

氏 名 野 上 正 弘

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第406号

学位授与の日付 平成11年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Studies on Intranuclear Arrangement of Human  
Chromosome 12 and Relative Locations of  
Chromosome 15 Centromeres and of SNRPN  
Genes in Interphase Nuclei of HL 60 Cells

論 文 審 査 委 員 主 査 助 教 授 城石 俊彦  
教 授 小川 智子  
教 授 西川 建  
教 授 佐々木 裕之（国立遺伝学研究所）  
助 教 授 松田 洋一（名古屋大学）

Studies on Intranuclear Arrangement of Human Chromosome 12 and Relative Locations of Chromosome 15 Centromeres and of SNRPN Genes in Interphase Nuclei of HL60 Cells

(HL60 細胞におけるヒト 12 番染色体の核内配置ならびに 15 番染色体のセントロメアと SNRPN 遺伝子の間期核における相対的配置に関する研究)

Two sets of approximately  $3 \times 10^9$  bp of human DNA are compacted within a small volume of the cell nucleus. A number of genes on the genome express timely and play each function under precise regulation. The whole genome duplicates in numerous numbers of human cells under the perfect order. To accomplish such sophisticated biological processes, the mammalian genome is organized by various levels of domain structures that essentially associate with biological functions. An understanding of chromosome organization and its relation to intranuclear arrangement is important for models of nuclear structure and function. Extensive efforts to obtain information about the primary structure of complex genomes. However, much less is understood about the higher order organization of the genome within the nucleus, in particular the chromosome organization and its relation to intranuclear arrangement.

Application of the fluorescence in situ hybridization (FISH) technique using specific DNA probes lead to direct visualization of the genome organization in the nucleus as well as contribute to diagnostic analysis. Various types of probes for FISH are going to be available with the progress of the genome projects. Chromosome specific painting probes demonstrated territorial organization of chromosomes in the nucleus. Interphase chromosomes in mammalian cells are generally considered to be less condensed than their mitotic counterparts, but individual chromosomes appear to occupy restricted subcompartments in the interphase nucleus, i.e., chromosome territories. Many observations have been reported for temporally and spatially ordered organization of the genome within the nucleus. However, little is known about the relationship among specific gene locations, chromosome territories, and various intracellular processes.

For understanding of the arrangement of specific genome sequences in the interphase nucleus of mammalian cells, I adopted two approaches. Firstly, I analyzed the relative positioning of specific DNA segments in the nucleus by multicolor FISH. In this approach, thousands of nuclei can be surveyed in a short time, and an intranuclear position of one specific DNA segment is inferred from comparison with those of other DNA segments from known genomic sites. The detailed information

about each clone will be available, such as chromosomal localization, DNA replication timing, GC content, and gene or repetitive sequences. As an example, intranuclear arrangement of human chromosome 12 in G0(G1) nuclei of human myeloid leukemia HL60 cells was analyzed by using band-specific cosmid clones as probes. Each set of two cosmids was detected in different colors to the HL60 nuclei fixed by paraformaldehyde, and their relative positioning, internal or periphery, in the individual nucleus was scored. The results suggest that the intranuclear arrangement of human chromosome 12 is not random. Some chromosomal domains, including centromeric region, localized in the nuclear periphery, while other parts, including telomeric regions, positioned in the internal parts of the nucleus in G0(G1) cells. Based on the replication banding pattern of metaphase spreads, human chromosome 12 was divided roughly into five large domains. Interestingly, the clones in later replicating domains preferentially localized in the nuclear periphery, whereas those in earlier replicating domains were arranged in the internal position of the nuclei. DNA replication timing of each cosmid determined by FISH-based assay was consistent with the replication R-banding profile of chromosome 12. These results suggest that a topological arrangement of a human chromosome correlates to large-scale replication domains of the genome, and possibly to the chromosome bands, even before the DNA replication stage of cell cycle.

Next, I adopted an approach to simultaneously visualize four targets including a specific gene, a centromere, a whole chromosome, and a nucleus, and to three-dimensionally analyze their relative positioning in the nucleus during cell cycle by using a deconvolution system. I selected an imprinted gene, SNRPN (small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N), as an example, because this gene are well-analyzed on its imprinted expression, replication timing, etc., and also homologous association of this gene region at late S phase has been reported. The relative positions of chromosome 15 centromeres and SNRPN genes in the interphase nuclei of HL60 cells and their cell cycle dependency were analyzed with respect to the territories occupied by the whole chromosome 15 in which these DNAs are localized. Chromosome 15 territory, its centromere, SNRPN gene, and the nucleus were simultaneously visualized in three-dimensionally preserved nuclei by multicolor FISH. Spatial distribution of DNAs analyzed by a cooled CCD camera deconvolution system revealed that the SNRPN gene relatively localizes on the periphery of the chromosome territories and that preferentially faces to the nuclear membrane in late S and G2 phases. The chromosome 15 centromere and SNRPN gene come close to each other in late S phase, suggesting that both DNA segments replicate together within the same intranuclear domains, since they replicate in later half of S phase and DNA replication occurs in large foci at this stage of cell cycle. Preferential association of SNRPN does not occur in HL60 cells through the cell cycle. This contrasts with a report of homologous association of this imprinted chromosomal

domain found in lymphocytes and lymphoblasts with the imprinting expression. RNA-FISH using an intron probe within SNRPN gene and the methylation status of this imprinted domain demonstrate that SNRPN gene is also imprinted in HL60 cells and allelically expressed through the cell cycle. This gene region in HL60 cells exhibits asynchronous replication which is a general feature of imprinted genome domains, similar with lymphocytes. These results suggest that factors other than imprinted expression and replication timing may be important determinants for the homologous association of imprinted genes.

## 論文の審査結果の要旨

申請者である野上正弘君は、間期核内における染色体の高次構造を明らかにする目的で、マルチカラーFISH法を用いてヒト12番染色体の核内配置ならびに15番染色体のセントロメアSNRPN遺伝子の核内における相対的配置に関する研究を行った。

ヒトを含む哺乳動物の巨大ゲノムは、小さな核内に折りたたまれて収納され、その中で遺伝子は時期、組織、特異的に転写され、また、秩序だった複製が行われる。このようなゲノムの生物学的機能は、染色体の様々なレベルでのドメイン構造と関連していると考えられる。例えば、染色体複製のタイミング、GC含量、遺伝子密度などが、染色体の分裂中期の高次バンド構造と関連している。一方、間期核では、各染色体が空間的にランダムに核内に配置するのではなく、染色体テリトリーと呼ばれる一定の領域に局在して分布することが提唱されている。このように染色体は、均一な構造をとるのではなく、特定なドメイン構造を持ち、それらがゲノムの機能と密接に関連していると考えられるようになった。しかし、染色体の間期核におけるドメイン構造とゲノム機能の関連については、まだまだ知見が少なく、推論の域を出ていない。

申請者は、ヒトHL60細胞を材料にして、間期核内における染色体の高次構造を明らかにする目的で、ヒト染色体の様々な位置に特異的なDNAプローブを用いたマルチカラーFISH法とその3次元的な解析により、核内に染色体領域を位置付け、その詳細な解析から、以下の二つの結果を得た。

- (1) ヒトHL60細胞の12番染色体の、それぞれのバンドの領域に特定のコスミドDNAプローブを用いてマルチカラーFISHを行い、G<sub>0</sub>(G<sub>1</sub>)期核における各プローブの空間的配値を解析した。その結果、染色体の各バンドの領域は、核内にランダムに配置するのではなく、核膜周辺に位置するものと、核内深部に位置するものがあることをみつけた。さらに、同じコスミドDNAによる染色をマーカーとして、12番染色体のDNA複製タイミングを調べた結果、DNA複製の開始がR-バンドを作る領域でおこること、そして、初期複製ドメインに位置する染色体領域は核内深部に、後期複製ドメインに属する領域は核膜周辺に配置するという結果を得た。また、ヒト12番染色体の核内配置を3次元的に視覚化し、バンド構造とそれらの領域の核内配置を調べ、それらに相関のあることを示す結果を得た。申請者は、この研究によって、ヒト染色体の空間的な核内配置は、複製時期を異にする大まかな染色体ドメイン構造と密接な関係を持っていることを示し、それらの位置は細胞周期を通して変化しないことを示した。
- (2) 15番染色体の特定の遺伝子の核内配置を細胞周期を通して解析した。用いた遺伝子は、ゲノムインプリンティングを起こすことが知られており、かつ複製時期や細胞周期に伴った相同遺伝子の相対的配置についても解析されているSNRPN遺伝子である。このSNRPN遺伝子の空間的な核内配置を、セントロメアに対するプローブと第15番染色体全体に分布するDNA配列を認識するプローブ(chromosome painting用)を使って解析した。その結果、S期後半とG<sub>2</sub>期において、15番染色体のセントロメアは、SNRPN遺伝子よりも染色体のテリトリーのより周辺部に近い位置に存在し、その位置は核膜に近接していることがわかった。また、S期後半では、SNRPN遺伝子とセントロメアが接近し、染色体の後期複製領域に含まれることが示された。しかし、す

で報告されていた、S期後半における相同染色体上の二つのSNRPN遺伝子の接近は観察されなかった。野上君は、RNA-FISH法により、HL60細胞においてもSNRPN遺伝子にゲノムインプリンティングが起こっていることを確認した。また、これまでに報告されていた、相同なSNRPN遺伝子が核内で接近して配置することと、ゲノムインプリンティング現象は直接関係しないことを示した。

以上、二つの研究によって、申請者は、染色体が核内にランダムに配置するのではなく、それが染色体バンド構造や複製タイミングと関連して、特徴のあるドメイン構造を持っていることを明らかにした。さらに、細胞周期にともなって、特異的な遺伝子領域が、その遺伝子が位置する染色体のテリトリーの中で特徴的な空間的配置をとることを示した。これらの成果は、この分野の今後の研究に一つの指針を与えるものとして評価でき、審査委員会は、全員一致でこの論文が博士論文としての条件を充分満たしているとの結論に達した。

博士論文審査会の公開発表と質疑応答、さらにその後の非公開の質疑応答において、申請者は、細胞遺伝学分野で優れた実験技術を習得しており、また、博士号を与えるのに十分な学力を有することを示した。また、本博士論文は、英語で書かれており、さらにその一部は、国際誌に投稿中ということであり、同君が博士としての英語力を持つと判断した。これらの結果から、審査委員会は、申請者が学位取得に足る十分な研究能力と学力を有するものと判定した。