

学 位 論 文 題 名

STUDIES ON THE NUCLEAR PROTEINS AND CELL SURFACE ANTIGEN
IN CULTURED MURINE TERATOCARCINOMA CELLS WITH REFERENCE
TO THE CONTROL OF X CHROMOSOME ACTIVITY

（マウス悪性奇形腫の核タンパク質と細胞表面抗原の研究
—特にX染色体の活性制御に関連して）

学位論文内容の要旨

マウス悪性奇形腫は組織学的に未分化な細胞と種々の分化した組織が混在した癌である。この腫瘍の増殖の主体をなしている未分化な細胞は形態学的、生化学的あるいは免疫学的に発生初期の胚細胞に類似しており、マウスに移植した場合悪性度の高い癌として増殖するので、胚性癌細胞 (embryonal carcinoma cell; ECC) と呼ばれる。しかし、このような ECC を胚盤胚中などに移植すると、増殖はするが分化し良性化するので、ECC は細胞の癌化、分化及び癌治療のモデルとして広く用いられるようになってきた。本研究では、培養 ECC 株を用い、ECC の分化機能の性質を利用し、初期発生の過程で起きる X 染色体不活性化に関与する一因として核タンパク質の解析を行った。さらに、不活性 X 染色体 (Xi) を活性化する能力に関与する ECC の性質を明らかにするため細胞表面抗原の探索を試みた。

哺乳類の雌個体においては初期発生の過程で 2 本の X 染色体のうち 1 本が遺伝的に不活性化される (Lyon, 1961)。不活性化した X 染色体は間期核でも凝縮しており、X 染色体の複製は DNA 合成期の後半に限定されている。不活性状態は体細胞ではきわめて安定で、活性化された報告はないが、卵母細胞では減数分裂の開始に合わせて必ず活性化が起きる。X 染色体の不活性化については多くの研究がなされてきたが、その分子機構は推論の域を出ていない。近年、DNA のメチル化の関与が示唆され、検討が重ねられたが不活性化との因果関係はなお明らかではない。また、Xi 上で特異的に発現される遺伝子 (XIST と名付けられている) が見い出されたが (Brown *et al.*, 1991)、

その役割についても未だ不明の点が多い。

本研究の発端となったのは、染色体標本作製する際に細胞の低張処理を50℃で行うとXiのみがギムザ液で濃染される事実(神田法; Kanda, 1972)である。このXiの濃染が特定のタンパク質によるものか、単なる染色体凝縮によるものかを検討した。実験に用いたECC株(C86S1A; McBurney and Adamson, 1976)は2本のX染色体が存在し、その中の1本が不活性化されているが、活性X染色体上の遺伝子ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HPRT)が欠損しているためにヒポキサンチン、アミノプテリン、チミンを含むHAT培地では生存出来ない。この株より、Xi末端に常染色体が転座し、約30%長さが増した転座Xi染色体をもつクローンMC12を分離し、さらに、大腸菌のneo^r遺伝子をもつモロニー白血病ウイルス(M-MuLV)を感染させ、5-アザシチジン処理後、HAT培地で生存できるHAT抵抗性細胞を選別した。また、この細胞群より、Xi染色体上のHPRT遺伝子機能が回復したと思われる2つのクローン(C4, D2)を分離した。これらの細胞では神田法を適用しても転座X染色体はギムザで濃染されず、Xiの特徴を全く示さないことから、Xiが再活性化されたとも思われた。分離したこれらの細胞より、核を単離し、低塩濃度緩衝液中50℃、15分間(神田法でXの分染が認められなくなる条件)で核タンパク質を抽出した。溶出してきた核タンパク質をLaemmli (1970)の方法に従って、SDS-PAGEにより解析した。C4とMC12の電気泳動のパターンを比較したところ、Xiを持つMC12細胞に特異的な核タンパク質として分子量46kDaの付近に2バンド、分子量71kDaの近くに1バンドが認められた。分子量46kDaのタンパク質はXiを持たないC4細胞では認められず、分子量71kDaのタンパク質は両者の細胞で認められたが、染色性がそれぞれ異なっていたことから量的な差である可能性が示唆された。また、親細胞C86S1A1とこれより直接分離したHAT抵抗性クローン細胞においても、それぞれMC12及びC4細胞と同様な結果が得られた。今回見いだされた核タンパク質はX染色体の不活性化に関与していると期待されるが、C4と正常雌リンパ球との細胞融合では後者由来のXiは維持されるにもかかわらず活性化したC4のX染色体はXiの性質を示さないことから、このタンパク質の有無がX染色体の活性化状態を決めているという結論は得られなかった。X染色体の活性・不活性化には発生・分化に特有のプロセスが必要なのかも知れない。また、この融合実験からC4には正常細胞のXiを活性化する能力が無いことも判明した。

ECC にはXiを持つ細胞株と持たない細胞株とがある。また、雌個体のリンパ球と細胞融合した場合、リンパ球由来の Xi が再活性化されるかどうか細胞株による。そこで、これらの性質と関連した細胞の特性を探るため ECC に対するモノクローナル抗体の作成を試みた。OTF9-63 細胞をマウス脾臓に直接注入し、免疫された脾臓細胞とのハイブリドーマを作成し、OTF9-63 細胞に特異的なモノクローナル抗体 1F7を得た。1F7 抗体とヒト及びマウス由来の多数の細胞株との反応性を調べた結果、悪性奇形腫が自然発症しやすい129/Sv系統由来の ECCのみがこの抗体に反応することが判った。1F7 抗原は着床以前までは全ての胚細胞表面に存在しているが、発生が進むにつれて次第に減少し、着床胚においては、胚外内胚葉に局在しておりマウスの分化抗原のひとつであることが明らかになった。また、成体の卵巣では、卵母細胞とそれを取り囲む濾胞細胞が 1F7 抗体と強く反応した。1F7抗体と初期胚及び卵巣組織との反応性から、着床前の胚細胞に存在する抗原は濾胞細胞から移行した可能性もある。また、1F7 抗原発現と細胞融合に伴うXiの活性化能との関連性を分析したところ、1F7 陰性のLT-1細胞では活性化能があるが、1F7陽性の B242g 細胞には無いことが明らかになり、1F7 は必ずしもXiの活性化能に関連した抗体とは限らないと考えられた。しかし、ECCの起源とされる胚内外胚葉には 1F7 抗体と反応する細胞はないので、この抗体は129/Sv系統における悪性奇形腫の形成過程を解析するのに有用であると考えられる。

1F7抗原の同定のために、OTF9-63 細胞より界面活性剤Nonidet P40でタンパク質を抽出した。試料を一度、1F7抗体で免疫沈澱させ、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)にかけ、ウェスタンブロッティング法で解析した結果、1F7抗原は分子量180kDaのタンパク質であることが判明した。これまでに分析した結果では、1F7 の抗原決定基は他の多くの分化抗原と同様にペプチド部分にあることが分ったが、その詳細については決定していない。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 田 廸 弘

副 査 教 授 堀 浩

副 査 助教授 高 木 信 夫

学 位 論 文 題 名

STUDIES ON THE NUCLEAR PROTEINS AND CELL SURFACE ANTIGEN IN CULTURED MURINE
TERATOCARCINOMA CELLS WITH REFERENCE TO THE CONTROL OF X CHROMOSOME ACTIVITY
(マウス悪性奇形腫の核タンパク質と細胞表面抗原の研究—特にX染色体の活性制
御に関連して)

阿部健司提出の学位論文は主論文(英文)と参考論文(英文7編)よりなる。主論文は、マウス悪性奇形腫由来の胚性癌細胞(ECC)を用い、ECCの分化機能の性質を利用し、初期発生の過程で起きるX染色体不活性化に関与する核タンパク質、ならびに不活性X染色体(Xi)の活性化能に関与するECCの性質を明らかにするため細胞表面抗原の探索を行ったものである。

染色体標本作製する際に熱(50℃)処理を行うと、Xi染色体のみがギムザ液で濃染される性質があるので、このXiの濃染が特定のタンパク質によるものか、単なる染色体凝縮によるものかを検討した。用いたECC株細胞は活性XとXiの2本のX染色体をもっていたが、この細胞群よりXi末端に常染色体が転座した転座Xi染色体をもつクローンと、Xiが再活性化されたクローンをそれぞれ分離した。これらのクローンより核タンパク質を単離し、SDS-PAGE法による電気泳動パターンを比較したところ、転座Xiをもつ細胞には特異的な核タンパク質として分子量46kDaの付近に2バンド、分子量71k

Daの近くに1バンドが認められた。分子量46kDaのタンパク質はXiをもたないクローンでは認められず、分子量71kDaのタンパク質は両者の細胞で認められたが、染色性がそれぞれ異なっていたことから量的な差である可能性が示唆された。いずれにせよ、これら核タンパク質はX染色体の不活性化に関与しているものとして、極めて重要な発見である。今後この核タンパク質がX染色体の活性・不活性化にどのように関与しているのか、その究明の足掛かりとなるものとして注目されている。

ECCにはXiを持つ細胞株と持たない細胞株とがある。また、雌個体のリンパ球と細胞融合した場合、リンパ球由来のXiが再活性化されるかどうかは細胞株による。そこで、これらの性質と関連した細胞の特性を探るためECCに対するモノクローナル抗体を作成し、マウス発生初期の細胞についてその分布を検索した。この抗原は着床以前までは全ての胚細胞表面に存在し、発生が進むにつれて次第に減少し、着床胚においては、胚外内胚葉に局在しておりマウスの分化抗原のひとつであること、また、成体の卵巣では、卵母細胞とそれを取り囲む濾胞細胞がこの抗体と強く反応することを明らかにし、新たなモノクローナル抗体として注目されるものである。また、この抗原発現と細胞融合に伴うXiの活性化能との関連性を分析したところ、この抗原陰性細胞では活性化能があるが、陽性細胞には無いことが示され、このモノクローナル抗体は必ずしもXiの活性化能に関連したものとは限らないと考えられた。しかし、ECCの起源とされる胚内外胚葉にはこの抗体と反応する細胞はないので、したがって、この抗体は悪性奇形腫の形成過程を解析するのに極めて有用な指標となるもので、この分野の研究に注目されている。また、このモノクローナル抗体に対する抗原は分子量180kDaのタンパク質であることが判明した。これまでに分析した結果では、抗原決定基はペプチド部分にあることが分った。

参考論文は主論文の内容に直接関連した4編の論文の他に、遺伝子および染色体の機能発現などに関する論文3編からなり、諸外国の国際学術専門誌に発表され、それらの内容はいずれも新知見を含むものとして関連分野において高く評価されている。

審査員一同は主論文と参考論文の内容及び最終試験の成績を慎重に検討した上で、申請者が博士(理学)の学位を受けるに十分な資格を有することを認めた。