

博士論文

マウスの配偶子形成に關与する遺伝子の
機能に關する研究

岡山大学大学院
自然科学研究科博士後期課程
バイオサイエンス専攻
51423409

平成 26 年 3 月

梶田 晋平

目次

第一章 諸論	1
第二章 <i>sks</i> 突然変異マウスにおける核膜の形態およびテロメアの配置の観察	
諸言	9
材料方法	12
結果	17
考察	19
図および表	21
第三章 <i>sks</i> 突然変異メスマウスにおける表現型の解析	
諸言	25
材料方法	27
結果	31
考察	36
図および表	39
第四章 TMEM48 と結合するタンパク質の探索	
諸言	49
材料方法	52
結果	62
考察	65
図および表	67
第五章 Tdrd12 遺伝子および TDRD12 タンパク質の精巢における発現解析	
諸言	78
材料方法	80
結果	84
考察	97
図および表	89
第六章 総括	97
謝辞	103
参考文献	104

第一章

諸論

・マウスを用いた遺伝子の機能解析

2000年にヒトおよびマウスのゲノム配列が解読されて以来、マウスを用いた遺伝子の機能解析は飛躍的に進んでいる。ゲノム配列の解読以前よりマウスを用いた遺伝子の機能解析は行われており、自然発生の突然変異マウスがその主なツールであった。加えて、放射線や変異原性薬剤であるエチルニトロソウレア（ENU）の投与などによる大規模な突然変異マウスの作出も頻繁に行われている。これらの方法は、突然変異マウスの表現型を解析し、さらにその原因となっている遺伝子の突然変異を探し出すことで、変異を持つ遺伝子の本来の機能を解明しようとする方法であり、順遺伝学（フォワードジェネティクス）と呼ばれる。一方で、特定の遺伝子の機能を人為的に改変・欠損・破壊することで、どのような表現型が出るかを解析し、遺伝子の機能を解明する方法も発達しており、逆遺伝学（リバーズジェネティクス）と呼ばれる。胚性幹細胞（ES細胞）の開発によりこれまでマウスでは、相同組み換えを利用したゲノム改変技術が利用されてきた。近年では、ノックアウトマウスプロジェクトと呼ばれる、マウスにおける全遺伝子を対象としたノックアウトマウスの作出・解析プログラムが世界規模で進行しており、逆遺伝学的手法により遺伝子の機能を大規模解析する試みがなされている。一方最近では、相同組み換えではない方法により目的の遺伝子を改変する方法も開発されており、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFNs）や、その発展型であり植物病原菌由来の TALE（transcription activator-like effectors）にヌクレアーゼドメインを融合させた TALEN（Christian et al., 2010）、バクテリアの獲得免疫システムとして発見された CRISPR/Cas9 システム（Mali et al., 2013）を利用した方法が挙げられる。これらの方法では従来の方法とは異なり、胚性幹細胞が遺伝子改変動物の作出に必須ではないため、マウスに限らず多くの動物種で遺伝子改変動物の作出が可能となった。このようにゲノム情報の操作技術の開発が進み、マウスのみではなく遺伝子の機能解析が可能となってきてはいるものの、マウスにおいてこれまでに蓄積されたデータは膨大であり、かつ実験動物としての利点も優れているため、遺伝子の機能解

析研究におけるマウスの存在は極めて重要である。

遺伝子の機能を解析するに当たり順遺伝学的アプローチを利用する場合の長所として、新規遺伝子の可能性、変異の多様性、疾患モデル動物としての有用性等が考えられる。この場合における新規遺伝子の可能性とは、変異の種類や表現型を決定している遺伝子が不明であるため、目的の表現型や生理機構において機能する新規の遺伝子を発見する可能性を秘めており、今まで明らかとなっていない遺伝子の関与を示唆することが出来るということである。自然界で起こる突然変異は実に多様であり、染色体レベルで起こる転座や欠損、挿入、重複、逆位、塩基レベルで生じる置換や欠失、挿入等多岐に広がる。特に染色体レベルで起こる変異は人為的に誘発することが難しく、動物を作出することは困難である。また塩基レベルのみで考えても、遺伝子の翻訳領域に置換が生じる可能性もあれば、非翻訳領域に置換が生じる場合もあり、また、エクソンではなくイントロンに突然変異が生じる場合もある。さらに、発現調節部位に突然変異を生じることでも遺伝子の発現に影響を及ぼす。翻訳領域に生じる変異でも、ナンセンス変異に伴う早期停止コドンの誘発による機能欠損だけでなく、ミスセンス変異に伴うアミノ酸変異もあり、変異の生じる部位によっても大きく異なる結果をもたらす場合がある。さらに近年では、ノンコーディング RNA と呼ばれる RNA の存在が発生等の生物学上重要な現象に必須の役割を果たしていることが明らかとされており、タンパク質情報に関与しないゲノム領域における変異の発生も研究対象として重要である。これらのことから、目的の表現型・病態に関与する新規遺伝子の発見の可能性や、ヒトにおいてみられる突然変異の発見、各種変異の表現型に与える影響を解析できる点において、自然発症等の突然変異マウスを使う利点が存在する。特にヒト疾患モデル動物としては有用である。

・減数分裂と配偶子形成

現在、哺乳類を含む多くの高等生物は有性生殖をおこなっている。有性生殖では、両親

から遺伝子のセットを受け継ぐため、核型を半減させる必要がある。そのため減数分裂と呼ばれる体細胞分裂とは異なる特殊な細胞分裂を経ることで配偶子が形成される。減数分裂は、間に DNA の複製を挟むことなく細胞分裂を 2 回連続して行うことで染色体数を半減させる分裂様式であり、配偶子を形成する過程で非常に重要である。減数分裂は、減数分裂第一分裂と減数分裂第二分裂とに分けることができる。さらに、減数分裂第一分裂前期はレプトテン期、ザイゴテン期、パキテン期、ディプロテン期、ディアキネシス期の 5 つの時期に分類することができる。レプトテン期では染色体が凝集し始め、ザイゴテン期では相同染色体の対合が開始する。パキテン期にはシナプトネマ複合体が完成し、交叉・組み換えが起こり、染色体の部分的な交換が行われる。また、ディプロテン期には対合が解離し始めキアズマが確認できるようになる。ディアキネシス期は減数分裂第一分裂中期への移行期間であり、前期を終了すると減数分裂第一分裂中期、後期を経て相同染色体は姉妹染色分体へと分離される。減数分裂第一分裂が終わると、減数分裂第二分裂が開始し、前期、中期、後期を経て姉妹染色分体は分離され染色体数が半減した半数体が形成される。

マウスのオスでは発生に伴い、精子形成ファーストウェーブと呼ばれる、精巣内において最初に観察される同調した精子形成が起こる。そのため、特定の日齢の精巣を観察することで、精子形成の特定の進行段階における様子を調べることが可能である。例えば、マウスでは生後 10 日頃より減数分裂が開始し、12 日にはレプトテン期・ザイゴテン期の細胞が多く観察され、14 日にはパキテン期の精母細胞が観察されるようになる (Bell et al., 1977)。そして、20 日頃にはディプロテン期に入り、22 日頃になると中期像が観察されるようになり、その後円形精子細胞が観察され、30 日前後で伸長精子細胞が観察される。マウスの場合、精原細胞が分化を開始し、およそ 35 日を経て精子が産生されている。精子形成における細胞分化の周期性があり、かつ周囲の細胞と同調して精子形成が進行しているため、成熟した個体では精細管内の細胞種において、12 のステージへと分類することができる。

多くの哺乳類において、オスの場合では、生後始めて起こる精子形成であるファーストウェーブ以降、全ての過程が連続かつ持続して行われ、精子形成が行われる。一方メスの場合、減数分裂は胎仔期に完了してしまっていることが多い。マウスでは、胎齢 12.5 日頃生殖隆起へと達した始原生殖細胞が増殖を開始し、その後オスでは出生後まで休眠状態へと入る。メスではその後 13.5 日頃から減数分裂へと入り、同調して減数分裂第一分裂をディプロテン期まで完了させた後、網状期へと入り一度休止する (BORUM, 1961; Speed, 1982)。出生後は、選抜された卵母細胞が、周囲の体細胞である顆粒層細胞や卵丘細胞、卵膜細胞といった体細胞および、ホルモンの作用により卵胞と呼ばれる単位で成長してゆき、細胞の巨大化を伴い成長・成熟してゆく。十分に成長した卵胞は、排卵刺激である LH サージの影響により卵母細胞を排卵する。同時に、LH サージの影響により卵母細胞は減数分裂を再開させ、第一極体放出を経、減数分裂を第二分裂中期まで進行させ再び停止する。その後、受精の刺激により第二極体の放出および減数分裂を完了させ、以降の発生へと進む。

・配偶子形成機構に関与する遺伝子の機能を解析する意義

精子や卵子といった配偶子は、受精を通して遺伝情報を次世代へ伝達し、生命の連続性を維持することに特化した細胞である。精子や卵子への分化過程である配偶子形成に異常を生ずると、正常な精子・卵子が生産されず、多くの場合「不妊」となる。この配偶子形成過程の解明は、人為的に動物の生殖をコントロールする方法の開発につながるため、重要な研究課題である。すなわち、産業動物の効率的な生産や、野生動物の個体数の調節など、応用分野における活用が期待され、必要度も高い。また、ヒトにおいても、不妊症は特に先進国で深刻な社会問題として取り上げられている疾患の一つである。そのため、配偶子形成に関わる分子機構の解明は、動物における生殖コントロールだけでなく、ヒトにおける不妊症の治療法の開発につながる重要な課題として取り組まれている。その結果、これ

までに、配偶子形成には多くの遺伝子が関与することが明らかとされてきたが、いまだに未解明な部分も多く残っている。配偶子形成に不可欠かつ特徴的な現象である減数分裂の分子機構の解明は、ヒトや各種動物における生殖機能の効率的な制御方法の確立に大きく貢献する重要な課題であり、減数分裂に異常を呈するマウスは、この課題を研究・解決するための有用なモデル動物である。

そこで本研究では、当研究室にて導入・維持されている不妊を呈する突然変異マウスである *sks* マウスおよび *repro23* マウスの 2 系統に焦点をあて、これらの突然変異マウスの配偶子形成異常に関与する遺伝子の機能解明を試みた。

・ *sks* 突然変異マウス

sks 突然変異マウスは、アメリカのジャクソン研究所で樹立された、自然発症の突然変異マウスである (Handel et al., 1988)。中軸骨格に異常を持ち、雌雄ともに不妊となる。これまでの研究から、相同染色体の対合に異常を生じることで精子形成が減数分裂第一分裂前期パキテン期で停止し、精子が生産されないことから不妊を呈することが確認されている (Handel et al., 1988; Akiyama et al., 2013)。一方メスでは、長期交配を行っても産子が得られないことから不妊であるとされているが、詳しい表現型の解析は行われておらず、不妊の原因は明らかとされていない。

さらに、連鎖解析による候補領域の縮小および候補領域内の遺伝子の塩基配列の解析、大腸菌人工染色体 (BAC) による表現型の回復試験により、*sks* 突然変異マウスに生じた表現型の原因として *Tmem48* 遺伝子の第 6 エクソンに生じた 2 塩基の塩基置換が同定された (Akiyama et al., 2013)。この塩基置換により、*Tmem48* 遺伝子の第 6 エクソンがエクソンとして認識されず、成熟した mRNA においてスプライシング異常により第 6 エクソンを欠損してしまう。この第 6 エクソンの欠損に伴い、フレームシフトが生じ本来より早い位置で停止コドンが出現し、正常な *TMEM48* タンパク質が生産されていないことが確認され

ている (Akiyama et al., 2013)。

・ *repro23* マウス

repro23 マウスは、アメリカのジャクソン研究所において実施されたリプロジェノミックス計画により作出された ENU 誘発の突然変異マウス系統である。これまでの研究により、減数分裂第一分裂前期の早い段階において異常が生じ、精子形成が停止し、精子が生産されないことから不妊を呈することが確認されている (Asano et al., 2009)。*repro23* マウスの精巣は正常個体と比較して著しく小さく、精巣および精巣上体に成熟した精子は観察されない (Asano et al., 2009)。また、*repro23* マウスの精細管では、空胞化した精細管が多く観察され、レプトテン期以降の細胞がほとんど観察されない。さらに、連鎖解析による候補領域の縮小および候補領域内の塩基配列の解析から、この *repro23* マウスに生じた表現型の原因として、*Tdrd12* 遺伝子の第 8 エクソン内に生じた塩基置換が同定された (Asano et al., 2009; Pandey et al., 2013)。この塩基置換は、アミノ酸情報を持つコドンから停止コドンへの変更を伴うナンセンス変異である。そのため、*repro23* マウスでは正常な TDRD12 タンパク質が生産されていないものと考えられている。

第二章

skS 突然変異マウスにおける
核膜の形態およびテロメアの配置の観察

諸言

減数分裂において、相同染色体の対合は非常に重要であり、配偶子形成に必須な現象である。相同染色体の対合は減数分裂初期に生じた DNA 二本鎖切断 (DSBs) の修復に必須かつ、組み換えや染色体の分離の正確性を担保するためにも欠かせない現象である。これまでに、相同染色体の対合に異常を生じることで精子形成が停止する突然変異マウスが数多く報告されている。一方で、減数分裂第一分裂前期の染色体は、末端を核膜へ付着させ核内を移動することで核内において適切な配置をとっており、この染色体の移動と配置がオスの減数分裂の進行には不可欠である。テロメアはこの移動に関与しており、相同染色体の対合や分離に重要な役割を果たしている。テロメアは 2kb から 50kb の TTAGGG の繰り返し配列であり (Kipling and Cook, 1990; Moyzis et al., 1988)、染色体末端に存在し染色体を保護・安定化させている。減数分裂の開始に伴い、テロメアは核内膜へ付着し核膜上を移動する。そしてテロメアは、レプトテン期とサイゴテン期との移行期間の短い間のみ、核膜上の一か所へ集合し、ブーケ構造と呼ばれる染色体構造をとることが知られている (Scherthan et al., 1996)。ブーケ構造は進化上保存されており、酵母から植物や哺乳動物まで幅広い生物種で観察されている (Chikashige et al., 1997; Trelles-Sticken et al., 1999, 2000; Bass et al., 1997, 2000; Armstrong et al., 2001; Carlton and Cande, 2002; Moens, 1969; Moens et al., 1998; Scherthan et al., 1996, 1998; Scherthan and Schönborn, 2001; Pfeifer et al., 2001, 2003)。ブーケ構造の形成は、染色体末端が一極に集合し、染色体同士の物理的な距離を近付けることで相同染色体の対合を促進していると考えられている。これまでに、SUN タンパク質ファミリーが減数分裂期にテロメアへ局在し、特徴的な局在パターンを示すことが明らかとされている (Ding et al., 2007; Morimoto et al., 2012; Schmitt et al., 2007)。

sks 突然変異マウスでは、相同染色体の対合に異常を生じることで、精子形成が減数分裂

第一分裂前期のパキテン期で停止することが明らかとなっている (Handel et al., 1988; Akiyama et al., 2013)。相同染色体の対合に異常を生じ、精子形成が停止するノックアウトマウスの中でも、テロメアの核膜への係留やブーケ構造の形成に異常が生じているものも報告されている (Liebe et al., 2006; Scherthan, 2003)。さらに、テロメアと核内膜とをつなぐタンパク質のノックアウトマウスは、テロメアの核膜への付着が欠損し、精子形成が減数分裂第一分裂前期で停止する (Ding et al., 2007)。また、*sks* 突然変異マウスの原因遺伝子である *Tmem48* と高い相同性を持つ酵母の NDC1 は、動物細胞の中心体に対応するスピンドル極体にも局在することが報告されている (Araki et al., 2006)。この中心体やスピンドル極体は、ブーケ構造形成時の染色体の移動に関与しているとされている (Tomita and Cooper, 2007)。そこで、*sks* 突然変異マウスにおける相同染色体の対合異常の原因として、ブーケ構造に異常が生じている可能性が考えられた。

さらに、核膜孔複合体は核膜や細胞骨格と相互作用することで、核の形態形成に重要な役割を担っている。そのため、培養細胞において核膜孔複合体構成因子の一つであり、核膜孔複合体の構築に必須なタンパク質の発現を siRNA により抑制させた場合、核の形態に異常が生じることが既に報告されている (Mansfeld et al., 2006; Stavru et al., 2006)。このことから、核膜孔構成タンパク質が核および核膜の形態の維持に深く関与しており、精母細胞においても TMEM48 が核の形態形成に重要な役割を持っていることが予想された。このことから、*sks* 突然変異マウスの精母細胞において核および核膜の形態に異常を生じている可能性が考えられた。

そこで本章では、免疫蛍光染色および蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションを行うことで、*sks* 突然変異マウスの精母細胞におけるテロメアの局在を観察・分類し、正常個体と比較した。また、抗 LAMINB1 抗体を用いた免疫染色により核および核膜の形態を観察し、正常個体と *sks* 突然変異マウスとで比較した。これらの実験により、TMEM48 の変異がブーケ構造など核内での染色体の配置、および精母細胞の核または核膜の形態に与える影響につ

いて検討した。立体構造を維持した細胞を用いてのテロメアの FISH は Scherthan の方法 (Scherthan, 2009) を、精巣の組織切片を用いてのテロメアの FISH は Tanemura 等の方法 (Tanemura et al., 2005) を参考にした。

材料および方法

・ 供試動物

アメリカのジャクソン研究所より導入し、当研究室で維持している *sks* 系統の *sks/+* 雄個体と、クレアより購入した ICR 雌個体との交雑により *sks/+* の F₁ 個体を作成した。さらに、交雑により得られた *sks/+* の F₁ 個体の雌雄を交配させ、得られた F₂ 個体を実験に用いた。

・ ゲノム DNA 抽出

マウスより採取した尾部片に、100 μ l の NP-40 バッファー (0.5% NP-40、0.14M NaCl、10mM EDTA、100mM Tris-HCl (pH8.0)) および 100 μ l の 2 \times SDS バッファー (2% SDS、20mM EDTA、0.2M NaCl)、5 μ l のプロテイナーゼ K 溶液 (10mg/ml) を加え混合し、55 $^{\circ}$ C にて一晩保温した。その後、5 μ l の RNase A 溶液 (10mg/ml) を加え、37 $^{\circ}$ C で 2 時間保温した。11 μ l の 3M 酢酸ナトリウムおよび 250 μ l のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1) を加え、ゆっくりと転倒混和した後、室温、12,000rpm にて 10 分間遠心した。水層を新たな容器へ移し、2 倍量 の 100%エタノールを加えよく混和した後、4 $^{\circ}$ C、12,000rpm にて 20 分間遠心分離した。その後、上精を除き、70%エタノールにより沈殿物を洗浄し、さらに 4 $^{\circ}$ C、12,000rpm にて 5 分間遠心した。上精を除去し、沈殿物を乾燥させた後、DNA 沈殿物を 50 μ l の TE バッファー (10mM Tris-HCl、1mM EDTA) に溶解した。

・ 遺伝子型判定

sks の遺伝子型は PCR 後、PCR 産物を制限酵素 *MspI* で消化することで確認した。

1 μ l の抽出したゲノム DNA 溶液 (20ng/ μ l) および 1 \times PCR バッファー (GE ヘルスケア)、2mM dNTPs (各 2mM の dATP と dTTP、dCTP、dGTP (TAKARA))、各 0.25 μ M の増幅用プライマー、0.25U の Taq DNA Polymerase (GE ヘルスケア) を含む 10 μ l の PCR

反応液を調製した。PCR では、95°C 5 分の熱変性の後、95°C 30 秒の熱変性・55°C 30 秒のアニーリング・72°C 30 秒の伸長反応を 40 サイクル繰り返し、68°C で 4 分間伸長反応を行った。5 μ l の PCR 産物を 2%アガロースゲルにて 100V の電圧で 30 分間電気泳動した後、臭化エチジウムで染色し、紫外線照射下でバンドを確認した。さらに、5 μ l の PCR 産物および 1 \times NEbuffer 4 (New England Biolabs)、5U の *MspI* (New England Biolabs) を含む 10 μ l の反応液を調製し、37°C で一晩保温することで PCR 産物を制限酵素 *MspI* で完全消化した。制限酵素処理反応液は、3%アガロースゲルにて 100V の電圧で 40 分間電気泳動した後、臭化エチジウムで染色し、紫外線照射下でバンドを観察することで遺伝子型を判別した。

・精母細胞の回収および前処理

マウスから精巣を摘出し、カルシウム、マグネシウム不含リン酸緩衝食塩水 (以下 PBS(-)) (137mM 塩化ナトリウム、8.1mM リン酸水素 2 ナトリウム、2.68mM 塩化カリウム、1.47mM リン酸 2 水素カリウム) で湿らせたろ紙上で転がし、血液や白膜を除いた。白膜を取り除いた精巣は、500 μ l の DMEM 培地中にてだまかに切った。その後、デッキ型ピンセットを用い、切り込みを入れた精巣を揉みほぐし、精細管内の細胞を培地に懸濁させた。細胞を懸濁させた培地にさらに 500 μ l の DMEM 培地を加え、4°C、2,000rpm にて 10 分間遠心し細胞を回収した。その後、上精を除き、200 μ l の DMEM 培地により再懸濁し細胞浮遊液とした。50 μ l の細胞浮遊液と 150 μ l の固定液 (4%ホルムアルデヒド、0.1M スクロースを含む PBS(-)溶液) をシランコーティングプレート上で混和し、プレート全体に広げ、4°C にて 30 分間静置することで細胞を固定した。PBS(-)で 1 回浸漬洗いした後、0.04%ドライウェル溶液 (FJIFILM) により 3 回浸漬洗いした。よく乾燥させた後、0.1% Tween-20 溶液に浸け、5 分間ゆっくりと振盪させた。純水により浸漬洗いした後、余分な水分を除き、100 μ l の 1M チオシアン酸ナトリウム溶液をスライドガラス上へのせ、カバーガラスをか

ぶせて、湿箱内で 70℃にて 30 分間保温した。純水により浸漬洗いすることでカバーガラスをはがした後、PBS(-)に 5 分間浸け、さらに SSC 溶液 (150mM 塩化ナトリウム、15mM クエン酸三ナトリウム) により浸漬洗いをした。その後、100 μ l の RNase 溶液 (0.2 μ g/ml の RNase を含む SSC 溶液) をのせ、カバーガラスをかぶせて、湿箱内で 37℃にて 2 時間保温した。SSC 溶液で浸漬洗いすることでカバーガラスを外し、さらに純水により浸漬洗いをした。変性液 (70%ホルムアミドを含む 2 \times SSC 溶液) をスライドガラスにのせ、カバーガラスをかぶせ 75℃のヒートブロック上で 5 分間保持した後、冷やした純水で浸漬洗いをし、カバーガラスと変性液を洗い流し、スライドガラスを乾燥させた。

・組織の固定および包埋

マウスから摘出した精巣は、ブアン固定液 (ピクリン酸飽和水溶液 : ホルマリン : 酢酸 = 15 : 5 : 1) またはメタカーン固定液 (メタノール : クロロホルム : 氷酢酸 = 6 : 3 : 1) を用い固定した。ブアン固定は 4℃で一晩保存し、メタカーン固定は 4℃で 4 時間保存することで組織を固定した。固定した精巣は、70%エタノールに一晩おき、80%エタノール、90%エタノール、95%エタノール、99.5%エタノールにそれぞれ 2 時間おいた後、精巣を半分に取り、無水エタノールに浸け、一晩おくことで脱水した。翌日キシレンに 1 時間静置し、この作業を 3 回繰り返すことでエタノールをキシレンに置換した。続いて、パラフィンに 1 時間静置を 3 回繰り返すことでパラフィンを浸透させた後、包埋用のステンレス皿とカセットを用い包埋した。

・組織の薄切

組織はマイクロトームを用い 4 μ m の厚さで薄切し、37℃に温めておいた水上に伸展させた。薄切した切片はシランコーティングプレートもしくはスライドガラス上にのせた後、37℃のパラフィン伸展機上で一晩乾燥させた。

- ・組織の脱パラフィンおよび水系への置換

乾燥させたプレパラートをキシレンに 5 分間静置し、これを 3 回繰り返すことでパラフィンを除去した。その後、100%エタノールに 2 回、95%エタノール、90%エタノール、80%エタノール、70%エタノール、脱イオン水に各 5 分間ずつ静置し、キシレンから水系に置換した。

- ・組織切片の前処理

前処理液（10mM EDTA、0.05% NP-40、0.05% Triton X-100 を含む SSC 溶液）を組織上に乗せ、95℃のヒートブロック上で 5 分間加温した後、冷やした純水で浸漬洗いをした。その後、余分な水分を切り、変性液（70%ホルムアミドを含む 2×SSC 溶液）を組織上に乗せ、75℃のヒートブロック上で 5 分間加温した後、冷やしたエタノールで 3 分間浸漬洗いし、乾燥させた。

- ・テロメアプローブのハイブリダイズ

ハイブリダイゼーション液（0.8μg/ml Cy3 標識 PNA telomere probe（PANAGENE）、70%ホルムアミドを含む 2×SSC 溶液）を 93℃にて 5 分間保温した後、氷上で 3 分間静置することで変性させた。変性させたハイブリダイゼーション液を前処理したスライドに乗せ、カバーガラスをかぶせて、湿箱内で 37℃にて 2 時間から 12 時間保温した。その後、0.05×SSC 溶液に浸けることでカバーガラスを外し、さらに、0.05×SSC 溶液にて 5 分間の浸漬洗いを 3 回繰り返した後、蛍光顕微鏡にて検鏡した。

- ・免疫蛍光染色

ハイブリダイズ後、0.05×SSC 溶液で洗ったスライドを PBS(-)溶液で 5 分間浸漬洗いを

した。ブロッキング液（10%BSA を含む PBS(-)溶液）をのせ、湿箱内で室温にて 1 時間静置した。ブロッキング液を除き、一次抗体液（抗 SCP3 抗体（京都大学中辻研究室より分与）および、抗 γ H2AX 抗体（MILIPORE）は 400 倍に、抗 LAMINB1 抗体（Abcam）は 1000 倍に 3%BSA を含む PBS(-)溶液にてそれぞれ希釈した。）をのせ、湿箱内で 4℃にて一晩静置した後、PBS(-)溶液にて 5 分間の浸漬洗いを 5 回繰り返した。二次抗体溶液（Alexa Flour® 350 標識抗マウス IgG 抗体（invitrogen）、Alexa Flour® 350 標識抗ウサギ IgG 抗体（invitrogen）、Alexa Flour® 488 標識抗マウス IgG 抗体（invitrogen）、FITC 標識抗ウサギ IgG 抗体(Santa Cruz Biotechnology)はそれぞれ、3%BSA を含む PBS(-)溶液にて 200 倍に希釈した。 ）をのせ、湿箱内で室温にて 3 時間静置した後、PBS(-)溶液にて 5 分間の浸漬洗いを 5 回繰り返した。蛍光顕微鏡での検鏡後、封入剤（VECTASHIELD® Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories) または VECTASHIELD® Mounting Medium (Vector Laboratories)) で封入し、カバーガラスの淵をマニキュアでコーティングした。標本の観察は正立の蛍光顕微鏡（Carl Zeiss）を用い、DAPI、Cy3 または GFP のフィルターを通し観察した。画像の取り込みは LEICA DFC480 (Leica)により行った。

結果

・精巣から単離した精母細胞におけるテロメアの局在

まず、減数分裂期における染色体の移動を観察するため、テロメアの染色により観察を行った。立体構造を維持した細胞におけるテロメアの局在を観察するため、精巣より単離した精母細胞を用い作成した標本を用い、テロメアの FISH を行った。各細胞における減数分裂進行時期の特定は γ -H2AX および SCP3 の免疫染色により行った。正常個体のレプトテン期の精母細胞において、 γ -H2AX や SCP3 は核全体に広く存在しており、テロメアのシグナルは核周囲で観察される (図 2.1.A 上)。また、初期ザイゴテン期の精母細胞において、 γ -H2AX は核全体に広く存在しつつ局在化をはじめ、SCP3 は線状に観察され始める (図 2.1.A 中)。この時テロメアのシグナルはまとまって観察される (図 2.1.A 中)。パキテン期の精母細胞になると、 γ -H2AX は核内の一か所に局在し、SCP3 は糸状にはっきりと観察され、テロメアのシグナルは核表面の全体に分布するようになる (図 2.1.A 下)。さらに、ディプロテン期の精母細胞になると、同じく γ -H2AX は核内の一か所に局在し、SCP3 は解離し始め、テロメアのシグナルは核表面の全体に観察される。

一方で、*sks* 突然変異マウスの精母細胞においても、ザイゴテン期と思われる精母細胞においてテロメアの集合が確認された (図 2.1.B 中)。また、レプトテン期およびパキテン期と思われる精母細胞ではテロメアのシグナルは全体に広がって存在していた (図 2.1.B 上、下)。このように、*sks* 突然変異マウスの精母細胞においても正常個体と同様のテロメアの配置が観察され、*sks* 突然変異マウスの精母細胞においてテロメアの配置に顕著な異常は確認されなかった。

・組織切片を用いた FISH

精巣の組織切片を用い、抗 LAMINB1 抗体を用いた蛍光免疫染色およびテロメアの FISH

を行った結果、*sks* 突然変異マウスの精巣では、正常個体の精巣と同様に、テロメアのシグナルが、抗 LAMINB1 抗体により染色される核膜上に存在していることが明らかとなった。さらに、多くの細胞において、核膜の染色パターンが正常個体とは異なり、スムーズな円形ではなく、異常な形態を示す核が多数観察された。しかし、これら異常な形態を示す精母細胞の核においてもテロメアのシグナルは核膜上に観察され、*sks* 突然変異マウスの精母細胞においてもテロメアが核膜に正常に付着していることが示唆された (図 2.2)。

・組織切片を用いた抗 LAMINB1 抗体による免疫染色

精巣の組織切片を抗 LAMINB1 抗体により蛍光免疫染色した結果、初期パキテン期までの精母細胞では、正常個体、*sks* 突然変異マウスともに顕著な異常は観察されなかった。しかし、*sks* 突然変異マウスのパキテン期と思われる精母細胞において、明らかに異常な形態を示す核および核膜が多数観察された (図 2.3)。

そこで、観察された核および核膜の形態異常の出現頻度を調べた。細胞における減数分裂進行時期の分類は減数分裂第一分裂前期のマーカーである抗 SCP3 抗体を用いた免疫染色により行い、核および核膜の形態は抗 LAMINB1 抗体を用いた免疫染色により判断した (図 2.3)。その結果、正常個体ではパキテン期中期から後期の精母細胞のうち約 24%において核および核膜の形態に異常を示すものが観察された (図 2.3)。一方で、*sks* 突然変異マウスでは、パキテン期中期から後期の精母細胞の約 55%において核および核膜の形態に異常が観察され、異常を示す割合が正常個体と比較して有意に増加していた ($P<0.001$)。このことから、正常個体と比較して高い割合で核の形態異常が引き起こされていることが明らかとなった (図 2.3B)。

核の異常な形態には、核膜の一部が突出したものや、核膜が内部に陥入したもの、核膜が波状に変形しているものなどが観察され (図 2.3A)、異常な形態は多岐にわたっていた。

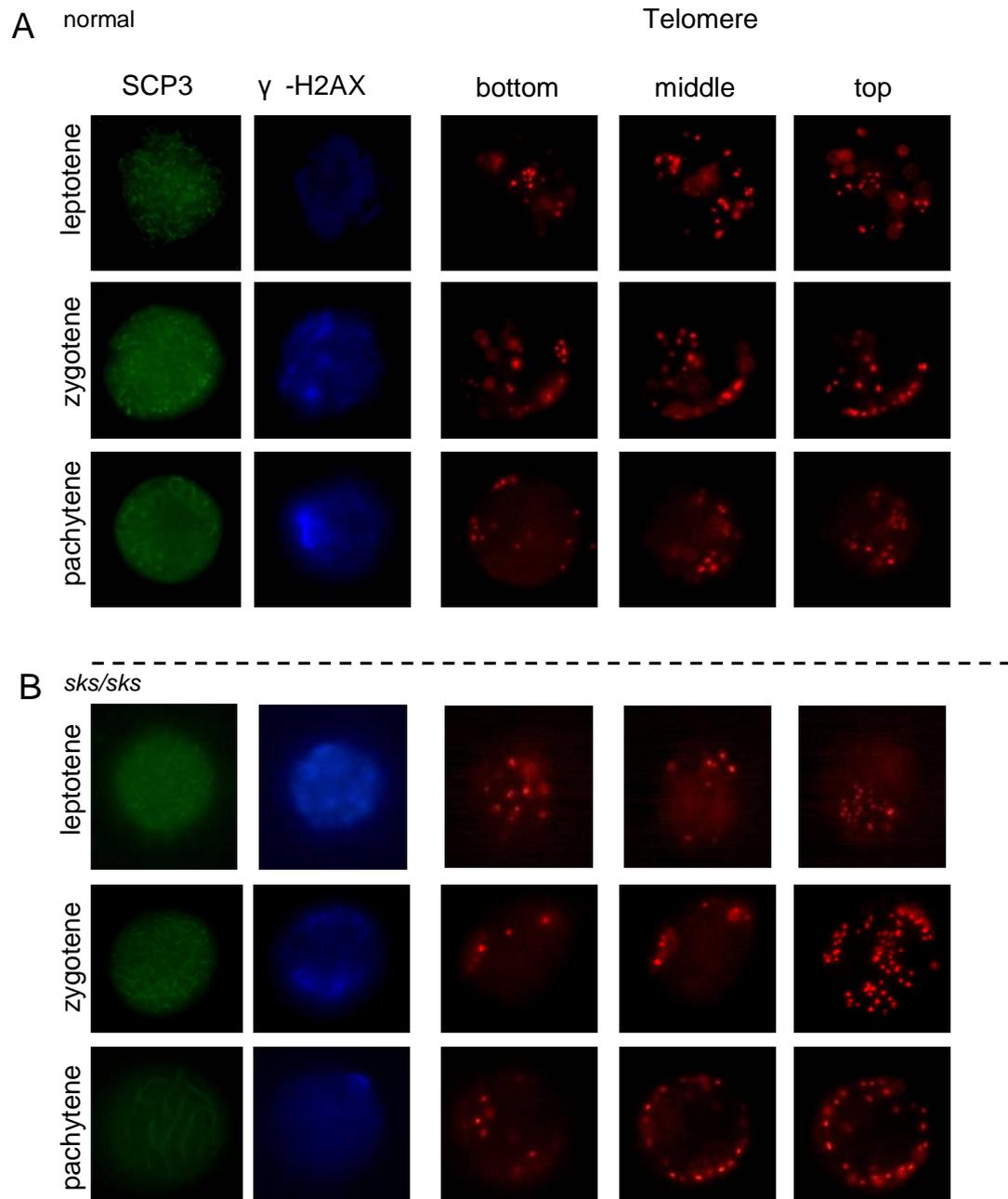
考察

減数分裂においてテロメアの配置は、適切な時期に適切な局在を示すことが重要である。ブーケ構造をとる細胞頻度の上昇や期間が長期化することで不妊を呈するノックアウトマウスが報告されており (Liebe et al., 2006; Scherthan, 2003)、ブーケ構造の形成だけでなくクラスターの解離も重要である。精巣から単離した精母細胞および精巣の組織切片を用い、テロメア FISH および蛍光免疫染色を行ったところ、*sks* 突然変異マウスにおいても正常個体と同様のテロメアの分布が観察され、レプトテン期やザイゴテン期と思われる精母細胞においてテロメアの集合が、パキテン期の精母細胞において分散してテロメアが存在する像が観察され、*sks* 突然変異マウスと正常個体の間に顕著な差がないことが確認された。さらに、抗 LAMINB1 抗体で染色される核膜上にテロメアのシグナルが観察されたことから、*sks* 突然変異マウスにおいて、テロメアの核膜への付着および移動・配置に異常はなく、減数分裂期の核内におけるテロメアや染色体の配置、特にブーケ構造の形成および解離不全が、*sks* 突然変異マウスにおける減数分裂停止の原因ではないことが示唆された。しかし、各減数分裂進行時期におけるテロメア分布の割合は計数していない。そのため、精子形成ファーストウェーブ期の精巣を使用した標本の観察により、テロメアのクラスター形成または分布のパターンを各細胞時期により分類・計数することでテロメアの移動をより詳細に観察し、異常の有無をより明確にすることが可能であると考えられる。

一方で、抗 LAMINB1 抗体を用いた精巣の組織切片の蛍光免疫染色では、*sks* 突然変異マウスの初期パキテン期までの精母細胞の核の形態には顕著な異常は観察されなかったが、パキテン期中期以降の精母細胞において核の形態に異常が観察された。このことから、*sks* 突然変異マウスにおいて、パキテン期中期以降の精母細胞における核の形態異常が精子形成停止の原因の一つである可能性が考えられた。核膜の形態異常は電子顕微鏡による観察によっても確認され、*sks* 突然変異マウスのパキテン期精母細胞の多くで、核膜の 2 重構造

がスムーズではなく波打っている像が観察されており、さらに、核膜が無明瞭な部分も観察されている。このことから、*sks* 突然変異マウスのパキテン期精母細胞では核膜の構造が不安定になっており、その結果核の形態に異常が生じている可能性が示唆された。核膜孔複合体は核膜中に存在する構造であるため、核膜との相互作用が重要なことは想像に難くない。実際に、核膜の再構築における分子機序に核膜孔複合体構成因子である POM121 が関与しており、重要な役割を担っていることが報告されている (Antonin et al., 2005)。このことから、核膜孔複合体構成因子のなかでも、POM121 と同様に膜貫通タンパク質である TMEM48 が核膜の構成及び再構築に重要な役割を担っており、*sks* 突然変異マウスでは正常な TMEM48 が生産されないことから、核膜を含めた核の形態異常が生じている可能性が考えられた。

sks 突然変異マウスのパキテン期中期以降の精母細胞において核の形態に異常が観察されたことおよび、初期パキテン期までの精母細胞では顕著な異常が観察されず、核内における染色体およびテロメアの配置にも異常が見られないことから、TMEM48 はパキテン期中期以降の精母細胞における核の形態の維持に重要な役割を担うことが示唆された。また、核の形態を維持することが、減数分裂および精子形成において重要であることが示唆された。



2.1 Distribution of telomere in spermatocyte

Spermatocytes of normal (A) and *sks/sks* mutant (B) are stained with SCP3 (green), γ -H2AX (blue) and telomere (red). Same distribution pattern of telomere are observed in each spermatocyte stage.

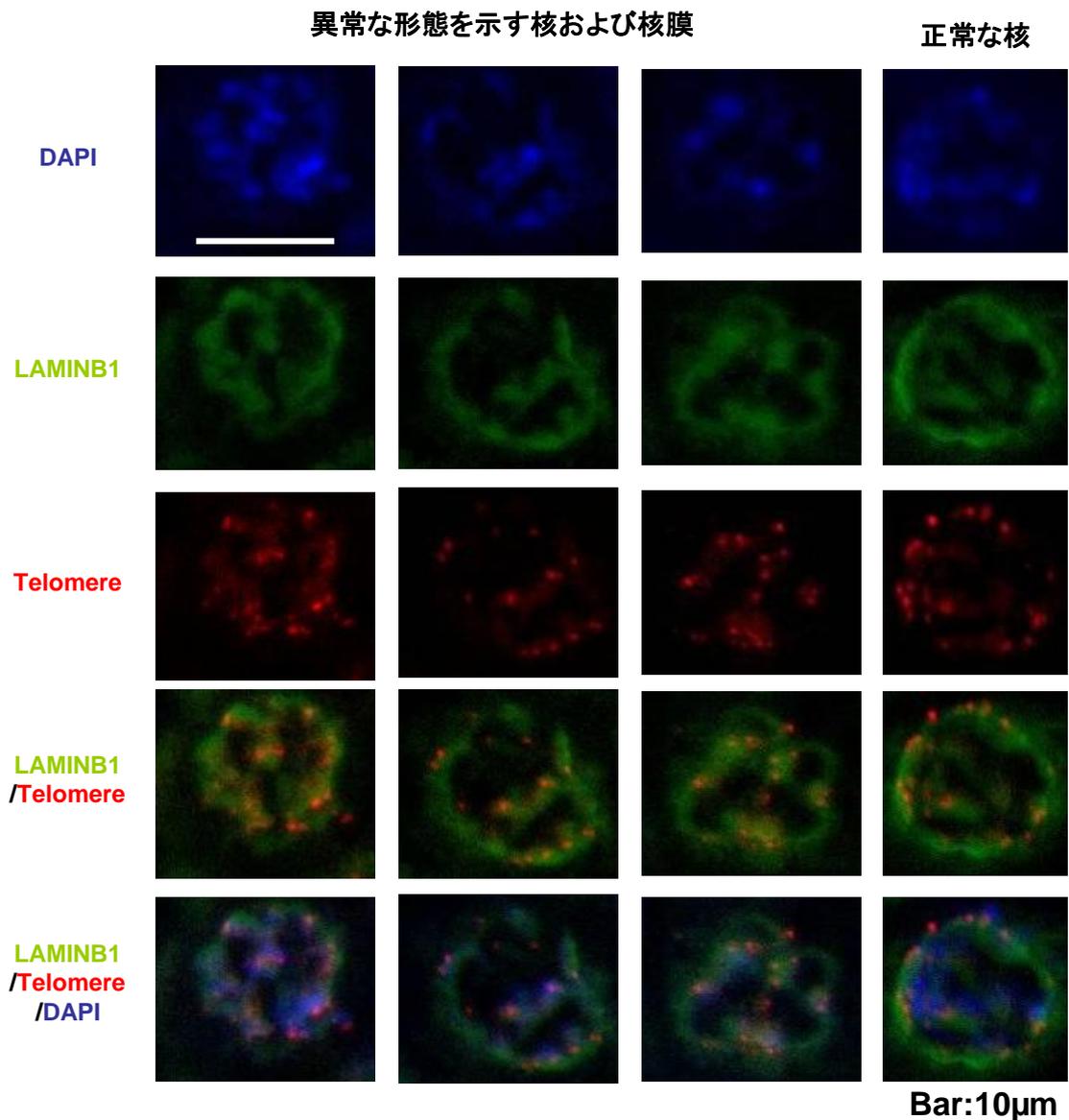


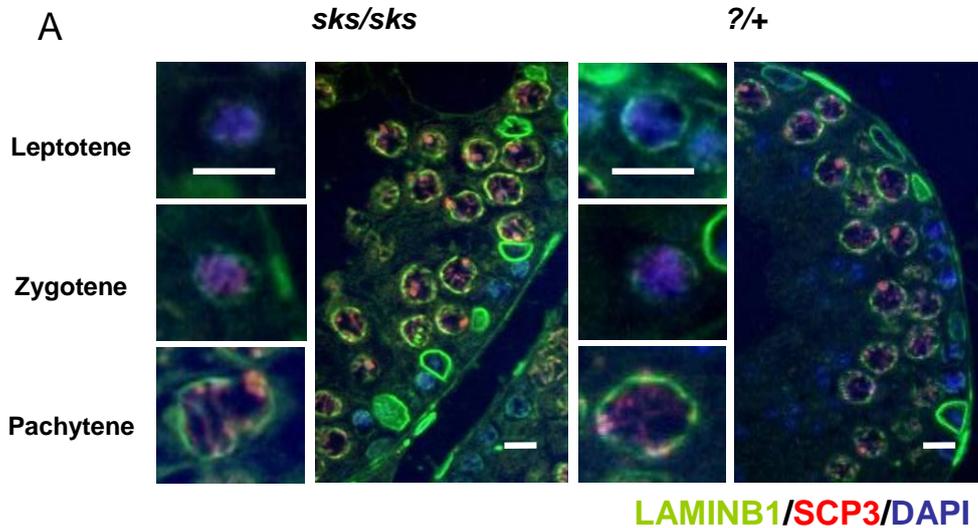
図2.2 Nuclear dimorphism found in *sks/sks* mutant spermatocyte

Immunofluorescence staining and FISH (fluorescence in situ hybridization) in testis section. Nuclear membrane is stained with anti-LAMINB antibody (green), and telomere is labeled with probe (red). Nucleus is counterstained with DAPI (blue). Scale bar :10μm

In *sks* mutant testis, there are many spermatocytes shown abnormal nuclear morphology. A variety of dimorphism like folding (arrow) and projection (arrowhead) are observed. In normal testes, most spermatocyte shows smooth round shape.

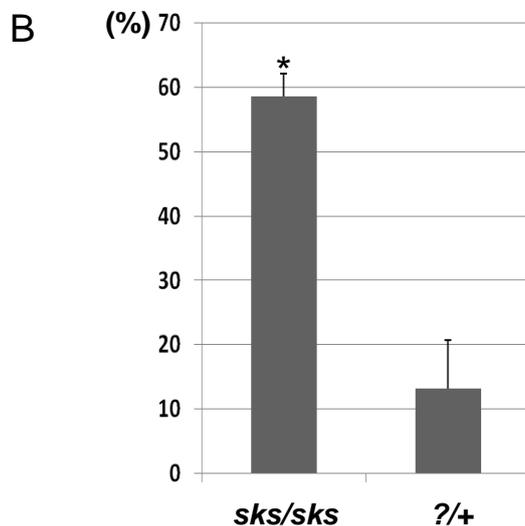
Even in spermatocyte which have morphologically abnormal nucleus, signal of telomere is located onto nuclear membrane.

2.3 Nuclear morphology in spermatocyte



Immunofluorescence staining in testis section. Section is stained with anti-LAMINB antibody (green), and anti-SCP3 (red). Nucleus is counterstained with DAPI (blue). Scale bar :10 μ m

In leptotene stage and zygotene stage, there is no difference in nuclear morphology between normal and *sks/sks* mutant. However, in pachytene stage, abnormal morphology of nuclear is observed.



Ratio of pachytene stage spermatocyte showing abnormal nuclear morphology in *sks* mutant mouse.

In *sks/sks*, about 58% of mid- to late-pachytene spermatocytes shows abnormal nuclear morphology, although only 13% in normal mouse. The ratio of abnormal nuclear morphology is significantly increased. (* $P < 0.0002$).

第三章

sks 突然変異メスマウスにおける 表現型の解析

諸言

sks 突然変異マウスは、アメリカのジャクソン研究所において発見された、矮小および不妊を呈する自然発症の突然変異マウスである (Handel et al., 1988)。これまでに、*sks* 突然変異マウスでは Transmembrane protein 48 (*Tmem48*) 遺伝子に生じた 2 塩基の塩基置換が同定されており、この突然変異が *sks* 突然変異マウスの表現型の原因であることが明らかとされている (Akiyama et al., 2013)。また、*sks* 突然変異マウスのオスでは、減数分裂第一分裂前期のパキテン期精母細胞において相同染色体の対合に異常が観察されており、精子形成がパキテン期以降に進行しないことで精子が形成されず不妊となることが明らかとされている (Handel et al., 1988; Akiyama et al., 2013)。一方で *sks* 突然変異マウスのメスにおける不妊の原因は明らかとされていない。

sks 突然変異マウスにおいて突然変異の確認された *Tmem48* 遺伝子は、核膜孔複合体 (Nuclear Pore Complex) のアンカープロテインの一つをコードする遺伝子であり、酵母から vertebrate (脊椎動物) まで、真核生物において広く保存されている (Mansfeld et al., 2006; Stavru et al., 2006)。さらに、TMEM48 は核膜孔複合体の会合に必須の因子であり、TMEM48 の欠損または発現抑制は核膜孔複合体の会合不全を引き起こす (Mansfeld et al., 2006; Stavru et al., 2006)。*Tmem48* のオーソログである酵母 NDC1 は、核膜孔複合体構成のみでなく Spindle Pole Body (SPB) への関与も明らかとされている (Thomas and Botstein ., 1986; Winey et al., 1993; West et al., 1998; Chial et al., 1998; Lau et al., 2004; Araki et al., 2006)。一方で、酵母以外の生物種における、核膜孔複合体の構成以外の機能については不明である。またマウス生体における機能も、雌雄の不妊および中軸骨格形成異常を引き起こすことが明らかとされているのみであり、異常の発生機序および分子機構については不明である。

メスにおける配偶子形成は染色体数の半減および、細胞の成熟による大きく 2 つの要素からなる。哺乳類において減数分裂は胎仔期に、特にマウスでは胎齢 13.5 日に開始し

(BORUM, 1961; Speed, 1982)、減数分裂第一分裂前期をディプロテン期まで完了させた後、網状期へと入り一度休止する。出生後、周囲の体細胞およびホルモンの作用により卵胞という単位で成長していき、細胞の巨大化を伴い成熟してゆく。十分に成熟した卵母細胞は、排卵刺激である LH サージの影響により減数分裂を再開させ、第一極体の放出を経て、減数分裂第二分裂中期に至る。そして、減数分裂は第二分裂中期で再び休止状態となり排卵される。その後、受精に伴い減数分裂は再開し、第二極体の放出に伴い完了する。

メスの不妊には多くの要因が考えられ、生殖細胞の欠損、減数分裂異常、卵胞発育異常、排卵異常、受精異常や発生異常等、異常の発生時期および種類は様々である。さらに、配偶子に異常があるとは限らず、行動異常（交尾行動の欠損）や着床異常も考えられる。本研究では、*sks* 突然変異マウスのメスにおける不妊の原因解明を行うことで *Tmem48* の雌性生殖に関する機能を解明することを目的とした。

材料方法

・ 供試動物

sks 突然変異マウス系統はジャクソン研究所より入手した。ICR (CLEA JAPAN) と *sks* 突然変異マウス系統の交配により得られた F2 個体を実験に使用した。本実験では、8-10 週齢のマウスを、卵母細胞および受精卵、初期胚の採取に使用した。また、組織学的解析には、10 週齢のマウスを成熟個体として、3 週齢のマウスを性腺刺激ホルモン (gonadotropin) 処理に使用した。性腺刺激ホルモンの処理として、5 単位の妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG) を腹腔内に投与した 48 時間後に、5 単位の人絨毛性性腺刺激ホルモンを投与した。動物を使用した全ての実験は、岡山大学実験動物倫理委員会の承認のもと行った。

・ 膣スメアおよび膣栓

性周期の確認のための膣スメアの採取は、毎朝定時に行い、膣をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄することで採取した。採取した膣スメアはスライドガラス上に滴下した後、4% ギムザ染色液 (SIGMA) により染色し観察した。膣栓の形成の有無は、雌雄の同一ケージ内における飼育開始の翌朝確認した。交尾行動の有無の確認は、膣栓の形成に加え、膣スメアないにおける精子の存在の有無によっても行った。

・ 組織学的解析

成熟個体および性腺刺激ホルモン処理個体より採取した卵巣は、ブアン固定液により固定した。組織は固定後、脱水を経て、パラフィンにより包埋し、4 μ m の厚さに薄切しスライドガラス上に定着させた。組織切片はキシレンにより脱パラフィンを行った後、水系へと置換した。その後、メイヤーのヘマトキシリン (Mayer's hematoxylin) およびエオジンにて染色した。

・卵母細胞、受精卵および初期胚の採取および *in vitro* での培養

全ての実験において、卵母細胞、受精卵および初期胚は、5 単位の妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG) 投与 48 時間後に、5 単位の人絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) を投与することにより過排卵処理を行った個体より採取した。人絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) 投与 12-16 時間後、減数分裂第二分裂中期 (MII stage) の卵母細胞を卵管より採取した。また、ヒアルロニダーゼに暴露させることで卵母細胞に付随する卵丘細胞を除去し卵子の裸化を行った。受精卵または初期胚を採取するため、人絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) を投与した後、野生型個体のオスと同一ケージ内にて飼育した。交尾行動の有無は、膣栓の形成および膣スメア内の精子の存在により確認した。膣栓または膣スメアにより交配を認した朝を胎齢 0.5 日とし、胎齢 1 日および 1.5 日胚を卵管より灌流により採取した。卵核胞期 (GV stage) の卵母細胞は、5 単位の妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG) を投与した 44-48 時間後、穿刺することで卵巣より採取した。

採取した胎齢 1.5 日胚は、37°C に保たれた 5% CO₂ 存在下の湿潤恒温機内において、KMSO 培地中にて培養した。

・免疫染色

卵母細胞の染色体展開標本は de Boer et al. [13] (de Boer et al., 2009) の方法に従い作成した。標本の作製には、胎齢 18.5 日齢のメスの生殖巣を使用した。卵母細胞の染色体展開標本は antigen dilution buffer (ADB; PBS with 2% BSA and 0.05% Triton-X 100) 中において室温保持させた後、4°C にて一次抗体液と反応させた。一次抗体反応には、anti-SCP3 guineapig 抗体 (Grey et al., 2009)、anti-SCP1 rabbit 抗体 (Novus Biologicals) および γ -H2AX モノクローナル抗体 (millipore) をそれぞれ 1:1,000、1:200、および 1:500 の割合にて希釈して使用した。染色体展開標本は一次抗体反応後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)

にて洗浄した後、二次抗体反応を行った。二次抗体反応には、Alexa Fluor® 594 が付加された anti-guineapig goat IgG (invitrogene)、Alexa Fluor® 488 が付加された anti-rabbit donkey IgG (invitrogene) および Alexa Fluor® 350 が付加された anti-mouse donkey IgG (invitrogene) を 1 : 500 の割合にて希釈し使用した。

一方、卵母細胞および受精卵、初期胚は 2% PFA (2% paraformaldehyde, 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4) にて 30 分間固定した。固定後、0.1% Tween®20 を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) により 3 度洗浄後、4%ブロッキングエース (森永) 中にて 1 時間静置した。その後、4℃にて一次抗体反応を行った。一次抗体反応には、anti-TMEM48 rabbit 抗体 (Akiyama et al., 2013)、NPC モノクローナル抗体(mab414) (Covance)、anti-a-TUBULIN mouse IgG (SIGMA)および anti-pericentrin 抗体(Covance) をそれぞれ 1:500 の割合で希釈し使用した。一次抗体反応終了後、0.1% Tween®20 を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) により 3 度洗浄した後、二次抗体反応を行った。二次抗体反応では、Cy3 が付加された anti-rabbit donkey IgG (Jackson ImmunoResearch) および Alexa Fluor® 488 が付加された anti-mouse goat IgG (invitrogene) を 1 : 500 の割合にて希釈し使用した。DNA および核の対比染色には DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)(Vector Laboratories Inc.)を使用した。

・ウエスタンブロッティング

ウエスタンブロッティングには、それぞれ 50 個の卵母細胞、受精卵または初期胚を使用した。採取した卵母細胞、受精卵または初期胚は SDS サンプルバッファー(125mM Tris-HCl, 4% SDS, 10% β-mercaptoethanol, 1% BPB, 20% glycerol)に溶解した。各タンパク質試料は 37℃にて 15 分間静置することで SDS により平衡化させた。一般的な SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によりタンパク質を分離させた後、セミドライ法にて PVDF メンブレン(Imobilon-P, Milipore) にタンパク質を転写させた。メンブレンは 2%のブロッキング

グバッファーに室温にて1時間浸漬させた後、anti-TMEM48 rabbit 抗体を1:5000の割合で希釈した一次抗体反応液と4℃にて反応させた。その後、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase (HRP)) が付加された anti-rabbit goat IgG (santa cruz) を1:20,000の割合に希釈し、室温にて浸漬することで二次抗体反応を行った。タンパク質の検出には ECL advance western blotting detection kit (GE Healthcare)を用い、LAS-4000 (fuji film)により画像を取得した。

結果

・ *sks* 突然変異メスマウスにおける性周期の変化および、生殖行動

Tmem48 の発現パターンが性周期により変化していたことから、*sks* 突然変異メスマウスにおいて性周期に異常が生じている可能性が考えられた。そこで、膣スメアを採取・観察することで、発情周期の変化を観察した。正常個体では、主に白血球のみが観察される発情休止期、有核の膣上皮細胞が優勢に観察され、その他にごく少数の白血球、角化細胞が含まれる発情前期、主に角化細胞のみが観察される発情期、主に角化細胞と白血球、または多量の有核細胞および白血球から構成される発情後期が観察される。この各ステージをマウスの場合 3~5 日間かけて一周している。*sks* 突然変異メスマウスの膣スメアを採取し、ギムザ染色により染色後、観察したところ、正常個体と同様に、各ステージの膣スメア像が観察され、*sks* 突然変異メスマウスにおいても、正常に発情周期が変化していることが確認された(図 3.1)。さらに、正常個体のオスと同居させ、膣栓の形成による生殖行動の有無を観察したところ、*sks* 突然変異メスマウスにおいても膣栓の形成が確認され (figure not shown)、生殖行動は正常に行われていることが確認された。一方で、膣栓の形成を確認した個体においても、妊娠および産仔は確認されず、*sks* 突然変異メスマウスが不妊であることが確認された。

・ *sks* 突然変異メスマウスの卵巣の組織学的解析

卵巣を採取後、組織切片を作成し、*sks* 突然変異メスマウスの卵巣組織を H.E.染色により観察した。正常個体では、卵巣組織内に、黄体 (Corpus Lutea) や各発達段階の卵胞 (Ovarian Follicle) を観察することが可能である(図 3.2 A)。一方、*sks* 突然変異メスマウスの卵巣では、黄体や各発達段階における卵胞も観察された(図 3.2 B)。さらに、各発達段階の卵胞に含まれる卵母細胞は、正常個体と同様に卵核胞期を呈していた(図 3.2 A、

B')。また、さらなる卵胞の発達および排卵を観察するため、性腺刺激ホルモン処理後の卵巣および卵管を観察した。正常個体の胞状卵胞では、排卵刺激である黄体形成ホルモン (LH) の一過性の刺激により、卵核胞崩壊 (GVBD) とそれに続く減数分裂の再開および卵丘細胞の膨化が観察され、その後 LH の刺激後 12 時間頃に排卵にいたる。そのため、LH と同様の作用を持つヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) の投与後 10 時間後の卵巣では、一部の卵母細胞において減数分裂の再開した像および卵丘膨化が観察され、14 時間後の卵管膨大部においては排卵卵子を観察することができる。*sks* 突然変異メスマウスでも正常個体で観察されたのと同様に、PMSG 処理した後、hCG 投与後すぐの卵巣では、卵核胞期の卵母細胞を伴う十分に発達した卵胞が観察され (図 3.2 C, C')、hCG 投与後 10 時間後の卵巣内において、卵核胞崩壊に伴い減数分裂が再開した像および卵丘膨化が観察された (図 3.2 D, D')。また hCG 投与後 14 時間の卵巣には黄体が観察され (図 3.2 E)、卵管膨大部においても、正常個体と同様に排卵卵子が確認された (図 3.2 F)。

・ *sks* 突然変異メスマウスにおける減数分裂第一分裂前期

sks 突然変異オスマウスでは、減数分裂第一分裂前期のパキテン期において相同染色体の対合に異常が生じており、精子形成がそれ以降へ進行しないため、精子が形成されず不妊を呈する。オスにおいては、相同染色体の対合に TMEM48 が重要である可能性が示唆されているため、*sks* 突然変異メスマウスにおける減数分裂第一分裂前期のパキテン期における相同染色体の対合状態を確認した。オスの減数分裂の進行とは異なり、メスの減数分裂第一分裂の進行は胎仔期に進行し、ディプロテン期に進行した段階で網状期へと移行し、減数分裂を停止する。そのため、胎齢 18.5 日のメス胎仔より生殖巣を単離し、染色体展開標本を作成した。作成した染色体標本は、シナプトネマ構造形成の側性要素である SCP3 および軸性要素である SCP1、減数分裂第一分裂進行時に非対合領域に局在するタンパク質である γ -H2AX の免疫蛍光染色を行い、パキテン期卵母細胞における相同染色体の対

合の状態を観察した。パキテン期において正常に対合が進行している場合、シナプトネマ構造が完成し完全に対合しているため、非対合領域に局在する γ -H2AX のシグナルは観察されず、SCP3 および SCP1 が完全に共局在する像が観察される(図 3.3 A)。一方、対合が完全ではなく異常を示す場合、非対合領域に γ -H2AX が局在し、さらに SCP3 のシグナルは観察されるが SCP1 が局在しない像が観察される(図 3.3 A)。正常個体において対合異常を示すパキテン期卵母細胞の割合は約 20%に対し、*sks* 突然変異メスマウスにおける対合異常を示すパキテン期の卵母細胞の割合は約 15%であり、有意な差は観察されなかった(図 3.3 B)。

・ *sks* 突然変異メスマウスにおける 1.5dpc 胚の観察

sks 突然変異メスマウスの卵母細胞における受精および発生能を観察するため、過排卵処理した後、野生型個体のオスと同居・交配させた。その後、正常であれば 2-細胞期胚へと発生が進行している胎齢 1.5 日胚を卵管膨大部より採取し観察した。その結果、正常個体のメスでは 75%が 2-細胞期胚へ発生しているのに対し、*sks* 突然変異マウスのメスではわずか 18%のみでしか 2-細胞期胚が観察されず、2-細胞期胚形成率が有意に低かった(表 3.1)。さらに、回収した 1.5 日胚を *in vitro* にて培養し、それらの発生能を観察したところ、正常個体のメスより採取した胚では 72%が胚盤胞期胚へ発生したのに対し、*sks* 突然変異マウスのメスより採取した胚では以降の発生が観察されなかった(表 3.1) (図 3.4 A)。一方で、前核期胚の観察される 1 日胚を卵管膨大部より回収し、核の染色を行い観察したところ、*sks* 突然変異メスマウスより回収した受精卵においても、前核を形成している受精卵が観察された(図 3.4 B)。さらに、*sks* 突然変異メスマウスより回収した排卵卵子のみを *in vitro* 下で培養しても 2-細胞期様の胚への発生は観察されなかった(data not shown)。このことから、*sks* 突然変異メスマウスにおいて観察された 2-細胞期様の胚は、受精の結果生じていることが示唆された。

・ *sks* 突然変異メスマウスにおける分裂中期像の観察

排卵卵子における状態を観察するため、紡錘体構成タンパク質の一つである alpha-TUB の免疫蛍光染色を行った。通常排卵卵子は減数分裂を第二分裂中期まで進行させ停止しているため、紡錘体の形成および紡錘体中央に染色体が観察される。一方、*sks* 突然変異メスマウスにおいても、紡錘体の形成が観察され、染色体も紡錘体中央に観察された(図 3.5 中)。しかし、*sks* 突然変異メスマウスでは、正常個体では観察されない減数分裂第一分裂後期/終期像を示す卵母細胞も観察されており(図 3.5 右)、*sks* 突然変異メスマウスでは減数分裂の進行に遅れが生じている可能性が示唆された。

さらに、紡錘体の極に存在する微小管形成中心 (MTOCs) に局在するタンパク質であるペリセントリンの免疫蛍光染色を行った。正常個体では、中心体マーカータンパク質であるペリセントリンは紡錘体の極に局在しており、リングを形成し密集していた(図 3.6 A,B)。一方で *sks* 突然変異メスマウスでは紡錘体の極周辺に存在しているものの、正常個体のような密集したリング状の局在は観察されず、局在が散在しており、正常個体とは明らかに異なった局在パターンを示していた(図 3.6 A,B)。したがって、*sks* 突然変異メスマウスでは MTOCs の紡錘体の極への局在に異常が生じていることが推測された。

・ TMEM48 の発現および局在

卵母細胞の発生段階における TMEM48 の発現状態を調べるため、ウエスタンブロッティングを行った。その結果、TMEM48 は卵核胞期の卵母細胞から、排卵卵子、前核期胚、2細胞期胚の全てで発現していることが明らかとなった(図 3.7)。また、各発生段階における TMEM48 の局在を免疫蛍光染色により観察した。核膜孔複合体のマーカータンパク質との共染色を行ったところ、卵核胞期卵母細胞、前核期胚、2細胞期胚において、核周囲に比較的強いシグナルが観察され、TMEM48 が核膜孔複合体のマーカータンパク質と共局在を

示し、TMEM48 が核膜、核膜孔に局在することが示された(図 3.8)。

考察

sks 突然変異メスマウスにおいて、膣スメアの変化に顕著な異常は観察されず、さらに膣栓も確認されたことから、発情周期は正常であり、交尾行動も正常に行われていることが明らかとされた。このことから、*sks* 突然変異メスマウスにおいて、ホルモンの不均衡は生じていないことが示唆された。また、卵巣組織においても顕著な異常は観察されず、卵胞内の卵母細胞は卵核胞期を呈しており、正常個体と比較して顕著な差は観察されなかった。さらに、性腺刺激ホルモンの投与により、生後の卵母細胞および卵胞発育、排卵現象に顕著な異常は観察されなかった。これらのことから、*sks* 突然変異メスマウスでは、正常な卵母細胞の発生が進行しており、また性腺刺激ホルモンの分泌およびシグナル伝達は正常に作用していることが明らかとなった。以上のことから、**TMEM48** に生じた変異が上記の現象に顕著な影響を及ぼしていないことが明らかとなり、**TMEM48** がこれらの現象に必須ではないことが示唆された。

さらに、*sks* 突然変異オスマウスにおいて確認された、パキテン期における相同染色体の対合異常の頻度上昇はメスでは観察されず、胎仔期に進行する減数分裂第一分裂前期パキテン期に進行する相同染色体の対合に異常がないことが明らかとされた。このことから、**TMEM48** はオスにおいてメスと異なる相同染色体の対合機構において機能している可能性が示唆され、また、メスにおける対合には必須でないことが示唆された。

一方、*sks* 突然変異マウスのメスにおいても 1.5 日胚において 2-細胞期様の胚が少数観察された。さらに、一部の受精卵においても前核形成が観察され、受精の結果 2-細胞期胚へ発生している可能性が示唆された。しかし、*sks* 突然変異メスマウスより回収した 1.5 日胚において 2-細胞形成率が有意に低下しており、さらに一部で確認された 2-細胞期胚においても以降の発生は観察されなかった。これらのことから、*sks* 突然変異メスマウスでは、受精および第一卵割またはそれ以前の卵母細胞において顕著な異常が生じている可能性が

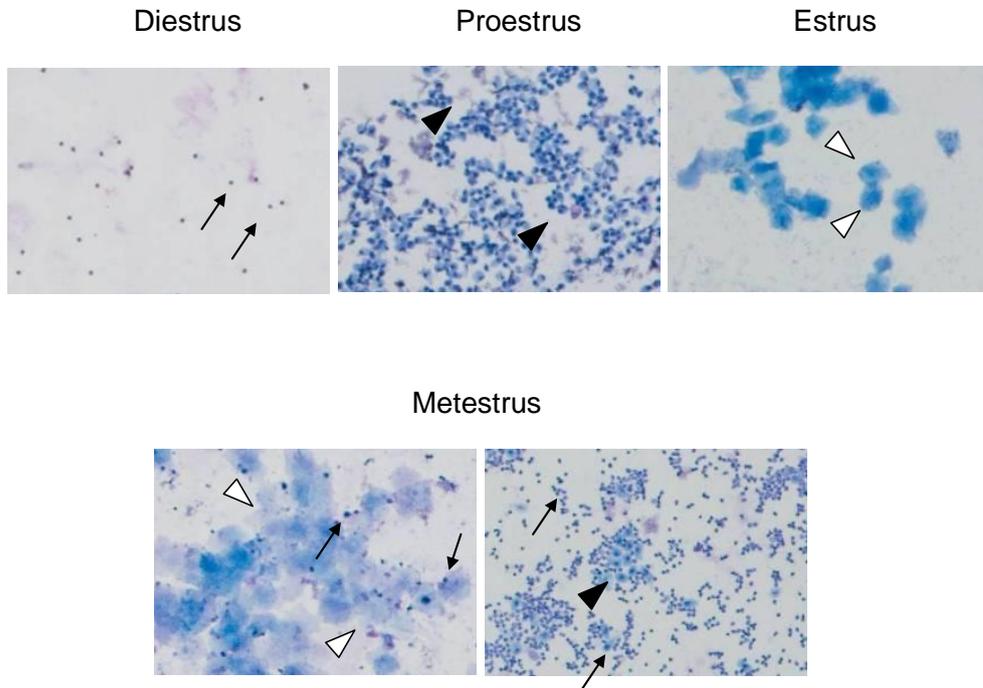
強く示唆され、*sks* 突然変異メスマウス由来の卵母細胞に正常な発生能がないことが明らかとなった。

sks 突然変異メスマウスの排卵された卵母細胞では、MII 紡錘体極に存在するペリセントリンの局在に乱れが生じており、さらに 2-細胞以降の発生が観察されないことから、TMEM48 が紡錘体形成、特に卵母細胞から初期胚における非中心体性の紡錘体形成・維持および安定性に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。排卵卵子の免疫蛍光染色では、*sks* 突然変異メスマウスより回収した卵母細胞において、正常個体では観察されない第一分裂後期像を示す卵母細胞も観察されており、*sks* 突然変異メスマウスでは分裂の進行に遅れが生じている可能性が示唆された。これらのことから、卵母細胞における減数分裂の進行、特に分裂中期における MTOCs の会合および安定性が、受精前の卵母細胞の準備に重要であり、さらにその後の初期胚発生に重要であることが示唆された。またその MTOCs の会合および安定性に TMEM48 が重要な働きを担っており、TMEM48 に生じた突然変異により *sks* 突然変異マウスではペリセントリンの局在に異常が観察され、胚発生が観察されなかったものと考えられる。

卵母細胞における紡錘体形成と通常の体細胞分裂時に起こる紡錘体形成とは、形成機序が異なる。体細胞分裂では、中心体が紡錘体形成に大きな役割を担っている。一般的な体細胞分裂では、中心体が対極に移動しそこから微小管を伸長させ、紡錘体が形成される。一方、マウスを含む (Szollosi et al., 1972) 多くの種の卵母細胞では、無中心体性の紡錘体形成が生じており、細胞質に存在する微小管形成中心 (MTOCs) が紡錘体形成に重要な役割を担っている。細胞質に存在する MTOCs は核膜消失前に卵核胞周囲に集合し、核膜消失後、微小管とキネトコアを結合させた後、MTOC が各極へ移動し会合することで紡錘体が形成される (Maro et al., 1985; Messinger and Albertini, 1991; Carabatsos et al., 2000; Schuh and Ellenberg, 2007)。さらに、マウスでは着床前のごく初期の卵割までは、非中心体性の微小管形成機構により紡錘体が形成され、染色体の分配が行われている

(Gueth-Hallonet et al., 1993; Courtois et al., 2012)。

近年では、核膜孔複合体構成因子の細胞分裂期における挙動および細胞周期依存的な機能についても報告されており、Spindle やキネトコアとの相互作用が明らかとなっている (reviewed in Chatel and Fahrenkrog , 2011)。これらの報告からも、TMEM48 が卵母細胞における減数分裂だけでなく、体細胞分裂においても、細胞周期の進行および分裂中期に重要な機能を有している可能性が考えられる。



☒3.1 Esterus cycle in *sks* female

Daily vaginal smears showed change exact stage and manner. In diestrus, only leukocyte (arrow) can be observed. In proestrus, there is apredominance of nucleated epithelial cells (black arrow head). In estrus, cornified squamous epithelial cells without nucleus (white arrow head) are observed. In meterus, leukocyte (arrow) are observed in addition to a lot of cornified squamouse epithelial cells (white arrow head), and then, predominance of leukocyte (arrow) and some epithelial cells (black arrow head) are observed. After metestrus, the cycle is go back to diestrus.

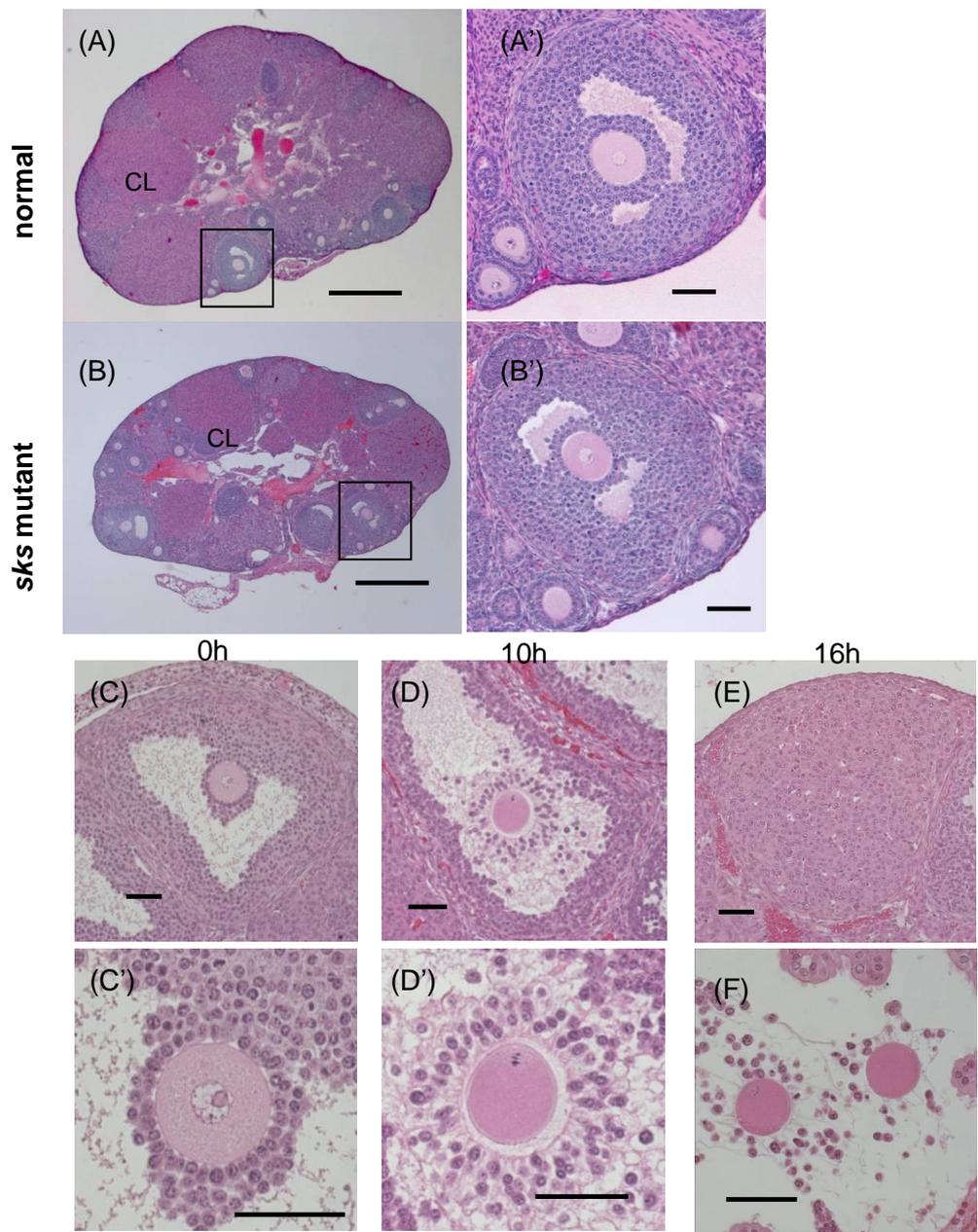


图3.2 Histology of ovary and oviduct in sks mutant

Scale bar: (B, C) 500 μ m, (B', C', D-G) 50 μ m.

(A, B) Ovary of both normal and the sks mutant mouse has ovarian follicles and corpora lutea. CL: corporum luteum. (A', B') Oocytes in the follicles show germinal vesicle.

In the PMSG treated juvenile sks mutant, ovary which 0 hour after hCG injection has developed follicles (C) with germinal vesicle stage oocyte (C'). (D, D') After 10 hours later from hCG injection, cumulus expansion is observed, and oocyte shows metaphase. After 16 hours later from hCG injection, corpora lutea (E) are observed in ovary, and ovulated oocytes (F) are observed in oviduct. Scale bar: (A, B) 500 μ m, (A', B', C-F) 50 μ m.

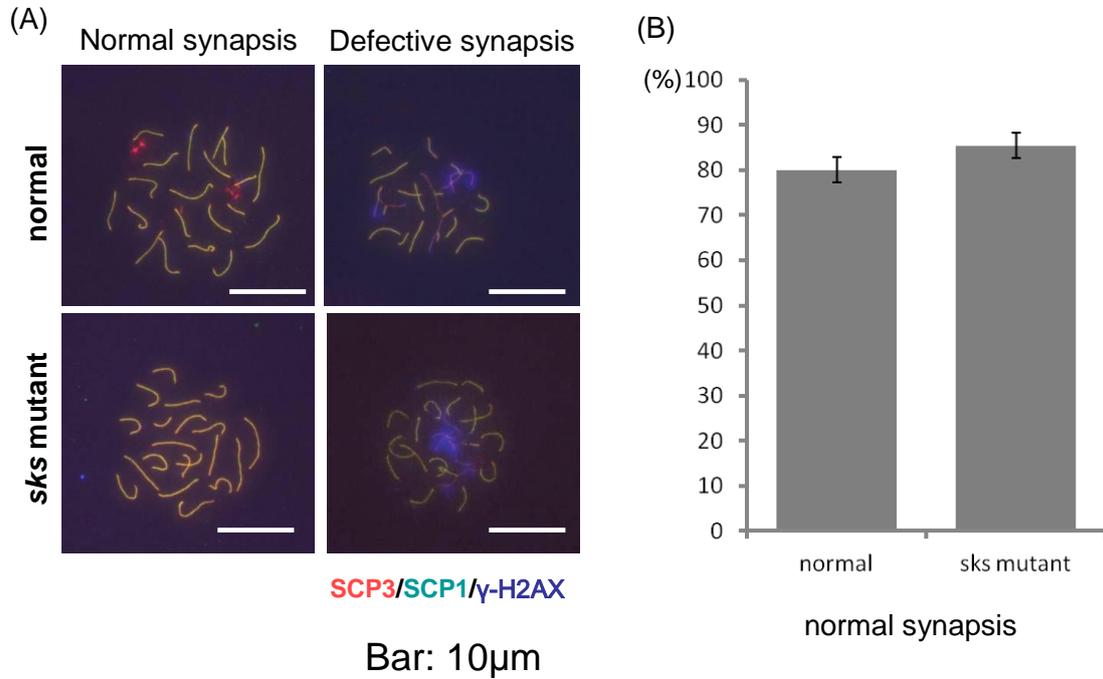


图3.3 Homologous chromosome synapsis in pachytene oocytes of the *sks* mutant

(A) Chromosome spreads of 18.5dpc oocytes were stained with anti-SCP3 (red), anti-SCP1 (green) and anti-gamma-H2AX (blue). Both in normal (upper) and the *sks* mutant (lower), normal synapsis (left) and defective synapsis (right) were observed. Scale bar: 10 μ m

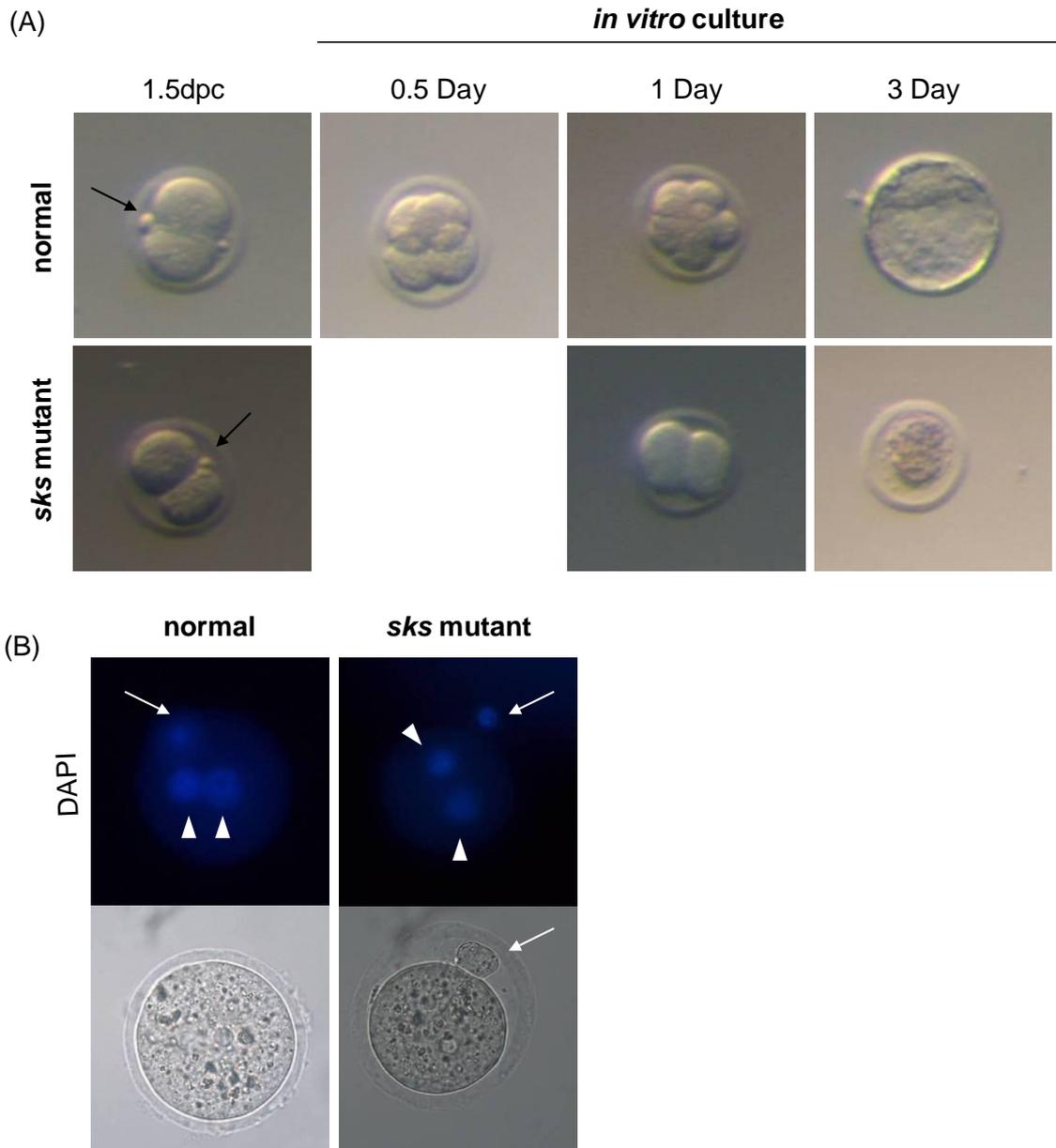
(B) Ratio of normal synapsis in pachytene oocytes. No significant difference was observed.

表3.1 Ratio of 2cell embryo in 1.5dpc and developmental ability.

	total	2-cell stage embryo	develop to blastocyst
normal (n=7)	251	75% (188/251)	72% (180/251)
sks mutant (n=4)	108	18% (19/108)*	0% (0/108)*

1.5dpc embryos were obtained from oviducts and cultured *in vitro*.

*significant difference was observed by χ^2 test. (P<0.0001)



☒3.4 Early embryonic development from skt mutant.

(A) Collected 1.5dpc embryos from normal female (upper) showed 2cell stage(left) and develop to 4cell (left center), 8cell (right center) and blastocyst stage (right) *in vitro*. Although a part of 1.5dpc embryos collected from the skt mutant female (lower) looked like 2cell (left), development was not observed *in vitro* (right two). Arrow shows polar bpdy.

(B) Collected zygotes from normal (left) and the skt mutant (right) were stained with DAPI (upper). Arrowheads indicate pronuclear. Arrow indicate polarbody.

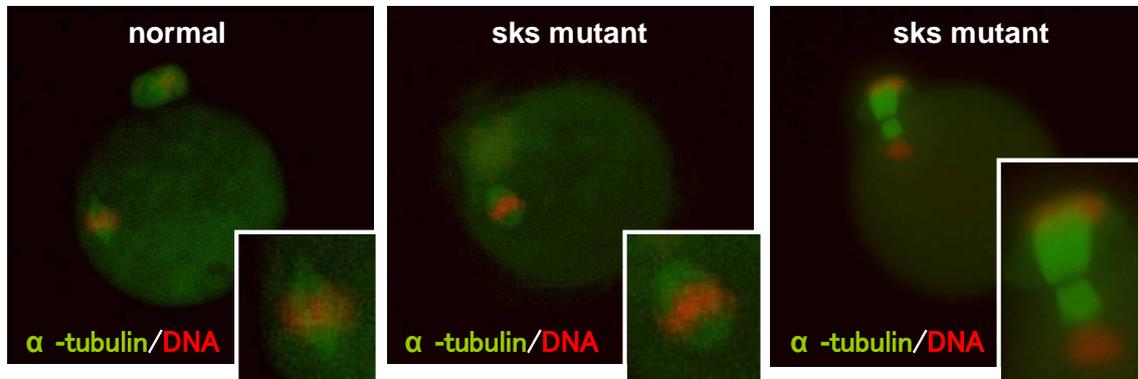
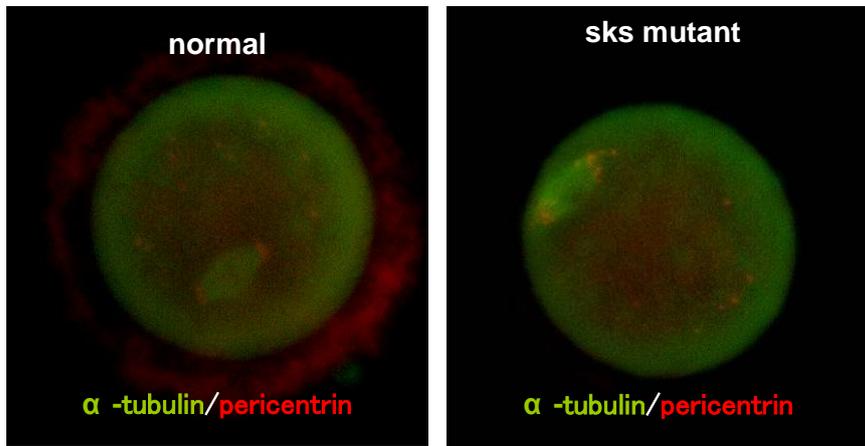


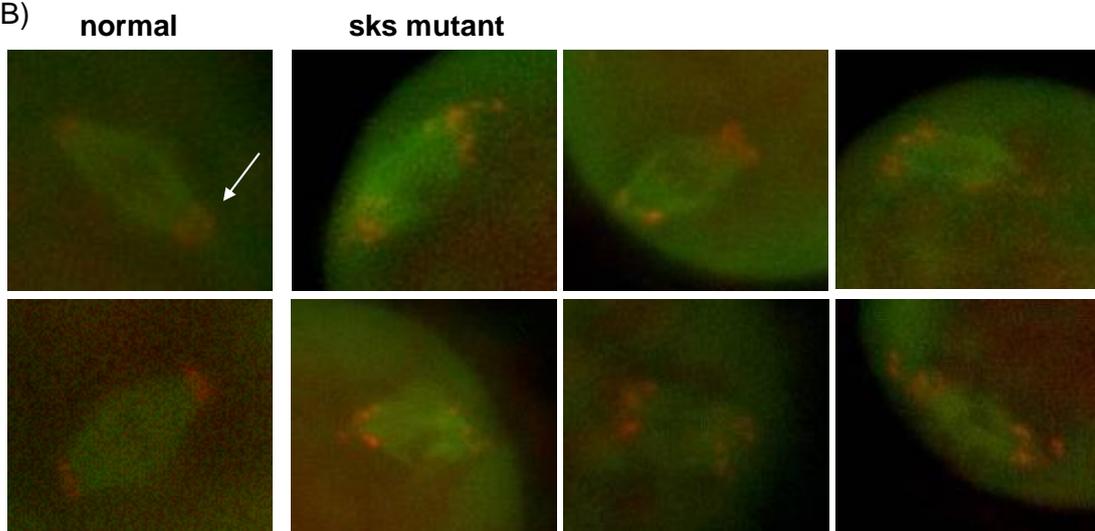
图3.5 progression of meiosis and Spindle formation in ovulated oocytes from the sks mutant.

Ovulated oocytes obtained from normal (left) and sks mutant (middle, right) were stained with anti- α -TUBULIN (green). DNA stained with DAPI (red). Oocyte collected from normal shows metaphase of second meiotic division. Oocyte collected from sks mutant mouse shows also metaphase of second meiotic division (middle), but some oocytes show anaphase/ telophase of first meiotic division (right).

(A)



(B)



3.6 Spindle and MTOCs in ovulated oocyte from the sks mutant mouse

(A, B) Spindles of ovulated oocytes were also stained with anti- α -TUBULIN (green) and anti-pericentrin (red). Over view (A) and closer (B). In normal, MTOCs localize to both pole of spindles and form ring shape (arrow). In mutant, on the other hand, MTOCs localize around pole of spindle, but diffuse the signal and shows different localization from normal.

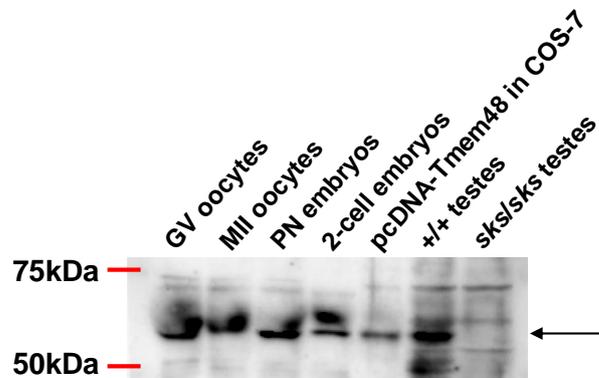
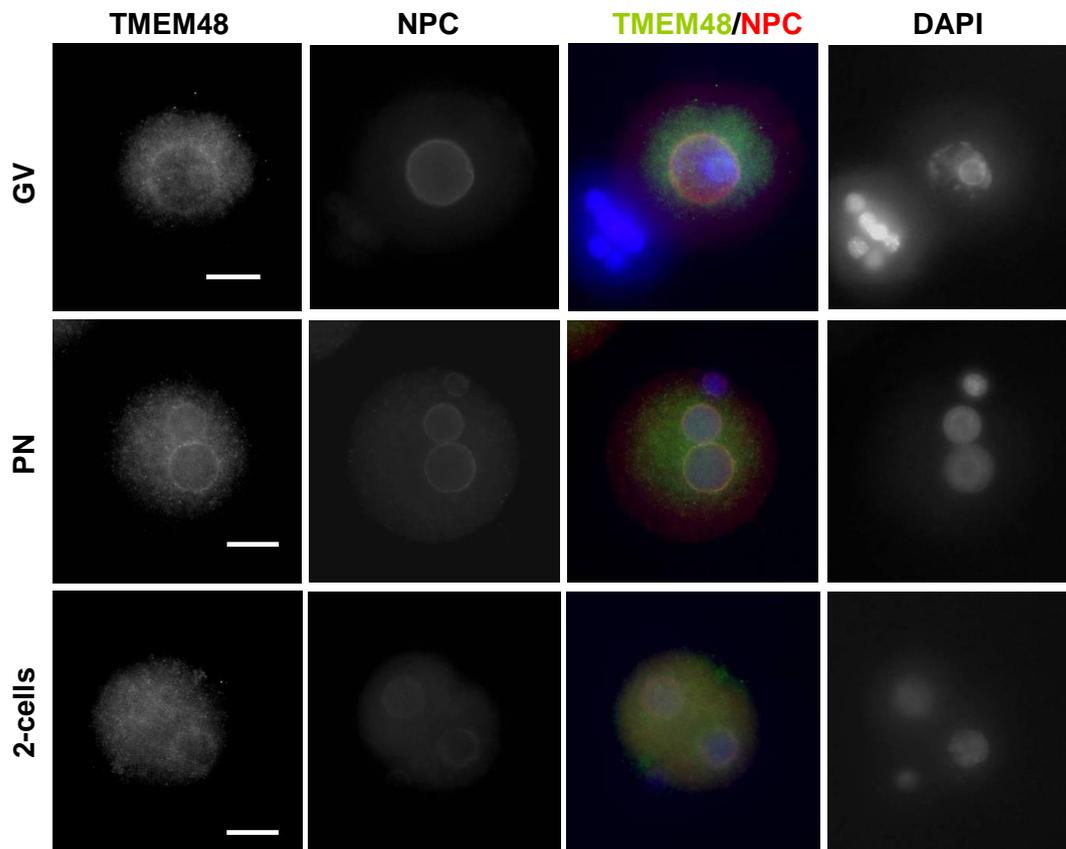


图3.7 Expression and of TMEM48 in oocytes and zygotes development.

Western blot analysis shows expression of TME48 during oocytes and zygotic development. GV: Germinal Vesicle stage oocytes. MII: Metaphase II stage (Ovulated) oocytes. PN: Pronuclear stage zygote. pcDNA-Tmem48 in COS-7: Cloned Tmem48 full length into pcDNA3.1 vector and overexpressed by transfected COS-7 cells, +/+ : Testes from Tmem48^{+/+} sks/sks: testes from Tmem48^{sks/sks} are used as control. Arrow indicates predicted TMEM48 band.



Bar: 20 μ m

图3.8 Localization of TMEM48 in oocytes and zygotes development.

Cells were stained with anti-TMEM48 (left) and mAb414 (left center). DNA stained with DAPI (right). In merged signal, TMEM48 shown in green, NPC shown in red, and DNA shown in blue (right center). Scale bar: 20 μ m.

In each stage of oocyte, zygote and embryo, signal is observed in cytoplasm, and especially surrounding of nuclei has stronger signal. This signal surrounding nuclei is overlapped with the signal of NPC.

第四章

TMEM48 と結合するタンパク質の探索

諸言

ゲノムプロジェクトの進行に伴い、ヒトやマウスにおいてはタンパク質情報を有する機能的な遺伝子は約 2 万数千個であることが予測されている。生体内では、DNA や RNA、タンパク質等、様々な因子が相互作用することでその機能を発揮し、生命活動を維持している。中でも、タンパク質間の相互作用、特にタンパク質同士の結合は、タンパク質複合体という一つの機能単位を形成するうえで必須の現象である。単分子で機能を発揮するタンパク質も存在する一方で、転写開始複合体や構造タンパク質複合体、チャンネルタンパク質複合体等、複合体を形成して初めて本来の機能を果たすタンパク質が数多く存在する。このことから、タンパク質間の相互作用を明らかにすることは、特定の遺伝子およびタンパク質のもつ機能を明らかにし、生体での役割を理解する上で非常に重要である。また、どのようなタンパク質と相互作用するかを解明することで、そのタンパク質の持つ機能を推察することも可能である。

特定のタンパク質と相互作用するタンパク質を検出する方法には、クロスリンク法やフーウエスタン法、免疫沈降法、プルダウンアッセイ、そして、酵母ツーハイブリッド法など様々な方法がある (Berggård et al., 2007)。その中でも Stanley Fields 等によって開発された酵母ツーハイブリッド法 (Fields and Song, 1989) は、特定のタンパク質と相互作用する分子をスクリーニングする方法として最もよく使われている方法である。その基本原理は、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の GAL4 タンパク質の特性 (Johnston, 1987; Keegan et al., 1986; Ma and Ptashne, 1987) を利用して酵母内でタンパク質相互作用を検出する方法である。出芽酵母のガラクトース代謝関連酵素をコードする遺伝子の転写活性化因子である GAL4 は、N 末端側の DNA 結合ドメインと C 末端側の転写活性化ドメインとに分割することができ、これらは近接することでその機能を回復することが可能である (図 4.1)。酵母ツーハイブリッド法では、酵母内で GAL4 の DNA 結合ドメインと

既知のタンパク質との融合タンパク質をベイトタンパク質として発現させ、さらに、GAL4の転写活性化ドメインとライブラリー由来のタンパク質との融合タンパク質としてプレイタンパク質を発現させる。ベイトタンパク質とプレイタンパク質が結合し、GAL4のDNA結合ドメインと転写活性化ドメインとが近接した場合、転写活性化能が回復しレポーター遺伝子が発現する (図 4.2)。さらに、一倍体酵母は株間で自然に接合して二倍体となる性質を利用し、ベイトタンパク質とプレイタンパク質を別々に発現させ、これらを接合させることで、高い効率で両者を発現させる酵母を作出し、スクリーニングを行うことが可能である。そのため、現在酵母ツーハイブリッド法によるスクリーニングにはこの方法が多く用いられている。

本章において標的とされる TMEM48 は核膜孔複合体構成因子の一つであり、酵母の NDC1 と高い相同性を有する。マウスの TMEM48 は分子量約 65kDa、6 個の膜貫通型の膜貫通ドメインを有し、タンパク質の N および C 両末端を核膜孔側へ出しているタンパク質であり、核膜孔複合体を核膜へ係留しているアンカータンパク質であると予測されている (Lau et al., 2006; Mansfeld et al., 2006; Stavru et al., 2006)。酵母とマウス、ヒトで高い相同性が報告されていることからわかるように、NDC1 は真核生物において広く保存されており、核膜孔複合体の構築に必須であることが報告されている (Mansfeld et al., 2006; Stavru et al., 2006)。さらに、これまでに、複数の核膜孔構成因子と NDC1 との結合が報告されている (Araki et al., 2005; Kind et al., 2009; Onischenko et al., 2009; Yamazumi et al., 2009) ことから、TMEM48 が多くのタンパク質と結合し核膜孔複合体の形成に関与していることが考えられる。また、*sks* 突然変異マウス (Handel et al., 1988) は、このタンパク質情報を有する *Tmem48* 遺伝子に突然変異を生じることで、顕著な精子形成異常を呈する (Akiyama et al., 2013) ことから、TMEM48 は核膜孔複合体構成因子はもちろんのこと、精子形成過程に特異的な機能を持つタンパク質と相互作用している可能性が考えられた。

そこで本章では、精子形成過程における TMEM48 の分子機構の解明を目的とし、マウス精巣において TMEM48 と相互作用するタンパク質の同定を試みた。その方法として、TMEM48 をベイトタンパク質として用いた酵母ツーハイブリッド法により、マウスの精巣 cDNA ライブラリーより TMEM48 と結合する可能性のある分子のスクリーニングを行った。また、酵母ツーハイブリッド法によるスクリーニングには、Clontech 社の Matchmaker[™] GAL4 Two-Hybrid System 3 を利用した。

材料および方法

<ベイトベクターの構築>

・ *Tmem48* 遺伝子の増幅

ベイトベクターに挿入する遺伝子断片は、マウス精巣 cDNA を鋳型に用い、ミスマッチプライマーまたはリンカープライマー（表 4.1）による PCR 法を用いることで、*Tmem48* の N 末端側に *Nco* I 認識配列および C 末端側に *Sma* I 認識配列を挿入した。挿入に用いる DNA 塩基配列として、*Tmem48* の全長配列（*Tmem48-Full*）、膜貫通ドメインの一部を除いた配列（*Tmem48-Short*）、膜貫通ドメインを完全に除いた C 末端側配列（*Tmem48-Cterm*）の 3 種類の長さの異なる *Tmem48* cDNA 断片をそれぞれ増幅した。PCR 反応には、2 μ l の鋳型となるマウス精巣 cDNA 溶液、KOD -Plus-1 \times PCR バッファー（TOYOBO）、0.2mM dNTPs（dATP、dTTP、dCTP、dGTP（TAKARA）各 0.2mM）、1mM MgSO₄、0.25 μ M 各増幅用プライマー、および 0.4U の KOD -Plus-（TOYOBO）を含む 20 μ l の反応液を調製した。そして、94 $^{\circ}$ C 2 分の熱変性反応後、94 $^{\circ}$ C 15 秒の熱変性・55 $^{\circ}$ C 30 秒のアニーリング・68 $^{\circ}$ C 2 分 30 秒の伸長反応を 25 サイクル繰り返し、その後 68 $^{\circ}$ C で 5 分間伸長反応を行うことで PCR 反応を行った。増幅した PCR 産物は、末端にアデニンを付加させた後、pGEM-T Easy ベクター（Promega）へクローニングした。

・ プラスミド抽出

白色コロニーを滅菌した爪楊枝で釣菌し、3ml の液体 LB 培地に懸濁した後、37 $^{\circ}$ C で 16 時間振盪培養することで大腸菌培養液を調製した。培養後、大腸菌培養液を 4 $^{\circ}$ C、12,000rpm にて 30 秒遠心し集菌した。Solution I（50mM グルコース、25mM Tris-HCl(pH8.0)、10mM EDTA）を 100 μ l 加えよく懸濁したのち、Solution II（0.2M 水酸化ナトリウム、1%SDS）を 200 μ l 加えやさしく混和し、Solution III（3M 酢酸カリウム、11.5%酢酸）を 150 μ l 加えよく攪拌した。その後、氷上にて 5 分間静置し、4 $^{\circ}$ C 12,000rpm にて 5 分間遠心した。上精

を新たな容器へ移し、等量のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールを加えよく混和した後、4℃、12,000rpm にて 5 分間遠心した。水層を新たな容器へ移し、二倍量の 100% エタノールを加え転倒混和し、室温にて 5 分間静置した後、4℃、12,000rpm にて 5 分間遠心した。上精を除去し、70%エタノールにより沈殿物を洗浄後、再び 4℃、12,000rpm にて 5 分間遠心した。上精を除去し乾燥させた後、沈殿物を 50 μ l の RNaseA 溶液 (20ng/ μ l RNaseA を含む TE バッファー) で溶解し、37℃にて 2 時間インキュベートした。0.5 μ l の RNase 処理プラスミド溶液を、0.7%アガロースゲルにて 100V の電圧で 30 分間電気泳動した。また、1 μ l の RNase 処理したプラスミド溶液、3U *Nco* I (New England Biolabs)、3U *Sma* I (TOYOBO)、1 \times NEBuffer4 (New England Biolabs) を含む 10 μ l の反応液を調整し、30℃にて 1 時間保温した後、37℃にてさらに 1 時間保温することで抽出したプラスミドを制限酵素により切断した。制限酵素反応液を 1%アガロースゲルにて 100V の電圧で 30 分間電気泳動した後、臭化エチジウムで染色し、トランスイルミネーター (Bio Rad) で UV 照射することで目的の遺伝子断片が挿入されているかを確認した。

・塩基配列の確認

抽出したプラスミドは PEG (ポリエチレングリコール) により精製し、その後のステップに使用した。1 μ l の PEG 沈殿後のプラスミド溶液 (~300ng/ μ l) および 2 μ l の Big Dye[®] Terminator v3.1 5 \times Sequencing Buffer (Applied Biosystems)、0.5 μ l の Big Dye[®] Terminator v3.1 Ready Reaction mix (Applied Biosystems)、0.15 μ M シークエンス用プライマーを含む 10 μ l の反応液を調整した。サーマルサイクラーを用い、96℃3 分の後、96℃ 20 秒・55℃20 秒・60℃4 分にて 35 サイクル、60℃4 分反応させ 4℃にて保温した。10 μ l の反応液、1.5 μ l の酢酸ナトリウム溶液 (3M、pH5.2)、40 μ l の 100%エタノールおよび 10 μ l の滅菌水を混合し、室温に 5 分間静置した後、室温 12,000rpm にて 20 分間遠心した。上精を除去し、200 μ l の 70%エタノールを加え沈殿物を洗い、再び室温 12,000rpm にて 20

分間遠心した。上精を除去し、乾燥させた後、沈殿物を Hi-Di ホルムアミド (Applied Biosystems) 10 μ l に溶解し、95 $^{\circ}$ Cにて 3 分間熱処理した後、急冷し変性させた。その後、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用い塩基配列を決定し、データベース上の塩基配列と BLAST (build37) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) によって解析した。

・ベイトベクターpGBKT7の制限酵素処理

5 μ g の pGBKT7 ベクター (Clontech) と 40.5U *Sma* I、1 \times NEBuffer4 を含む 100 μ l の反応液を調製し、30 $^{\circ}$ Cにて 1 時間保温した後、40U の *Nco* I を加えさらに 1 時間 37 $^{\circ}$ C で保温した。制限酵素処理した反応液に等量のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールを加え混和した後、室温、12,000rpm にて 5 分間遠心した。二倍量の 100%エタノールが入った新たな容器へ水層を移し、転倒混和し 4 $^{\circ}$ C、12,000rpm にて 10 分間遠心した。その後、上精を除き、70%エタノールを加え、再度 4 $^{\circ}$ C、12,000rpm にて 10 分間遠心した。上精を除き乾燥させた後、10 μ l の TE バッファーに溶解させた。そのうち 1 μ l を 100 倍希釈した後、分光光度計を用い OD₂₆₀ の値を測定し、濃度を算出した。制限酵素 *Nco* I、*Sma* I で切断した pGBKT7 ベクターを以降 pGBKT7-*Nco* I /*Sma* I とする。

・制限酵素処理したベクターのアルカリホスファターゼ処理

5 μ g の pGBKT7-*Nco* I /*Sma* I と、1 \times アルカリホスファターゼバッファー (TAKARA)、40U CIAP (TAKARA) を含む 50 μ l の反応液を調製した後、50 $^{\circ}$ Cで 30 分間保温し、制限酵素処理断片のアルカリホスファターゼ処理を行った。CIAP 処理後、滅菌水にて全量を 200 μ l に調製した後、等量のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールを加え転倒混和し、室温、12,000rpm にて 5 分間遠心した。水層を新しい容器へ移し、20 μ l の 3M 酢酸ナトリウム溶液、400 μ l の 100%エタノールを加え転倒混和した後、室温にて 10 分間静置

した。4℃、12,000rpmにて15分間遠心し上精を捨てた後、70%エタノールにて沈殿物の洗浄を行った。再度4℃、12,000rpmにて5分間遠心した後、上精を除去し乾燥させ、沈殿物を20μlのTEバッファーに溶解させた。

・ pGEM®-T Easy ベクターからの目的の遺伝子断片の切り出し

塩基配列を確認し、目的の遺伝子断片が挿入されている pGEM®-T Easy ベクターから目的の DNA 断片の切り出しを行った。挿入断片のある pGEM®-T Easy ベクター8μg および 40U *Sma* I、1×NEBuffer4 を含む 76μl の反応液を調製し、30℃にて1時間保温した後 40U *Nco* I を加えさらに1時間 37℃で保温した。制限酵素処理したサンプルを1%低融点アガロースゲルにて100Vの電圧で30分間電気泳動した後、臭化エチジウムにて染色し、紫外線照射下で目的のサイズのバンドを切り出した。切り出したアガロースゲル断片は65℃に加温することで融解し、同じく65℃に加温した等量のフェノールを加えよく攪拌した後、室温、12,000rpmにて5分間遠心した。水層を新たな容器へ移し、等量のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールを加えよく攪拌し、室温、12,000rpmにて5分間遠心した。水層を新たなチューブへ移し、二倍量の100%エタノールと10分の1量の3M酢酸ナトリウム、100分の1量の1M酢酸マグネシウムを加え-80℃に1時間静置した後、4℃、12,000rpmにて20分間遠心した。上精を除き、200μlの70%エタノールで沈殿物を洗い、再度4℃、12,000rpmにて5分間遠心した。上精を除き沈殿物を乾燥させた後、20μlのTEバッファーにて溶解した。

・ 目的遺伝子断片の pGBKT7 ベクターへのサブクローニング

pGEM®-T Easy ベクターから切り出した 1.5 μl の目的の遺伝子断片溶解液と、0.5μl の CIAP 処理した pGBKT7-*Nco* I /*Sma* I 溶解液、1×Rapid Ligation Buffer、1.5U T4 DNA Ligase を混合し、4℃にて一晩反応させた。その後、大腸菌を形質転換し、カナマイシンを

含む LB 寒天培地（1%トリプトン、0.5%酵母乾燥粉末、1%塩化ナトリウム、1.5%寒天、37.5mg/L カナマイシン）に播種した。37°Cで一晩培養しコロニーを形成させた後、プラスミドを抽出し遺伝子断片の挿入の有無を確認した。さらに、挿入断片の上流を含む塩基配列の決定により読み枠や塩基配列に異常がないかを確認した。*Tmem48-Full* を組み込んだ pGBKT7 ベクターを pGBKT7- *Tmem48-Full*、*Tmem48-Short* を組み込んだ pGBKT7 ベクターを pGBKT7- *Tmem48-Short*、*Tmem48-C term* を組み込んだ pGBKT7 ベクターを pGBKT7- *Tmem48-C term* とする。

<形質転換酵母の作出>

・酵母コンピテントセル作製

YPDA 寒天培地（2%グルコース、2%ペプトン、1%酵母乾燥粉末、0.003%アデニンヘミスルフェイト塩、2%寒天）で *S.cerevisiae* AH109 株（Clontech）を 30°Cにて 3 日間画線培養し、直径 2mm 程度のコロニーを形成させた。生育したコロニー一つを 3ml の YPDA 液体培地（2%グルコース、2%ペプトン、1%酵母乾燥粉末、0.003%アデニンヘミスルフェイト塩）に植菌後、30°Cにて 8 時間振盪培養し、前培養液とした。300ml フラスコに入った 50ml の YPDA 液体培地に前培養液 5 μ l を加え、OD₆₀₀ の値が 0.15 から 0.3 となるよう 30°Cにて 16 から 20 時間振盪培養した。培養液を 700 \times g にて 5 分遠心することで集菌し、100ml の YPDA 液体培地に菌体を再懸濁した。再懸濁液を OD₆₀₀ の値が 0.4 から 0.5 となるよう、30°Cにて 3 から 5 時間振盪培養した。培養液を 700 \times g にて 5 分遠心することで集菌した後、滅菌水に再懸濁し、菌体を洗浄した。再び 700 \times g にて 5 分遠心することで集菌し、菌体を 3ml の 1.1 \times TE/LiAc 溶液（Clontech）にて懸濁した。菌体懸濁液を 2 本の 1.5ml チューブにそれぞれ 1.5ml 移し、室温、12,000rpm にて 5 秒遠心した。上清を捨て、600 μ l の 1.1 \times TE/LiAc 溶液（Clontech）にてそれぞれを再懸濁し、酵母コンピテントセルとした。

・酵母の形質転換

20 μ l の Herring Testes Carrier DNA (10mg/ml) (Clontech) を 100 $^{\circ}$ C にて 5 分インキュベートし、氷上にて急冷した。この作業を二回繰り返すことで Herring Testes Carrier DNA を変性させた。続いて、冷やしておいた 15ml チューブに、1~3 μ g のベクターと変性させた 20 μ l の Herring Testes Carrier DNA を加え、良く攪拌した。今回の実験では形質転換に pGBKT7- *Tmem48*-Full、pGBKT7- *Tmem48*-Short、pGBKT7- *Tmem48*-C term およびコントロールとして無処理の pGBKT7 を使用した。次に、先に記述した方法により作製した酵母コンピテントセルを 600 μ l 加えやさしく攪拌し、さらに 2.5ml の PEG/LiAc 溶液 (Clontech) を加えやさしく攪拌した。30 $^{\circ}$ C にて 15 分毎にやさしく攪拌しながら 45 分間インキュベートした。DMSO を 160 μ l 加え攪拌し、42 $^{\circ}$ C のウォーターバスに 20 分間つけた。この時 10 分毎にやさしく攪拌した。700 \times g にて 5 分遠心し上精を除き、3ml の YPD Plus 液体培地 (Clontech) で菌体を懸濁し、30 $^{\circ}$ C にて 90 分振盪培養した。700 \times g にて 5 分遠心し上精を除き、15ml の 0.9%NaCl にて懸濁した。原液、10 倍希釈液、100 倍希釈液、1000 倍希釈液それぞれ 100 μ l をトリプトファン欠損最少寒天培地(以下 SD/-Trp) (26.7g/L Minimal SD Base (Clontech)、0.74g/L -Trp Dropout Supplement (Clontech)、2%寒天末)、カナマイシンを添加した YPDA 寒天培地 (YPDA/Kan+) (15mg/L カナマイシンを含む YPDA 寒天培地) に播種し、30 $^{\circ}$ C にて 3 日間培養した。

・転写活性テストおよび毒性テスト

酵母の形質転換液の原液、10 倍希釈液、100 倍希釈液、1000 倍希釈液それぞれ 100 μ l の X- α -Gal (2mg/ml) (Clontech) を塗布した SD/-Trp 寒天培地、ヒスチジン・トリプトファン欠損最少寒天培地 (以下 SD/-His/-Trp) (26.7g/L Minimal SD Base (Clontech)、0.74g/L -His/-Leu/-Trp Dropout Supplement (Clontech)、0.395g/L L-ロイシン、2%寒天

末)、アデニン・トリプトファン欠損最少寒天培地 (以下 SD/-Ade/-Trp) (26.7g/L Minimal SD Base (Clontech)、0.74g/L -Ade/-His/-Leu/-Trp Dropout Supplement (Clontech)、0.076g/L L-ヒスチジン塩酸塩、0.395g/L L-ロイシン、2%寒天末)、アデニン・ヒスチジン・トリプトファン欠損最少寒天培地 (以下 SD/-Ade/-His/-Trp) (26.7g/L Minimal SD Base (Clontech)、0.74g/L -Ade/-His/-Leu/-Trp Dropout Supplement (Clontech)、0.395g/L L-ロイシン、2%寒天末) に播種し、30℃にて 3 日間培養した。コロニー形成の有無およびコロニー色、コロニーサイズを比較した。

・ベイトタンパク質の発現確認

寒天培地上で生育したコロニーを 5ml の YPDA 液体培地に懸濁後、30℃にて 16 時間振盪培養し、前培養液とした。そして、前培養液を 50ml の YPDA 液体培地に加え、30℃にて OD600 の値が 0.5 に近づくまで約 8 時間振盪培養した。さらに、培養液を 4℃、700×g にて 5 分間遠心し集菌した。回収した菌体は 1ml の溶解バッファーに懸濁し、超音波破碎することでタンパク質を抽出し可溶化処理を行った。その後、抗 TMEM48 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行い、ベイトタンパク質の発現を確認した。

・ウエスタンブロッティング

5μl の調製したタンパク質溶液に 5μl の 2×サンプルバッファー (125mM Tris-HCl, pH6.8、8%SDS、2%メルカプトエタノール、20%グリセロール、0.2%BPB) を加え、37℃にて 15 分間保温することでタンパク質の SDS 化を行った。このサンプルを 7.5%アクリルアミドゲルにて 200V の電圧で 35 分間電気泳動することでタンパク質を分離した。分離したタンパク質を PVDF メンブレン (Millipore) に転写後、メンブレンをブロッキングバッファー (2%の Amersham™ ECL Advance Blocking Agent (GE ヘルスケア) を含む 1×PBS-T) に 1 時間浸漬した。続いて、ハイブリパック内にブロッキング処理したメンブレ

ンと抗 TMEM48 抗体 (Akiyama et al., 2013) 液 (抗 TMEM48 抗体 : ブロッキングバッファー = 1 : 5000) を入れ、4°C にて一晩ローテートした。一次抗体反応を終えたメンブレンを 1×PBS-T (137mM 塩化ナトリウム、8.1mM リン酸水素 2 ナトリウム、2.68mM 塩化カリウム、1.47mM リン酸水素 1 カリウム、0.05% Tween-20) にて振盪しながら 15 分間洗浄し、この作業を 4 回繰り返した。洗浄したメンブレンを HRP 標識された抗ウサギ IgG 抗体液 (HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) : ブロッキングバッファー = 1 : 20000) に浸し、室温にて 1 時間液を揺らしながら反応させた。二次抗体反応を終えたメンブレンを 1×PBS-T にて振盪しながら 15 分間洗浄し、この作業を 4 回繰り返した後、検出試薬 (Lumigen™ TMA-6 (GE ヘルスケア)) により化学発光させ、ルミノイメージアナライザー LAS-400mini (FUJIFILM) にて露光し画像を取り込んだ。

<スクリーニング>

作出した形質転換酵母を寒天培地で培養し、コロニーを形成させた。形成されたコロニーを 50ml の SD/-Trp 液体培地に懸濁し、OD₆₀₀ の値が約 0.8 となるよう 30°C にて 16 から 20 時間振盪培養した。培養液を 1,000×g にて 5 分間遠心することで集菌し、5ml の SD/-Trp 液体培地に再懸濁した。前培養し 5ml の SD/-Trp 液体培地に再懸濁した形質転換体と、Matchmaker™ 酵母形質転換済みマウス精巣 cDNA ライブラリー (Clontech) とを 2L のフラスコ内で混合し、カナマイシンを添加した 45ml の 2×YPDA 液体培地を加えた。酵母菌体は、30°C にて 24 時間ゆっくりと振盪培養することで接合させた。その後、培養液を 1000×g にて 5 分間遠心することで集菌した。回収した菌体は、X-α-gal 添加アデニン・ヒスチジン・ロイシン・トリプトファン欠損最少培地 (強度選択培地) (26.7g/L Minimal SD Base (Clontech)、0.74g/L -Ade/-His/-Leu/-Trp Dropout Supplement (Clontech)、2% 寒天末、) またはヒスチジン・ロイシン・トリプトファン欠損最少培地 (中度選択培地) (26.7g/L Minimal SD Base (Clontech)、0.74g/L -His/-Leu/-Trp Dropout Supplement (Clontech)、

2%寒天末) に播種した。150mm プレートには 200 μ l、100mm プレートには 100 μ l を播種し、30 $^{\circ}$ Cにてコロニーが形成されるまで約 2 週間培養した。中度選択培地上で形成したコロニーは、白金耳により強度選択培地へ再び播種し、30 $^{\circ}$ Cにてコロニーが形成されるまで培養した。強度選択培地上で青色を示したコロニーを陽性コロニーとした。

<陽性コロニーの解析>

酵母からのプラスミド抽出は PrepEase[®] Yeast Plasmid Isolation Kit (GE ヘルスケア) を用いて行った。

・PCR によるプレイベクター挿入断片の増幅および塩基配列の確認

抽出した酵母プラスミドを鋳型にライブラリー側の挿入断片を増幅し、ABI310 ABI PRISM 310 Genetic Analyzer をもちいたダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。

1 μ l の抽出した酵母プラスミド液と 1 \times PCR バッファー、0.2mM dNTPs (dATP、dTTP、dCTP、dGTP (TAKARA) 各 0.2mM)、0.25 μ M 各増幅用プライマー、(表 4.3)、0.5U Taq DNA Polymerase を混合し、10 μ l の PCR 反応液を調製した。PCR では、94 $^{\circ}$ C1 分の熱変性の後、94 $^{\circ}$ C30 秒の熱変性・68 $^{\circ}$ C3 分 30 秒のアニーリングおよび伸長反応を 35 サイクル繰り返し、68 $^{\circ}$ Cで 4 分間伸長反応を行った。5 μ l の PCR 産物を 1%アガロースゲルにて 100V の電圧で 30 分間電気泳動した。残りの 5 μ l の PCR 産物に 3.5 μ l の滅菌水および 0.5 μ l の ExoSAP-IT (GE ヘルスケア) を加え攪拌し、37 $^{\circ}$ Cで 30 分間反応させた後、80 $^{\circ}$ Cにて 15 分間保温することで酵素を失活させ、その後氷上に 5 分間静置した。分光光度計にて濃度を測定し、300ng を鋳型として使用し、先の「塩基配列の確認」に記述してある方法により塩基配列の決定を行った。

・プレイプラスミドの精製および塩基配列の決定

抽出した酵母プラスミド液 0.5 μ l を用い、先に記述してある方法により大腸菌を形質転換し、アンピシリンを添加した LB 寒天培地に播種した。一晚培養しコロニーを形成させた後、プラスミドを抽出した。抽出したプラスミドはオペロンバイオテクノロジー株式会社に外注し挿入断片の塩基配列の解析を依頼した。また、先述のシーケンス方法により塩基配列の確認を行った。確認した塩基配列は NCBI の BLAST プログラムを用い、データベース上の既知マウス DNA 配列との相同性検索を行い、該当する遺伝子を特定した。

<候補遺伝子の発現解析>

・半定量的 RT-PCR

1 μ l の希釈した cDNA および 1 \times PCR バッファー、2mM dNTPs、各 0.25 μ M *Gapdh* 増幅プライマー、0.5U Taq DNA Polymerase を含む 10 μ l の反応液を調整した。PCR では、95 $^{\circ}$ C 5 分の熱変性の後、95 $^{\circ}$ C 30 秒の熱変性・55 $^{\circ}$ C 30 秒のアニーリング・72 $^{\circ}$ C 30 秒の伸長反応を 22 サイクル繰り返し、72 $^{\circ}$ C で 5 分間伸長反応を行った。5 μ l の PCR 産物を 2% アガロースゲルにて、100V の電圧で 30 分間電気泳動した後、臭化エチジウムで染色し、紫外線照射下でバンドを確認した。内部標準である *Gapdh* の増幅断片のバンドの明るさがそろるように、各臓器および精子形成ファーストウェーブの精巣 cDNA の希釈率を調整した。

内部標準によるサンプルの調整後、内部標準を合わせた各臓器 cDNA 1 μ l および候補遺伝子の発現解析用に設計した各プライマー（表 4.5）を使用し、PCR を行った。また、各臓器の cDNA を用いた PCR と同様に、精巣で限定的に発現することが確認された遺伝子について、精子形成ファーストウェーブにおける精巣の cDNA を用い PCR を行った。5 μ l の PCR 産物を、2% アガロースゲルにて 100V の電圧で 30 分間電気泳動した後、臭化エチジウムにより染色し、紫外線照射下でバンドを確認した。

結果

<ベイトベクターの構築および形質転換酵母の作出>

作製したベイトタンパク質発現ベクターにおいて、挿入断片の塩基配列をデータベース上の *Tmem48* の塩基配列と比較したところ、目的とする *Tmem48* 全長配列、膜貫通ドメインの一部を除いた配列、膜貫通ドメインを完全に除いた C 末端側配列のそれぞれ異なる 3 種の *Tmem48* cDNA 断片が挿入されていることが確認された。また、挿入断片に塩基置換や欠失・挿入は確認されなかった。また融合タンパク質における読み枠を確認したところ、GAL4 DNA 結合ドメインとの融合タンパク質を正常に生産することのできる塩基配列であった。そこで、これらのベクターを材料方法にて先述したとおり、pGBKT7-*Tmem48* full、pGBKT7-*Tmem48* short、pGBKT7-*Tmem48* C term とし、それぞれを用い酵母 AH109 株を形質転換したところ、全てのベクターで SD/-Trp 寒天培地および YPDA/Kan⁺寒天培地上にコロニー形成を確認した。また、形成したコロニーの大きさを比較したところ、上記の 3 ベクターおよび挿入断片を持たない pGBKT7 ベクターの間で、形成したコロニーの大きさに顕著な違いは認められなかった (図)。さらに、作出した全ての形質転換体は、SD/-Ade/-His/-Trp 寒天培地および SD/-His/-Trp 寒天培地上でコロニーを形成せず (図 3.5)、X- α -gal を塗布した SD/-Trp/寒天培地上で白色コロニーを形成した。続いて、ウェスタンブロッティングによるタンパク質の発現を確認したところ、*Tm4m48* の全長配列、膜貫通ドメインの一部を除いた配列および膜貫通ドメインを完全に除いた C 末端側配列と GAL4 結合ドメインとの融合タンパク質として予測される分子量に一致したバンドが、それぞれの形質転換体において得られ (図 3.4)、各形質転換体において目的のタンパク質が発現していることが確認された。以上のことから、作出した形質転換体において目的のタンパク質が生産されており、かつ生産されているベイトタンパク質が酵母の生育に影響を示すほどの毒性を示さず、またレポーター遺伝子の自律的な転写活性も有さないことが確認され

た。

<スクリーニング>

pGBKT7-*Tmem48* full によって形質転換した酵母を用いて行ったスクリーニングでは、強度選択培地に直接播種したものはコロニーを形成しなかった。中度選択培地に播種し、強度選択培地に播種し直したものでは、16 個の陽性コロニーを得た。また、pGBKT7-*Tmem48* short によって形質転換した酵母を用いて行ったスクリーニングでは、強度選択培地に直接播種したもので 5 個の陽性コロニー、中度選択培地を介して強度選択培地に播種し直したもので 55 個の陽性コロニーを得た。pGBKT7-*Tmem48* C term によって形質転換した酵母を用いて行ったスクリーニングでは、強度選択培地に直接播種したもので 2 個の陽性コロニー、中度選択培地を介して強度選択培地に播種し直したもので 18 個の陽性コロニーを得た (表 3.2)。今回のスクリーニングにより、総計で 96 個の陽性コロニーを得ることができた。

<陽性コロニーの解析>

陽性コロニーよりプラスミドを抽出し、プレイプラスミドに挿入されている DNA 断片の塩基配列を決定し、BLAST プログラムによりデータベース上で対応する遺伝子を検索したところ、表に示すように合計 31 の遺伝子が確認された。そのうち、SNAP-associated protein (*Snapap*) 遺伝子および、COX11, cytochrome c oxidase assembly protein (*Cox11*) 遺伝子がそれぞれ 11 コロニーにおいて同定された。そして、COP9 homolog, subunit 5 (*Cops5*) 遺伝子および serin peptidase inhibitor, Kazal type 2 (*Spink2*) 遺伝子が各 5 コロニーにおいて、EF-hand calcium binding domain 7 (*Efcab7*) 遺伝子が 3 コロニーにおいて、WD repeat domain 53 (*Wrd53*) 遺伝子および Superoxide dismutase 1, soluble (*Sod1*) 遺伝子がそれぞれ 2 コロニーにおいて同定された。それ以外の 24 遺伝子については、それぞれ

1つのコロニーから同定された。また、データベース上では対応する遺伝子情報が存在しないものや、染色体 DNA の配列が対応するものなども存在した (表 3.4)。

<候補遺伝子の発現解析>

以上の酵母ツーハイブリッドスクリーニングにより得られた、TMEM48 と結合する可能性のあるタンパク質の遺伝子について、マウス各臓器における発現を半定量的 RT-PCR により調べた。その結果、調べた 22 遺伝子の全てが精巣で発現していることが確認された。また、これらのうち多くの遺伝子は幅広い臓器で発現していたが、中でも精巣における発現が強いものが多く存在していることが明らかとなった (図 3.8)。さらに、*Dynll2* や *Pabpc2*、*Spink2*、*Tcte3* と *Txn14b* は精巣においてのみバンドが確認され、調べた他の臓器においては発現していないか、あるいは極めて低いレベルでの発現であることが明らかとなった (図 3.8)。

また、精巣で限定的に発現していることが確認された候補遺伝子について、精子形成ファーストウェーブ期における発現開始時期の特定を試みたところ、*Txn14b* は減数分裂が開始し始める 8 日齢の精巣ですでに発現が開始していることが明らかとなった。さらに *Pabpc2* や *Spink2* は、パキテン期の精母細胞が出現する生後 14 日齢の精巣で発現が開始し、発現量が徐々に増加していた。また、*Dynll2* は減数分裂第一分裂中期に入り始める細胞が見られ始める 20 日齢の精巣で発現が開始していた (図 3.9)。このように、これらの遺伝子は精子形成の特定の時期に特異的に発現していることが明らかとなった。

考察

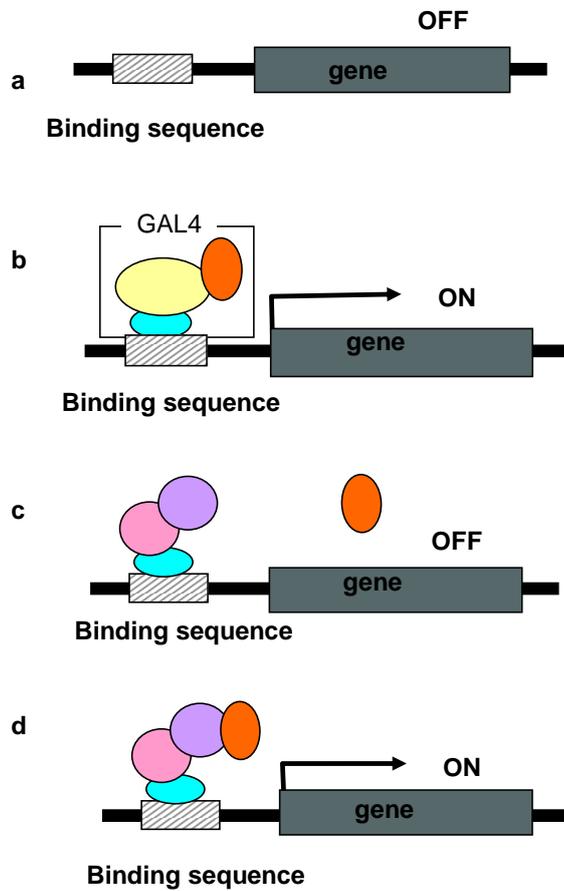
酵母の形質転換や毒性試験、転写活性試験、ウエスタンブロットティングによるベイトタンパク質の発現確認の結果から、作製したベイトベクターにより形質転換体内で目的のベイトタンパク質を発現させることができていることが確認され、生産されているベイトタンパク質が酵母の生育に影響を与えるほどの毒性を示さず、レポーター遺伝子の自律的な転写活性をもたないことが確認された。このことから、作出した酵母形質転換体はクロンテックの Matchmaker™システムを利用した酵母ツーハイブリッド法によるスクリーニングに使用可能であると考えられたため、作出した形質転換体を用いた酵母ツーハイブリッド法によるスクリーニングを行った。

酵母ツーハイブリッド法によるスクリーニングにより、合計 31 の遺伝子が TMEM48 と結合する可能性のあるタンパク質として同定された。これらの中には、遺伝子改変マウスや突然変異マウスの存在により、その生体における機能が報告されている遺伝子も存在していたが、精子形成に関する報告は少なく、*sks* 突然変異マウスと同様の表現型を示すものは確認できなかった。しかし、今回のスクリーニングにおいて複数のクローンより同定された *Spink2* 遺伝子のノックアウトマウスは精子形成に異常を呈することが報告されており ()、*sks* マウスとの関連性も高い可能性が示唆された。

また、核膜孔を介した物質輸送に関与すると言われていた RAN に結合するタンパク質である *Ranbp9* (Nakamura et al., 1998) や、mRNA のポリ A に結合し mRNA の核膜孔を介した輸送に関与することが予想される *Pabpc2* (Kimura et al., 2009) などが同定された。このことから、TMEM48 が核膜孔の構築だけでなく、核膜孔を介した物質輸送に関与している可能性が考えられた。さらに、mRNA のスプライシングや細胞周期の進行に関与することが報告されている *Txn14b* (Sun et al., 2004) が同定されたことから、mRNA の代謝や細胞周期の調節にも関与している可能性が示唆された。

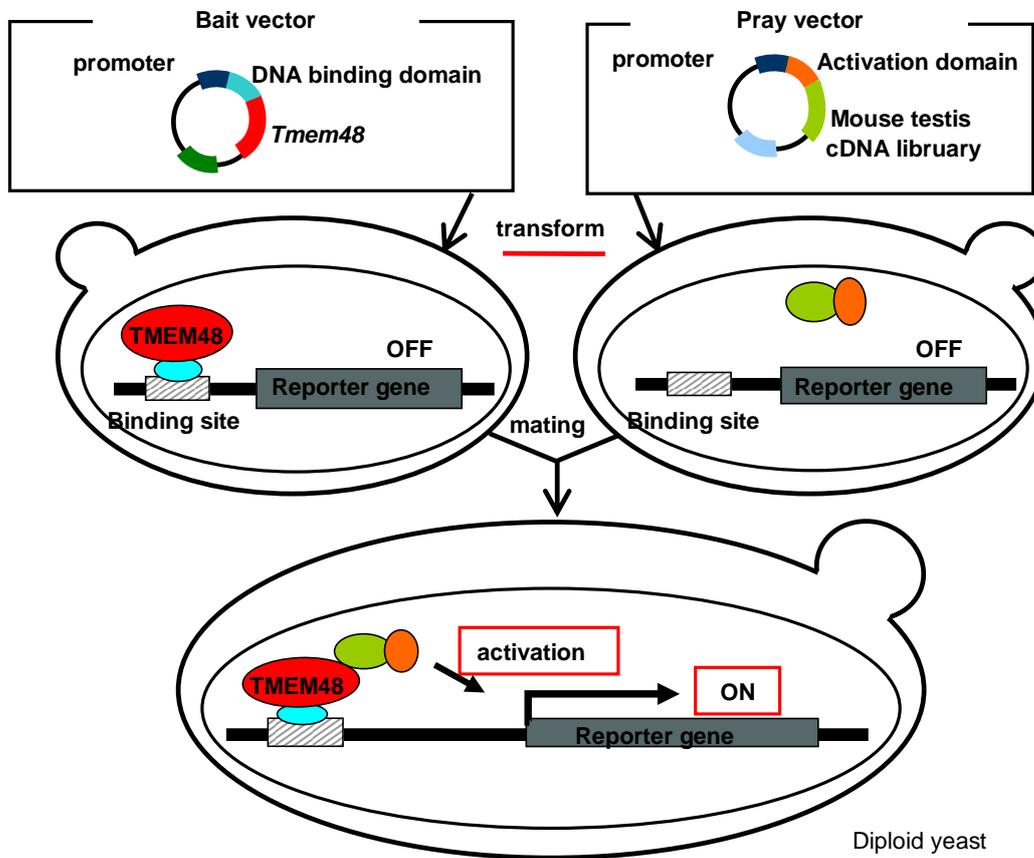
一方で、ヒトや酵母のNDC1と結合する遺伝子として既に報告のあるPom152やNup53、Nup59そしてALADINは(Onischenko et al., 2009; Yamazumi et al., 2009; Kind et al., 2009)、今回のスクリーニングで同定することはできなかった。その理由として、発現量が微量であり今回使用したライブラリーに含まれていなかった可能性や、結合力が弱く偽陰性となってしまった可能性が考えられる。また、陽性コロニー数が少ないことに関しても、選択強度が強すぎるため偽陰性となったものが多く存在した可能性が考えられる。一方で、NDC1と同じく核膜孔複合体においてアンカータンパク質として必須の役割を担っているPOM121に類似の遺伝子であるPom12112遺伝子が候補遺伝子として得られた。

また、候補遺伝子の発現解析の結果から、精巣に限定的に発現する候補遺伝子の存在が明らかとなり、TMEM48とこれら候補遺伝子との精巣特異的な相互作用が、マウスにおける精子形成に重要な役割を担っている可能性が示唆された。



4.1 Principle of activation of transcription by GAL4

Gene which is transcriptionally regulated by GAL4 In yeast, (a) If GAL4 does not bind to upstream binding sequence, that gene do not activate and express. (b) If GAL4 binds to upstream binding sequence, transcription is activated and gene is expressed. On the other hand, GAL4 can recover the function even if the activation domain and DNA binding domain are expressed separately. So, (c) if Gal4 binding domain and Gal4 activation domain are not close, gene transcription is not activated. However, (d) if Gal4 DNA binding domain and activation domain are close to each other, the activity is recovered and activates transcription.



4.2 Principle of Yeast Two hybrid screening

Prepare the yeast transformed by Bait vector or prey vector. After generating transformant, be mating them each other and generate Diploid cells which express each bait and prey protein in one cell. If bait and prey protein bind to each other, reporter gene is activated and expressed.

表4.1 Primer sequences for the insert DNA for Bait vector

Primer	sequence
1: <i>Tmem48</i> Full-F	ccatctccatggccacggct
2: <i>Tmem48</i> two-hy F-Nco I	ggaatccctgtccatggtcag
3: <i>Tmem48</i> C-term F-Nco I	atctatgccatggaggcgcag
4: <i>Tmem48</i> R-Sma I	gtatcaccgggtaatgaacacag

1 and 4 are used for *Tmem48* Full
 2 and 4 are used for *Tmem48* Short
 3 and 4 are used for *Tmem48* C-term

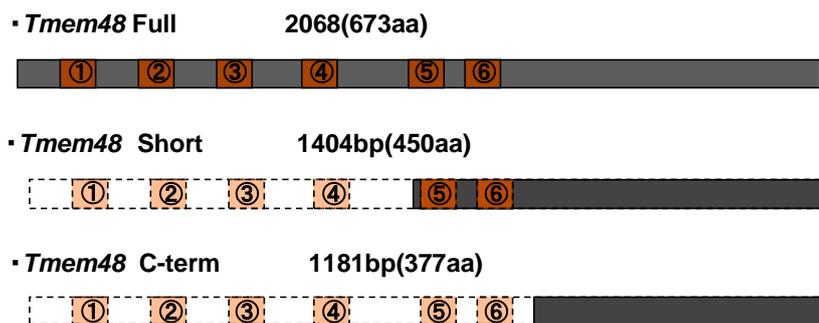
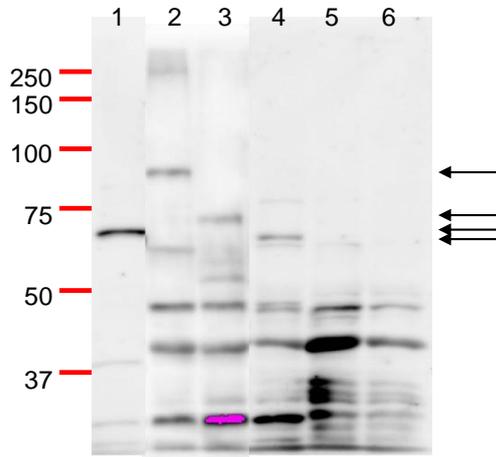


图4.3 Construct of *Tmem48* used for Yeast two hybrid screening

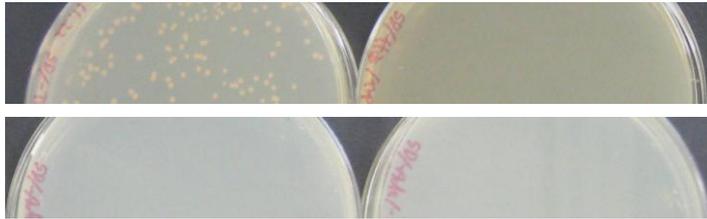
Three type of *Tmem48* fragment were used for Yeast two hybrid. Short type is lacking 4 transmembran domain at N-term of protein. C-term type is deleted N-term transmembran domain completely. No1-6 indicate transmembrane position. Dotted line indicates deleted region.



☒4.4 Expression of bait protein in transformant.

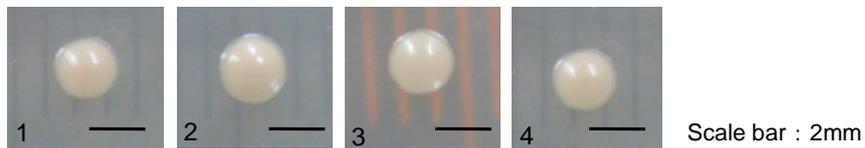
Western blotting using anti-TMEM48 antibody. A band is detected in predicted molecular size at lane 1, 2, 3, 4. Arrow indicates predicted size of TMEM48 or recombinant protein.

1: pcDNA3.1-Tmem48 transfected COS-7. 2: AH109 transformed by pGBKT7-Tmem48 full. 3: AH109 transformed by pGBKT7-Tmem48 short. 4: AH109 transformed by pGBKT7-Tmem48 C-term. 5: AH109 transformed by empty pGBKT7. 6: AH109



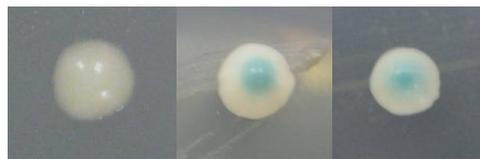
☒4.5 Transcriptional activation test

Transcriptional activation ability of bait protein was tested. Transformant is cultured onto (top left) X-α -Gal added SD/-Trp, (top right) SD/-His /-Trp, (bottom left) SD/-Ade/-Trp and (bottom right) SD/-Ade/-His/-Trp



☒4.6 Toxicity test

Toxicity of bait protein for yeast growth was tested. Transformant is cultured onto SD/-Trp plate, and measure the colony size. 1:pGBKT7-Tmem48 Full in AH109. 2:pGBKT7-Tmem48 Short in AH109. 3:pGBKT7-Tmem48 C-term in AH109. 4:pGBKT7 in AH109



☒4.7 Positive colony

Colony created by yeast which have positive interaction of bait and prey protein shows blue color on the X-α -gal added agarose plate.

表4.2 Number of Positive colonies

construct	# positive colonies
<i>Tmem48</i> Full	16(0)
<i>Tmem48</i> Short	55(5)
<i>Tmem48</i> C-term	18(2)
total	89

* Positive colony: Yeast formed blue colony on Strong selection medium (SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -gal)

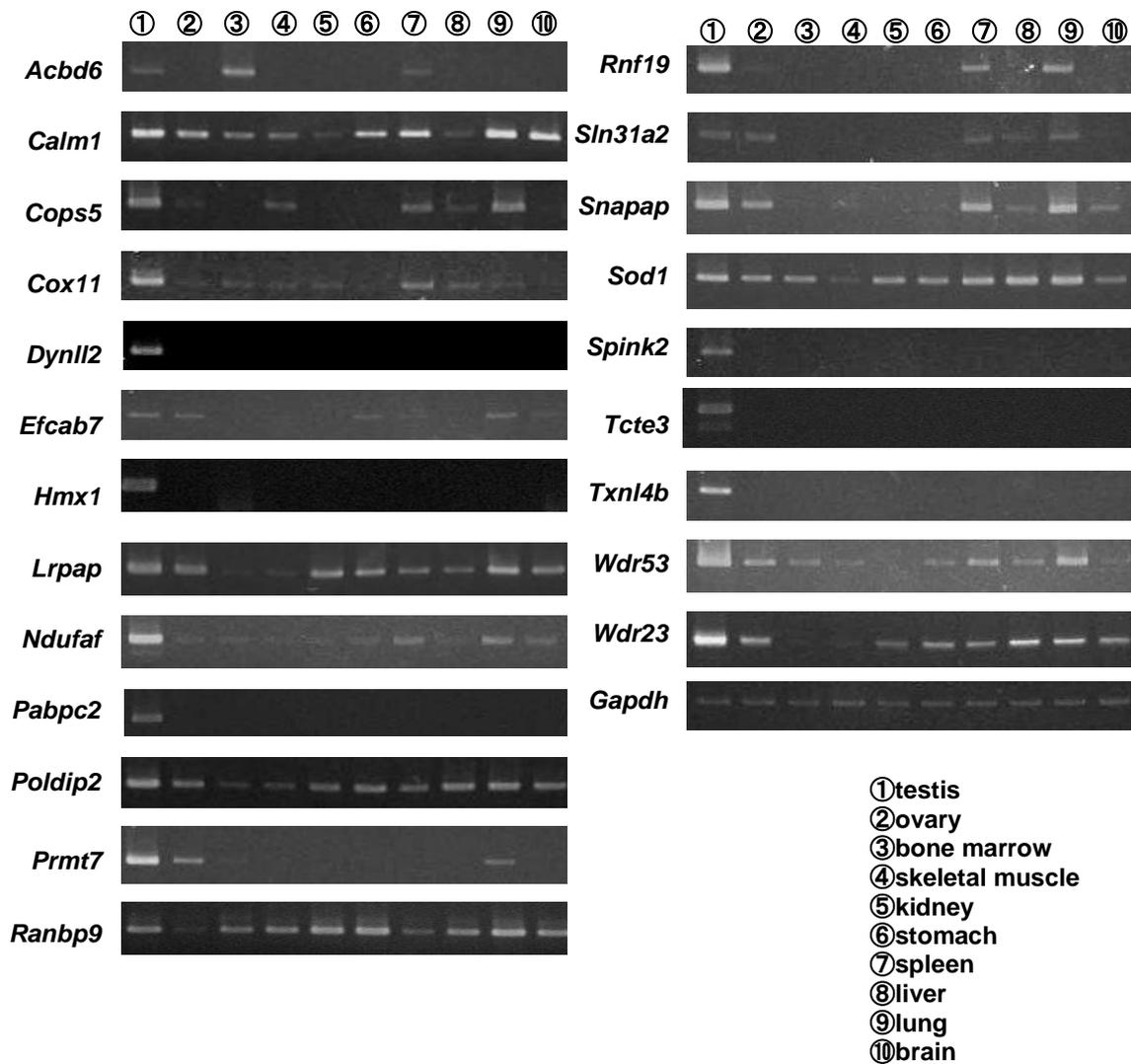
Parenthesis indicates No of clone which form positive colony selected by only strong medium. Others are selected by midium selection medium first, and after that, select again by strong medium.

表4.3 Primer for sequencing of inserts

Primer	Sequence
5' AD Insert Sequencing Primer	ctattc gatgatgaagataccccaccaaacc
3' AD Insert Sequencing Primer	gtgaacttgcggggttttcagtatctacga

表4.4 candidate gene obtain from Yeast two hybrid screening

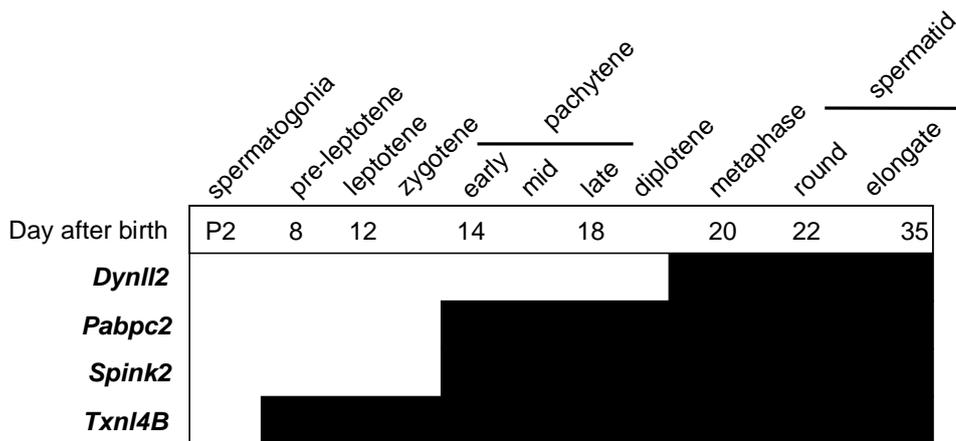
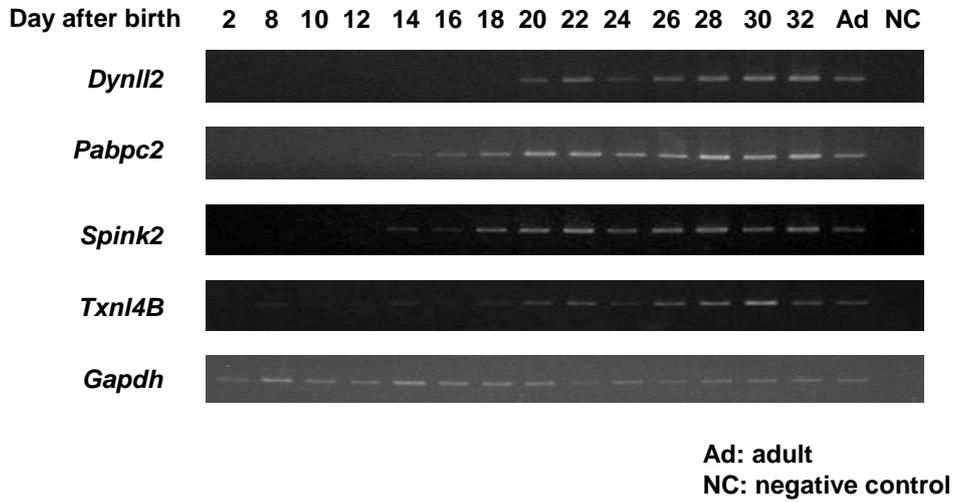
No.	gene	
11	<i>Snapap</i>	SNAP-associated protein
11	<i>Cox11</i>	COX11 homolog, cytochrome c oxidase assembly protein
5	<i>Cops5</i>	COP9 homolog, subunit 5
5	<i>Spink2</i>	serine peptidase inhibitor, Kazal type 2
3	<i>Efcab7</i>	EF-hand calcium binding domain 7
2	<i>Wdf53</i>	WD repeat domain 53
2	<i>Sod1</i>	Superoxide dismutase 1, soluble
1	<i>Ranbp9</i>	RAN binding protein 9
1	<i>Rnf19</i>	ring finger protein 19A(XY body protein
1	<i>a</i>	nonagouti
1	<i>2010109K11Rik</i>	RIKEN cDNA 2010109K11 gene
1	<i>D11Wsu47e</i>	DNA segment, Chr11, Wayne State University 47
1	<i>Hmx1</i>	H6 homeo box 1
1	<i>Ndufaf3</i>	(NADH dehydrogenase(ubiquinone)1 alpha subcomplex, assembly factor 3
1	<i>Calm1</i>	Calmodulin 1
1	<i>Txn14b</i>	thioredoxin-like 4B
1	<i>Slc31a2</i>	solute carrier family 31, member 2
1	<i>Spin2</i>	serine peptidase inhibitor, Kunitz type 2
1	<i>Lrpap1</i>	low density lipoprotein receptor-related protein associated protein
1	<i>Poldip2</i>	polymerase (DNA-directed), delta interacting protein 2
1	<i>Tcte3</i>	t-complex-associated testis expressed 3
1	<i>Avp</i>	arginine vasopressin
1	<i>Pabpc2</i>	poly A binding protein, cytoplasmic 2
1	<i>Dynl12</i>	dynein light chain LC8-type 2
1	<i>Mbijp</i>	MAP3K12 binding inhibitory protein 1
1	<i>Acbd6</i>	acyl-CoA binding domain containing 6
1	<i>2310006M14Rik</i>	RIKEN cDNA 2310006M14 gene
1	<i>Prrnt7</i>	protein arginine N-methyltransferase 7
1	<i>Wdf23</i>	WD repeat domain 23
1	<i>Pom121l2</i>	POM121 membrane glycoprotein-like 2
1	<i>Sumo2</i>	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 2
17	Chromosomal DNA	
11	unknown	
89	total	



4.8 Candidate Gene expression in several organ

Gene expression of candidate gene in several organ were analysed. RT-PCR were performed. Gapdh is for internal controle.

Lane 1: testis. 2: ovary. 3: bone marrow. 4: skeletal muscle. 5: kideny. 6: stomach. 7: spleen. 8: liver. 9: lung. 10: brain.



4.9 Expression at first wave of spermatogenesis

Expression of gene which shows testes limited expression were analyzed at first wave of spermatogenesis. *Dynll2* is detected from 20 day old mouse. *Pabpc2* and *Spink2* are first detected at day 14 old mouse. *Txnl4b* is first detected at day 8 old mouse.

表4.5 Primer for gene expression analysis

gene	Forward primer	Reverse primer
<i>Acbd6</i>	ACCCGGACCGGTGGATCAGG	CTCTGATACCTGAGGATTCCATCCTGG
<i>Calm1</i>	TTACTCGAAGTCGGGCGGCG	GGTGCCATTGCCATCAGCATCC
<i>Cops5</i>	GAGACCATGATCATCATGGAC	TGAAATATGAGACTTCTAAGGC
<i>Cox11</i>	GGAACAAGACGGTGCTCAC	CTGGTTTGTGAGTAGGATTC
<i>D11Wsu47e F</i>	GGCGAATCGCGAGGTCCCTG	CACCTCTGGCTTGGCCTGGC
<i>Dynll2</i>	AGGAGCACCACATTTGAAGGATGG	TTCGCCTCGGCCACCTAGCC
<i>Efcab7</i>	GTATTGGACTCCTCAAACCTGC	GACTGTGCACACTGCCAATCC
<i>Lrpap1</i>	GAAGATGGCGCCTCGAAGAGAGAG	ATTGAGGGCGTTGCTGTGCACC
<i>Ndufaf3</i>	GGACACCGGCTTTCTCCGGC	TGGCACAGGCATTGGGCGTG
<i>Pabpc2</i>	CAGCCGTTGGGGAGGTTCTCAT	CATAGCCCAGGGAACGGCGT
<i>Poldip2</i>	CCTGGCAAGAGAAGAATCACCCG	ACCAGTGAAGGCCTGAGGGTGG
<i>Prmt7</i>	TGGATCGCTTCCCACAGCGG	AGCACGACACGGCAAGTCACC
<i>Rnf19</i>	GCAGATCCTGACTGTAGGTGG	CAATCCCTACGGGAGCACCAAC
<i>Slc31a2</i>	CTGAGTCCCAGCAGCGAGC	AAACCACCTGAGGCGGGTCC
<i>Snapap</i>	CAGAGAAAGCCAAGTAGAGC	GAGGCGGCTACATGAATGAG
<i>Sod1</i>	CATCCACTTCGAGCAGAAGGC	CAAGCGGCTCCCAGCATTTCC
<i>Spink2</i>	AGTGATGCTGAGACTGGTGC	CTTCCAGCCTTACCCAGAG
<i>Tcte3</i>	AGGCCGAATGGCGAAGACGC	CCCAGTTGTCCCATGCCACATCC
<i>Txn14b</i>	GATACAGCCCAGGACCCACGC	CTGGCTTCAGGCCCGTCTC
<i>Wdr23</i>	TGCAGGCTTTGCTTTCACCAAACC	CGGAAAACCTCTGCTGCAGCGC
<i>Wdr53</i>	ACGGGCTGGTGGCTTCAGGA	TGCCGCACGACGCTACAGAG

第五章

Tdrd12 遺伝子および TDRD12 タンパク質の 精巣における発現解析

諸論

repro23 マウスは、アメリカのジャクソン研究所において実施されたリプロジェノミック計画により作出された ENU 誘発の突然変異マウス系統である。これまでの研究により、減数分裂第一分裂前期の早い段階において異常が生じ、精子形成が停止し、精子が生産されないことから不妊を呈することが確認されている (Asano et al., 2009)。 *repro23* マウスの精巣は正常個体と比較して著しく小さく、精巣および精巣上体に成熟した精子は観察されない (Asano et al., 2009)。また、 *repro23* マウスの精細管では、空胞化した精細管が多く観察され、レプトテン期以降の細胞がほとんど観察されない (Asano et al., 2009)。さらに、連鎖解析による候補領域の縮小および候補領域内の塩基配列の解析から、この *repro23* マウスに生じた表現型の原因として、 *Tdrd12* 遺伝子の第 8 エクソン内に生じた塩基置換が同定された (Asano et al., 2009; Pandey et al., 2013)。この塩基置換は、アミノ酸情報を持つコドンから停止コドンへの変更を伴うナンセンス変異である。そのため、 *repro23* マウスでは正常な TDRD12 タンパク質が生産されていないものと考えられている。

repro23 マウスにおいて原因遺伝子として同定された *Tdrd12* は Tudor ドメインを有するタンパク質ファミリーの一つである。これまで多くの Tudor domain containing ファミリーにおいて、piRNA の生合成への関与が報告されており、精子形成過程において必須の役割を果たしていることが明らかとなっている (Saxe et al., 2013; Bao et al., 2012; Tanaka et al., 2011; Yabuta et al., 2011; Shoji et al., 2009; Chuma et al., 2006)。piRNA とはシヨウジョウバエにおいて発見された、PIWI タンパク質に結合する短鎖 RNA のことであり、生殖細胞において特異的に発現し、PIWI タンパク質と相互作用することで遺伝子のサイレンシングに関与しているとされている (Alexei et al., 2007)。この遺伝子の発現制御機構が精子形成過程において非常に重要であることから、関連遺伝子を欠損した場合、不妊となることが報告されている (Chuma and Nakano, 2013; Pillai and Chuma, 2012)。

これまでに、ショウジョウバエでは *Tdrd12* のオーソログ遺伝子が piRNA の合成および生殖細胞の健全な生産に必須かつ重要な役割を果たしていることが報告されている (Handler et al, 2011)。さらに *Tdrd12* のノックアウトマウスでも、不妊となることが確認されており、piRNA の二次生産に必須の役割を果たすことが報告されている (Pandey et al., 2013)。*Tdrd12* のノックアウトマウスでは、piRNA の二次生産に異常が生じることで、トランスポゾン領域のメチル化が不十分となり、トランスポゾンの活性が上昇することで不妊となることが明らかとされている (Pandey et al., 2013)。*Tdrd12* は生殖巣において特異的に発現しており、特に精巣において強い発現を示すことが確認されている。また、培養細胞を用いた発現系では、細胞質へ顆粒状に局在することが明らかとされているが、精子形成過程における発現パターンおよび局在は不明である。しかし、成熟した精巣において *Tdrd12* が発現していることから、これまでに報告されている胎仔期における機能以外にも精子形成過程において重要な役割を担っている可能性が考えられる。またデータベース上では、複数の転写産物がマウス精巣において存在する可能性が示唆されている一方、その情報は統一されておらず、未知である。そこで本章では、*Tdrd12* の精子形成過程における機能を解明するための足掛かりとして、*Tdrd12* および TDRD12 の発現解析を行った。具体的には、精巣において発現している *Tdrd12* の転写産物の特定および、精子形成過程における *Tdrd12* および TDRD12 の発現状況、TDRD12 の発現部位および局在の特定を行った。

材料方法

・ 供試動物

アメリカのジャクソン研究所より導入し、当研究所で維持されている *repro23* 系統の変異ヘテロ個体同士の交配により得られた同腹個体の遺伝子型を PCR-RFLP 法を用いた遺伝子型判定により決定した。*Tdrd12^{repro23/repro23}* を *repro23* マウスとし、*Tdrd12^{+/+}* または正常個体 *Tdrd12^{repro23/+}* を正常個体として使用した。

・ 遺伝子型判定

マウス尾部より抽出したゲノム DNA を用い、PCR により変異を含む部位を増幅した後、PCR 産物を制限酵素 *HinfI* により完全消化した。その後アガロースゲルにて分離し、臭化エチジウムにより染色しトランスイルミネーター下でバンドを観察し、遺伝子型を決定した。

・ RT-PCR

マウスより抽出した精巣は 1ml の Torizol (invitrogen) を加えた後、簡易ホモジェナイザーおよびシリンジにより破碎懸濁し、室温にて 5 分間静置した。その後 200 μ l のクロロホルムを加え攪拌し、さらに 3 分間室温に静置した。4 $^{\circ}$ C、12,000rpm にて 5 分間遠心した後、上清を新しいチューブに移し、等量のイソプロパノールを加え室温に 5 分間静置した後、4 $^{\circ}$ C、12,000rpm にて 5 分間遠心した。上清を除き、沈殿物を DEPC 水処理水により溶解した。吸光度計を用い濃度を測定した後、アガロースゲルにより分離、臭化エチジウムによる染色によっても RNA の存在を確認した。

抽出した RNA 50 μ g、10U の DNaseI (TAKARA)、1 \times DNaseI バッファーを含む 50 μ l の反応液を調整し、37 $^{\circ}$ C にて 30 分間反応させることで DNA を分解した。DEPC 水を加え 100 μ l にメスアップした後、等量の酸性フェノール/クロロホルムを加え攪拌し、4 $^{\circ}$ C、

12,000rpm にて 5 分間遠心した。水層を新しいチューブに移し、等量のクロロホルムを加え再び攪拌後、4℃、12,000rpm にて 5 分間遠心した。上清を新たなチューブに移し、10μl の 3M 酢酸ナトリウムおよび 250μl のエタノールを加え混和し、-80℃にて 20 分間静置した後、4℃、12,000rpm にて 5 分間遠心した。上清を除去後、DEPC 処理水に溶解した。その後吸光度計を用い濃度を測定した後、アガロースゲルにより分離、臭化エチジウムによる染色によっても RNA の存在を確認した。

続いて、DNaseI 処理した RNA 5μl および 1μM のオリゴ dT プライマー (TAKARA)、1mM の dNTP (TAKARA) を含む 10μl の反応液を調整した。反応液を 65℃で 5 分間保温した後、氷上で急冷した。この反応液に、1×PrimeScript™バッファー (TAKARA) および 0.5μl の RNase インヒビター (TAKARA)、1μl の PrimeScript™逆転写酵素 (TAKARA) を含む反応液を混合し、20μl の反応液を調整した。反応液は 42℃にて 1 時間保温することで逆転写反応を行った後、70℃にて 15 分間保温し、氷上で冷却することで cDNA の合成を行った。

1μl の希釈した cDNA および 1×PCR バッファー、2mM dNTPs、各 0.25μM *Gapdh* 増幅用プライマー、0.5U Taq DNA Polymerase を含む 10μl の反応液を調整した。PCR では、95℃5 分の熱変性の後、95℃30 秒の熱変性・55℃30 秒のアニーリング・72℃30 秒の伸長反応を 22 サイクル繰り返し、72℃で 5 分間伸長反応を行った。5μl の PCR 産物を 2%アガロースゲルにて、100V の電圧で 30 分間電気泳動した後、臭化エチジウムで染色し、紫外線照射下でバンドを確認した。内部標準である *Gapdh* の増幅断片のバンドの明るさがそろるように、cDNA の希釈率を調整した。

内部標準によるサンプルの調整後、内部標準を合わせた cDNA 1μl および各プライマー (表 5.1) を使用し、PCR を行った。5μl の PCR 産物を、2%アガロースゲルにて 100V の電圧で 30 分間電気泳動した後、臭化エチジウムにより染色し、紫外線照射下でバンドを確認した。

・ウエスタンブロッティング

精巢より抽出したタンパク質溶液は BCA 法により濃度を測定した後、濃度が一定になるようにタンパク質溶液を調整した。20 μ g のタンパク質を含むタンパク質溶液に等量の 2 \times サンプルバッファー (125mM Tris-HCl, pH6.8、8%SDS、2%メルカプトエタノール、20%グリセロール、0.2%BPB) を加え、37 $^{\circ}$ Cにて 15 分間静置することで SDS により平衡化させた。一般的な SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によりタンパク質を分離させた後、セミドライ法にて PVDF メンブレン(Imobilon-P, Milipore)にタンパク質を転写させた。メンブレンは 2%のブロッキングバッファーに室温にて 1 時間浸漬させた後、anti-TDRD12 rabbit 抗体 (Pandey et al., 2013) を 1:1000 の割合で希釈した一次抗体反応液と 4 $^{\circ}$ Cにて反応させた。その後、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase (HRP)) が付加された anti-rabbit goat IgG (santa cruz) を 1:20,000 の割合に希釈し、室温にて浸漬することで二次抗体反応を行った。タンパク質の検出には ECL advance western blotting detection kit (GE Healthcare)を用い、LAS-4000 (fuji film)により画像を取得した。

・組織標本および染色体展開標本の作成

染色体展開標本は、Peters 等 (Peters et al., 1997) の方法を利用して作成した。精巢の薄切標本用の精巢は、摘出後白膜を取り除き、4%PFA 固定液を用い氷上において 8 時間緩やかに振盪することで固定した。固定後、PBS にて洗浄、置換した後、10%のサッカロース、20%のサッカロース、20%のサッカロースおよび 50%の OCT コンパウンドを含む PBS 溶液にそれぞれ浸漬させることで、OCT コンパウンドおよびサッカロースを含む溶液へ置換した。その後、最終的に置換に用いた OCT コンパウンドを含む溶液を用い液体窒素下で組織を包埋した。OCT コンパウンドに包埋した組織は 4 μ m の厚さに薄切し、スライドガラス上に展開させた後、乾燥させ定着させた。

・免疫染色

染色体展開標本は、antigene dilution buffer (ADB; PBS with 2% BSA and 0.05% Triton-X 100)中において室温保持させた後、4°Cにて一次抗体液と反応させた。一次抗体反応には、anti-SCP3 guineapig 抗体 (Grey C et al., 2009)、anti-TDRD12 rabbit 抗体 (Pandey et al., 2013)および γ H2AX モノクローナル抗体(millipore) をそれぞれ 1:1,000、1:200、および 1:500 の割合にて希釈して使用した。染色体展開標本は一次抗体反応後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて洗浄した後、二次抗体反応を行った。二次抗体反応には、Alexa Fluor® 594 が付加された anti-guineapig goat IgG (invitrogene)、Alexa Fluor® 488 が付加された anti-rabbit donkey IgG (invitrogene) および Alexa Fluor® 350 が付加された anti-mouse donkey IgG conjugated with (invitrogene) を 1 : 500 の割合にて希釈し使用した。

一方、精巢の薄切標本は、PBS 中に 5 分間浸漬した後、10%BSA 中において室温保持させた後、4°Cにて 1 次抗体液と反応させた。1 次抗体反応には、anti-TDRD12 rabbit 抗体 (Pandey et al., 2013) を 1 : 200 の割合に希釈して使用した。抗体反応後、PBS にて洗浄し、二次抗体反応を行った。二次抗体反応には Cy3 が付加された anti-rabbit donkey IgG (Jackson ImmunoResearch)を用い、1 : 500 の割合にて希釈し使用した。DNA および核の対比染色 (counter staining) には DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)(Vector Laboratories Inc.)を使用した。

結果

・マウス精巣において発現している *Tdrd12* の転写産物

まず初めに、精巣において発現している *Tdrd12* の転写物の解析を行った。精巣において発現している可能性のある 3 種類の転写産物それぞれを特異的に増幅するプライマー（表 5.1、図 5.1 A）を設計し、マウス精巣 cDNA を鋳型に PCR 反応を行い発現の有無を観察した。その結果、3 種類の予測された転写産物の内、最も短いものを増幅するプライマーを用いた PCR ではバンドを確認することが出来なかった（図 5.1 B）。一方その他の 2 種類の転写産物増幅するプライマーを用いた場合、目的のサイズにバンドを確認し（図 5.1 B）、マウス精巣においては 2 種類の転写物が発現していることが明らかとなった。

さらに、*repro23* マウスにおける *Tdrd12* の発現を半定量的 RT-PCR により確認したところ、*repro23* マウスの精巣 cDNA サンプルではバンドが正常個体と比較して薄くなっていることが確認された（図 5.2 A）。このことから、*repro23* マウスでは変異を持つ *Tdrd12* の発現量が正常個体と比較して低下していることが明らかとなった。

・精子形成ファーストウェーブ期における *Tdrd12* および TDRD12 の発現

次に、マウス精巣において発現していることが明らかとなった *Tdrd12* の転写産物それぞれの、精子形成過程における発現開始時期および発現パターンを調べた。精子形成ファーストウェーブ期における各時期の精巣 cDNA を用い、上記の実験で使用したプライマーにより PCR を行ったところ、*Tdrd12* の転写産物の内短いもの（以下短鎖）を増幅した PCR では、2 日齢の精巣サンプルからバンドを確認でき、使用した全ての日齢のサンプルにおいてバンドが検出された（図 5.3 A）。一方で、*Tdrd12* の転写産物の内長いもの（以下長鎖）を増幅した PCR では、生後 12 日齢の精巣サンプルにおいて初めてバンドが検出され、以降全ての日齢においてバンドを検出した（図 4.3 A）。このことから、短鎖の転写物は出生後ま

もなくの精巣で既に発現が開始しており、長鎖の転写物については生後 12 日齢の精巣より発現が開始していることが明らかとされた。また、タンパク質の発現を調べるため、TDRD12 に対する抗体を用いウエスタンブロッティングを行った。その結果、*repro23* マウスのサンプルでは検出されないバンドが、2 種の転写産物の翻訳により生産される TDRD12 の予測される分子量に検出された (図 5.2 B)。さらに、精子形成ファーストウェーブ期における精巣タンパク質を用い、TDRD12 抗体によりウエスタンブロッティングを行った。その結果、短鎖の転写産物由来の TDRD12 は生後 2 日齢の精巣サンプルで既にバンドが検出され、調査由来の翻訳産物は生後 12 日の精巣サンプルにおいて初めてバンドが確認された (図 5.3 B)。すなわち、*Tdrd12* の場合と同様に、短鎖転写物由来の翻訳産物は生後まもなくの精巣において既に発現が確認され、長鎖転写物由来のものは生後 12 日齢の精巣より発現していることが明らかとされた。

・ TDRD12 の精巣における発現部位および局在

さらに、TDRD12 の精巣における発現部位を、精巣切片を用いた免疫蛍光染色法により調べた。その結果、精原細胞および精母細胞の細胞質に広くシグナルを検出した (図 5.4、5.5)。また、精母細胞の細胞質では、顆粒状の局在も観察された (図 5.5 B)。さらに、精母細胞の核内において比較的強いシグナルを観察することができ、発生に伴い特徴的な局在変化のパターンを示した (図 5.4、5.5)。精巣切片を用いた免疫染色により、精母細胞の核内でシグナルが観察され、特徴的な局在パターンの変化を示したことから、さらに染色体展開標本を用い TDRD12 抗体による免疫蛍光染色を行った。シナプトネマ構造の側方要素タンパク質である SYCP3 および突長的なヒストンバリエーションである rH2AX は減数分裂進行時期の特定に使用した。その結果、レプトテン期精母細胞においては核全体に広くシグナルが観察された (図 5.6 下)。また、減数分裂が進行し、サイゴテン期に入るとシグナル分布はレプトテン期よりも限定的となり、主にシナプトネマ構造上で観察された (図 5.6 中)。

さらに発生がすすみパキテン期に入ると性染色体上の XYbody と呼ばれる部位のみで強いシグナルが観察された(図 5.6 上)。これらのことから、TDRD12 の局在を解析したところ、レプトテン期精母細胞においては核全体に広く分布しており、減数分裂の進行とともに分布範囲はシナプトネマ構造上に収束され、パキテン期に入ると性染色体上にのみ局在することが明らかとなった。また、TDRD12 のシグナルおよび rH2AX のシグナルは重なっており、かつ局在パターンが一致していることが明らかとなった (図 5.6)。

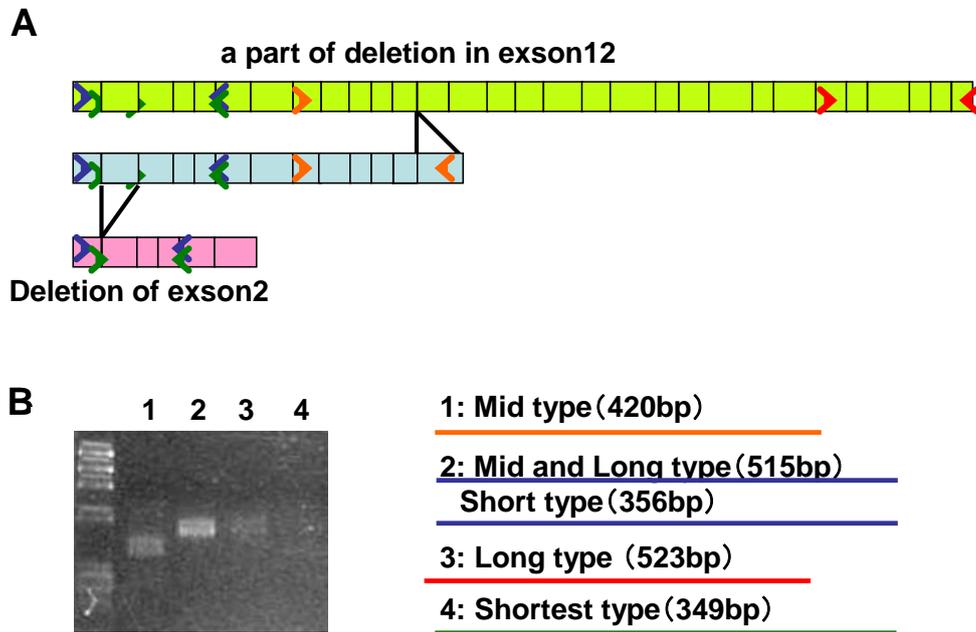
考察

Tdrd12 のマウス精巣における転写産物の発現解析を行ったところ、2種類の長さの異なる転写産物が発現していることが明らかとなった。この2種類の転写産物はそれぞれ、短鎖の場合は Tudor ドメインを1つのみ有するタンパク質を生産し、長鎖の場合は2つの Tudor ドメインおよびヘリカーゼドメイン、CS ドメインを有するタンパク質を生産することが予測される (図 4.7)。*repro23* マウスに生じた変異では、タンパク質の N 末端側から 270 残基のところまで停止コドンが生じており、もし翻訳されていたとしても、短鎖のものにおいても 3 分の 1 を欠損しており、たとえ Tudor ドメインを有していたとしても、正常に機能するタンパク質が生産されない物と予想される。さらに、*repro23* マウスにおいて、精巣における *Tdrd12* の発現量を確認したところ、正常個体と比較して発現量の低下が確認された。そのため、*repro23* マウスではナンセンス変異依存の mRNA 分解機構 (NMD) が作用し、変異を持つ *Tdrd12* 転写産物が分解されているものと考えられた。また、TDRD12 の発現をウエスタンブロッティングにより確認したところ、*repro23* マウスのサンプルでは目的のサイズにバンドが無く、正常な TDRD12 が生産されていないことが確認された。

続いて、精子形成ファーストウェーブ期の精巣を用いた RT-PCR およびウエスタンブロッティングの結果から、*Tdrd12* および TDRD12 はともに、短鎖のものは生後 2 日齢の精巣で既に発現しており、長鎖のものに関しては生後 12 日齢の精巣において初めて発現が確認された。マウスの生後 12 日齢の精巣は、レプトテン期の精母細胞およびザイゴテン期の精母細胞の割合が上昇してくる時期であり (Bell et al., 1977)、長鎖 TDRD12 は精母細胞以降の生殖細胞において発現・機能している可能性が示唆された。また、短鎖のものに関しては、生後 2 日齢で既に発現が確認されることから、精原細胞以降および胎仔期に機能していることが考えられた。胎児期における *Tdrd12* の発現を調べていないものの、発現解析の結果から、胎児期には主に短鎖の TDRD12 が機能している可能性が示唆された。

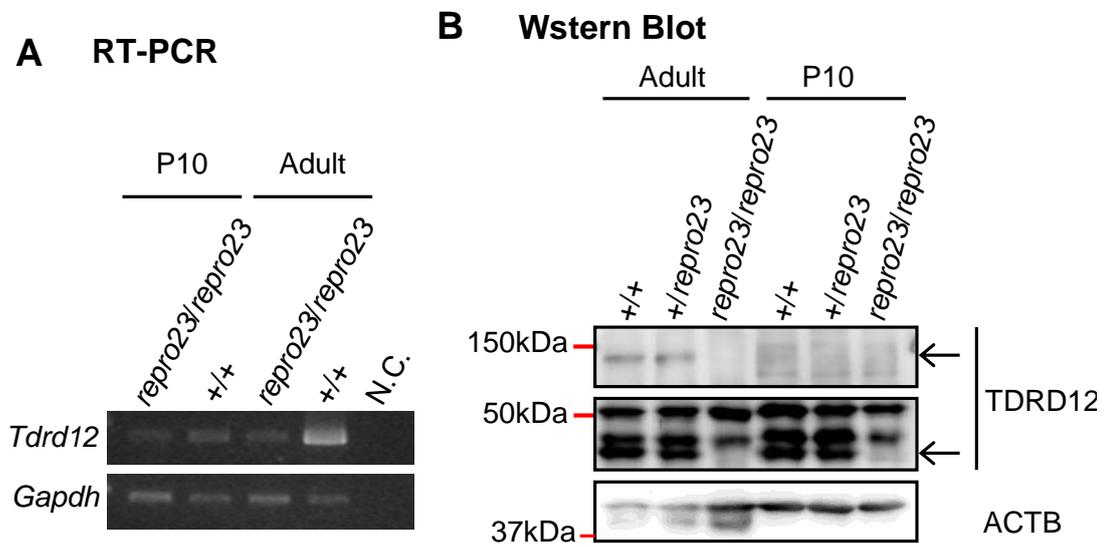
さらに、精巣切片を用いた anti-TDRD12 抗体による免疫蛍光染色による局在部位の観察では、精原細胞から精母細胞の広い範囲で細胞質全体にシグナルを観察することができた。精原細胞では明確な顆粒状のシグナルは観察されなかったものの、精母細胞になると細胞質側に顆粒状のシグナルも観察された。このことから TDRD12 は生殖細胞の細胞質に存在し、生殖顆粒へ局在している可能性が示唆された。多くの piRNA 関連因子において生殖顆粒への局在が報告されていることから、TDRD12 においても同様の機能を有しており、同様の局在が確認されたものと思われる。さらに詳しく確認するためにも、各発生段階における生殖顆粒のマーカータンパク質等との共染色により、細胞質での局在の特定が求められる。また、特に精母細胞の核内において、特に強いシグナルが検出された。この精母細胞の核内における局在パターンが特徴的であったため、染色体展開標本を用いた免疫染色も行ったところ、レプトテン期では核全体へ広く局在しており、その後発生に伴い、シグナルはシナプトネマ構造上へと収束され、パキテン期になると最終的に XY ボディのみへの局在へと変化した。この局在パターンの変化は、r-H2AX の局在パターンの変化 (Blanco-Rodríguez, 2009) と類似しており、実際に局在の一致も確認された。シグナルの収束パターンが、精子形成過程において生じる二本鎖切断である DSBs の修復とも重なることから、TDRD12 が精子形成過程において、2 本鎖切断の修復または DNA の損傷認識に重要な役割を担っている可能性が考えられた。TDRD12 の精巣における局在はこれまで明らかとされておらず、これまでに報告されている胎児期の piRNA 合成以外に、精母細胞においても重要な機能を有している可能性が示唆された。

これらのことから、*Tdrd12* および TDRD12 の発現解析を行うことで、これまでの報告に加え、*Tdrd12* および TDRD12 が精母細胞の減数分裂において重要な機能を有している可能性が明らかとなった。



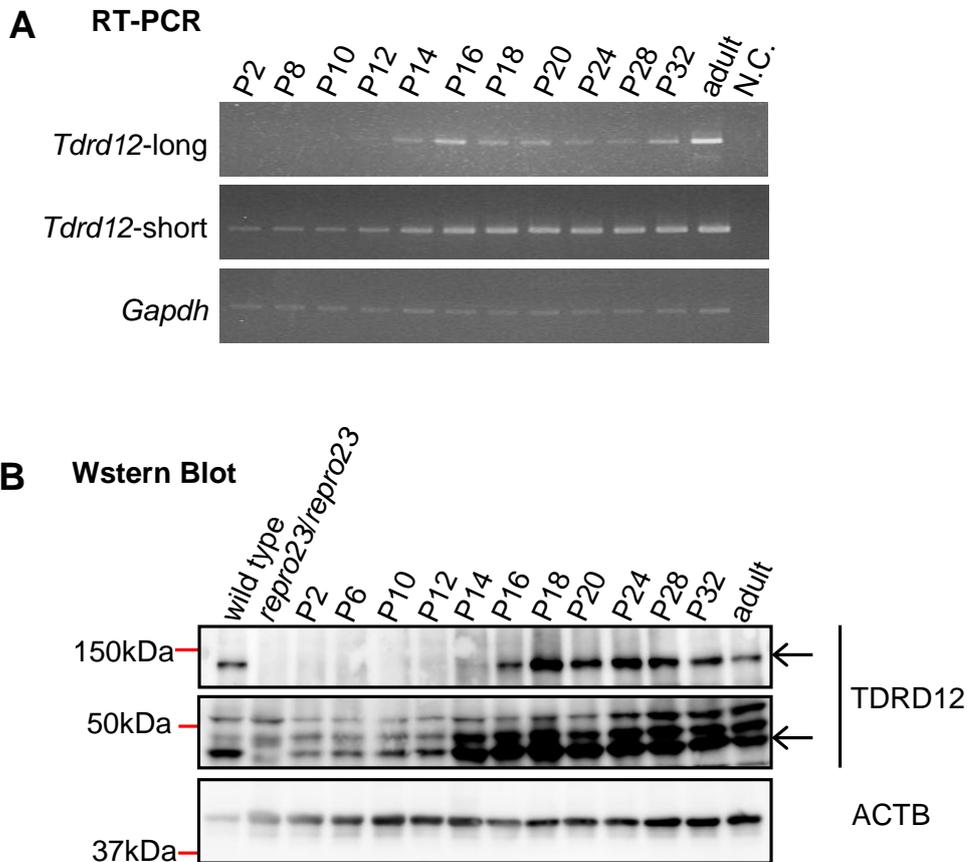
☒ 5.1 Transcript variants of Tdrd12 expressed in mouse testis

- (A) Predicted transcript variants of Tdrd12 expressed in mouse testis. Each blocks shows individual exons. A part of exon12 is missing in long type transcripts variant, and exon2 is missing in short type transcript variant. Arrow shows position of primers designed for PCR.
- (B) RT-PCR by primers shown in (A). 1: Only for middle type. 2: Target for all transcript variant, but products size are different. Middle and long type produce 515bp and short type produce 356bp. 3: Only for long type. 4: Only for short type.



5.2 Expression of *Tdrd12* and TDRD12 in *repro23* mutant mouse testis.

- (A) RT-PCR for *Tdrd12* at P10 and adult testis.
Gapdh is internal control. N.C: negative control.
- (B) Western blotting with anti-TDRD12 antibody.
 ACTB is loading control. Arrow shows predicted TDRD12 band.



5.3 Expression of Tdrd12 and TDRD12 during first wave of spermatogenesis.

- (A) RT-PCR of Tdrd12 by transcript variant specific primer. Several time point of first wave of spermatogenesis are used. Gapdh is for internal control. NC: negative control.
 Long type of transcript variant is first detected at P12 sample.
- (B) Western blotting with anti-TDRD12 antibody. Several time point of first wave of spermatogenesis are used. ACTB is loading control. Arrow shows bands of TDRD12. wild type: Tdrd12^{+/+} testis. repro23/repro23: Tdrd12^{repro23/repro23} testis.
 Long type of transcript variant is first detected at P12 sample.

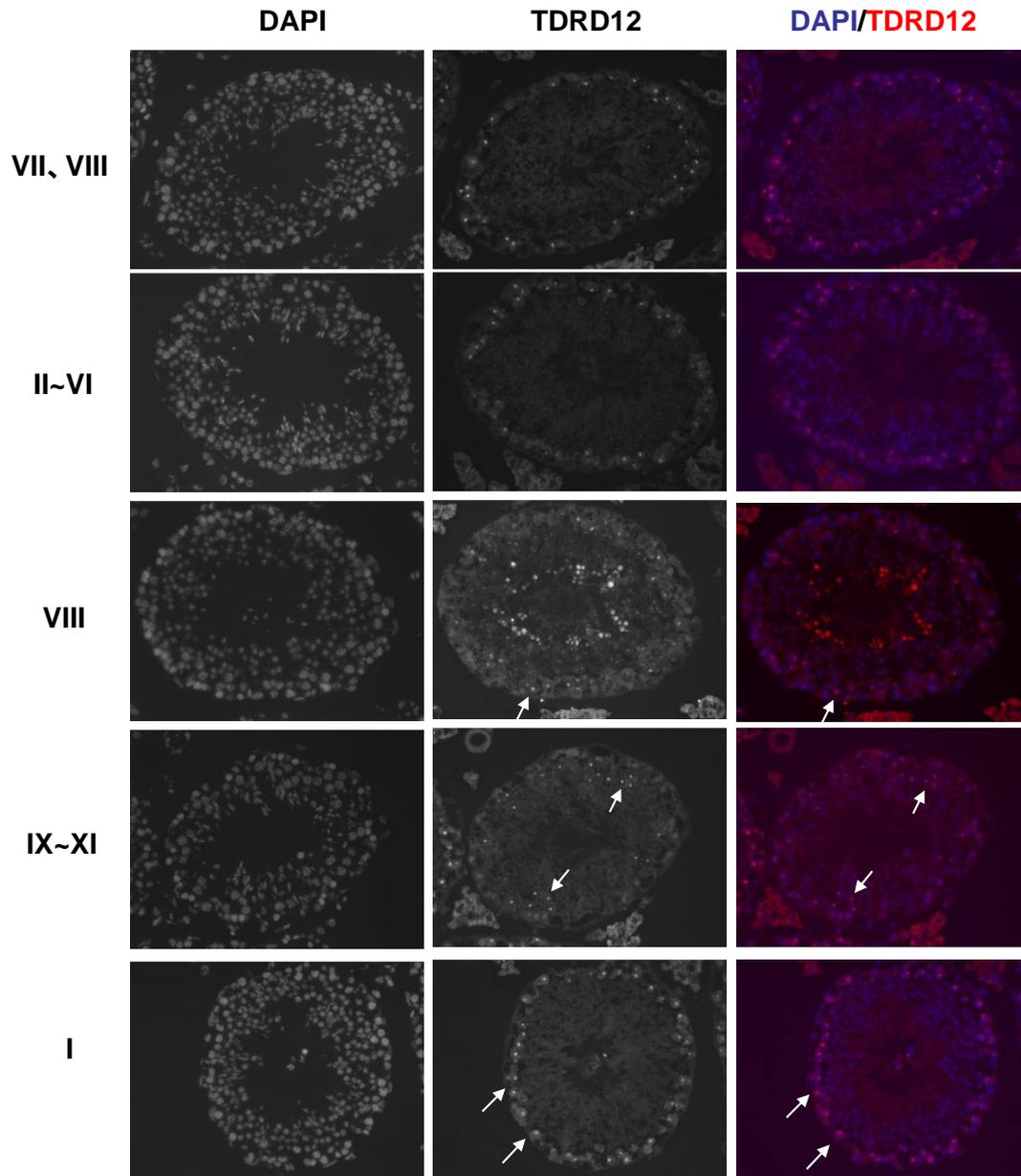
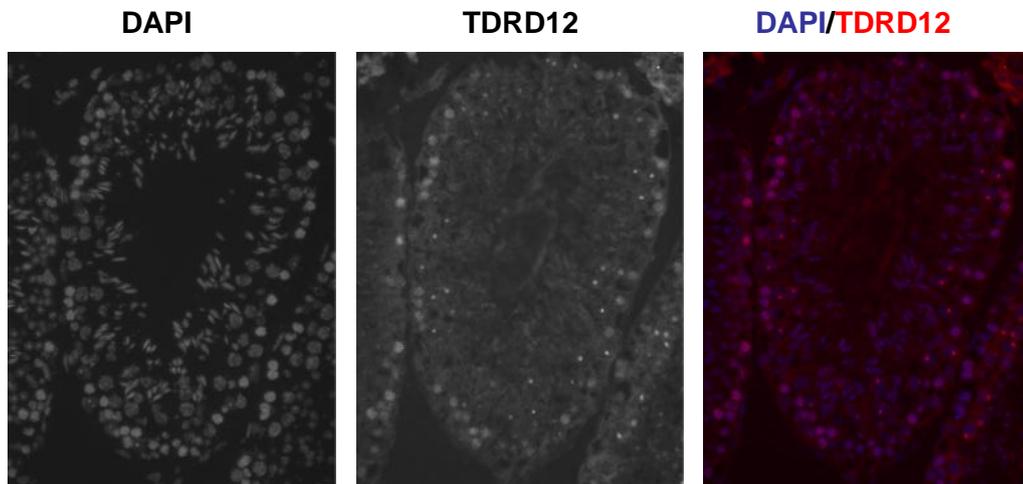


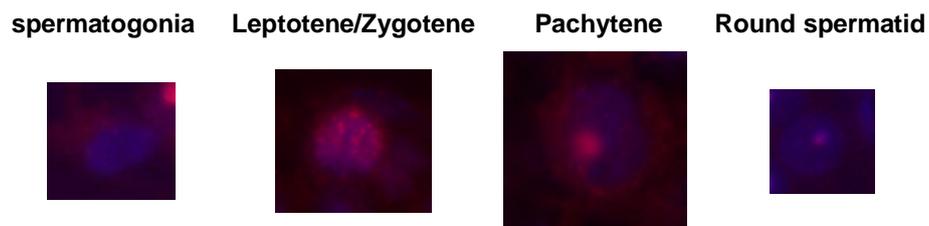
图5.4 Localization of TDRD12 in mouse testis

Immunofluorescence staining with anti-TDRD12 antibody (red). Nuclei and chromosomal DNA are counterstained by DAPI (blue). Roman numerals shows spermatogenic stages of seminiferous tubules. Signal are detected in spermatocytes (arrow).

A



B

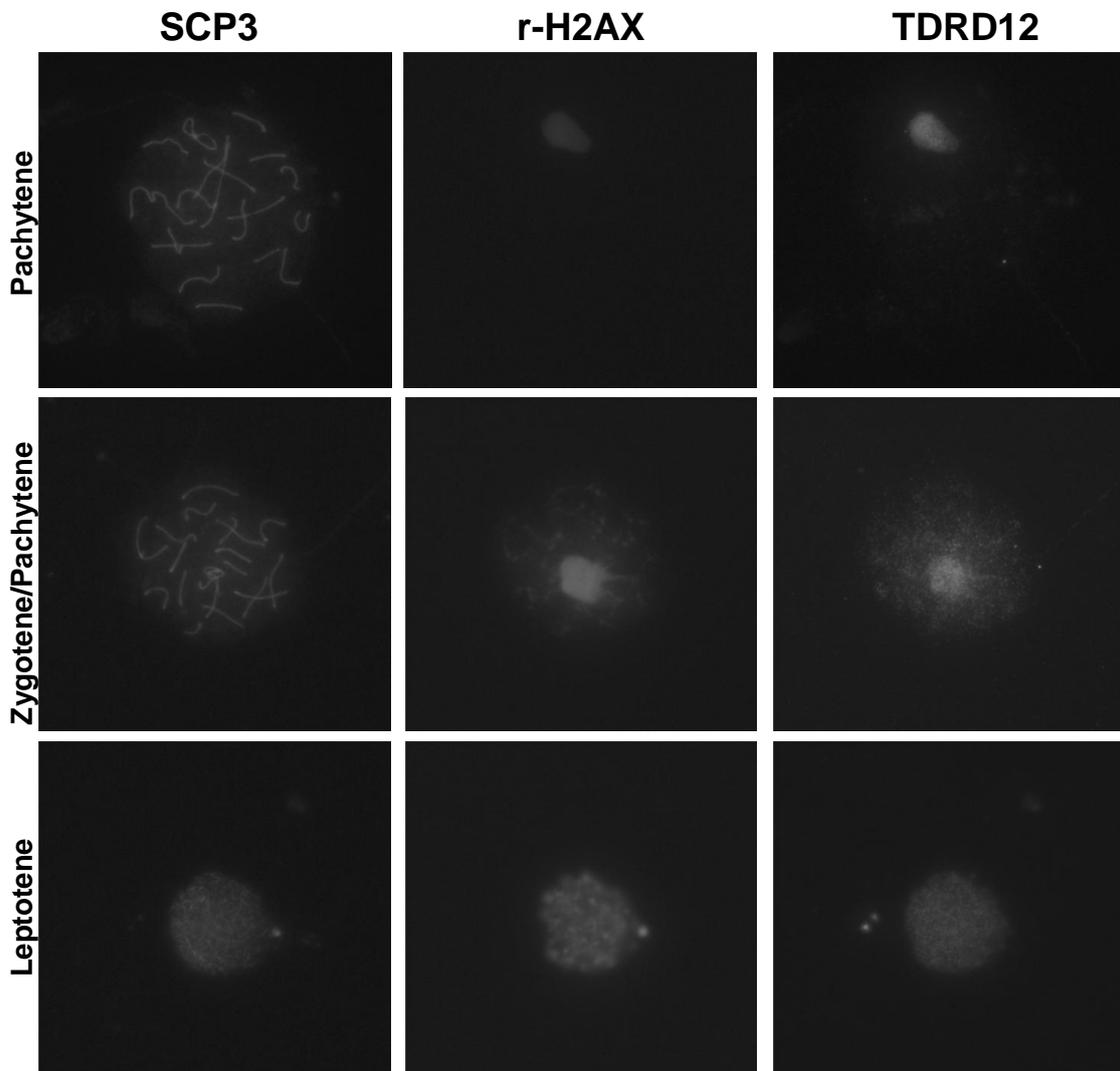


☒5.5 Localization of TDRD12 in male germcells

Immunofluorescence staining with anti-TDRD12 antibody (red). Nuclei and chromosomal DNA are counterstained by DAPI (blue).

Overview of seminiferous tubule (A) and enlarged pictures of individual male germcells (B).

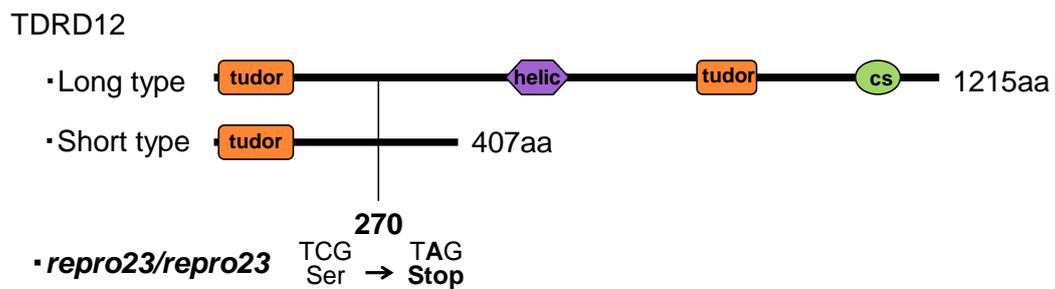
In spermatogonia, weak signal is observed in cytoplasm. In spermatocytes, weak signal in cytoplasm is also observed, and especially, granules are observed in pachytene spermatocyte. Furthermore, strong signal in nuclei is observed in spermatocyte. In leptotene or zygotene stage, signal is spread entirely. In pachytene stage, signal is packed in one region.



5.6 Localization of TDRD12 in nucleus of spermatocytes

Immunofluorescence staining with anti-SCP3 (left), anti-rH2AX (center) and anti-TDRD12 antibody (right).

In leptotene stage (bottom), signal are spread entirely. In zygotene/pachytene stage, signal start localizing to XYbody and on synaptonemal complex. In pachytene stage, signal is packed and localized in XYbody only. TDRD12 signal is overlapped with r-H2AX and localized to XY body



5.7 Structure of mouse TDRD12

Long type of TDRD12 is 1215aa, and short type of TDRD12 is 407aa.
 Long type has two tudor domain (tudor) and one helicase (helic) and CS (CS) domain.
 Short type has only one tudor domain.
 In repro23, Stop codon appears at 270aa from N-term of protein.

表5.1 Primer for *Tdrd12* expression analysis

Primer	sequence	
<i>Tdrd12</i>	tgttcgaggctcctggtgctg	gcttcacttgggtagttgctc
<i>Tdrd12</i> -long	cagcaaggagatggaggtacag	aaccgctgctctcagccaac
<i>Tdrd12</i> -short	gcttgagaagcagcagcagag	aaagggtggcatgtcgtcagg
<i>Gapdh</i>	cttggcatttggaaggg	cctctcttgctgcagtgtc

第六章

総括

高等生物において有性生殖は生命が種の連続性を維持し、次世代を作出するうえで欠くことのできない重要なプロセスである。精子や卵子といった配偶子は、受精を経て遺伝情報を次世代へと伝達し、種を維持することに特化した細胞であり、有性生殖の根本を担う。この配偶子の形成に関する分子機構を解明することは、有性生殖の人為的なコントロール法の確立に不可欠であり、不妊治療などの医療分野から、産業動物の効率的な生産といった畜産分野、動物の個体数の調節などへの応用が期待され、必要性も高い。その中で、生殖に異常を呈する突然変異マウスや、遺伝子改変マウスを用いた解析は、哺乳動物における生殖メカニズムを解明するうえで重要な役割を担っている。

sks 突然変異マウスは、核膜孔複合体構成因子の一つである *Tmem48* 遺伝子に突然変異を生じ、雌雄ともに不妊を呈する突然変異マウスである。これまでに核膜孔複合体の構築に必須であることは報告されているが、配偶子形成に関する報告はなかった。一方、核膜孔複合体の機能においても、体細胞における核-細胞質間の物質輸送や、遺伝子の発現制御に関与していることが明らかとされているが、生殖細胞における機能については未解明のままである。そのため、配偶子形成過程における *Tmem48* および核膜孔複合体の機能の解明は、配偶子形成に関する分子機構に新たな知見を与えることのできる重要な課題であると考えられる。そこで、本研究では、*sks* 突然変異マウスを用いた解析を行うとともに、*Tmem48* の機能の解析を行うことで、*Tmem48* の配偶子形成過程における機能の解明を試みた。

また、

第二章では、*sks* 突然変異マウスの生殖細胞における、核の形態および染色体の移動と配置に着目し研究を行った。その結果、*sks* 突然変異マウスのパキテン期精母細胞までにおける、ブーケットフォーメーションを含む一連のテロメアの局在の変化に顕著な異常は観察されなかった。しかし、抗 LAMINB1 抗体を用いた蛍光免疫染色により、*sks* 突然変異マウスでは、パキテン期中期以降の精母細胞において、核および核膜の形態に顕著な異常が

確認され高い頻度で核の形態に異常が生じていることが明らかとなった。このことから、TMEM48 はパキテン期の精母細胞において、核の形態の維持に重要な役割を担っている可能性が示唆された。さらに、核の形態異常が生じる時期と、相同染色体の対合に異常が生じる時期および精子形成が停止する時期が重なることから、核の形態を維持することが減数分裂の進行および精子形成の進行に重要であることが考えられた。

次に第 2 章では、*sks* 突然変異メスマウスにおける不妊の原因を解明するため、雌性生殖に関する表現型の解析を行った。その結果、*sks* 突然変異マウスのメスでは、性周期や、交尾行動、卵胞発育および排卵に顕著な異常は確認されなかった。さらに、*sks* 突然変異オスマウスにおいてみられる相同染色体の対合異常が、メスでは正常個体と比較して顕著な差が観察されなかった。一方で、2-細胞形成率が有意に低下しており、少数観察された 2-細胞でも以降の発生を観察することは出来なかった。しかし、*sks* 突然変異マウスの卵由来の受精卵を観察したところ、一部の卵において前核を観察することができ、さらに極体も観察された。このことから、観察された 2-細胞期胚は受精の結果発生し観察されたものと考えられる。さらに、排卵された卵母細胞を観察したところ、一部の卵母細胞において減数分裂の進行に遅延が観察された。また、MTOCs の局在を観察したところ、*sks* 突然変異マウスより排卵された卵母細胞において、局在に乱れが観察された。卵母細胞および初期胚は、中心体非依存性の紡錘体形成を行っており、MTOCs の会合が重要な役割を果たしている。これらのことから、TMEM48 が卵母細胞および初期胚における MTOCs の会合または安定性に関与している可能性が示唆された。また、MTOCs の適切な会合・局在および安定化が減数分裂および初期胚の卵割に重要であり、*sks* 突然変異マウスでは、TMEM48 の欠損によりこの MTOCs の局在化に異常が生じることで、減数分裂に遅延が見られ、発生が 2-細胞期胚以降に進行しないものと考えられる。

続いて第四章では、TMEM48 の機能解析の一環として、精巣内で TMEM48 と結合するタンパク質のスクリーニングを行い、29 の遺伝子を TMEM48 結合タンパク質の候補遺伝

子として同定した。さらに、得られた候補遺伝子の各臓器における発現を確認したところ、ほとんどの遺伝子において精巣で強い発現を確認した。中には精巣で限定的に発現が確認された遺伝子も存在した。また、得られた候補遺伝子の中に、核-細胞質間の物質輸送に関与する RAN に結合するタンパク質の遺伝子や、精巣特異的なポリ A 結合タンパク質、精巣特異的に発現している mRNA のスプライシングに関与するタンパク質が存在したことから、TMEM48 が核膜孔の構築だけでなく、核-細胞質間の物質輸送に関与している可能性が示唆された。しかし、相互作用の検出が酵母ツーハイブリッド法によるもののみであるため、今後 TMEM48 との免疫共沈降や TMEM48 をおとりとした GST プルダウンアッセイなどにより候補遺伝子と TMEM48 との結合を確認することで相互作用を確かめる必要がある。既に相互作用が報告されているタンパク質が今回の研究では同定されなかった一方で、精巣で特異的に発現が確認され、精子形成の特定の時期より発現している遺伝子も存在したことから、TMEM48 がこれら因子との相互作用により精子形成過程において必須の機能を有している可能性が示唆された。

第五章では、*Tdrd12* および TDRD12 の発現解析を行うことで、精子形成過程での機能に迫ろうと試みた。その結果、マウス精巣においては 2 種類の *Tdrd12* 転写産物が存在することが明らかとされた。また短鎖のものは生後間もなくより RNA およびタンパク質の発現を開始しており、長鎖のものにおいても、レプトテン期の細胞とザイゴテン期の細胞が観察される生後 12 日齢より発現が確認された。また、抗 TDRD12 抗体を免疫染色の結果から、精原細胞および精母細胞の細胞質における局在が確認された。特にパキテン期精母細胞では細胞質側に顆粒状の局在が確認され、胎仔期には piRNA の合成に必須の役割を果たしていることが報告されていることから、他の piRNA 合成関連遺伝子および生殖顆粒へ局在する遺伝子と同様の機能を精原細胞および精母細胞においても有する可能性が示唆された。また、精母細胞では、核内において TDRD12 の強いシグナルが観察された。染色体標本での染色と同様、レプトテン期には核全体に広く観察されるシグナルが、発生の進行に

伴いシナプトネマ構造上に収束され、パキテン期以降になると最終的に XY ボディーへと局在することが明らかとなった。この局在パターンの変化は精子形成過程において非対合領域および非修復領域に局在する rH2AX の局在パターンの変化と一致している。このことから、精子形成過程において生じる 2 本鎖切断の認識または修復等に関与している可能性が考えられた。また、長鎖の発現時期が、レプトテン期の精母細胞が多い時期の精巣より開始することから、長鎖の TDRD12 が精母細胞の核内において重要な役割を担っている可能性が考えられた。これらのことから、精子形成過程において、TDRD12 がこれまでに報告されている、piRNA 合成関連の機能以外に、特に減数分裂過程に重要な機能を有している可能性が明らかとなった。

これまでに核および核膜の形態の維持が減数分裂の完了および精子形成の進行に必須であるという報告はなく、本研究で明らかとなった精母細胞における核および核膜の形態異常は、画期的な発見である可能性が考えられる。さらに、卵母細胞において MTOCs の局在に TMEM48 が関与している可能性も示唆され、TMEM48 が多くの機能を有していることが明らかとなった。MTOCs を構成する因子に関する研究は存在するものの、MTOCs の会合不全、局在異常が減数分裂の進行および受精、発生能に及ぼす影響に関する報告はなく、核膜孔構成因子の MTOCs への関与および MTOCs の局在が減数分裂の進行および発生に重要であることを示した本研究は極めて重要であると考えられる。また、酵母ツーハイブリッド法によるスクリーニングにより、精子形成に重要な役割を担っている可能性のあるタンパク質との相互作用も明らかとなり、今後の発展が期待される。配偶子形成における *Tmem48* および核膜孔複合体の機能はいまだ解明されていないため、*sk5* 突然変異マウスを用いて行った本研究は、配偶子形成メカニズムにおける核膜孔複合体の機能の解明に重要な知見を与えたと考えられる。また、Tudor ドメインを有するタンパク質ファミリーは、piRNA 合成を介したレトロトランスポゾンの発現抑制等に重要である場合が多く、研究が盛んにおこなわれているが、それ以外の機能については未知な部分が多い。また、そ

れらの中に TDRD12 のような局在パターンを示すタンパク質が存在しないことから、非常に興味深く、piRNA 合成を介したレトロトランスポゾンの発現抑制以外でも、精子形成に重要な機能を有している可能性が考えられる。そのため、本研究により得られた TDRD12 の局在は、以後の研究に大きな影響を与える重要な結果であると考えられる。

本研究では、配偶子形成に異常を呈する *sks* および *repro23* マウスの表現型とその原因遺伝子である *Tmem48* および *Tdrd12* の機能を解析することで、これら遺伝子の哺乳類の配偶子形成に関与する新たな機能を明らかとした点において重要であると考えられる。

謝辞

本研究を遂行するに当たり、多大な指導・助言を賜りました指導教官である岡山大学動物遺伝学研究室の国枝哲夫教授に謹んで感謝の意を表します。また、同様に貴重な助言を賜りました、独立行政法人農業生物資源研究所、野口純子氏および、岡山大学動物遺伝学研究室の辻岳人准教授、遺伝育種学研究室の揖斐隆之准教授にも、深く感謝します。

また、*Tdrd12* の発現解析をするにあたり、**TDRD12** に対する抗体を分与して頂いた EMBL の Dr. Pillai および京都大学の中馬新一郎准教授に感謝いたします。

最後に、私が学氏取得のために研究を行うに当たり、支援を惜しまず、温かく見守ってくれた両親に深い感謝の意を表します。

平成 26 年 3 月

参考文献

Ahmed EA, de Rooij DG.

Staging of mouse seminiferous tubule cross-sections.

Methods Mol Biol. 2009;558:263-77.

Akiyama K, Noguchi J, Hirose M, Kajita S, Katayama K, Khalaj M, Tsuji T, Fairfield H, Byers C, Reinholdt L, Ogura A, Kunieda T.

A mutation in the nuclear pore complex gene Tmem48 causes gametogenesis defects in skeletal fusions with sterility (sks) mice.

J Biol Chem. 2013 Sep 17.

Araki Y, Lau CK, Maekawa H, Jaspersen SL, Giddings TH Jr, Schiebel E, Winey M.

The *Saccharomyces cerevisiae* spindle pole body (SPB) component Nbp1p is required for SPB membrane insertion and interacts with the integral membrane proteins Ndc1p and Mps2p.

Mol Biol Cell. 2006 Apr;17(4):1959-1970.

Aravin AA, Hannon GJ, Brennecke J.

The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race.

Science. 2007 Nov 2;318(5851):761-764.

Armstrong SJ, Franklin FC, Jones GH.

Nucleolus-associated telomere clustering and pairing precede meiotic chromosome synapsis in *Arabidopsis thaliana*.

J Cell Sci. 2001 Dec;114(Pt 23):4207-4217.

Asano Y, Akiyama K, Tsuji T, Takahashi S, Noguchi J, Kunieda T.

Characterization and linkage mapping of an ENU-induced mutant mouse with defective spermatogenesis.

Exp Anim. 2009 Oct;58(5):525-532.

Aslanukov A, Bhowmick R, Guruju M, Oswald J, Raz D, Bush RA, Sieving PA, Lu X, Bock CB, Ferreira PA.

RanBP2 modulates Cox11 and hexokinase I activities and haploinsufficiency of RanBP2 causes deficits in glucose metabolism.

PLoS Genet. 2006 Oct;2(10):e177. Epub 2006 Sep 1.

Babu JR, Jeganathan KB, Baker DJ, Wu X, Kang-Decker N, van Deursen JM.
Rae1 is an essential mitotic checkpoint regulator that cooperates with Bub3 to prevent chromosome missegregation.
J Cell Biol. 2003 Feb 3;160(3):341-353.

Bao J, Wang L, Lei J, Hu Y, Liu Y, Shen H, Yan W, Xu C.
STK31(TDRD8) is dynamically regulated throughout mouse spermatogenesis and interacts with MIWI protein.
Histochem Cell Biol. 2012 Mar;137(3):377-389.

Bass HW, Marshall WF, Sedat JW, Agard DA, Cande WZ.
Telomeres cluster de novo before the initiation of synapsis: a three-dimensional spatial analysis of telomere positions before and during meiotic prophase.
J Cell Biol. 1997 Apr 7;137(1):5-18.

Bass HW, Riera-Lizarazu O, Ananiev EV, Bordoli SJ, Rines HW, Phillips RL, Sedat JW, Agard DA, Cande WZ.
Evidence for the coincident initiation of homolog pairing and synapsis during the telomere-clustering (bouquet) stage of meiotic prophase.
J Cell Sci. 2000 Mar;113 (Pt 6):1033-1042.

Bellvé AR, Cavicchia JC, Millette CF, O'Brien DA, Bhatnagar YM, Dym M.
Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization.
J Cell Biol. 1977 Jul;74(1):68-85.

Bellvé AR, Millette CF, Bhatnagar YM, O'Brien DA.
Dissociation of the mouse testis and characterization of isolated spermatogenic cells.
J Histochem Cytochem. 1977 Jul;25(7):480-494.

Berggård T, Linse S, James P.
Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions.
Proteomics. 2007 Aug;7(16):2833-2842.

Blanco-Rodríguez J.

gammaH2AX marks the main events of the spermatogenic process.
Microsc Res Tech. 2009 Nov;72(11):823-832.

BORUM K

Oogenesis in the mouse. A study of the meiotic prophase.
Exp Cell Res. 1961 Sep;24:495-507

Brohawn SG, Partridge JR, Whittle JR, Schwartz TU.
The nuclear pore complex has entered the atomic age.
Structure. 2009 Sep 9;17(9):1156-1168.

Brown CR, Kennedy CJ, Delmar VA, Forbes DJ, Silver PA.
Global histone acetylation induces functional genomic reorganization at mammalian nuclear pore complexes.
Genes Dev. 2008 Mar 1;22(5):627-639.

Capelson M, Liang Y, Schulte R, Mair W, Wagner U, Hetzer MW.
Chromatin-bound nuclear pore components regulate gene expression in higher eukaryotes.
Cell. 2010 Feb 5;140(3):372-383.

Carabatsos MJ, Combelles CM, Messinger SM, Albertini DF.
Sorting and reorganization of centrosomes during oocyte maturation in the mouse.
Microsc Res Tech. 2000 Jun 1;49(5):435-444.

Carlton PM, Cande WZ.

Telomeres act autonomously in maize to organize the meiotic bouquet from a semipolarized chromosome orientation.
J Cell Biol. 2002 Apr 15;157(2):231-242.

Casolari JM, Brown CR, Komili S, West J, Hieronymus H, Silver PA.
Genome-wide localization of the nuclear transport machinery couples transcriptional status and nuclear organization.
Cell. 2004 May 14;117(4):427-439.

Chatel G, Fahrenkrog B.

Nucleoporins: leaving the nuclear pore complex for a successful mitosis.

Cell Signal. 2011 Oct;23(10):1555-1562.

Chial HJ, Rout MP, Giddings TH, Winey M.

Saccharomyces cerevisiae Ndc1p is a shared component of nuclear pore complexes and spindle pole bodies.

J Cell Biol. 1998 Dec 28;143(7):1789-1800.

Chikashige Y, Ding DQ, Imai Y, Yamamoto M, Haraguchi T, Hiraoka Y.

Meiotic nuclear reorganization: switching the position of centromeres and telomeres in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*.

EMBO J. 1997 Jan 2;16(1):193-202.

Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, Bogdanove AJ, Voytas DF.

Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases.

Genetics. 2010 Oct;186(2):757-761.

Chuma S, Hosokawa M, Kitamura K, Kasai S, Fujioka M, Hiyoshi M, Takamune K, Noce T, Nakatsuji N.

Tdrd1/Mtr-1, a tudor-related gene, is essential for male germ-cell differentiation and nuage/germinal granule formation in mice.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Oct 24;103(43):15894-15899

Chuma S, Nakano T.

piRNA and spermatogenesis in mice.

Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2013 Jan 5;368(1609):20110338.

Courtois A, Schuh M, Ellenberg J, Hiiragi T.

The transition from meiotic to mitotic spindle assembly is gradual during early mammalian development.

J Cell Biol. 2012 Aug 6;198(3):357-370.

Cronshaw JM, Krutchinsky AN, Zhang W, Chait BT, Matunis MJ.

Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex.

J Cell Biol. 2002 Sep 2;158(5):915-927.

D'Angelo MA, Hetzer MW.

Structure, dynamics and function of nuclear pore complexes.

Trends Cell Biol. 2008 Oct;18(10):456-466.

Dawlaty MM, Malureanu L, Jeganathan KB, Kao E, Sustmann C, Tahk S, Shuai K, Grosschedl R, van Deursen JM.

Resolution of sister centromeres requires RanBP2-mediated SUMOylation of topoisomerase IIalpha.

Cell. 2008 Apr 4;133(1):103-115.

de Boer E, Lhuissier FG, Heyting C.

Cytological analysis of interference in mouse meiosis.

Methods Mol Biol. 2009;558:355-382.

Ding X, Xu R, Yu J, Xu T, Zhuang Y, Han M.

SUN1 is required for telomere attachment to nuclear envelope and gametogenesis in mice.

Dev Cell. 2007 Jun;12(6):863-872.

Elad N, Maimon T, Frenkiel-Krispin D, Lim RY, Medalia O.

Structural analysis of the nuclear pore complex by integrated approaches.

Curr Opin Struct Biol. 2009 Apr;19(2):226-232.

Faria AM, Levay A, Wang Y, Kamphorst AO, Rosa ML, Nussenzveig DR, Balkan W, Chook YM, Levy DE, Fontoura BM.

The nucleoporin Nup96 is required for proper expression of interferon-regulated proteins and functions.

Immunity. 2006 Mar;24(3):295-304.

Fields S, Song O.

A novel genetic system to detect protein-protein interactions.

Nature. 1989 Jul 20;340(6230):245-246.

Grey C, Baudat F, de Massy B.

Genome-wide control of the distribution of meiotic recombination.

PLoS Biol. 2009 Feb 17;7(2):e35.

Gueth-Hallonet C, Antony C, Aghion J, Santa-Maria A, Lajoie-Mazenc I, Wright M, Maro B.
gamma-Tubulin is present in acentriolar MTOCs during early mouse development.
J Cell Sci. 1993 May;105 (Pt 1):157-166.

Handel MA, Lane PW, Schroeder AC, Davisson MT.
New mutation causing sterility in the mouse.
Gamete Res. 1988 Dec;21(4):409-423.

Handler D, Olivieri D, Novatchkova M, Gruber FS, Meixner K, Mechtler K, Stark A,
Sachidanandam R, Brennecke J.
A systematic analysis of Drosophila TUDOR domain-containing proteins identifies Vreteno
and the Tdrd12 family as essential primary piRNA pathway factors.
EMBO J. 2011 Aug 23;30(19):3977-3993.

Imamoto N.
Diversity in nucleocytoplasmic transport pathways.
Cell Struct Funct. 2000 Aug;25(4):207-216.

Johnston M.
A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*.
Microbiol Rev. 1987 Dec;51(4):458-476.

Kalverda B, Pickersgill H, Shloma VV, Fornerod M.
Nucleoporins directly stimulate expression of developmental and cell-cycle genes inside the
nucleoplasm.
Cell. 2010 Feb 5;140(3):360-371.

Keegan L, Gill G, Ptashne M.
Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic
regulatory protein.
Science. 1986 Feb 14;231(4739):699-704.

Kimura M, Ishida K, Kashiwabara S, Baba T.
Characterization of two cytoplasmic poly(A)-binding proteins, PABPC1 and PABPC2, in
mouse spermatogenic cells.
Biol Reprod. 2009 Mar;80(3):545-554.

Kind B, Koehler K, Lorenz M, Huebner A.

The nuclear pore complex protein ALADIN is anchored via NDC1 but not via POM121 and GP210 in the nuclear envelope.

Biochem Biophys Res Commun. 2009 Dec 11;390(2):205-210.

Kipling D, Cooke HJ.

Hypervariable ultra-long telomeres in mice.

Nature. 1990 Sep 27;347(6291):400-402.

Lau CK, Delmar VA, Forbes DJ.

Topology of yeast Ndc1p: predictions for the human NDC1/NET3 homologue.

Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol. 2006 Jul;288(7):681-694.

Lau CK, Giddings TH Jr, Winey M.

A novel allele of *Saccharomyces cerevisiae* NDC1 reveals a potential role for the spindle pole body component Ndc1p in nuclear pore assembly.

Eukaryot Cell. 2004 Apr;3(2):447-458.

Liebe B, Petukhova G, Barchi M, Bellani M, Braselmann H, Nakano T, Pandita TK, Jasin M, Fornace A, Meistrich ML, Baarends WM, Schimenti J, de Lange T, Keeney S, Camerini-Otero RD, Scherthan H.

Mutations that affect meiosis in male mice influence the dynamics of the mid-preleptotene and bouquet stages.

Exp Cell Res. 2006 Nov 15;312(19):3768-3781.

Lupu F, Alves A, Anderson K, Doye V, Lacy E.

Nuclear pore composition regulates neural stem/progenitor cell differentiation in the mouse embryo.

Dev Cell. 2008 Jun;14(6):831-842.

Ma J, Ptashne M.

A new class of yeast transcriptional activators.

Cell. 1987 Oct 9;51(1):113-119.

Macara IG.

Transport into and out of the nucleus.

Microbiol Mol Biol Rev. 2001 Dec;65(4):570-594

Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM.

RNA-guided human genome engineering via Cas9.

Science. 2013 Feb 15;339(6121):823-826.

Mansfeld J, Güttinger S, Hawryluk-Gara LA, Panté N, Mall M, Galy V, Haselmann U, Mühlhäusser P, Wozniak RW, Mattaj JW, Kutay U, Antonin W.

The conserved transmembrane nucleoporin NDC1 is required for nuclear pore complex assembly in vertebrate cells.

Mol Cell. 2006 Apr 7;22(1):93-103.

Maro B, Howlett SK, Webb M.

Non-spindle microtubule organizing centers in metaphase II-arrested mouse oocytes.

J Cell Biol. 1985 Nov;101(5 Pt 1):1665-1672.

Messinger SM, Albertini DF.

Centrosome and microtubule dynamics during meiotic progression in the mouse oocyte.

J Cell Sci. 1991 Oct;100 (Pt 2):289-298.

Moens PB, Pearlman RE, Heng HH, Traut W.

Chromosome cores and chromatin at meiotic prophase.

Curr Top Dev Biol. 1998;37:241-262.

Moens PB.

The fine structure of meiotic chromosome pairing in the triploid, *Lilium tigrinum*.

J Cell Biol. 1969 Jan;40(1):273-279.

Morimoto A, Shibuya H, Zhu X, Kim J, Ishiguro K, Han M, Watanabe Y.

A conserved KASH domain protein associates with telomeres, SUN1, and dynactin during mammalian meiosis.

J Cell Biol. 2012 Jul 23;198(2):165-172.

Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff RL, Wu JR.

A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 Sep;85(18):6622-6626.

Nakamura M, Masuda H, Horii J, Kuma K, Yokoyama N, Ohba T, Nishitani H, Miyata T, Tanaka M, Nishimoto T.

When overexpressed, a novel centrosomal protein, RanBPM, causes ectopic microtubule nucleation similar to gamma-tubulin.

J Cell Biol. 1998 Nov 16;143(4):1041-1052.

OAKBERG EF.

A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal.

Am J Anat. 1956 Nov;99(3):391-413.

Okita K, Kiyonari H, Nobuhisa I, Kimura N, Aizawa S, Taga T.

Targeted disruption of the mouse ELYS gene results in embryonic death at peri-implantation development.

Genes Cells. 2004 Nov;9(11):1083-1091.

Onischenko E, Stanton LH, Madrid AS, Kieselbach T, Weis K.

Role of the Ndc1 interaction network in yeast nuclear pore complex assembly and maintenance.

J Cell Biol. 2009 May 4;185(3):475-491.

Pandey RR, Tokuzawa Y, Yang Z, Hayashi E, Ichisaka T, Kajita S, Asano Y, Kunieda T, Sachidanandam R, Chuma S, Yamanaka S, Pillai RS.

Tudor domain containing 12 (TDRD12) is essential for secondary PIWI interacting RNA biogenesis in mice.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Oct 8;110(41):16492-16497.

Peters AH, Plug AW, van Vugt MJ, de Boer P.

A drying-down technique for the spreading of mammalian meiocytes from the male and female germline.

Chromosome Res. 1997 Feb;5(1):66-68.

Pfeifer C, Scherthan H, Thomsen PD.

Sex-specific telomere redistribution and synapsis initiation in cattle oogenesis.

Dev Biol. 2003 Mar 15;255(2):206-215.

Pfeifer C, Thomsen PD, Scherthan H.

Centromere and telomere redistribution precedes homologue pairing and terminal synapsis initiation during prophase I of cattle spermatogenesis.

Cytogenet Cell Genet. 2001;93(3-4):304-314.

Pillai RS, Chuma S.

piRNAs and their involvement in male germline development in mice.

Dev Growth Differ. 2012 Jan;54(1):78-92.

Rout MP, Aitchison JD, Suprpto A, Hjertaas K, Zhao Y, Chait BT.

The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism.

J Cell Biol. 2000 Feb 21;148(4):635-651.

Russell L, Ettl R, Sinha Hikim A, Clegg E.

Histological and Histopathological Evaluation of the Testis.

Cache River Press, 1990

Saxe JP, Chen M, Zhao H, Lin H.

Tdrkh is essential for spermatogenesis and participates in primary piRNA biogenesis in the germline.

EMBO J. 2013 Jul 3;32(13):1869-1885.

Scherthan H, Eils R, Trelles-Sticken E, Dietzel S, Cremer T, Walt H, Jauch A.

Aspects of three-dimensional chromosome reorganization during the onset of human male meiotic prophase.

J Cell Sci. 1998 Aug;111 (Pt 16):2337-2351.

Scherthan H, Schönborn I.

Asynchronous chromosome pairing in male meiosis of the rat (*Rattus norvegicus*).

Chromosome Res. 2001;9(4):273-282.

Scherthan H, Weich S, Schwegler H, Heyting C, Härle M, Cremer T.

Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing.

J Cell Biol. 1996 Sep;134(5):1109-1125.

Scherthan H.

Telomere attachment and clustering during meiosis.

Cell Mol Life Sci. 2007 Jan;64(2):117-124.

Scherthan H.

Knockout mice provide novel insights into meiotic chromosome and telomere dynamics.

Cytogenet Genome Res. 2003;103(3-4):235-244.

Scherthan H.

Analysis of telomere dynamics in mouse spermatogenesis.

Methods Mol Biol. 2009;558:383-399.

Schmitt J, Benavente R, Hodzic D, Höög C, Stewart CL, Alsheimer M.

Transmembrane protein Sun2 is involved in tethering mammalian meiotic telomeres to the nuclear envelope.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 May 1;104(18):7426-7431.

Schuh M, Ellenberg J.

Self-organization of MTOCs replaces centrosome function during acentrosomal spindle assembly in live mouse oocytes.

Cell. 2007 Aug 10;130(3):484-498.

Shoji M, Tanaka T, Hosokawa M, Reuter M, Stark A, Kato Y, Kondoh G, Okawa K, Chujo T, Suzuki T, Hata K, Martin SL, Noce T, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Sasaki H, Pillai RS, Nakatsuji N, Chuma S.

The TDRD9-MIWI2 complex is essential for piRNA-mediated retrotransposon silencing in the mouse male germline.

Dev Cell. 2009 Dec;17(6):775-787.

Smitherman M, Lee K, Swanger J, Kapur R, Clurman BE.

Characterization and targeted disruption of murine Nup50, a p27(Kip1)-interacting component of the nuclear pore complex.

Mol Cell Biol. 2000 Aug;20(15):5631-5642.

Speed RM.

Meiosis in the foetal mouse ovary. I. An analysis at the light microscope level using surface-spreading.

Chromosoma. 1982;85(3):427-437.

Stavru F, Hülsmann BB, Spang A, Hartmann E, Cordes VC, Görlich D.

NDC1: a crucial membrane-integral nucleoporin of metazoan nuclear pore complexes.

J Cell Biol. 2006 May 22;173(4):509-519.

Sun X, Zhang H, Wang D, Ma D, Shen Y, Shang Y.

DLP, a novel Dim1 family protein implicated in pre-mRNA splicing and cell cycle progression.

J Biol Chem. 2004 Jul 30;279(31):32839-32847.

Szollosi D, Calarco P, Donahue RP.

Absence of centrioles in the first and second meiotic spindles of mouse oocytes.

J Cell Sci. 1972 Sep;11(2):521-541.

Tanaka T, Hosokawa M, Vagin VV, Reuter M, Hayashi E, Mochizuki AL, Kitamura K, Yamanaka H, Kondoh G, Okawa K, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Sachidanandam R, Hannon GJ, Pillai RS, Nakatsuji N, Chuma S.

Tudor domain containing 7 (Tdrd7) is essential for dynamic ribonucleoprotein (RNP) remodeling of chromatoid bodies during spermatogenesis.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jun 28;108(26):10579-10584.

Tanemura K, Ogura A, Cheong C, Gotoh H, Matsumoto K, Sato E, Hayashi Y, Lee HW, Kondo T.

Dynamic rearrangement of telomeres during spermatogenesis in mice.

Dev Biol. 2005 May 15;281(2):196-207.

Terry LJ, Wente SR.

Flexible gates: dynamic topologies and functions for FG nucleoporins in nucleocytoplasmic transport.

Eukaryot Cell. 2009 Dec;8(12):1814-1827.

Thomas JH, Botstein D.

A gene required for the separation of chromosomes on the spindle apparatus in yeast.

Cell. 1986 Jan 17;44(1):65-76.

Tomita K, Cooper JP.

The telomere bouquet controls the meiotic spindle.

Cell. 2007 Jul 13;130(1):113-126.

Trelles-Sticken E, Dresser ME, Scherthan H.

Meiotic telomere protein Ndj1p is required for meiosis-specific telomere distribution, bouquet formation and efficient homologue pairing.

J Cell Biol. 2000 Oct 2;151(1):95-106.

Trelles-Sticken E, Loidl J, Scherthan H.

Bouquet formation in budding yeast: initiation of recombination is not required for meiotic telomere clustering.

J Cell Sci. 1999 Mar;112 (Pt 5):651-658.

van Deursen J, Boer J, Kasper L, Grosveld G.

G2 arrest and impaired nucleocytoplasmic transport in mouse embryos lacking the proto-oncogene CAN/Nup214.

EMBO J. 1996 Oct 15;15(20):5574-5583.

Vaquerizas JM, Suyama R, Kind J, Miura K, Luscombe NM, Akhtar A.

Nuclear pore proteins nup153 and megator define transcriptionally active regions in the Drosophila genome.

PLoS Genet. 2010 Feb 12;6(2):e1000846.

West RR, Vaisberg EV, Ding R, Nurse P, McIntosh JR.

cut11(+): A gene required for cell cycle-dependent spindle pole body anchoring in the nuclear envelope and bipolar spindle formation in *Schizosaccharomyces pombe*.

Mol Biol Cell. 1998 Oct;9(10):2839-2855.

Winey M, Hoyt MA, Chan C, Goetsch L, Botstein D, Byers B.

NDC1: a nuclear periphery component required for yeast spindle pole body duplication.

J Cell Biol. 1993 Aug;122(4):743-751.

Wu X, Kasper LH, Mantcheva RT, Mantchev GT, Springett MJ, van Deursen JM.
Disruption of the FG nucleoporin NUP98 causes selective changes in nuclear pore complex stoichiometry and function.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Mar 13;98(6):3191-3196.

Yabuta Y, Ohta H, Abe T, Kurimoto K, Chuma S, Saitou M.
TDRD5 is required for retrotransposon silencing, chromatoid body assembly, and spermiogenesis in mice.
J Cell Biol. 2011 Mar 7;192(5):781-795.

Yamazumi Y, Kamiya A, Nishida A, Nishihara A, Iemura S, Natsume T, Akiyama T.
The transmembrane nucleoporin NDC1 is required for targeting of ALADIN to nuclear pore complexes.
Biochem Biophys Res Commun. 2009 Nov 6;389(1):100-104.

Zhang X, Chen S, Yoo S, Chakrabarti S, Zhang T, Ke T, Oberti C, Yong SL, Fang F, Li L, de la Fuente R, Wang L, Chen Q, Wang QK.
Mutation in nuclear pore component NUP155 leads to atrial fibrillation and early sudden cardiac death.
Cell. 2008 Dec 12;135(6):1017-1027.