

## 学位論文題名

## A cytogenetic and developmental study on the choice of the X chromosome to be inactivated in the mouse

(マウスにおける不活性X染色体の決定に関する

細胞遺伝学および発生学的研究)

## 学位論文内容の要旨

哺乳類の雌におけるX染色体の不活性化(XCI)現象は、約 $150 \times 10^6$ 塩基対におよぶDNAをまるごと発現制御する機構として興味深い研究対象である。XCIが起こる諸過程の重要なものの一つとして、不活性化するX染色体の選択が挙げられる。マウスやヒトのX染色体上には自己の活性を制御する1個の中心的な座位、不活性化中心(X chromosome inactivation center; Xic)があり、Xの不活性化はXicから始まること、また同一の核に2つ以上のXicがないと不活性化が起こらないことなどが知られている。ヒトの2倍体細胞ではX染色体の数にかかわらず活性X染色体は常に1本、また4倍体細胞では2本という細胞遺伝学的知見から不活性化するX染色体の数と常染色体組の数の間に何らかの関係があると考えられている。さらにマウスの初期胚発生の研究から、胚体組織では父方由来のX( $X^P$ )と母方由来の( $X^M$ )が任意に不活性化するのに対して、胚体外組織では $X^P$ が優先的に不活性化することが知られている。この様な組織特異的な選択様式の違いはXicのゲノムインプリンティング(GI)の存在とその消去によりもたらされると考えられているが、その性質については不明の点が多く論議が続いている。

GIがXCIにおよぼす影響を明らかにする目的で、初めに、ロバートソン型転座Rb(X.2)2Adをヘテロ接合またはヘミ接合にもつマウスを交配して得た $X^M X^M Y$ ,  $X^M X^P Y$ ,  $X^M X^M X^P$ 胚における胚発生およびXCIのパターンを観察した。 $X^M X^P Y$ 胚では正常な発生がみられたが、 $X^M X^M X^P$ ,  $X^M X^M Y$ 胚では胚体外組織の発育遅延や異常が認められた。 $X^M X^P Y$ 胚では正常雌( $X^M X^P$ )胚と同じく、授精後7.5日目には胚体組織でも胚体外組織

でも XCI は正常に起こり、ほとんど全ての細胞で 1 本の X 染色体が不活性となっていた。一方、 $X^M X^M X^P$  胚や  $X^M X^M Y$  胚の胚体外組織の細胞の中には、2 本の  $X^M$  が活性状態で残っているものが多数観察された。これらの事実は、遺伝子量補正が正常に起きない場合、胚発生が異常になることを意味している。このように、胚体外組織の細胞では、インプリントによって  $X^M$  は不活性化しにくくなり、結果として  $X^P$  のみが不活性化されることが示唆された。胚体外組織とは対象的に胚体組織の細胞では常に活性 X が 1 本になるように不活性化が起きていた。さらに、これらの交配実験では  $X^P O$  胚の数が相補的な核型をもつ  $X^M X^M X^P$  胚よりも少なく GI によって  $X^P O$  胚が 7.5 日以前に失われやすいとする説を裏書しているかに思われた。しかし In(X)H 転座をヘテロ接合にもつ雌マウスと Rb2Ad 転座をヘミ接合にもつ雄マウスの交配実験で検討したところ、 $X^P O$  胚の有意な減少は認められなかった。結局、Hunt (1991) によって報告された着床前の時期での  $X^P O$  胚の有意な減少は、GI の影響によるものではなく、XO の母親の子宮内環境または卵形成期全般にわたり X 染色体量の不足の影響と推定した。X 染色体の GI が Xic 以外にないとするれば、 $X^M X^M X^P$ 、 $X^M X^M Y$  胚の異常発生は XCI の異常、すなわち、2 本の雌性化 X 染色体の活性状態での存在によって生じたとする結論を支持するものである。

$X^M X^M Y$ 、 $X^M X^M X^P$  胚での知見は、 $X^M$  が不活性化せず 2 本の X 染色体が活性を保つために発生異常が起きることを示した。しかし、このような核型異常胚の頻度は低く、確実な同定も難しいため研究を更に進めることは困難である。そこで、エタノールで誘導した単為発生胚を用いて、X 染色体の不活性化におよぼす GI の影響を再検討した。単為発生胚においては 2 本の X 染色体と同時に、常染色体も母方由来であることが問題を複雑にする恐れは残るが、得られた結果は、 $X^M X^M Y$ 、 $X^M X^M X^P$  胚での知見と矛盾するものではなかった。着床直後の単為発生胚の形態的観察によって、極栄養外胚葉での細胞死が明らかに認められた。同時に、妊娠 7-8 日目の胚においては  $X^M X^M X^P$ 、 $X^M X^M Y$  胚と同様に極栄養外胚葉に由来する胚体外組織の欠損あるいは異常が認められた。また同じ細胞数の単為発生胚盤胞と正常胚盤胞で不活性 X をもつ細胞の頻度を比較したところ、単為発生胚盤胞においてその頻度が有意に低かった。以上のことから、父方由来の常染色体がないことに起因する影響を除くことはできないものの、少なくとも単為発生胚の初期発生胚の異常は、X 染色体が GI に依存して不活性化する栄養外

胚葉で、XCIが起きにくいことによるものであることが確認された。

次に、不活性X染色体の決定におよぼす常染色体組の関係を調べるために、二細胞期胚の割卵を電気融合して四倍体胚を作り、着床早期における胚発生の特徴とXCIパターンを調べた。妊娠7-8日目の四倍体胚の形態は、胚体組織の極度の発育不良と胚体外組織の比較的良好な発達が特徴であった。 $4n, X^M X^M X^P X^P$ 細胞の多くでは2本の $X^P$ が不活性化していたが、中には不活性Xが1本あるいは3本のものも認められた。 $4n, X^M X^M Y Y$ 細胞では不活性Xはほとんど見られなかった。胚体外組織でのXCIがインプリンティングに依存しているために2本の $X^P$ が不活性になるとすれば、このパターンからはずれたものは胚体組織に由来した可能性が大きい。胚体組織の割合が極端に低くなっており、しかも細胞死が継続していることを示す組織像から判断すると、この組織では不活性異常が高頻度で起こり細胞死につながっている可能性がある。このことは、常染色体組の数は活性X染色体の数の決定に直接的には関与せず、細胞死という淘汰により結果的にXCIのパターンが統一される可能性を示唆している。

最後に、細胞遺伝学的または生化学的に区別可能な2本の活性X染色体をもつ胚幹(ES)細胞を樹立し、X染色体のGIの性質を調べた。これらのES細胞をバクテリア用シャーレで培養すると、よく発達した胚様体を形成する。この胚様体は外側の近位内胚葉と内側の中胚葉の2層で構成される卵黄嚢様の部分と、胚体外胚葉を含んだ胚に相当すると考えられる塊状部分より成る。胚様体でのXCIを調べた結果、興味深いことに、袋状部分の大部分の細胞で父方由来のX染色体が不活性化していた。この現象は30回継代培養したES細胞に由来する胚様体においてもかわることなく観察された。従って、優先的な $X^P$ の不活性化を引き起こすインプリントはES細胞の樹立やその後の細胞分裂を繰り返しても安定に引き継がれていることが明らかになった。この結果は、正常胚発生の5日目から6日目にかけての24時間の間にインプリントが失われるという仮説とは一致しない。おそらく、雌マウス胚の胚体組織で不活性化となるべきX染色体が決定される際、このインプリントは残っているものの効果は発揮されず、ランダムな決定が起こるのであろう。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 田 廸 弘  
副 査 教 授 堀 浩  
副 査 教 授 高 木 信 夫

## 学 位 論 文 題 名

A cytogenetic and developmental study on the choice of  
the X chromosome to be inactivated in the mouse

(マウスにおける不活性X染色体の決定に関する細胞遺伝学および発生学的研究)

多田高提出の学位論文は主論文(英文)と参考論文(14編)よりなる。主論文は、マウスの雌に見られるX染色体の不活性化(Xi)についてその決定機構に関し初期胚を用い細胞遺伝学的ならびに発生学的見地から研究を行ったものである。

マウスの初期胚においては、胚体組織では父方由来のX( $X^P$ )と母方由来のX( $X^M$ )染色体が任意に不活性化するのに対して、胚体外組織では $X^P$ が優先的に不活性化する。このXiの組織特異的な選択様式の違いは不活性化中心(X chromosome inactivation center)のゲノムインプリンティング(GI)によると考えられている。申請者は不活性化X染色体の選択性を明らかにするために、先ず、両親由来のX染色体が容易に識別可能なRb(X.2)2Adマウスを用い性染色体構成が $X^M X^M Y$ ,  $X^M X^P Y$ ,  $X^M X^M X^P$ 胚におけるXiパターンを観察した。 $X^M X^P Y$ 胚では正常雌( $X^M X^P$ )胚と同様に受精後7.5日目には胚体および胚体外の両組織で1本のX染色体の不活性化が見られたが、 $X^M X^M X^P$ や $X^M X^M Y$ 胚の胚体外組織では $X^P$ が不活性化し2本の $X^M$ が活性状態であった。 $X^M X^P Y$ 胚では正常な発生がみられたが、 $X^M X^M X^P$ ,  $X^M X^M Y$ 胚では胚体外組織の発育遅延や異常を認めた。これらの結果か

ら、胚体外組織の $X^M$ はGIの影響を受けず不活性化しにくくなり、結果として $X^P$ のみが不活性化されること、さらに、遺伝子量補正が正常に起きないことにより、胚発生が異常になることを明らかにした。

これらの結果は、さらに人為的に作った単為発生胚を用いた実験で確認された。単為発生胚では2本のX染色体は母方由来であるが、 $X_i$ はみられず、GIの影響を受けていないことが認められた。胚では極栄養外胚葉および胚盤胞ともに異常あるいは細胞死がみられ、単為発生胚においても初期発生胚の異常はX染色体の不活性化と密接に関連していることを実証した。

次に、不活性X染色体の決定におよぼす常染色体組の関係を調べるために、二細胞期胚を融合して四倍体胚を作り、着床早期における胚発生と $X_i$ パターンを調べた。7-8日目の $X^M X^M X^P X^P$ 構成の胚では2本の $X^P$ が不活性化し、 $X^M X^M Y Y$ ではXの不活性化は見られず、2本の $X^P$ が不活性している胚体外組織は比較的良好な発育を見たが、 $X_i$ の見られない胚体組織は極度の発育不良と細胞死が生じている。これらの結果から、X染色体の不活性化および胚発生は常染色体組の数とは関連性がなく、また、観察された胚発生異常は $X_i$ が起こらないために遺伝子量補正の欠落が原因であることを明らかにした。

また、申請者は父方由来のX染色体の不活性化を引き起こすインプリントの安定性について、マウス胚幹(ES)細胞を培養系にうつしin vitroでの検索を行った。父方由来のX染色体が不活性化されているES細胞が樹立でき、この $X_i$ はES細胞を長期間(30回)継代培養しても失われることなくその性質を保っていた。従来、GI効果は胚発生の途上消失するとされているが、その安定性に新たな知見をえた。X染色体の活性・不活性化とゲノムインプリントがどのように関与しているのか、その究明がin vitro系でなしうるものとして注目されている。

参考論文は主論文の内容に直接関連した3編の論文の他に、哺乳類の核型進化、寄生虫感染と疾病などに関する論文等計14編よりなり、国内外の国際学術専門誌に発表され、それらの内容はいずれも新知見を含むものとして関連分野において高く評価されている。

審査員一同は主論文と参考論文の内容を慎重に検討した上で、申請者が博士(理学)の学位を受けるに十分な資格を有することを認めた。