

氏名・(本籍)	さい じょう ゆき お 西 條 幸 男
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理博第1228号
学位授与年月日	平成3年3月28日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
研究科専攻	東北大学大学院理学研究科 (博士課程) 生物学専攻
学位論文題目	マウス初期発生における $A^y$ 致死遺伝子の作用に関する研究
論文審査委員	(主査) 教 授 竹 内 拓 司      教 授 長 内 健 治 助 教 授 井 出 宏 之

## 論 文 目 次

### 序 論

#### 材料と方法

- I. 実験動物
- II. 着床前胚の培養
- III. 割球解離
- IV. 胚盤胞の培養
- V. 胚盤胞内 cAMP の定量
- VI. 検定

#### 結 果

- I. 初期胚盤胞培養下における  $A^y/A^y$  胚の観察
- II. 8細胞期胚における割球解離実験
- III. 透明帯からの孵化 (Hatching) における  $A^y/A^y$  胚の異常について
- IV.  $A^y/A^y$  胚の孵化異常における dbcAMP の効果について

V. 胚盤胞内 cAMP 量の測定

VI. アデニレートサイクレーズの活性について

VII. 後期胚盤胞（孵化前後の胚）におけるプロテインカイネース A (PK-A) について

## 論 議

I. 培養下における  $A^y/A^y$  胚の異常発現について

II. 割球解離実験について

III. 孵化率における異常について

IV. 孵化における  $A^y/A^y$  胚の異常と dbcAMP

V.  $A^y/A^y$  胚における胚内 cAMP 量について

VI. cAMP 量低下の原因について

VII.  $A^y/A^y$  胚の異常発現の場所について

VIII. ヘテロ接合体とホモ接合体における異常の発現機構の関連性について

IX. 結論および展望

## 要 約

## 謝 辞

## 引用文献

## 図 表

## 論文内容要旨

ヒトをはじめとする多細胞動物は、受精卵というたった1個の細胞を出発点として「発生」を始める。その発生とは、時間と空間の軸に沿った遺伝子発現によってもたらされる分化の連続により形態形成が起こり、それがさらに連続することによって、1つの秩序だった個体を形成していく過程である。1つの細胞から個体へというダイナミックな変化を伴った初期発生は古来より多くの研究者の興味の対象となってきた。これまでの初期発生に関する多くの研究はウニなどの無脊椎動物あるいはアフリカツメガエルなどの両生類を対象として行われてきたが、これらの動物は遺伝的変異の記載に乏しく、遺伝子発現と分化の関連性について未知の部分が多く残されている。

哺乳類胚は、完全な調節卵であり、全能性を持つ未分化な細胞集団においてどのように分化が誘導されていくのか大変興味ある問題である。そこで、突然変異が多数記載され、遺伝的純系も確立されているマウスに着目した。突然変異体を解析することは、それに相当する正常遺伝子の機能を知る手がかりとなる。解析に用いた突然変異体はlethal yellow ( $A^y$ )である。lethal yellowはホモ( $A^y/A^y$ )で致死となり、着床できずに死滅していくため、初期発生における遺伝子発現と分化の関係を探るうえで好適な材料である。本実験は、

1. 異常を確認し、その現れる時期を決定する。
2. 異常の発現のメカニズムを、回復実験によって分子レベルで解析する。

という方針に基づいて行った。

用いたマウスは、C57BL/6J ( $a/a$ )および、C57BL/6J- $A^y$  ( $A^y/a$ )である。 $A^y/A^y$ 胚は、 $A^y/a \times A^y/a$ の交配から得、これを実験区とした。また  $a/a \times a/a$  あるいは  $A^y/a \times a/a$  の交配から得た胚を対照区とした。

先に、コンパクションの時期における大きな割球の脱落が  $A^y/A^y$ 胚特異的な異常とする報告がなされていた (Pedersen, 1974)。この報告からマウス初期発生における最初の分化誘導が行われる、コンパクションの時期に  $A^y$ 遺伝子が重要な役割を果たしていることが考えられた。そこで、この報告にある大きな脱落割球に着目し、その異常を確認するため、まず、培養下で形態観察を行った。受精卵から胚盤胞まで培養し、その発生を観察したところ、実験区に特異的な形態的異常は観察されなかった。先の報告に見られたような大きな脱落割球の出現は実験区、対照区にそれぞれ1例ずつ観察されたのみであった。次に培養下に移す時期を2細胞、4細胞、8細胞、桑実胚、と変えて胚盤胞まで培養し、同様に発生を観察したが、実験区における特異的な異常は観察されなかった。また、胚盤胞までの発生率および、発生速度についても検討したが、実験区に特異的な異常は観察されなかった。

さらに、脱落割球の出現の報告から、8細胞期以降分裂を止める割球の存在することが推測され、解離実験を行い8細胞期の割球の分裂能について調べた。8細胞期の胚を解離し、それぞれの割球を培養して何個の細胞にまで分裂するかを観察した。分裂しない割球から5細胞以

上にまで分裂したものまで観察されたが、それぞれの細胞数で分裂を止めた割球が全体の何%かを調べ、実験区、対照区の間で比較した。その結果、分裂しなかった割球は実験区、対照区ともに約9%であり有意な差は観察されなかった ( $p > 0.1$ )。またそれ以上分裂した割球の比較においても実験区、対照区の間で有意な差は観察されなかった ( $p > 0.1$ )。従って本研究において大割球の脱落は確認されず、胚盤胞形成時までに  $A^y/A^y$  胚特異的な異常は観察されないという結論に達した。次に、胚盤胞以降の発生に着目し、胚盤胞の孵化について検討したところ、孵化率は実験区：46.9%、対照区：76.9%であり、実験区において、 $A^y/A^y$  胚の異常と考えられる孵化率の有意な低下が観察された ( $p < 0.05$ )。実験区における  $A^y/A^y$  胚の存在比が1/4であることから、ここで見られた、実験区における孵化率の低下は理論値より大きく、 $A^y/a$  胚においても孵化率が低下している可能性が考えられ、対照区として  $A^y/a \times a/a$  の交配から得られた胚についても孵化率を調べた。結果は79.3%であり、 $a/a \times a/a$  の交配から得られた胚の孵化率と有意な差は見られず ( $p > 0.1$ )、実験区に対して有意な差が見られた ( $p < 0.05$ )。実験区で見られた孵化率は  $A^y/A^y$  胚によるものであることが示された。

この実験区における孵化率の低下を1つの系と考え、次に回復実験を行った。回復させる因子として、cAMP が考えられた。その理由は、孵化の要因の1つと考えられる、胚盤胞の時期に胚盤腔形成に cAMP が関与していること、ヘテロ個体における多面発現の1つである、黄毛色形成の原因が色素細胞内の cAMP レベルの低下にあることである。cAMP の膜透過性のアナログ dbcAMP を培地中に添加し培養して、その効果を調べた。対照区において有意な変化は観察されなかった (孵化率78.9%、 $p > 0.1$ )。実験区において孵化率の有意な上昇が観察された (82.1%、 $p > 0.1$ )。さらに dbcAMP の濃度を10 $\mu$ M、100 $\mu$ M と変えたとき、対照区の孵化率には有意な変化が見られなかったが、実験区の孵化率は79.3%、60.0%と濃度依存的に変化し、実験区の孵化率上昇に dbcAMP が関与していることが示された。

dbcAMP を培地に添加することにより孵化率が上昇したことから、 $A^y/A^y$  胚中の cAMP 量の低下が推測された。そこで孵化の時期の胚内 cAMP 量を測定した結果、胚当りの cAMP 量は実験区：2.47fM、対照区：3.18fM となり、実験区に有意な低下が観察された ( $p < 0.05$ )。また、この時期の対照区の胚にプロテインカイネース A の阻害剤、H8 を加え培養したところ、孵化率の有意な低下が観察された (25.5%、 $p < 0.05$ )。また、培養後12時間で胚盤胞内の内部細胞塊が解離する異常な形態が観察され、孵化の起こる時期にアデニレートサイクレーズを介する情報伝達系が機能している可能性が示された。これら一連の実験によって、 $A^y/A^y$  胚を含む実験区における孵化率の低下は、アデニレートサイクレーズを介する情報伝達系における異常によることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

マウスの  $a$  遺伝子座における  $A^y$  対立遺伝子はホモで致死となる致死遺伝子である。この遺伝子は今世紀のはじめに発見されたものでありながら、今日までその作用機序は明らかにされていない。しかも、 $A^y$  ホモ胚の発生に関する形態的観察から、相矛盾する報告がなされていたものである。

著者は先づ  $A^y$  ホモ胚においてどの時期にどのような異常が生じるのか、卵割期の胚培養と分離割球の培養によって検討し、 $A^y$  ホモ胚においても胚盤胞 1 期までは異常が現れないことを明らかにした。次に正常胚発生の着床期に相当する時期に培養条件において見られる孵化現象に着目して、 $A^y/a$  と  $A^y/a$  のヘテ同士の交配による  $A^y$  ホモを含む胚と、野生型の交配による胚を比較したところ、 $A^y$  ホモ胚では孵化の時期に異常が現れ、孵化が不能であることが観察された。

そのような異常を修復するためにデブチリルサイクリック AMP を培養液に加えたところ、 $A^y$  ホモの孵化率が上昇するような結果が得られた。そこで胚あたりのサイクリック AMP の濃度を測定し、 $A^y$  ホモの胚は野生型に比較して胚あたりのサイクリック AMP 濃度が有意に低いことを発見した。

又、正常胚にタンパクキナーゼ A の阻害剤である H8 を加えて培養した結果孵化率の有意な低下が観察された。この時形態的にも胚盤胞内の内部細胞塊が解離する異常が観察された。

これらの実験結果からマウスの正常発生においては孵化—着床の時期にサイクリック AMP の濃度上昇が必要であり、 $A^y$  ホモ胚においてはその濃度を低下させるような異常がある、つまり  $a$  (アグチ) 遺伝子座はアデニルシクラーゼ系の情報伝達系に関与するものであるという結論を導いた。

この成果は哺乳類胚の初期発生における遺伝子の作用に関する新しい知見である。従ってこの論文は著者がこの分野において自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示しており、よって西條幸男提出の論文は理学博士の論文として合格と認める。