

学 位 論 文 題 名

A DEVELOPMENTAL BIOLOGICAL STUDY
ON THE *t*-COMPLEX RECESSIVE LETHAL
MUTATION *tclw5* IN THE MOUSE

(マウス *t* コンプレックス劣性致死遺伝子 *tclw5* の発生生物学的研究)

学位論文内容の要旨

マウス 17 番染色体には野生型の他に *t* 染色体と呼ばれる変異型が知られている。*t* コンプレックスはこの *t* 染色体のセントロメア側約 20 cM に及ぶ領域のことで、世界中の野生マウス集団内に広く存在している。そして、*t* コンプレックスはその由来により多数の *t* ハプロタイプとして同定されている。野生型と比較すると *t* コンプレックス内には大小 4 つの逆位が存在し、野生型との間での組み換えが強く抑制されている。そのため、*t* コンプレックス内に存在する多数の変異はあたかも一つの遺伝子座であるかのように同時に子孫に受け継がれる。通常 *t* ハプロタイプはそれぞれ一つの劣性致死変異を持っており、現在までに少なくとも 16 種の劣性致死変異が存在することが確認されている。中でも古くから知られている 6 つに関しては発生学的な解析も進んでおり、いずれもマウス初期発生における重要な時期に影響を及ぼす変異であることが知られている。そのため、これら劣性致死変異の原因遺伝子は哺乳類初期発生において重要な働きをしていると考えられるが、*t* ハプロタイプが初めて発見されてから 70 年を経た現在でも、いずれの致死変異の原因遺伝子も同定されていない。本研究では、*t^{ss}* ハプロタイプが持つ *t* コンプレックス劣性致死変異 *tclw5* の原因遺伝子の機能を解明することを目的として、発生生物学的手法を用いて *tclw5* 遺伝子が機能する組織の特定を試みた。

t^{ss} ハプロタイプをホモに持つ胚は、原腸形成期に胚体組織に著しい異常を来し致死となることが知られている。原腸形成が開始される受精後 6.5 日 (E6.5) 胚において詳細に組織学的解析を行った結果、胚体外部分（胚体外外胚葉、近位胚体内内胚葉）は比較的正常な形態を保持していたが、胚体部分（胚体外胚葉、近位胚体内胚葉）、特に胚体外胚葉で顕著な異常が認められ、原腸形成は全く観察されなかった。異常は E5.5 胚ですでに現れており、正常胚ではこの時期に原羊膜腔が形成されるが *t^{ss}/t^{ss}* 胚のほとんどで原羊膜腔は形成されていなかった。さらに、この時期の *t^{ss}/t^{ss}* 胚では正常胚の原始内胚葉細胞に認められる大きい液胞がほとんど観察されなかった。*t^{ss}/t^{ss}* 胚と正常 2 倍体胚とのキメラ胚形成実験を行ったところ、E6.5 の時点で *t^{ss}/t^{ss}* 細胞はすべての組織に寄与できることがわかった。つまり、正常細胞の補助があれば *t^{ss}/t^{ss}* 細胞は胚体組織でも生存できたのである。このことから、*tclw5* 変異は細胞の生存自体に影響を及ぼすようなものではないと考えられる。E5.5 の正常胚と *t^{ss}/t^{ss}* 胚の原始内胚葉におけるエンドサイトーシス活性を調べたところ、*t^{ss}/t^{ss}* 胚では正常胚に比べ明らかにエンドサイトーシス活性が低下していることがわかった。これらの結果より、*t^{ss}/t^{ss}* 胚に現れる胚体組織の著しい異常は、内

胚葉組織の機能不全によって引き起こされる二次的なものである可能性が示唆される。この可能性を検証するために、 l^{ws}/l^{ws} 胚と正常 4 倍体胚とのキメラ胚を形成し、 l^{ws}/l^{ws} 胚の発生能が回復されるか調べた。4 倍体胚は胚体組織には寄与しないが、胚体外組織として正常に分化し機能することが知られているので、この方法を用いることで l^{ws}/l^{ws} 胚の胚体外組織のみを正常細胞で補うことができる。 l^{ws}/l^{ws} 胚と 4 倍体胚とのキメラ胚 ($l^{ws}/l^{ws} \Leftrightarrow 4n$) を E9.5 に回収したところ、 $l^{ws}/l^{ws} \Leftrightarrow 4n$ キメラ胚は正常胚の E9.0 に相当する時期までほぼ正常に発生が進んでいた。4 倍体細胞が胚体組織に寄与していないことは組織学的解析及び PCR を用いた genotyping により確認した。正常な胚体外組織の助けを得ることで l^{ws}/l^{ws} 胚の発生能が大幅に回復したということは、*tclw5* 遺伝子は胚体外組織で重要な役割を果たすということを示している。 $l^{ws}/l^{ws} \Leftrightarrow 4n$ キメラ胚には頭部、心臓、体節、神経管など主要な器官は形成されており、胚前部はほぼ正常に発生していたが、胚後部の発育不全を伴い E9.0 に相当する時期で発生が停止していた。これらの結果より、*tclw5* は原腸形成期には胚体外組織で機能するが、その後胚体組織でも何らかの役割を果たす遺伝子であることが示唆される。発生初期において近位内胚葉で特異的に発現し、近位内胚葉の分化の指標としてよく用いられる HNF-4 の発現を免疫染色法を用いて調べたところ、正常胚、 l^{ws}/l^{ws} 胚ともに近位内胚葉で HNF-4 の発現が確認された。このことから、 l^{ws}/l^{ws} 胚の近位内胚葉細胞は、一部の機能は影響を受けているものの、近位内胚葉としてある程度正常に分化していると考えられる。

l^{ws}/l^{ws} 胚の胚体外胚葉に見られる著しい異常は胚体外組織の機能不全によって引き起こされることがわかった。母親由来 X 染色体を余分に持つ胚での研究より、胚体外外胚葉組織がほとんど無い状態でも胚体外胚葉は比較的正常に発生、分化することがわかっている。このことから、 l^{ws}/l^{ws} 胚の異常は胚体外外胚葉の機能不全により引き起こされるとは考えにくい。 l^{ws}/l^{ws} 胚では近位内胚葉が形態的、機能的に異常であったことを考え合わせると、*tclw5* は原腸形成期の近位内胚葉組織で重要な働きをする遺伝子であると考えるのが妥当であろう。近位内胚葉は、発生初期に母親からの栄養を外胚葉組織に供給する働きを持っているが、栄養吸収能の低下だけが致死の原因とは考えにくい。近位内胚葉は、鳥類におけるハイポブラストに相当する組織で、外部環境からの栄養吸収作用に加え、胚体外胚葉の分化や軸形成などを誘導する働きを持っている。この、近位内胚葉による誘導作用に関係していると考えられている遺伝子は多数報告されている。ノックアウトマウスを用いた実験から、それらの遺伝子のいくつかに関しては近位内胚葉での働きが原腸形成に必須であることが報告されている。例えば、BMP レセプターの一つである ALK2 を欠損させると原腸形成に異常を来して E7.5 頃に致死となり、 $ALK2^{-/-}$ の ES 細胞と 4 倍体胚とのキメラ胚を作成すると、 l^{ws}/l^{ws} 胚と同様に胚後部の発育不全を伴い E9.0 頃に発生を停止する。この様に、近位内胚葉からのシグナルは原腸形成に必須であると考えられるが、 l^{ws}/l^{ws} 胚に見られる異常は原腸形成開始よりも 24 時間早い時期にすでに現れているので、*tclw5* 遺伝子は原腸形成に関わっているというよりも、胚体外胚葉組織の成長、維持に重要な遺伝子であると考えられる。ES 細胞を用いた実験より、近位内胚葉と胚体外胚葉との相互作用によって胚体外胚葉内に原羊膜腔が形成されることが報告されている。 l^{ws}/l^{ws} の ES 細胞から *in vitro* で胚様体を形成させると正常に原羊膜腔も形成されたとの報告もあるが、一方では core cell が死滅する胚様体もあり、また l^{ws}/l^{ws} 胚の異常は原羊膜腔形成期に現れ始めるので、*tclw5* 遺伝子が原羊膜腔形成に本質的に関係している遺伝子である可能性も考えられる。

本研究より、*tclw5* は発生初期における細胞間、組織間でのシグナル伝達に関連する重要な遺伝子である可能性が示唆される。*tclw5* が同定されれば、哺乳類初期発生のメカニズム

に関する重要な知見が得られるものと期待される。最近、*tclw5* が存在すると考えられているゲノム領域のシーケンス解析が行われ、その領域に候補となり得る遺伝子が32個見つかった。本研究の結果が、この候補遺伝子群から *tclw5* 遺伝子を特定する上で大きな手がかりになることが期待される。

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	高橋	孝行
副査	助教授	鈴木	仁

学位論文題名

A DEVELOPMENTAL BIOLOGICAL STUDY ON THE *t*-COMPLEX RECESSIVE LETHAL MUTATION *tclw5* IN THE MOUSE

(マウス *t*コンプレックス劣性致死遺伝子 *tclw5* の発生生物学的研究)

マウス 17 番染色体には *t*コンプレックスを持つ変異型が知られている。セントロメア側約 20 cM に及ぶ領域には大小 4 つの逆位が存するため、野生型との間での組み換えが強く抑制され、あたかも一つの遺伝子座のように子孫に受け継がれる。*t*コンプレックスは世界中の野生マウス集団内に広く存在し、多数の *t*ハプロタイプとして同定されている。通常 *t*ハプロタイプはそれぞれ一つの劣性致死変異を持っており、現在までに少なくとも 16 種の劣性致死変異が報告されている。中でも古くから知られている 6 つに関しては発生学的な解析も進んでおり、いずれもマウス初期発生における重要な時期に影響を及ぼすことが知られている。そのため、これら劣性致死変異の原因遺伝子は哺乳類初期発生において重要な働きをしていると考えられるが、*t*ハプロタイプが初めて発見されてから 70 年を経た現在、原因遺伝子は未だ一個も同定されていない。本研究は、*t^{ws}*ハプロタイプが持つ *t*コンプレックス劣性致死変異 *tclw5* の原因遺伝子の機能を解明することを目的として、発生生物学的手法を用いて *tclw5* 遺伝子が機能する組織を特定する試みである。

*t^{ws}*ハプロタイプをホモに持つ胚は、原腸形成期に胚体組織に著しい異常が起き致死となる。原腸形成が始まる受精後 6.5 日 (E6.5) 胚の組織学的観察から、胚体外部分 (胚体外外胚葉、近位胚体外内胚葉) は比較的正常な形態を保持するものの、胚体部分 (胚体外胚葉、近位胚体内胚葉) に原腸形成が観察されなかった。普通、原羊膜腔は E5.5 胚で形成されるが、*t^{ws}/t^{ws}*胚ではほとんど形成されていない。さらに、この時期の *t^{ws}/t^{ws}*胚では正常胚の原始内胚葉細胞に認められる大きい液胞がほとんど観察されない。*t^{ws}/t^{ws}*胚と正常 2 倍体胚とのキメラ胚を形成したところ、E6.5 の時点で *t^{ws}/t^{ws}*細胞はすべての組織に寄与す

るので、*tclw5* 変異は細胞の生存自体に影響を及ぼすものではないと結論される。また、原始内胚葉におけるエンドサイトーシス活性は、 t^{w5}/t^{w5} 胚では正常胚に比べ明らかに活性が低下していた。これらの結果より、 t^{w5}/t^{w5} 胚に現れる胚体組織の異常は、内胚葉組織の機能不全によって引き起こされる二次的なものである可能性が示唆される。この可能性を検討するために、 t^{w5}/t^{w5} 胚と正常 4 倍体胚とのキメラ胚を形成し、 t^{w5}/t^{w5} 胚の発生能を調べた。4 倍体細胞は胚体組織には寄与しないが、胚体外組織として正常に分化し機能することが知られているので、この方法を用いることで t^{w5}/t^{w5} 胚の胚体外組織のみを機能的に正常な細胞で補うことができる。 t^{w5}/t^{w5} 胚と 4 倍体胚とのキメラ胚 ($t^{w5}/t^{w5} \leftrightarrow 4n$) を E9.5 に回収したところ、正常胚の E9.0 に相当する時期までほぼ正常に発生が進んでいた。4 倍体細胞が胚体組織に寄与していないことは組織学的解析及び PCR によって確認されている。正常な胚体外組織の助けを得ることで t^{w5}/t^{w5} 胚の発生能が大幅に回復した事実は、*tclw5* 遺伝子は胚体外組織で重要な役割を果たすことを立証した。キメラ胚には頭部、心臓、体節、神経管など主要な器官は形成されており、胚前部はほぼ正常に発生していたが、胚後部は短く発育不全を示していた。これらの結果より、*tclw5* は原腸形成期には胚体外組織で機能するが、その後胚体組織でも何らかの役割を果たす遺伝子であることを示唆する。

t^{w5}/t^{w5} 胚では近位内胚葉が形態的、機能的に異常なので *tclw5* は原腸形成期の近位内胚葉組織で重要な働きをする遺伝子であると考えられよう。近位内胚葉は、発生初期に母親からの栄養を外胚葉組織に供給しているが、栄養吸収能の低下だけが致死の原因とは考えにくい。近位内胚葉は、鳥類におけるハイポブラストに相当する組織で、胚体外胚葉の分化や軸形成などを誘導する働きを持っていると考えられる。近位内胚葉からのシグナルは原腸形成に必須であると考えられるが、 t^{w5}/t^{w5} 胚の異常は原腸形成開始よりも 24 時間早い時期にすでに現れているので、*tclw5* 遺伝子は胚体外胚葉組織の成長、維持に重要な遺伝子であると考えられる。近位内胚葉と胚体外胚葉との相互作用によって胚体外胚葉内に原羊膜腔が形成されることが報告されている。 t^{w5}/t^{w5} の ES 細胞から *in vitro* で胚様体を形成させると正常に原羊膜腔も形成されたとの報告もあるが、更に検討が必要である。

以上のように、本論文は *tclw5* が原始内胚葉で発現する遺伝子であり、変異の結果胚体外胚葉に二次的に大きな影響が表れることを示した。最近、*tclw5* が存在すると考えられているゲノム領域のシークエンス解析が行われ、その領域に候補となり得る遺伝子が 32 個見つかった。本研究の結果が、この候補遺伝子群から *tclw5* 遺伝子を特定する上で大きな手がかりになることが期待される。

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。