

学 位 論 文 題 名

# Abnormal development of mouse embryos having an extra maternally inherited X chromosome : The implication of imprinted X chromosome inactivation

（母由来過剰X染色体を持つマウス胚の発生異常：  
刷り込み型X染色体不活性化の関わり）

## 学位論文内容の要旨

哺乳類では、常染色体のトリソミーは、胚や胎児に流死産や出産直後の早期の死を引き起こす重大な影響を与えるのに対し、X染色体の増加の影響はそれ程深刻ではない。実際、ヒトではXXYやXXX個体の生存力が低下する事実はなく、過剰X染色体が両親のいずれに由来しても違いはない。このようなX染色体異数性の表現型に対する影響の緩和は、2倍体の細胞において、1本を除く全てのX染色体を不活性化するX染色体の不活性化(XCI)に原因がある。しかしながら、実験用マウスでは、X<sup>M</sup>X<sup>P</sup>Y (X<sup>M</sup>: 母由来X染色体, X<sup>P</sup>: 父由来X染色体) 個体の報告はあるが、X<sup>M</sup>X<sup>M</sup>Y 個体はこれまで見出されていない。近年の研究で、X<sup>M</sup>を過剰に持つ胚、つまり母由来X染色体のダイソミー(DsX<sup>M</sup>)は、胚体外組織の発育不全に特徴づけられる発生異常を示し、着床後に失われることが報告されている。XCIは、時期、組織特異的に起きる。最初は、受精後3.5日の栄養外胚葉で、次に受精後4.5日の原始内胚葉で、そして最後に受精後5.0-6.0日目のエピブラストで起きる。エピブラストでは、2本のX染色体のうち1本がランダムに不活性化されるのに対し、栄養外胚葉と原始内胚葉では、X<sup>P</sup>染色体が不活性化する。これらの事実は、過剰X染色体が両親のいずれに由来するかが胚の生存に決定的な重要性を持つことを意味する。当学位論文では、マウスにおけるDsX<sup>M</sup>胚の発生異常に焦点をあて、その原因を究明した。

第1章では、2種のロバートソン型X-常染色体転座 Rb(X.2)2AdとRb(X.9)6Hをヘテロに持つ雌マウスの減数分裂でX染色体の不分離頻度が上昇することを利用して、DsX<sup>M</sup>胚を作出した。これらの胚は、着床前に失われることなく、受精後6.5-7.5日目で胚体外組織に重度の発育遅延や欠損を示した。しかしながら、胚体組織には影響が比較的少なく、受精後8.5日目まで発育遅延以外には異常は認められず、8.5日胚では、中胚葉が分化しているものも認められた。更に時期を遡って検討すると、異常は受精後5.5日目に初めて観察された。異常は極栄養外胚葉由来の組織である外胚葉性胎盤円錐や胚体外外胚葉に限られ、他の胚体外組織である近位内胚葉や遠位内胚葉に異常は認められなかった。このため、DsX<sup>M</sup>胚では、極栄養外胚葉とそれに起源を持つ組織の増殖や分化が抑制されたと考えられる。

DsX<sup>M</sup>胚において、発生異常とXCIの関係を調べるため、次に、着床後のDsX<sup>M</sup>胚におけるX染色体の不活性化パターンを調べた。細胞遺伝学的研究では、受精後6.5、7.5日目のX<sup>M</sup>X<sup>M</sup>X<sup>P</sup>胚で、順調に増殖している

胚体外組織の細胞では、3本のうち2本がランダムに不活性化しているのに対し、発達が停止した胚体外組織の細胞では、父由来のX染色体のみが不活性化していることが見出された。XMXMY胚の胚体外組織では、1本のX染色体が不活性化しているのに対し、胚体外組織では、XCIが起きたことを示す兆候は見られなかった。

胚体外組織の欠損がDsXM胚の発生を異常にしているのであれば、それを補うことで発生を正常の軌道に戻せるはずである。この可能性を検討するために、DsXM胚と正常胚の凝集キメラ作成を試みた。得られた149のキメラ胚に、DsXM胚と同じ表現型を示すものは認められなかった。細胞遺伝学に18個体のDsXMキメラ胚を確認したが、その何れにおいても胚体外組織は、DsXM細胞と正常細胞で構成されていたのに対し、胚体外組織にDsXM細胞は認められなかった。これらの結果は、DsXM胚は、胚体外組織を他の正常細胞で補うことで、正常に発生が進むことを示唆している。そこで次に、DsXM胚と4倍体胚のキメラを作成してDsXMマウスの作出を試みた。従来の研究で、2倍体と4倍体のキメラでは、4倍体の細胞は胚体外組織に寄与しないことが示されている。DsXM胚は毛色遺伝子が野生型 (agouti) で、X-常染色体ロバートソン転座を持つため、4倍体胚は、毛色遺伝子がアルビノで核型が正常であるものにした。このためキメラマウスにおける4倍体細胞の割合は、毛色や細胞の染色体構成を調べることで容易に判断できる。90個の胚を仮親に戻し、32頭のマウスが生まれた。30頭は完全な野生型で、2頭は野生型とアルビノのキメラであった。尾を培養することによって核型を調べ、2頭が純粋なDsXM個体 (1頭はXMXMP、もう1頭はXMXMY) であることを確認した。このように、DsXM胚は胚体外組織を補ってやることで、個体発生を正常に行い生存可能であること、つまりXCIが正常に起きさえすれば致死とはならないことが示された。

6.5~7.5日目のDsXM胚における染色体の観察から、栄養外胚葉系列ではXMが不活性化されないと結論されたが、第2章では*Xist*転写産物を検出するRNA FISHとDNA複製バンド法を用いて、胚盤胞で直接この結論の当否を検討した。DNA複製バンド法による観察からは、XMXMP胚盤胞の細胞で異周期的複製をおこなうのは父由来X染色体のみであり、XMXMY胚盤胞ではその様な行動をするX染色体は検出されなかった。不活性X染色体のみから特異的に発現し、不活性X染色体を覆うように局在する*Xist* RNAは、XMXMP胚盤胞では半数以上の細胞で、1つのペイントシグナルとして検出された。これに対して、XMXMY胚盤胞では、このようなシグナルを持つ細胞は観察されなかった。雌の体細胞では、1つの*Xist* RNAのペイントシグナルが不活性X上に検出されることが確認されている。このため、XMXMP、XMXMY胚の栄養外胚葉では、父由来X染色体が不活性化し、2本の母由来X染色体は活性化状態にあることは明らかである。この結果から、母由来X染色体が不活性化を免れるようなインプリンティングが、胚体外組織での父由来X染色体の優先的な不活性化を引き起こすという結論に至った。

第1章の4倍体胚によるDsXM胚の救助実験で、4細胞期胚の4倍体胚と2倍体胚を凝集させて、2匹の2倍体↔4倍体キメラを得た。4細胞期の4倍体胚に8細胞期の2倍体胚を凝集させる標準的な方法ではこのようなキメラマウスは得られていない。このため2倍体↔4倍体のキメラでは、4倍体の細胞は、自身の発生能力の制約あるいは、胚体外組織に優先的に分化することにより、胚体部から排除されと考えられてきた。第3章では4倍体細胞が胎児に寄与するための条件を検討した。厳しい実験上の制約はあるが、凝集実験は2倍体と4倍体の割球の数、大きさ、発生段階を変えてをおこなった。8細胞期の2倍体胚に、4細胞期の4倍体胚を凝集させる標準的な方法で作成した12.5日目のキメラ胎児では、これまでの報告と同様に、*lac Z*トランスジーンを持つ4倍体の細胞は胚体外組織に全く寄与しなかった。しかし、2倍体胚と4倍体

胚を4細胞期で凝集させると、4倍体細胞が、しばしば心臓、肝臓、皮膚、腸などに寄与した。この結果は、強い細胞選択のもと、4倍体の細胞が桑実胚の内部に位置する機会が減少することが、標準的な2倍体⇔4倍体キメラにおいて4倍体細胞が排除される原因であることを示している。心臓や肝臓には4倍体や多倍体細胞が多い。このような組織にはかろうじて初期発生段階をすり抜けた4倍体の細胞が生き残る素地があるに違いない。4倍体細胞は遺伝的にはバランスが取れているはずであるが、2倍体とのキメラでも組織形成に貢献する能力は極めて低い。この原因究明にもキメラは有効に利用出来ると考えられる。

# 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 渡 辺 智 正 (大学院獣医学研究科)

## 学 位 論 文 題 名

### Abnormal development of mouse embryos having an extra maternally inherited X chromosome : The implication of imprinted X chromosome inactivation

(母由来過剰X染色体を持つマウス胚の発生異常：

刷り込み型X染色体不活性化の関わり)

哺乳類では、常染色体のトリソミー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のに対し、X染色体の増加の影響はそれ程深刻ではない。ヒトのXXYやXXX個体の生存力は低下せず、過剰X染色体が両親のいずれに由来しても違いはない。この原因は、2倍体(2n)の細胞では1本を除いて全てのX染色体が不活性化されるためである。しかし、マウスではXMPY (XM: 母由来X染色体, XP: 父由来X染色体) 個体の報告はあるが、XMY 個体は見出されていない。近年、XMを過剰に持つ(DsXM)胚は着床後に失われることが示された。当論文はこの不思議な現象の解析を目指したものである。

X染色体の不活性化(XCI)は時期および組織特異的に起きる。最初、受精後3.5日の栄養外胚葉で、次いで4.5日の原始内胚葉で、そして最後に5.0-6.0日目のエピブラストで起きる。エピブラストでは、XPまたはXMがランダムに不活性化されるが、栄養外胚葉と原始内胚葉では、XPのみが不活性化する。ここに過剰X染色体の両親からの由来が胚の生存を左右する原因がありそうである。

DsXM胚の研究はその発生頻度が低いため困難であった。そこで、2種のロバートソン型X-常染色体転座 Rb(X.2)2AdとRb(X.9)6Hをヘテロに持つ雌マウスでは、減数分裂時のX染色体不分離頻度が上昇することを利用してDsXM胚を作出した。これらの胚には、受精後5.5日目より胚体外組織に发育遅延や欠損を認めたが、胚体組織への影響は比較的少ない。異常は極栄養外胚葉由来の外胚葉性胎盤円錐や胚体外外胚葉に限られていた。受精後6.5、7.5日目のDsXM胚でX染色体の不活性化を細胞遺伝学的に見ると、XMXMP

胚の胚体組織では、3本のうち2本がランダムに不活性化し、胚体外組織では、X<sup>P</sup>のみが不活性化していた。XMXY胚の胚体組織では、1本のX染色体が不活性化するが、胚体外組織ではXCIが起きていない。RNA FISH法を用いて、胚盤胞で直接XCIの状況を検討した。不活性X染色体から特異的に発現し、不活性X染色体を覆うように局在するXist RNAは、MXMXP胚では半数以上の細胞で、1つのペイントシグナルとして検出されたが、XMXY胚ではシグナルを持つ細胞は認められなかった。従って、着床胚でのXCIのパターンは胚盤胞ですでに確立していると結論される。XMにはXCIを免れるような刷り込みがあり、そのため胚体外組織ではX<sup>P</sup>が優先的に不活性にされると思われる。

胚体外組織の欠損がDsXM胚の発生異常の原因であれば、それを補えば発生は正常に戻ると期待される。そこで、DsXM胚と4n胚のキメラを作成してDsXMマウスの作出を試みた。2n/4nのキメラでは、4n細胞は胚体組織に寄与しないとされている。90個のキメラ胚より、32頭のマウスを得た。30頭は完全な野生型で、通説に反して、2頭は2n/4nのキメラであった。核型より、野生型の1頭は純粋のMXMXP、もう1頭の野生型マウスはXMXYと判明した。また、胚体部ではXCIが正常に起きていることも示された。

上の実験で4細胞期の4n胚と2n胚を凝集して2頭の2n↔4nキメラを得た。4細胞期の4n胚と8細胞期の2n胚を凝集する標準的な方法ではこのようなキメラマウスは得られないので、4n細胞が胎児に寄与するための条件を検討した。標準法で作成した12.5日目のキメラ胎児では、従来の報告通り、4n細胞は胚体組織に全く寄与しない。しかし、2n胚と4n胚を4細胞期で凝集させると、4n細胞が、心臓、肝臓、皮膚、腸などに認められた。この結果は、強い細胞選択の下、4n細胞が桑実胚の内部に位置する機会が減少することが、標準的な2n↔4nキメラにおいて4n細胞が完全に排除される原因であることを示している。心臓や肝臓には元々4nや多倍体細胞が多い。このような組織には初期発生段階をкаろうじてすり抜けた4n細胞が生き残る素地があるに違いない。

以上のように、本論文はマウスのDsXM胚が致死となる原因が胚体外部におけるXCIの異常にあることを疑問の余地無く証明した。また、XMには不活性化を免れさせる刷り込みがあり、エピブラストではそれが消えるらしいことも示し、これを基にX染色体不活性化の制御機構の解明が進むものと期待される。DsXMマウスの作成と4n細胞の分化能に関する発見も注目に値するもので、今後の発展を期待したい。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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。