

## 学位論文題名

## Detection and cloning of X-linked locus that escapes DNA methylation by the RLGS-M method.

(RLGS-M法によるDNAメチル化を免れるX連鎖座位の検出とクローニング)

## 学位論文内容の要旨

X染色体上には細胞の機能や個体の生存のために必須な遺伝子が多数存在するにもかかわらず、哺乳類の雌と雄の間にはその数に二倍の差がある。このため、雌では2本のX染色体の一方が不活性化されることにより雌雄間のX連鎖遺伝子量が補正されるが、X染色体とY染色体の相同部分である偽常染色体領域は例外で、不活性化は及ばない。偽常染色体領域はヒトではX染色体短腕の遠位側とY染色体短腕の遠位側、マウスではX染色体の遠位側とY染色体長腕の遠位側にそれぞれ存在する。X染色体の不活性化は発生の初期に起こり、どちらのX染色体が選ばれるかは細胞によってランダムに決まる。ヒトではX染色体の偽常染色体領域外にも不活性化を免れる遺伝子がいくつか報告されているが、マウスではそれらの相同遺伝子のうち*Xe169/Smcx*, *Utx*, *eIF-v* 以外のほとんどは不活性化を受けている。

X連鎖遺伝子でCpG島をもつものは、その発現とCpG島のメチル化に相関がみられる。すなわち、活性アレルはメチル化を受けておらず、不活性アレルはメチル化を受けている。X染色体の不活性化を免れる機構はほとんど分かっていないが、マウスのX染色体はヒトのX染色体よりもより完全に不活性化しているため、マウスの不活性化を免れる遺伝子の同定は不活性化の機構を解析する手掛かりとなる可能性がある。そこで、本研究ではX染色体の不活性化を免れる遺伝子の同定を目的に、すべてのX染色体が単一の起源をもつXX、X0、XYマウスを作成し、そのゲノム上のメチル化の違いをRLGS-M法 (Restriction landmark genomic scanning using methylation-sensitive endonuclease method) により探索した。RLGS-M法はメチル感受性制酵素を用い、その制限部位を放射性同位元素で標識するため、ゲノム上のメチル化されていない制限部位はDNAの二次元電気泳動によりスポットとして検出する。また、そのスポットの強度はアレルの数に比例する。X染色体の不活性化を免れる遺伝子のCpG島はDNAのメチル化を免れているものと考えられるため、XX、X0、XYマウスにおいてそのような遺伝子に相当するスポットの強度はそれぞれ1、0.5、0.5になるものと推測される。

メチル感受性制酵素として*NotI*を用いてXX、X0、XYマウスをRLGS-M法で解析したところ、8つの候補座位を検出した。その1つをクローニング後、周辺を含むコスミドクローンを単離し部分塩基配列を決定した。RLGS-Mで検出した座位はCpG島内にあり、その近傍には3つのマウスのEST (expressed sequence tag) に相同性のある配列が見い

だされた。RT-PCRによりこの3つのESTは2つの転写単位をコードしていることが確認された。両転写単位の塩基配列はともにヒトEXLM1に有意な相同性が認められたため、Exlm1a, Exlm1bと名付けた。ヒトEXLM1遺伝子はX染色体の不活性化を免れるものとして、RLGS-M法により最近同定されたものである。アミノ酸配列を推定し比較したところ、Exlm1bはヒトEXLM1全体と類似していたが、Exlm1aはヒトEXLM1のN末端側のみ相同性があった。Exlm1aのヒトEXLM1と相同性のない部分は齧歯類にのみ存在するB2繰り返し配列であった。B2配列はORFの3'側と3'UTRに及んでおり、ポリA付加配列はB2に由来するものであった。マウスExlm1a, bに存在するヒトEXLM1相同性領域の塩基配列を比較すると完全に一致し、この領域はサザンハイブリダイゼーションによりマウスのゲノム中の1座位にしか存在しないことから、両者は選択的RNAスプライシングにより1つの遺伝子Exlm1から発現されたものであると考えられた。また、日本産野生マウス由来の近交系統であるMSM(*Mus musculus molossinus*)と実験用マウスC3H/He(*M. m. domesticus*)の戻し交配によって得た55頭のマウスを用いて連鎖解析を行い、X染色体の近位側領域にマップした。この領域はヒトのEXLM1遺伝子付近とsyntenicであった。以上のことからマウスExlm1遺伝子はヒトEXLM1遺伝子の相同遺伝子であると考えられる。

Exlm1遺伝子の発現はX染色体と16番染色体の相互転座であるSearle転座を持つマウスを用いてRT-PCR法により解析した。Searle転座を持つ雌マウスでは、正常X染色体が必ず不活性化しているため、ゲノムに多型が存在すればExlm1がどのX染色体から発現しているか知ることができる。そのため、日本産愛玩マウス由来の近交系JF1マウスの正常X染色体と転座X染色体を同時に持つマウスを作成して検討したところ、Exlm1a, Exlm1b共に活性X染色体のみから転写されており、Exlm1遺伝子は不活性化を受けることが明らかになった。マウスExlm1遺伝子のゲノム構造を解析するため、コスミドクローンの塩基配列を決定した。Exlm1aを含むゲノム配列は18.5 kbあり、11個のエキソンからなっていた。B2配列は最後のエキソンに存在し、スプライシングによりExlm1aに取り込まれたものと考えられる。プライマー伸長法で転写開始点を解析したところ、RLGS-M法で検出したNotI制限部位を含むCpG島中の数箇所から転写の開始が認められた。

マウスExlm1のcDNAとヒトEXLM1のcDNAはORFだけでなく5'UTRにも相同性が見られたが、マウスでは不活性化を受け、ヒトでは不活性化を免れる。また、ヒトEXLM1遺伝子でもマウスExlm1遺伝子と同様に5'UTRがGCに富んでいるため、転写開始部位がCpG島にあると考えられる。ヒトEXLM1遺伝子の構造とメチル化状態は今のところ不明であるが、マウスExlm1遺伝子との比較により、不活性X染色体上の遺伝子が活性であるか、不活性となるかを決定する塩基配列の同定が期待される。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 高 木 信 夫  
副 査 教 授 吉 田 勉 弘  
副 査 助 教 授 瀧 谷 重 治  
副 査 助 教 授 鈴 木 仁

学 位 論 文 題 名

### Detection and cloning of X-linked locus that escapes DNA methylation by the RLGS-M method.

(RLGS-M 法による DNA メチル化を免れる X連鎖座位の検出とクローニング)

一般に、遺伝子量のバランスは生物にとって極めて重要な意味を持っている。最も良く知られているヒトやマウスの例を挙げるならば、常染色体のモノソミーは着床前に失われ、トリソミー個体は流死産や出産直後の死を引き起こす重大な影響を与える。しかし、X染色体は例外で、雌で2本、雄で1本と2倍の差があるにも関わらず、不都合は生じていない。性染色体とはいっても、X染色体には常染色体同様、細胞の機能や個体の生存のために必須な遺伝子が多数存在する。哺乳類では、このため雌の2本のX染色体の一方を不活性化することにより、雌雄間に存在する二倍のX連鎖遺伝子量差を補正している。ただし、X染色体とY染色体の相同領域である偽常染色体領域は例外で、不活性化はこの領域には及ばない。偽常染色体領域以外にも、ヒトでは不活性化を免れる遺伝子が多数知られているが、マウスではそれらの相同遺伝子はほとんどが不活性化を受けており、マウスで不活性化を免れる遺伝子として知られているものは極めて少ない。不活性化センターで始まった不活性化は染色体の両端に向かって広がり、一旦不活性化が終了するとその状態は安定に保たれ、体細胞分裂をくり返しても活性化することはないとされている。従って、不活性X染色体上に散在する不活性化を免れる遺伝子は不活性化の機構を解明するためだけではなく、不活性化現象の進化という観点からも興味ある検討対象である。本論文はマウスの不活性X染色体上で不活性化を免れる遺伝子をRLGS法によって検索し、あわよくば不活性化に働く遺伝子の検出を試みたものである。結果的には不活性化関連遺伝子の同定には至らなかったが、興味ある遺伝子のクローニングに成功した。

CpG島をもつX連鎖遺伝子ではその発現とCpG島のメチル化に相関が見られる。不活性アレルではメチル化され、活性アレルではメチル化されていない。そこで、本研究

ではX染色体の不活性化を免れる遺伝子を探索するために、兄妹交配を30代くり返したX0系統のマウスを利用し、単一起源のX染色体を持つXX, X0, XY個体のゲノム上のメチル化の違いをRLGS-M法 (Restriction Landmark Genomic Scanning using methylation-sensitive endonuclease method) により解析した。RLGS-M法はメチル化感受性制限酵素を用い、その切断部位を放射性同位元素で標識するため、ゲノム上のメチル化されていない制限部位はDNAの二次元電気泳動によりスポットとして検出できる。また、スポットの強度はアレルの数に比例する。不活性化を免れる遺伝子のCpG島はDNAのメチル化を免れていると考えられるので、XX, X0, XYマウスではその様な遺伝子に相当するスポットの強度はそれぞれ1, 0.5, 0.5 になるものと推定される。

メチル化感受性制限酵素としてNotIを用いて解析したところ、8個の候補座位を検出した。そのひとつをクローニング後、周辺を含むコスミドクローンを単離し、部分配列を決定した。その結果、この座位はCpG島内にあり、その近傍には3個のマウスEST(expressed sequence tag) に相同性のある配列が見出された。これらをもとに、不活性X染色体上に存在しながらメチル化を免れる遺伝子座のクローニングに成功した。そこには不活性化を免れるヒト遺伝子EXLM1のマウス相同遺伝子*Exlm1*が存在し、腎臓で選択的スプライシングによると観られる転写単位、*Exlm1a, b*が見出された。推定されるアミノ酸配列を比較したところ、*Exlm1b*はヒトEXLM1に酷似し、*Exlm1a*はEXLM1のN末端側にのみ相同性を示した。また、*Exlm1a*にはORFの3'側と3'UTRにおよぶマウスB2配列が認められた。遺伝子は11個のエキソンを含み18.5 kbである。B2配列は最後のエキソンに存在し、スプライシングにより*Exlm1a*に取り込まれたものと考えられる。ゲノムの多型を用いた解析により、*Exlm1*遺伝子はX染色体の近位側にマップされ、ヒトとは違って不活性化を受けることが判明した。CpG島内の他の部位ではメチル化されており、当研究では不運にも例外的な部分を検出したものと思われる。

以上のように、本研究では初期の目的に合う遺伝子を分離することは出来なかったが、意欲的な検索の結果、注目に値する遺伝子のクローニングに到達した。ヒト相同遺伝子との比較によって不活性化の機構を解明する手掛かりとなる可能性もあり、今後の発展を期待したい。

審査員一同は、これらの成果と努力を高く評価し、大学院課程における研鑽や単位取得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断した。