

学 位 論 文 題 名

Significance of partial methylation of mouse *Xist* gene
in X chromosome inactivation : analysis of X chromosome
reactivation induced by cell fusion between embryonal
carcinoma cell and female somatic cell

（マウスX染色体不活性化における *Xist* 遺伝子の部分的メチル化の意義：
胚性腫瘍細胞と雌体細胞との細胞融合による再活性化X染色体における解析）

学位論文内容の要旨

X染色体の不活性化(XCI)は、ほ乳類の雌に特有な現象である。ほ乳類の雌は2本のX染色体を持ち、そのいずれか1本が胚発生の初期に全長にわたって不活性化し、X染色体を1本しか持たない雄との間の遺伝子量の差を補正していると考えられている。現在まで、XCIについては多くの研究がなされてきたが、XCIの分子機構についての解析は進んでいるとはいえない。しかし、近年、XCIを制御する中心的な遺伝子の候補として不活性X染色体(Xi)から特異的に発現される *Xist* 遺伝子が発見されたことで、詳細な分子機構の解析が進展することが期待されている。DNAのメチル化は、遺伝子の発現を抑制することが知られており、Xi上のハウスキーピング遺伝子は、そのCpGアイランドがメチル化されることで発現が抑えられていると考えられている。本学位論文は、X染色体の活性変化に伴う *Xist* 遺伝子のメチル化と発現との関係についての解析を試みたものである。

マウス胚性腫瘍細胞(ECC)は、奇形ガン腫の幹細胞であり、マウス初期胚の未分化細胞とよく似た特徴を持つため、多量の材料を得ることが難しいほ乳類の初期発生を研究する上で格好の *in vitro* のモデルとして利用されてきた。このECCと、雌の体細胞を細胞融合して得られるECC様の融合細胞においては、細胞融合後数回の細胞分裂を経て雌の体細胞に由来するXiが再活性化される。この再活性化されたX染色体は、他の染色体と同調的に複製を行い、それまで発現していなかった染色体上の *Pgk-1* を発現するようになり、融合細胞を分化させた場合、他のX染色体にまじってランダムに不活性化する能力を持っていることから、この再活性化はXCIの完全な逆反応であると考えられる。不活性化がおきる際の変化で大切なものは、この際に反対方向へ変化するはずであると考え、不活性化の開始に重要であるとされる *Xist* 遺伝子のメチル化の変化についての解析を行うことにした。

これまで、すべてのECCがこの不活性X染色体の活性化能を持っているかどうかについては報告がなかった。そこで数種類のECCと雌体細胞とを細胞融合し、得られた融合細胞におけるX染色体の活性状態を複製バンド法によって調べた。今回用いた親細胞と融合細胞はすべてECCとしての特徴を備えたものであるにも

関わらず、PSA1、OTF9-63、LT-1には再活性化する能力が認められたが、P19、B242g、C4-X0にはその能力は欠如しており、ECCは明確に2つのグループに分けられることがわかった。ECCと、融合細胞における*Xist*と*Hprt*のmRNA発現をRT-PCR法によって解析したところ、すべての細胞で*Hprt*の発現は検出されたが、*Xi*を持たないECCでは*Xist*の発現は検出されなかった。また、融合細胞においても再活性化が起こった細胞では、*Xist*の発現が検出されず、*Xi*を持つ融合細胞では体細胞と同様に*Xist*の発現が検出された。このように、細胞融合による再活性化においても*Xist*は発現されなくなり、しかもこれは細胞融合自体が原因ではなく、X染色体が再活性化したことによるものであることがわかった。

*Xist*は、その塩基配列に適当なORFが見いだされないでRNAとして機能していると考えられている遺伝子であるが、実際の機能についてはまだ全くわかっていない。*Xist*の発現は他のX染色体上の遺伝子と同様にメチル化の支配を受けていることが明らかになりつつある。体細胞においては発現している*Xist*の5'側上流域はメチル化されておらず、逆に発現していないXa上の*Xist*はメチル化されていることが知られているが、これはXaと*Xi*を1本ずつ持つようなECCにおいても同様であることがわかった。X染色体を1本だけ持つECCでの*Xist*のメチル化を調べたところ、再活性化する能力を持たないP19、B242gでは*Xist*は発現しておらず、体細胞の場合と同様にほぼ完全にメチル化されていた。一方、再活性化能を持つPSA1、OTF9-63も*Xist*は発現していないが、メチル化は約50%で、脱メチル化と新たなメチル化とが平衡状態を保っていることがわかった。X染色体を2本持つECCにおいては、再活性化する能力のあるLT-1のメチル化は不安定であったのに対して、C4では2つの*Xist*が両方とも完全にメチル化されていた。このように、*Xi*を再活性化する能力と*Xist*遺伝子のメチル化の状態との間には相関があることがわかった。

融合細胞においては、再活性化が起こらなかった場合には、完全にメチル化された*Xist*と、逆に完全にメチル化されていない*Xist*とが同時に検出され、細胞融合による*Xist*のメチル化の変化はないことがわかった。ところが、再活性化が起こった場合には*Xist*のメチル化には劇的な変化が認められた。体細胞のXa上では*Xist*は完全にメチル化されているが、細胞融合後に染色体の活性には何の変化もないにも関わらず、融合細胞のなかでは脱メチル化が進んでいた。一方、再活性化が起こったX染色体上においては*Xist*の発現が抑えられただけでなく、新たにある程度のメチル化が起こっていて、結果的に融合細胞内では3-4本あるX染色体上の*Xist*が親ECCとほぼ同程度にメチル化されていて、しかも動的に平衡状態が維持されていることがわかった。この様なメチル化の変化は、雌体細胞との細胞融合の時だけではなく、雄の体細胞と再活性化能のあるECCとを融合した場合にも、染色体の活性に変化は起こらないが、雄体細胞由来のXa上で*Xist*の脱メチル化が起こっていることがわかった。この特色あるメチル化が、再活性化能のあるECCのX連鎖遺伝子に特有なものかもしれないという可能性を*Hprt*遺伝子を利用して次に検討した。

体細胞では、*Hprt*の第1イントロンのCpGアイランドは、*Xi*上ではメチル化されているのに対して、活性X染色体(Xa)上ではメチル化されていない。ECCでは、Xaしか持たない場合には*Hprt*はメチル化されておらず、*Xi*を持つ細胞だけがメチル化された*Hprt*を持っていることを確認した。また、融合細胞においては、再活性化がおきたときには活性化されたX染色体上の*Hprt*で脱メチル化が起こり、再活性化がおきなかった場合には、メチル化されたものとメチル化されていないものとが同時に検出され、*Hprt*のメチル化に変化がないことがわかった。このように、X染色体上のハウスキーピング遺伝子である*Hprt*のメチル化は、X染色体の活性変化とよく一致して変化し、*Xist*にみるような特異なメチル化はおきていないことがわかった。以上

の結果は、細胞融合によってそれぞれの遺伝子のメチル化についても不活性化の前の状態に引き戻されていることを示唆するものであった。

このように *Xist* 遺伝子に特有とみられる不安定なメチル化が再活性化の原因であるか結果であるかについては明らかにすることができなかったが、マウス胚性幹細胞(ESC)においても同様なメチル化が観察されており、実際のマウスの胚発生においてもこの不安定なメチル化が不活性化されるべきX染色体を決定する段階で利用されている可能性がある。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 高 木 信 夫

副 査 教 授 木 村 正 人

副 査 教 授 吉 田 勉 弘

副 査 助教授 若 原 正 己 (大学院理学研究科)

学 位 論 文 題 名

Significance of partial methylation of mouse *Xist* gene
in X chromosome inactivation : analysis of X chromosome
reactivation induced by cell fusion between embryonal
carcinoma cell and female somatic cell

(マウスX染色体不活性化における *Xist* 遺伝子の部分的メチル化の意義：
胚性腫瘍細胞と雌体細胞との細胞融合による再活性化X染色体における解析)

X染色体の不活性化(XCI)は、哺乳類に特有な現象で、胚発生の初期に雌の2本のX染色体のいずれか1本がランダムに選ばれ、全長にわたって不活性化し、X染色体が1本の雄とのX連鎖遺伝子量の差を補正している。これまで、多くの研究はあるものの、XCIの分子機構の解析は進んでいない。しかし、近年、XCIを制御する遺伝子の候補として不活性X染色体(Xi)から特異的に発現される *Xist* 遺伝子が発見され、その発現制御とDNAのメチル化の関連が注目されている。マウス胚性腫瘍細胞(ECC)は、奇形ガン腫の幹細胞で、マウス初期胚の未分化細胞の特徴を持つため、多量の材料を得ることが難しい哺乳類の初期発生研究の *in vitro* モデルとして利用されてきた。ECCと雌体細胞を融合して得られるECC様の雑種細胞では、数回の細胞分裂を経て雌体細胞由来のXiが活性化される。活性化は完全で、XCIの逆反応であると考えられる。本学位論文は、不活性化の際の変化で重要なものは、この場合に反対方向へ変化するはずであると考え、*Xist* 遺伝子のメチル化の解析を行ったものである。

最初に数種のECC株の活性化能を雌体細胞との融合によって調べた。報告通り、PSA1、OTF9-63、LT-1には再活性化する能力があるが、P19、B242g、C4-X0には欠如していた。RT-PCR法により解析した結果、*Hprt* の発現はすべてのECCと、融合細胞で検出されたが、*Xist* の発現はXiを持たないECCと再活性化が起こった融合細胞では検出されなかった。

Xist の発現は他のX連鎖遺伝子と同様にメチル化の支配を受けていることが明らかに

なりつつある。体細胞では発現している *Xist* の5'側上流域はメチル化されておらず、発現していないXa上の *Xist* はメチル化されている。X染色体を1本持つECCでの *Xist* のメチル化を調べたところ、活性化能を持たないP19、B242gでは *Xist* は発現せず、ほぼ完全にメチル化されていた。一方、活性化能を持つPSA1、OTF9-63でも *Xist* は発現していないが、メチル化は約50%で、脱メチル化と新たなメチル化とが平衡状態にあることを明らかにした。X染色体を2本持つECCにおいては、活性化能のあるLT-1は同様なメチル化を示したが、C4では *Xist* が双方とも完全にメチル化されていた。このように、*Xi* を活性化する能力と *Xist* 遺伝子のメチル化状態との間には密接な相関があることがわかった。

活性化が起こらなかった融合細胞では、完全にメチル化された *Xist* と、逆に完全にメチル化されていない *Xist* とが同時に検出され、細胞融合による *Xist* のメチル化の変化はないことがわかった。ところが、活性化が起きた場合には *Xist* のメチル化には劇的な変化が認められた。完全にメチル化されていたXa上の *Xist* は融合細胞中では脱メチル化が進む。活性化したX染色体上の *Xist* は発現が抑えられるだけでなく、新たなメチル化が起こり、融合細胞内では全てのX染色体上の *Xist* が親ECCとほぼ同程度にメチル化され、しかも動的に平衡状態が維持されていることがわかった。この様な変化は、雄の体細胞と活性化能のあるECCとを融合した場合にも起こっている。

この特色あるメチル化が、活性化能のあるECCのX連鎖遺伝子に普遍的である可能性もあるが、検討の結果 *Hprt* 遺伝子には認められないことが判明した。

以上のように本論文は、XCIに伴ってメチル化あるいは脱メチル化した *Xist* 遺伝子はX染色体の活性化により中間的な状態に引き戻されることを明らかにした。ここでは不断にメチル化と脱メチル化が起こり動的平衡状態にある。XCIが起こる前の未分化マウス胚性幹細胞(ESC)においても同様なメチル化が観察されており、実際のマウスの胚発生においてもランダムなX染色体不活性化が起きるエピプラストでの *Xist* 遺伝子は同様なメチル化状態にあると推定される。現状では、単なる並行現象との見方もあり得るが、このような独特なメチル化が不活性化されるべきX染色体を決定する段階で利用されている可能性がある。いずれにせよ、この知見はこれまで難航してきた *Xist* 遺伝子の機能解析に波紋を与え、更に前進させる契機になると期待される。

審査員一同は、この成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（地球環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。