

学 位 論 文 題 名

Unique Properties of the Inactivated X Chromosome in Mammals Revealed by Cell Hybridization

（細胞融合法によって明らかにされた哺乳類不活性X染色体の特異な性質）

学位論文内容の要旨

哺乳動物の雌初期胚細胞では、同一核内にある2本のX染色体のうち1本が転写因子に対する反応性を失い転写レベルで不活性となる。このようにして、 3×10^9 塩基対よりなるハプロイドゲノムの約5%を占めるX染色体の上に存在する遺伝子の量は、ごく少数の例外を除いて雌雄で等しくなる。不活性化されたX染色体は、晩期複製、ヘテロクロマチン化、CpG島のメチル化、ヒストンH4のアセチル化、*Xist*遺伝子産物の結合など、染色体全長にわたる特徴を示すようになり、その状態は細胞分裂を通して安定に維持される。これまで不活性化について膨大な数の研究が為されてきたが、その分子レベルの機構については殆ど明らかになっていない。

哺乳動物の不活性X染色体が、ほぼ例外なく異周期的複製を行い、ヘテロクロマチン化されることから、両者は不活性化に不可欠なものと考えられてきた。私は、不活性化現象の分子的側面解明の手掛かりを得ることを目的として、細胞融合法および微小細胞融合法を用いて、X染色体の異周期的複製とヘテロクロマチン化に関する解析を試みた。本論文の前半では、S期のはじめに複製を完了する早期複製X染色体が、他種細胞との融合により晩期複製型へと移行する現象を取り上げた。後半部には、微小細胞融合法によりマウス細胞内に導入されたヒト不活性X染色体の行動を、その遺伝子発現、ヘテロクロマチン化、性染色質の形成、*XIST*の発現とメチル化、ヒストンH4のアセチル化などについて詳細に解析した結果を示した。

一般に不活性X染色体はS期の後半に集中的に複製を行うが、S期の前半に速やかに複製を終了するような不活性X染色体もマウスの初期胚や骨髓細胞などで見出されて来た。しかし、早期複製X染色体を持つ細胞の出現が一過性で、その頻度も必ずしも高くないことから、そのような染色体に関する解析は進んでいなかった。我々の研究室で単離されたマウス胸腺リンパ腫由来の細胞株MTLB3とMTLH8は、この早期複製X染色体を安定に保持しているため、初めてその複製時期に関する解析が可能となった。まず、(1)ノーザンハイブリダイゼーションによる*Hprt*、*Pgk-1*遺伝子の発現レベル、及び、G6PDの酵素比活性、(2)*Pgk-1*遺伝子の5'プロモーター領域、及び、*Hprt*遺伝子の第一イントロンのメチル化状態、(3)*Xist*遺伝子の発現などを調べ、MTLB3やMTLH8の早期複製X染色体が不活性であることを確

認した。この早期複製X染色体が常染色体断片の転座を持つため形態的に他の染色体と区別できることを利用して、高温低張処理による Kanda 法、及び、抗アセチル化ヒストン抗体による間接蛍光抗体染色法によっても不活性化状態が確認された。MTLB3 や MTLH8 を、マウス胚性腫瘍細胞 OTF9-63, ラット筋芽細胞 L6TG, 有袋類腎細胞 PtK₂, チャイニーズハムスター肺由来細胞 V79HP, ヒト子宮頸部癌由来細胞 HeLaTG などの培養細胞株と融合したところ、不活性X染色体の複製時期がS期の前半から後半へと変化することが認められた。更に、この複製時期の変化は融合相手のゲノムの複製なしでは起こらないことも示した。以上の結果から、(i) X染色体の不活性化に晚期複製は不可欠ではなく、(ii) 晚期複製はトランスに働く因子によって制御されており、(iii) この因子の欠乏が MTLB3 や H8 細胞で見られたような不活性X染色体の早期複製をもたらすこと、更に、(iv) この因子はS期に合成あるいは活性化され、次の細胞分裂に入ると急速に不活性になることが示唆された。

一般に、不活性X染色体は間期核の核膜近傍に局在して、高度に凝縮した性染色質を形成する。しかし、私は、ヒトの染色体としては不活性X染色体のみを1～数本含むヒト・マウス雑種細胞 CF150 細胞において不活性X染色体が性染色質を形成せず、細胞分裂前中期においても特異的な凝縮を示さないことを見出した。この事実は、X染色体を含む数本のヒト由来染色体を持つヒト・マウス雑種細胞で、ヒト不活性X染色体が凝縮せず、核の周辺に局在しないとした Dyer ら(1989)の報告と一致する。更に、CF150 細胞のヒト不活性X染色体のヒストン H4 は、通常とは異なり、他のマウス染色体と同程度にアセチル化されているという意外な事実も明らかにした。このX染色体が不活性であることは *TIMP*, *POLA*, *AR*, *PGK1*, *G6PD* などのX連鎖遺伝子の発現がないこと、及び、ヒト *XIST* 遺伝子の発現から明らかなので、マウス細胞中でヒト不活性X染色体は性染色質の形成やヒストン H4 の低アセチル化なしで不活性状態を維持できることになる。おそらくは核膜への結合部位の様な種特異的要因が、性染色質の形成には中心的役割を果たしているものと考えられる。

X染色体の活性調節に関する種間の違いを明らかにするために、CF150 のヒト不活性X染色体を微小細胞融合法を用いてマウス胚性腫瘍細胞(PSA-TG8, OTF9-63)中に導入した。得られた 21 個のクローンはいずれも親細胞であるマウス胚性腫瘍細胞の形態を保持しており、CF150 由来の完全長のヒトX染色体、あるいは、その断片を含んでいた。クローン中の全てのヒトX染色体は他のマウス染色体と同調して複製しており、CF150 では発現していなかったヒトX連鎖遺伝子の活発な転写が認められたことから、マウス胚性腫瘍細胞中で再活性化したものと考えられた。ところが、通常、再活性化に伴い転写を停止すると期待される *XIST* 遺伝子が、親細胞と同じレベルで発現し続けていることが明らかになった。この活性 *XIST* 遺伝子の 5'上流のメチル化状態を調べたところ、ほぼ完全にメチル化されているものから、ほとんどメチル化していないものまでクローンによって違っていた。マウス胚性腫瘍細胞は、ヒト不活性X染色体上の *XIST* 遺伝子のメチル化状態を完全ではないにしろ変えられるが、その発現を抑制することは出来ないと推定される。更に、得られたクローンをを用いて細胞分化による再不活性化を試みたがマウス、ヒトいずれのX染色体の不活性化も確認できなかった。以上の結果から、マウス胚性腫瘍細胞中では、ヒトX染色体上の *XIST* 遺伝子を含む不活性化中心が完全には機能できないと考えられる。

本研究により、培養細胞中の不活性X染色体は多くの因子によって維持されており、そのうちの幾つかが欠けても、不活性状態は安定して保たれると結論される。しかし、不活性化に関わる全ての要因が明らかにされた訳ではなく、また、各々の重要度も明らかになっていない。X染色体の不活性化機構を分子レベルで解明しようとする試みは、今、ようやく、その端緒にたどり着いたと言えよう。

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 教 授 高 橋 孝 行 (大学院理学研究科)

学 位 論 文 題 名

Unique properties of the inactivated X chromosome in mammals revealed by cell hybridization

(細胞融合法によって明らかにされた哺乳類不活性X染色体の特異な性質)

哺乳類の雌初期胚細胞では、同一核内にある2本のX染色体の1本が転写レベルで不活性となる。このようにして、ハプロイドゲノムの約5%を占めるX染色体上の遺伝子の雌雄差は補正される。不活性化されたX染色体(Xi)は晩期複製、ヘテロクロマチン化、CpG島のメチル化、ヒストンH4のアセチル化、Xist遺伝子産物との結合など染色体全長にわたる特徴を示し、その状態は細胞分裂を通して安定に維持される。

Xiは殆ど例外なく異周期的複製を行い、ヘテロクロマチン化されるので、両者は不活性化に不可欠と考えられてきた。当研究では細胞融合法および微小細胞融合法を用いて、これらに関する解析を試みた。論文の前半では、S期のはじめに複製を完了する早期複製X染色体が、他細胞との融合により晩期複製型へと移行する現象を取り上げ、後半部では、微小細胞融合法によりマウス細胞内に導入されたヒトXiの行動を検討している。

通常、XiはS期の後半に複製するが、S期の前半に速やかに複製を終了するXiと見られる染色体も度々報告されて来た。しかし、その様なX染色体を持つ細胞の出現は一過性で、頻度も高くないことから、解析は進まなかった。新たに単離されたマウス胸腺リンパ腫細胞株MTLB3とMTLH8は、早期複製X染色体を安定に保持しているため、初めて解析が可能となった。(1)ノーザン解析によるHprt, Pgk-1遺伝子の発現レベルとG6PDの酵素比活性、(2)Pgk-1遺伝子とHprt遺伝子のメチル化、(3)Xist遺伝子の発現などより、早期複製X染色体が不活性であることを確認した。さらに、この早期複製X染色体が形態的に他の染色体と区別できることを利用して、細胞遺伝学的に不活性化状態の傍証を得た。MTLB3やMTLH8をヒト、マウス、ラット、チャイニーズハムスター、有袋類の培養細胞株と融合すると、Xiの複製がS期の前半から後半へと変化した。この変化は融合相手の

ゲノムの複製なしでは起こらない。したがって、(i) X染色体の不活性化に晩期複製は不可欠ではなく、(ii) 晩期複製はトランスに働く因子によって制御されており、(iii) この因子の欠乏がXiの早期複製をもたらすこと、そして (iv) この因子はS期に合成あるいは活性化され、その後速やかに不活性化されると考えられる。

Xiは間期核の核膜に接して凝縮した性染色質を形成する。しかし、ヒトの染色体としてはXiのみを1～数本含む、ヒト・マウス雑種細胞CF150において、申請者はヒトXが性染色質を形成せず、細胞分裂前中期にも凝縮しないことを見出した。また、ヒストンH4はマウス染色体と同程度にアセチル化されている事実も明らかにした。TIMP, POLA, AR, PGK1, G6PDなどX連鎖遺伝子の発現欠如と、ヒトXIST遺伝子の転写からこのX染色体は間違いなく不活性である。マウス細胞中でヒトXiは性染色質の形成やヒストンH4の低アセチル化なしで不活性状態を維持できることになる。おそらく、核膜への結合部位の様な種特異的要因が、性染色質の形成に中心的役割を果たしていると考えられる。

X染色体の活性調節に関する種差を検討するために、ヒトXiを微小細胞融合法により未分化マウス胚性腫瘍(EC)細胞に導入した。得られたクローンはいずれもEC細胞の形態を保持し、CF150由来のヒトX染色体またはその断片を含んでいた。ヒトX染色体はマウス染色体と同調して複製し、CF150では発現していないX連鎖遺伝子の転写が認められ、活性化したと考えられた。ところが、XIST遺伝子は親細胞と同レベルで発現していた。この活性XIST遺伝子の5'上流は、ほぼ完全にメチル化しているものから、殆どされていないものまでクローンによって差があった。マウスEC細胞は、ヒトXi上のXIST遺伝子のメチル化状態をある程度変えることは出来ても、発現を抑制することは出来ないと推定される。得られた雑種クローンをを用いてX染色体の再不活性化を試みたが成功には至らなかった。したがって、マウスEC細胞では、ヒトの不活性化センターは完璧には機能できないと考えられる。また、培養細胞のXiは多くの因子によって維持されており、その幾つかが欠けても、不活性状態は安定に保たれうると結論される。

以上のように本論文はXX・XY型性決定機構の出現によって、哺乳類の雌雄間に生じたX連鎖遺伝子量の差を補正するために出現した不活性X染色体の特性を細胞遺伝学、細胞工学、分子生物学的な手法で解析を試みたものである。長年にわたる努力により得られたこれらの知見が更なる研究に大きく寄与するものと期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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。