

学 位 論 文 題 名

Imprinted X chromosome inactivation in mice:
Behavior of the paternal X chromosome
in androgenetic embryos produced
by pronuclear transplantation

（マウスにおける刷り込み型 X 染色体不活性化：
前核移植により作製された雄核発生胚の父由来 X 染色体の行動）

学位論文内容の要旨

哺乳類の雌体細胞は胚発生初期に 2 本ある X 染色体のうち 1 本をそのほぼ全長にわたって不活性化する。これは XY の雄と XX の雌の間に生じる X 連鎖遺伝子量の二倍の差を転写レベルで解消するための重要な遺伝子量補正機構である。マウスの初期発生研究から、X 染色体の不活性化 (XCI) は、時期、組織特異的に起きることが知られている。最初は、受精後 3.5 日目の栄養外胚葉（主に胎盤を形成する）で、次に受精後 4.5 日目の原始内胚葉で、そして最後に受精後 5.0-6.0 日目のエピプラスト（主に胚体を形成する）で起きる。エピプラストでは、父由来の X (X^P) と母由来の X (X^M) が任意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^P が選択的に不活性化される。このような組織特異的な不活性化様式は X^P と X^M が配偶子形成の過程で異なる行動を取るよう運命づけられる、つまりゲノムインプリンティング (GI) を受けるためであると考えられる。従来の研究では、マウスの X^PY 雄核発生 (X^PY 胚) 胚は着床後もしばらく生存しているが X^PX^P 雄核発生胚 (X^PX^P 胚) は着床前に失われるとされてきた。その原因として、 X^P が 2 本共不活性化してしまうか、あるいは 2 本共不活性化しないためと想定されてきたが真偽のほどは明らかではない。私は本学位論文で、マウスにおける雄核発生胚の発生と XCI に焦点をあて、選択的 XCI に関する GI の性質について検討を試みた。

X^PX^P 胚が XCI を起こすために十分な発生能を持っているかどうかを明らかにするために、まず初めに、XCI を受けることが明らかにされている X 連鎖 *lacZ* トランスジーンをヘミ接合の状態に持つ雄核発生胚を受精卵間の前核移植により作製した。仮親の輸卵管に移植し発生を進行させ 7.5 日後に子宮から取り出して胚発生を観察し、得られた胚の一部を用いて核型を調べ、更に残りの部分を用いて X-gal 染色を行い X^PX^P 胚であることを確認した。この検討により X^PY と X^PX^P 胚はほぼ同じ発生能を有し、着床後も数日間は生存していることを明らかにした。YY 胚は従来の報告通り観

察されなかった。 X^PY 、 X^PX^P 胚は共に正常胚に比べ 24 時間程度の発生遅延を示し、どちらかと言えば胚体組織に影響が強かった。面白いことに、 X^PX^P 胚では胚体組織のみならず胚体外組織でも *lacZ* トランスジーンが発現している細胞としていない細胞のモザイク状態になっていた。従って、 X^PX^P 胚では胚体外組織でも 2 本の X^P の一方がランダムに不活性化している可能性が示された。

次に、この可能性を検討するために、私は X 連鎖 *lacZ* トランスジーンに加えてロバートソン型 X -常染色体転座、 $Rb(X.2)2Ad$ もしくは $Rb(X.9)6H$ を細胞遺伝学的マーカーとして用いて雄核発生胚を作製した。仮親の卵管に移植後 7.5 日目で胚を回収し、 X 染色体の不活性化パターンを調べた。 X^PX^P 胚では胚体組織のみならず胚体外組織でも X^P の一方がランダムに不活性化していることが BrdU 標識後アクリジンオレンジ染色による DNA 複製バンド法を用いて、異周期的複製を指標にして細胞遺伝学的及び X 連鎖 *lacZ* トランスジーンが発現の有無を指標にして組織化学的研究で確認された。 X^PY では、XCI が起きたことを示す兆候は認められなかった。この結果から、正常雌胚の胚体外外部における X^P の選択的不活性化は、 X^M が胚体外組織で不活性化を免れるような GI を受けていることが原因であるという結論に至った。

従来の研究によると、 X 染色体不活性化の開始に当たって細胞は核内の X 染色体数を数え (counting)、活性を維持する 1 本を選択 (choice) する。残る X 染色体では蛋白をコードしていない *Xist* 遺伝子が活性化し、転写された mRNA はそのまま X 染色体上に局在して不活性化することが示された。更に、RT-PCR 法を利用した研究から、4~8 細胞期正常雌胚では父性 *Xist* 遺伝子が優先的に発現していることが示され、選択的 X^P 不活性化との関連が指摘されている。このことから、 X^PX^P 胚で得られた知見は X 染色体が 2 本とも不活性化したり、2 本とも不活性化しなかった細胞が淘汰された結果である可能性も考えられる。そこで、私はこの可能性を検討するために先に用いたロバートソン型 X -常染色体転座に加えてロバートソン型常染色体転座、 $Rb(10;11)8Bnr$ もしくは $Rb(11;13)6lub$ を用いて雄核発生胚を作製し、*Xist* 遺伝子の発現の変化を、XCI の準備期 (4~16 細胞期)、開始期 (3.5 日目の胚盤胞) 及び完了期 (6.5 日目の胚) において RNA FISH 法を用いて解析した。その結果、*Xist* RNA は 4~16 細胞期の X^PX^P 胚では 2 個、 X^PY 胚では 1 個の、大型のペイントシグナルとして全ての割球で検出された。4 細胞期まで観察された YY 胚ではシグナルを持つ細胞は全く検出できなかった。胚盤胞期になると、 X^PX^P 胚では 1 個、 X^PY 胚ではシグナルを全く持たない細胞が出現したが、過剰なペイントシグナルを持つ細胞も依然として認められた。6.5 日目の X^PY 、 X^PX^P 胚においても過剰なペイントシグナルを持つ細胞が胚盤胞期より頻度はかなり低いながらも依然として認められた。この結果から、4~16 細胞期の早いステージでの *Xist* の発現は GI 依存型であり、32 細胞期以降に counting が始まり、GI 非依存型のランダムな発現が開始し、 X^PX^P 胚では胚体組織のみならず胚体外組織でも 2 本ある X^P の一方がランダムに不活性化するという結論に至った。

最後に、正常胚では XCI が完了している 6.5 日目の X^PX^P 胚、 X^PY 胚にまだ存在している過剰なペイントシグナルを持つ細胞は全ての X 染色体を不活性化し、活性 X を全く 1 本も持たないのか

を調べるために、私は 6.5 日目 $X^P X^P$ 胚、 $X^P Y$ 胚で不活性 X 染色体の有無を直接、細胞遺伝学的に検討した。しかしながら、 $X^P X^P$ 胚では不活性 X 染色体は 1 本で、 $X^P Y$ 胚ではそのような X 染色体は検出されなかった。このような細胞は X 染色体に関して機能的に零染色体性（ヌリソミー）のために細胞分裂せず、従って検出されない可能性がある。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	鈴 木 信 夫
副 査	教 授	木 村 正 人
副 査	教 授	松 田 洋 一
副 査	助教授	鈴 木 仁

学 位 論 文 題 名

Imprinted X chromosome inactivation in mice: Behavior of the paternal X chromosome in androgenetic embryos produced by pronuclear transplantation

(マウスにおける刷り込み型 X 染色体不活性化：

前核移植により作製された雄核発生胚の父由来 X 染色体の行動)

哺乳類の雌体細胞は胚発生の初期に 2 本の X 染色体のうち 1 本を不活性化し、XY の雄と XX の雌の間に生じる X 連鎖遺伝子量の二倍の差を転写レベルで解消する。X 染色体の不活性化 (XCI) は、マウスでの研究から、時期・組織特異的に起きることが知られている。まず受精後 3.5 日目の栄養外胚葉で、次に受精後 4.5 日目の原始内胚葉で、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、父由来の X (X^P) と母由来の X (X^M) が任意に不活性化されるが、栄養外胚葉と原始内胚葉では X^P が選択的に不活性化される。この組織特異的な XCI は X^P と X^M が配偶子形成の過程でゲノムインプリンティング (GI) を受け、異なる行動を取るよう運命づけられるためであるらしい。従来、マウスの X^PY 雄核発生胚は着床後もしばらく生存するが X^PX^P 雄核発生胚は着床前に失われるとされてきた。その原因として、 X^P が 2 本共不活性化するか、共に不活性化しないためと想定されてきた。当論文はマウスにおける雄核発生胚の発生と XCI に焦点を当て、選択的 XCI に関与する GI の性質の解析を目指したものである。

まず、 X^PX^P 胚が XCI を起こす時期まで成長できるか検討した。XCI を受ける X 連鎖 *lacZ* トランスジーンをヘミ接合の状態に持つ雄核発生胚を受精卵間の前核移植により作製した。仮親の輸卵管に移植し発生を進行させ 7.5 日後に子宮から取り出し、得られた胚の一部分を用いて核型と X-gal 染色反応を調査した。この検討により X^PY と X^PX^P 胚はほぼ同じ

発生能を有し、着床後も数日間生存していることを明らかにした。特筆すべきは、 $X^P X^P$ 胚では胚体のみならず胚体外組織でも *lacZ* トランスジーンが発現している細胞といていない細胞のモザイク状態になっていることである。従って、 $X^P X^P$ 胚では胚体外組織でも 2 本の X^P の一方がランダムに不活性化している可能性がある。

次に、この可能性を検討するために、 X 連鎖 *lacZ* トランスジーンに加えてロバートソン型 X -常染色体転座である $Rb(X.2)2Ad$ または $Rb(X.9)6H$ をマーカーとして雄核発生胚を作製し、 X 染色体の不活性化パターンを調べた。 $X^P X^P$ 胚では胚体、胚体外にかかわらず X^P の一方がランダムに不活性化していたが、 $X^P Y$ では XCI が起きたことを示す証拠は得られなかった。この結果から、正常雌胚の胚体外組織における X^P の選択的不活性化は、 X^M が不活性化を免れるような GI を受けているためと結論された。

X 染色体不活性化の開始に当たって、細胞は核内の X 染色体数を数え (counting)、活性を維持する 1 本を選択する。残る X 染色体では蛋白をコードしていない *Xist* 遺伝子が活性化し、転写された mRNA はそのまま X 染色体上に局在して不活性化が始まる。4～8 細胞期正常雌胚では父性 *Xist* 遺伝子が優先的に発現し、選択的 X^P 不活性化との関連が指摘されている。従って、 $X^P X^P$ 胚で得られた知見は X 染色体が 2 本とも不活性化、あるいは不活性化しなかった細胞が淘汰された結果である可能性もある。これを検討するために、ロバートソン型転座をマーカーとして用いて雄核発生胚を作製し、卵割期における *Xist* 遺伝子の発現の変化を RNA FISH 法を用いて解析した。その結果、*Xist* RNA は 4～16 細胞期の $X^P X^P$ 胚では 2 個、 $X^P Y$ 胚では 1 個の、大型のペイントシグナルとして全ての割球で検出された。胚盤胞期の $X^P X^P$ 胚では 1 個、 $X^P Y$ 胚ではシグナルを全く持たない細胞が出現したが、過剰なペイントシグナルを持つ細胞も依然として認められた。6.5 日目の $X^P Y$ 、 $X^P X^P$ 胚においても過剰なペイントシグナルを持つ細胞が依然として低頻度で認められた。この結果から、4～16 細胞期の早いステージでの *Xist* の発現は GI 依存型であり、32 細胞期以降に counting がはじまり、 GI 非依存型のランダムな発現が開始し、 $X^P X^P$ 胚では胚体組織のみならず胚体外組織でも 2 本ある X^P の一方がランダムに不活性化するという結論に至った。

以上のように、本論文は XX 雄核発生胚が着床後まで生き延びること、そして、 X 染色体はどの組織でも基本的にはランダムに不活性化されることを証明した。したがって、正常雌胚の胚体外組織に見られる、 X^P の選択的不活性化は X^M にある不活性化を免れさせる刷り込みに起因することが示され、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。

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。