry+ の MEF は MoFlo XDP (Beckman coulter) により選別した。

## 2.2. 細胞の準備

### 2.2.1. DNA 抽出

#### 2.2.1.1. DNA 簡易抽出

雌雄の確認のために簡易的に DNA を抽出して PCR を行った。2.1. で保存しておいた、それぞれのマウス胎児の頭、手足、尾が入った 1.5 mL チューブに 75  $\mu$ L の Alkaline Lysis Reagent (1N NaOH, 0.5 M EDTA-NaOH(pH 8.0))を加え、95°Cで 2 時間インキュベートし、75  $\mu$ L の Neutralization Buffer (1M Tris-HCl (pH 5.0))を加えた上清を簡易 DNA 抽出溶液とした。

#### 2.2.1.2. DNA 抽出

個々の胎児から単離した MEF より DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いてプロトコールに従い、より純度の高いゲノム DNA の抽出を行った。

### 2.2.2. ジェノタイピング

#### 2.2.2.1. PCR 法によるジェノタイピング

雌雄の確認のため、2.2.1.1.で得られた簡易 DNA 溶液 1  $\mu$ L を鋳型として、表 1 に示した、*Zfy1* に対するフォワードプライマー、リバープライマーを終濃度 10  $\mu$ M, Go Taq Green Master Mix (Promega) を 50% (v/v) となるよう添加し、96°C 2 min  $\rightarrow$  (96°C 30 sec  $\rightarrow$  58°C 30 sec  $\rightarrow$  72°C 60 sec) x 30 サイクルで PCR 反応を行った。反応後は、1% (w/v)のアガロースゲルの 1 ウェルあたり 5  $\mu$ L のサンプルを用いて 100 V, 400 mA で約 30 分間電気泳動を行った。

*Hprt* 欠損確認のため、2.2.1.2 で抽出した DNA 1  $\mu$ L をそれぞれ鋳型として、フォワード、リバープライマーを 25  $\mu$ M となるよう添加し、その他の試薬は KOD-Plus-neo (東洋紡) のプロトコールに従って合計 20  $\mu$ L となるように混合し、94°C 2 min  $\rightarrow$  (98°C 10 sec  $\rightarrow$  60°C 30 sec  $\rightarrow$  68°C 3 min) x 30 サイクルで PCR 反応を行った。反応後は、1% (w/v)のアガロースゲルの 1 ウェルあたり 10  $\mu$ L のサンプルと 2  $\mu$ L の Gel Loading Dye Purple (x 6, Bio Lab)を用いて 100 V, 400 mA で約 30 分間電気泳動を行った。

## 2.3. 細胞培養

### 2.3.1. MEF 細胞の培養

2.1 で示した MEF medium を、6 well plate または 35 mm<sup>2</sup> dish では 1.5 mL, 60 mm<sup>2</sup> dish では 4~5 mL, 100 mm<sup>2</sup> dish では 7.5~8 mL 用いて、37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> の低酸素条件下で MEF の培養を行った。植え継ぎの際には、100

mm<sup>2</sup> dish では約 5 mL の PBS(-)で洗淨を行い，1 mL の TrypLE Express または 0.5g/l-Trypsin/0.53mmol/l-EDTA Solution を添加後，37°Cで 1,2 分間インキュベートすることで細胞を dish からはがし，適当量の MEF medium を加え，新しい dish に移した。

### 2.3.2. 薬剤選択

HAT 選択では，4 mg/mL Hypothanthine (Sigma)，2 mg/mL Thymidine (Sigma)，1 μg/mL MTX (Pfizer)を MEF medium に加えて使用した。

6-Thioguanine (6-TG)選択では，Sigma の純度 98%以上の 6-TG を，1N NaOH に溶解し，0.22 μm 孔の PVDF フィルター (Merck Millipore) にてろ過後，10~60 nM となるよう，MEF medium に加えて使用した。

### 2.3.3. iPS 細胞誘導

iPS 細胞誘導を行う MEF を，24 well plate に， $5.0 \times 10^4$  cells/well となるよう播き，一日後に MEF が dish に張り付いているのを確認した。凍結保存してあった SeVdp ベクター(KOSM, fKOSM, fKOSMaB, GOSM, GSKM, GKOM, GKOS) を 37°Cの恒温槽で溶解し，MEF medium で約  $5 \times 10^6$  CIU/mL 以上になるように希釈し，培養している MEF に加え，32°C，5% CO<sub>2</sub> 条件下で 16~20 時間培養した。その後，0.1% ゼラチンでコーティングした 6 well plate に  $1.6 \times 10^5$  cells/well のフィーダー細胞を播種しておいたものに，上記の SeVdp ベクター感染細胞を移した。感染後に用いるフィーダー細胞(mSNLp)は，SNL 細胞を 10 μg/mL のマイトマイシン C (Sigma) を加えた MEF medium で 2.5 時間培養することにより得た。植え継ぎを行う前までの約 1 週間は，1 well あたり 1.5 mL の mES(2) medium を用いて 37°Cで培養した。SeVdp (fKOSMaB)を用いた際には，ベクター感染細胞をブラストサイジン耐性の mSNLp フィーダー細胞 (mSNLp-BsdR)上に播種してから medium を mES(1)に変えるまで約 1 週間，1 μg/mL のブラストサイジンを加え非感染細胞を除去した。

mES(2) medium には DMEM + 15% Knockout Serum (Life Technologies) または Stemsure Serum Replacement (和光純薬工業) + 1 μM 非必須アミノ酸 (Life technologies) + 2 mmol/L L-Alanyl-L-glutamine Solution + 0.55 nM 2-メルカプトエタノール (Life technologies) + Leukemia Inhibitor Factor (LIF, 1000 倍希釈，和光純薬工業) + 1 U/mL ペニシリン・ストレプトマイシンを用いた。

KDM1A 阻害剤である TCP (2-PCPA, abcam)を添加するときは，リプログラミング開始の 7 日前より行い，培地交換の際も継続して添加を続けた。

#### 2.3.4. iPS 細胞の培養・細胞回収

6 well plate または 12 well plate にて 1.5 mL または 750  $\mu$ L の mES(1) medium を用いて 37°C で培養を行った。0.1% ゼラチンでコーティングした 6 well plate または 12 well plate に  $0.5 \times 10^5$  cells/well または  $0.25 \times 10^5$  cells/well の mSNLp フィーダー細胞を播種しておいたものに植え継ぎを行った。

mES(1) medium には DMEM + 15% FBS + 1  $\mu$ M 非必須アミノ酸 + 0.55 nM 2-メルカプトエタノール + LIF (1000 倍希釈) + 1 U/mL ペニシリン・ストレプトマイシンを用いた。

また、RNA や DNA の回収を行う際、SeVdp (fKOSMaB) ベクターを用いた場合は、回収 2 日前より 1  $\mu$ g/mL のブラストサイジンを加えることでフィーダー細胞の除去を行った。その他の SeVdp を用いた場合は、細胞回収直前の植え継ぎでフィーダー細胞を使わずにゼラチンコート上に直接 iPS 細胞を播種し、mES(1) medium を用いて培養を行った。

### 2.4. 遺伝子発現解析

#### 2.4.1. RNA 抽出

クリーンベンチ内で培養細胞を PBS により洗浄し、TryPLE (Life Technologies) または Trypsin/0.53mmol/l-EDTA Solution を加えて 37°C で 1~2 分間インキュベートした。細胞が dish から離れたのを確認後、FBS 含有培地を TryPLE と等量以上加えて 1.5 mL チューブに移し、室温にて 5,000 rpm で 2 分間遠心処理を行った。細胞ペレットを回収し、ISOGEN (ニッポンジーン) を用いて、プロトコールに従い RNA を回収し、15~30  $\mu$ L の RNase Free の滅菌水に溶解した。

#### 2.4.2. cDNA 合成

1  $\mu$ g の RNA を鋳型とし、SuperScriptIII First-Strand Synthesis System (Life Technologies) を用いて逆転写反応を行った。まず、1  $\mu$ g の RNA に 10 mM dNTP mix 1  $\mu$ L, 50 ng/ $\mu$ L random primers (BioLabs) 1  $\mu$ L を加え、計 7  $\mu$ L となるよう混合した。65°C で 5 分間、さらに氷上で 5 分間静置し、First-strand Buffer を 5 倍希釈、DTT を 50 nM, Super ScriptIII を 10 U/ $\mu$ L, RNase OUT を 2 U/ $\mu$ L となるよう添加し、25°C で 5 分、50°C で 60 分、70°C で 15 分、反応させた。

#### 2.4.3. 定量 PCR

2.4.2 で合成した cDNA を超純水で 10 倍または 100 倍に希釈し、そのうち 1  $\mu$ L を鋳型として用いた。表 2 に示す各プライマーを 2  $\mu$ M, Go Taq qPCR

Master Mix (Promega) を 50%, 計 10  $\mu$ L となるよう混合し, Applied Biosystems 7500 Fast で定量した. 多能性に関わる遺伝子を定量する場合, 当研究室で得られた iPS 細胞クローン (miPSC #24), 体細胞特異的な遺伝子の発現の定量を行うときは, B6 MEF における発現量を元に作製した検量線から算出した. iPSC #24 または B6 MEF における各遺伝子の発現を 1 とし, 内部コントロールとして TATA Binding Protein (TBP)を用いて標準化した.

## 2.5. SNP cDNA typing

### 2.5.1. プライマー・プローブの設計

X 染色体上の遺伝子に関して, 以下の条件を満たす SNP を標的としたプローブ・プライマーを作製した.

1. MEF と ES 細胞の両方において発現が見られること.
2. B6 と Sp 間で, 遺伝子転写領域に存在する SNP であること.

SNP の探索には Sanger の Mouse Genome Project (Keane et al., 2011)<sup>37</sup>

([https://www.sanger.ac.uk/sanger/Mouse\\_SnpViewer/rel-1303](https://www.sanger.ac.uk/sanger/Mouse_SnpViewer/rel-1303)) を参照した. なお, *Hdac6* については, RNA-seq より存在が確認された SNP の情報を用いた. プローブ・プライマーセットのデザインは Thermo Fisher Scientific に依頼した.

### 2.5.2. 遺伝子コピー数の定量

#### 2.5.2.1. プラスミド DNA の作製

まず, cDNA 中における各 SNP のコピー数を求めるために, 1つの標的とする SNP に関して B6 と Sp の配列を持つプラスミドを各々作製した. そのために, 2.5.1 で設計したプライマーを用いて, 2.2.2 同様に KOD-Plus-neo を用いて, B6 と Sp 各々の MEF cDNA に対して PCR 反応を行い, 計 50  $\mu$ L の PCR 産物を得た. 1% (w/v) のアガロースゲルにて 1 ウェルあたり 50  $\mu$ L のサンプルと 10  $\mu$ L の Gel Loading Dye Purple (x6) を用いて 150 V, 400 mA で約 45 分間電気泳動を行なった. QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いてプロトコールに従いゲル抽出を行い, 得られた DNA 断片の濃度を NanoDrop 2000c を用いて測定した. TOPO TA Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて, プロトコールに従いライゲーション, トランスフォーメーションを行った. コンピテントセルには DH5 $\alpha$  を用いた. トランスフォーメーション後, LB 培地にアンピシリンを 100  $\mu$ g/mL となるように加えて調整した LA プレート培地に細胞を播き, 37°Cで一晩培養した. 現れたコロニーのうちの複数のクローンについて, 2.2.1 で示した通り Go Taq Green Master Mix (Promega) と, プライマーには T7 プライマーとプラスミド DNA 作製に用いたプライマーのうちのフォワードプライマーを用いて, コロニーPCR を行った. 目的のバンドが観察されたクロー

ンについて、3 mL の LB 液体培地を用いて 16~20 時間、37°C で培養を行ない、FastGene Plasmid Mini Kit (FastGene) を用いて、プロトコールに従いプラスミド精製を行った。精製後、NanoDrop 2000c を用いてプラスミド DNA 濃度を測定した。

さらに、目的の DNA 配列を含むプラスミドが得られたことを確認するため、シーケンスを行った。750 ng の cDNA を鋳型に、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer または Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer を検出器として DNA 配列解析を行った。

#### 2.5.2.2. プラスミド DNA のコピー数決定

DNA 濃度から 1  $\mu$ L あたりのプラスミドコピー数を算出し、 $1.0 \times 10^4$  copies/ $\mu$ L~ $1.0 \times 10^7$  copies/ $\mu$ L の希釈系列を作製し、これらをスタンダードとして 2.4.3 で示した通り定量 PCR を行ない、B6, Sp MEF cDNA に含まれる標的遺伝子の cDNA のコピー数を同定した。このとき用いたプライマーは、表 3 に示した。

#### 2.5.3. SNP cDNA typing

##### 2.5.3.1. 遺伝子発現の定量

TaqMan Genotyping Master Mix (Thermo Fisher Scientific)を用いて、プロトコールに従い SNP cDNA typing を行った。検出器には Applied Biosystems 7500 Fast (Applied Biosystems)または QuantStudio5 (Applied Biosystems)を用いた。Applied Biosystems 7500 を用いた場合は、60°C 30 sec→95°C 10min→(92°C 15 sec→60°C 90 sec) x 40 サイクル→60°C 30 sec, QuantStudio5 を用いた場合は 25°C 30 sec→95°C 10 min→(95°C 15 sec→60°C 60 sec) x 40 サイクル→25°C 1min で反応を行った。

また、検量線を作製するために、cDNA 中の遺伝子コピー数の比が B6 : Sp = 1 : 99, 20 : 80, 33 : 66, 99 : 1 となるように cDNA を混合し、混合 cDNA 溶液 1  $\mu$ L を鋳型として、上記と同様に SNP cDNA typing を行った。得られた結果より、X 軸には cDNA コピー数比  $\log_2(\text{Sp}/\text{B6})$  を、Y 軸には蛍光比コピー数比  $\log_2(\text{FAM } \Delta\text{Rn} / \text{VIC } \Delta\text{Rn})$  をプロットして検量線とした (Lo et al., 2003)<sup>38</sup>。SNP cDNA typing による、Allele-specific transcript abundance の決定の際には、決定したいサンプルと検量線サンプルを template として上記のように反応を行い、FAM  $\Delta$ Rn, VIC  $\Delta$ Rn をそれぞれ得た。まず、検量線サンプルに対して上記のように検量線を作成し、目的サンプルから得られた  $\log_2(\text{FAM}/\text{VIC})$  をその検量線

に代入してアレル cDNA コピー数比を算出した。このとき用いたプライマーとプローブは、表 3 に示した。

#### 2.5.3.2. ゲノム DNA を定量する場合

*Msn* に対するプローブは、エクソン-エクソンジャンクションを含まないため、genome DNA に対しても適用することができる。検量線作成のためには、B6 と Sp の genome DNA の抽出、genome DNA のコピー数の同定を行い、2.5.3.1. で示すのと同様に反応、解析を行った。このとき用いたプライマーとプローブは、表 3 に示した。

## 2.6 Allele-specific RNA-seq

### 2.6.1. RNA サンプル回収

2.3.4.と同様に行った。RNA 抽出後、Nanodrop2000c (Thermo Fisher Scientific) により濃度を測定した。

### 2.6.2. クオリティチェック

RNA が分解されていないことを確かめるため、RNA6000 ピコキット (Agilent) と bioanalyzer (Agilent) を用いてプロトコールに従い、RNA Integrity Number (RIN) を得た。RIN が 5 以上であるものを RNA-seq に用いた。

### 2.6.3. ライブラリ DNA の作成、DNA シーケンシング、およびデータ処理

RNA-seq library は 500 ng の total RNA から NEB Next Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (New England Biolabs) と NEB Next Ultra Directional RNA Library Prep Kit (New England Biolabs) を用いて作成した。シークエンス反応は、NextSeq500 (Illumina) 2x76-base reads, ペアエンドで行った。得られた FASTQ ファイルを CLC Genomics Workbench (CLC-GW, Version 10.1.1, Qiagen) にインポートし、RNA-seq 解析ツールを用いて、Normalized RPKM (Reads Per Kilobase per Million mapped reads) を算出した。mm10 マウスリファレンスゲノムへのマッピング後、SNP や Indel 等のバリエーションの位置とアレルからの転写比の情報を得るために、バリエーションコールを行った。B6 Reference genome に一致したものを B6 Reference read, 一致しなかったものを Sp Variant read とし、バリエーション毎に、 $B6 \text{ Reference read number} / (B6 \text{ Reference read number} + Sp \text{ Variant read number})$  より B6 frequency,  $Sp \text{ Variant read number} / (B6 \text{ Reference read number} + Sp \text{ Variant read number})$  より Sp frequency を算出した。B6/Sp gene frequency は、その遺伝子に含まれるすべてのバリエーションの平均より算出した。



## 2.6.4. 結果解析

### 2.6.4.1. PCA 解析

PCA は, R の "prcomp" を使用して, B6 gene frequency を羅列し作成したファイルに対して行なった.

### 2.6.4.2. ヒートマップ作成

各 polymorphism に対して算出した B6 frequency の値を用いて, リプログラミング開始後の日数順に各サンプルを行に, 列には各 SNP を X 染色体上の順に並べて, ヒートマップを作成した. B6 frequency は, 50 以上のものは 50 と見なし, 0 を青色, 50 を赤色とした. 実際のヒートマップの出力には morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>)を用いた.

### 2.6.4.3. クラスター解析

B6 gene frequency によるクラスター解析の際は, ユークリッド距離をもとにして, R の Ward's agglomerative hierarchical clustering を用いた.

### 2.6.4.4. Escapee の同定

bsMEF において Xa-Sp に対する Xi-B6 の B6 frequency 比を算出し, 10%以上のものを escapee とした (Carrel and Willard, 2005)<sup>39</sup>.

## 2.7. 既報公開データを用いた Xtreme 部位の解析

Xi の立体構造に着目した論文で, SNP を利用し Xa と Xi を読み分けながら Hi-C と ATAC-seq を行っている (Giorgetti et al., 2016)<sup>40</sup>. これらのデータを用いて, Xtreme 部位の構造的特異性の考察を試みた.

### 2.7.1. Allele-specific Hi-C (GSE72697)

GSE72697 をダウンロードし, HiCPlotter version 0.7.3 (Akdemir et al., 2015)<sup>41</sup> を用いて X 染色体全域における Hi-C interaction とその拡大図を作成した. コマンドは以下に記載. <https://github.com/akikuno/bioinformatics-workflow/blob/master/HiC/HiCPlotter.sh>.

### 2.7.2. Allele-specific ATAC-seq (GSE71156)

WT mESCs (mouse embryonic stem cells), WT NPCs (GSM1828645, GSM1828646)のそれぞれをダウンロードし, Lift Genome Annotation

(<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgLiftOver>) を用いて、mm9 から mm10 に対する annotation を行った。Allelic open Xi ratio は、Xi-129 reads / (Xi-129 reads + Xa-Cast reads) により算出した。Xi における Chromatin accessibility を比較するために、129 reads(Xi)の 2Mbs ごとの和を取り、Xtreme を含む領域と、その他の領域の比較を行った。

## 2.8. Xtreme 部位に結合する転写再開関連候補因子の絞り込み

ChIP-Atlas (Oki et al., 2018)<sup>42</sup>(<https://chip-atlas.org>) の Peak Browser に報告されている、322 のタンパク質に対して行われた 12,161 の”TFs and others”の (ESC embryonic stem cell) における結合データより、*Gpkow*, *Wdr45*, *Gm45208*, *Hdac6*, *Tfe3*, *Wdr13*, *Ftsj1* の各 TSS+- 1 kbps の範囲に結合が見られるタンパク質のスクリーニングを行った。そのうち、5 つ以上の遺伝子に結合が見られたものを、転写再開関連候補因子とした。

## 2.9. Knock down 実験

### 2.9.1. shRNA のデザイン

shRNA 配列は基本的に、他の論文で使われているものから、B6 と Sp 間で SNP がないものを使用するようにした。新たに shRNA 配列をデザインする必要がある場合は、RNAi Consortium (<https://www.broadinstitute.org/rnai-consortium/rnai-consortium-shrna-library>)を用いてデザインした配列のうち、B6 と Sp 間で SNP がないものを選別して利用した。

### 2.9.2. shRNA 産生レトロウイルスベクターの作成

リプログラミング中にサイレンシングされないようにするため、pMXs-U6-Puro plasmid (Cambridge bioscience) 中の shRNA 発現カセットを pMCsΔYY1-IRES-Puro plasmid に組み込み、pMCΔYY-U6-Puro plasmid の作成を行った (Bui et al., 2019)<sup>43</sup>。そして、pMCΔYY-U6-Puro plasmid に表 4 に示した、oligo DNA をアニーリングし、組み込んだ。

レトロウイルス作成のためには、Lipofectamine2000 を用いて、上記 PLAT-E 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションから 2 日後、0.45 μm ポアのフィルターで濾過したウイルス溶液を回収し、使用時まで -80 °C で保存した。

### 2.9.3. レトロウイルス感染

レトロウイルス感染を行う bsMEF-HAT を、24 well plate に、 $4.0 \times 10^4$  cells/well となるよう播き、一日後に MEF が dish に張り付いているのを確認した。凍結保存してあったレトロウイルスベクターを 37°C の恒温槽で溶解し、MEF medium で 2 倍希釈後、培養している bsMEF-HAT に加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 2 日間培養した。その後、感染細胞と非感染細胞の両方に 1 µg/mL の puromycin を加え、非感染細胞が完全に除去されるまでおよそ 3 日間、薬剤選択を行った。

## 2.10. Allele-specific ChIP-seq

### 2.10.1. クロマチン回収

KDM1A の検出に使う際には 10 分間、細胞を 1%ホルムアミドで固定後、125 mM グリシンにより反応を止め、よく冷やした PBS で 3 回洗浄した。回収した細胞は FA lysis buffer (50 mM HEPES-KOH, pH7.5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, and Protease Inhibitor Cocktail (Sigma)) に溶解し、クロマチン切断のため SONIFIER 250 (BRANSON) を用いて、Output control 2, Duty cycle 50%の条件でソニケーションを行った。ソニケーション後、15,000 rpm, 4°C で 5 分間遠心分離し、上清をクロマチン懸濁液として ChIP (Chromatin immunoprecipitation) アッセイに用いた。

### 2.10.2. クロマチン免疫沈降

クロマチン溶液を Dilution buffer (16.7 mM Tris, 167 mM NaCl, 1.2 mM EDTA, 1.1% Triton X-100, 0.01% SDS) で 10 倍に希釈し、500 倍希釈となるように各抗体を加えた。4°C で 16 時間、さらに Dynabeads Protein G (Thermo Fisher) を加えて 4°C で 4 時間、抗体反応を行った。反応液は Wash buffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS) にて 2 回、Final Wash buffer (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS) で 1 回、さらに LiCl Wash buffer (20 mM Tris, 500 mM LiCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS) で 1 回、最後に TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA) で一回洗浄した。クロマチン DNA は 30°C で 30 分間ボルテックスしながら Elution buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1% SDS) に溶出させ、抽出したサンプルを ChIP-seq に用いた。なお、本実験で用いた抗体は、anti-KDM1/LSD1 (ab17721, Abcam) である。

### 2.10.3. ライブラリ DNA の作成, DNA シーケンシング, およびデータ処理

ChIP sequencing ライブラリーの作成には、KAPA HyperPlus Kit (Roche) を用いた。ライブラリー DNA の両端には、Illumina TruSeq DNA UD Indexes (Illumina) の unique dual index adaptor を使用し、10 ng の ChIP DNA からライブ

ライリーの作成を行った。作成されたライブラリー濃度は Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) により定量し, MultiNA (Shimadzu) または TapeStation 2200 (Agilent Technologies) を用いてサイズの確認を行った。Novaseq 6000 Sequencing System と SP 100 cycle kit (Illumina) を用いてライブラリー-DNA をペアエンドでシーケンスし, BWA-MEM version 0.7.17 (Li et al., 2010)<sup>37</sup> を用いて, マウスゲノムリファレンス mm10 にマッピングした。バリエーションコールは, samtools mpileup の bcftools call により行った (Li et al., 2009)<sup>44</sup>。B6 Reference genome に一致したものを B6 Reference read, 一致しなかったものを Sp Variant read とし, 2 つ以上のサンプルで検出された variant を, Sp polymorphism として扱った。KDM1A occupancy の算出には, 読まれた SNP が存在する領域を enhancer, promoter, gene body に振り分け, 0.2 Mb 毎に合算をした。その値を  $X_a$ ,  $X_i$  のそれぞれで算出し,  $X_a$  に対してノーマライズを行った。Enhancer, Promoter, gene body は以下に示す条件により振り分けを行った。Enhancer; EnhancerAtlas 2.0 の ESC\_J1 (Gao et al., 2020)<sup>45</sup> (<http://www.enhanceratlas.org/indexv2.php>) に存在すること, Promoter; 各遺伝子の TSS から 1 kbs 以内, gene body; 各遺伝子の中で転写されている領域。

## 2.11. 統計処理

統計的に有意な差であるかを検討するためには, Student's t-test を用いた。  $p < 0.05$  であったものを, 有意として扱った。

### 3. 結果

#### 3.1. これまでの研究

本研究は、2015年度修士(医科学)学位論文「iPS細胞誘導におけるX染色体再活性化機構の解明」をもとにした研究である。私は、この先行研究において、X染色体再活性化状態を定量するため新しい系の確立を行った。まず、細胞中の2本のX染色体を区別するために、遺伝子配列の異なる *Mus spretus* (Sp) と *Mus musculus* C57BL/6J (B6) をかけ合わせて bsMEF を単離した (Fig. 2a)。このとき、B6にはX染色体上の *Hprt* 遺伝子がヘテロに欠損したものをを用いており、さらにジェノタイピングにより、(<sup>B6</sup>X<sup>Hprt</sup>;<sup>Sp</sup>X) の核型を持つ bsMEF を選択して用いた。

HPRTは、プリンヌクレオチド合成に関わる酵素であり、サルベージ経路に含まれる。HPRT欠損細胞においてはプリンヌクレオチドの合成は *de novo* 経路からのみ行われるため、*de novo* 経路の阻害が起きるとこれらの細胞は生存できなくなる。これを利用したのが HAT (Hypoxanthine, Aminopterin and Thymidine) 選択である (Foung et al., 1982)<sup>46</sup>。このようにして、HAT存在下では、HPRTが産生される細胞 (Kim et al., 2014)<sup>47</sup>、つまり Sp の X 染色体が活性化している bsMEF(<sup>B6</sup>Xi,<sup>Sp</sup>Xa)のみを選別できる (Fig. 2b)。逆に、B6のX染色体が活性化している細胞を得たい場合には、6-TG (6-Thioguanine) を培地に添加する。6-TGはグアニンのアナログであるため細胞中に取り込まれるが (Fig. 2c)、RhoファミリーGTP結合タンパク質である *Rac1* の阻害をすることにより、細胞毒性を持つ。このようにして、HPRT変異をもとに薬剤選択を行うことで、父型または母型由来のX染色体のみが活性化した細胞を選択できる。

このような細胞を用いてリプログラミングに伴うXiからの転写を検出する際、2本のX染色体を区別する必要がある。SNPをもとに2本のX染色体を区別するために、TaqMan probeを使用したRT-qPCRを行なうことにした。X染色体に含まれる遺伝子上でSNPを探索し、それを標的としてprobe, primerの設計を行なったところ、*Lamp2*, *Msn*の2つの遺伝子に対して、B6とSpのcDNAをきちんと区別しながら定量することができた (Fig. 2d, e)。実際に、このSNP cDNA typingを用いて、*Lamp2*, *Msn*の両方の遺伝子座において、薬剤選択の評価を行ったところ、HAT選択ではSpからの転写が、6-TG選択ではB6からの転写がそれぞれ大部分を占めていることから、前者では(<sup>B6</sup>Xi,<sup>Sp</sup>Xa)、後者では(<sup>B6</sup>Xa,<sup>Sp</sup>Xi)が選択されたことが確認された (Fig. 2f)。

以上のように、B6 と Sp をかけ合わせて得られた MEF に薬剤選択を行うことで、特定の X 染色体が活性化している細胞のみを選択的に取得し、その細胞の X 染色体からの転写をアレル特異的に検出できる系を確立した。

さらに、HAT-bsMEF に対して、SeVdpベクターを用いて、KLF4, OCT4, SOX2, c-MYC の山中 4 因子の導入によりリプログラミングを行ったところ、B6のX染色体からの*Lamp2*や*Msn*の転写増加が検出できたことから、SeVdpベクターからの山中4因子の発現でXCRを誘導できることと、SNP cDNA typing を用いて、Xi からの転写の再開を検出できることが確認された (Fig. 2g)。

### 3.2. XCR に対する山中四因子の影響の確認

XCR は XCI 同様、決まった領域から転写が再開し、それが X 染色体全体に広がっていくことが予想されている。これに対して本研究は、XCR の開始に着目し、転写が再開する機構を解明することを目的としている。転写が再開したばかりの遺伝子では、活性型 X 染色体 (Xa) と比べて転写量が少なく、それが徐々に増加し Xa と同程度になると考えられる (Fig. 3a)。

これまでの研究では、Xi からの遺伝子転写が再開されてから Xi からの遺伝子転写が Xa 同等までに回復している状態を観察することはできたが、その間を見る事ができていなかった (Fig. 2g)。そこでまず、山中四因子を一つずつ抜きながらリプログラミングを行うことで、XCR が中途半端に起きた細胞を得られるかどうか確認することにした。通常、上述した系では、リプログラミング因子として、OCT4, KLF4, SOX2, c-MYC を用いている。このうち、Fig. 3a に示したベクターを用いて、KLF4 以外、OCT4 以外、SOX2 以外、c-MYC 以外の 3 つの遺伝子をそれぞれ導入しながらリプログラミングを行なった。

まず、山中 4 因子のうち、XCR 誘導に必要な因子を明らかにするために、SNP cDNA typing を用いて Xi からの *Lamp2* 遺伝子の転写を確かめたところ、KOSM ベクター、-M (GKOS)ベクター以外の全てのベクターにおいて、*Lamp2* での Xi からの転写の亢進が観察されなかったことから (Fig. 3c)、c-MYC 以外の全ての因子が転写の再活性化に必要であることが示唆された。

さらに、これが多能性の欠如からくるものであるかどうか確かめるため、リプログラミング初期、中期、後期に対する多能性マーカー遺伝子 *Cdh1*, endogenous *Oct4*, *Rex1* に対する RT-qPCR やアルカリフォスファターゼ (AP) 染色を行った (Fig. 3d, e)。 *Cdh1* 発現や AP 染色の結果から、c-MYC の欠如はマーカー遺伝子の発現や AP 染色に影響を及ぼさないが、KLF4 や OCT4 が存在しないと、リプログラミング初期までも進行していないことが示唆された。SOX2 欠如による影響は、KLF4 や OCT4 よりも限定的であり、リプログラミング

グ初期には影響しないものの、それ以上の多能性を獲得することはできないと考えられる。また、四因子を用いたリプログラミングと比べて、いずれの三因子を発現させた場合も、コロニーを形成する時期は遅く、比較的平坦なコロニーが観察されたことから (Fig. 3f), 多能性が低いことが示唆された。

以上より OCT4, KLF4 または SOX2 を除いた三因子によるリプログラミングにより XCR を誘導することは不可能であると結論した。また, c-MYC を除いた三因子で誘導を行っても, XCR が遅延することはなかった。したがって, 三因子を用いたリプログラミングにより, XCR を解析することは困難であると考えた。一方, これらの結果は, OCT4, KLF4, SOX2 の下流に存在する分子が XCR に必要であることを示唆しており, 3S reprogramming system で KLF4 量を制御することによって, XCR を遅らせられる可能性が高いと考えた。

### 3.3. High-K 条件を用いたリプログラミング

序章でも述べたように, 本研究室独自の 3S リプログラミング system を用いると, Shield1 の添加により細胞内での KLF4 存在量を変えることでリプログラミングの速度を変えることができる (Fig. 4a). Shield1 の添加量が少ない方, つまり, KLF4 の存在量が少ない条件から, Low-K, Mid-K, High-K と呼んでいる (Fig. 4b). 3S reprogramming system では, これまでとは異なる, fKOSM ベクターを用いるため, HAT-bsMEF に対して fKOSM ベクターを用いて最も高い多能性を誘導する High-K の条件でリプログラミングを行い, RT-qPCR により 3 つの多能性マーカー遺伝子, *Cdh*, endogenous *Oct4*, *Rex1* の発現から, その多能性の程度を確かめた。

Fig. 4c に示すようにリプログラミング誘導 30 日後において, どの遺伝子発現も上昇していることから (Fig. 4c), この条件において, 高い多能性が誘導されることが示唆された。さらにこのとき, B6 からの *Xist* RNA の発現はほとんど見られないことから (Fig. 4d), Xi を覆っていた *Xist* RNA はすでに除去された状態であると考えられる。また, SNP cDNA typing を用いて, *Msn*, *Lamp2* における Xi からの転写状態を確かめたところ, *Lamp2* においては, Xi の転写が Xa の転写とほぼ同程度である一方, *Msn* では, Xi からの転写が Xa からの転写を上回っていた (Fig. 4e)。

2 本の X 染色体が活性化している細胞では, 2 本とも Xa 状態を維持することは難しく, 培養中に片方の X 染色体を失う現象がよく知られている (Zvetkova et al., 2005)<sup>48</sup>。そこで, 細胞から抽出した genome DNA を template に TaqMan probe を用いて qPCR を行うことで, 2 本の X 染色体の有無を確認したところ, どちらのアレルも増幅されたことから, 両方の X 染色体が存在していることが示唆された (Fig. 4f)。私は, Xi からの転写が開始し, Xa と同程度まで回復し

た後、その転写レベルが維持されると予測していたが、上の結果は、Xiからの転写がXaと同程度に達した後、下降することを示唆している。実際にこのような現象が起きるのであれば、XCRの過程で、Xiからの転写がXaと同等になっている状態とXCR後にXiからの転写が減少している状態を区別することは困難である。XCR後にXaXaが維持されるかどうかをさらに確かめるため、X染色体の活性化状態を、蛍光により観察できるMomiji細胞 (Kobayashi et al., 2016)<sup>23</sup> を用いてリプログラミングを行うことにした。

本研究で使用したMomiji細胞は、X染色体上の*Hprt*にそれぞれ異なる蛍光タンパク質GFP、mCherry発現遺伝子が挿入されている (Fig. 4g)。リプログラミングによるXCRをより捉えやすくするために、mCherry+のMEF細胞をFACSにより選別した。このMEFにリプログラミングを行いXCRが起きると、もともとのmCherryに加えて、XiからのGFPが蛍光を発するようになる (Fig. 4g)。Fig. 4hで示すように、High-Kの条件でリプログラミングされたMomiji MEFは、リプログラミング17日後までにはXiからのGFPを発する、つまりXCRが開始している。この状態は、リプログラミング21日後程までは維持されるが、27日後ではmCherry+/GFP+だけではなくmCherry+/GFP-またはmCherry-/GFP+の細胞も登場していることより、XaXaを維持しきれずに、再度不活性化が起きていることが分かる (Vallot et al., 2015)<sup>49</sup>。さらに42日後では、mCherry+/GFP+の細胞はほとんど見られないことから、ほぼ全ての細胞において不活性化が起きていることが分かる。

したがって、High-Kの状態ではリプログラミングを行うと、多能性が高くXCRが起きた細胞が得られる一方、XaXa状態は維持されず再度XCIが始まってしまうため、この条件を用いてXCR過程の細胞を回収することは困難であると結論した。

### 3.4. リプログラミングが遅延した細胞の誘導

High-Kは、SeVdp(fKOSM)ベクターを用いた3S reprogramming systemにおいて、最も高い多能性を誘導する条件である (Fig. 4a, b)。High-KではXCRが誘導された後、XCIを引き起こしてしまうことから、XCRが起きてすぐの状態までを観察対象とすることにした。その際、XCRが起きるまでの時間を引き伸ばすために、より低い多能性を誘導するLow-K、Mid-Kの両方の条件で誘導を行なうことにした (Fig. 5a)。最初の目標を、HAT-bsMEFに対してリプログラミングを行い、Xiからの転写が再開し、Xaからの転写量と同等になるまでの様子を*Lamp2*、*Msn*領域に対するprobeを用いて観察することとした。



まず、High-Kと同様に、リプログラミングにおいて両方のX染色体を維持することを確認した (Fig. 5b). 次に、*Lamp2*, *Msn* の2種類の遺伝子領域におけるXiからの転写状態を確かめると、Mid-KではLow-Kよりも転写再活性化が進行しており、また、時間依存的にXiからの転写量が増えていく様子が観察できた (Fig. 5c, 左, 中). さらに、これらの細胞の多能性を確認するため、多能性マーカー遺伝子に対するRT-qPCRを行うと、Low-KでもMid-Kでもマーカー遺伝子の発現上昇が見られた (Fig. 5d, 左, 中).

以上より、リプログラミングに伴うXCRの過程で、Xiからの転写が再開し、転写量が徐々に増えていく様子を捉えた経時的サンプルを得ることができた. しかし、Xiからの転写の増加が最初に確認されたのが、リプログラミング後35日であった. そこでリプログラミング35日までの詳細を捉えるために、Mid-Kの条件で再度リプログラミングを行ない、*Lamp2*, *Msn* におけるXiからの転写状態の確認を行った. 結果、Low-K, Mid-K(1)より早い段階で転写が再開し、Xaと同等まで回復した細胞を得ることができた (Fig. 5c, d, 右). さらに、B6からの*Xist*の発現をRT-qPCRで確認したところ、High-Kのような極端な発現降下は見られなかったことから (Fig. 5e), 以上で見られた転写の開始は、*Xist*がXiを覆っている状態で起きると考えられる.

このように、High-Kより低い多能性を誘導するMid-K, Low-Kにおいて、Xiからの転写が再開し、Xaと同程度まで回復する様子を経時的に観察することができた.

### 3.5. Allele-specific RNA-seqによる転写再開領域の同定

3.4で得られたXiからの転写が再開し、Xaと同程度まで回復する過程の細胞における、Xiからの転写プロファイルをX染色体全体で解析し、それを元に転写が開始する領域を特定するために、アレルを読み分けながらRNA-seqを行った. アレルの読み分けの際には、B6ゲノムをReferenceとしてreadsのalignmentを行い、それに当てはまらなかったものをSpのpolymorphismと見なした (Fig. 6a). さらに、XiであるB6からの転写状態を分かりやすくするために、polymorphismごとにB6 frequencyの算出を行った (Fig. 6a).

まず、B6, Spの読み分けが正しくされているかどうか、確認を行うことにした. X染色体上遺伝子の中には、不活性化を受けず常に活性化状態を維持するescapeeという遺伝子群が存在する (Yang et al., 2010)<sup>50</sup>. Escapeeはマウスとヒトで異なり、さらにその組織においても異なることが報告されているため (Li et al., 2012, Berletch et al., 2015)<sup>51,52</sup>, マウスの複数の組織においてXCIを受けない13のEscapee遺伝子 (Yang et al., 2010) の転写状態を調べることにし

た。B6 と Sp の読み分けがきちんとされているのであれば、MEF の段階で Sp からだけではなく、B6 の escapee からの転写も見られるはずである。Escapee を定義する基準として、Carrel and Willard ら<sup>39</sup> は、Xi からの転写が Xa の 10% 以上であることを用いている。そこで、HAT-bsMEF における 13 の遺伝子の転写量を、Xa と Xi で比較したところ、Fig. 6b で示されるように、そのうちの多くの遺伝子で、Xi からの転写が確認されたため、B6, Sp の読み分けはある程度できていると判断した。

さらに、Fig. 5c では、*Lamp2* と *Msn* の転写活性化状態でのみ XCR の経過を判断したが、X 染色体の他の遺伝子における転写の進行具合を調べるため、X 染色体上の遺伝子の B6 frequency を用いて PCA 解析を行った (Fig. 6c)。Mid-K(1)のサンプルは、Low-K のサンプルの延長線上に存在することから (Fig. 6c)、Mid-K(1)では、Low-K で起きた転写の再活性化がそのまま進んでいることが示唆された。一方、Mid-K(2)は、Low-K, Mid-K(1)とは異なる位置に存在した。しかし全体的に見ると、MEF では左上に位置していたものが、どの誘導条件についても、リプログラミングが進むに連れて右下方向に進んでいくことから、X 染色体の遺伝子全体で見ても、転写の再活性化が進んでいると考えられた。

次に、各条件にて転写が開始する領域を絞り込むため、Xi からの遺伝子の発現傾向に応じて遺伝子のクラスタリングを行った (Fig. 6d)。*Lamp2*, *Msn* 領域における Xi からの転写状態によって選出したサンプルで RNA-seq を行っているため、*Lamp2*, *Msn* よりも早く転写の再活性化が早く起きる遺伝子では、最初不活性化していた Xi からの転写が上昇するという傾向が観察されるはずである。RNA-seq で検出された遺伝子をそれぞれ 12 のクラスターに分割したところ、Xi からの転写が上昇傾向を示すクラスターが Low-K, Mid-K(2)では 1 つ、Mid-K(1)では 2 つ得られた (Fig. 6d)。上昇傾向を示すクラスターが各条件で 1, 2 個しかないことより、これらは転写開始が早い遺伝子群であると言える。まず、Low-K cluster1 と Mid-K(2) cluster4 の遺伝子の重複を確認したところ、それぞれのクラスターに含まれる遺伝子は X 染色体全体に存在するが、重複する遺伝子はセントロメア周辺に偏って分布した (Fig. 6e)。この 2 つのクラスターに対して、それぞれ、Mid-K(1) cluster1 と Mid-K(1) cluster4 をさらに重ね合わせたところ、前者では重複する遺伝子が存在しない一方、後者では 7 つ重なる遺伝子が存在した (Fig. 6f)。そして、この 7 つの遺伝子は全て、170 Mb ある X 染色体のたった 0.5 Mb に集中していた (Fig. 6g)。

なお、XCR は Escapee 付近から開始するとの報告もある (Janiszewski et al., 2019)<sup>28</sup>。そこで、Fig. 6h で上昇傾向を示した各クラスターに含まれる遺伝子と Fig. 6b で Xi からの転写が Xa の 10%以上であった Escapee との位置関係を図に

すると、Fig. 6h のようになり、*escapee* 近傍に存在する複数の遺伝子で、リプログラミングの比較的初期段階で転写が再開されることがわかる。

このように本研究は、これまで言われていたように、XCR が *escapee* の近傍から開始することを確認した。さらに新しい発見として、その中でも Fig. 6g で示される 7 つの遺伝子を含む領域；Xtreme (X-transcriptional reactivation manifesting element) から転写の再開が始まる事を明らかにした。

### 3.6. Xtreme における転写再開の確認

クラスタリングでは B6 frequency を用いているが、これは B6 からの転写が増加しているときだけでなく、Sp からの転写が減少したときにも上昇する可能性がある。そこで、以上で同定された Xtreme において実際に B6 からの転写産物が増えていることを検証するため、Mid-K(1)を用いて、Xtreme, RNA FISH による XCR の検出に用いられてきた *Mecp2* 遺伝子周辺、*escapee* の一つである *Kdm5c* の 3 つの領域に対して、Xi と Xa の両方の read 数の変化を確認した (Fig. 7a)。

転写再開の早い遺伝子に含まれない *Mecp2* 周辺では Sp-Xa からの転写はほぼ変わらず、B6-Xi からの転写量もあまり変化がなく、転写の再開が起きていない。*escapee* の一つである *Kdm5c* では、B6-Xi からの Sp-Xa からも MEF の段階ですでに転写が観察されており、変化があまりない。これに対して Xtreme では、Sp-Xa からの転写を維持しながら、B6-Xi からの転写が増えてくる様子が見られた。さらに、X 染色体全体における転写の傾向を確認するため、検出された全ての polymorphism に対する B6 frequency を用いて、X 染色体に対する heat map を作成した。B6 frequency が高くなる、つまり B6 からの転写が増えると赤色が強くなるが、X 染色体全体の中でも、Xtreme 周辺で転写の再開が早いことが確認でき、これは、Low-K, Mid-K(1), Mid-K(2)のすべてで見られる傾向であった (Fig. 7b)。

Xtreme における Sp の X 染色体からの転写量が維持されていること、X 染色体全体の領域で見ても Xtreme 周辺の B6 frequency が高いことより、Xtreme から転写の再開が開始すると結論した。

### 3.7. XCR 評価のための新たな probe の作成

XCR が Xtreme から起きるのであれば、Xtreme 中に存在する遺伝子に対して TaqMan probe を作成することで、SNP cDNA typing により XCR の開始を検出

することができる。そこで、Xtreme中に存在する *Hdac6* に対して TaqMan probe を作成した (Fig. 8a).

標的とする polymorphism は、RNA-seq で検出されたものから選択し、2つの連続しない SNP を用いた。Probe の性能を確かめるために、B6 と Sp の cDNA をそれぞれ B6 : Sp = 1:99, 20:80, 50:50, 66:33, 99:1 になるように予め混合したものを template として qPCR を行うと、アレル cDNA 混合比と蛍光レポーター比にある程度の相関が見られたが、40 cycle では増幅がほぼ起きていなかった (Fig. 8b, c 上)。そこで、cycle 数を 60 cycle まで増やしたところ、蛍光シグナルの増幅が見られ、アレル cDNA 混合比と蛍光レポーター比にさらに高い相関が見られるようになったため (Fig. 8b, c 下)、今後このプローブを用いて qPCR を行うときには、サイクル数は 60 とした。実際にこれらの TaqMan probe を用いて RNA-seq を行った cDNA に対して SNP cDNA typing を行い、Fig. 8d で示すような結果を得た。これらは、RNA-seq より算出した B6 frequency の値とも類似しており、リプログラミングにおける B6-Xi からの転写量の増減を反映すると結論した (Fig. 8e)。

このように、SNP cDNA typing により *Hdac6* 領域における Xi からの転写状態を確認することで、XCR の開始を検出できることが明らかになった。

### 3.8. Xtreme 領域の特異性

X 染色体は不活性化を受けると、escapee 遺伝子を外側にした、2つのメガドメインからなる特徴的な立体構造をとることが報告されている (Deng et al., 2015; Giorgetti et al., 2016)<sup>53,54</sup>。そこで、本研究で同定した Xtreme から転写の再開には、このような立体構造が関係する可能性があると考えた。

その可能性を検証するために、XCI 前の ESC と XCI 後の NPC (Neural progenitor cell) の、2本の X 染色体の立体構造を明らかにした研究 (Giorgetti et al., 2016)<sup>40</sup> のデータを用いて、Xtreme 周辺の立体構造を解析した。彼らも本研究と同様に、2種類の異なるマウス (*Mus musculus* 129S1/SvImJ [129] と *Mus musculus* CAST/EiJ [Cast]) をかけ合わせて、2本の X 染色体の間に SNP を存在させることで、SNP をもとにアレルの区別を行っている。

まずは、ゲノム DNA 間の近接性を表す Hi-C のデータを解析したところ、NPC の Xi では、Xtreme とほぼ一致する領域に一つの TAD (Topologically Associating Domain) を形成することが読み取れた (Fig. 9a)。つまり、Xi において Xtreme 中の遺伝子は、同様の遺伝子制御を受けている可能性が挙げられた。

さらに XCR において、Xi 上のこの領域から早い時期に転写が再開するのであれば、この領域は、凝縮したヘテロクロマチン構造を持つ Xi の中でも、転写関連タンパク質が比較的アクセスがしやすいことが考えられる。この仮説を確かめるために、同論文で行われた ATAC-seq のデータを解析することにした。Fig. 9b で示すように Allelic Xi open ratio を求めたところ、Xtreme の中に存在する SNP では、129-Xi 全体と比べて大きい値を示したことから、よりオープンであることが示唆された。さらに、Xtreme におけるクロマチンアクセシビリティを X 染色体全体で比較するため、X 染色体全体を 2 Mb 毎に区切り、129-Xi における read 数の合算を行った (Fig. 9c)。結果、Xtreme 領域は比較的高い値を示し、それよりも高い値を示したのは、escapee を含む領域のみであったことから、X 染色体全域で見ても、オープンなクロマチン構造を有することが分かった (Fig. 9c)。

また、私は転写の再開が始まる Xtreme がセントロメア周辺に存在することに興味を持った。ランダム XCI を可能にした *Xist* の出現以降、X 染色体の構造はより高く保存されていることが報告されている (Chaumeil et al., 2011)<sup>14</sup>。XCR のメカニズムが保存されており、同じメカニズムでこの領域から転写が再開するのであれば、この領域は、種の間でも保存されているはずである。そこで、マウスとヒトにおける Xtreme 領域の比較を行った (Boyd et al., 2000)<sup>55</sup>。マウスとヒトにおいて X 染色体上の多くの遺伝子が保存されているが、その並び順は異なり、特にセントロメア的位置が大きく異なっている (Fig. 9d)。ところが、マウス Xtreme 領域に存在するすべての遺伝子が、ヒトでも同じ並び順を保ったまま存在しており、さらに、どちらでもセントロメアに比較的近いところに存在していた (Fig. 9d)。これは、Xtreme がセントロメア周辺に存在する必要がある、さらにそれが XCR の開始に関連していることを示唆する。

以上から、Xtreme は X 染色体上でも比較的オープンで、統一された遺伝子制御を受ける領域であると考えられる。また、マウスでもヒトでもセントロメアの近傍に存在することより、XCR の開始にはセントロメアが関わる可能性が考えられる。

### 3.9. 領域から因子へ、転写再開に関連する因子の同定

これまでの研究より、転写の再開はセントロメア付近の Xtreme 領域から開始し、その領域は比較的オープンなクロマチン構造を持つことが明らかとなった。Xtreme がオープンなクロマチン構造を持つことから、転写再開の際には転写因子が直接この領域に結合し、転写の再開に働きかけることが予想される。

そこで私は、ChIPのデータベースであるChIP-Atlasを用いて、転写の再開に関わる分子の探索を行うことにした (Fig. 10a). 転写の再開に関わる因子は転写再開後もプロモーターに結合し続けると考え、ESCにおいてXtremeの中でも特に転写の再開が早い、7つの遺伝子、*Gpkow*, *Wdr45*, *Gm45208*, *Tfe3*, *Hdac6*, *Wdr13*, *Ftsj1*のプロモーターに結合するタンパク質の探索を行った (Fig. 10a). すると、Fig. 10bの*Wdr45*遺伝子の例で示すように、これらの遺伝子のプロモーター周辺 (Transcription start site; TSS+1kbs) に、タンパク質が多く結合するピークが観察された. このなかでも、5つ以上の遺伝子プロモーターに結合したKDM1A, KDM4C, NELFA, OTX2, TCF12の5因子を、転写再開関連候補因子とした (Fig. 10a, b).

次に、これら候補因子をshRNAでKnock down (KD) しながらリプログラミングによってXCRを誘導することで、これらの遺伝子の機能のXCRへの影響を確認することにした. まず、それぞれの遺伝子に対してshRNAをデザインし、shRNA産生レトロウイルスを感染させた. この際、*Otx2*はMEFでは発現せず多能性幹細胞で高く発現するためiPS細胞に、それ以外の遺伝子の場合には、MEFでも多能性幹細胞でも同程度の発現が見られるため、HAT-bsMEFに対してレトロウイルスの感染を行なった. 感染細胞を薬剤選択後、細胞を回収し、RT-qPCRを行いKD効率を算出したところ、すべてのshRNAが有意に発現を低下させることが確認できた (Fig. 10c). そこで、これらのレトロウイルスをHAT-bsMEFに感染後、Mid-K条件下でリプログラミングを行ない、およそ20日後、*Hdac6*に対するSNP cDNA typingにて、転写再開の評価を行った. 結果、*Kdm1a*, *Nelfa*, *Otx2*をKDすると、*Hdac6*におけるXiからの転写が増加した、つまり転写の再開が亢進した (Fig. 10. d). したがって、KDM1A, NELFA, OTX2が転写再開を阻害することが示唆された.

ここで、転写の再開はリプログラミングに伴い起きる現象であるため、上述の遺伝子が転写再開を阻害する上で、リプログラミングを阻害するかどうか確認した. リプログラミングの進行評価は、多能性マーカーである*Cdh1*, endogenous *Oct4*, *Rex1*に対するRT-qPCRで行った. *shKdm1a*, *shNelfa*はendogenous *Oct4*, *shOtx2*は*Rex1*の発現を有意に下げたが、endogenous *Oct4*, *Rex1*の発現は完全にリプログラミングされたiPS細胞と比べると低いため、KDM1A, NELFA, OTX2による転写再開の阻害は、リプログラミング阻害によるものではないと結論した (Fig. 10e).

### 3.10. KDM1A による転写再開の阻害

Fig. 9 で示したように、Xtreme から開始する転写の再開には、Xi の立体構造の変化が関わる可能性が考えられる。そこで、KDM1A, NELFA, OTX2 の中でも特に、エピジェネティクス制御に関連する KDM1A が転写の再開を引き起こす機構に興味を持ち、その分子機構を解析することにした。HAT-bsMEF に対して Low-K, Mid-K のそれぞれの条件でリプログラミング誘導を行い、転写の再開が起きる前後の細胞を回収した (Fig. 11a)。それぞれからクロマチンを抽出し、アレルを読み分けながら KDM1A に対する ChIP-seq を行った。

Xtreme 周辺における結合を見ると、Xi と比べ Xa で多く KDM1A が結合しており、その結合は Low-K より Mid-K でより少なかった (Fig. 11b)。また、Xtreme 領域中ではその周りと比べ、Xi, Xa 共に、KDM1A が比較的多く結合していた (Fig. 11b)。そこで、Xi において転写再開が始まる Xtreme における KDM1A の結合の特徴を明らかにするために、Xa に対してノーマライズを行い、さらに、promoter, gene body, enhancer の3つの領域に分けて、KDM1A がどの領域に多く結合しているか解析した (Fig. 11c)。その結果、Mid-K では、Low-K と比べて、Xtreme における promoter, gene body への KDM1A の結合が増加していた。ここで、Fig. 11a で示す Mid-K の転写状態は Fig. 8d では、Mid-K(2) D22 くらいの段階にあたる。このときの Xtreme における転写状態をヒートマップで確認すると、Fig. 7b のように、Xtreme の中でも、転写の再開が起きていない遺伝子が存在する。そこで、Xtreme の中でも、転写の再開が早かった7つの遺伝子 *Gpkow*, *Wdr45*, *Gm45208*, *Tfe3*, *Hdac6*, *Wdr13*, *Ftsj1* についてのみ同様の ChIP 解析を行うと、Low-K では MEF と比べて KDM1A の結合がすべての領域で増加するが、さらにリプログラミングが進んで Mid-K になると、enhancer と promoter において KDM1A が存在しなくなることが明らかとなった (Fig. 11c)。

このように、転写の再開と同時にその遺伝子の promoter, enhancer 領域から KDM1A が除去されることから、KDM1A は転写再開を阻害しており、それが除去されることで転写が始まる可能性が示唆された。これは、Fig. 10d の *shKdm1a* が転写の再開を阻害するという結果と矛盾しない。

### 3.11. KDM1A 関連複合タンパク質の阻害による転写再開への影響

KDM1A はリジン脱メチル化の酵素作用を持つ一方で、DNA 結合ドメインを持たずに、様々なタンパク質と複合体を作ることもよく知られており、タンパク質をリクルートするためのプラットフォームとしても重要であると考

えられている (Reviewed in Zheng et al., 2015)<sup>56</sup>. KDM1A に存在するタワードメインは、タンパク質のリクルートに使われており、ここを介して、特に KDM1A と共局在することが報告されるのが、HDAC1, 2 である (Lee et al., 2015)<sup>57</sup>. HDAC1, 2 は、近年、XCI において *Xist* の下流でサイレンシングに働くことが報告された、HDAC3 と同じ HDAC1 family に属する、ヒストン脱アセチル化酵素である (McHugh et al., 2015; Moindrot et al., 2015)<sup>10,58</sup>. そこで、これら HDAC が KDM1A にリクルートされ、転写の再開に関係する可能性があると考え、HDAC を shRNA により KD した際の、転写再開への影響を観察することにした。

まず、*Hdac1, 2, 3* に対する shRNA は、有意にその発現を低下させた (Fig. 12a). これら shRNA 産生レトロウイルスをそれぞれ HAT-bsMEF に感染、感染細胞を薬剤選択後、Mid-K 条件でリプログラミング誘導を行った。HDAC は pluripotency と関わるという報告があるように (Jamaladdin et al., 2014; Saunders et al., 2017)<sup>59,60</sup>, これらに対する shRNA は有意に多能性マーカーの発現を低下させたことから (Fig. 12b), shRNA は標的遺伝子を正しく KD したと考えられる。リプログラミング後およそ 20 日で転写の再開を評価すると、HDAC1 family の中で転写再開を促進する shRNA は一つも存在しなかった (Fig.12c). HDAC1, 3 が XCR を促進すると報告されていることを踏まえると (Janiszewski et al., 2019)<sup>28</sup>, HDAC は、リプログラミングの促進や XCR の促進には関与するものの、XCR の開始には直接関与していないことが考えられた。

### 3.12. KDM1A 酵素活性阻害による転写再開の促進

KDM1A は、リジン脱メチル化酵素として主に H3K4me1/2 の脱メチル化に働く (Reviewed in Zheng et al., 2015)<sup>56</sup>. H3K4 メチル化は転写促進の修飾であると考えられ、Xi ではあまり存在しないことが知られている (Heard et al., 2001)<sup>61</sup>. 私は、Xi と H3K4 メチル化との関連から、*Kdm1a* 発現抑制によって H3K4 メチル化が蓄積するために転写の再開が亢進しているのではないかと考えた。そこで、この仮説を確かめるために、KDM1A の酵素活性中心に対する阻害剤 Tranylcypromine (TCP) を用いてリプログラミングを行い、KDM1A の酵素活性の転写の再開に対する影響を観察することにした。Fig. 13a で示すように、HAT-bsMEF に、リプログラミングを行う 7 日前から TCP 処理を始め、リプログラミング誘導中も常に TCP を添加しながら培養を行い、リプログラミング 20 日目に細胞を回収し評価を行った。



KD 実験と同様の、Mid-K 条件の場合、リプログラミング 20 日後、TCP 処理によって B6 からの転写が有意に増加した (Fig. 13b, 右下). つまり、KDM1A によるヒストン脱メチル化が、転写再開のバリアとなっていたことが示唆された. さらに、TCP の添加は、多能性に影響を与えなかった (Fig. 13c, 下). したがって、TCP は多能性を付与することで転写の再開に寄与するわけではないということが分かった. また、TCP を添加後、リプログラミング誘導を行わないと転写の再開は起きないことから (Fig. 13b, 左)、KDM1A 以外にも転写再開を阻害するものは存在しており、リプログラミングに伴ってそれらも取り除かれる必要があることが予想される. 実際、Mid-K より多能性誘導の低い Low-K 条件では、TCP の添加は転写の再開に影響していない (Fig. 13b, 右上).

以上から、KDM1A は、その酵素活性により、リプログラミングを阻害することなく転写再開を阻害することが明らかとなった.

## 4. 考察

### 4.1. 本研究の独自性

本研究では、XCR が開始する箇所を特定し、さらに多能性との関連が報告されてこなかった KDM1A が XCR に関わることを明らかにした。これを可能にしたのは、3S reprogramming system によりリプログラミングを遅らせ、リプログラミング初期の細胞を回収できたことである。Janiszewski ら<sup>28</sup>は、リプログラミングにおける XCR において、転写再開が早く始まる遺伝子を early gene とし、early gene は escapee の横に多く存在することを示している。しかし本研究と比べて、early gene に分類された遺伝子の数が多く分布が分散していたために、X 染色体全体として early gene の集まる領域を特定することが困難だったようである。彼らの研究と本研究ではどちらも、X 染色体全体における遺伝子転写プロファイルの獲得のために RNA-seq を行っているという点では共通しているが、異なる点は2つある。

まずリプログラミングを行った細胞の違いである。彼らは B6 と Cast のハイブリッド細胞を用いたのに対し、本研究では、さらに多くの SNP (約 50-100 に1つ) を持つと考えられる (Zhang et al., 2005; Mahler et al., 2008)<sup>62,63</sup>、B6 と Sp のハイブリッド細胞を用いたため、彼らが 150 程度の遺伝子を解析したのに対し、本研究は、400 以上の遺伝子を対象とすることができた。

次に、RNA-seq を行う細胞を回収する方法が異なっている。彼らは、リプログラミングにおける XCR を検出するにあたり、リプログラミング誘導後、まず細胞の均一性を担保するために、FUT4+の細胞を FACS により選出し、*Syn1/Timp1* 領域に挿入した GFP からの蛍光発現により XCR の評価を行った。彼らが利用した *Syn1/Timp1* 遺伝子は、私の研究結果では、比較的転写再開の早い遺伝子であるため、GFP の転写から翻訳のタイムラグを考えなければ、本研究と同じくらいのタイミングで XCR が起きてすぐの細胞を回収できたはずである。しかし、彼らの系ではリプログラミングのスピードが早かったために、XCR が起きてすぐの細胞を得ることが困難であったと考えられる。一方、本研究では比較的均一な細胞集団の誘導が可能である 3S reprogramming system を用いて、あえて多能性の低い細胞を作成し、*Lamp2*, *Msn* の Xi からの転写により、RNA-seq を行う細胞を選別している。

これらの違いにより、本研究では XCR 開始後の各段階を彼らより細かく観察でき、彼らの研究では特定が不可能であった XCR 開始領域、Xtreme の特定が可能となったと考えている。

さらに、本研究で確認された重要な知見として、*Xist* の発現を維持したまま転写の再開が起きること、転写の再開がリプログラミングの初期に起きる事が挙げられる。このような発見が可能となったのは、転写の再開を感度良く検出できたことによると考えられる。序章でも述べたように XCR はこれまで、免疫染色による転写抑制修飾の解除や、RNA FISH による *Xist* cloud の消失により判断されることが多かったが、その時期は正しく転写の再開とリンクしているわけではなかった。RNA FISH を用いて、X 染色体上 *Pgk1*, *Mecp2*, *Atrx* のような代表的な遺伝子による発現で評価されることもあったが (Pasque et al., 2014; Tomoda et al., 2012)<sup>25,64</sup>, 本研究ではこれらの遺伝子は比較的再活性化が遅い遺伝子群にあたり、XCR 開始直後というよりは、開始後の伝播の検出に適していると考えられる。本研究では、*Pgk1*, *Mecp2*, *Atrx* より再活性化の早い *Lamp2* や *Msn* を指標として XCR の検出を行っていたことが、以上のような発見につながったと考える。

また、以下の 4.2. で詳述するが、本研究はこれまで共役すると考えられてきた XCR が Pluripotency と関連しない可能性を示唆する。このように、本研究が XCR の開始極初期の観察を可能にしたことにより、これまで報告されてきたものとは異なる知見が見つかると考えられ、この分野における議論を更に活発化させることが期待される。

## 4.2. XCR と多能性の関連

XCR はリプログラミングの後期に起きると言われ (Pasque et al., 2014)<sup>25</sup>, XCR の機構には複数の多能性関連転写因子の関連が報告されてきた (Nichols et al., 2009)<sup>65</sup>. これに対して、本研究では *Lamp2* や *Msn* における転写の再開と同時に、*Rex1* の発現上昇は見られないが、*Cdh1* の発現は増加していく様子が観察されたことから、XCR がリプログラミングの初期に開始することが示唆された (Fig. 5d). 先述したとおり、これはこれまでの研究でも観察されていた現象であり、その要因として、本 XCR 検出系が従来の RNA FISH や免疫染色よりも感度が高い系である事が考えられる。近年、本研究同様に、Allele-specific RNA-seq を用いてリプログラミングにおける XCR の解析を行ったグループも同様に、転写の再活性化は比較的初期に起きることを報告している (Janiszewski et al., 2019)<sup>28</sup>.

そこで具体的に、XCR が起きる時期と多能性マーカーとの関連を RNA-seq の結果をもとに探ってみたところ、*Esrrb* や *Nanog* 等の、これまで XCR に関連すると言われてきた遺伝子の発現上昇が見られる前に Xi からの転写が開始し

ていた。一方、mesenchymal epithelial transition (MET) 関連遺伝子である *Cdh1*, *Ocln*, *Epcam* の発現上昇, *Cdh2*, *Snail*, *Zeb2*, *Twist1* の発現抑制 (Skrypek et al., 2017)<sup>66</sup> と関連が見られることより, MET とほぼ並行して転写の再開が起きると考えられた (Fig. 7c).

リプログラミングの過程では, MET と同時期に細胞内代謝に大きな変化が起きることが知られている。MEF 等の間葉系細胞では酸化的リン酸化による ATP 合成が活発に行われる一方, 多能性幹細胞においては ATP 産生のために解糖系を利用する (Nishimura et al., 2017)<sup>67</sup>。多能性幹細胞で主に解糖系による ATP 産生が行われる理由として, 多能性獲得や維持に必要なエピジェネティクス修飾を行なう際に解糖系で生じる副産物が必要であるからと考えられる。例えばヒストンのアセチル化に利用されるアセチル CoA (Moussaieff et al., 2015)<sup>68</sup> やヒストンの脱メチル化に作用するアスコルビン酸 (Wang et al., 2011)<sup>69</sup> などがあり, どちらも転写の活性化を通して多能性の維持に関連するものである。以上より, MET と同時期に XCR が開始する理由として, MET と同時期に解糖系が活性化することで産生された以上のような分子が, 転写促進に関連するエピジェネティクス修飾付加を促進することにより XCR の開始が引き起こされるためと考えられる。

また, KDM1A 阻害剤である TCP で処理しながらリプログラミングを行った際にも, Low-K では見られなかった転写の再開が Mid-K では見られた (Fig. 13b)。TCP は多能性マーカーを変化させないため (Fig. 13c), KDM1A の阻害が多能性とは独立して転写を促進すると考えた。しかしここで, Low-K と Mid-K では誘導された多能性の程度が異なっており, endogenous *Oct4*, *Rex1* の発現は大きく変わらない一方, Low-K での *Cdh1* の発現は Mid-K での半分程度となっている。ここでも, XCR が起きる頃には *Cdh1* の発現上昇が見られており, XCR は MET と同時期に起きることが示唆される。

### 4.3. Xtreme の位置の必要性

XCI では Xi から *Xist* が発現し Xi 全体に広がっていく過程で, *Xist* RNA が最初に結合する領域が *Xist* entry site (XES) として同定されている (Engreitz et al., 2013)<sup>70</sup>。XES は, 立体構造的に *Xist* と近位であることから, XCI が伝播する過程では, *Xist* が近位の遺伝子に広がりながら転写不活性化を担うタンパク質をリクルートすることで, 不活性化状態を広げていくと考えられてきた。この後, Hi-C により染色体全体における立体構造の解析が可能になると, 遺伝子配列の異なるマウスを掛け合わせ得られた ES 細胞やそこから分化させた NPC に

において、SNPの違いを利用しアレルを読み分けながらHi-Cを行うことで、Xi、Xaの立体構造の違いが明らかとなった。Xiでは、50 Mb付近に存在するsatellite DNA配列を堺に構造が別れており、前後にそれぞれmega domainを形成する(Deng et al., 2015; Giorgetti et al., 2016)<sup>53,40</sup>。その際、不活性化を受けないescapee遺伝子は、立体構造的に外側に配置される。

これに対して、XCRにおいては、escapeeの横の遺伝子から転写が比較的早く再開することが報告されており(Janiszewski et al., 2019)<sup>28</sup>、escapeeはXiの立体構造の外側に存在しアクセスしやすいためであると考えられる。しかし、X染色体上に比較的散らばっているescapeeの中で、どこから転写の再開が起きるのかは未だ不明のままであった。本研究では、170 MbのX染色体のうち、セントロメア近傍の0.5 Mbの領域から転写再開が始まることを明らかにした。このXtreme領域では、Xiの時点で他よりもオープンなクロマチン構造を持ち、さらに一つのTADに存在することから、同様の遺伝子制御を受けることが示唆される。

Marksら<sup>71</sup>も、この領域が一つのTADに存在していることを示している。彼らは、遺伝子配列の異なる2種類のマウスをかけ合わせて得たES細胞にて片方のX染色体のみにおいて*Xist RNA*を抑制する*Tsix RNA*の発現を止め、NPCへの分化誘導を行うことで、そのX染色体におけるXCIの誘導を行い、単一TAD内に存在するXtreme領域では、他の領域と比べて転写抑制が生じづらかったことを報告した。

また、Xtremeは1つのTADに存在するため、同様の遺伝子制御を受けると考えられたが、実際は、Xtremeの中でも転写の再開が早い遺伝子とそうではない遺伝子が存在していた。例えば、Fig. 7bで*Tfe3*と*Hdac6*の間は青色で示されており、B6からの転写が少なかったことが分かる。Marksら<sup>71</sup>も、一つのTADに存在しているXtreme中の遺伝子の中でも、*Hdac6-Ebp*は比較的の不活性化を受けやすい遺伝子群であることを示している。

さらに、Xtremeにおける転写状態とKDM1Aの結合にも関連が見られた。Fig. 6gに示した7つの遺伝子は、より転写再開が早く、転写再開と同時にKDM1Aの結合が解除される一方、Xtreme全体ではKDM1Aが存在していた。X染色体の0.5 Mbを占めるXtremeは全体からみたら限られた領域であり、単一のTADに含まれていることから、同様の遺伝子制御を受けていることが予想された。しかし実際は、その中でも細かい遺伝子制御の調整が行われており、その調整機構にKDM1Aは関わっているようである。これに関して考えられる機構に関しては、4.5に詳述する。

本研究では、Low-K、Mid-K(1)、Mid-K(2)の3つの条件を用いて転写の再開が開始する領域を一つに特定したが、X染色体上で再活性化が伝播していく順

序は単一ではない可能性がある。例えば、Fig. 5cにおいて、Low-K, Mid-K(1)では *Msn*, *Lamp2* 座位における転写再開状況はほぼ同じように見えるが、Mid-K(2)では、*Lamp2* よりも *Msn* のほうが転写の再開が早いことが読み取れる。Fig. 6c の PCA 解析は、X 染色体上のすべての遺伝子の B6 gene frequency をもとに作成しているが、Low-K, Mid-K(1)と Mid-K(2)で、進んでいく方向が少し異なっており、再活性化を受けている遺伝子や程度が異なっていることが予想される。このように、伝播する順序に違いが出るのは、XCI が立体構造を介して *Xist* から近接するところへと不活性化が始まっていくように(Engreitz et al., 2013)<sup>70</sup>, XCR でも立体構造を介して活性化状態の伝播が起きているためであると考えられる。

最後に、ペリセントロメア近傍の Xtreme から XCR が開始する意味について考察した。オープンなクロマチン構造を持つ Xtreme が構造的ヘテロクロマチンの代表格であり凝縮した構造を持つセントロメア近傍に存在していることは、一見矛盾しているように思える。

セントロメア近傍領域はペリセントロメアヘテロクロマチン (Pericentromeric heterochromatin; PHC) と呼ばれる。PHC は体細胞において H3K9me3 を代表とする転写抑制修飾に覆われたクローズなクロマチン構造を持つことを特徴とし、PHC 中に存在するサテライト DNA の転写も抑制されている。体細胞では H3K9me3 の付加に関わる Suv39h1/2 の KD により PHC 中のサテライト DNA の転写が促進され、染色体誤分離を引き起こすことで、適切な染色体分離には PHC を不活性化し、クロマチンをクローズ状態に維持することが重要であると考えられる。一方、高い多能性を持つ ES 細胞の PHC やヘテロクロマチンは体細胞と比べ、H3K9me3 レベルも低くよりオープンな構造を持つことが知られている。また、ESC においては Suv39h1/2 を KD するとサテライト DNA の転写は促進するが、染色体の誤分離にはつながらない。このように ESC では PHC の構造変化と転写の促進には関連があり、PHC の構造変化は多能性獲得に重要であると予想されてきた。実際、多能性関連転写因子の一つである NANOG は ES 細胞にて、PHC やヘテロクロマチンに直接結合し構造変化を引き起こす役割を持つことが報告されている (Novo et al., 2016)<sup>72</sup>。Xtreme は PHC 近傍に位置し、もともとオープンな構造を持つ。NANOG がリプログラミングの過程で PHC に結合する際、近傍であるがゆえに Xtreme にも NANOG が結合し、クロマチン構造をオープンにしている可能性がある。これに関連して、ES 細胞の Xtreme における NANOG の結合を ChIP-Atlas により探索したところ、Xtreme 中の全遺伝子の 80%以上の TSS 付近に結合が見られた。また、NANOG によるクロマチン構造変化において、NANOG と協調して働く分子としては、

クロマチンリモデリングタンパク質の一つである CHD 等の関与が考えられている (Gaspar-Maia et al., 2011)<sup>73</sup>.

#### 4.4. ヒトにおける Xtreme

Fig. 9d で示すように、マウスの Xtreme 領域と相同となる領域は、ヒトでは Xp11.23 に存在している。マウスと同じ順番で同様の遺伝子が並ぶことから、この領域がヒトにおいても XCR の開始点となるかもしれない。これに関して、ヒト Xp11.23 を含む領域の欠失・重複はともに XCI に異常を引き起こし、以下のような疾病につながる事が報告されている。

Xp11.23 領域の欠失は通常、女性に蛇行性血管腫を引き起こす (Houge et al., 2008)<sup>74</sup>。蛇行性血管腫は Goltz 症候群に伴う症状であると考えられ、Goltz 症候群においては、Wnt シグナルの制御因子である *PORCN* (Xtreme 中に存在) の欠失や変異に起因すると考えられる (Houge et al., 2008)<sup>74</sup>。興味深いのは、Xp11.23 が欠失した X 染色体は、特異的に不活性化を受けることが報告されていることである (Blinkenberg et al., 2007; Houge et al., 2008)<sup>75,74</sup>。このようなヒト女性細胞中においては、通常の X 染色体が一本と Xp11.23 が欠失した X 染色体が存在することとなる。ヒトではマウス同様 3 回の XCR が起きる。発生の過程における本疾患の病態機序を考えてみると、ランダム型 XCI 直前の XCR においては父親由来、母親由来の両方の X 染色体が再活性化されるが、その後のランダム型 XCI においてランダムに XCI が起こらず、常に Xp11.23 欠失の X 染色体が常に不活性化を受ける、ということが起きていると推測される。つまり、Xtreme を含む Xp11.23 領域の存在が不活性化を受けにくくしており、これが Xtreme 配列の存在によるものと考えれば、Xtreme が存在することで欠失のない X 染色体が再活性化されていると考えられる。これは、Xtreme の存在が XCR を促進することを示唆する。

一方、Xp11.23 の重複は知的障害や言葉の遅れ、脳波異常などを引き起こす (Arican et al., 2018)<sup>76</sup>。Xp11.23 領域に存在する *SHROOM4*, *KDM5C*, *IQSEC2*, *HUWE1* (すべて Xtreme 外) の重複は知的障害を引き起こすことが知られている。通常、女性細胞において X 染色体の重複が起きても、XCI 機構により不活性化を受け表現型に現れないことが多いが、Xp11.23 重複が起きると、この部分は特異的に活性化を受けることが報告されている (Arican et al., 2018)<sup>76</sup>。Xp11.23 欠失と同様、発生における病態機序を考えてみると、XCR により両方の X 染色体が活性化された状態からランダム型 XCI が起きる際、Xp11.23 が重複した X 染色体は、Xp11.23 を余分に持つゆえに不活性化の対象となりづらか

ったと考えられる。先程同様、これが Xp11.23 中に存在する Xtreme によるものであると考えれば、Xtreme の存在が XCI を受けづらくする、すなわち Xtreme 配列は活性化状態を維持しやすくすることが予想される。

以上より、ヒトにおいても Xtreme 領域は保存されており、XCR の開始点となる可能性が高いと考えられる。

#### 4.5. 転写再開を引き起こす機構

XCI において、*Xist* RNA がその開始と伝播に必要であることが示される一方、維持には必要ないことが示されている (Brown et al., 1994)<sup>77</sup>。しかし XCR において、転写再開と *Xist* 除去のどちらが先に起きるかは明らかにはなっていない。これに関して本研究では、*Xist* の発現が下がらない状態で転写の再開が起きるといふ現象を観察した (Fig. 5c, e)。これは一見、*Xist* が Xi を覆った状態で転写が開始することを示唆するように思われる。しかし *Xist* は X 染色体上で遺伝子密度の高い領域に多く結合することが示唆されている一方、Xtreme は X 染色体中でもかなり遺伝子密度が高い領域であるにもかかわらず *Xist* の結合は少ない (Engreitz et al, 2013)<sup>70</sup>。つまり、転写の際には *Xist* がすでに外れている可能性も示唆される。*Xist* を結合したままで転写は可能なのか、RNA FISH 等によるさらなる解析が必要とされている。

また、従来行われてきた H3K9me3 や H3K27me3 等の転写抑制修飾に対する免疫染色の結果からは、これらの修飾の解除がリプログラミングの後期に起きることが示唆されてきた。一方、本研究においては、Xi からの転写再開はリプログラミングの初期から中期に起きることが示唆されることより、転写抑制修飾が消去される前に転写は再開することが予想される。

さらに本研究では、KDM1A が XCR における転写の再開を阻害していることを明らかにした。KDM1A の酵素活性を阻害する TCP が転写再開を促進したことより、酵素活性を阻害することが、転写の再開に重要だと結論づけた。

KDM1A が触媒する H3K4me1/2 を含む転写促進に係る H3K4 メチル化は Xi において欠損していることが報告されていることから (Heard et al., 2001)<sup>61</sup>、H3K4 メチル化の付加により転写の再開が始まっている可能性は高い。実際、発生におけるランダム XCI からの XCR の機構では、転写の再開が早い遺伝子と H3K4 メチル化との関連、さらに、H3K27me3 と転写開始が遅い遺伝子との報告がされている (Borensztein et al. 2017)<sup>27</sup>。しかし、KDM1A は多くのタンパク質と複合体を形成することが分かっており、さらに、その複合体により、標的とする基質も異なる。本研究では HDAC が転写の再開を促進しなかったこと



より (Fig. 12c), KDM1A は HDAC とは複合体を形成していない, または HDAC は KDM1A と複合体を形成するが HDAC は XCR を促進しないと考えられる. すでに HDAC1, 3 は XCR を促進するとの報告があることより, KDM1A と HDAC は複合体を形成しないと考えたほうが自然である. しかし, HDAC を KD することにより, 多能性が下がり, XCR 開始に必要な因子が誘導されていなかったことによる結果である可能性もあり, KDM1A による XCR の開始における HDAC の関与は不明である.

MEF または Low-K 状態において KDM1A を阻害しても転写の再開が起きなかったことから, KDM1A が XCR 再開の唯一のバリアでないことは明らかである. しかし, *Cdh1* の上昇が見られる Mid-K 状態では *shKdm1a* が転写の再開を促進したことより, MET と同時期に転写再開に関連する因子が誘導されると考えられる. ただ, その因子が発現するだけで転写の再開が起きるわけではなく, それにより KDM1A が阻害され, H3K4 メチル化が回復することが転写の再開につながるようである.

転写が再開した Mid-K と比べ, 転写再開前の Low-K では, Fig. 6g の 7 つの遺伝子に対する enhancer, promoter への KDM1A の結合が増加していることから (Fig. 11c), 転写再開の前に KDM1A がリクルートされることが必要であると予想される. 上述したように, 転写再開に必要なのは, KDM1A の酵素活性がなくなり, H3K4 メチル化等のエピジェネティック修飾変化が起きることであると考えられるが, その前に転写の再開に必要な因子をリクルートするプラットフォームとしての働きを持つ可能性が示唆される. このように本研究は, KDM1A の除去により転写再開が起きることを明らかにした一方, その機構はまだ不明のままであるため, 今後は実際に, KDM1A にはどのような複合体を作り, ヒストン修飾などにどのように影響するのかを明らかにしたい.

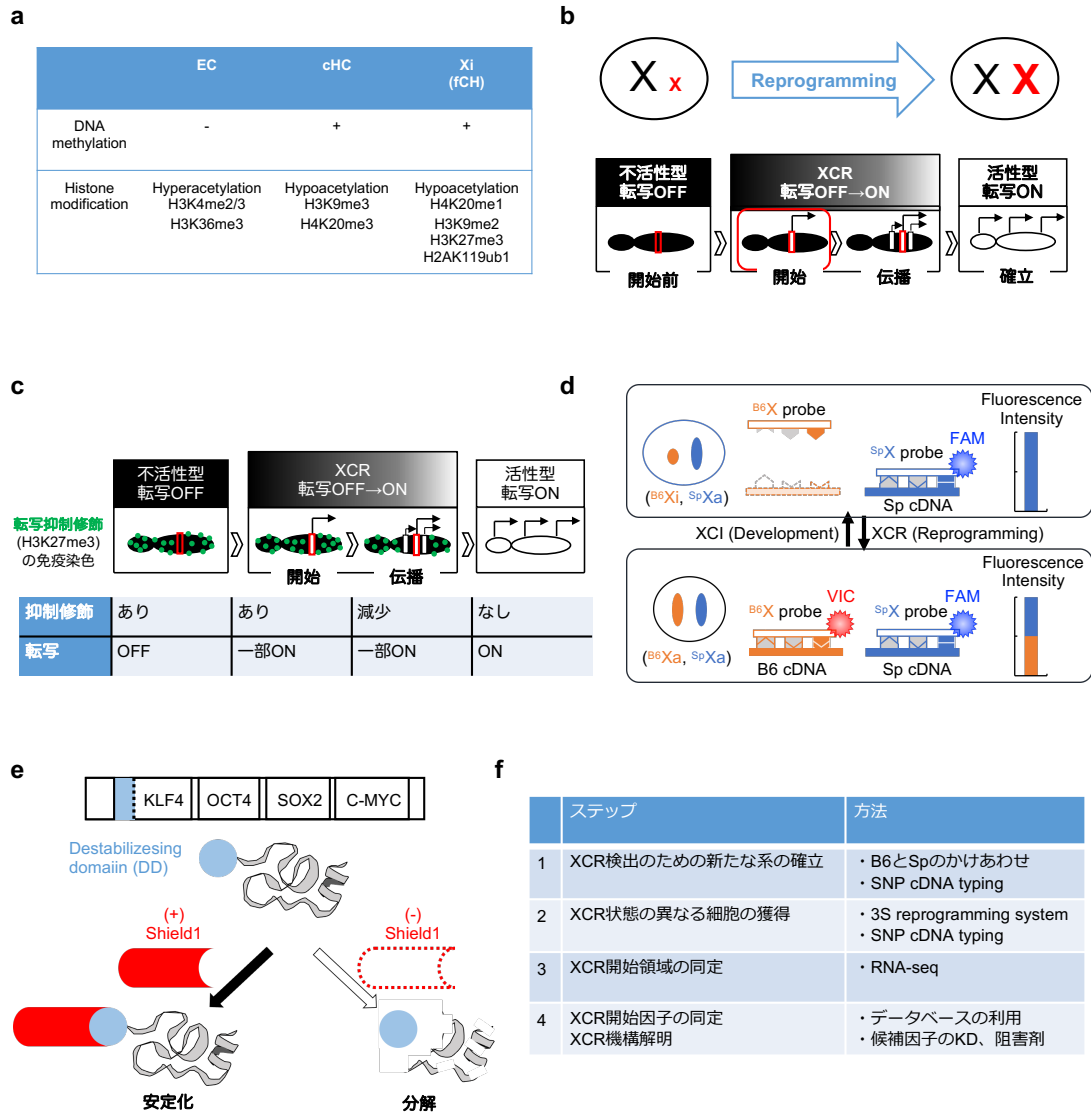
本研究の結果とこれまでの知見から, KDM1A が XCR を引き起こすモデルを Fig. 13d にまとめた. XCR の開始では, MET と同時期に誘導されてきた多能性関連因子が, KDM1A に替わって Xtreme に結合し, H3K4 メチル化が付加されることにより転写が再開する, と予想される. なお, Xtreme の中でも特に 7 つの遺伝子から転写が先に再開することより, KDM1A を退かす分子は, 配列特異性を持つ転写因子だと予想される. ChIP-Atlas を用いて, KDM1A が転写に伴い KDM1A が離脱した部位に存在する分子を探索したところ, H3K4me に関わるヒストン修飾タンパク質, CHD4, BRD4 等の染色体構造関連タンパク質の他, NANOG, PRDM15 等の多能性関連転写因子が挙げられた.

Xtreme の次に転写の再開が起きるのは escapee の横に存在する遺伝子であるようだが, 伝播の機構は明らかとなっていない. Xi と Xa において立体構造が変わること, また XCI において立体構造により不活性化状態を広げていくこと

より、XCRにおいても活性化状態を広げていくために、立体構造が関わると思われる。さらに、*Xist* RNA や転写抑制修飾が外れるのも、転写再開の後であることが示唆されるが、それらの順番も明らかになっていない。リプログラミングにおけるXCRを効率よく観察する方法を示した本研究を皮切りとして、詳細な機構が明らかになっていくことが期待される。

5. 図

Fig.1



## Figure legend

### Fig. 1

- a. クロマチン構造と代表的なヒストン修飾  
クロマチン構造により，見られる修飾は異なる(Trojer and Reinberg, 2007 より改変)<sup>2</sup>.
- b. リプログラミングにおける XCR 機構のモデル  
一定の領域から開始し，それがその X 染色体全体に伝播すると考えられている.
- c. 転写抑制修飾を用いた XCR の検出と転写産物の関係  
転写抑制修飾 (Chadwick et al., 2003<sup>32</sup> より改変) は不活性化状態に見られるものであり，転写の再活性化を感度良く検出することは不可能である.
- d. SNP cDNA typing の概要  
TaqMan プローブが B6 または Sp の SNP を特異的に認識して異なる色の蛍光を発するため，理論上，各アレルからの転写比は蛍光の比と相関する.
- e. 3S reprogramming system による KLF4 レベルの制御  
Shield1 が，DD と融合して発現している KLF4 を分解から守る．また，KLF4 レベルは多能性に関連することから，Shield1 濃度に応じた多能性を持つ細胞を誘導できる
- f. XCR の機構を明らかにするための研究の道筋

**Fig.2**

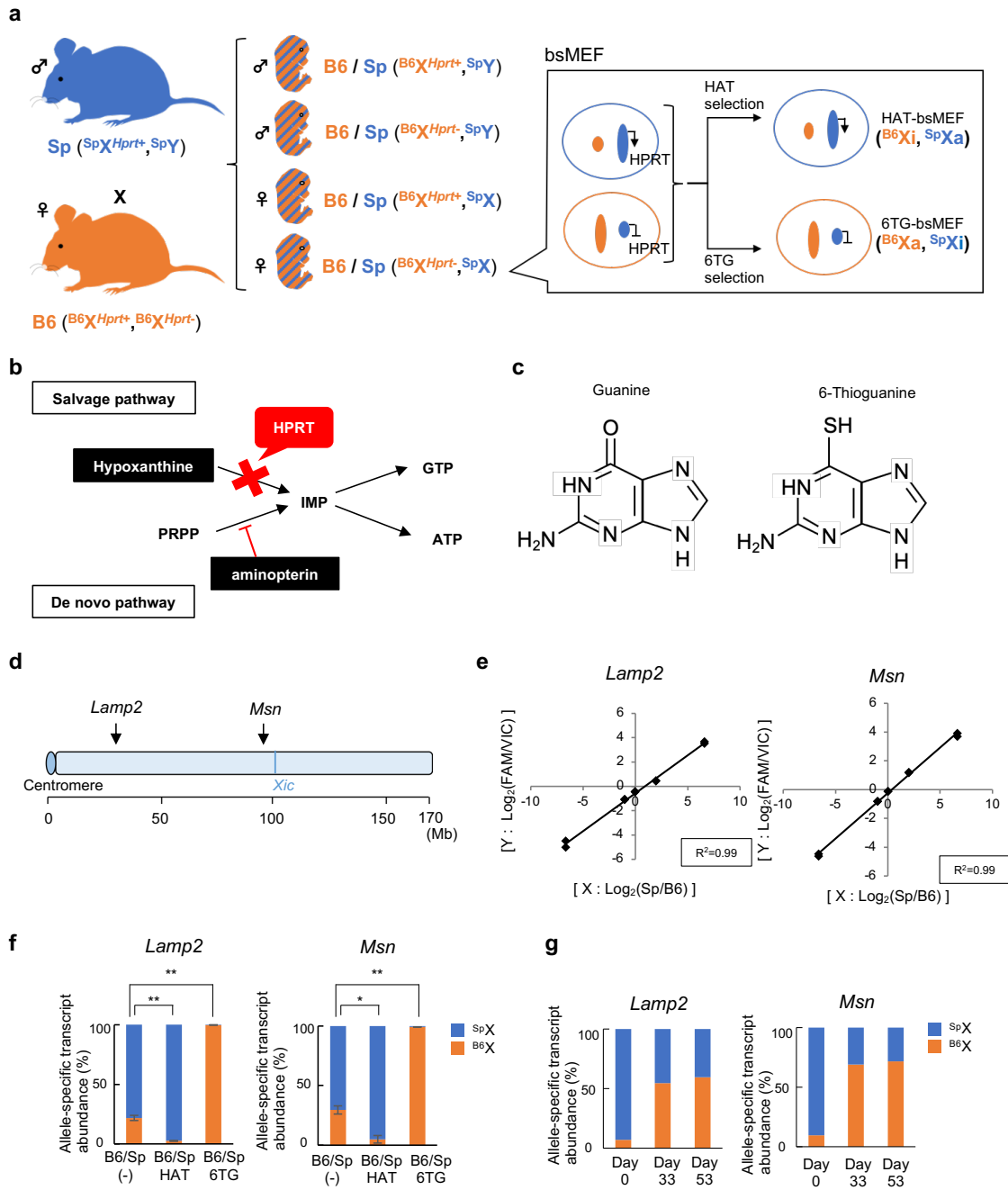


Fig. 2

a. 本研究で用いた MEFhs

*Hprt* をヘテロに欠損したメスの B6 とオスの Sp をかけあわせて得られた胎児から、*Hprt* が欠損しているメスを選び、そこから MEF を得た。さらに、誘導した *Hprt* 変異により母型由来 X 染色体が活性化している細胞は 6-TG 選択により、父型由来の X 染色体が活性化している細胞は HAT 選択により、選択が可能である。

b. HPRT が関わるプリンヌクレオチド合成経路

HPRT は salvage 経路にて IMP の合成を行うため、HPRT 欠損細胞で aminoptetin が De novo 経路を阻害すると、プリンヌクレオチドの合成が不可能となる。

c. Guanine と 6-Thioguanine (6-TG) の構造の比較

d. TaqMan probe をデザインした遺伝子の位置

Xic; X inactivation center

e. SNP cDNA アレル比と probe からの蛍光の相関

*Lamp2*, *Msn* のそれぞれに対して、cDNA を B6 : Sp = 1 : 99, 20 : 80, 50 : 50, 66 : 33, 99 : 1 に混合したものを template として SNP cDNA typing を行い、cDNA 比を X 軸に、各アレルの probe から検出された蛍光の比を Y 軸にプロットした。

f. SNP cDNA typing による薬剤選択の評価

MEFhs を未処理、または HAT, 6-TG で処理後の細胞から RNA を回収し、*Lamp2*, *Msn* でそれぞれ SNP cDNA typing を行った。\* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

g. MEFhs-HAT へのリプログラミングに伴う転写の再活性化 (修士論文のデータ)

MEFhs-HAT に SeVdp(KOSM) ベクターにより、リプログラミングの誘導を行なった細胞から、感染後 33 日, 53 日に RNA を抽出し、SNP cDNA typing を行った。

**Fig.3**

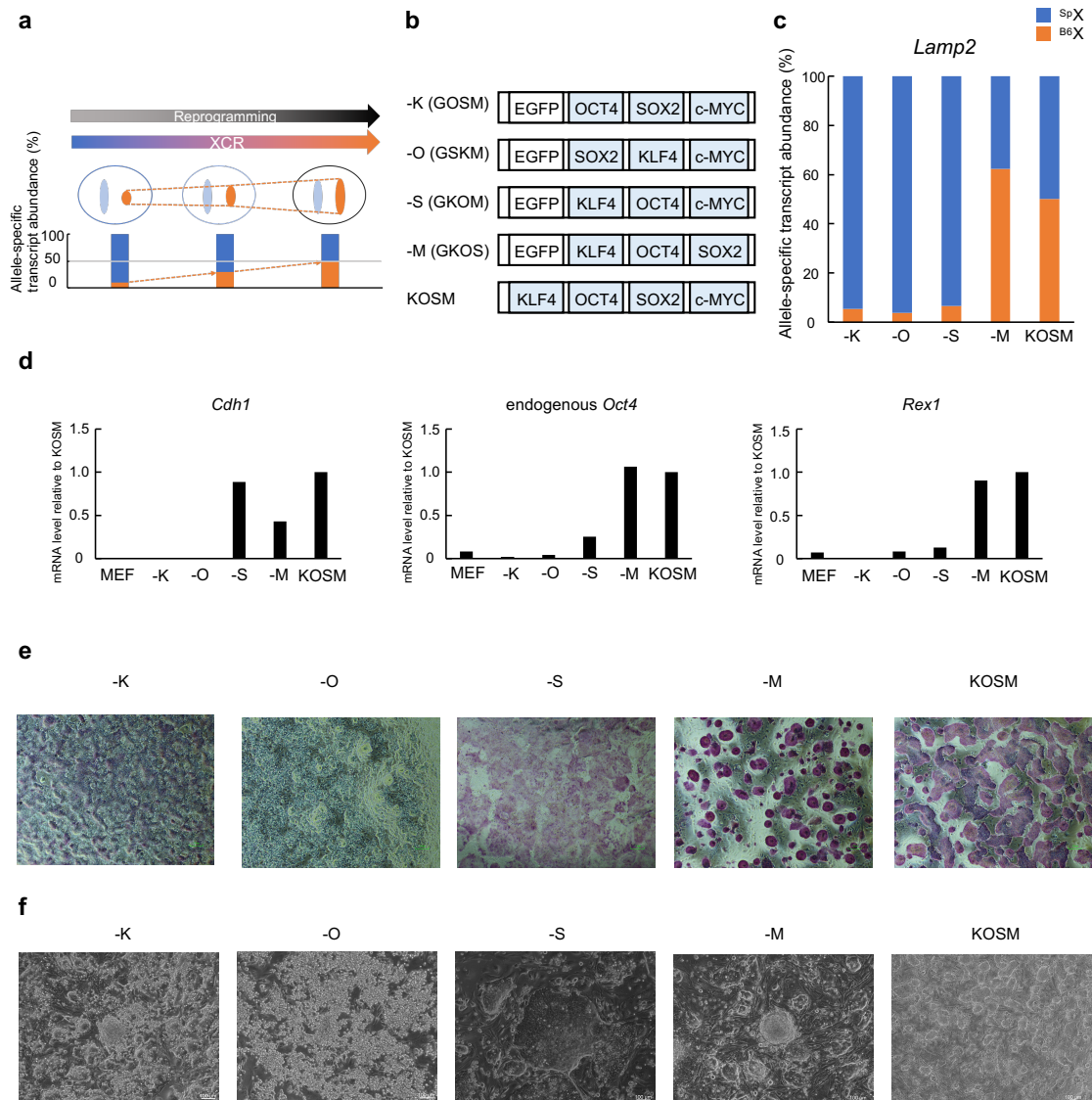


Fig. 3

- a. リプログラミングに伴って起きる XCR の予想図  
Xi からの転写産物が徐々に増え, Xa と同程度になる過程を, SNP cDNA typing により定量し捉えることが可能であると考え
- b. 山中 4 因子のうち, 一つずつの因子を除いた SeVdp ベクターの構造
- c. 各リプログラミング因子が XCR に与える影響  
a に示した SeVdp を用いてリプログラミングを行い 33 日後, RNA を抽出し, SNP cDNA typing を行ない, *Lamp2* における Xi からの転写状態を確認した.
- d. 各リプログラミング因子が多能性に与える影響  
c と同じ cDNA を用いてリプログラミング初期のマーカー *Cdh1*, 中期から後期のマーカー *endogenous Oct4*, 後期のマーカー *Rex1* に対して RT-qPCR を行った.
- e. AP 染色による多能性の評価  
各 SeVdp を用いてリプログラミングを開始した 45 日後, *Cdh1* より低い多能性の評価に使われる, AP 染色を行った.
- f. 各因子を用いずリプログラミングを行った際の形態変化 (リプログラミング 33 日)



**Fig. 4**

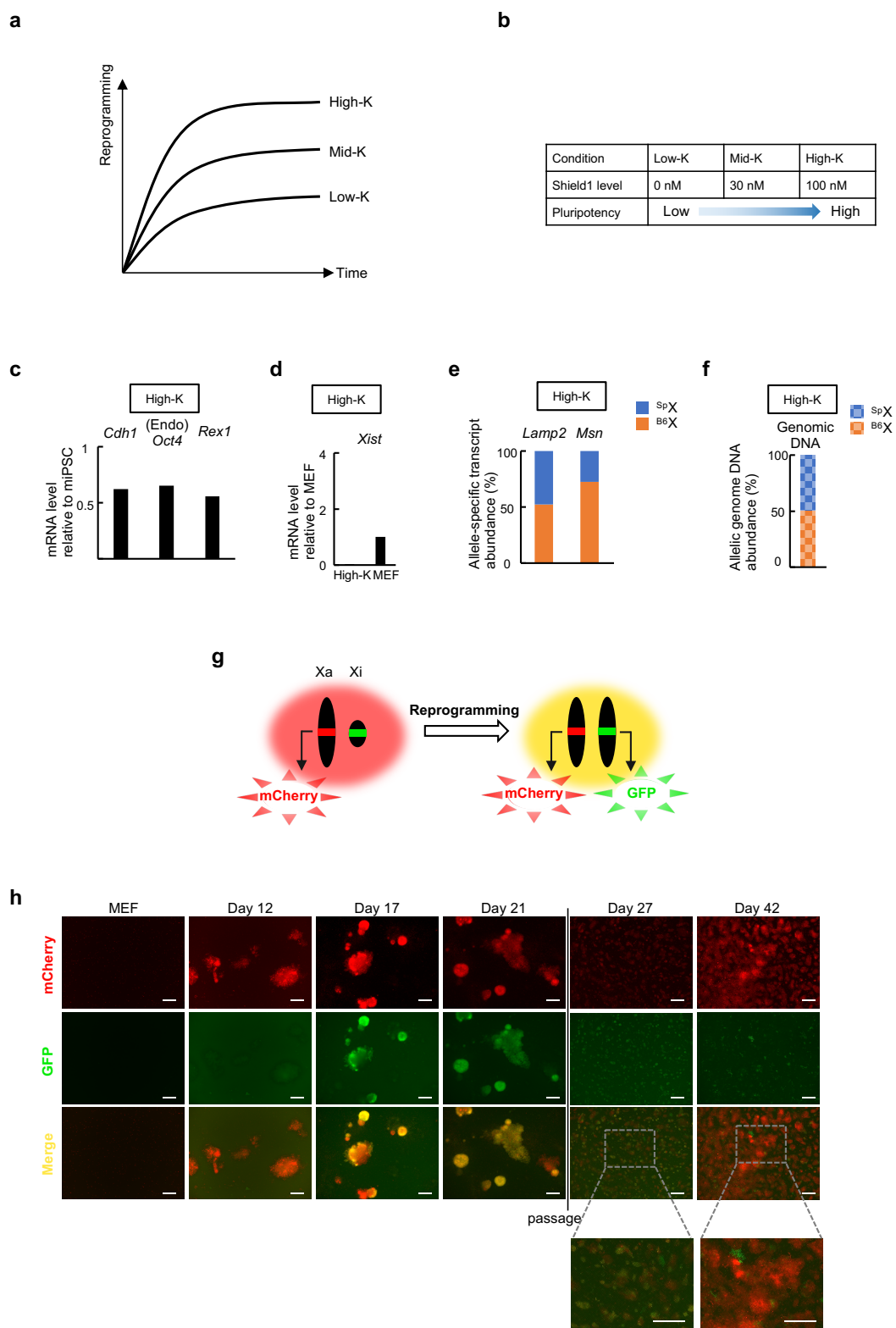
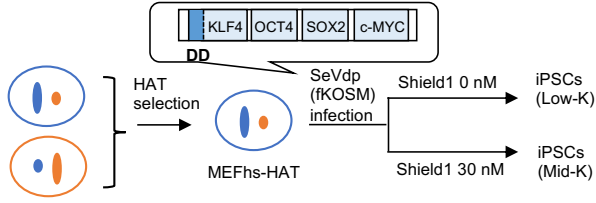


Fig. 4

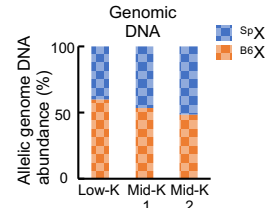
- a. 3S reprogramming system を利用した，多能性の異なる細胞の誘導  
Shield1 濃度を変化させることで，細胞中に存在する KLF4 の量を制御できる．KLF4 レベルは，多能性と相関することが報告されているため，結果，Shield1 レベルに応じた多能性を持つ細胞を誘導できる．
- b. 3S reprogramming system によって誘導される Low-K, Mid-K, High-K
- c. High-K 条件が誘導する多能性  
リプログラミング後 30 日に RNA を回収し，リプログラミング初期のマーカー *Cdh1*，中期から後期のマーカー endogenous *Oct4*，後期のマーカー *Rex1* に対して RT-qPCR を行った．
- d. High-K 条件における *Xist* の発現  
c と同じ cDNA を用いて，B6 *Xist* に対して RT-qPCR を行った．
- e. High-K 条件における転写活性化状態  
c と同じ cDNA を用いて，*Lamp2*，*Msn* で SNP cDNA typing を行った．
- f. ゲノム DNA X 染色体の存在確認  
リプログラミング後 34 日の細胞から回収した genome DNA を template として，*Msn* に対するプローブを用いて RT-qPCR を行なった．
- g. Momiji 細胞による XCR 検出の原理  
X 染色体の *Hprt* 座位にそれぞれ GFP，mCherry をコードする遺伝子が挿入されている．FACS でソートした mCherry+ の MEF にリプログラミングを行うと，GFP の発現により XCR を検出できる．
- h. Momiji 細胞を用いた XCR の検出  
mCherry+/GFP- の Momiji MEF に対して High-K 条件でリプログラミングを行い，その間の蛍光発現を観察した．スケールバーは 400  $\mu\text{m}$  である．

**Fig. 5**

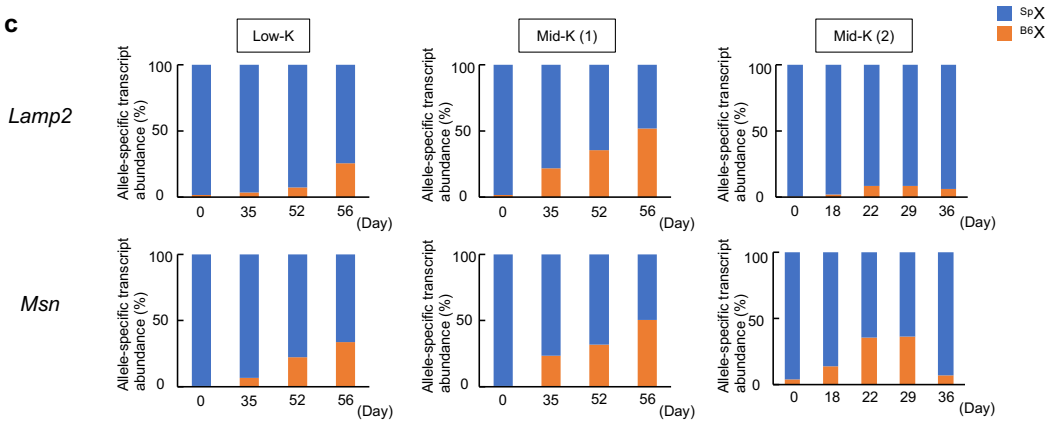
**a**



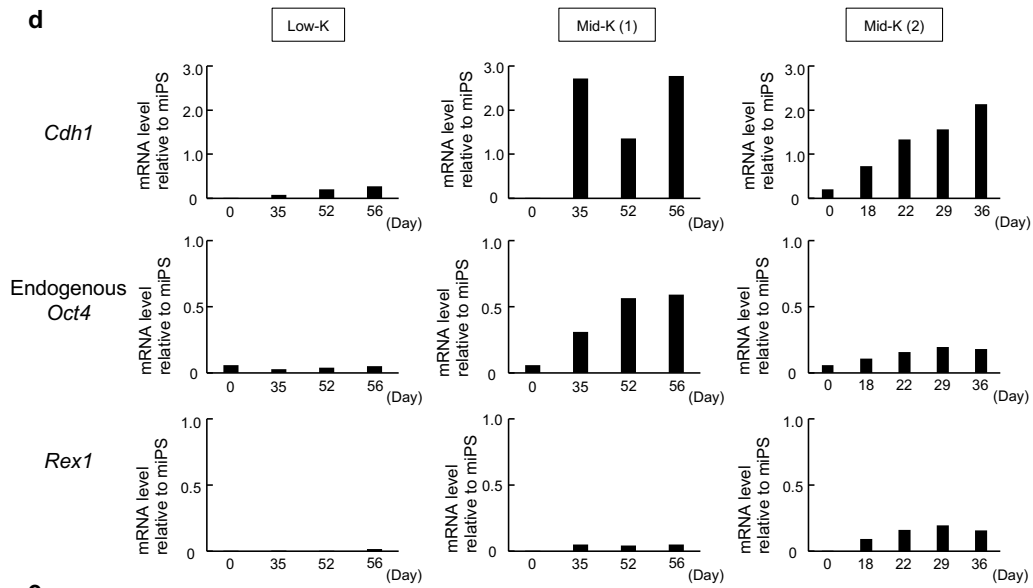
**b**



**c**



**d**



**e**

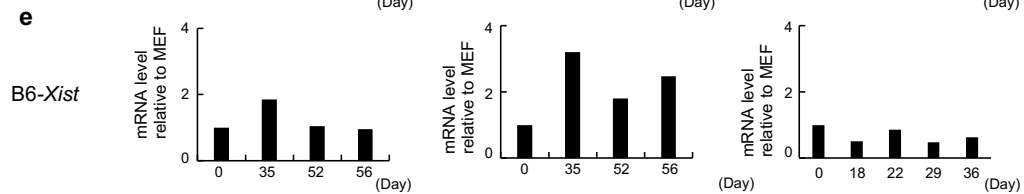


Fig. 5

- a. 3S reprogramming system を用いて異なる程度のリプログラミングを誘導
- b. 各条件におけるゲノム DNA X 染色体の存在確認  
リプログラミング後 37 日の細胞から回収した genome DNA を template として, *Msn* に対するプローブを用いて RT-qPCR を行なった.
- c. 各条件における転写活性化状態  
それぞれの条件でリプログラミングされた細胞に対して, X 軸に示された時期に細胞回収を行い, *Lamp2*, *Msn* において SNP cDNA typing を行った.
- d. 多能性マーカー遺伝子の発現  
b と同じ cDNA を用いて, リプログラミング初期のマーカー *Cdh1*, 中期から後期のマーカー *endogenous Oct4*, 後期のマーカー *Rex1* に対して RT-qPCR を行った.
- e. Xi における *Xist* の発現  
b と同じ cDNA を用いて, B6 *Xist* に対して RT-qPCR を行った.

**Fig. 6**

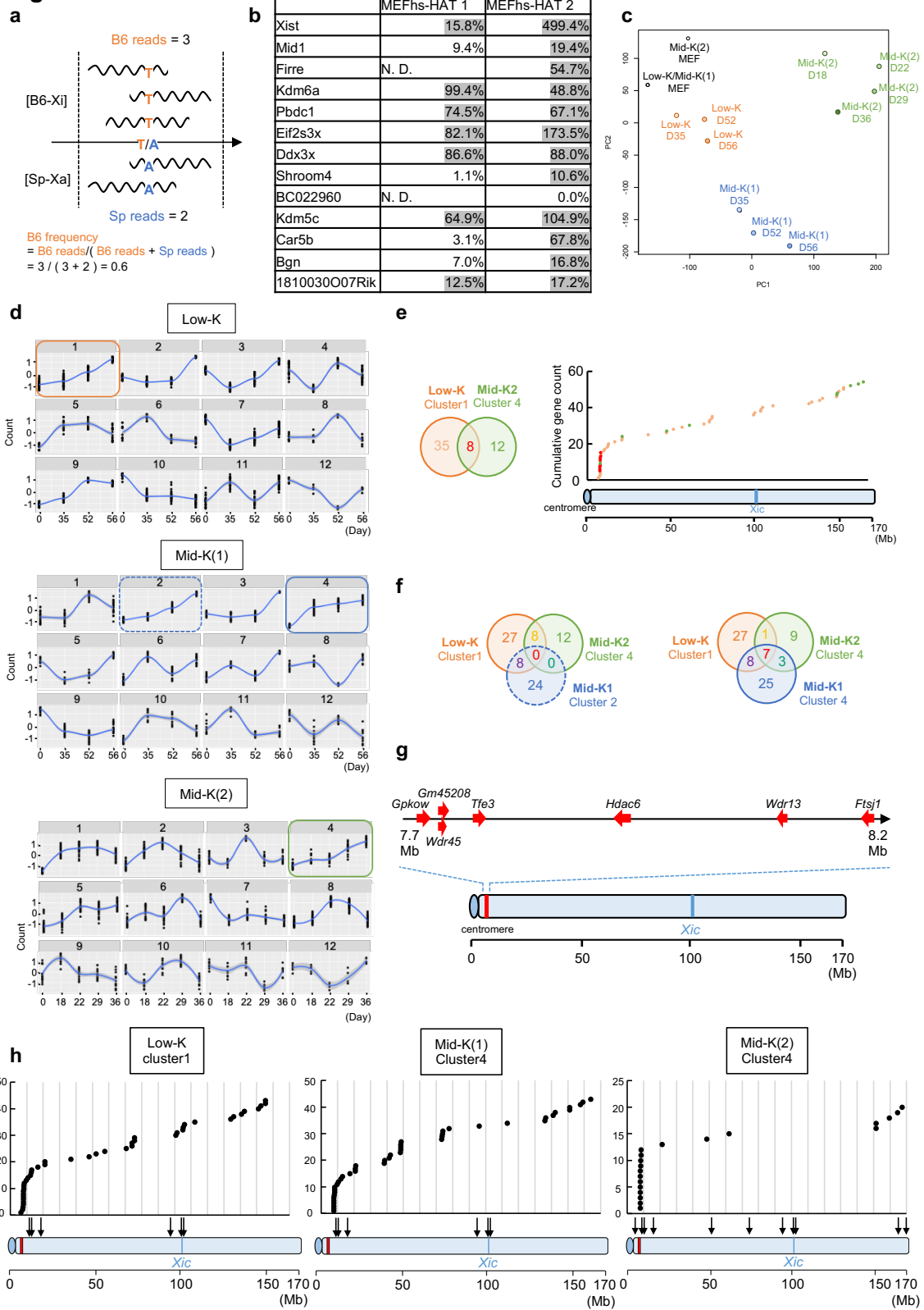


Fig. 6

- a. Allele-specific RNA-seq による B6 frequency の算出  
B6 マウスゲノムを Reference として、マッピングされなかったものが Sp polymorphism として扱われた。各 Polymorphism における B6 reads, Sp reads を確認し、 $B6\ frequency = B6\ reads / (B6\ reads + Sp\ reads)$  として算出した。
- b. Escapee の同定  
MEFhs-HAT に対する RNA-seq の結果から、各遺伝子中に含まれるそれぞれの polymorphism の B6 frequency, Sp frequency を算出し、その遺伝子全体で平均を、B6 gene frequency, Sp gene frequency とし、 $B6\ Frequency / Sp\ frequency$  の値を表に記した。10%を超えるものは、網掛けで示した。
- c. 各遺伝子の B6 gene frequency をもとにした PCA 解析
- d. Xi からの遺伝子発現パターンによるクラスタリング  
各遺伝子の B6 gene frequency をもとに、その変化パターンから 12 のクラスターにクラスター分けを行った。上昇傾向を示すものを、四角で括っている。
- e. Low-K cluster1 と Mid-K(2) cluster4 遺伝子の重ね合わせ  
Low-K cluster1 と Mid-K(2) cluster4 での遺伝子の重複をベン図として左に示した。これらクラスターに含まれるすべての遺伝子の領域を X 軸に、その領域に存在する遺伝子の数を累計として Y 軸に示した cumulative plot である。一つの点が一つの遺伝子を示しており、点の色はベン図で示される各数字の色と対応指定している。
- f. Mid-K(1) cluster1 と cluster4 の比較  
e で示した 2 つのクラスターと、Mid-K(1) で上昇傾向を示す 2 つのクラスター、cluster1 と cluster4 のそれぞれ 3 つを重ね合わせてベン図にした。
- g. 転写の再開が早い遺伝子の分布  
Low-K cluster1, Mid-K(1) cluster4, Mid-K(2) cluster 4 で重複する 7 つの遺伝子の分布を示した。
- h. 転写の再開が早い遺伝子と escapee の位置関係  
それぞれ、Low-K cluster1, Mid-K(1) cluster4, Mid-K(2) cluster 4 に含まれる遺伝子を cumulative plot として示した。また、escapee との相関がわかるように、同じサンプルで escapee として同定された遺伝子の位置を下の図に矢印で示した。

**Fig. 7**

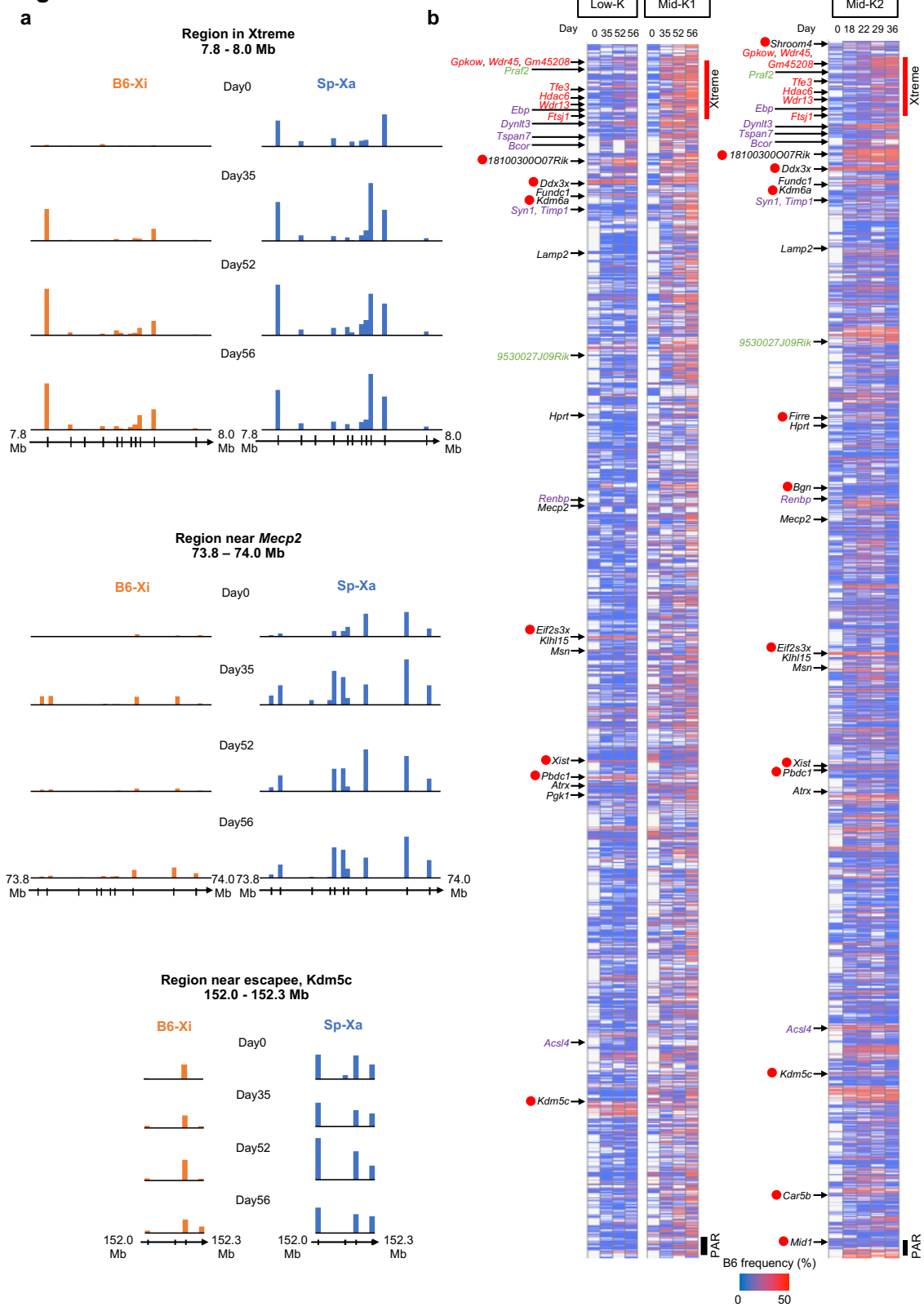


Fig. 7

c

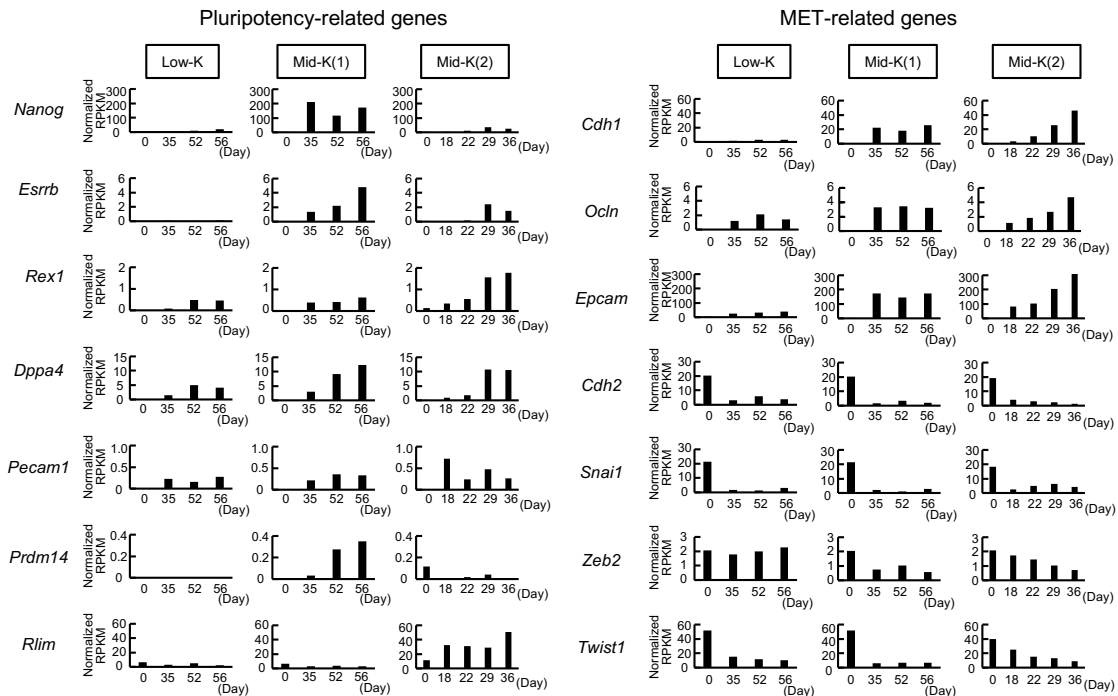


Fig. 7

a. Xa, Xi における実際の read 数の確認

Xa, Xi での実際の read 数を 20 kb 毎に集計し，各領域と対応させて示した。

b. B6 frequency の heatmap

polymorphism 毎に算出した B6 frequency を X 染色体の領域順に並べ，値が大きくなるほど赤色になるようにして heatmap を作成した。なお，先頭に赤い丸がついている遺伝子は，本研究で確認された escapee である。Xtreme, PAR はヒートマップの右側にバーで示した。

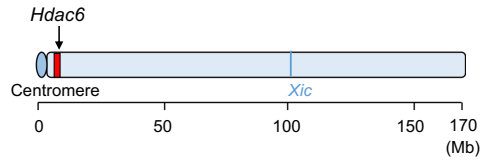
c. 多能性関連遺伝子，MET 関連遺伝子の発現状態

RNA-seq で得られた多能性関連遺伝子，MET 関連遺伝子の発現を Normalized RPKM として示した。

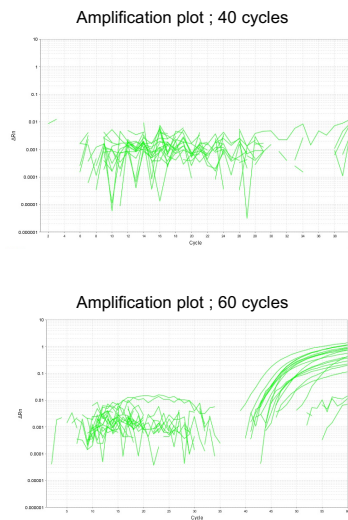


**Fig. 8**

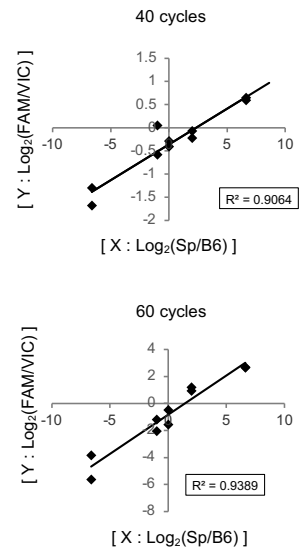
**a**



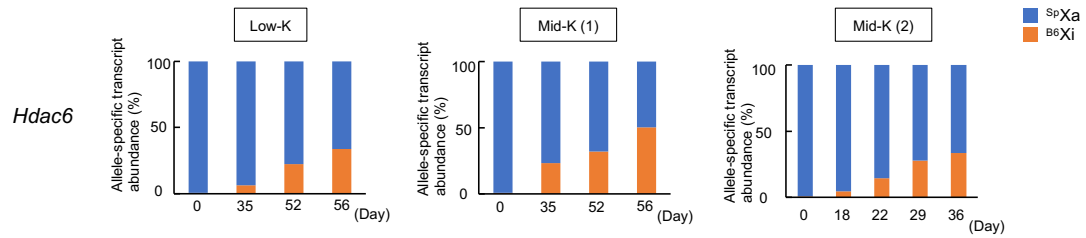
**b**



**c**



**d**



**e**

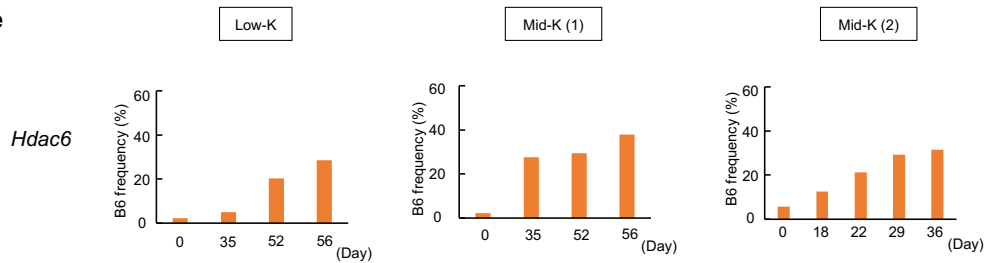


Fig. 8

- a. TaqMan probe を作成した *Hdac6* の位置
- b. *Hdac6* に対する SNP cDNA typing の amplification plot  
B6 cDNA : Sp cDNA = 1 : 99, 20 : 80, 50 : 50, 66 : 33, 99 : 1 を Template と  
して, それぞれ 40 cycle (上), 60 cycle (下) で qPCR を行い, B6 と Sp の  
amplification plot を両方示した.
- c. SNP cDNA アレル比と probe からの蛍光の相関  
*Hdac6* に対して, cDNA を B6 : Sp = 1 : 99, 20 : 80, 50 : 50, 66 : 33, 99 : 1  
に混合したものを template として SNP cDNA typing を行い, cDNA 比を X  
軸に, 各アレルの probe から検出された蛍光の比を Y 軸にプロットした.
- d. SNP cDNA typing による *Hdac6* 座位における転写状態  
5c と同じ cDNA を用いて *Hdac6* の Allele-specific transcript abundance を算  
出した.
- e. RNA-seq による *Hdac6* 座位における転写状態  
RNA-seq の結果より, *Hdac6* の B6 gene frequency を算出した.

**Fig. 9**

Analysis of Giorgetti et al, 2016 data

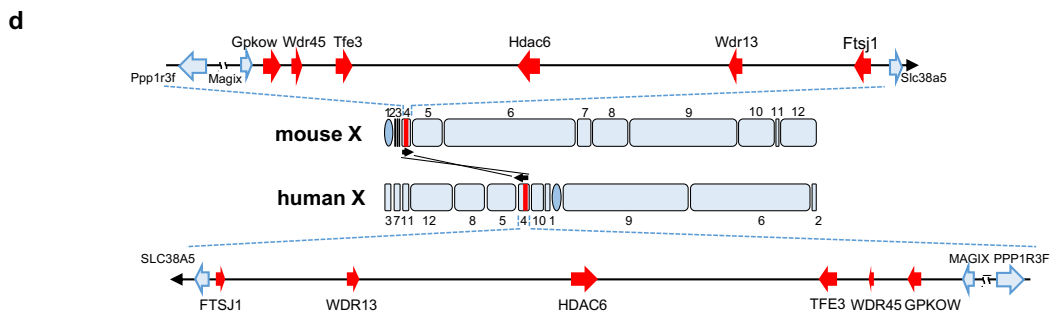
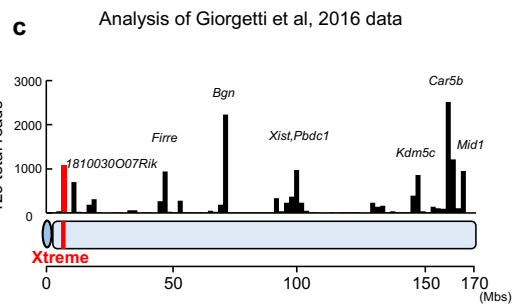
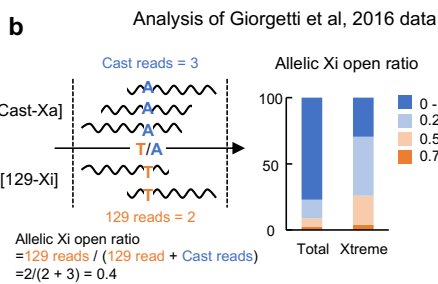
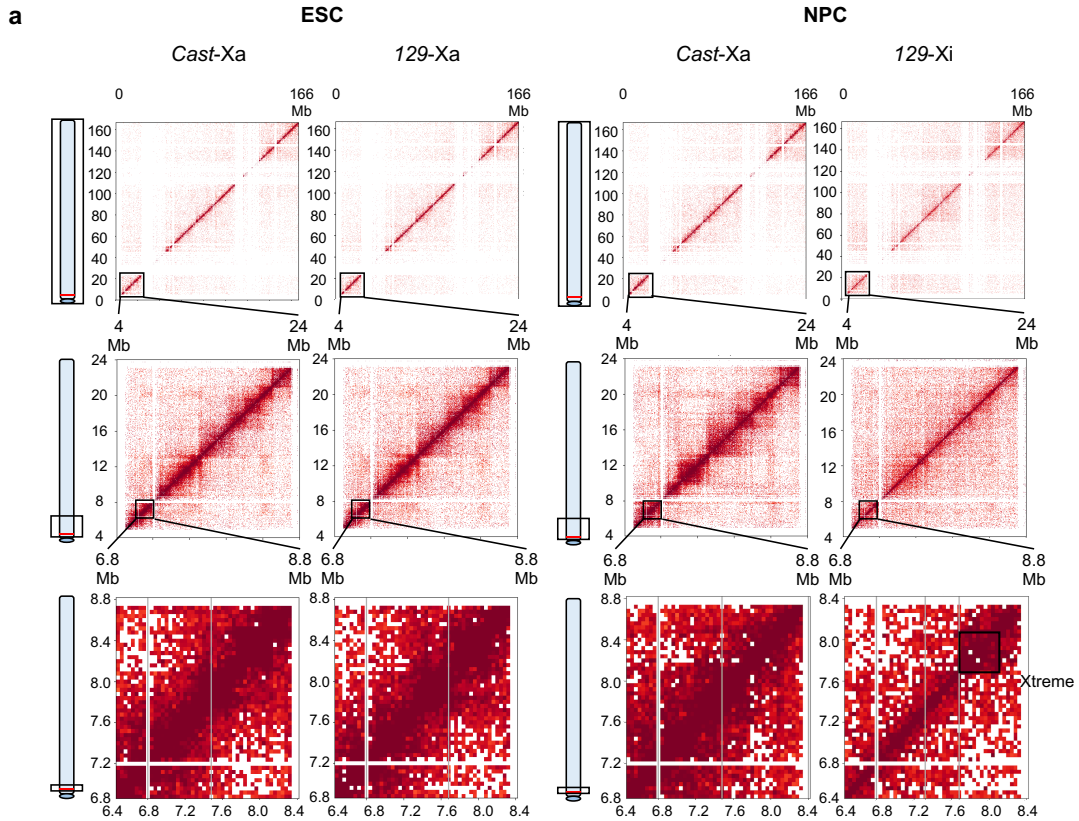


Fig. 9

a. Xtreme 周辺のクロマチン構造

Giorgetti et al., 2016<sup>54</sup> の Hi-C データより, Xa, Xi での Xtreme のクロマチン構造を可視化した.

b. Xtreme におけるクロマチンアクセシビリティ

Giorgetti et al., 2016<sup>54</sup> の ATAC-seq のデータより各領域で Allelic Xi open ratio =  $129 \text{ reads} / (129 \text{ reads} + \text{Cast reads})$  を算出し, 右のグラフを作成した.

c. X 染色体全体におけるクロマチンアクセシビリティの比較

Giorgetti et al., 2016<sup>54</sup> の ATAC-seq のデータより 129-Xi reads を確認し, 2 Mb 毎にそれを累積したものを, 対応する領域とともにグラフに示した. 赤色で示されるのが Xtreme を含む領域である. なお, グラフ上に書いてある遺伝子数はそのグラフの領域と対応する escapee を示す.

d. マウスとヒトの X 染色体の比較 (Boyd et al., 2005<sup>55</sup> より改変)

1-12 の数字は, マウスとヒトの間で保存されているセグメントを表す. 赤いバーは Xtreme を示している.

**Fig. 10**

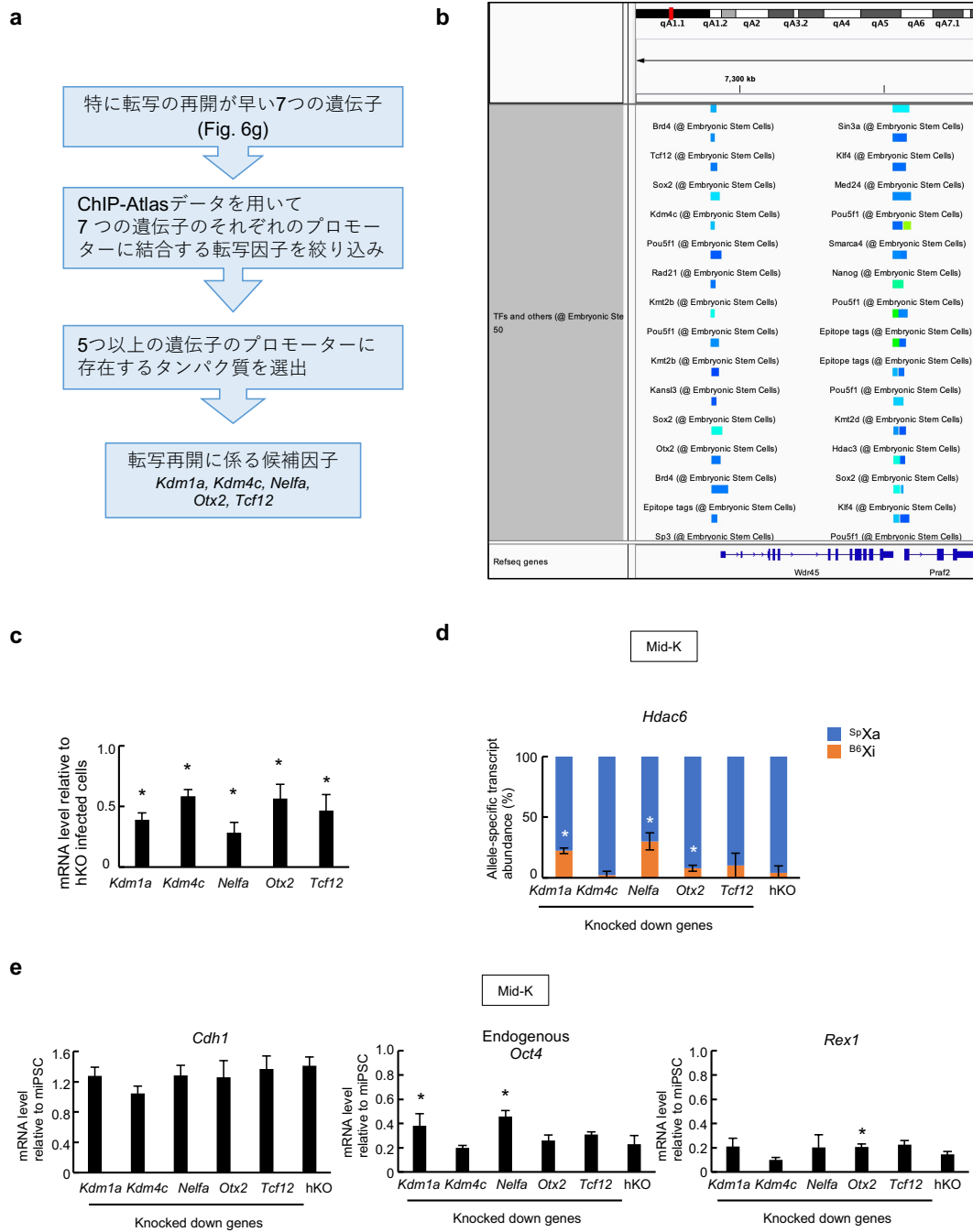
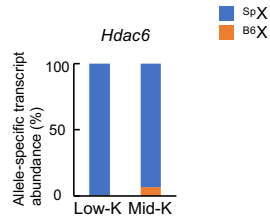


Fig. 10

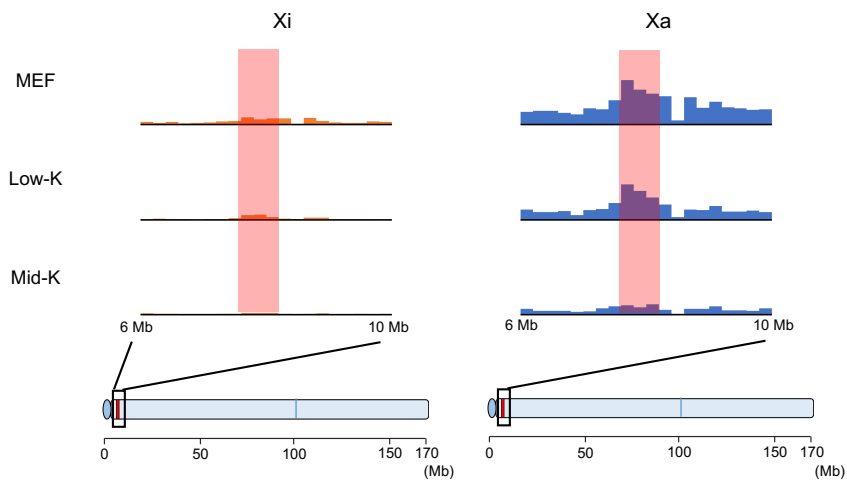
- a. Xtreme 領域から転写の再開に関わるタンパク質同定のフロー
- b. ChIP-Atlas で見られるタンパク質結合のピークの例  
*Wdr45* の TSS 周辺に、様々なタンパク質が結合している.
- c. shRNA の KD 効率  
shRNA 産生レトロウイルスを MEFhs-HAT または iPS 細胞に感染, 感染細胞を薬剤選択後, 抽出した RNA を用いて各遺伝子に対する RT-qPCR を行ない, hKO 感染細胞を 100%として KD 効率を算出した.  $*p<0.05$
- d. 各候補因子 KD が転写再開に及ぼす影響  
shRNA 産生レトロウイルスを MEFhs-HAT に感染, 薬剤選択後, Mid-K 条件でリプログラミングを行い, およそ 20 日後に抽出した RNA を用いて *Hdac6* に対する RT-qPCR を行った.  $*p<0.05$
- e. 各候補因子 KD がリプログラミングに及ぼす影響  
d と同様の cDNA を template に, リプログラミング初期のマーカー *Cdh1*, 中期から後期のマーカー *endogenous Oct4*, 後期のマーカー *Rex1* に対して RT-qPCR を行った.  $*p<0.05$

**Fig. 11**

**a**



**b**



**c**

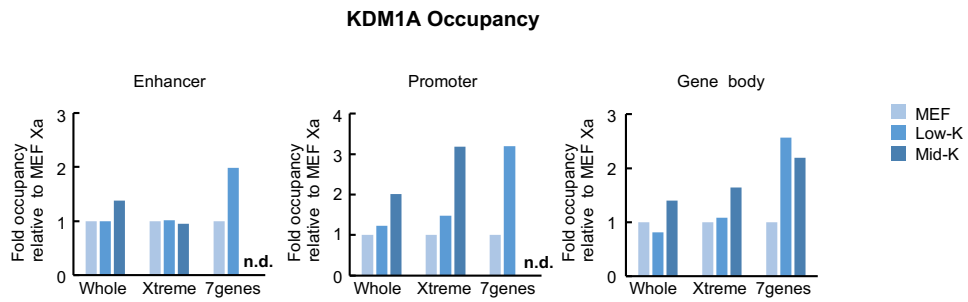


Fig. 11

a. 転写再開の確認

MEFhs-HAT に対して Low-K, Mid-K 条件でリプログラミングを行いおよそ 20 日後に回収した RNA を用いて, *Hdac6* 座位において SNP cDNA typing を行った.

b. Xi, Xa における KDM1A の結合

MEFhs-HAT に対して Low-K, Mid-K の条件でリプログラミングを行い, およそ 20 日後にクロマチンを回収し, KDM1A に対する ChIP-seq を行った. Xi, Xa で, それぞれ reads を 20 kb 毎に累積加算したものを図にした. 赤いバーは Xtreme 領域を示している.

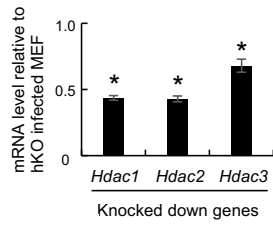
c. Xtreme 中の 7 つの遺伝子における KDM1A occupancy

Xi に対する結合を Xa に対してノーマライズし, さらに promoter (各遺伝子から +1 kbs), gene body, ESC における enhancer の 3 つの領域に分けて, Xtreme 上の遺伝子, 6g に示した 7 つの遺伝子に対しても解析を行った.

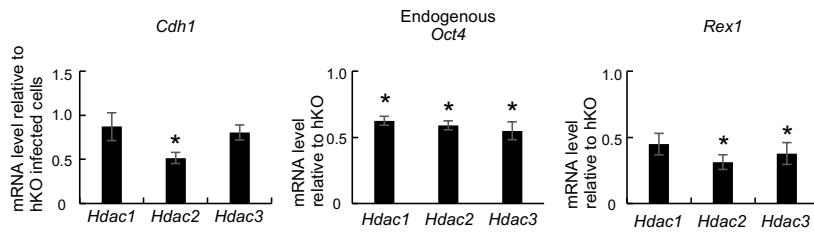


**Fig. 12**

**a**



**b**



**c**

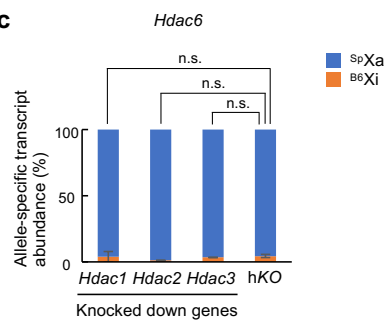
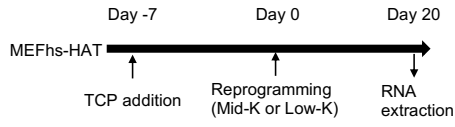


Fig. 12

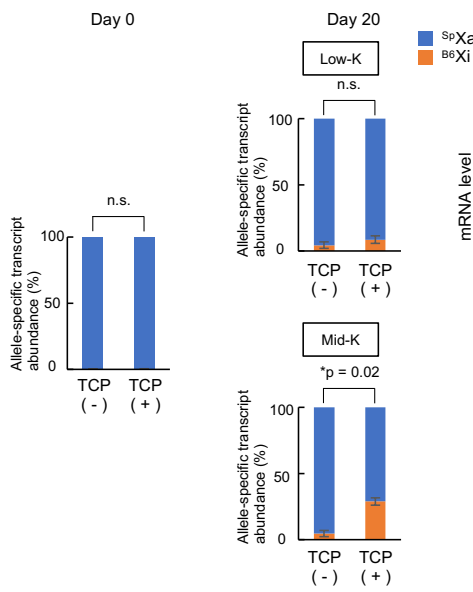
- a. HDAC に対する shRNA の KD 効率  
shRNA 産生レトロウイルスを MEFhs-HAT に感染，感染細胞を薬剤選択後，抽出した RNA を用いて各遺伝子に対する RT-qPCR を行ない，hKO 感染細胞を 100%として KD 効率を算出した． \* $p < 0.05$
- b. sh*Hdac* がリプログラミングに及ぼす影響  
shRNA 産生レトロウイルスを MEFhs-HAT に感染，薬剤選択後，Mid-K 条件でリプログラミングを行い，およそ 20 日後に抽出した RNA を用いて，リプログラミング初期のマーカー*Cdh1*，中期から後期のマーカー—endogenous *Oct4*，後期のマーカー*Rex1* に対して RT-qPCR を行った． \* $p < 0.05$
- c. 各候補因子 KD が転写再開に及ぼす影響  
b と同じ cDNA を用いて，*Hdac6* に対する RT-qPCR を行った． \* $p < 0.05$

**Fig. 13**

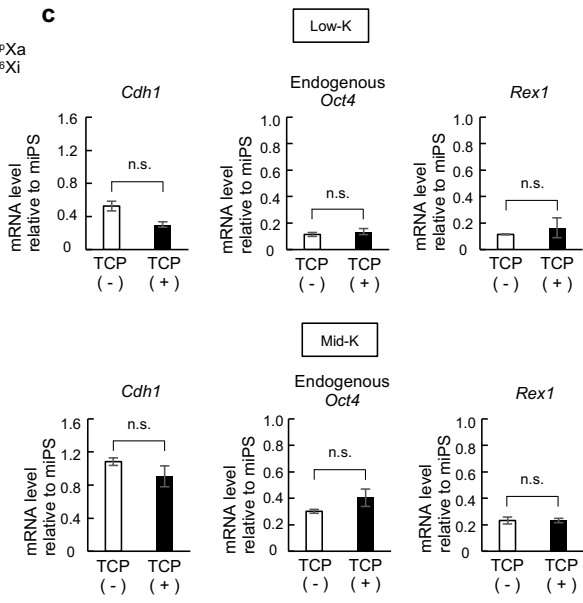
**a**



**b**



**c**



**d**

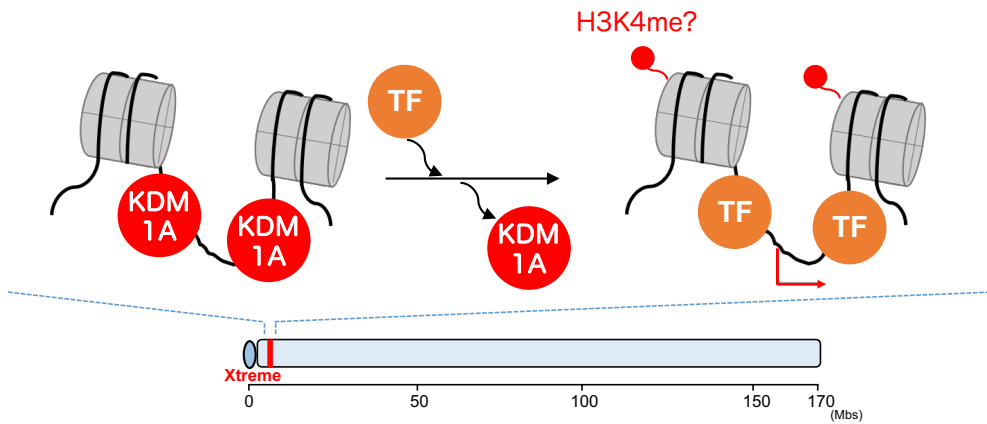


Fig. 13

a. TCP 処理のスキーム

リプログラミング開始の 7 日前に TCP の添加を開始し，培地交換の際にも継続して添加し続けた。

b. TCP の転写再開に対する影響

TCP を MEFhs-HAT に処理開始の 7 日後に，Low-K または Mid-K の条件でリプログラミングを行い，およそ 20 日後に抽出した RNA を用いて *Hdac6* に対する RT-qPCR を行った。\* $p < 0.05$

c. TCP のリプログラミングに対する影響

b と同じ cDNA を用いて，リプログラミング初期のマーカー *Cdh1*，中期から後期のマーカー *endogenous Oct4*，後期のマーカー *Rex1* に対して RT-qPCR を行った。\* $p < 0.05$

d. XCR 再開における KDM1A が果たすと考えられる役割

体細胞の状態では Xtreme は比較的オープンな構造を取る。リプログラミングに伴い，MET と同時期に転写因子が発現誘導される。KDM1A は，転写因子の DNA への結合を阻害しながら，他に必要な因子をリクルートし，転写再開のための環境を整える。そして特に *Gpkow*，*Wdr45*，*Gm45208*，*Tfe3*，*Hdac6*，*Wdr13*，*Ftsj1* から KDM1A は除去され，転写促進修飾が回復することで転写を開始する。

## 6. 結論

本研究では、異なる程度の多能性を付与する3S reprogramming systemにより誘導した細胞を、転写産物に存在する SNP をもとに高感度かつ定量的に XCR を検出する SNP cDNA typing system を用いて XCR 進行度を評価することで、XCR 開始極初期の減少を観察することに成功した。誘導された細胞は、RNA-seq により解析され、各 X 染色体の領域とその遺伝子からの X 転写活性化状態の紐付けが行われ、XCR における転写の再開は、セントロメア近傍の 7.7-8.2 Mb に存在する Xtreme から開始することを明らかにした。さらに、ChIP のデータベースを用いてこの領域に結合し転写を開始する分子候補を探索したところ、KDM1A が転写開始を阻害することが示唆された。KDM1A の酵素活性部位の阻害により転写再開が促進したことより、転写再開に大きな役割を果たすのは、H3K4me1/2 の脱メチル化であると考えられる。KDM1A に対する ChIP-seq の結果、KDM1A は転写再開直前、Xtreme 中の *Gpkow*, *Wdr45*, *Gm45208*, *Tfe3*, *Hdac6*, *Wdr13*, *Ftsj1* 等に結合し、転写再開に必要な分子を呼び込みながらエピジェネティック修飾を変化させた後、そこから離れ転写が再開することが予想される。

## 7. 表

表1. ジェノタイピングに用いたプライマー

Target	Types of primer	Sequence
<i>Zfy1</i> (chr. Y)	Forward primer	TGGTGATTCAATAATGTCTGTTTCAGCTG
	Reverse primer	GGACAAACTTTACGTGTCTATCCTTGC
<i>Hprt</i>	Forward primer	GAGAGAAGCTGCTACCACTGAGAG
	Reverse primer for <i>Hprt</i> (-)	GTTATTGGTGGAGATGATCTCTCAAC
	Reverse primer for <i>Hprt</i> (+)	ATCAGAGCAGCCGATTGTCTGTTG

表2. RT-qPCRに用いたプライマー

Target	Types of primer	Sequence
<i>Cdh1</i>	Forward primer	ACGTCCCCCTTTACTGCTG
	Reverse primer	TATCCGCGAGCTTGAGATG
Endogenous <i>Oct4</i>	Forward primer	CTGTTCCCGTCACTGCTCTG
	Reverse primer	AACCCCAAAGCTCCAGGTTTC
<i>Rex1</i>	Forward primer	TTGATGGCTGCGAGAAGAG
	Reverse primer	ACCCAGCCTGAGGACAATC
<i>Xist</i> (B6)	Forward primer	GGTTCTCTCTCCAGAAGCTAGGAAAG
	Reverse primer	TGGTAGATGGCATTGTGTATTATATGG
<i>TBP</i>	Forward primer	TATCTGCTGGCGGTTTGGC
	Reverse primer	TGAAATAGTGATGCTGGGCAC
<i>Kdm1a</i>	Forward primer	CTCCTGGCCCCTCAATTC
	Reverse primer	TGTGTGTTCTCCAGCAAAGAA
<i>Kdm4c</i>	Forward primer	GCGGGTTCATGCAAGTTGTT
	Reverse primer	GTTTCAGAGCACCTCCCCTC
<i>Nelfa</i>	Forward primer	CTGGCCTGGTATCCACACAG
	Reverse primer	AGTCTCAGAGCTGGGGATGT
<i>Otx2</i>	Forward primer	CTCGACGTTCTGGAAGCTC
	Reverse primer	GGCCTCACTTTGTTCTGACC
<i>Tcf12</i>	Forward primer	AGACACAAACCTGGCAGGAG
	Reverse primer	TGCAGAAGCGACACACTGAT
<i>Hdac1</i>	Forward primer	CTGGGGACCTACGGGACATT

	Reverse primer	CACTGCACTAGGCTGGAACA
<i>Hdac2</i>	Forward primer	AGTTGCTGGGGCTGTGAAAT
	Reverse primer	TCGAGGATGGCAAGCACAAT
<i>Hdac3</i>	Forward primer	GAGAGGTCCCGAGGAGAACT
	Reverse primer	CTTGGGGACACAGCATCCAT

表3. SNP cDNA typingに用いたプライマー・プローブ

Target	Types of primer		Sequence
<i>Lamp2</i>	Primer	Forward primer	CACCTGCAAGCTTTTGTCCA
		Reverse primer	GTGTGAATGATGGGTGCCAC
	Probe	B6	AAGACCAAACtccCACCAC
		Sp	AAGACCAAACgtCACCAC
<i>Msn</i>	Primer	Forward primer	AGAGAGGATGAGTACCCTCAAACCTA
		Reverse primer	TGGCAGGAAAATACTAAAGCCAG
	Probe	B6	AAGTTTCTTCCTTTgtGGC
		Sp	AAGTTTCTTCCTTTcGGC
<i>Hdac6</i>	Primer	Forward primer	CCTTCTGGGAGGTCCTGGA
		Reverse primer	GCTGAGGTGTCTCAGGGTGAT
	Probe	B6	AAGAAGCCgTgCTAGAAG
		Sp	TGGAAGAAGCCaTtCTAGAAG

表4. shRNA産生レトロウイルスの作成にもちいたオリゴDNA配列

Target	Sequence
<i>Fgfr1</i>	gatccGTGACCGAGGATAACGTAATGCTCGAGCATTACGTTATCCTCGGTCACTTTTTg
	aattcCAAAAAGTGACCGAGGATAACGTAATGCTCGAGCATTACGTTATCCTCGGTCACg
<i>Kdm1a</i>	gatccGAGTTGAAAGAGCTTCTTAATCTCGAGATTAAGAAGCTCTTTCAACTCTTTTTGg
	aattcCAAAAAGAGTTGAAAGAGCTTCTTAATCTCGAGATTAAGAAGCTCTTTCAACTCg
<i>Kdm4c</i>	gatccGCAGAGTGATAGATGTGACATCTCGAGATGTCACATCTATCACTCTGCTTTTTGg
	aattcCAAAAAGCAGAGTGATAGATGTGACATCTCGAGATGTCACATCTATCACTCTGCg
<i>Nelfa</i>	gatccGCCAGTACCTGAACAAGAATGCTCGAGCATTCTTGTTTCAGGTAAGGCTTTTTGg
	aattcCAAAAAGCCAGTACCTGAACAAGAATGCTCGAGCATTCTTGTTTCAGGTAAGGCTGg
<i>Otx2</i>	gatccGCATGGACTGTGGATCTTATTCTCGAGAATAAGATCCACAGTCCATGCTTTTTGg
	aattcCAAAAAGCATGGACTGTGGATCTTATTCTCGAGAATAAGATCCACAGTCCATGCg

<i>Tcf12</i>	gatccGAAGGCCTTGGCATCTATTTACTCGAGTAAATAGATGCCAAGGCCTTCTTTTTGg
	aattcCAAAAAGAAGGCCTTGGCATCTATTTACTCGAGTAAATAGATGCCAAGGCCTTCg
<i>Hdac1</i>	gatccGCCAGTCATGTCCAAAGTAATCTCGAGATTACTTTGGACATGACTGGCTTTTTGg
	aattcCAAAAAGCCAGTCATGTCCAAAGTAATCTCGAGATTACTTTGGACATGACTGGCg
<i>Hdac2</i>	gatccCGAGCATCAGACAAACGGATACTCGAGTATCCGTTTGTCTGATGCTCGTTTTTGg
	aattcCAAAAACGAGCATCAGACAAACGGATACTCGAGTATCCGTTTGTCTGATGCTCGg
<i>Hdac3</i>	gatccGTGTTGAATATGTCAAGAGTTCTCGAGAACTCTTGACATATTCAACACTTTTTGg
	aattcCAAAAAGTGTGAAATATGTCAAGAGTTCTCGAGAACTCTTGACATATTCAACACg



## 8. 参考文献

1. Barrero, M. J., Boué, S. & Izpisua Belmonte, J. C. Epigenetic Mechanisms that Regulate Cell Identity. *Cell Stem Cell* **7**, 565–570 (2010).
2. Trojer, P. & Reinberg, D. Facultative Heterochromatin: Is There a Distinctive Molecular Signature? *Mol. Cell* **28**, 1–13 (2007).
3. Hahn, M., Dambacher, S. & Schotta, G. Heterochromatin dysregulation in human diseases. *J. Appl. Physiol.* **109**, 232–242 (2010).
4. Wutz, A. Gene silencing in X-chromosome inactivation: Advances in understanding facultative heterochromatin formation. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 542–553 (2011).
5. Lyon, M. F. Gene Action in the X-chromosome of the Mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* **190**, 372–373 (1961).
6. Simon, M. D. *et al.* High-resolution Xist binding maps reveal two-step spreading during X-chromosome inactivation. *Nature* **504**, 465–469 (2013).
7. Clemson, C. M., McNeil, J. A., Willard, H. F. & Lawrence, J. B. XIST RNA paints the inactive X chromosome at interphase: Evidence for a novel RNA involved in nuclear/chromosome structure. *J. Cell Biol.* **132**, 259–275 (1996).
8. Williams, L. H., Kalantry, S., Starmer, J. & Magnuson, T. Transcription precedes loss of Xist coating and depletion of H3K27me3 during X-chromosome reprogramming in the mouse inner cell mass. *Development* **138**, 2049–2057 (2011).
9. Csankovszki, G., Nagy, A. & Jaenisch, R. Synergism of Xist RNA, DNA methylation, and histone hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation. *J. Cell Biol.* **153**, 773–783 (2001).
10. McHugh, C. A. *et al.* The Xist lncRNA interacts directly with SHARP to silence transcription through HDAC3. *Nature* **521**, 232–236 (2015).
11. Lee, J. T., Lu, N. & Han, Y. Genetic analysis of the mouse X inactivation center defines an 80-kb multifunction domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 3836–3841 (1999).
12. Sado, T., Wang, Z., Sasaki, H. & Li, E. Regulation of imprinted X-chromosome inactivation in mice by Tsix. *Development* **128**, 1275–1286 (2001).
13. Sado, T. & Brockdorff, N. Advances in understanding chromosome silencing by the long non-coding RNA Xist. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **368**, (2013).

14. Chaumeil, J. *et al.* Evolution from XIST-independent to XIST-controlled X-chromosome inactivation: Epigenetic modifications in distantly related mammals. *PLoS One* **6**, 1–11 (2011).
15. Rens, W., Wallduck, M. S., Lovell, F. L., Ferguson-Smith, M. A. & Ferguson-Smith, A. C. Epigenetic modifications on X chromosomes in marsupial and monotreme mammals and implications for evolution of dosage compensation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 17657–17662 (2010).
16. Wutz, A. & Jaenisch, R. A shift from reversible to irreversible X inactivation is triggered during ES cell differentiation. *Mol. Cell* **5**, 695–705 (2000).
17. Ohhata, T. & Wutz, A. Reactivation of the inactive X chromosome in development and reprogramming. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 2443–2461 (2013).
18. Huynh, K. O. & Lee, J. T. Inheritance of a pre-inactivated paternal X chromosome in early mouse embryos. *Nature* **426**, 857–862 (2003).
19. Patrat, C. *et al.* Dynamic changes in paternal X-chromosome activity during imprinted X-chromosome inactivation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 5198–5203 (2009).
20. Sugimoto, M. & Abe, K. X chromosome reactivation initiates in nascent primordial germ cells in mice. *PLoS Genet.* **3**, 1309–1317 (2007).
21. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
22. Maherali, N. *et al.* Directly Reprogrammed Fibroblasts Show Global Epigenetic Remodeling and Widespread Tissue Contribution. *Cell Stem Cell* **1**, 55–70 (2007).
23. Kobayashi, S. *et al.* Live imaging of X chromosome reactivation dynamics in early mouse development can discriminate naïve from primed pluripotent stem cells. *Development.* **143**, 2958–2964 (2016).
24. Tran, T. H. Y. *et al.* Live cell imaging of X chromosome reactivation during somatic cell reprogramming. *Biochem. Biophys. Reports* **15**, (2018).
25. Pasque, V. *et al.* X chromosome reactivation dynamics reveal stages of reprogramming to pluripotency. *Cell* **159**, 1681–1697 (2014).
26. Talon, I., Janiszewski, A., Chappell, J., Vanheer, L. & Pasque, V. Recent Advances in Understanding the Reversal of Gene Silencing During X Chromosome Reactivation. *Front. Cell Dev. Biol.* **7**, 1–13 (2019).

27. Borensztein, M. *et al.* Contribution of epigenetic landscapes and transcription factors to X-chromosome reactivation in the inner cell mass. *Nat. Commun.* **8**, 1297–1310 (2017).
28. Janiszewski, A. *et al.* Dynamic reversal of random X-Chromosome inactivation during iPSC reprogramming. *Genome Res.* **29**, 1659–1672 (2019).
29. Navarro, P. *et al.* Molecular coupling of Tsix regulation and pluripotency. *Nature* **468**, 457–460 (2010).
30. Payer, B. *et al.* Tsix RNA and the germline factor, PRDM14, link X reactivation and stem cell reprogramming. *Mol. Cell* **52**, 805–818 (2013).
31. Chaumeil, J., Okamoto, I. & Heard, E. X-Chromosome Inactivation in Mouse Embryonic Stem Cells: Analysis of Histone Modifications and Transcriptional Activity Using Immunofluorescence and FISH. *Methods Enzymol.* **376**, 405–419 (2003).
32. Chadwick, B. P. & Willard, H. F. Barring gene expression after XIST: Maintaining facultative heterochromatin on the inactive X. *Semin. Cell Dev. Biol.* **14**, 359–367 (2003).
33. Okamoto, I., Otte, A. P., Allis, C. D., Reinberg, D. & Heard, E. Epigenetic Dynamics of Imprinted X Inactivation during Early Mouse Development. *Science (80-. )*. **303**, 644–649 (2004).
34. Nishimura, K. *et al.* Manipulation of KLF4 expression generates iPSCs paused at successive stages of reprogramming. *Stem Cell Reports* **3**, 915–929 (2014).
35. Banaszynski, L. A., Chen, L., Maynard-Smith, L. A., Ooi, A. G. L. & Wandless, T. J. A Rapid, Reversible, and Tunable Method to Regulate Protein Function in Living Cells Using Synthetic Small Molecules. *Cell* **126**, 995–1004 (2006).
36. Yoshiki, A. *et al.* The mouse resources at the RIKEN BioResource Center. *Exp. Anim.* **58**, 85–96 (2009).
37. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **26**, 589–595 (2010).
38. Lo, H. S. *et al.* Allelic variation in gene expression is common in the human genome. *Genome Res.* **13**, 1855–1862 (2003).
39. Carrel, L. & Willard, H. F. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature* **434**, 400–404 (2005).
40. Giorgetti, L. *et al.* Structural organization of the inactive X chromosome in the mouse. *Nature* **535**, 575–579 (2016).
41. Akdemir, K. C. & Chin, L. HiCPlotter integrates genomic data with interaction matrices. *Genome Biol.* **16**, 1–8 (2015).

42. Oki, S. *et al.* Ch IP -Atlas: a data-mining suite powered by full integration of public Ch IP -seq data . *EMBO Rep.* **19**, 1–10 (2018).
43. Bui, P. L. *et al.* Template Activating Factor-I  $\alpha$  Regulates Retroviral Silencing during Reprogramming. *Cell Rep.* **29**, (2019).
44. Li, H. *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**, 2078–2079 (2009).
45. Gao, T. & Qian, J. EnhancerAtlas 2.0: An updated resource with enhancer annotation in 586 tissue/cell types across nine species. *Nucleic Acids Res.* **48**, D58–D64 (2020).
46. Foug, S. K. H., Sasaki, D. T., Grumet, F. C. & Engleman, E. G. Production of functional human T-T hybridomas in selection medium lacking aminopterin and thymidine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 7484–7488 (1982).
47. Kim, K. Y. *et al.* X chromosome of female cells shows dynamic changes in status during human somatic cell reprogramming. *Stem Cell Reports* **2**, 896–909 (2014).
48. Zvetkova, I. *et al.* Global hypomethylation of the genome in XX embryonic stem cells. *Nat. Genet.* **37**, 1274–1279 (2005).
49. Vallot, C. *et al.* Erosion of X chromosome inactivation in human pluripotent cells initiates with XACT coating and depends on a specific heterochromatin landscape. *Cell Stem Cell* **16**, 533–546 (2015).
50. Yang, F., Babak, T., Shendure, J. & Disteche, C. M. Global survey of escape from X inactivation by RNA-sequencing in mouse. *Genome Res.* **20**, 614–622 (2010).
51. Li, S. M. *et al.* Transcriptome-wide survey of mouse CNS-Derived cells reveals monoallelic expression within novel gene families. *PLoS One* **7**, 1–8 (2012).
52. Berletch, J. B. *et al.* Escape from X Inactivation Varies in Mouse Tissues. *PLoS Genet.* **11**, 1–26 (2015).
53. Deng, X. *et al.* Bipartite structure of the inactive mouse X chromosome. *Genome Biol.* **16**, 1–21 (2015).
54. Giorgetti, L. *et al.* Structural organization of the inactive X chromosome in the mouse. *Nature* **535**, 575–579 (2016).
55. Boyd, Y., Blair, H. J., Cunliffe, P., Masson, W. K. & Reed, V. A phenotype map of the mouse X chromosome: Models for human X-linked disease. *Genome Res.* **10**, 277–292 (2000).
56. Zheng, Y.-C. *et al.* A systemic review of histone lysine-specific demethylase 1 and its inhibitors. *Medidibal Res. Rev.* **35**, 1032–1071 (2015).

57. Lee, M. G., Wynder, C., Cooch, N. & Shiekhattar, R. An essential role for CoREST in nucleosomal histone 3 lysine 4 demethylation. *Nature* **437**, 432–435 (2005).
58. Moindrot, B. *et al.* A Pooled shRNA Screen Identifies Rbm15, Spen, and Wtap as Factors Required for Xist RNA-Mediated Silencing. *Cell Rep.* **12**, 562–572 (2015).
59. Jamaladdin, S. *et al.* Histone deacetylase (HDAC) 1 and 2 are essential for accurate cell division and the pluripotency of embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 9840–9845 (2014).
60. Saunders, A. *et al.* The SIN3A/HDAC Corepressor Complex Functionally Cooperates with NANOG to Promote Pluripotency. *Cell Rep.* **18**, 1713–1726 (2017).
61. Heard, E. *et al.* Methylation of histone H3 at Lys-9 Is an early mark on the X chromosome during X inactivation. *Cell* **107**, 727–738 (2001).
62. Zhang, J. *et al.* SNPdetector: A software tool for sensitive accurate SNP detection. *PLoS Comput. Biol.* **1**, 0395–0404 (2005).
63. Mahler, K. L. *et al.* Sequence divergence of *Mus spretus* and *Mus musculus* across a skin cancer susceptibility locus. *BMC Genomics* **9**, 1–12 (2008).
64. Tomoda, K. *et al.* Derivation conditions impact x-inactivation status in female human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **11**, 91–99 (2012).
65. Nichols, J. & Smith, A. Naive and Primed Pluripotent States. *Cell Stem Cell* **4**, 487–492 (2009).
66. Skrypek, N., Goossens, S., De Smedt, E., Vandamme, N. & Berx, G. Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Epigenetic Reprogramming Driving Cellular Plasticity. *Trends Genet.* **33**, 943–959 (2017).
67. Nishimura, K. *et al.* A Role for KLF4 in Promoting the Metabolic Shift via TCL1 during Induced Pluripotent Stem Cell Generation. *Stem Cell Reports* **8**, 787–801 (2017).
68. Moussaieff, A. *et al.* Glycolysis-mediated changes in acetyl-CoA and histone acetylation control the early differentiation of embryonic stem cells. *Cell Metab.* **21**, 392–402 (2015).
69. Wang, T. *et al.* The histone demethylases Jhdm1a/1b enhance somatic cell reprogramming in a vitamin-C-dependent manner. *Cell Stem Cell* **9**, 575–587 (2011).
70. Engreitz, J. M. *et al.* The Xist lncRNA exploits three-dimensional genome architecture to spread across the X chromosome. *Science (80-. ).* **341**, 1–9 (2013).

71. Marks, H. *et al.* Dynamics of gene silencing during X inactivation using allele-specific RNA-seq. *Genome Biol.* **16**, 1–20 (2015).
72. Novo, C. L. *et al.* The pluripotency factor Nanog regulates pericentromeric heterochromatin organization in mouse embryonic stem cells. *Genes Dev.* **30**, 1101–1115 (2016).
73. Gaspar-Maia, A., Alajem, A., Meshorer, E. & Ramalho-Santos, M. Open chromatin in pluripotency and reprogramming. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 36–47 (2011).
74. Houge, G., Oeffner, F. & Grzeschik, K. H. An Xp11.23 deletion containing PORCN may also cause angioma serpiginosum, a cosmetic skin disease associated with extreme skewing of X-inactivation. *Eur. J. Hum. Genet.* **16**, 1027–1028 (2008).
75. Blinkenberg, E. *et al.* Angioma serpiginosum with oesophageal papillomatosis is an X-linked dominant condition that maps to Xp11.3-Xq12. *Eur. J. Hum. Genet.* **15**, 543–547 (2007).
76. Arican, P. *et al.* A De Novo Xp11.23 Duplication in a Girl with a Severe Phenotype: Expanding the Clinical Spectrum. *J. Pediatr. Genet.* **07**, 074–077 (2018).
77. Brown, C. J. & Willard, H. F. The human X-inactivation centre is not required for maintenance of X-chromosome inactivation. *Nature* **368**, 154–156 (1994).

## 9. 謝辞

お忙しい中に本論文の主査を引き受けて下さいました，筑波大学医療医学系教授 高橋智先生，副査を引き受けて下さいました，筑波大学医療医学系教授 家田真樹先生，筑波大学医療医学系准教授 尾崎遼先生，筑波大学医療医学系助教 加藤広介先生には，貴重なお時間を割いて審査に当たっていただき，終始親身にご助言、ご指摘下さいましたこと、深く御礼申し上げます。

共著者として本研究に関わって下さいました，筑波大学医学医療系助教 久野郎広先生，筑波大学医療医学系教授 村谷匡史先生，特定国立研究開発法人産業技術総合研究所臨海副都心センター細胞分子工学研究部門動的創薬モダリティ研究グループ主任研究員 小林慎先生，筑波大学医学医療系助教 鍋倉宰先生，筑波大学医学医療系教授 渋谷彰先生，筑波大学プレシジョン・メディシン研究開発センターゲノム先端医療分野准教授 杉原英志先生，筑波大学プレシジョン・メディシン研究開発センターゲノム先端医療分野特命教授 佐藤孝明先生に心から感謝しております。

技術的なご支援をいただきました，筑波大学 山崎裕治様，筑波大学 西村智子様には深く御礼を申し上げます。

国立研究開発法人理化学研究所生命機能科学研究センターバイオインフォマティクス研究開発チームのチームリーダー 二階堂愛先生，研究員 林哲太郎様を含む研究室の皆様には，有意義なディスカッション，アドバイスを下さいましたこと，深く感謝いたします。恵まれた研究・人間環境でこれまで苦手だと思っていた分野を学び修める絶好の機会を頂きました。

本研究室に所属当時より細かくご指導いただきました，国立研究開発法人理化学研究所バイオリソース研究センターiPS細胞高次特性解析開発チームチームリーダー 林洋平先生に心より感謝申し上げます。現所属になってからもまめに気にかけてくださり，研究に必要なこと，研究者として生きていくのに大事なことをたくさん教えていただきました。

浜松医科大学医学部助教 大畑樹也先生を始め，X染色体研究会の皆様には，たくさんの有益なアドバイスを頂きましたこと，深く感謝いたします。

先の見えない状況の中で私を奨学生として採用し学習する機会をくださった中谷医工計測技術振興財団，研究者としての期待を込め大きな経済的支援をくださった日本学術振興会，継続的な経済支援をいただいた筑波大学に心よりお礼申し上げます。

私と X 染色体を出会わせ，研究する機会を頂きました筑波大学医療医学系教授 久武幸司先生，筑波大学医療医学系准教授 西村健先生，筑波大学医療医学系准教授 福田綾先生に感謝申し上げます。日頃から数え切れないほどのご指導，ご協力，ご鞭撻をいただきました。

同じ研究室で毎日を過ごし，日々ディスカッションをしながらお互いを支えあいながら同じ時を過ごしてきた研究室の皆様に，最大級の感謝を送ります。

**I feel very grateful to all lab members, especially Arun Kumar and Gonzalo Seminario Mondejar for joining my research as an active participant.**

いつも近いところで見守り，明るく迎え励まし，私の能力を信じ続けてくれた家族・友人に，心からの感謝をいたします。経済的な後ろ盾のない状態から研究を始め，随所随所で出会うべき人やもの，考えに出くわし，困難な状況が続く中で目標も良心も失わずに，ここまで来ることができました。優れた研究者であっても身近な人をおろそかにはしないように。社会や人の役に立つよう研究をしていきます。

研究者として生きていく決意を固める間，辛抱強く話を聞き，頷き，暖かく見守ってくれたすべての皆様に，心からの謝意を示します。

自身に安寧をもたらしてくれる，研究ができることに感謝いたします。



## 10. 出典

本学位論文では [doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.11.008](https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.11.008) に掲載された論文の内容を、Cell Press 社の規定にしたがって再利用している。