

学 位 論 文 題 名

X-chromosome activity during establishment
and differentiation of embryonic stem cells in mice

（マウス胚性幹細胞株の樹立と分化過程における X 染色体の活性）

学位論文内容の要旨

哺乳類では、性染色体構成により個体の性が決まる。雌は XX、雄は XY であり、XY 共に常染色体対より分化したものである。X 染色体は中型で常染色体と同程度の密度で遺伝子が分布している。一方、Y 染色体は一般に小型でヘテロクロマチン化する傾向があり、ほぼ同じ大きさの常染色体に比べても、格段に少い数の遺伝子しか持たない。生物にとって、ゲノムのバランス保持は極めて重要なので、性染色体の分化に伴って、遺伝子量補正機構が出現せざるを得ない。哺乳類ではこのために、雌細胞にある 2 本の X 染色体の一方からの転写を、ほとんど全長に渡って止める X 染色体不活性化(X chromosome inactivation)が採用されている。この X 染色体不活性化現象は発見より 40 余年を経た現在も解明されていない面が多く、活発に検討が加えられている。特にこの数年は不活性化開始に関する新知見が多く報告されている。

X 染色体不活性化の研究が急速に進まない原因の一つは、この現象が、胚が未だ小さい間、しかも母体内で起きるためと考えられる。その上、マウスでは X 染色体不活性化は胚全体で一度に起きるのではなく、少なくとも 3 回にわたって起きる。しかも最初の 2 回では父由来 X が選択的に不活性化し、最後の 1 回ではどちらか一方がランダムに不活性化するという点で違いがあるため、1 個の胚の中に不活性化に関し種々の細胞が混在することになり、各々を分取することは技術的に難しい。このような困難があるため、近年の分子生物学的な手法による不活性化研究は胚幹細胞(embryonic stem cell)を利用することが多い。

ES 細胞は胚盤胞期の胚をフィーダー細胞および leukemia inhibitory factor (LIF) 存在下で培養することによって、内部細胞塊より直接得られる未分化で分裂能の高い細胞株である。適切な条件を与えると細胞分化が誘導され、それと同時に X 染色体の不活性化が起きることが知られている。ただし、条件を整えるのが難しいためか、不活性化の起きる時期や必要とする時間の変異幅が広いので、実験に難しさがある。また、不活性化の指標としては晩期複製 X 染色体の出現と *Xist* mRNA による X 染色体の coating などが広く用いられているが、何れも細胞を固定後種々の手続きを経てようやく結果が得られるため、リアルタイムでの判断が出来れば非常に有用となる。

そこで当研究では X 染色体不活性化の研究に活用できる、X 染色体上にレポーターとして有効な *lacZ* と *GFP* トランスジーンを持った ES 細胞株の樹立を試みた。マウスには選択的な不活性化もあるので、父由来 X あるいは母由来 X 上にトランスジーンを持つ ES 細胞の樹立を目指した。同時に、樹立過程での X 染色体の活性変化を検討し、樹立された ES 細胞が目的通り實際役に立つのか、分化過程における X 染色体の不活性化とマーカートランスジーンの発現の時間的關係を検討した。

胚盤胞は、129/Sv(♀)×GL(♂)と GL(♀)×129/Sv(♂)の交配より得た。GL で表したマウスは X 連鎖

トランスジーン *HMG-lacZ* を持つ H253 系マウスと、*GFP* トランスジーンを X 染色体上に持つ #152A 系統の交配より得られた組み換え体で、X 染色体には両方のトランスジーンが乗っている。15% の牛胎児血清と 100U/ml の LIF を含んでいる DMEM を用い胚盤胞をフィーダー細胞上で浮遊培養した。これを 5% 炭酸ガス中で培養すると、2, 3 日後に胚は透明帯より脱出して、フィーダー上に接着し栄養芽細胞が広がって足場を築いた。内部細胞塊は細胞分裂によって体積を増し液面に向かって張り出す。内部細胞塊が適切な大きさになるのを見計らって、タングステン針ではがし、トリプシン処理した後に新しいフィーダー上で培養を続けた。2, 3 日後 ES 細胞の特徴を備えた細胞群が出現すればほぼ成功であるが、多くの場合は殆どの細胞が分化してしまい ES 細胞株樹立には至らなかった。約 400 個の胚盤胞より最終的に 3 系統の雌 ES 細胞株が得られた。1 系統(MC58)はトランスジーンが母由来 X に、2 系統 (GL1, GL2) では父由来 X 染色体の上にある。3 系統とも核型は正常で、同調的に複製する 2 本の X 染色体を持っていた。未分化状態ではどの細胞も *GFP* による蛍光を発し、意外にも *lacZ* によってコードされる β -galactosidase 活性は極めて高く、短時間で細胞質まで濃染した。

細胞の分化誘導実験は MC58 を用いて行った。フィーダーを用いず LIF の存在下で細胞を増殖させ、十分な細胞数が確保された段階で ES 細胞が接着できないバクテリア用のシャーレに移す。従来の報告と同様、細胞同士が接着し胚様体(embryoid body)を形成し、浮遊したまま細胞数を増やして初期胚類似の細胞分化が進行した。3 日目に半分はそのまま培養を継続し、残る半分を細胞培養用のシャーレに移して(replate)培養した。胚様体はシャーレの底に接着し細胞は周辺部に拡がり分化は更に促進される様に見えた。この過程で不活性化の代表的な指標である晩期複製 X 染色体の出現、*GFP* による蛍光の変化、X-Gal 染色による β -gal 活性の消長を検討した。実験は 2 回行った。胚様体を replate した群では、細胞分化誘導開始後 8 日目までに実験 1 ではほぼ 50%、実験 2 では 80% の分裂中期細胞に晩期複製 X 染色体が認められた。ただし、晩期複製 X 出現の開始は必ずしも一定ではなく、実験 1 では 4 日目にすでに 10% の細胞に認められているにもかかわらず、実験 2 では 4 日目では零で翌日 8% となった。Replate しなかった群でも実験 1 で replate 群以上に晩期複製 X が見いだされたが 7 日目で逆転した。実験 2 では浮遊培養を続けた群では 7 日目まで、晩期複製 X は認められず 8 日目に 8% になったに過ぎない。実験間に見られた違いの原因は不明であるが、最初の細胞塊形成が大きな要因になっている可能性がある。実験 2 における浮遊培養群での晩期複製 X 出現の著しい遅れの原因は不明であるが、培養条件の違いが関与していることが考えられる。*GFP* の発現が停止した細胞は Replate 群では最初から認められた。細胞の形態より内胚葉と判断される周辺細胞では 5 日目には既にランダムな不活性化を示唆するまだら状の蛍光パターンが見られたが、一面に蛍光を出さない部分も多く認められ、その原因に関しては更に検討を要する。少なくとも、逆に一面に蛍光を発する内胚葉は認められなかった。また、実験期間を通して、胚様体の中心部が蛍光を失うことは無かった。未分化状態では β -gal 活性は非常に高く、実験 2 では 4 日目には全ての細胞が X-Gal 染色で濃染していた。実験 1 では周辺部に既に染色されないあるいは薄く染色される細胞が出現していた。その後の変化は *GFP* の蛍光と同じ傾向を示した。

このように *GFP* トランスジーンはリアルタイムに、しかも細胞を生かしたまま不活性化を検知出来るので、これら ES 細胞株の X 染色体不活性化研究への今後の活用が期待される。当研究でも示したように、あたかも母由来 X 染色体が選択的に不活性化されたような様相を呈することもあり、その理由も解明されなければならない。予備実験では、GL2 細胞でも、同様に一面蛍光を発せず、X-Gal でも染まらない内胚葉の出現が認められた。更に詳しいこれらの細胞の検討によって従来知られていない面白い現象も見いだされる可能性が高い。

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 芳 幸
副 査	助教授	北 田 一 博

学 位 論 文 題 名

X-chromosome activity during establishment and differentiation of embryonic stem cells in mice

(マウス胚性幹細胞株の樹立と分化過程における X 染色体の活性)

哺乳類の性染色体構成は雌では XX、雄では XY である。X、Y 共に常染色体対より分化したものであるが、X 染色体は中型で常染色体と同程度の密度で遺伝子が分布するものの、Y 染色体は一般に小型で、ほぼ同じ大きさの常染色体に比べても、遺伝子数は格段に少い。生物にとって、ゲノムのバランス保持は極めて重要なので、Y 染色体の縮小に伴って、遺伝子量補正機構が出現した。哺乳類ではこのために、雌細胞にある 2 本の X 染色体の一方からの転写を、ほとんど全長に渡って止める X 染色体不活性化(XCI)が採用された。この X 染色体不活性化現象は発見より 40 余年を経た現在も解明されていない面が多く、この数年、分子機構に関する新知見が多数報告されている。

XCI の研究が急速に進まない原因の一つは、この現象が、胚が未だ小さい間、しかも母体内で起きるためである。その上、マウスでは XCI は胚全体で一度に起きるのではなく、少なくとも 3 回にわたって起きる。しかも最初の 2 回では父由来 X が選択的に不活性化し、最後の 1 回ではどちらか一方がランダムに不活性化するという違いがあるため、1 個の胚の中に XCI に関し種々の細胞が混在することになり、各々を分取することは技術的に難しい。このような困難があるため、近年の分子生物学的な手法による XCI 研究は胚幹(ES)細胞を利用することが多い。

ES 細胞は胚盤胞期の胚をフィーダー細胞および leukemia inhibitory factor (LIF) 存在下で培養することによって、内部細胞塊より直接得られる未分化で分裂能の高い細胞株である。適切な条件を与えると細胞分化が誘導され、それと同時に XCI が起きることが知られている。ただし、条件を整えるのが難しいためか、XCI の起きる時期や必要とする時間の変異幅が広いので、実験に難しさがある。また、XCI の指標としては晩期複製 X 染色

体の出現と *Xist* mRNA による X 染色体の coating などが広く用いられているが、何れも細胞を固定する必要がある、その後種々の手続きを経てようやく結果が得られるため、リアルタイムでの判断が出来れば非常に有用となる。

当研究では X 染色体上にレポーターとして便利な *lacZ* と *GFP* トランスジーンを持つ、XCI の研究に活用できると期待される ES 細胞株の樹立を試みた。マウスには選択的不活性化もあるので、父由来 X と母由来 X 上にトランスジーンを持つ 2 種類の ES 細胞の樹立を目指した。また、樹立された ES 細胞が目的通り実際役に立つのか、分化過程における XCI とマーカートランスジーンの発現の時間的關係を検討した。

胚盤胞は、129/Sv(♀)×GL(♂)と GL(♀)×129/Sv(♂)の交配より得た。GL マウスは X 連鎖トランスジーン *HMG-lacZ* を持つ H253 系マウスと、同じく *GFP* トランスジーンを X 染色体上に持つ #152A 系統の交配より得られた組み換え体で、X 染色体には両方のトランスジーンが乗っている。最終的に 3 系統の雌 ES 細胞株が得られた。1 系統(MC58)はトランスジーンが母由来 X に、2 系統 (GL1, GL2) では父由来 X 染色体の上にある。いずれも核型は正常で、2 本の X 染色体は同調的に複製し、XCI は起きていない。未分化状態ではどの細胞も緑の蛍光を発し、*lacZ* によってコードされる β -ガラクトシダーゼ活性は極めて高い。

細胞の分化誘導実験は MC58 を用いて行った。胚様体形成による、分化過程で XCI の代表的な指標である晚期複製 X 染色体の出現、*GFP* による蛍光の変化、X-Gal 染色による β -gal 活性の消長を検討した。これらの指標は分化誘導開始後 4～5 日目に出現し、時間的にほぼ並行的に変動した後、約一週間で最高値に達したが、細部には違いも認められた。

GFP トランスジーンはリアルタイムに、しかも細胞を生かしたまま不活性化を検知出来るので、これら ES 細胞株は今後 X 染色体不活性化研究などへの活用が期待される。当研究では、あたかも母由来 X 染色体が選択的に不活性化されたような様相を呈する細胞もあることが示された。また、予備実験では、GL2 細胞にも、同様な振る舞いをする細胞の存在が認められた。更に詳しい検討によって、従来気付かれることのなかった面白い現象も見いだされる可能性が高い。

以上のように、本論文は XX EC 細胞株の樹立と、細胞分化誘導時の X 染色体の振る舞いを検討した。細胞を生かしたまま XCI の進行状態を知ることが出来、しかも XCI によって生じるモザイクパターンが容易に観察できる。これを基に XCI の分子機構や不活性化される X 染色体の選択機構の解明など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）の学位を受ける資格を有するものと判断した。