

学位論文題名

Mapping of the breakpoint in the mouse T(X;16)16H
translocation that causes non-random X
chromosome inactivation.

(選択的 X 染色体不活性化の原因となる
マウス T(X;16)16H 転座点のマッピング)

学位論文内容の要旨

哺乳類の雌では雌雄間で生じる X 染色体連鎖遺伝子の発現量の違いを補正するため、胚発生初期に X 染色体不活性化 (XCI) が起こり、雌では二本の X 染色体のうち一方がほぼ完全に不活性化される。マウスの胚体外組織では刷り込み型の XCI が起こっており、父方由来の X 染色体が常に不活性化している。しかし、将来、胎児を形成する胚体部では不活性化する X 染色体は胚発生 6.5 日目までにランダムに決定し、一旦不活性化された X 染色体は細胞分裂を経ても変化することなく受け継がれる。

胚体外部では刷り込み型の不活性化を受ける X 染色体が、胚体部ではランダムに不活性化される機構がどのようなものであるは解っていないが、いくつかの要因によってこのランダムな不活性化が偏ることが知られている。未だ同定に至っていないが Xce (X-chromosome controlling element) は不活性化する X 染色体に必須な領域である Xic (X-chromosome inactivation center) 内にあり、対立遺伝子の組み合わせにより不活性化する X 染色体の選択に偏りを与える。同じく Xic 内にある Xist (X inactivation specific transcript) 遺伝子や Xist のアンチセンス鎖より発現する Tsix 遺伝子のノックアウトマウスでも不活性化に偏りが現れることが報告されている。

16 番染色体と X 染色体の相互転座である T(X;16)16H (以下 T16H とする) を持つマウスでも XCI に偏りが見られ、成熟雌の体細胞では正常 X 染色体のみが不活性化されている。他の X-常染色体相互転座マウスではこのような選択的な不活性化が見られないことから T16H マウス特異的な現象であると考えられる。X 連鎖遺伝子 *Pgk-1* のアロ酵素を利用した研究では、T16H 胚では正常 X 染色体と T16H の不活性化はランダムに起こるが、Xic を持つ 16^X 染色体が不活性化された細胞は遺伝的に不均衡な状態になるため淘汰されていくと考えられた。しかしながら、T16H マウス胚でも発生段階で細胞死による発生の大きな遅れや異常が見られないことや細胞遺伝学的な研究では受精後 6.5 日目胚で

はすでに正常 X 染色体が不活性化された細胞が圧倒的に多く存在していることから、不活性化する X 染色体の選択は XCI 開始時点から偏っている可能性が示唆されている。

本研究では、最初に RT-PCR 法を用いた研究から初期胚での不活性化の偏りについての検討を試みた。雌 T16H マウス ($X^n/X^{16};16^X/16$) を JF-1 マウス雌と C57BL/6J 雄との交配で得られた F_1 雑種 (X^J/Y) の雄と交配し、受精後 6.5 日目と 7.5 日目に雌 T16H マウスから胚を回収した。転座点近傍のマーカー *DXMit62* は 16^X 特異的な多型があり、*DXMit78* は X^J に多型が見られることを利用して胚の核型の決定を行った。*Xist* RNA の蓄積量に加え、それぞれ転座点より近位と遠位にある X-連鎖遺伝子 *Hprt*、*Pgk-1* の RNA 蓄積量を RT-PCR 法を用いて比較した。アレルを区別するため *Xist*、*Hprt*、*Pgk-1* の PCR 産物はそれぞれ *HindIII*、*ScrFI*、*HinfI* で消化した。

10 個の 7.5 日正常胚 (X^n/X^J) ではアレル間の *Xist*、*Hprt*、*Pgk-1* の RNA 蓄積量の比較からランダムな不活性化が起こっていると考えられた。一方、11 個の 7.5 日 T16H ヘテロ雌 (T16H/ X^J) 胚の解析では、*Xist*^{T16H}RNA が平均 7.2% (1.7-14.9%)、*Hprt*^{JF-1}RNA が平均 12.8% (5.4-23.1%)、*Pgk-1*^{JF-1}RNA が平均 13.2% (4.1-27.7%) の蓄積量で正常 X 染色体が不活性化されている細胞が多数を占めていることが示された。さらに、5 個の 6.5 日 T16H ヘテロ雌 (T16H/ X^J) 胚の解析では、*Hprt*^{JF-1}RNA と *Pgk-1*^{JF-1}RNA の蓄積は平均 12.1% (2.9-20.6%) と平均 16.1% (13.8-18.0%) の蓄積量であったため、T16H 雌胚は受精後 6.5 日目ですでに正常 X 染色体が不活性化した細胞が多数を占めていると考えた。T16H 6.5 日目胚の *Xist*^{T16H}RNA の蓄積量は平均 18.8% (11.7-23.2%) と *Hprt* や *Pgk-1* の結果に比べやや高い結果が得られたが、本来 *Xist* RNA の発現のない雄の 6.5 日胚からも *Xist* RNA のシグナルが検出されたことから、この結果は *Tsix* RNA の影響を受けていると考えた。これらの結果は先に報告されている細胞遺伝学的な解析結果を支持するものであり、胚体部の不活性化が 5.5 から 6.5 日目に始まることと併せて考えると、T16H 雌では XCI 開始時点で正常 X 染色体が選択的に不活性化されている可能性が高いとの結論に達した。

正常 X 染色体の選択的 XCI は T16H 転座マウスで特異的に見られることから、転座点近傍に存在しているランダムな XCI の選択に関与している遺伝子または調節領域が T16H の転座によって突然変異を引き起こされている可能性があると考えた。そこで次に T16H 転座点のマッピングを試みた。T16H の転座点は *G6pdx* 遺伝子と *Pola* 遺伝子の間約 4 cM の領域にあることが報告されている。データベース上で公開されている YAC を用いた物理地図に Radiation Hybrid マップから得られたマーカーを配置することで、転座点の近傍領域のより詳細な物理地図を作製した。この物理地図上にあるマーカーを元に BAC クローンをスクリーニングし、得られた BAC クローンをプローブとして FISH 法による解析を行った。その結果、BAC188-15F と 297-100 に挟まれた約 2.8 Mb の領域に転座点が存在していることが示された。この領域には 17 個の BAC クローンからなる不完全なコンティグが公開されていたので、これらの BAC クローンを用いて FISH 法による解析

を行ったところ、RP23-132M12 は転座点より近位に、RP23-61E2 は遠位にあることが明らかになった。この BAC クローン間の領域を 7 個の BAC クローンの塩基配列とマウスゲノム計画で公開されている 35.6 kb の塩基配列から、約 900 kb の完全なコンティグにすることができた。5 個の BAC クローンについてはすでに塩基配列が公開されている。しかしながら、これらの 7 個の BAC クローンをプローブにした FISH 法による解析ではシグナルが X^{16} と X^{16} の両方の染色体から検出され、転座点の位置をさらに詳細に特定することができなかった。以上の結果から転座点を物理的に完全な約 900 kb の領域にマッピングすることができた。この領域内に不活性化する X 染色体の選択に関与する新規遺伝子または調節領域が存在していると考えられる。

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 松 田 洋 一
副 査 助 教 授 瀧 谷 重 治

学 位 論 文 題 名

Mapping of the breakpoint in the mouse T(X;16)16H translocation that causes non-random X chromosome inactivation.

(選択的 X 染色体不活性化の原因となる
マウス T(X;16)16H 転座点のマッピング)

哺乳類の雌では雌雄間に生じる X 染色体連鎖遺伝子の発現量の違いを補正するため、胚発生初期に X 染色体不活性化 (XCI) が起こり、雌では 2 本の X 染色体のうち一方がほぼ完全に不活性化される。マウスの胚体外組織では父方由来の X 染色体が常に不活性化しているが、将来、胎児を形成する胚体部では胎生 6.5 日目までにランダムな XCI が起きる。一旦不活性化された X 染色体は細胞分裂を経ても変化することなく受け継がれる。

胚体部でランダムな XCI がおきる機構については、いくつかの要因が知られている。Xce (X-chromosome controlling element) は不活性化する X 染色体に必須な領域である Xic (X-chromosome inactivation center) 内にあり、対立遺伝子の組み合わせにより不活性化する X 染色体の選択に偏りを与える。同じく Xic 内にある *Xist* (X inactivation specific transcript) 遺伝子や *Xist* のアンチセンス鎖より発現する *Tsix* 遺伝子のノックアウトマウスでも不活性化に偏りが現れる。

16 番染色体と X 染色体の相互転座である T(X;16)16H (以下 T16H とする) を持つマウスでも XCI に偏りがあり、成熟雌の体細胞では正常 X 染色体のみが不活性化している。X 連鎖遺伝子 *Pgk-1* のアロ酵素を利用した研究では、不活性化はランダムに起こるが、Xic を持つ 16^x 染色体が不活性化した細胞は遺伝的に不均衡な状態になるため淘汰されると結論された。しかし、細胞遺伝学的データは、X 染色体の選択は XCI 開始時点で既に偏っている可能性を示唆している。

本研究では、最初に RT-PCR 法を用いて初期胚での XCI の偏りを検討した。T16H/+マウスを雌 JF-1 マウスと雄 C57BL/6J との交配で得られた F1 雄 (X^J/Y) と交配し、受精後 6.5 日目と 7.5 日目に胚を回収し、マイクロサテライトマーカーの多型を利用して胚の核型を決定した。*Xist* ばかりでなく転座点より近位および遠位にある *Hprt*、*Pgk-1* 遺伝子の RNA 蓄積量も RT-PCR 法で比較した。7.5 日正常胚 (X^n/X^J) ではランダムな XCI が起きていることを示すデータが得られた。一方、7.5 日 T16H/+胚では、*Xist*^{T16H}RNA が平均 7.2% (1.7-14.9%)、*Hprt*^{JF-1}RNA が平均 12.8% (5.4-23.1%)、*Pgk-1*^{JF-1}RNA が平均 13.2% (4.1-27.7%) で正常 X 染色体が不活性化されている細胞が多数を占めた。さらに、6.5 日胚の解析では、*Hprt*^{JF-1} RNA と *Pgk-1*^{JF-1} RNA の蓄積は平均 12.1% (2.9-20.6%) と平均 16.1% (13.8-18.0%) なので、これらの胚ではこの時期にすでに正常 X 染色体が不活性化した細胞が多数を占めている。*Xist*^{T16H}RNA の蓄積量は平均 18.8% (11.7-23.2%) とやや高いが、*Tsix* RNA を検出している可能性がある。これらの結果は先に報告されている細胞遺伝学的な解析結果を支持するもので、胚胎部の XCI が 5.5 から 6.5 日目に始まることを考えると、T16H/+では正常 X 染色体が選択的に不活性化する可能性が高い。

正常 X 染色体の選択的 XCI は T16H/+マウスで特異的なので、転座点近傍にあるランダムな XCI の選択に関与している遺伝子または調節領域が T16H 転座によって変異した可能性がある。そこで、T16H 転座点のマッピングを試みた。転座点は *G6pdx* 遺伝子と *Pola* 遺伝子の間約 4 cM の領域にあると報告されてきた。データベースに公開されている YAC 物理地図に Radiation Hybrid マップから得られたマーカーを配置して、転座点の近傍の詳細な物理地図を作製した。この物理地図上にあるマーカーを元に BAC クローンをスクリーニングし、得られたクローンをプローブとして FISH 法による解析により、転座点は BAC188-15F と 297-100 に挟まれた約 2.8 Mb の領域に存在することを示した。この領域には完全ではないが 17 個の BAC クローンからなるコンティグが公開されていた。これらの BAC クローンをを用いて FISH 法による解析より、RP23-132M12 は転座点より近位に、RP23-61E2 は遠位にあることを明らかにした。この BAC クローン間の領域を 7 個の BAC クローンの塩基配列とマウスゲノム計画で公開されている 35.6 kb の塩基配列から、約 900 kb の完全なコンティグにすることができた。

本研究では 7 個の BAC クローンをプローブにした FISH 法による解析ではシグナルが X^{16} と X^{16} の両方の染色体から検出されたため、残念ながら転座点に到達できなかった。しかし、シーケンスの解析から約 240 kb の領域に転座点が狭められた。この領域内に不活性化する X 染色体の選択に関与する新規遺伝子または調節領域が存在していると考えられる。この結果を基に 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。