

学 位 論 文 題 名

TOWARD THE UNDERSTANDING OF X
CHROMOSOME INACTIVATION AT THE
MOLECULAR LEVEL

(X染色体不活性化現象を分子レベルで解明する試み)

学位論文内容の要旨

哺乳類の雌の体細胞は、胚発生のごく初期に2本あるX染色体のうち1本をそのほぼ全長にわたって不活性にすることで、雄との間にあるX連鎖遺伝子量の差を見かけ上解消している。このX染色体不活性化(XCI)の現象についてはこれまで数多くの研究がなされてきたが、その分子機構についてはほとんどわかっていないというのが現状である。その要因の一つに不活性化を解析する上での適切なプローブがなかったことが挙げられる。そこで、私はXCIに関わる遺伝子は、不活性X染色体を持つ細胞で特異的に発現されているはずであるという想定のもとに、そのような遺伝子の単離、解析を試みることにした。本学位論文では、前半で上述の想定を満たすような遺伝子を単離するために行ったディファレンシャルスクリーニングと、その結果得られた新規の遺伝子の解析について、後半で不活性X染色体からのみ特異的に発現されていることが報告されたX染色体連鎖遺伝子、*Xist* のクローニングとその解析について述べた。

XCIの研究を進める上で問題となることは、XCIの起こる着床前後の胚が十分に得られないことである。初期胚における未分化な細胞とよく似た性質を持つ多分化能性の培養細胞であるマウス胚性腫瘍細胞(ESC)は、初期胚に代わるin vitroの系としてこれまで広く用いられてきた。そこで、私は2本のX染色体のうち1本が不活性化しているESC株MC12とそのサブクローンで不活性X染色体が再活性化したC4株を用いてディファレンシャルスクリーニングを行った。その結果得られた121a遺伝子は約2.5kbのこれまでに報告のない新たな遺伝子で、予想される335個のアミノ酸配列から121aは分泌型、あるいは膜結合型の糖タンパクをコードしていると考えられた。しかし、ノーザン解析を行った結果、121aは不活性X染色体がC4同様に再活性化した別のMC12のサブクローン2株、雌雄のマウス胚で各々発現されていたので、XCIと直接関連がないことが示唆された。一方、発生過程を追って行ったin situハイブリダイゼーションより、121aは中胚葉とそれ由来の組織、器官で特

異的に発現されていることがわかった。また、こうした組織特異性に加えて、*121a*と相同の配列が有袋類を含む哺乳動物のみならず、ショウジョウバエにおいても存在することから *121a* は中胚葉の分化、あるいはその特性の維持に重要な役割を果たしている可能性がある。FISH解析により *121a* 遺伝子は第6染色体のB1バンド位置づけられた。このように *121a* は興味深い特徴を持った遺伝子ではあったが、目的としたXCIに関わるものではなかったため、その解析はこの時点で終了することにした。*121a* の解析を進めている間に、Brownらによってヒトの胎盤cDNAライブラリーより *XIST* 遺伝子が単離されたが(1991)、この遺伝子は先に述べた想定に適合する非常に興味深いものであった。そこで、マウスの相同遺伝子 *Xist* のクローニング後、*Xist* の発現様式、およびプロモーター領域を含む *Xist* 上流域のメチル化の解析を新たに始めた。マウス初期胚では、最初に分化する栄養外胚葉、原始内胚葉において父方由来のX染色体(X^P)が選択的に不活性化し、その後、将来胚体組織をつくる胚体外胚葉ではランダムな不活性化が起こることが知られている。前者で見られる X^P の選択的な不活性化は X^P と母方由来のX染色体(X^M) が配偶子形成の過程で異なる修飾(ゲノムインプリンティング)を受けるためであると考えられている。Rastanのグループは *Xist* 遺伝子の発現が不活性化するX染色体を決定し、*Xist* 遺伝子上流領域のメチル化が胚体外組織における X^P の選択的な不活性化、および胚体組織におけるランダムな不活性化の双方に重要な役割を果たしている可能性を示唆していた。活性X染色体を2本持つマウス胚性幹細胞(ESC)は、細胞分化に伴ってXCIが起こるので、ESCを用いてその可能性を検討した。ESCを懸濁培養すると細胞塊を作りやがて三胚葉性組織を合わせ持つ胚様体となる。その後、胚様体の一部からしばしば卵黄嚢によく似た内外二層の組織からなる袋状の構造ができてくる。卵黄嚢の外側組織は原始内胚葉由来で、 X^P が選択的に不活性化しているので、胚様体における卵黄嚢様構造の外側組織におけるX染色体の不活性化パターンを調べた。結果は *in vivo* の場合と異なり不活性化が X^P に偏るということではなかった。この組織における *Xist* の発現が父方に偏らなかったというPCRによる結果もこれを支持している。したがって、ESCにおいては X^P の選択的な不活性化に関わるインプリンティングは、すでに消えているか、もしくは消えていなくてもその効果が覆い隠されているものと思われる。雌の体細胞では、*Xist* 5' 上流領域は活性X染色体で完全にメチル化されていて、不活性X染色体ではメチル化されていないことがすでに報告されていた。そこで、雌のESC、および雌の始原生殖細胞由来と思われるESC様細胞(EGC)のメチル化を調べた結果、これらの細胞では一見雌の体細胞のそれとよく似たパターンを示した。しかし、詳細な解析の結果、ESCおよびEGCでは、雌体細胞のようにメチル化が片方の遺伝子座に安定に保たれているわけではなく、むしろ不安定でそれまでメチル化されていた部位が脱メチル化され、されていなかった部位が新たにメチル化されるといったことが頻繁に起きていることが示唆された。これらの結果は、未分化な細胞において発現する *Xist* がその5' 上流領域の二者択一的なメチル化によって予め片方に決められているとするRastanのグループの報告と矛盾する。ESC、およびEGCが実際の胚の細胞の状態をどの程度反映しているかについては今後の解析を待たねばならないものの、胚体組織で見られるランダムなX染色体の不活性化にはこれらの細胞で見られたメチル化の不安定性が関与している可能性がある。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 田 廸 弘

副 査 教 授 高 木 信 夫

副 査 教 授 高 橋 孝 行

学 位 論 文 題 名

TOWARD THE UNDERSTANDING OF X CHROMOSOME INACTIVATION AT THE MOLECULAR LEVEL

(X染色体不活性化現象を分子レベルで解明する試み)

哺乳類の雌の体細胞は、胚発生のごく初期に2本あるX染色体のうち1本をそのほぼ全長にわたって不活性にすることで、雄との間にあるX連鎖遺伝子量の差を見かけ上解消している。このX染色体不活性化(XCI)の現象についてはこれまで数多くの研究がなされているが、その分子機構については殆ど研究が進んでいない。そこで申請者はマウスにおいてXCIに関わる遺伝子の単離とその解析を行った。

マウスの初期胚を用いたXCIの研究を進める上で問題となることは、XCIの起こる着床前後の胚が十分に得られないことである。そこで申請者はマウス初期胚における未分化な細胞とよく似た性質を持つ多分化能性の培養細胞である胚性腫瘍細胞(ECC)由来のMC12株およびC4サブクローンを用いた。MC12細胞では2本のX染色体のうち1本が不活性化しており、C4細胞では不活性X染色体が再活性化されているので、これら細胞を用いディファレンシャルスクリーニング法により遺伝子を単離した。得られた121a遺伝子は約2.5kbのこれまでに報告のない新たな遺伝子で、予想される335個のアミノ酸配列から121aは分泌型、あるいは膜結合型の糖タンパクをコードしていると考えられた。しかし、ノーザン解析を行った結果、121aは不活性X染色体がC4同様に再活性化した別のMC12のサブクローン2株、雌雄のマウス胚で各々発現されていたので、XCIと直接関連がないことが示唆された。一方、胚の発生過程における発現を*in situ*ハイブリダイゼーションで分析したところ、121aは中胚葉とそれ由来の組織、器官で特異的に発現されていることがわかった。また、こうした組織特異性に加えて、121aと相同の配列が有袋類を含む哺乳動物のみならず、ショウジョウバエにおいても存在することから121aは中胚葉の分化、あるいはその特性の維持に重要な役割を果たしている可能性がある。121a遺伝子は蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション法により第6染色体B1に位置づけした。

121a遺伝子はX染色体の不活性化に直接関わっていないことが分かったので、ヒトで単離されたX染色体不活性化に関連するXIST遺伝子を参考として、マウスの相同遺伝子Xistを単離

し、*Xist*の発現様式、およびプロモーター領域を含む*Xist*上流域のメチル化の解析を行った。マウス初期胚では、最初に分化する栄養外胚葉および原始内胚葉において父方由来のX染色体(X^P)が選択的に不活性化し、その後、将来胚体組織をつくる胚体外胚葉ではランダムな不活性化が起こることが知られている。前者で見られる X^P の選択的不活性化は X^P と母方由来のX染色体(X^M)が配偶子形成の過程で異なる修飾(ゲノムインプリンティング)を受けるためであると考えられている。Rastanらは*Xist*遺伝子の発現が不活性化するX染色体を決定し、*Xist*遺伝子上流領域のメチル化が胚体外組織における X^P の選択的な不活性化および胚体組織におけるランダムな不活性化の双方に重要な役割を果たしている可能性を示唆していた。活性X染色体を2本持つマウス胚性幹細胞(ESC)は、細胞分化に伴ってXCIが起こるので、ESCを用いてその可能性を検討した。ESCを懸濁培養すると細胞塊を作りやがて三胚葉性組織を合わせ持つ胚様体となる。その後、胚様体の一部からしばしば卵黄嚢によく似た内外二層の組織からなる袋状の構造ができてくる。卵黄嚢の外側組織は原始内胚葉由来で、 X^P が選択的に不活性化しているので、胚様体における卵黄嚢様構造の外側組織におけるX染色体の不活性化パターンを調べた。その結果、*in vivo*の場合と異なり、不活性化が X^P に偏るということとはなかった。また、この組織においては*Xist*の発現は必ずしも父方に偏っていない結果が得られた。したがって、ESCにおいては X^P の選択的不活性化に関わるインプリンティングは、すでに消えているか、もしくは消えていなくてもその効果が覆い隠されているものと思われる。雌の体細胞では、*Xist* 5' 上流領域は活性X染色体で完全にメチル化されていて、不活性X染色体ではメチル化されていないことがすでに報告されていた。そこで、雌のESCおよび雌の始原生殖細胞由来と思われるESC様細胞(EGC)のメチル化を調べた結果、これらの細胞では一見雌の体細胞のそれとよく似たパターンを示した。しかし、詳細な解析の結果、ESCおよびEGCでは、雌体細胞のようにメチル化が片方の遺伝子座に安定に保たれているわけではなく、むしろ不安定でそれまでメチル化されていた部位が脱メチル化され、されていなかった部位が新たにメチル化されるといったことが頻繁に起きていることが示唆された。これらの結果は、未分化な細胞において発現する*Xist*がその5' 上流領域の二者択一的なメチル化によって予め片方に決められているとするRastanらの報告と矛盾する。ESCおよびEGCが実際の胚の細胞の状態をどの程度反映しているかについては今後の解析を待たねばならないが、胚体組織で見られるランダムなX染色体の不活性化には、メチル化の不安定性が関与しているという新たな可能性が示唆された。

申請者は主論文の内容に直接関連した参考論文4編を国際学術専門誌に発表しており、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を慎重に検討した上で、申請者は北海道大学博士(理学)の学位を授与される資格あるものと認めた。