

平成25年 3月

相馬淳美 学位論文審査要旨

主 査 押 村 光 雄
副主査 竹 内 隆
同 佐 藤 建 三

主論文

Visualization of inactive X chromosome in preimplantation embryos utilizing
MacroH2A-EGFP transgenic mouse

(MacroH2A-EGFPトランスジェニックマウスを利用した着床前胚における不活性X染色体の
可視化)

(著者：相馬淳美、佐藤建三、中西友子)

平成25年 Genesis 掲載予定

学 位 論 文 要 旨

Visualization of inactive X chromosome in preimplantation embryos utilizing MacroH2A-EGFP transgenic mouse

(MacroH2A-EGFPトランスジェニックマウスを利用した着床前胚における不活性X染色体の可視化)

哺乳類の雌では、2本あるX染色体のうち1本が、雌雄間のX連鎖遺伝子量を補正するために不活性化されている。このX染色体不活性化は胚発生に必須であるが、胚発生期に起こるため、不活性化過程の分子機構の解析が困難である。そこで本研究では、不活性X染色体に豊富に局在することが報告されているMacroH2AとEGFPの融合タンパク質を用いて、トランスジェニック (Tg) マウスを作製し、不活性X染色体を経時的に観察出来るシステムを構築した。

方 法

全身発現性のサイトメガロウイルスプロモーター(CAG)の下流でマウスMacroH2A1.2とEGFPの融合タンパク質(MacroH2A-EGFP)を発現するコンストラクトを作製し、雌マウス培養細胞でMacroH2A-EGFPの局在を検討した。このコンストラクトを用いて、Tgマウスを作製した。臓器における融合タンパク質の発現を検討するために、ウェスタンブロットと蛍光顕微鏡下での観察を行った。更にTgマウスと野生型マウスを交配し、受精卵を回収したのち、*in vitro*で培養した着床前胚のXist RNAの検出のためFISHを行った。

結 果

雌マウス培養細胞にMacroH2A-EGFP発現コンストラクトを導入した結果、MacroH2A-EGFPは核内全体に局在していたが、核内には1点の強いシグナルが観察され、そのシグナルは不活性X染色体のマーカとなるXist RNAと共局在した。作製したTgマウスの臓器のウェスタンブロッティングを行ったところ、MacroH2A-EGFPが核に局在していることがタンパクレベルで示された。また、蛍光顕微鏡下で雌マウスの組織切片を観察した結果、雄では見られない不活性X染色体を示す1点の強いシグナルが観察された。更に雌の初期胚では、全てのステージにおいてMacroH2A-EGFPは核に局在していたが、8細胞期頃よりMacroH2A-EGFPの強いシグナルの一部とXist RNAは共局在し、胚盤胞期胚では大部分の割球にMacroH2A-EGFP

の1点の強いシグナルが観察され、その強いシグナルはXist RNAと共局在した。

考 察

雌マウスの培養細胞だけでなく、Tgマウスにおいても、MacroH2A-EGFPの強いシグナルは不活性X染色体を示す指標になることが示唆された。また、内在性のMacroH2Aは8細胞期以降に発現し、8-16細胞期に不活性X染色体上に集積し始めることが報告されているが、MacroH2A-EGFPは4-8細胞期に不活性X染色体上へ集積を開始したことから、MacroH2Aは4-8細胞期に不活性X染色体上へ集積しうる可能性が示唆された。更にMacroH2A-EGFPは発生が進むにつれ、不活性X染色体上に蓄積することが示唆された。

結 論

全身でMacroH2A-EGFPを発現するTgマウスを作製した。そのマウスでは、MacroH2A-EGFPの強いシグナルを指標に、体細胞及び着床前胚の不活性X染色体を可視化出来ることが示唆された。恒常的にMacroH2A-EGFPを発現するこのマウスは、胚発生期のみならずライフサイクルを通して、経時的なX染色体の変化を観察出来る有用な実験モデルになると期待される。