

生物機能応用科学

氏名 籠谷 和弘
 学位記番号 生博 甲第 122 号
 学位記授与の日付け 平成 14 年 3 月 25 日
 学位論文題目 Studies on Intracellular Dynamics of Imprinted Gene Regions in Mammalian Cells
 (哺乳類細胞におけるインプリント遺伝子領域の核内ダイナミクスに関する研究)

論文審査委員会 主査 教授・田口 寛
 教授・古市 幸生
 教授・田中 晶善
 助教授・奥村 克純

要 旨

ゲノム・インプリンティングは、遺伝子が由来する親の起源が刻印される哺乳類に特徴的な生物学的現象である。すなわち、インプリンティングを受ける遺伝子（インプリント遺伝子）では、両親それぞれから受け継いだ特定の一对の対立遺伝子（アレル）のうちの一方は発現し、もう一方は不活性化される。インプリント遺伝子の発現の調節は、哺乳類の発生過程に特に重要であり、その異常は胚の発生などに大きく影響する。例えば過大牛症候群などの発生異常の一因であり、細胞のがん化にも大きな関わりをもつ。さらに、クローン動物作出時の出生率の低下の原因の一つは、インプリンティングの異常であることが知られ、家畜の発生異常や生産に大きく関連するゲノム・インプリンティングのメカニズムに関する知見を得ることは極めて意義深いと考えられる。

本研究では、哺乳類ゲノム、特にゲノム・インプリンティングの研究が最も盛んなヒトやマウスの細胞を用いて、核内の DNA 複製の様式や遺伝子の転写、核内ゲノムの構造などのダイナミックな過程について、インプリント遺伝子領域のゲノムを可視化することにより解析を行い、ゲノム・インプリンティングに関する新たな知見を得ることを目的とした。

はじめに、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法を用いて、インプリント遺伝子領域の細胞周期 S 期における DNA 複製時期及び核内ゲノム構造の解析を行った。DNA 複製時期の解析の結果、代表的なインプリント遺伝子領域である small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N (SNRPN) を含むヒト 15 番染色体 q11-

q13 に存在する Prader-Willi/Angelman syndrome (PWS/AS) 領域や、マウスの 7 番染色体遠位部の insulin-like growth factor II (*Igf2*) を含むマウス *Igf2* 領域では一般的なゲノム領域とは異なり、アレル間で複製時期が異なる非同調的複製が見られた。さらにこれらの領域での早期複製アレルを解析した結果、PWS/AS 領域では母親アレルが早期複製する新たな複製ドメインが見つかり、この領域はいくつかのアレル特異的な複製ドメインにより構成されていることを見出した。一方、これまでの知見と合わせてマウス *Igf2* 領域では、父親アレルが早期複製する複製ドメインが約 1Mb にわたって存在することを明らかとし、さらにこの複製ドメインは胚性幹細胞である ES 細胞で既に確立されており、遺伝子の発現制御に先立って、複製制御が行われる可能性が示唆された。核内ゲノム構造の解析では、よりサイズの大きな酵母人工染色体 (YAC) クローンを用いて、インプリント遺伝子領域の核内ゲノム構造を蛍光シグナルとして可視化し、解析を行った。その結果、インプリント遺伝子領域ではアレル間で YAC シグナルが非対称な形として検出されるパターンが多く、一方のアレルでは伸展したシグナル、もう一方ではコンパクトなシグナルが観察され、アレル間でゲノム構造の伸縮の違いが示された。また、この現象はゲノム領域が複製される前にすでに観察され、伸展したゲノム構造は早期複製アレルと一致した。さらにこのアレル特異的な現象はヒストンの脱アセチル化阻害により解除され、非同調的複製が同調的複製の様式へ変化した。このことから、ヒストンのアセチル/脱アセチル化はクロマチン構造をダイナミックに変化させ、

インプリント遺伝子領域の複製とゲノム構造のアレル特異性を制御する要因の一つであることを明らかにした。

次にインプリント遺伝子の転写と核マトリクスとの関連性を明らかにするため、まず、核内で RNA と DNA の同時検出を行い、転写様式の解析を行った。その結果、個々の細胞核で *SNRPN* などのインプリント遺伝子は片アレルからの転写シグナルが多く観察された。続いて、転写が確認された細胞の核マトリクス標本を作製し、DNA 検出を行った結果、転写シグナルのパターンに一致して DNA シグナルが核マトリクスで検出された。さらに、それぞれの両親由来のアレル欠失を持つ患者由来の細胞または多型リピートマーカーを用いて、*SNRPN*

の転写と核マトリクスへの結合を解析した。その結果、父親アレルからの *SNRPN* の転写シグナル、さらに転写に伴う父親アレルの核マトリクスへの結合を明らかにした。この結果から、転写と核マトリクスとの関連性さらにインプリント遺伝子では転写を受けるアレルのみが核マトリクスへ結合することが示された。

以上、本研究では、インプリント遺伝子領域の特有なゲノム DNA の複製や核内ゲノムの構造、核のネットワーク構造と遺伝子の転写について新たな知見が得られた。この新たな知見が、動物資源を利用した研究分野で有益な基盤情報となることを期待する。

生物機能応用科学専攻

氏名	竹林 慎一郎
学位記番号	生博 甲第 123 号
学位記授与の日付	平成 14 年 3 月 25 日
学位論文題目	哺乳類染色体 DNA の複製とその制御機構に関する研究
論文審査委員	主査 教授・田口 寛 教授・小宮 孝志 教授・古市 幸生 助教授・奥村 克純

要 旨

DNA 複製は細胞増殖の根元的なプロセスの一つであるが、同時に細胞のガン化や分化、再生にも深く関連している。このことから、哺乳類の DNA 複製の制御機構を明らかにすることは、ガンの診断や治療、有用トランスジェニック動物やクローン動物の作出などの応用性の高い分野に有益となる基盤的情報を提示することにつながる。本研究では、近年その技術革新の目覚ましい蛍光顕微鏡イメージングによる視覚化によって、複製過程を染色体、細胞核、DNA ファイバー、クロマチンタンパク質などのさまざまな階層で解析し、得られた結果を総合的に捉えることで複製を基盤とした哺乳類染色体構造の構築原理を明らかにすることを試みた。

まず、生きている動物細胞に蛍光ラベルしたヌクレオチドを取り込ませ、複製中の DNA をラベルすることで、実際に複製が起こっている DNA 領域を視覚的に検出した。これを用いて、染色体 DNA が間期核内でどのような順序、空間的配置で複製されるのかを詳細に解析した。

その結果、S 期が進むにつれて複製部位が核の内部から外部へと徐々に移動し、それが分裂期染色体の R/G バンド構造と密接に関連していることを明らかにした。このことから、染色体 DNA が一見ランダムに詰め込まれているような間期核内でも、それらは高度に組織化され、DNA 複製制御と密接に関わっていることを推定した。

また、この方法で複製ラベルした DNA を細胞核からファイバー状に引きのばし、より高解像度で DNA 複製を解析できる技術を確立した。これにより、数キロ〜数百キロベースの間隔でゲノム上に存在する複製開始領域を明確に検出することが可能になった。これを用いて、同調した培養細胞で S 期の最も初期に活性化される染色体複製ドメインを詳細に解析した結果、一つの複製ドメインを構成する複数のレプリコンのうち、最初に活性化されるレプリコンと、最初に活性化されたものに影響を受けて少し遅れて活性化されるレプリコンの 2 種類が存在していることが分かった。また同様の解析系を用い、細胞周期ごとに異なるラベルで複製ドメインを検出する