

東京農業大学

博士論文

レトロトランスポゾンが雌雄生殖細胞の
機能に及ぼす影響

令和3年度 修了

農学研究科バイオサイエンス専攻

池田 晋也

令和3年度

レトロトランスポゾンが雌雄生殖細胞の
機能に及ぼす影響

バイオサイエンス専攻

池田 晋也

レトロトランスポゾンが雌雄生殖細胞の
機能に及ぼす影響

東京農業大学大学院農学研究科

バイオサイエンス専攻

令和3年度 博士後期課程修了

池田 晋也

指導教授 尾畑 やよい

目次

第一章 序論	3
付表および図説	
第二章 <i>Asz1</i> 欠損マウスの表現型解析	
第一節 緒言	8
第二節 材料及び方法	10
第三節 結果	14
第四節 考察	17
付表および図説	
第三章 レトロトランスポゾンの活性化が前精原細胞の遺伝子発現に及ぼす影響	
第一節 緒言	19
第二節 材料及び方法	21
第三節 結果	27
第四節 考察	31
付表および図説	
第四章 初期卵母細胞におけるレトロトランスポゾン制御機構の解析	
第一節 緒言	35
第二節 材料及び方法	37
第三節 結果	40
第四節 考察	42

付表および図説

第七章 総合考察	44
第八章 総括	48
Summary	55
謝辞	61
参考文献	62

第一章 序論

有性生殖を行う生物にとって配偶子ゲノムの恒常性は、次世代個体へ正確に遺伝情報を伝達するために非常に重要であると考えられる。その一方で哺乳類のゲノムの大部分は自身の変異原となりうる配列因子であるレトロトランスポゾンが占めている。哺乳類のゲノムに含まれるレトロトランスポゾンは主に long interspersed nuclear element (LINE) 型、short interspersed nuclear element (SINE) 型、long terminal repeat (LTR) 型の 3 種に分けられる (図 1-1) [1]。LINE 型レトロトランスポゾンは自身のコードする 2 種類のタンパク質を利用して転移する自律型のレトロトランスポゾンである。LINE 型レトロトランスポゾンで代表的な LINE1 は長さが約 6-7 kb であり、マウスゲノムの 19.2%を占める。SINE 型レトロトランスポゾンは転移に LINE1 のコードする逆転写酵素が必要な非自律型のレトロトランスポゾンであり、マウスゲノムの 8.2%を占める [1, 2]。マウスで主要な SINE は B1 であり、長さは~140 bp ほどである。LTR 型レトロトランスポゾンは endogenous retrovirus (ERV) と呼ばれ、一般的には自律した転移に必要な gag、pol、pro 等のタンパク質をコードするが、中には非自律的なものも存在する。LTR は ERV1、ERVK (Dfam [https://dfam.org/home] では ERV2 に分類される)、ERVJ (Dfam では ERV3 に分類される) や MaLR (Dfam では ERV3 に含まれる) などのファミリーを含んでおり、マウスゲノムの 9.8%を占める。これらはいずれも転移時の DNA 切断や転移による新たなコピーの挿入などによりゲノムに変異をもたらす得るため、通常は DNA のメチル化等により抑制される [3]。しかしながら、初期胚や生殖細胞などの未分化な細胞やエピゲノム修飾のリプログラミングが行われる細胞においてはレトロトランスポゾンの活性化が起こることが知られている [4, 5]。

マウスにおいて雌雄の配偶子は始原生殖細胞 (Primordial Germ Cells; PGCs) を起源とする。胎齢 7.25 日 (Embryonic day 7.25; E7.25) にエピブラストを構成する体細胞から分離して尿膜基底部に出現した PGCs はその後、体細胞分裂を繰り返しながら胎齢 10.5 日ごろに生殖隆起へと移動し定着する [6]。生殖隆起へと定着した PGCs は体細胞の性に従って性分化し、胎齢 13.5 日までに雌雄生殖細胞特異的な遺伝子発現動態やエピジェネティック修飾を確立する (図 1-2) [7-9]。この一連の過程において PGCs ではインプリント制御領域やレトロトランスポゾンを含む体細胞型の DNA メチル化パターンの消去やヒストン修飾のリモデリングが行われる [10]。その結果、生殖細胞のゲノムはレトロトランスポゾンの潜在的な脅威にさらされることとなるが、雄性生殖系列においては Piwi-interacting RNAs (piRNAs) と呼ばれる小分子 RNA を利用してレトロトランスポゾンの DNA を効率的に再メチル化する仕組みが存在する [1, 11]。

雄性生殖系列における、piRNA 経路によるレトロトランスポゾンの DNA 再メチル化は胎仔期の前精原細胞において起こる (図 1-3)。piRNA 経路は、intermitochondrial cement および pi-P-body と呼ばれる生殖細胞の細胞質に存在する特徴的な区画に存在するタンパク質が共役することで機能する [12]。piRNA の産生にあたり、piRNA クラスターから転写されたレトロトランスポゾンの配列を含む一本鎖 RNA が、MitoPLD の関与により 5'末端側の切断を受けたのちに piwi-like RNA-mediated gene silencing 2 (MILI/PIWIL2) により捕捉される [11, 13, 14]。MILI に取り込まれた piRNA 前駆体はその後 poly(A)-specific ribonuclease-like domain-containing 1 (PNLDC1) により 3'末端側の切断を受けて primary piRNA へと成熟する [15]。MILI-primary piRNA 複合体は piRNA をガイドに相補的なレトロトランスポゾンを標的とし、MILI の持つスライサー活性により標的 RNA を切断する [16]。切断された標的 RNA は MILI に捕捉され、5'末端および 3'末

端のトリミングをうけることで secondary piRNA となる。MILI-secondary piRNA 複合体は再び piRNA をガイドに標的転写産物の切断を行い、primary piRNA の資材を提供する。この効率的にレトロトランスポゾン転写産物の分解と piRNA の増幅を行うモデルはピンポンサイクルと呼ばれている [11]。ピンポンサイクルにより産生された piRNA の亜集団は Gametocyte Specific Factor 1 (GTSF1) や DEAD-box helicase 4 (DDX4/MVH) の関与により piwi-like RNA-mediated gene silencing 4 (MIWI2/PIWIL4) へとロードされる [17, 18]。MIWI2 は piRNA 依存的に細胞質から核内へと移行し、piRNA をガイドに転写されたばかりの RNA を捕捉し、その後 DNA メチル化を導入する複合体をリクルートすることでレトロトランスポゾンの DNA メチル化を達成すると考えられる (図 1-3) [19, 20]。

piRNA 経路を構成する遺伝子の欠損はレトロトランスポゾンの発現上昇を伴う、第一減数分裂前期での精子形成停止を引き起こすことが知られている。特にレトロトランスポゾンの DNA メチル化に関与する MIWI2 は、雄性生殖系列において胎仔期から新生仔期の限られた期間の前精原細胞で機能し、精母細胞では発現しないことが知られているにもかかわらず、MIWI2 の欠損は一次精母細胞で精子形成の停止を引き起こす。そのため、胎仔期における piRNA 経路を介したレトロトランスポゾンの抑制が精子形成に必須の役割を持つことが伺える [21]。これまでに piRNA 産生に関連する様々な遺伝子の欠損体が作出され、欠損体の精子形成における表現型や piRNA 産生における役割が明らかにされてきた [22]。その一方で、piRNA 経路の欠損がもたらすレトロトランスポゾンの活性化が雄性生殖細胞そのものに与える影響に関してはこれまでに十分な解析がなされておらず、中でも前精原細胞についての研究は進んでいない。

これは胎仔期の piRNA 経路を欠損しても出生前後の精巣において精巣の萎縮や大規模な細胞死等が起こらないことや、精巣において前精原細胞が占める割

合は極めて小さく分子生物学的解析が困難なためと考えられる [21,23]。しかしながら前精原細胞は、雄性個体において生涯に渡って精子形成を支える精原幹細胞の唯一の供給源であり、その品質は配偶子の恒常性に非常に重要であると考えられる [24]。よって、piRNA 経路の破綻によるレトロトランスポゾンの活性化が前精原細胞にどのような影響を及ぼし、後に精子形成不全に至らしめるのか理解する生物学的意義は大きい。

一方で卵子形成過程におけるレトロトランスポゾン制御に関しては雄性生殖系列と大きく異なる。卵母細胞においても piRNA 経路の存在はこれまでに報告されており、piRNA 経路関連遺伝子の欠損はレトロトランスポゾンの発現上昇を引き起こすが、雌個体では妊孕性を損なわないことが報告されている[25]。雌性生殖系列においては piRNA による DNA メチル化を介したレトロトランスポゾンの抑制機構が働いていないことが報告されており、さらに前精原細胞と同時期の雌性生殖細胞にあたる新生仔の非成長期卵母細胞では DNA メチル化酵素 (DNA methyltransferase; DNMT) である DNMT3A や DNMT3L が発現していないことが知られる [26, 27]。piRNA 経路によるレトロトランスポゾンの DNA メチル化機構が存在しないことを鑑みると、そもそも卵子形成過程におけるレトロトランスポゾン抑制は、piRNA 経路への依存度は低い可能性が示唆される。また、卵母細胞はレトロトランスポゾンの発現に対して耐性があるのではないかと考えられている。実際に、胎仔期の卵母細胞では、同時期の前精原細胞では抑制が開始される LINE1 の発現が報告されている [28]。これらのことから、雌性生殖系列においては、前精原細胞では piRNA 経路により抑制されるレトロトランスポゾンの活性化が許容されている可能性が考えられる。あるいは DNA メチル化に依存しない、レトロトランスポゾンを抑制する別の機構が存在する可能性が示唆される。

そこで本研究ではまず第一に、レトロトランスポゾンの活性化が初期の雄性生殖細胞の機能に及ぼす影響を解明することを目的とし、piRNA 経路のマスターレギュレーターである ankyrin repeats, SAM, and basic leucine zipper domain-containing 1 (*Asz1*) 遺伝子の欠損マウスを解析することとした。第二に、DNA メチル化に依存的なレトロトランスポゾンの抑制機構が存在しない初期雌性生殖系列において、レトロトランスポゾンが *Asz1* 欠損マウスの前精原細胞と同様に活性化し、機能しているかを検証することとした。レトロトランスポゾンが抑制されているのか、あるいは活性化しているのかを明らかにし、レトロトランスポゾンが雌性生殖細胞の発生に影響しうるか否かを考察することとした。

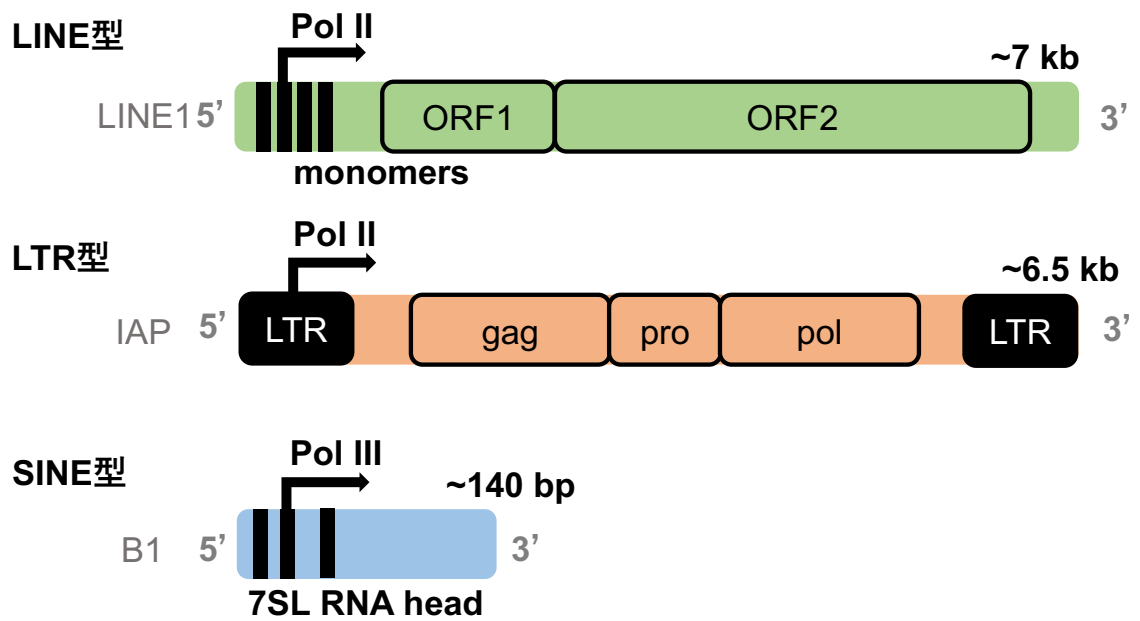


図1-1 マウスゲノムにおけるレトロトランスポゾンの種類

マウスゲノムに存在する3種のレトロトランスポゾンのファミリーと、それぞれを代表とするレトロトランスポゾンを図示した。

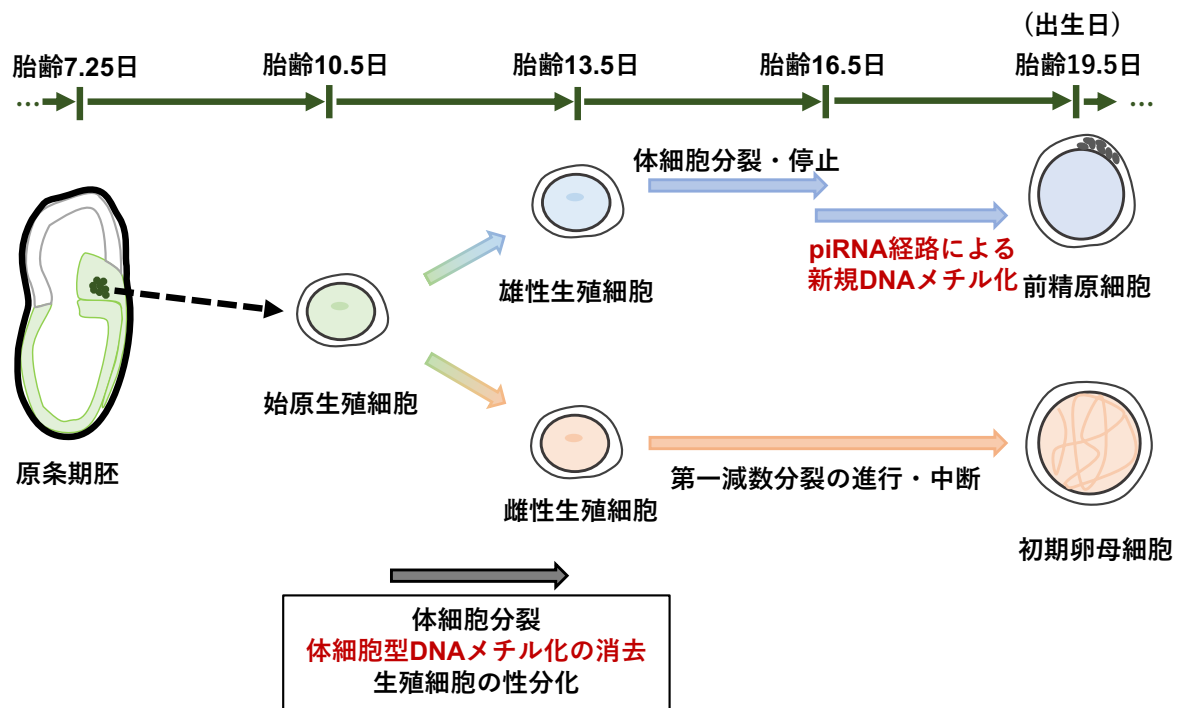


図1-2 雌雄生殖細胞の分化

初期雌雄生殖細胞の形成過程を図示した。胎齢7.25日に出現した始原生殖細胞は体細胞分裂を繰り返しながら生殖腺へと移動し、胎齢10.5日には定着する。その後始原生殖細胞は体細胞分裂を繰り返しながらゲノムワイドなDNA脱メチル化を行う。胎齢13.5日においてはすでに始原生殖細胞は雌雄生殖細胞へと分化しており、その後、雌雄配偶子の形成が進行する。

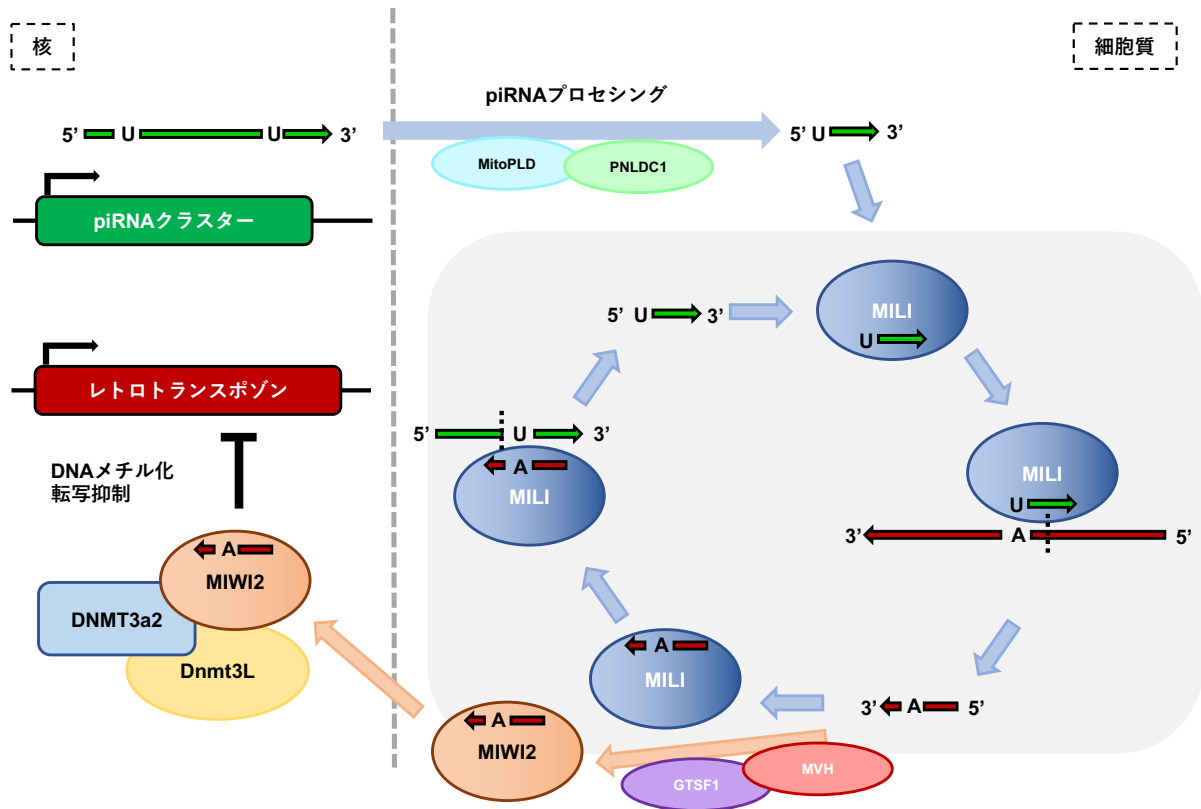


図1-3 前精原細胞におけるpiRNA機構の仕組み

piRNAクラスターから転写された一本鎖RNAはMILIにロードされてpiRNAへとプロセッシングされる。MILIはpiRNAをガイドに相補的なRNAを切断するが、この際、切断を受けたRNAから再度piRNAが産生される。産生されたpiRNAの垂集団はMIWI2へとロードされる。MIWI2は核内以降後、piRNAをガイドにレトロトランスポゾンのDNAメチル化を行う。

第二章 *Asz1* 欠損マウスの表現型解析

第一節 緒言

マウスの精子形成における piRNA 経路の仕組みや機能を明らかにするために、これまでに様々な遺伝子欠損マウスが用いられてきた。本研究においては piRNA 経路の欠損によるレトロトランスポゾンの活性化が前精原細胞に与える影響を明らかにするために、*Asz1* 欠損マウスを piRNA 機構の欠損のモデルマウスとして供試することとした [29]。

Asz1 の欠損は前精原細胞における MILI の著しい発現低下を伴うレトロトランスポゾンの発現上昇と、piRNA 産生不全を伴う第二減数分裂前での精子形成の停止を引き起こすことが知られている [30, 31]。ASZ1 (GASZ) 自身は piRNA のプロセッシングには関与していないものの piRNA 産生を司る MILI の安定化に必須であると考えられている。これには ASZ の C 末端に存在するミトコンドリア局在シグナルが重要であり、ASZ1 は intermitochondrial cement の足場を提供することで piRNA 産生を支えていると考えられている。

これまでに *Asz1* 欠損マウスの雌雄生殖細胞における表現型は詳細な報告がなされている。*Asz1* の欠損は雌マウスの妊孕性は損なわない一方で、雄マウスでは、レトロトランスポゾンの発現上昇を伴う第二減数分裂前での精子形成の停止を引き起こす [25, 31]。しかしながら、*Asz1* 欠損マウスを用いてレトロトランスポゾンの活性化が前精原細胞に与える影響を解析するにあたり第一減数分裂の停止時期をより詳細に明らかにする必要があった。これは piRNA 産生のどの段階に関与する因子の機能が喪失しているかにより、レトロトランスポゾンの活性化の程度が異なる可能性があるからである。例えば、piRNA 産生の過程に

において piRNA の 3'末端側のトリミングに関与する *Pnlcd1* 欠損マウスの胎仔精巣においては通常よりも長い 24 – 50 nt の piRNA が産生されるようになるものの、*Mili* 欠損マウスのように piRNA の大部分が消失することはない [15]。産生された通常よりも長い piRNA の集団のうち適切な長さの piRNA が機能するためか、*Pnlcd1* の欠損マウスでは *Mili* 欠損マウスの前精原細胞のように MIWI2 の核内局在が完全に消失することはない、レトロトランスポゾンの DNA メチル化レベルの低下も限定的である。その結果、*Pnlcd1* 欠損マウスでは *Mili* や *Miwi2* の欠損マウスに比べると精子形成障害の表現型は穏やかであり、精原細胞は第一減数分裂を終えた半数体の伸長精子細胞まで分化することが示されている。また、MIWI2 の核内での活動を補助する TDRD9 の欠損は、IAP と LINE1 の脱抑制を引き起こす MIWI2 欠損とは異なり、LINE1 の活性化のみが認められ、IAP 活性化は起こらないことが報告されている。*Tdrd9* の欠損マウスでは MIWI2 の欠損マウスでは確認されないパキテン期に相当する精母細胞が出現する [32]。

以上のように piRNA 因子を欠損した生殖細胞の表現型には因子ごとに差異が存在する可能性がある。そこで本章では *Asz1* 欠損マウスの表現型をより詳細に明らかにすることを目的とした。

第二節 材料および方法

1. 供試動物

すべての動物は東京農業大学 15 号館 1 階のコンベンショナル動物室で飼育された。飼料および飲水は不断給餌で行い、明暗周期は午前 8 時点灯、午後 8 時消灯の 12 時間周期で飼育した。すべての実験は東京農業大学動物実験委員会の定める実験動物の取り扱いに関する指針に従い行った (承認番号 300054)。サンプル収集の際には動物への苦痛を最低限のものとするための最大限の努力の元、実験動物の安楽死が行われた。

マウスの交配は発情期の雌マウスを 17 時から 20 時の間に雄マウスのケージに移して一晩同居させることで行われ、膣栓の確認は翌日の朝になされた。膣栓確認日の正午を E0.5 と定めた。また、マウスが出生した次の日を出生後 1 日齢 (1 day post partum; 1dpp) とした。

本研究には *Asz1* 遺伝子欠損マウス (C57BL/6 マウスバックグラウンド) を供試した。*Asz1* 欠損マウスの作出は広島大学自然科学研究支援開発センターの外丸祐介教授と神田暁史研究員の協力により行われた。C57BL/6 マウス由来 ES (embryonic stem) 細胞に対して *Asz1* 遺伝子の 1 番エキソンから 2 番エキソンを標的とするターゲティングベクターが導入された。得られた *Asz1* 欠損 ES 細胞を ICR マウス由来初期胚に注入し、胚を仮親に移植することで雄のキメラマウスが作出された。得られた雄のキメラマウスを C57BL/6 の雌マウスと交配させることで *Asz1* ヘテロ欠損マウス (*Asz1*^{+/-}) が作出された。得られた *Asz1*^{+/-} マウスは C57BL/6 マウスと交配させることで *Asz1*^{+/-} マウスとして維持された。*Asz1* ホモ欠損マウス (*Asz1*^{-/-}) は *Asz1*^{+/-} マウス同士を交配させることで作出された。C57BL/6N マウスは日本クレアより購入して実験に供試した。

2. ウェスタンブロットによる精巢の ASZ1 タンパク質の検出

ウェスタンブロットによる精巢における ASZ1 の発現解析は東京農業大学動物発生工学研究室の田中康貴氏と共同で行った。安楽死後の 3 週齢のマウスより精巢を摘出し、2 × sample buffer (380 mM Tris-HCl [pH 6.8], 4% SDS, and 20% glycerol) 中でガラスビーズにより破碎した。タンパク質溶液の濃度を Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて SpectraMax i3 Multimode Microplate Reader (Molecular Devices) にて計測後、4 × loading buffer (250 mM Tris-HCl [pH 6.8], 8% SDS, 40% glycerol, 10% β-mercaptoethanol, and 0.05% bromophenol blue) で 1 μg/μl になるように希釈した。得られたタンパク質溶液を 95°C で 7 分間熱処理を行なった。

タンパク質溶液 20 μl に対して 10% Running Gel および 4% Stacking Gel を用いて 150V で 90 分間 SDS-PAGE を行い、さらにタンパク質を PVDF メンブレンへ 100V で 60 分かけて転写した。転写後のメンブレンを 5% skim milk in TBST で 1 時間振とうしてブロッキングを行った後、1% skim milk in TBST で希釈した一次抗体溶液中にて 4°C で一晩振とうした。TBST に希釈した二次抗体溶液中にて 1 時間振とう後、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Cytiva) で 5 分間処理し、LAS-3000 (FujiFilm) で撮影を行なった。使用した抗体および希釈率は表 2-1 に示した。

3. *Asz1* 欠損マウス精巢の HE 染色による解析

Asz1 欠損マウス精巢の表現型解析は東京農業大学動物発生工学研究室の蓮沼智也氏と共同で行った。安楽死後の 6 週齢のマウスより精巢を摘出して 1 × PBS (-) で洗浄後、4% paraformaldehyde (PFA) in PBS へ移して一晩固定した。その後、10、15、20 および 30% sucrose in PBS でそれぞれ一晩ずつ凍結防護処理を行なっ

た。OCT Compound (Sakura Finetek) で包埋し液体窒素で凍結後、凍結切片で 9 μm 厚の凍結切片を作製した。

作製した凍結切片を 1 \times PBS (-) で洗浄後、ヘマトキシリンで 5 秒間染色後エタノール置換した。エオシンで 3 分間染色後にエタノールで洗浄し、キシレンで置換してカナダバルサムで封入した。切片の観察は BZX-710 (KEYENCE) で行なった。

4. シナプトネマ複合体の観察

Meiotic chromosome spreads は過去の報告を参考に、3 週齢の精巣に対して行なった [33]。安楽死後の雄マウスから精巣を摘出後、白膜と精巣上体の除去を行なった。ピンセットで精細管をほぐし、適量の精巣片を hypotonic extraction buffer 350 μl へ移して氷上にて 1 時間静置した。その後、精細管をガラスボトムディッシュ上の 100 mM sucrose (pH 8.0) 40 μl のドロップへ移し、メスとピンセットで組織片化した。ピペッティングにより組織を分散させた後、残留している組織片を吸わないようにドロップを 1.5 ml チューブへ移し、100 mM sucrose 40 μl を加えた。MAS コートスライドガラスを、0.15% Triton X-100 を含む 1% PFA 溶液に浸した後に湿潤箱に設置し、細胞懸濁液を 40 μl 加えた。湿潤箱の蓋を完全に閉めない状態で 2 時間遮光静置して完全に乾かし、SQ で洗浄後に再度風乾した。

サンプルの周囲を PAP ペンで囲み、blocking solution (10% ウシ胎仔血清 [FBS]、3% ウシ血清アルブミン [BSA]、0.2% Triton-X 100 を含む PBS) を 100 μl 加えて室温で 1 時間静置した。blocking solution を除去後、preservation solution (1% BSA、0.1% Poly vinyl alcohol hydrolyzed [PVA] を含む PBS) で希釈した一次抗体を 100 μl ずつ加えて 4°C で一晩静置した。preservation solution で希釈した二次抗体を 100 μl ずつ加えて室温で 1 時間静置し、VECTASHIELD Antifade Mounting Medium

with 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI; Vector Laboratories) で封入した。共焦点レーザー顕微鏡による観察は LSM710 (Zeiss) にて行なった。使用した抗体および希釈率は表 2-1 に示した。

5. 精巣に対する蛍光組織免疫染色

安楽死後の胎齢 17.5 日の雄マウスから精巣を摘出後、精巣上体を除去した。精巣を 4% PFA in PBS へ移して 4°C で一晩静置し、固定した。PBS で洗浄後、10% および 20% sucrose solution でそれぞれ一晩ずつ凍結防護処理を行い、OCT Compound で封入した。10 μ m 厚の凍結切片を Leica CM1860 cryostat microtome (Leica Biosystems) にて作製した。

凍結切片は PBS で洗浄後、trisodium citrate buffer (1 mM Trisodium Citrate、0.05% Triton X-100、pH 6.0) 中で 500W、15 分間抗原賦活化処理を行い、blocking solution 中で 1 時間ブロッキングを行なった。抗体処理はシナプトネマ複合体の観察と同様に行なった。使用した抗体および希釈率は表 2-1 に示した。

第三節 結果

1. *Asz1* 欠損マウス精巣の組織学的な解析

3 週齢のマウス精巣において ASZ1 の発現を解析したところ、ASZ1 は精母細胞において顆粒状の強いシグナルを呈した (図 2-1)。6 週齢のマウス精巣を観察した結果、野生型および *Asz1*^{+/+}マウスの精巣と比較して、作出された *Asz1*^{-/-}由来のマウス精巣は著しく萎縮しており、精子形成障害が示唆された (図 2-2A)。

ウェスタンブロットにより 3 週齢のマウス精巣における ASZ1 の発現を解析した結果、*Asz1*^{+/+}マウス由来の精巣で確認された ASZ1 のシグナルは *Asz1*^{-/-}では完全に消失しており、*Asz1*^{-/-}マウスでは *Asz1* 遺伝子が完全に欠損していることが明らかとなった (図 2-2B)。

次に、2、4 および 6 週齢のマウス精巣における組織学的な解析を行なった。HE 染色の結果、2 週齢の精巣においては *Asz1*^{+/+}および *Asz1*^{-/-}マウスの両者の精巣において第一減数分裂前期と考えられる精母細胞が確認され、この時点では精子形成障害は顕著ではないことが示唆された (図 2-3)。しかしながら 4 週齢の *Asz1*^{+/+}マウス由来精巣においてはすでに減数分裂を終えた伸長精子細胞が確認されたのに対し、同週齢の *Asz1*^{-/-}マウスではそれらの細胞は確認されなかった。6 週齢の精巣においても、*Asz1*^{-/-}マウスでは半数体の精子細胞は確認されず、第一減数分裂前期で精子形成が停止していた。

2. シナプトネマ複合体の観察による精子形成障害の表現型解析

次に、*Asz1* 欠損マウスにおける精子形成障害の表現型をより詳細に明らかにし、精子形成障害が顕著な時期を特定するために、第一減数分裂の進行度を解析した。3 週齢のマウス精巣より meiotic chromosome spreads を調製し、シナプトネ

マ複合体の側方因子である SCP3 とシナプトネマ複合体の結合に必要な SCP1 に対して蛍光免疫染色を行なった。その結果、野生型精巣由来の細胞においては、SCP3 の繊維状のシグナルが確認されるレプトテン期、相同染色体の対合が開始して SCP1 のシグナルが確認されはじめるザイゴテン期、相同染色体の対合が完了するパキテン期と相同染色体の解離が始まるディプロテン期の、第一減数分裂前期の全てのサブステージの精母細胞が確認された (図 2-4)。一方で、*Asz1*^{-/-} マウス由来の精巣ではパキテン期とディプロテン期の精母細胞は確認されず、最も第一減数分裂が進行している精母細胞は後期のザイゴテン期に相当する精母細胞であった。以上のことから、*Asz1* 欠損マウスの精巣では第一減数分裂のザイゴテン期以前に生殖細胞が死滅してしまうことが明らかとなった。この表現型は *Miwi2* の欠損マウスと一致した [21]。

3. *Asz1* 欠損マウス前精原細胞における、MIWI2 の核内局在の消失

Asz1 欠損マウスの前精原細胞においては、piRNA 経路の主要因子をコードする *Mili* および *Miwi2* の mRNA の発現は野生型マウスと差がない。しかし、piRNA の産生とレトロトランスポゾン RNA の分解を司る MILI タンパク質の発現が著しく低下することが報告されている [31]。その一方で、前精原細胞において、MILI の産生する piRNA 依存的に細胞質から核内移行し、piRNA をガイドにレトロトランスポゾンの DNA メチル化を行う MIWI2 の発現は明らかにされていない。そこで前精原細胞における MIWI2 の発現を組織免疫染色により解析した。胎齢 17.5 日の精巣から作製した凍結切片に対し蛍光免疫染色を行なった結果、野生型の前精原細胞において MIWI2 は細胞質と核内の両方に局在が見られた (図 2-5)。その一方で、*Asz1*^{-/-} マウスにおいて MIWI2 は細胞質での局在は確認されたものの、野生型の前精原細胞で確認された核内での局在は完全に消失して

いた。このことから、*Asz1*^{-/-}マウスにおいては MIWI2 による DNA メチル化を介したレトロトランスポゾンの転写レベルでの抑制が機能していないことが示唆された。これを裏付けるように、*Asz1*^{-/-}マウスの前精原細胞では LINE1 がコードするシャペロンタンパク質である LINE1 open reading frame1 protein (L1ORF1p) の発現上昇も観察された (図 2-6)。

第四節 考察

piRNA 経路関連遺伝子の欠損による精子形成障害は大きく 2 種類に分けられる [1]。1 種類目は欠損により精子形成が第一減数分裂前期で停止する遺伝子群である。この遺伝子群は piRNA 経路の中でも胎仔期における piRNA 産生とレトロトランスポゾンの DNA メチル化に関与する遺伝子が含まれており、*Mili* や *Miwi2*、*Asz1* などが含まれる [21, 31, 34]。2 種類目は欠損により精子形成が円形精子細胞で停止する遺伝子群である。こちらには精母細胞におけるパキテン piRNA の産生に関与する遺伝子が含まれており、*Miwi* が該当する [35]。この 2 種類に加えて *Pnlcd1* のように、piRNA 産生への寄与度により精子形成障害の表現型が緩やかな遺伝子が存在する [15]。精子形成障害の詳細な時期に関しては欠損マウスの系統により少なからず影響を受けるため一概には同一視できないが、概ね上述の通りとなる。しかしながら欠損が第一減数分裂前期での精子形成の停止を引き起こす遺伝子の中での若干の表現型の差が見られる。*Miwi2* を欠損した精巣ではサイゴテン期までの精母細胞しか確認できないのに対し、*Tdrd9* を欠損した精巣ではパキテン期様の精母細胞を確認することができる [21, 32]。*Miwi2* 欠損マウスの精巣生殖細胞では IAP と LINE1 の活性化が起こるのに対し、*Tdrd9* 欠損マウスでは LINE1 の活性化のみが確認されることから、この第一減数分裂進行度の差はレトロトランスポゾンの活性化の度合いが寄与している可能性が考えられる。そのため、レトロトランスポゾンの活性化が前精原細胞に与える影響を解析するにあたり、*Asz1* 欠損マウスの精子形成停止時期を詳細に明らかにする必要がある。作出した *Asz1* 欠損マウスの表現型は過去に報告されている *Asz1* 欠損マウスのものと同様であり、*Asz1* の精子形成における重要性が裏付けられた。さらに、本研究でのシナプトネマ複合体の観察により、*Asz1* の

欠損は第一減数分裂前期の Zygotene 期以前での精子形成の停止を引き起こすことが明らかとなった。この表現型は *Pnlcd1* や *Tdrd9* の欠損体よりも *Mili* や *Miwi2* の欠損体と酷似しており、*Asz1* は piRNA 経路関連遺伝子の中でも欠損により最も深刻な表現型とレトロトランスポゾンの活性化を示す遺伝子の一つであることが明らかとなった。

第一減数分裂前期での精子形成の停止は、胎仔期におけるレトロトランスポゾンへの DNA メチル化に失敗した結果の二次的な影響と考えられる。これは胎仔期でしか機能しない *Miwi2* や、piRNA 経路には直接関与しないもののレトロトランスポゾンの DNA メチル化に必須である *Dnmt3l* の欠損でも同様の表現型が確認されるからである [21, 36]。実際に、*Asz1* 欠損マウスの前精原細胞では MIWI2 の核内局在が消失しており、piRNA 経路依存的なレトロトランスポゾンの DNA メチル化がなされていないことが示唆された。MIWI2 の核内局在は *Mili* の欠損マウスで消失することが報告されており、*Mili* の産生する piRNA 依存的に細胞質から核内移行することが示唆されている [11]。*Asz1* 欠損マウスでは piRNA 産生の足場となる intermitochondrial cement の消失と MILI タンパク質の著しい発現低下が報告されており、piRNA 産生に異常をきたした結果、MIWI2 の核内局在が消失したものと考えられた [30, 31]。

表2-1 本研究にて使用された抗体の一覧および使用時の希釈率

Primary antibodies	Supplier	Reference	Species	Dilution		
				IF	WB	FACS
ASZ1	GeneTex	GTX111618	rabbit		1/1000	
MVH (DDX4)	abcam	ab13840	rabbit	1/500	1/1000	
GENA	BioAcademia	73-003	rat	1/500		
SCP1	abcam	ab15090	rabbit	1/500		
SCP3	abcam	ab97672	mouse	1/500		
PIWIL4 (MIWI2)	abcam	ab21869	rabbit	1/500		
L1ORF1p	abcam	ab216324	rabbit	1/500		
CD16/32	BioLegend	101301	rat			1/200
EpCAM (APC/Fire750-conjugated)	BioLegend	118229	rat			1/200
c-kit (Brilliant Violet 421-conjugated)	BioLegend	135123	rat			1/200
GAPDH	Trevigen	2275-PC-100	rabbit		1/1000	
Secondary antibodies	Supplier	Reference	Species	Dilution		
				IF	WB	FACS
Alexa Fluor 488 Donkey anti-Mouse IgG (H+L)	Thermo Fisher Scientific	A-21202	mouse	1/500		
Alexa Fluor 594 Goat anti-Rabbit IgG (H+L)	ThermoFisherScientific	A-11012	rabbit	1/500		
Anti-Rabbit IgG, HRP-Linked Whole Ab Donkey	Cytiva	NA934V	rabbit		1/10000	
Anti-Mouse IgG, HRP-Linked Whole Ab Sheep	Cytiva	NA931VS	mouse		1/10000	

3 weeks

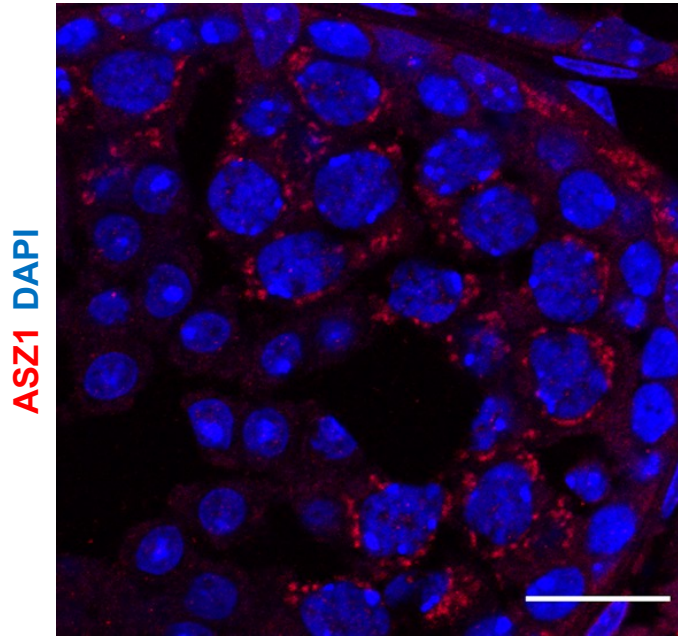


図 2-1 野生型マウスの精巣におけるASZ1の発現

野生型の3週齢のマウスにおいてASZ1 (赤色) の発現を蛍光組織免疫染色により解析した。細胞核はDAPI (青色) により染色されている。スケールバーは20 μm である。ASZ1は一際大きな精母細胞において顆粒状のシグナルとして観察された。

A

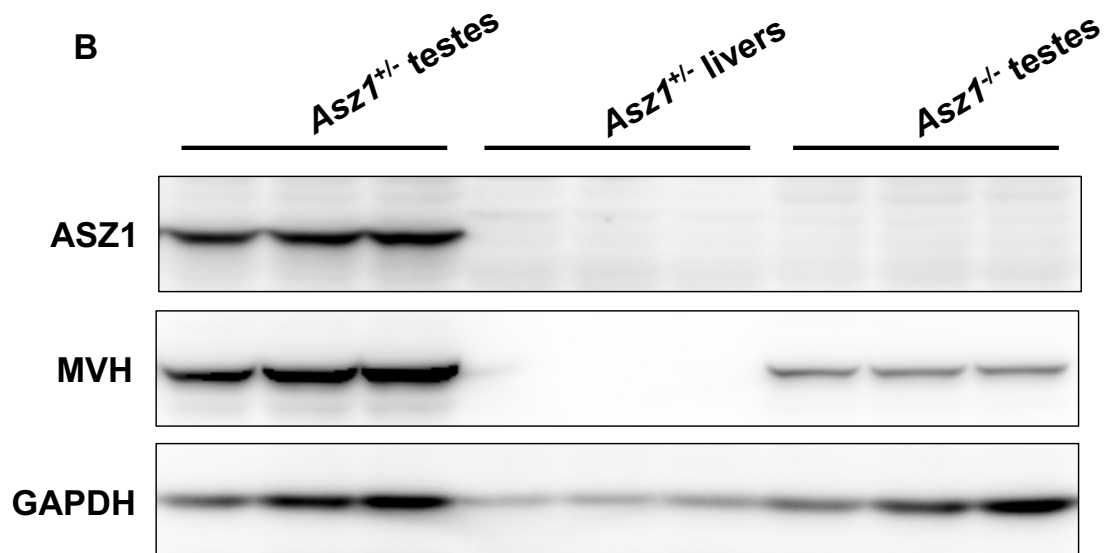
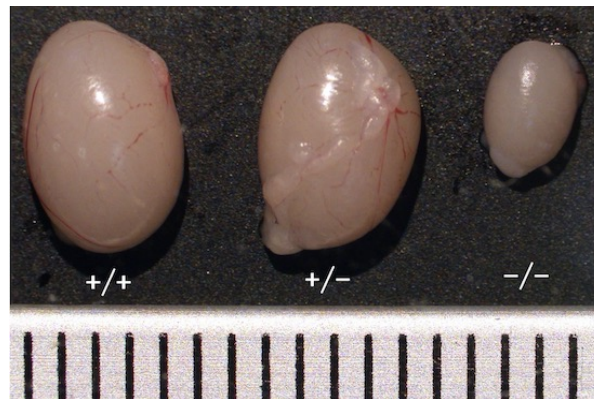


図 2-2 *Asz1*欠損マウスの作出

(A) 6週齢の精巣を示す図。左から野生型、*Asz1*^{+/-}、*Asz1*^{-/-}マウスの精巣を示す。下端の定規の1メモリは1 mmを示す。*Asz1*欠損マウスの精巣は野生型や*Asz1*^{+/-}マウスの精巣と比較して著しく萎縮していた。(B) 3週齢のマウス由来の組織におけるウェスタンブロッティングの結果。左から*Asz1*^{+/-}マウスの精巣、*Asz1*^{+/-}マウスの肝臓 (ネガティブコントロール)、*Asz1*^{-/-}マウスの精巣のレーンを示す。

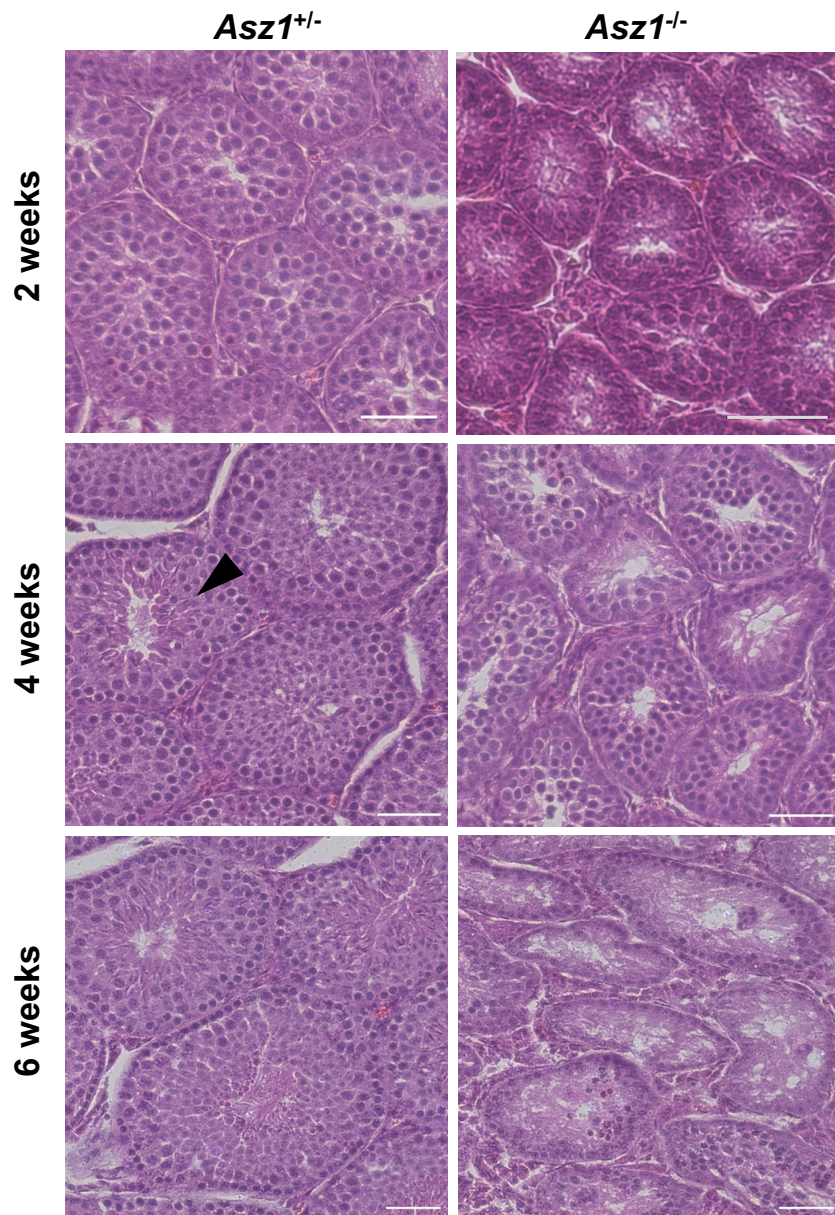


図 2-3 *Asz1*欠損マウス精巣の組織学的な解析

2、4および6週齢のマウス精巣の組織学的解析を示す。左列が*Asz1*^{+/-}、右列が*Asz1*^{-/-}マウスの精巣である。矢頭は伸長精子細胞を示す。スケールバーは100 μmである。

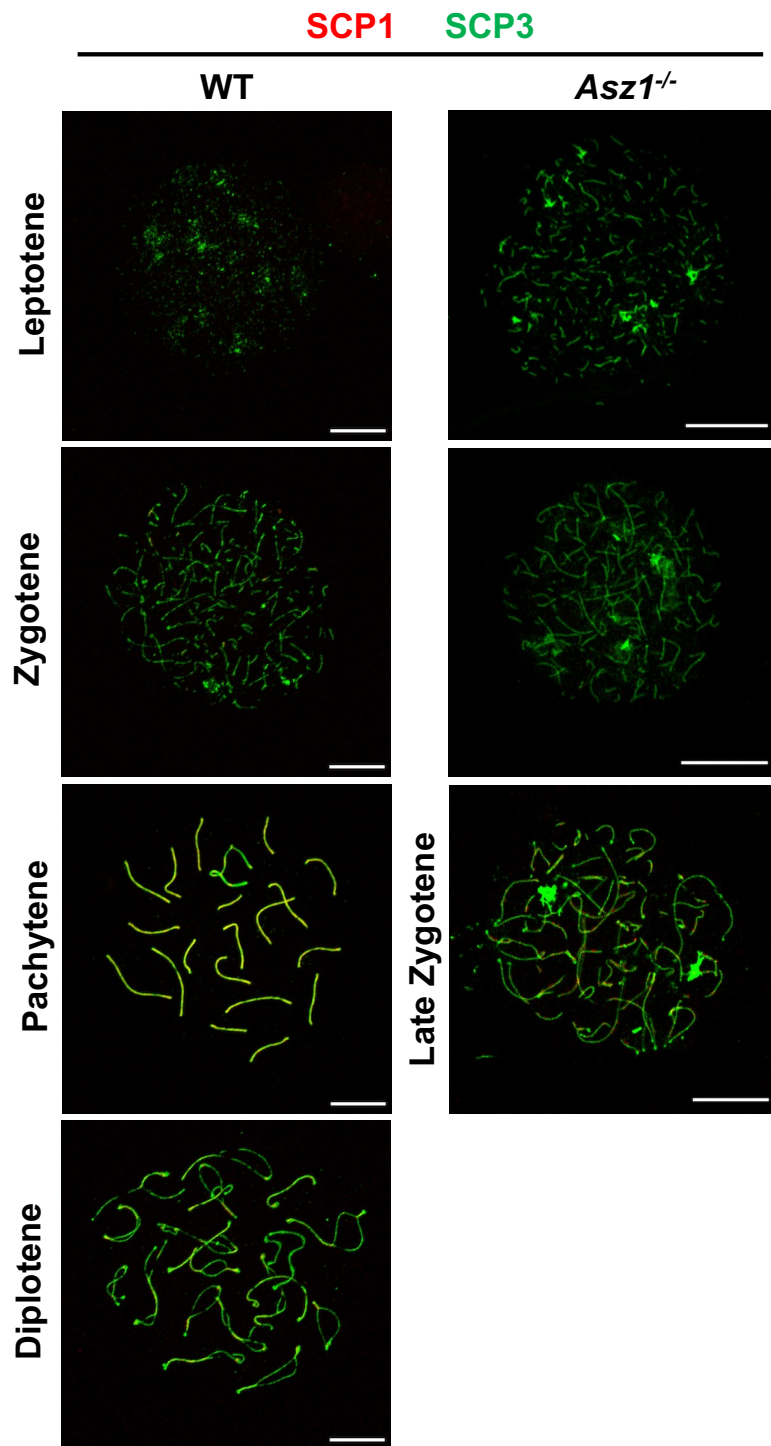


図 2-4 *Asz1*欠損マウス精母細胞のシナプトネマ複合体の解析

3週齢のマウス精巣由来の精母細胞に対するシナプトネマ複合体の免疫染色の結果。左列が野生型、右列が*Asz1*^{-/-}マウス由来のサンプルを示す。SCP1とSCP3はそれぞれ赤と緑色で示される。スケールバーは10 μmである。

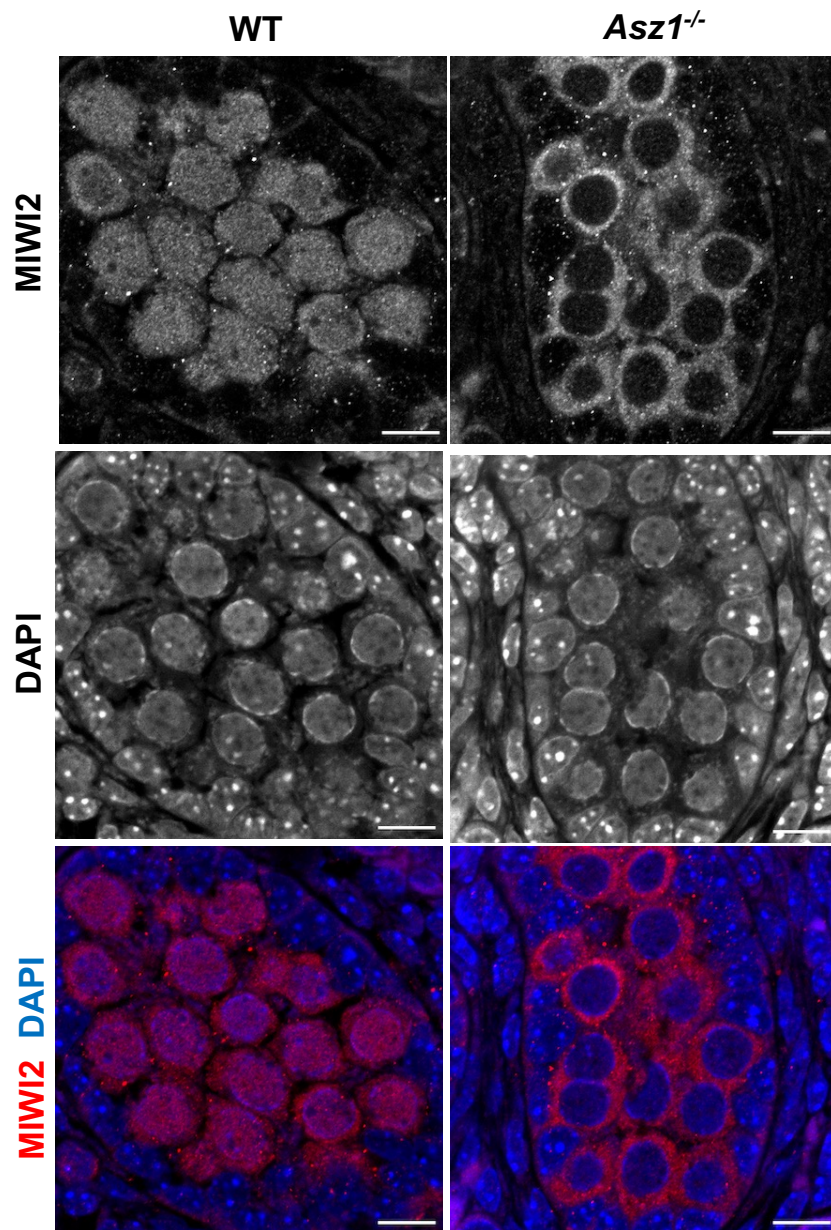


図 2-5 *Asz1*欠損マウス前精原細胞におけるMIWI2の局在解析

胎齢17.5日のマウス精巣におけるMIWI2 (赤色) の局在解析の結果。左列が野生型、右列が*Asz1*^{-/-}マウス由来の精巣を示す。細胞核はDAPI (青色) により染色されている。スケールバーは10 μmである。

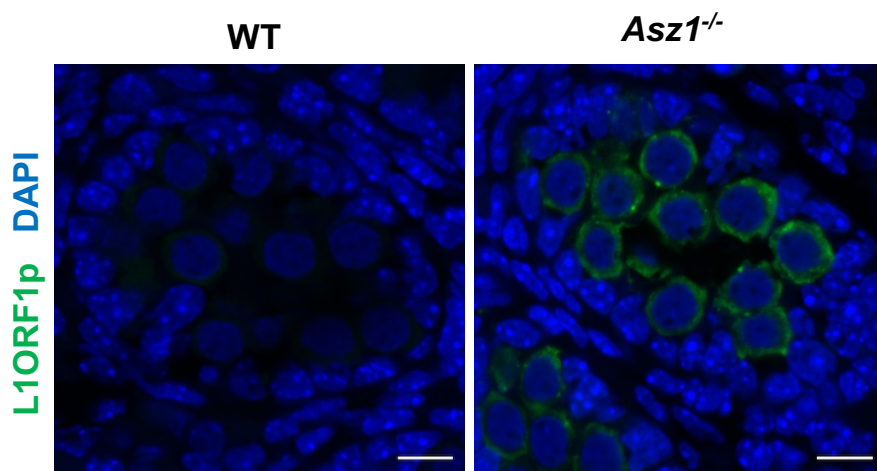


図 2-6 *Asz1*欠損マウス前精原細胞におけるLINE1の発現解析

LINE1 open reading frame1 protein (L1ORF1p, 緑色) の胎齢17.5日のマウス精巢における発現解析の結果。左列が野生型、右列が*Asz1*^{-/-}マウス由来の精巢を示す。細胞核はDAPI (青色) により染色されている。スケールバーは10 μm である。

第三章 レトロトランスポゾンの活性化が前精原細胞の遺伝子発現に及ぼす影響

第一節 緒言

前精原細胞は全ての雄性生殖系列の祖細胞である。雄の生殖腺に定着した PGCs は性分化し、前精原細胞と呼ばれるようになる。分化した前精原細胞は胎齢 16.5 日ごろまで体細胞分裂を続けたあと G0 期に入る [24]。おおよそ胎齢 16.5 日から出生までの間には piRNA 依存的なレトロトランスポゾンの DNA メチル化が行われる [22]。体細胞分裂を停止した前精原細胞は出生後 1 週間以内に体細胞分裂を再開するが、この間に精原幹細胞としての性質を獲得する [37]。前精原細胞から精原幹細胞への以降にはヒストン修飾の変化による精原幹細胞マーカー遺伝子の獲得が必要であり、体細胞分裂の再開だけではなく適切なエピゲノム修飾と遺伝子発現動態の変化が必要である [38]。

このように前精原細胞では精原幹細胞としての能力を獲得するまでの間に piRNA による DNA のメチル化を含めた重要な変化が多く起こるにもかかわらず、piRNA の欠損が前精原細胞そのものに与える影響に関してはあまり着目されてこなかった。この理由の一つとして piRNA 経路を欠損しても大規模な細胞死など、前精原細胞に目立った表現型が現れないことが考えられる。piRNA 経路を欠損すると前精原細胞において DNA 損傷のマーカー遺伝子である γ H2Ax の発現上昇が見られることが報告されている。その一方で γ H2Ax 陽性の前精原細胞の数はレトロトランスポゾンの活性化の規模と比較して少なく、細胞死を引き起こすほどのゲノムへの損傷は限定的であることが示唆されている [21]。これを支持するように、*Mili* 欠損マウスの子孫の精巣において精原細胞の数

は野生型と遜色がないことが報告されている [23]。また、胎仔期 piRNA は主にレトロトランスポゾンに由来するとされており、直接遺伝子発現を調節してはいないと考えられる [11]。

しかしながら、レトロトランスポゾンの活性化は近傍遺伝子の転写に関与することが報告されており、piRNA 経路が直接遺伝子発現を調節していなかった場合でも、piRNA 経路欠損マウスの前精原細胞において、活性化したレトロトランスポゾンの影響で遺伝子発現に変化が生じることは十分考えられる [39]。そこで、*Asz1* 欠損マウスの前精原細胞においてトランスクリプトーム解析を行い、piRNA 経路の欠損がもたらすレトロトランスポゾンの活性化が前精原細胞の遺伝子発現に与える影響を解析した。

第二節 材料および方法

1. 供試動物

第二章に準ずる。

2. 生殖細胞の FACS による分取の検討

安楽死後の出生後 1 日齢マウスから精巣を摘出し、1.5% BSA in DMEM 中へ移した。白膜を除去したのち、ガラスボトムディッシュ上に DMEM 100 μ l ごと精巣を移し、メスとピンセットで精細管の組織片化を行なった。組織片化した精細管を 1 mg/ml collagenase と 0.1 mg/ml の DNase I が入った DMEM へ移し、37°C で 35 分間酵素処理を行なった。4°C にて 1500 rpm で 5 分間遠心して上清を除去後、0.25% trypsin-EDTA を 500 μ l 加えて 37°C で 5 分間酵素処理を行なった。10% FBS in DMEM を 500 μ l 加えてピペッティングし、酵素活性の停止と組織片の分散を行なった後に、4°C にて 1500 rpm で 5 分間遠心して上清を除去した。FACS Buffer 200 μ l で再懸濁後、CD16/32 antibody を 2 μ l 加えて氷上で 15 分間静置し、Fc レセプターのブロッキングを行なった。続いて APC/Fire750 anti-mouse EpCAM antibody を 2 μ l 加えて氷上で 1 時間静置し、前精原細胞を標識した。遠心分離後に FACS Buffer 400 μ l で再懸濁して洗浄後、再度遠心して FACS Buffer 300 μ l に再懸濁した。

細胞懸濁液を 35 μ m セルストレーナーに通し、BD FACS Aria ii (BD Biosciences) にて細胞を 700 μ l の FACS Buffer に分取した。4°C にて 1500 rpm で 30 分間遠心後、1 \times PBS (-) 15 μ l で再懸濁した。細胞懸濁液で 4 well dish 上の丸型カバーガラス上に液滴を作成し、1 時間静置して細胞を固着させた。1% PFA in PBS 500 μ l を加えて 1 時間静置し固定したのちに、PBS で洗浄した。PBS を除去して

blocking solution を 500 μ l 加え、1 時間ブロッキングを行なった。GENA 抗体と MVH 抗体を含む preservation solution 500 μ l を加えて 4°C にて一晩静置し、一次抗体処理を行なった。Wash solution (0.1% PVA、0.25% Triton X-100 を含む PBS) で洗浄後、二次抗体を含む preservation solution 500 μ l を加えて 1 時間静置し、二次抗体処理を行なった。VECTASHIELD Antifade Mounting Medium with DAPI で封入後、LSM710 (Zeiss) にて観察を行い、前精原細胞の分取を確認した。FACS での分取時に使用したゲートと分取した前精原細胞の様子を図 3-1A に示した。使用した抗体および希釈率は表 2-1 に示した。

2 週齢のマウス精巣からの生殖細胞の分取は上述の前精原細胞の分取に準じて行った。分取した精巣生殖細胞の観察には MVH 抗体を使用した。FACS での分取時に使用したゲートと分取した精巣生殖細胞の様子を図 3-1B に示した。

3. RNA-seq ライブラリーの構築とシーケンシング

FACS により前精原細胞を RNeasy Plus Micro Kit (QIAGEN) に含まれる Buffer RLT Plus 350 μ l へ分取し、-80°C にて保存した。サンプルを融解し、十分な圧力をかけてピペッティングを行うことで細胞を破碎した。RNeasy Plus Micro Kit のプロトコルに従って Total-RNA を抽出し、RNA の質および量を Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent) と RNA 6000 pico kit (Agilent) により測定した。すべてのサンプルの RIN (RNA integrity number) 値が 8 を上回っていることを確認した。

抽出した Total-RNA に対する逆転写処理は SMART-Seq® v4 Ultra® Low Input RNA Kit for Sequencing (Takara) を用いて行った。300 pg の Total-RNA をキットのマニュアルに従い、poly(A)⁺ RNA に対する逆転写処理に供試し、完全長の cDNA を得た。cDNA のクオリティチェックを、Agilent 2100 Bioanalyzer と Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent) を用いて行った。各サンプルにつき 1 ng の

cDNA を Nextera XT DNA Library Prep Kit (illumina) を用いて、キットのプロトコルに従いライブラリー構築に供試した。品質およびライブラリー長の分布の確認は、Agilent 2100 Bioanalyzer with Agilent High Sensitivity DNA Kit により判定された。そして、各ライブラリーの濃度を QuantStudio3 (Thermo Fisher Scientific) と KAPA Library Quantification Kits Illumina (KAPA Biosystems) を用いた定量的 PCR により測定した。

構築したライブラリーの次世代シーケンシングは NextSeq 500 System (illumina) にて行われた。75 塩基のペアエンドシーケンスの結果、サンプルあたり約 1000 万ペアリードを得た。

4. RNA-seq データ解析

UCSC mm10 マウスゲノムと遺伝子のアノテーションリストは illumina の iGenomes (http://jp.support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/igenome.html) よりダウンロードして使用した。またレトロトランスポゾンと反復配列のアノテーションリストは UCSC genome browser (<https://genome.ucsc.edu/>) の repeat masker track より入手した。

RNA-seq のリードは Trimmomatic (version 0.36)を用いてトリミングし、ペアを維持したペアエンドリードのみを以降の解析に供試した [40]。本解析では遺伝子に加えてレトロトランスポゾンの発現変動比較も行うため、リードカウントの際に遺伝子とレトロトランスポゾンでリードを重複してカウントしてしまう恐れがあった。それを防ぐために、マッピングからリードカウントまでの工程を、遺伝子向けの工程とレトロトランスポゾン向けの工程で分けて行なった。第一に、レトロトランスポゾン関連のリードをカウントせずに遺伝子関連のリー

ドのみをカウントするために、ゲノム上の反復配列を連結して作製したシングル FASTA 配列にリードをマッピングし、マッピングされなかったリードを抽出した。抽出したリードをペアエンドリードとして、Hisat2 (version 2.1.0) を用いてマウスゲノムにマッピングした [41]。マッピングの設定は Hisat2 の規定の設定を用いた。マッピング後に samtools を用いて SAM ファイルから BAM ファイルに変換した後に、bedtools (version 2.27.1) を用いてミトコンドリア上にマッピングされたリードを除去した [42]。第二に、レトロトランスポゾン関連のリードをカウントするために、トリミング後のリードをゲノムにマッピングし、遺伝子のエクソン上にマッピングされたリードを bedtools で除去した。マッピングは Hisat2 を以下のオプションで用いた: `-k 10000 --no-spliced-alignment --score-min C,-1`。遺伝子およびレトロトランスポゾン関連のマッピングデータに対するリードカウントはそれぞれで featureCounts (version 1.6.2) を用いて行なった [43]。featureCounts は以下のオプションを付与して利用した: `-B -P -M -O -fraction`。それぞれのマッピングデータから得られたリードカウントの表を結合し、edgeR package (version 3.22.5) を用いて発現変動比較と RPM 値の算出を行なった [44]。edgeR は発現量のカットオフ値を RPM 5 で用いた。発現変動遺伝子のリストを表 3-1 に示した。マッピング方法の概略図を図 3-2 に示した。

遺伝子関連リードのカバレッジを目視で確認するために、遺伝子関連の BAM ファイルをサンプル群ごとにマージし、deepTools (version 3.5.1) を用いて CPM 正規化法にて BAM ファイルを BigWig ファイルに変換した [45]。BigWig ファイルの閲覧は IGV genome browser 上で行なった [46]。

5. レトロトランスポゾンと遺伝子の異常な融合転写産物の検出

遺伝子関連リードのマッピングデータに対し、StringTie (version 1.3.4.d) を用

いて、遺伝子のアノテーションリストをガイドにリードのアセンブルを行なった [47]。以下の基準を全て満たした転写産物を異常な融合転写産物として検出した: アセンブルされたトランスクリプトバリエーションの中で、5'末端のエクソンが NCBI RefSeqGene (GRCm38) にアノテーションされていない転写産物; トランスクリプトバリエーションの 5'末端のエクソンにおける発現が、*Asz1* 欠損マウスの前精原細胞で有意に発現上昇していること (FDR < 0.01); 異常な融合転写産物の典型転写産物の発現変動比較をした際に *Asz1* 欠損マウスにおいて有意に発現上昇していること (FDR < 0.05)。

6. IAP 由来 *Fancd2* のスプライシングサイトのシーケンス

RNA-seq データの解析により検出された、レトロトランスポゾン IAP と *Fancd2* の異常な融合トランスクリプトバリエーションの存在を再検証するために、スプライシングサイトのシーケンスを行った。RNA-seq 用に合成された cDNA の一部を TaKaRa Ex Taq Hot Start Version (Takara) を用いた PCR に供試し、IAP 由来 *Fancd2* の PCR 増幅産物を pGEM-T Easy Vector (Promega) へクローニングした。得られたプラスミドを SP6 および T7 プライマーを用いたシーケンスに供試した。シーケンスは ABI PRISM 3130 platform (Thermo Fisher Scientific) にて行った。配列の確認は SnapGene® software (Insightful Science LLC) を用いて行った。使用したプライマーは表 3-2 に示した。

7. バイサルファイトシーケンス

FACS により分取した出生後 1 日齢の前精原細胞および 2 週齢の精巣生殖細胞から QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen) を用いてゲノム DNA を抽出した。抽出した DNA に対して EpiTect Bisulfite Kits (Qiagen) を用いてバイサルファイト処理

を行った。バイサルファイト処理した DNA を PCR に供試し、得られた PCR 産物を pGEM-T Easy Vector にクローニングした。DH5 α のシングルコロニーを TempliPhi 500 Amplification Kit (Cytiva) に供試し、プラスミド増幅を行った。シーケンスは ABI PRISM 3130 platform (Thermo Fisher Scientific) にて行い、DNA メチル化解析はオンライン上の解析ツールである QUMA を用いて行った [48]。バイサルファイトシーケンスの一部は東京農業大学動物発生工学研究室の大谷麗子氏と共同で行った。使用したプライマーは表 3-1 に示した。

第三節 結果

1. *Asz1* 欠損マウス前精原細胞における遺伝子発現解析

出生後 1 日齢の前精原細胞に対して RNA-seq 解析を行なった結果、野生型で確認された *Asz1* の発現は *Asz1*^{-/-}では完全に消失していた (図 3-3)。レトロトランスポゾンの発現変動比較を行なった結果、*Asz1*^{-/-}前精原細胞において LINE や LTR などのレトロトランスポゾンが有意に発現上昇していた (図 3-4A)。その一方で、SINE の発現上昇は確認することができなかった (図 3-4B)。

遺伝子の発現変動比較を行なった結果、野生型に対して *Asz1*^{-/-}前精原細胞においては 275 および 216 遺伝子がそれぞれ有意に発現上昇と発現低下していた (図 3-5、表 3-2)。これらの発現変動遺伝子に対して GO 解析や遺伝子経路の解析を行なった結果、精子形成障害に関する GO term の濃縮や特定の遺伝子経路に属する遺伝子の濃縮は確認することができなかった。そこで、個々の遺伝子に着目した結果、いくつかの遺伝子が著しい発現上昇比を示した。その中の一つであり、精子形成過程においてアポトーシスへの関与が示唆されている apolipoprotein H (*Apoh*) に着目した [49]。*Apoh* は野生型の前精原細胞では全く発現しておらず、野生型と比較して *Asz1*^{-/-}では 100 倍以上の発現上昇比を示した (図 3-5)。興味深いことに、*Asz1*^{-/-}前精原細胞における *Apoh* はエクソン 1 番から 3 番までを欠いており、イントロン 3 番から転写が開始していた (図 3-6)。イントロン 3 番を拡大して見ると、イントロン 3 番に形成された異常なエクソンと元来の 4 番エクソンにリードがまたがってアライメントされていることがわかった。この異常なエクソンの上流には LTR 型レトロトランスポゾンである IAPLTR1_Mm_dup60 と SINE 型レトロトランスポゾンである B1_Mus1_dup5929m が存在していた。SINE の *Asz1*^{-/-}前精原細胞における発現上

昇は確認できなかったことから、活性化した IAPLTR1_Mm_dup60 のプロモーターが *Apoh* に異常な転写開始点を生じさせ、異常な融合トランスクリプトバリエーションの転写を誘起したことが示唆された (以降、*Apoh* の異常な融合トランスクリプトバリエーションを *IAP-Apoh* とする)。

2. 異常な融合トランスクリプトの検出

上述のように、*Asz1* 欠損マウスの前精原細胞において脱抑制したレトロトランスポゾンが近傍遺伝子の本来と異なる部位から転写を引き起こすことが示唆された。そこでそのような異常な融合トランスクリプトの検出を試みた。その結果、*Asz1*^{-/-}前精原細胞において 32 の遺伝子がレトロトランスポゾン由来の異常なトランスクリプトバリエーションを持つことが明らかとなった。図 3-7 に 32 遺伝子の前精原細胞における発現量を示した。これらの 32 遺伝子のほとんどは典型トランスクリプトの 5'末端側の 1 つか複数のエクソンを欠いていた。発現パターンをもとにした階層的クラスタリング解析の結果、32 遺伝子は Group A と Group B の二つのグループに分けられた (図 3-7)。Group A は野生型の前精原細胞では発現が見られないのに対して *Asz1*^{-/-}においては遺伝子が発現上昇していたグループで、*Apoh* はこちらのグループに含まれた。一方で Group B に含まれる遺伝子は野生型と *Asz1*^{-/-}の両方の前精原細胞で発現していたが、*Asz1*^{-/-}における発現の方が高かった遺伝子である。Group B に含まれる遺伝子のうち、*Fancd2* に着目してゲノムビューワでの観察を行なった (図 3-8)。

ゲノムビューワでの観察の結果、野生型と *Asz1*^{-/-}の両サンプルで *Fancd2* の全てのエクソン上にリードの蓄積が確認でき、*Fancd2* の典型転写産物が発現していることがわかった。その一方で、*Asz1*^{-/-}前精原細胞でのみ *Fancd2* のエクソン 9 番の上流に存在する IAPLTR2a_dup28 から異常な融合トランスクリプトが発現

しており (以降、*IAP-Fancd2* とする)、これが *Asz1*^{-/-}前精原細胞における *Fancd2* のリードカウントを増加させていたことがわかった。このことを支持するように、*Fancd2* に対してエクソンレベルでの発現変動比較を行うと *IAP-Fancd2* の転写開始点より前の、エクソン 1 番から 8 番までのエクソンにおいては有意な発現変動は認められなかったのに対して、*IAP-Fancd2* の異常な転写開始点よりも下流に存在するエクソンでは *Asz1*^{-/-}前精原細胞において有意な発現上昇が確認された (図 3-9A)。また、*IAP-Fancd2* の異常なエクソンと *Fancd2* のエクソンの連続性はシーケンスによって確認することができた (図 3-9B)。

3. 前精原細胞における DNA メチル化解析

Asz1 欠損マウスの前精原細胞において、活性化したレトロトランスポゾンにより転写されたと考えられる複数の異常な融合トランスクリプトバリエントが検出された。これらがレトロトランスポゾンの影響により転写されたことを裏付けるために、レトロトランスポゾンの DNA メチル化解析を行った。

出生後 1 日齢の前精原細胞において *IAP-Apoh* の転写への関与が示唆された *IAPLTR1_Mm_dup60* の DNA メチル化解析を行ったところ、野生型ではほぼ完全に DNA メチル化されていた一方で、*Asz1* 欠損マウスでは低メチル化の DNA 鎖と高メチル化の DNA 鎖が確認され、野生型よりも低メチル化傾向を示した (図 3-10A)。同様の傾向は *IAP-Fancd2* の転写への関与が示唆された *IAPLTR2a_dup28* においても観察された (図 3-10B)。

出生後 1 日齢の *Asz1* 欠損マウス前精原細胞で観察されたレトロトランスポゾンの DNA メチル化状態が後の段階の精巣生殖細胞においても維持されるかどうかを検証するために、2 週齢の精巣生殖細胞において *IAPLTR2a_dup28* の DNA メチル化解析を行った。その結果、2 週齢の精巣生殖細胞においても、

IAPLTR2a_dup2 は低メチル化 DNA 鎖と高メチル化 DNA 鎖を保持しており、前精原細胞で確認されたのと同様に野生型よりも低メチル化傾向を示した (図 3-11A)。2 週齢の精巣生殖細胞において、他の異常な融合トランスクリプトバリエントの転写に関連するレトロトランスポゾンの DNA メチル化解析を行ったところ、野生型よりも *Asz1* 欠損マウスで低メチル化傾向を示し、一部の高メチル化 DNA 鎖も検出された(図 3-11B)。

このように前精原細胞にける DNA メチル化不全により活性化したレトロトランスポゾンが異常な融合トランスクリプトバリエントの転写に寄与していることが示された。さらに前精原細胞における DNA メチル化不全は前精原細胞よりも後の段階の精巣生殖細胞においても維持されていた。

第四節 考察

前章にて *Asz1* 欠損による精子形成障害を詳細に明らかにすることができたため、piRNA 経路の欠損によるレトロトランスポゾンの活性化が前精原細胞に与える影響を、トランスクリプトーム解析により明らかにした。

Asz1 を欠損した前精原細胞において、LINE1 や LTR 型のレトロトランスポゾンが発現上昇していた。*Asz1* 欠損マウスの精巣においては LINE1 と IAP が DNA メチル化レベルの低下に伴い発現上昇することが報告されており、過去の知見に加えて多種のレトロトランスポゾンの発現上昇が起きていることが明らかとなった [31]。このことから *Asz1* 欠損体の雄性生殖細胞は MIWI2 と相互作用してレトロトランスポゾン抑制を担う tudor-domain containing 9 (*Tdrd9*) の欠損体のように IAP の脱抑制を引き起こさずに LINE1 の脱抑制を引き起こすのではなく *Mili* 欠損体のように piRNA の標的となっているレトロトランスポゾンの包括的な脱抑制を引き起こすことが支持された [11, 32]。

Asz1 の欠損により、前精原細胞において 275 遺伝子の発現上昇と 216 遺伝子の発現低下を確認することができた。これらの遺伝子の発現変動が、*Asz1* 遺伝子の欠損の直接的な影響によるものなのか、あるいは別の遺伝子の発現変動の二次的な影響によるものなのかは GO 解析や遺伝子経路の解析を行なった上でも不明であった。発現低下した遺伝子群の中には *Amh* や *Hsd17b1* などの低発現量の体細胞マーカー遺伝子が含まれていた。前精原細胞においては低レベルで体細胞マーカー遺伝子が発現していることが報告されており、なんらかの原因で *Asz1*^{-/-}前精原細胞にて発現低下が起きたものと考えられるが、前精原細胞におけるそれらの遺伝子の発現の意義については未だ不明であり、発現低下の原因についても今後の検証が必要と考えられた [50]。本研究において *Asz1*^{-/-}前精原

細胞における発現変動遺伝子の数は比較的少数に留まっていたが、胎仔期 piRNA のほとんどが反復配列に由来しており、あまり遺伝子を標的としていないからではないかと考えられた [51]。

一方で、*Apoh* や *Sult2a5*、*Cdh12* をはじめとした発現上昇遺伝子の中には、野生型では全く発現が確認できないにもかかわらず *Asz1*^{-/-} 前精原細胞において、著しい発現上昇を示した遺伝子が確認された。解析の結果これらの発現上昇遺伝子群は、DNA の低メチル化により活性化したレトロトランスポゾンのプロモーターにより転写された、レトロトランスポゾンと遺伝子の異常な融合トランスクリプトバリエーションであることが明らかとなった。IAP や LINE1 などはセンス鎖とアンチセンス鎖の両方向性のプロモーター活性を持つことが示唆されており、活性化により近傍遺伝子の転写に関与したと考えられる [39, 52]。 *Apoh* はこれまでに 10 dpp *Mili*^{-/-} 精巣において発現上昇が報告されているほか、*Dnmt3l* もしくは *Miwi2* の欠損マウスの精原細胞において、IAP の関与により発現上昇することが報告されている [53, 54]。しかしながら、レトロトランスポゾン由来の異常な融合トランスクリプトバリエーションの存在が前精原細胞で確認されたことはなかった。これまでに前精原細胞において、レトロトランスポゾンの DNA メチル化による転写抑制を担う *Dnmt3l* の欠損よりも piRNA 産生に寄与する *Pld6* の欠損の方がレトロトランスポゾン RNA の発現上昇が大きいことから、DNA メチル化はレトロトランスポゾンの抑制に重要ではなく、転写後の抑制が役割を果たしていると考えられてきた [55]。しかしながら本研究により、前精原細胞において DNA のメチル化不全により活性化したレトロトランスポゾンが異常な融合トランスクリプトバリエーションの産生を介して遺伝子発現の完全性を乱すことが明らかとなり、前精原細胞において piRNA 経路を介したレトロトランスポゾンの DNA メチル化はレトロトランスポゾンの抑制に重要な役割を担う

ことが明らかとなった。

異常な融合トランスクリプトバリエントの検出により、*IAP-Apoh* のような著しい発現上昇比を持つためにレトロトランスポゾンの影響下にあることがわかりやすい遺伝子群に加え、本研究では発現変動比が小さい遺伝子群の検出に成功した。その一つである *IAP-Fancd2* の解析により、これらの遺伝子群は前精原細胞において典型遺伝子が遺伝子型を問わず発現している一方で、*Asz1* 欠損前精原細胞ではレトロトランスポゾン由来のトランスクリプトバリエントが発現しており、その発現が有意な発現変動を生じさせていることが明らかとなった。*IAP-Fancd2* はこれまでに *Miwi2*、*Pld6* や *Dnmt3l* 欠損マウスの雄性生殖細胞でも報告されておらず、このような隠された異常な融合トランスクリプトバリエントの存在を明らかにできた意義は大きいものと考えられる。特に、*Fancd2* は DNA 損傷の修復に関与しており、一見すると *Asz1* 欠損前精原細胞で発現上昇していたのは、活性化したレトロトランスポゾンをもたらす DNA 二本鎖切断を修復するためと解釈されかねないが、実際は発現量の上昇は *IAP-Fancd2* によりもたらされていた [56]。これらの異常な融合トランスクリプトバリエントはこれまでの様々な遺伝子の欠損体でも見過ごされてきた可能性がある。本研究で検出された異常な融合トランスクリプトバリエントはレトロトランスポゾンをもたらす DNA へのダメージに加えて精子形成障害の一因である可能性があるが、具体的な影響の検証には今後の研究が必要と考えられた。

前述のように、*Asz1* 欠損前精原細胞で検出された異常な融合トランスクリプトバリエントの上流に存在し、これらの転写に関与していると考えられるレトロトランスポゾンは DNA 低メチル化傾向を示したが、低メチル化された DNA 鎖に加えて高メチル化された DNA 鎖も確認された。レトロトランスポゾンの DNA 低メチル化状態は PGCs で脱メチル化されたレトロトランスポゾンを再メ

チル化する MIWI2 の機能不全によるものと考えられる。一方で、一部のレトロトランスポゾン は PGCs における DNA の脱メチル化に抵抗を示すことが報告されており [10]、これが高メチル化状態のレトロトランスポゾン領域が存在した原因かもしれない。または、一度脱メチル化された後に一部が piRNA 非依存的に DNA 再メチル化されているのかもしれない [10, 57]。これに関しては、*Dnmt3l* の欠損体の前精原細胞でレトロトランスポゾンの DNA メチル化解析を詳細に行うことで明らかにすることができるかもしれない。いずれにせよ、異常な融合トランスクリプトバリエントへの関与が示唆されたレトロトランスポゾンが二峰性の DNA メチル化状態を示したことは、*Asz1* 欠損前精原細胞集団内において、異常な融合トランスクリプトバリエントの発現量や発現の有無に不均一性が存在することを示している。このことから piRNA 経路にはレトロトランスポゾンの DNA メチル化状態を前精原細胞集団内で一様に高メチル化することで、のちの精原幹細胞が遺伝子発現の観点から不均一な集団になることを防ぐ、潜在的な機能を持つことが示唆された。

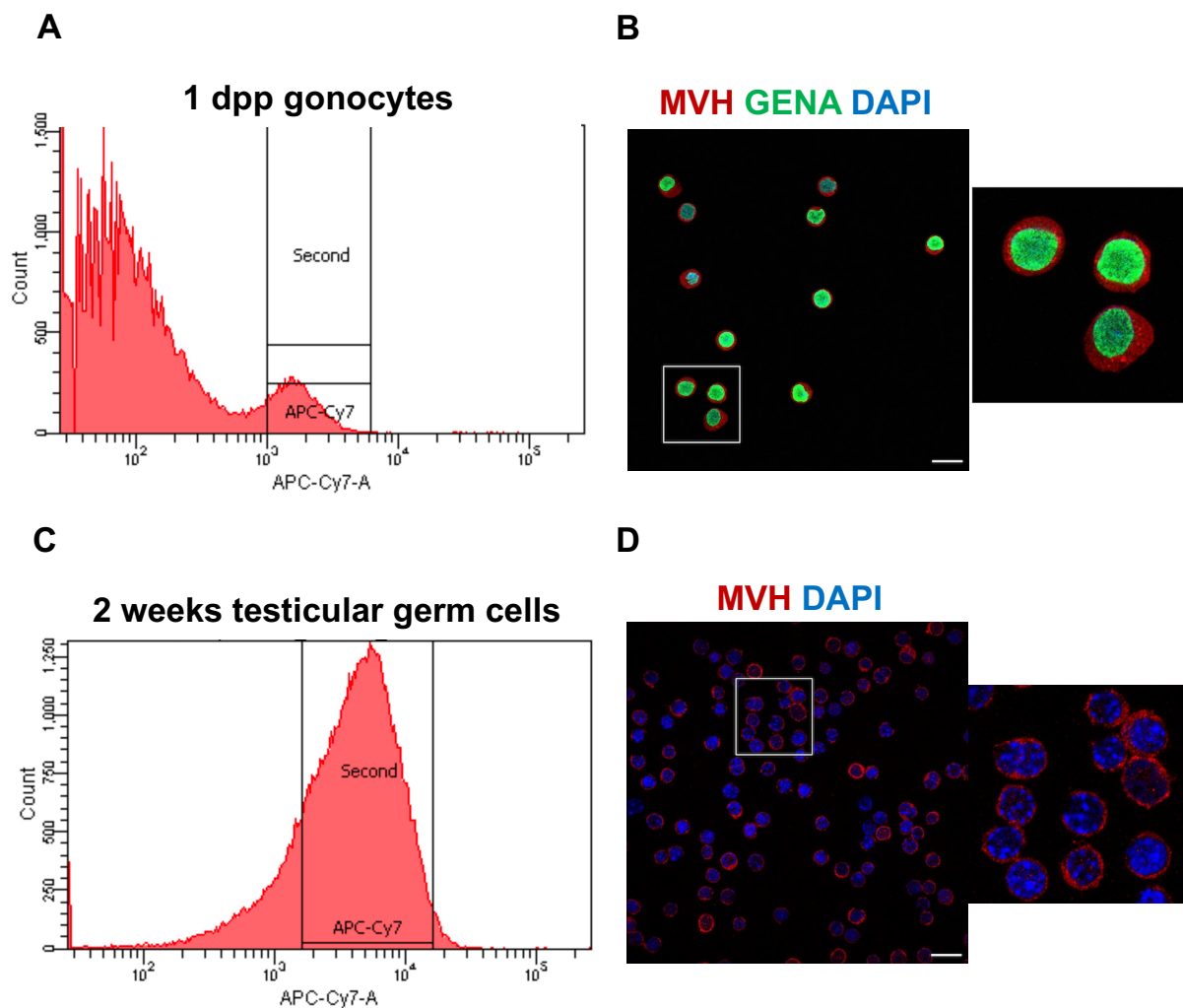


図 3-1 FACSによる精巣生殖細胞の分取

(A, C) 出生後1日齢の精巣および2週齢の精巣細胞懸濁液のフローサイトメトリーによる解析および生殖細胞分取時のゲートを示す。横軸はAPC-Cy7の検出器で検出された相対蛍光強度を示しており、右へ向かうほど強い蛍光を示した細胞がプロットされている。精巣生殖細胞の蛍光標識はEpCAM抗体を用いた。(B) FACSにより精製した前精原細胞の蛍光免疫染色の結果である。生殖細胞マーカーであるDDX4/MVH (赤色) およびGENA/TRA98 (緑色) を標識し、細胞核はDAPI (青色) で染色した。(D) FACSにより分取した2週齢の精巣生殖細胞をDDX4/MVH 抗体で染色した(赤色)。細胞核はDAPI (青色) により染色されている。スケールバーは20 μm である。

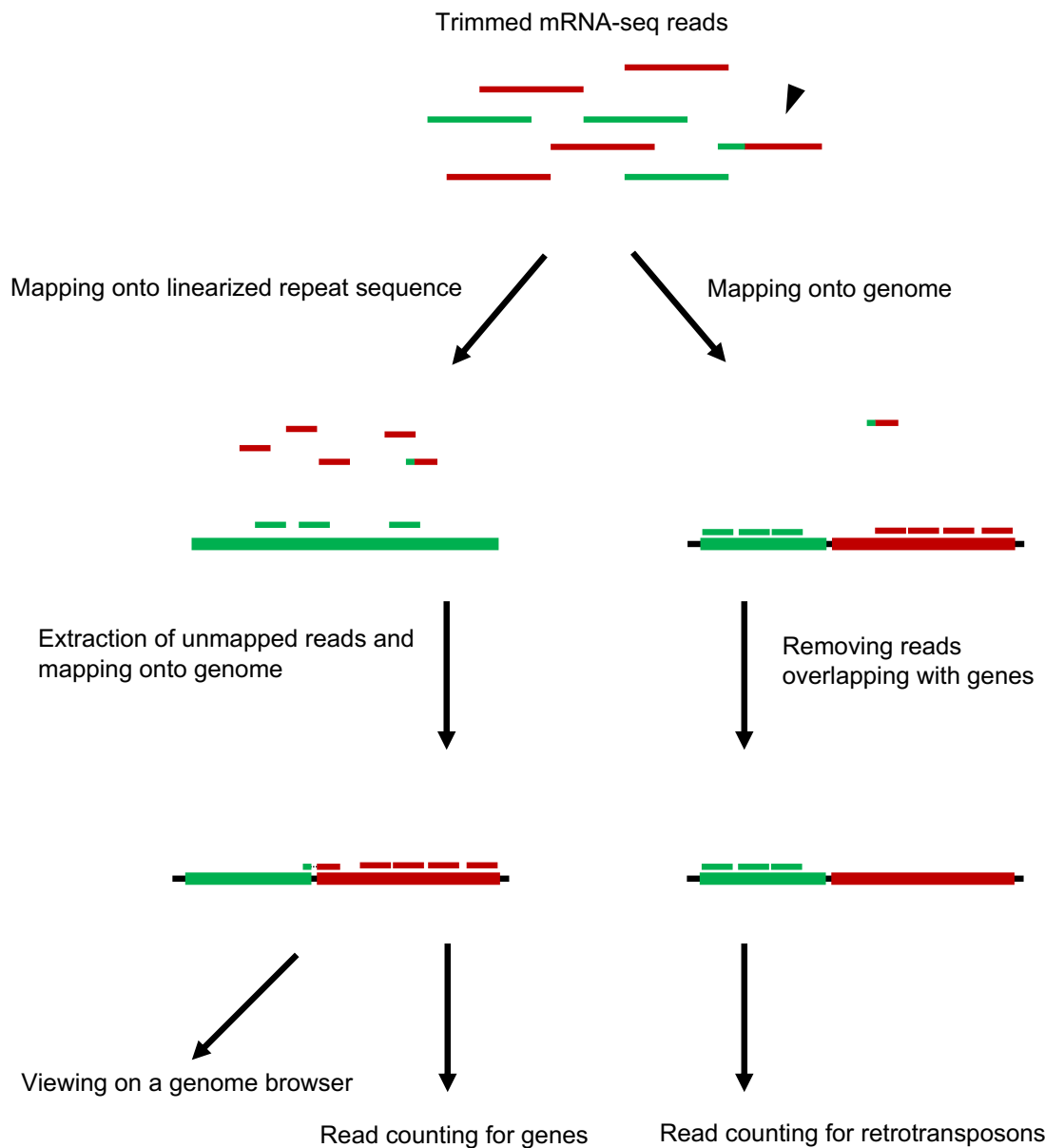


図 3-2 RNA-seqリードのマッピングの概略図

レトロトランスポゾンと遺伝子のリードカウントを分けて行うために、トリミング後のRNA-seqリードを2通りの手段でゲノムにマッピングした。矢頭はレトロトランスポゾン (緑色) と遺伝子 (赤色) の融合リードを示す。

表 3-1 *Asz1*欠損前精原細胞における発現変動遺伝子

Upregulated Genes in <i>Asz1</i> ^{-/-} gonocytes				
gene_id	logFC	logCPM	PValue	FDR
<i>Apoh</i>	6.878948413	5.221985484	1.51E-176	3.77E-173
<i>Cdh12</i>	8.455430749	4.08760179	1.02E-105	1.27E-102
<i>4930558C23Ri</i>	6.39170013	4.170575198	1.78E-85	1.71E-82
<i>Cbx5</i>	2.018563778	7.815994037	4.31E-66	2.99E-63
<i>Tfcp2l1</i>	2.739977581	5.731063559	6.72E-62	4.41E-59
<i>Gm16897</i>	4.970005103	3.691414756	4.21E-56	2.28E-53
<i>Gm9733</i>	10.7830501	2.705246602	4.50E-53	2.25E-50
<i>AW551984</i>	3.3243023	4.476366696	3.12E-52	1.44E-49
<i>Gylt1b</i>	1.853387873	6.906632313	6.19E-52	2.66E-49
<i>Ms4a6d</i>	5.702681183	3.501238671	1.21E-50	5.01E-48
<i>Cd93</i>	2.328995702	5.946600728	1.90E-50	7.63E-48
<i>Spag16</i>	3.1546635	4.248221306	1.42E-47	5.20E-45
<i>Fancd2</i>	1.481466228	7.426390773	2.11E-47	7.51E-45
<i>Mup3</i>	6.280450945	2.889254689	3.57E-45	1.20E-42
<i>Polr1a</i>	1.421762676	7.130481987	4.48E-44	1.47E-41
<i>Clec2g</i>	6.613373564	2.663453461	8.55E-43	2.73E-40
<i>Sult2a5</i>	7.517576155	2.64630744	1.46E-39	4.44E-37
<i>Abcb11</i>	4.258397681	3.853612986	5.14E-39	1.53E-36
<i>Tmppe</i>	1.65913114	5.901816993	2.10E-37	5.69E-35
<i>Bcl6b</i>	1.742332013	7.946346373	2.41E-37	6.38E-35
<i>Cd82</i>	1.391705393	6.90581052	1.13E-33	2.81E-31
<i>Sez6</i>	1.342760975	7.592840844	1.20E-33	2.92E-31
<i>AA792892</i>	10.10276467	2.047079382	3.12E-32	7.33E-30
<i>Itga7</i>	1.507861813	6.196044285	5.79E-31	1.30E-28
<i>Samd9l</i>	3.828193521	3.125649861	5.86E-31	1.30E-28
<i>Gm6329</i>	2.417542457	4.216055637	5.93E-31	1.30E-28
<i>Cntn6</i>	2.308806259	4.333004072	4.84E-29	1.02E-26
<i>Tmem232</i>	1.727112907	5.218415026	5.10E-29	1.06E-26
<i>Adtrp</i>	2.252262923	4.155897068	2.28E-28	4.59E-26
<i>Sidt1</i>	2.156112411	4.46114776	3.39E-28	6.70E-26
<i>BC051019</i>	3.423753034	2.8626333	4.28E-27	7.97E-25
<i>Wbp2nl</i>	2.658834028	3.395383633	9.65E-25	1.64E-22
<i>Gabrr1</i>	2.564932015	3.752886964	9.76E-25	1.64E-22
<i>Cdcl4b</i>	1.176459419	6.403641489	2.45E-24	3.97E-22

表 3-1 *Asz1*欠損前精原細胞における発現変動遺伝子

Upregulated Genes in <i>Asz1</i> ^{-/-} gonocytes				
<i>Cks2</i>	1.057437249	6.719633557	1.82E-22	2.80E-20
<i>E330020D12Ri</i>	3.939213647	2.017952162	2.01E-22	3.05E-20
<i>Atp13a4</i>	4.038669088	1.824105653	2.79E-22	4.18E-20
<i>Zfp72</i>	2.945133059	2.853621959	3.04E-22	4.52E-20
<i>Ryr1</i>	1.27748351	6.177256064	5.00E-22	7.32E-20
<i>Inadl</i>	1.335366469	6.067256348	2.72E-21	3.85E-19
<i>Six1</i>	1.809085311	4.395135106	4.04E-21	5.66E-19
<i>Gm14296</i>	2.290535417	3.594124156	7.21E-21	9.98E-19
<i>Gm6182</i>	2.290535244	3.594124156	7.29E-21	9.98E-19
<i>Cdkl4</i>	2.640506233	3.238317321	2.30E-20	3.11E-18
<i>Zfp53</i>	1.542754226	4.949909451	2.58E-20	3.46E-18
<i>Ripk3</i>	1.289119319	6.163744269	5.44E-20	7.06E-18
<i>Dpp4</i>	3.302164793	3.139736047	1.07E-19	1.35E-17
<i>Tmc2</i>	3.310774961	2.581228051	1.27E-19	1.56E-17
<i>Pdk1</i>	1.250539415	7.209829946	1.88E-19	2.30E-17
<i>4930481A15Ri</i>	2.99916371	2.286044514	4.71E-19	5.54E-17
<i>Hmmr</i>	1.63276152	4.740347485	1.81E-18	2.01E-16
<i>Ccdc127</i>	1.070089104	6.736816351	1.97E-18	2.18E-16
<i>Slc35e1</i>	1.188061731	5.609843615	2.88E-18	3.15E-16
<i>Eva1b</i>	1.228321453	5.470232811	3.42E-18	3.71E-16
<i>Gabpb2</i>	1.355983883	5.56472554	4.78E-18	5.05E-16
<i>Lpp</i>	1.09982804	6.169164647	7.88E-18	8.19E-16
<i>Mkl2</i>	1.108943129	5.750238152	3.19E-17	3.13E-15
<i>Plekho2</i>	1.136719047	5.99051292	1.70E-16	1.61E-14
<i>Gm14326</i>	2.105476609	3.830908554	2.68E-16	2.48E-14
<i>Naip5</i>	2.565978832	2.457867995	1.12E-15	1.01E-13
<i>Eps8l1</i>	2.225061901	3.026724386	1.45E-15	1.30E-13
<i>D17H6S56E-5</i>	1.305016977	4.799519598	1.83E-15	1.63E-13
<i>Rnf125</i>	1.94668788	3.911486278	1.88E-15	1.66E-13
<i>Scn7a</i>	2.101810384	4.425615289	4.74E-15	4.11E-13
<i>Zfp882</i>	2.16291833	3.215878273	8.39E-15	7.21E-13
<i>Flt4</i>	1.647520689	4.20891109	1.01E-14	8.60E-13
<i>Atp9b</i>	1.180219579	5.945644139	1.27E-14	1.05E-12
<i>Cyp20a1</i>	1.796097786	4.179305367	1.45E-14	1.19E-12
<i>Tek</i>	1.229297676	5.035466531	2.04E-14	1.63E-12

表 3-1 *Asz1*欠損前精原細胞における発現変動遺伝子

	Upregulated Genes in <i>Asz1</i> ^{-/-} gonocytes			
<i>Alx4</i>	2.039908912	3.247076365	3.15E-14	2.48E-12
<i>Colec12</i>	1.094315134	5.369052394	4.27E-14	3.29E-12
<i>Mfap3</i>	1.235701253	6.360574879	4.83E-14	3.67E-12
<i>Aig1</i>	1.174533499	5.612027382	6.89E-14	5.17E-12
<i>Nrros</i>	1.315037756	4.542874873	9.52E-14	7.02E-12
<i>Slc24a2</i>	1.651670398	4.105515527	9.79E-14	7.18E-12
<i>Sorcs2</i>	1.9070006	3.165777069	2.29E-13	1.61E-11
<i>Thbd</i>	2.709872641	2.862254607	5.22E-13	3.51E-11
<i>Fam219b</i>	1.333602749	4.727123235	6.72E-13	4.43E-11
<i>Slc43a2</i>	1.026164674	5.328445795	7.00E-13	4.59E-11
<i>Glrx2</i>	1.098386529	5.16768094	1.38E-12	8.60E-11
<i>C920006O11R</i>	1.90020331	3.125569632	3.39E-12	2.01E-10
<i>Xrcc2</i>	1.203779744	4.690683126	3.57E-12	2.11E-10
<i>Cercam</i>	1.289684426	4.324242777	3.92E-12	2.27E-10
<i>Gm14322</i>	1.899975629	2.970347753	4.15E-12	2.39E-10
<i>Creg2</i>	1.37854914	4.221714745	4.53E-12	2.60E-10
<i>Fam206a</i>	1.047167563	5.386528376	4.70E-12	2.69E-10
<i>Derl3</i>	1.368807653	4.151407287	4.77E-12	2.72E-10
<i>Nrip3</i>	1.35384107	4.153979474	5.35E-12	3.03E-10
<i>Clvs1</i>	2.30807337	1.989775181	8.38E-12	4.62E-10
<i>Zfp346</i>	1.024677848	5.761654407	1.20E-11	6.34E-10
<i>Ccnb3</i>	1.062146867	5.744261152	1.36E-11	7.10E-10
<i>Tmem40</i>	2.821669444	1.807308508	2.00E-11	1.03E-09
<i>Orai3</i>	1.26942028	5.301319726	2.57E-11	1.30E-09
<i>6820431F20Ri</i>	1.590781246	3.497477621	2.59E-11	1.30E-09
<i>Zfp953</i>	1.938308658	2.582870212	3.28E-11	1.62E-09
<i>Kndc1</i>	1.889664574	3.739199457	3.84E-11	1.85E-09
<i>Gm6710</i>	1.713021117	3.584973587	3.93E-11	1.87E-09
<i>Fstl4</i>	1.302137493	4.900486687	3.95E-11	1.87E-09
<i>Fam84b</i>	1.374884263	4.304361473	5.22E-11	2.41E-09
<i>Gm14325</i>	1.852415991	3.34840605	5.46E-11	2.51E-09
<i>Tomm7</i>	1.008757365	5.057655391	6.17E-11	2.79E-09
<i>Upk1b</i>	1.23701421	4.379436741	6.82E-11	3.07E-09
<i>Myof</i>	1.031050976	5.883526865	7.05E-11	3.14E-09
<i>9330102E08Ri</i>	1.480687883	3.675169323	9.76E-11	4.25E-09

表 3-1 *Asz1*欠損前精原細胞における発現変動遺伝子

	Upregulated Genes in <i>Asz1</i> ^{-/-} gonocytes			
<i>Ano4</i>	1.609099435	3.609797216	1.03E-10	4.47E-09
<i>Mtap7d3</i>	1.24712339	4.394031547	1.07E-10	4.60E-09
<i>Col22a1</i>	1.216963386	4.609465869	1.25E-10	5.29E-09
<i>Nuggc</i>	2.483793701	2.303466458	1.25E-10	5.29E-09
<i>Pamr1</i>	2.683204261	1.869837098	1.31E-10	5.52E-09
<i>Tmem53</i>	1.23699345	4.230476686	1.38E-10	5.78E-09
<i>Cdk5rap1</i>	1.121357904	5.322059107	1.85E-10	7.57E-09
<i>A4galt</i>	1.985562532	2.99309293	2.13E-10	8.63E-09
<i>L1cam</i>	1.335368388	4.16411868	2.15E-10	8.68E-09
<i>Cyp1b1</i>	1.997390273	2.793670858	2.40E-10	9.64E-09
<i>Pnpla1</i>	1.028972843	4.945891382	3.55E-10	1.38E-08
<i>Ky</i>	2.009415118	2.198538619	4.29E-10	1.62E-08
<i>Glyctk</i>	1.103638835	5.087334733	5.67E-10	2.11E-08
<i>Fam109b</i>	1.992533044	2.210396453	5.86E-10	2.17E-08
<i>2610005L07Ri</i>	1.602376659	3.199236037	8.30E-10	2.99E-08
<i>Ccdc28b</i>	2.146670318	1.938426921	9.14E-10	3.28E-08
<i>Slc5a4a</i>	1.832016959	2.550841749	1.22E-09	4.29E-08
<i>Rassf4</i>	1.153888519	4.19106707	1.37E-09	4.77E-08
<i>Ap5b1</i>	2.036110482	2.476569534	1.41E-09	4.90E-08
<i>Gm14430</i>	1.803145601	2.432332824	1.85E-09	6.24E-08
<i>Gm4724</i>	1.803145482	2.432332824	1.86E-09	6.25E-08
<i>Gm14308</i>	1.803145447	2.432332824	1.86E-09	6.25E-08
<i>Gm14434</i>	1.803145433	2.432332824	1.87E-09	6.25E-08
<i>0610010B08Ri</i>	1.803145354	2.432332824	1.87E-09	6.26E-08
<i>4932435O22Ri</i>	2.214371584	2.294721892	2.21E-09	7.30E-08
<i>B430306N03Ri</i>	1.105073475	4.407062064	2.55E-09	8.33E-08
<i>Mertk</i>	1.246015916	4.21303606	2.91E-09	9.40E-08
<i>Cdh26</i>	2.228228034	2.280491755	5.05E-09	1.55E-07
<i>Pars2</i>	1.450210105	3.7655722	5.78E-09	1.75E-07
<i>Ttc26</i>	1.168066093	4.060757721	6.41E-09	1.92E-07
<i>4930539E08Ri</i>	1.261436016	3.714070527	6.79E-09	2.02E-07
<i>Gm14403</i>	1.787971954	2.615873075	7.24E-09	2.15E-07
<i>Srxn1</i>	1.46551236	3.539548588	7.63E-09	2.26E-07
<i>Il10ra</i>	1.807215517	2.697417664	8.72E-09	2.53E-07
<i>Adra2a</i>	1.621951294	2.677327796	9.50E-09	2.73E-07

表 3-1 *Asz1*欠損前精原細胞における発現変動遺伝子

	Upregulated Genes in <i>Asz1</i> ^{-/-} gonocytes			
<i>Tigd3</i>	1.538065182	3.054812126	1.13E-08	3.22E-07
<i>Adgrv1</i>	1.126345314	4.790945827	1.14E-08	3.26E-07
<i>Ttc38</i>	1.313701247	3.868719366	1.26E-08	3.55E-07
<i>Slc7a4</i>	1.499403134	3.442045044	1.35E-08	3.76E-07
<i>Sspn</i>	1.500625689	3.170298613	1.44E-08	3.99E-07
<i>Slc29a3</i>	1.237026607	3.710490175	1.86E-08	5.03E-07
<i>Rspo2</i>	1.199803626	3.874715369	2.03E-08	5.43E-07
<i>Cep128</i>	1.149737104	4.005170394	2.14E-08	5.66E-07
<i>H6pd</i>	1.95792891	2.317227423	2.22E-08	5.85E-07
<i>Exoc8</i>	1.021928286	4.353363158	2.60E-08	6.78E-07
<i>Ccdc28a</i>	1.173701586	3.821559665	2.63E-08	6.84E-07
<i>Ube2u</i>	1.618146101	2.889738955	3.82E-08	9.61E-07
<i>Pkhd1</i>	1.90150379	2.351177837	3.84E-08	9.64E-07
<i>Neil3</i>	1.374960639	3.658984038	4.03E-08	1.01E-06
<i>Cbln2</i>	1.159147563	3.841616096	4.55E-08	1.13E-06
<i>Eomes</i>	1.087235668	4.45311294	4.67E-08	1.15E-06
<i>Upp2</i>	1.594542236	2.832709727	5.46E-08	1.32E-06
<i>OTTMUSG00l</i>	1.662663423	2.229277958	6.21E-08	1.49E-06
<i>Fam19a4</i>	1.618129105	2.38907559	7.21E-08	1.70E-06
<i>Zfp119a</i>	1.371464776	3.194227356	7.48E-08	1.75E-06
<i>Htra1</i>	1.292155503	3.983688966	8.25E-08	1.91E-06
<i>Cnr1</i>	1.036999313	4.269372249	9.15E-08	2.09E-06
<i>Sstr5</i>	1.155934498	4.659849987	9.54E-08	2.16E-06
<i>Kcnc2</i>	1.363171868	4.23329407	1.01E-07	2.25E-06
<i>Gm14391</i>	1.565042292	2.629257294	1.03E-07	2.29E-06
<i>Xkrx</i>	1.503450501	3.076968571	1.17E-07	2.57E-06
<i>Zfp931</i>	1.604475939	2.39544803	1.65E-07	3.51E-06
<i>BC026585</i>	1.196216554	4.001713937	2.38E-07	4.87E-06
<i>Cptp</i>	1.084528406	4.419190462	2.47E-07	5.00E-06
<i>Gpa33</i>	1.448640192	2.628711405	2.49E-07	5.03E-06
<i>Kdm8</i>	1.074631447	3.84845379	2.72E-07	5.46E-06
<i>Bik</i>	1.117702603	4.131387824	2.88E-07	5.78E-06
<i>Deptor</i>	1.136339119	3.952546785	3.38E-07	6.62E-06
<i>Efcab6</i>	1.399421331	3.078969545	3.40E-07	6.65E-06
<i>Cntn2</i>	1.753825557	2.373414644	4.12E-07	7.92E-06

表 3-1 *Asz1*欠損前精原細胞における発現変動遺伝子

Upregulated Genes in <i>Asz1</i> ^{-/-} gonocytes				
<i>Pld1</i>	1.318504605	3.178346159	4.63E-07	8.80E-06
<i>Dffa</i>	1.048843956	4.108659095	4.74E-07	8.99E-06
<i>2610524H06Ri</i>	1.572730355	3.326888087	5.29E-07	9.90E-06
<i>2410012E07Ri</i>	1.457457724	2.661939508	5.71E-07	1.06E-05
<i>Slc10a4</i>	1.452172554	2.683150478	5.73E-07	1.07E-05
<i>Tagln</i>	1.207345553	3.312925534	6.23E-07	1.14E-05
<i>Zfp820</i>	1.146819848	3.643085719	6.27E-07	1.15E-05
<i>Rltpr</i>	1.002967548	3.986994155	7.05E-07	1.27E-05
<i>St8sia5</i>	1.191828606	3.791089856	7.19E-07	1.29E-05
<i>Spag6</i>	1.295349656	3.168357354	7.53E-07	1.34E-05
<i>Fras1</i>	1.163831586	3.34501623	7.84E-07	1.39E-05
<i>Mfsd4</i>	1.128169616	3.505585007	8.45E-07	1.48E-05
<i>Sec14l4</i>	2.082451976	2.078265488	8.68E-07	1.51E-05
<i>Sppl2b</i>	1.110246866	4.797981971	9.13E-07	1.58E-05
<i>Pax9</i>	1.643349003	3.364480985	9.66E-07	1.66E-05
<i>Exog</i>	1.044798955	4.102114447	1.06E-06	1.81E-05
<i>Actc1</i>	1.788798025	2.241126604	1.08E-06	1.84E-05
<i>Gm9112</i>	1.604872942	2.145140903	1.17E-06	1.97E-05
<i>Map6d1</i>	1.231916445	3.181393195	1.19E-06	2.00E-05
<i>Syn3</i>	1.100095359	3.939358809	1.23E-06	2.07E-05
<i>Ybey</i>	1.366501211	3.307984042	1.29E-06	2.15E-05
<i>Fem1a</i>	1.418924517	3.154640728	1.30E-06	2.16E-05
<i>Gm5091</i>	1.103743799	3.540765395	1.57E-06	2.55E-05
<i>Hs3st1</i>	1.151478303	3.403253158	1.70E-06	2.73E-05
<i>Fam46b</i>	1.2201427	3.568354555	1.88E-06	2.97E-05
<i>Kcnh1</i>	1.226949846	3.088209242	1.95E-06	3.07E-05
<i>Fgf9</i>	1.154712668	3.418441326	1.99E-06	3.13E-05
<i>Klhl26</i>	1.632383357	2.992417056	2.20E-06	3.41E-05
<i>D430020J02Ri</i>	1.472752508	2.324484409	2.58E-06	3.91E-05
<i>Cyp2u1</i>	1.031461412	3.758409684	2.59E-06	3.92E-05
<i>Lca5l</i>	1.310010259	2.831363302	2.83E-06	4.23E-05
<i>Nrn1l</i>	1.113688346	3.878106906	2.87E-06	4.26E-05
<i>Cfb</i>	1.496688602	2.285310417	2.97E-06	4.39E-05
<i>Nos2</i>	1.47753506	2.353283075	3.00E-06	4.44E-05
<i>Etoh1l</i>	1.511704342	2.084700188	3.35E-06	4.91E-05

表 3-1 *Asz1*欠損前精原細胞における発現変動遺伝子

Upregulated Genes in <i>Asz1</i> ^{-/-} gonocytes				
<i>Dnah7b</i>	1.15740127	3.741906255	3.45E-06	5.04E-05
<i>Fitm2</i>	1.097043547	3.565134219	4.27E-06	6.08E-05
<i>Zbtb20</i>	1.023951323	4.737039197	4.29E-06	6.10E-05
<i>Abcc10</i>	1.159456406	3.361169208	5.08E-06	7.06E-05
<i>Pde4c</i>	1.348698095	2.463586641	6.22E-06	8.48E-05
<i>Zfp799</i>	1.044849056	3.885879906	6.28E-06	8.54E-05
<i>Lhfp15</i>	1.50352199	2.072222075	6.80E-06	9.12E-05
<i>Tecpr2</i>	1.113070065	3.99615531	7.20E-06	9.62E-05
<i>Alg6</i>	1.324115765	2.63835416	7.94E-06	0.000104515
<i>Itpr11</i>	1.002213747	3.658017416	8.07E-06	0.000105952
<i>9830147E19Ri</i>	1.181639729	3.189539996	8.79E-06	0.000114266
<i>Slc18a3</i>	1.196033475	3.109297058	9.18E-06	0.000118685
<i>Zdhhc25</i>	1.862615961	2.126495145	1.00E-05	0.000127605
<i>Depdc1a</i>	1.205255263	3.645469848	1.02E-05	0.000129546
<i>Smug1</i>	1.257863236	3.115897475	1.12E-05	0.000140897
<i>Slc38a3</i>	1.217295735	3.121305589	1.33E-05	0.000161632
<i>9930014A18Ri</i>	1.134233764	3.29782838	1.36E-05	0.00016498
<i>Mas1</i>	1.326148624	2.408048441	1.36E-05	0.00016541
<i>Htr3a</i>	1.321254926	2.694156335	1.45E-05	0.000175283
<i>Efcab8</i>	1.648376215	2.599383686	1.73E-05	0.000203691
<i>Tmem176b</i>	1.336545999	3.250804449	2.42E-05	0.000274223
<i>Rasl10b</i>	1.11164288	3.354296872	2.54E-05	0.000284821
<i>Gm3604</i>	1.217245283	3.155951964	2.84E-05	0.000314673
<i>Mfsd3</i>	1.166480387	2.977894708	3.10E-05	0.000339991
<i>Dram1</i>	1.111280107	3.026687889	3.15E-05	0.000343759
<i>Slfn9</i>	1.036327467	3.271604669	3.61E-05	0.000387779
<i>Pllp</i>	1.248210685	2.235899839	3.85E-05	0.000407834
<i>Glmpl</i>	1.308967884	3.298775123	3.90E-05	0.00041209
<i>Ctdsp1</i>	1.000729557	3.330060403	4.32E-05	0.000451405
<i>D030018L15Ri</i>	1.344112093	2.335215383	4.39E-05	0.000457543
<i>Scg5</i>	1.224101462	2.771352498	4.46E-05	0.000461087
<i>Hsd17b11</i>	1.226067966	2.219883213	4.76E-05	0.000488708
<i>A530064D06Ri</i>	1.021207935	3.316274949	4.84E-05	0.000495624
<i>Prort3</i>	1.11613185	2.6643065	5.21E-05	0.000527539
<i>AA414768</i>	1.319539541	2.15747887	5.53E-05	0.000554877

表 3-1 *Asz1*欠損前精原細胞における発現変動遺伝子

	Upregulated Genes in <i>Asz1</i> ^{-/-} gonocytes			
<i>Ctag2</i>	1.245944988	2.525552689	6.12E-05	0.000603371
<i>Afmid</i>	1.215942667	2.459693674	7.55E-05	0.000723527
<i>Ccdc155</i>	1.203683951	2.143335797	8.02E-05	0.000763414
<i>Rhbd11</i>	1.223157855	1.996397651	8.04E-05	0.000763934
<i>Cdh20</i>	1.004828951	2.986981408	9.45E-05	0.000875467
<i>Gm5113</i>	1.027048261	3.167571642	0.000102691	0.000940366
<i>Pla2g2d</i>	1.165954257	2.53962099	0.000110626	0.000999807
<i>Pts</i>	1.044176827	3.543799183	0.000117361	0.001053035
<i>Sfil</i>	1.452915344	2.687193436	0.000131762	0.001158896
<i>Gcnt1</i>	1.028948312	3.632225136	0.000152052	0.001306917
<i>Btnl9</i>	1.075340174	2.444742063	0.000186228	0.001551442
<i>Tspyl3</i>	1.015087079	2.689943178	0.00018895	0.001568875
<i>Ankrd42</i>	1.006143672	3.044369942	0.000193706	0.001603025
<i>Gdap1</i>	1.099819312	2.588518855	0.000226551	0.001831067
<i>Pomgnt2</i>	1.109991599	2.480585214	0.000257197	0.002027481
<i>I700011M02R</i>	1.086533792	2.413646977	0.000262462	0.002061159
<i>Vipr1</i>	1.025167574	3.287075428	0.000268753	0.002102338
<i>Gm5878</i>	1.216457072	2.565531055	0.000272645	0.002127726
<i>Acer2</i>	1.079824935	2.409970961	0.000291412	0.002248837
<i>Gm13238</i>	1.050649833	2.626741606	0.000304738	0.002332894
<i>Vrtn</i>	1.192566631	1.983092421	0.000311795	0.002373794
<i>Pik3r5</i>	1.171833466	3.541364162	0.000325511	0.002461674
<i>Them6</i>	1.029497711	2.585466027	0.00034148	0.002554541
<i>Azin2</i>	1.052200936	2.672029349	0.000413116	0.002996896
<i>Tmem202</i>	1.068658932	2.099225165	0.000433515	0.003126679
<i>Car4</i>	1.146078229	2.239751469	0.000437466	0.003149706
<i>Slc16a9</i>	1.009389167	2.846799168	0.000522592	0.003636555
<i>Ulbp1</i>	1.03260766	2.26267478	0.000576102	0.003945032
<i>Wdfy2</i>	1.087179785	2.870085473	0.000604861	0.004099174
<i>Cnga3</i>	1.13936383	2.963513648	0.000986745	0.006097077
<i>Zfp345</i>	1.011680748	2.483009264	0.001458426	0.00843563

表 3-1 *Asz1*欠損前精原細胞における発現変動遺伝子

Downregulated Genes in <i>Asz1</i> ^{-/-} gonocytes				
gene_id	logFC	logCPM	PValue	FDR
<i>Asz1</i>	-7.511076592	6.669713893	0	0
<i>Lmna</i>	-1.82673299	7.866476207	9.20E-62	5.73E-59
<i>Inha</i>	-2.853643845	4.469705223	1.95E-45	6.75E-43
<i>Adgrg1</i>	-1.600089495	6.27491838	9.02E-37	2.34E-34
<i>Magea8</i>	-1.763756705	5.931056523	4.93E-34	1.25E-31
<i>Chic2</i>	-1.183500554	7.524965834	2.05E-30	4.40E-28
<i>Ehmt2</i>	-1.268815243	7.926106685	4.92E-28	9.57E-26
<i>Axl</i>	-1.552368041	5.510480347	2.27E-24	3.72E-22
<i>Ecm1</i>	-1.177318829	6.646193246	3.07E-23	4.84E-21
<i>Magea5</i>	-1.502391119	5.143487377	5.05E-22	7.32E-20
<i>Cftr</i>	-3.763840081	3.581759431	4.55E-20	6.03E-18
<i>Sdc3</i>	-1.194964205	6.665647187	1.26E-19	1.56E-17
<i>Gstm2</i>	-2.014918743	4.038237294	1.51E-18	1.71E-16
<i>Gpd2</i>	-1.333377556	5.183212307	1.73E-18	1.94E-16
<i>Sult5a1</i>	-1.183224472	5.804409936	2.31E-17	2.30E-15
<i>Cst9</i>	-3.804787803	1.620943776	8.78E-17	8.42E-15
<i>Prss35</i>	-2.743025715	2.351089185	2.99E-16	2.74E-14
<i>Garnl3</i>	-1.074189573	5.997173124	8.06E-16	7.33E-14
<i>Dscaml1</i>	-1.239313602	5.250639271	3.09E-14	2.45E-12
<i>Hsd17b1</i>	-2.759212384	1.769804784	3.24E-14	2.54E-12
<i>Haus7</i>	-1.17837567	5.010450441	3.28E-14	2.56E-12
<i>Magea3</i>	-1.97239073	3.162692025	7.00E-14	5.22E-12
<i>Gm773</i>	-1.05199446	5.81735223	1.13E-13	8.21E-12
<i>Prdx2</i>	-1.0772495	5.35289998	1.54E-13	1.09E-11
<i>Lama4</i>	-1.367177161	4.618406055	3.03E-13	2.08E-11
<i>Hcfe2</i>	-1.045951426	5.363817016	3.65E-13	2.48E-11
<i>Arap3</i>	-1.386219594	4.15351421	6.48E-13	4.29E-11
<i>Bcar3</i>	-1.154973687	4.795126585	1.64E-12	1.01E-10
<i>Cdkn1a</i>	-1.157186825	4.689873957	3.72E-12	2.19E-10
<i>Jam2</i>	-2.263242336	2.277760631	3.81E-12	2.22E-10
<i>Bhlhe40</i>	-1.05976595	5.363408486	7.17E-12	3.99E-10
<i>Luzp4</i>	-1.012459206	5.237896167	8.51E-12	4.67E-10
<i>Tmem184a</i>	-1.320909173	4.181808432	9.12E-12	4.99E-10
<i>Fbln1</i>	-1.18046478	6.167725878	9.29E-12	5.05E-10

表 3-1 *Asz1*欠損前精原細胞における発現変動遺伝子

Downregulated Genes in <i>Asz1</i> ^{-/-} gonocytes				
<i>Gm1140</i>	-1.722090937	3.673075463	1.01E-11	5.47E-10
<i>Pet2</i>	-1.713323374	4.349960336	1.02E-11	5.50E-10
<i>Amh</i>	-2.572667043	2.334443976	1.12E-11	5.96E-10
<i>Mslnl</i>	-2.171884671	2.851025312	2.10E-11	1.07E-09
<i>Wnt3</i>	-1.037474407	5.00873306	2.25E-11	1.14E-09
<i>Magea2</i>	-1.653433761	3.730371009	2.79E-11	1.40E-09
<i>Etfb</i>	-1.166037258	4.632972568	2.88E-11	1.44E-09
<i>Aldh1a1</i>	-2.575266288	3.354151466	3.28E-11	1.62E-09
<i>Gatm</i>	-1.272743548	4.405458069	4.36E-11	2.03E-09
<i>Magea1</i>	-1.771434304	2.980431112	5.15E-11	2.39E-09
<i>Akr1cl</i>	-2.182787456	2.402708094	5.85E-11	2.67E-09
<i>Sl100a6</i>	-1.235055263	4.624746002	6.26E-11	2.83E-09
<i>Gjal</i>	-2.086062406	3.370133048	6.97E-11	3.11E-09
<i>Egr3</i>	-1.521727853	3.788057414	8.42E-11	3.72E-09
<i>Gm14692</i>	-1.697127122	3.307001101	9.76E-11	4.25E-09
<i>Hnrnp3</i>	-1.158426322	4.401375162	1.10E-10	4.73E-09
<i>1700029J07Rik</i>	-1.642517524	3.221229332	1.51E-10	6.26E-09
<i>Kctd14</i>	-2.238558363	2.379455494	2.14E-10	8.67E-09
<i>Erdr1</i>	-2.601986716	2.002423678	2.67E-10	1.06E-08
<i>Def8</i>	-1.321538659	3.98152964	2.90E-10	1.14E-08
<i>Nxt2</i>	-1.70580542	2.824384797	3.60E-10	1.39E-08
<i>Igdcc4</i>	-1.102560101	4.392772672	6.16E-10	2.26E-08
<i>Rhox13</i>	-1.038715981	4.733554719	6.45E-10	2.36E-08
<i>Speg</i>	-1.423787115	3.4288845	9.33E-10	3.34E-08
<i>Rara</i>	-1.019734461	4.659318938	9.85E-10	3.50E-08
<i>Pnma5</i>	-1.311094668	3.897967612	1.18E-09	4.17E-08
<i>Adgrg6</i>	-1.39239377	3.967384213	1.29E-09	4.51E-08
<i>Sbsn</i>	-1.885347995	2.802271213	1.76E-09	5.99E-08
<i>Gngt2</i>	-1.302732843	4.063231051	2.04E-09	6.76E-08
<i>Scd1</i>	-1.389523549	3.774916348	2.41E-09	7.93E-08
<i>Cntnap4</i>	-1.588884361	2.932603695	2.69E-09	8.76E-08
<i>Myh8</i>	-1.399689206	3.892469262	2.76E-09	8.95E-08
<i>Gm15097</i>	-1.118795847	4.303480935	3.19E-09	1.02E-07
<i>Rufy2</i>	-1.092432633	4.335041972	4.07E-09	1.28E-07
<i>Postn</i>	-1.54486726	3.221298543	4.11E-09	1.29E-07

表 3-1 *Asz1*欠損前精原細胞における発現変動遺伝子

Downregulated Genes in <i>Asz1</i> ^{-/-} gonocytes				
<i>Aard</i>	-1.562999402	2.912878791	4.13E-09	1.29E-07
<i>Trim47</i>	-1.398049338	3.570897763	4.43E-09	1.37E-07
<i>Thbs2</i>	-1.018389996	4.508034395	5.39E-09	1.64E-07
<i>Lgals7</i>	-1.168275007	4.3791012	5.51E-09	1.67E-07
<i>Hspb7</i>	-1.429441254	3.326143994	6.57E-09	1.96E-07
<i>Tep1</i>	-1.107029154	4.111192415	1.02E-08	2.92E-07
<i>Lad1</i>	-1.003749983	4.978908395	1.21E-08	3.44E-07
<i>Itih2</i>	-2.044767894	2.06307087	1.45E-08	4.02E-07
<i>Igsf9b</i>	-1.282736357	3.703362471	1.55E-08	4.26E-07
<i>Brcc3</i>	-1.005172187	4.387812738	1.66E-08	4.52E-07
<i>Pdk4</i>	-2.083392115	2.25206301	1.67E-08	4.54E-07
<i>Crygs</i>	-1.440974578	3.379283307	1.95E-08	5.25E-07
<i>Hsd17b10</i>	-1.108577713	4.032609851	1.97E-08	5.28E-07
<i>Bcat2</i>	-1.274945018	3.747193961	2.11E-08	5.60E-07
<i>Magea6</i>	-1.64095265	3.310981824	2.92E-08	7.52E-07
<i>Mid1</i>	-1.647663286	2.381849053	3.30E-08	8.42E-07
<i>Magea10</i>	-1.001409641	4.471860554	4.28E-08	1.07E-06
<i>Gata4</i>	-1.264345197	3.643267919	4.82E-08	1.18E-06
<i>Sfn</i>	-1.174453782	3.882857352	4.84E-08	1.19E-06
<i>Rcor1</i>	-1.467110143	4.092530282	6.11E-08	1.47E-06
<i>Cd68</i>	-1.455829321	3.126641783	6.36E-08	1.52E-06
<i>Crtam</i>	-1.583072902	2.996626774	7.58E-08	1.77E-06
<i>Dnajc6</i>	-1.001519415	4.28504018	9.61E-08	2.17E-06
<i>Vwal</i>	-1.825406201	2.293482679	9.88E-08	2.22E-06
<i>Sparc</i>	-1.52391378	5.300221447	1.18E-07	2.60E-06
<i>Tmem160</i>	-1.005371597	4.156803959	1.24E-07	2.70E-06
<i>Kctd15</i>	-1.532482884	2.543318488	1.39E-07	2.99E-06
<i>Cd300lb</i>	-1.688101844	2.44068325	1.42E-07	3.05E-06
<i>Inhbb</i>	-1.591252688	2.524251367	1.65E-07	3.51E-06
<i>Gabra2</i>	-1.717625956	2.527158109	1.86E-07	3.91E-06
<i>Endod1</i>	-1.304583171	3.221846328	1.88E-07	3.94E-06
<i>Col6a5</i>	-1.119346455	3.939198302	2.02E-07	4.21E-06
<i>Qprt</i>	-1.043896686	3.910558414	2.09E-07	4.33E-06
<i>Cfi</i>	-1.387447521	2.786816253	3.01E-07	6.00E-06
<i>Tnfrsf11a</i>	-1.727192003	2.045975803	3.06E-07	6.08E-06

表 3-1 *Asz1*欠損前精原細胞における発現変動遺伝子

Downregulated Genes in <i>Asz1</i> ^{-/-} gonocytes				
<i>Efhdl1</i>	-1.578865275	1.912980633	5.86E-07	1.09E-05
<i>Trim46</i>	-1.165903997	3.377879415	5.91E-07	1.09E-05
<i>AI607873</i>	-1.815353178	2.186646278	6.54E-07	1.19E-05
<i>S100a3</i>	-1.544130323	2.448272474	6.69E-07	1.21E-05
<i>Tmem80</i>	-1.645645346	2.552631718	9.86E-07	1.69E-05
<i>Apoa1</i>	-1.366265275	2.683470788	1.25E-06	2.09E-05
<i>Sult1c1</i>	-1.482018615	2.858668436	1.32E-06	2.20E-05
<i>Pla2g1b</i>	-1.387799537	2.491522402	1.36E-06	2.26E-05
<i>S100a16</i>	-1.191089217	3.636742245	1.51E-06	2.46E-05
<i>Adgrfl</i>	-1.363707352	2.59825608	1.61E-06	2.60E-05
<i>Dab2</i>	-1.303712936	3.299518518	1.61E-06	2.60E-05
<i>Ror2</i>	-1.027281264	5.009705163	1.75E-06	2.80E-05
<i>Gucy2g</i>	-1.534726473	1.924384422	1.91E-06	3.02E-05
<i>Cpeb2</i>	-1.147352916	4.517889042	2.07E-06	3.23E-05
<i>S100a13</i>	-1.589756561	2.127002158	2.08E-06	3.24E-05
<i>Gpc6</i>	-1.381550515	2.879244697	2.25E-06	3.45E-05
<i>Klhl32</i>	-1.052180619	3.669620973	2.52E-06	3.83E-05
<i>Sox9</i>	-1.631479584	2.140426104	2.57E-06	3.90E-05
<i>Abca8a</i>	-1.190771561	3.680181933	2.78E-06	4.17E-05
<i>Cpe</i>	-1.185619824	4.050898046	2.85E-06	4.24E-05
<i>Sh3bp5</i>	-1.228518998	3.244835578	3.29E-06	4.84E-05
<i>Nat14</i>	-1.487057569	2.087734714	3.82E-06	5.53E-05
<i>Phf2</i>	-1.101565307	3.486428936	4.05E-06	5.82E-05
<i>Tnnt2</i>	-1.585638627	2.30261816	4.10E-06	5.88E-05
<i>1110001J03Rik</i>	-1.408020179	2.90008726	4.73E-06	6.68E-05
<i>Zfp326</i>	-1.216442538	3.241580637	4.75E-06	6.68E-05
<i>1700012D01Ri</i>	-1.406769568	2.261953389	4.95E-06	6.89E-05
<i>Bcd1</i>	-1.505723684	2.173209794	4.96E-06	6.89E-05
<i>Cadm4</i>	-1.304421107	3.709156427	5.76E-06	7.94E-05
<i>Tnfaip2</i>	-1.22105508	2.752159862	5.87E-06	8.06E-05
<i>Trim52</i>	-1.085476387	3.547932431	5.96E-06	8.16E-05
<i>Vrk2</i>	-1.084079221	3.349240336	6.63E-06	8.94E-05
<i>Ier5</i>	-1.052424299	3.767207174	7.32E-06	9.74E-05
<i>Shc4</i>	-1.059060488	4.089025868	7.62E-06	0.000100548
<i>RbmX</i>	-1.257216605	2.803211241	8.44E-06	0.000110099

表 3-1 *Asz1*欠損前精原細胞における発現変動遺伝子

Downregulated Genes in <i>Asz1</i> ^{-/-} gonocytes				
<i>1700021F07Ri</i>	-1.111293903	3.197360557	8.93E-06	0.000115837
<i>Syt7</i>	-1.46689917	2.11843069	1.05E-05	0.000132776
<i>Sfxn1</i>	-1.075980651	3.569320322	1.06E-05	0.000134445
<i>St8sia3</i>	-1.033749486	3.532892231	1.08E-05	0.000136796
<i>Zp2</i>	-1.622417513	2.116603779	1.12E-05	0.000140897
<i>Thra</i>	-1.241812409	2.642747362	1.15E-05	0.000144005
<i>Pfkfb3</i>	-1.02869473	3.940090245	1.18E-05	0.000147282
<i>BC021891</i>	-1.251876358	2.571038324	1.24E-05	0.000153421
<i>Pros1</i>	-1.370734303	2.518063289	1.26E-05	0.000155295
<i>Slc27a5</i>	-1.319648074	2.34575045	1.55E-05	0.000185361
<i>Ccser1</i>	-1.113100792	3.180964813	1.72E-05	0.000202295
<i>4931414P19Ri</i>	-1.336742749	2.225274363	1.82E-05	0.000213474
<i>Vsx1</i>	-1.097885043	3.018128943	2.12E-05	0.000245004
<i>Anxa5</i>	-1.077964133	3.35088114	2.16E-05	0.00024888
<i>Col6a1</i>	-1.533871688	3.574563026	2.33E-05	0.000266028
<i>Klf6</i>	-1.019596167	3.687990958	2.69E-05	0.000299345
<i>Morn2</i>	-1.062903418	3.09126621	3.10E-05	0.000339991
<i>Mtmr1</i>	-1.17764103	3.598475052	3.66E-05	0.000391536
<i>Tnni1</i>	-1.095580219	3.215059886	4.00E-05	0.000421525
<i>Nap1l3</i>	-1.259893873	2.266219728	4.04E-05	0.000424128
<i>Cst12</i>	-1.425465614	2.11639317	4.41E-05	0.000458077
<i>Snap25</i>	-1.160102168	2.421377564	5.60E-05	0.000560464
<i>Cdhr2</i>	-1.287817914	2.636088132	5.67E-05	0.000565947
<i>Tbx4</i>	-1.061219863	3.553120139	5.71E-05	0.00056844
<i>Adora1</i>	-1.183875031	2.899596071	6.10E-05	0.000601137
<i>Il10rb</i>	-1.203951516	2.29521513	6.21E-05	0.000609257
<i>Col5a2</i>	-1.50851087	2.345250575	7.76E-05	0.00074101
<i>Ptprz1</i>	-1.294095075	3.16857482	8.90E-05	0.000835551
<i>Srcin1</i>	-1.204827921	2.689435761	9.28E-05	0.000864443
<i>Vamp8</i>	-1.036136062	2.995776259	9.32E-05	0.000866535
<i>Trps1</i>	-1.171096345	2.175319047	9.34E-05	0.00086798
<i>Fam131b</i>	-1.031609588	3.231546677	9.69E-05	0.000892919
<i>Cd3e</i>	-1.474034902	2.273082675	0.000118326	0.001057893
<i>5031425E22Ri</i>	-1.216628741	2.181003811	0.000124112	0.001102503
<i>Slc7a10</i>	-1.162571158	2.115760958	0.000125818	0.001114481

表 3-1 *Asz1*欠損前精原細胞における発現変動遺伝子

Downregulated Genes in <i>Asz1</i> ^{-/-} gonocytes				
<i>Sorbs2</i>	-1.070670707	2.722129147	0.000137542	0.001203778
<i>Gm13544</i>	-1.257030143	2.507080224	0.000138441	0.00120995
<i>Cfap69</i>	-1.120723581	2.947032353	0.000139183	0.001215584
<i>Dusp27</i>	-1.145264892	2.34864267	0.00014349	0.001247952
<i>Nfix</i>	-1.268351042	3.024879097	0.000151667	0.001304666
<i>2210010C04Ri</i>	-1.162363831	2.198691547	0.000151686	0.001304666
<i>Rpia</i>	-1.126719573	2.299210974	0.000156129	0.00133551
<i>Notch4</i>	-1.218910518	2.217042559	0.000181435	0.001519641
<i>Tph2</i>	-1.187775187	2.372820236	0.000183138	0.001531296
<i>Efcab2</i>	-1.093670184	3.245498864	0.000188853	0.001568875
<i>Cd274</i>	-1.073538963	2.940616472	0.000197887	0.001634372
<i>Alox12b</i>	-1.076257356	2.536653368	0.000204898	0.001687641
<i>Clca1</i>	-1.118552507	3.032762983	0.000212402	0.001736983
<i>Fam187b</i>	-1.131878291	2.484680552	0.000221779	0.001797159
<i>Zfp275</i>	-1.061781138	2.634129407	0.00022341	0.001808025
<i>Serpinc1</i>	-1.107931585	2.641436419	0.000234334	0.001884195
<i>4933402E13Ri</i>	-1.204501036	2.785219015	0.000244591	0.001950311
<i>Kitl</i>	-1.328085059	2.698750095	0.000261274	0.002055717
<i>Plp1</i>	-1.310618633	1.859581118	0.000273095	0.0021299
<i>Syce11</i>	-1.094032462	2.362445968	0.000280628	0.002180466
<i>Rin1</i>	-1.103539854	2.266142642	0.000293484	0.002262907
<i>Fam114a1</i>	-1.287030329	2.467056657	0.000299057	0.002298744
<i>Kazald1</i>	-1.830418807	2.117550195	0.000309723	0.002362347
<i>Nr5a1</i>	-1.0288375	2.705346527	0.000323256	0.002449079
<i>Trappc6a</i>	-1.021093326	2.481984398	0.00032986	0.002487019
<i>Cd7</i>	-1.108591239	2.201299547	0.000333677	0.002506937
<i>AI854517</i>	-1.041526992	2.458753157	0.00034715	0.002589582
<i>Rhox2d</i>	-1.08364611	2.676896957	0.000365286	0.002708244
<i>Slc22a23</i>	-1.041020658	2.424716907	0.000381297	0.002805259
<i>Zfpm2</i>	-1.157356997	2.984148328	0.000410884	0.002984174
<i>Pappa2</i>	-1.02733479	3.375829278	0.000429727	0.003102945
<i>Tecta</i>	-1.098030903	2.114464636	0.000449233	0.003218707
<i>Amhr2</i>	-1.081135104	2.358395981	0.00055524	0.003827406
<i>Igf2os</i>	-1.189105016	2.343331312	0.000664779	0.004421099
<i>Nedd9</i>	-1.140266168	3.514366123	0.000734082	0.004800036

表 3-1 *Asz1*欠損前精原細胞における発現変動遺伝子

Downregulated Genes in <i>Asz1</i> ^{-/-} gonocytes				
<i>Col3a1</i>	-1.166546019	3.873494617	0.000828352	0.005291517
<i>Fosb</i>	-1.708721949	2.590546994	0.000872861	0.005530485
<i>Il20rb</i>	-1.012859295	2.098177766	0.000891815	0.005627692
<i>Dsg2</i>	-1.188675421	2.690106165	0.00094086	0.005871774
<i>Pomc</i>	-1.04142686	1.948951309	0.000953249	0.005937205
<i>Pvr12</i>	-1.026085467	2.957738216	0.000954183	0.005937394
<i>Mbtps2</i>	-1.134942626	2.186602081	0.001530802	0.008778728
<i>Akr1c12</i>	-1.030326153	2.506321841	0.00156662	0.00893583

表 3-2 実験に供試したプライマーの一覧

Name	Sequence (5'- 3')	Splicing site sequencing	Bisulfite sequencing	qRT-PCR
Cdh12-F	ATGTTTGTGGTATATTGTTTATTTT		✓	
Cdh12-R	AACATTACCTATTCTATTTTCCTAA		✓	
Inadl-F	GTTATGTTTGGTGTATTGTT		✓	
Inadl-R	CTTAAAAAACATTCTCCTTC		✓	
Apoh-F	AGAGAGAAGTAAGAGAGAGAGAAAA		✓	
Apoh-R	TACCAAATAAAAAAACTAAAAAAC		✓	
Zfp72_F	GAGAAGTTGTTTTTTTTATGTG		✓	
Zfp72_R	TTAAAATTTTTCTACCTCCC		✓	
Fancd2-F	GAATTTTAGAAATATAAGGAATG		✓	
Fancd2-R	CAAACAATACCTCAAATAAAC		✓	
Spag16-F	TTTAGGGAGGATATTTAGGAGA		✓	
Spag16-R	CAAACAACAAATACCAAAAA		✓	
Sult2a5-F	ATTAGGTTTGGGTAGTTTGT		✓	
Sult2a5-R	TATAAATTCTAAAATACTTCTT		✓	
Fam135a-F	GTTGTGTGTATAAAGGTTTTGTT		✓	
Fam135a-R	ATATTCATTTCTTTTCTCCC		✓	
Sec11a-F	ATAGTTGTGTTTTAAGTGGT		✓	
Sec11a-R	CAATCTAAAATCTAATTATT		✓	
Hibch-F	ATTTTGTGGTAAGGAAGTT		✓	
Hibch-R	AAAATATTCTACAAAACATAAC		✓	
IAP-Fancd2_1_F	CATCTTGCAACGGCGAATGA	✓		✓
IAP-Fancd2_1_R	GTTGGGGTCAAGTCGGAGAC	✓		✓
SP6	ATTTAGGTGACACTATAGAA	✓		
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	✓		

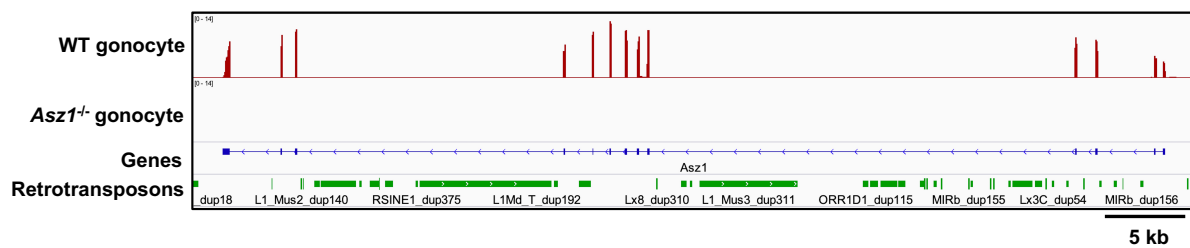


図 3-3 前精原細胞における *Asz1* の発現

出生後1日齢の前精原細胞のmRNA-seqリードのマッピング結果をゲノムビューワで示す。上段から野生型前精原細胞の遺伝子発現のトラック、*Asz1*欠損前精原細胞の遺伝子発現のトラック、遺伝子領域のトラック、そしてレトロトランスポゾン (緑色) のトラックが示されている。遺伝子発現のトラックにおける赤色の山はリードの蓄積を示しており、データはCPM正規化を行った上で各サンプルの縦軸の値を揃えて表示している。遺伝子領域のトラックでは、遺伝子の構造はエクソンが青色の太線で、イントロンが青色の細線で示されており遺伝子の転写方向はイントロンを示す青色の細線上の矢印で示されている。本図での遺伝子領域のトラックでは *Asz1* 遺伝子が表示されている。ゲノムビューワの表示形式に関しては以降の図も同様である。

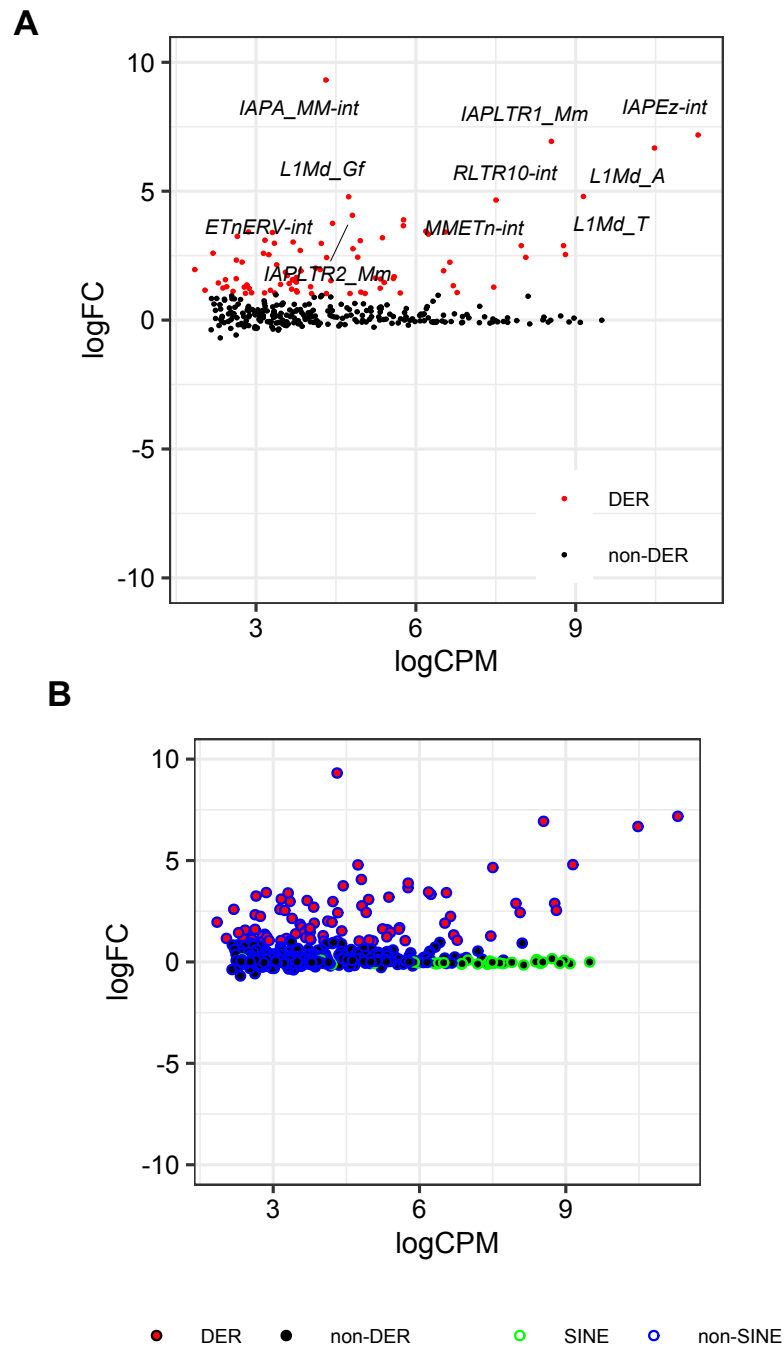


図 3-4 *Asz1*欠損前精原細胞におけるレトロトランスポゾンの発現上昇

(A) Differentially expressed retrotransposons (DERs) を示したMAプロット。有意に発現変動したレトロトランスポゾンは赤色の点で示される (FDR < 0.01, |fold-change| > 2)。 (B) (A)で示したMAプロットと同様のデータを示す図であるが、SINEを示す点は緑色の縁で、LINEとLTRを示す点は青緑色の縁で囲われている。有意に発現変動したSINEは認められなかった。

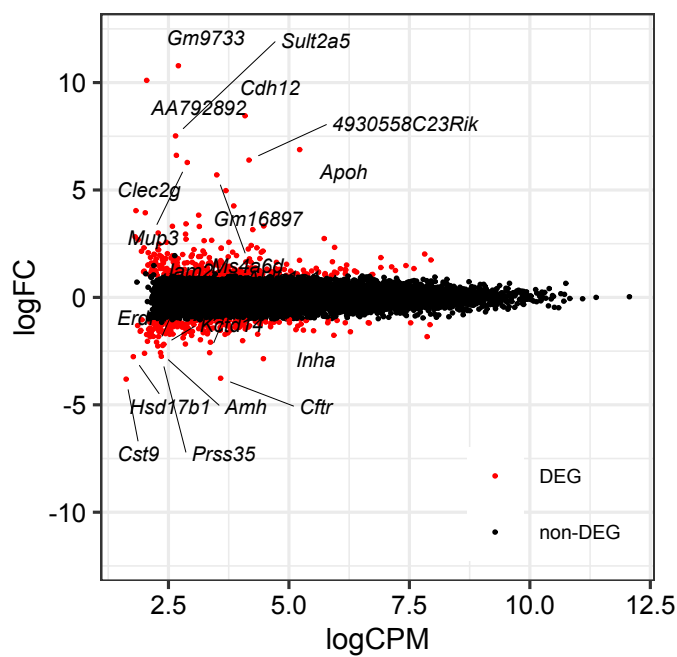


図 3-5 前精原細胞における遺伝子の発現変動

Differentially expressed genes (DEGs)を示したMAプロット。有意な発現変動を示した遺伝子は赤色の点で示される ($FDR < 0.01$, $|\text{fold-change}| > 2$)。

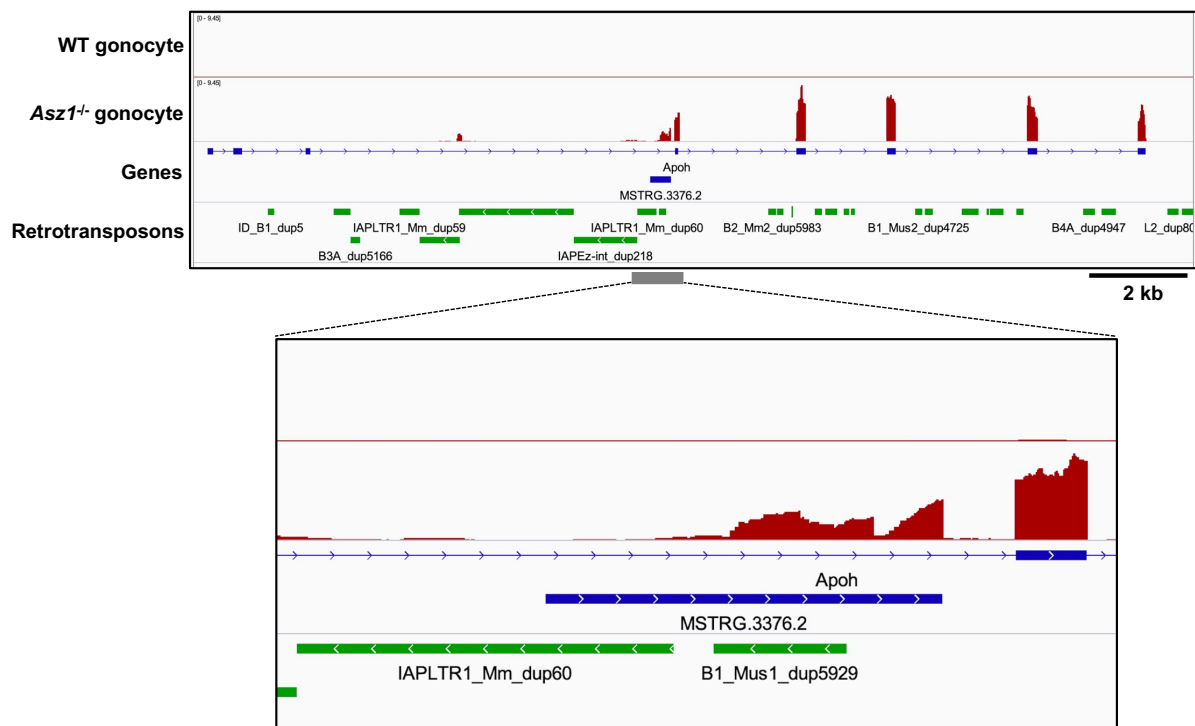


図 3-6 前精原細胞における *Apoh* の発現

Apoh の発現をゲノムビューワーで示す。遺伝子領域のトラックには *Apoh* 遺伝子が示されており、*Apoh* のは左側から右側へ向かって転写される。図の拡大部分は *Apoh* の4番エクソン付近を示しており、遺伝子領域のトラックにおいて青色の太線で示される MSTRG.3376.2 は StringTie によりアSEMBルされた *Apoh* の異常なトランスクリプトバリエントの1番エクソンを示す。*Apoh* は野生型の前精原細胞では発現しておらず、*Asz1* 欠損前精原細胞でのみ発現が確認された。しかしながら、*Asz1* 欠損前精原細胞で発現が確認された *Apoh* は、レトロトランスポソンのプロモーター活性により転写された異常な融合トランスクリプトバリエント (*IAP-Apoh*) であった。

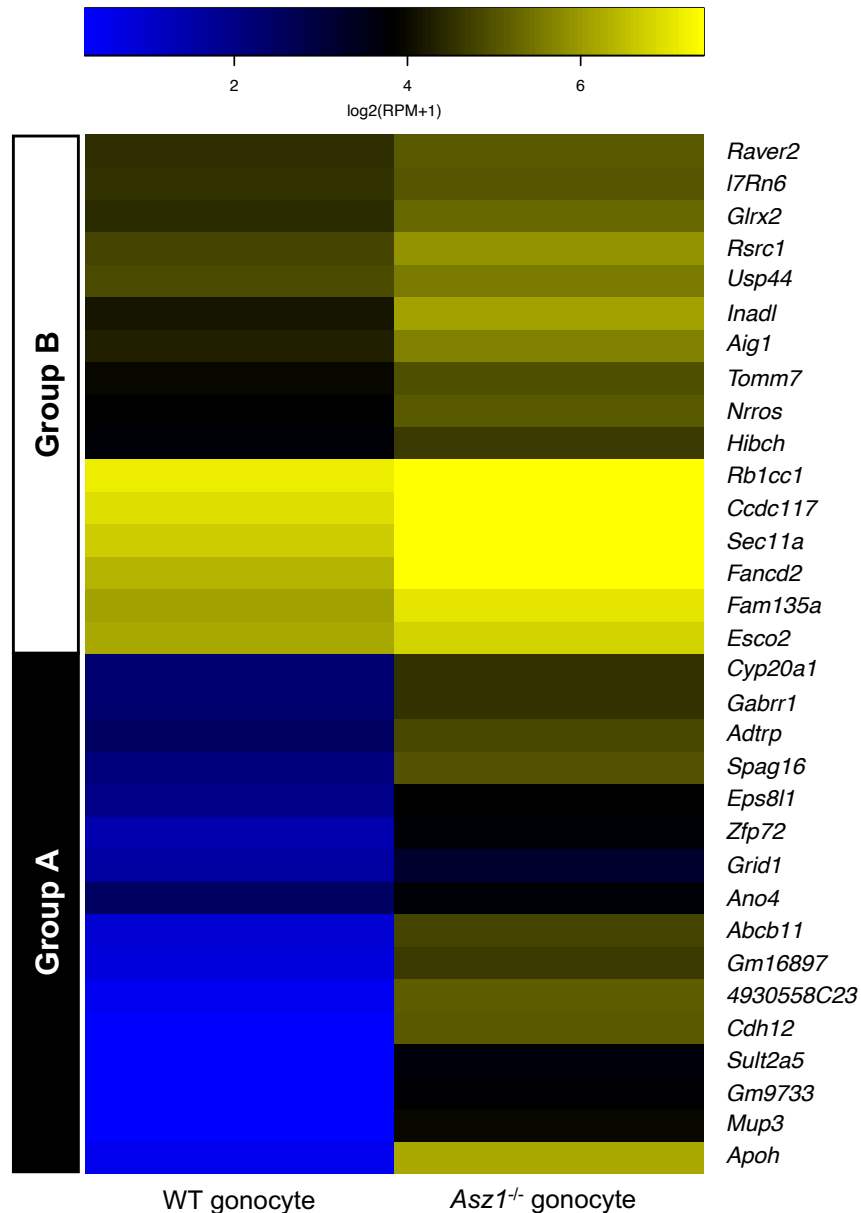


図 3-7 *Asz1*^{-/-}前精原細胞において異常な融合トランスクリプトの発現が確認された32遺伝子の発現パターン

ヒートマップは異常な融合トランスクリプトの発現が確認された32遺伝子の発現量 (log2 RPM +1) を示す。左列が野生型、右列が*Asz1*^{-/-}マウス前精原細胞における遺伝子の発現量を示す。Group Aの遺伝子は遺伝子型を問わず前精原細胞で典型遺伝子が発現していなかった遺伝子群が含まれ、Group Bには野生型と*Asz1*^{-/-}で典型遺伝子が発現がしていた遺伝子群が含まれた。

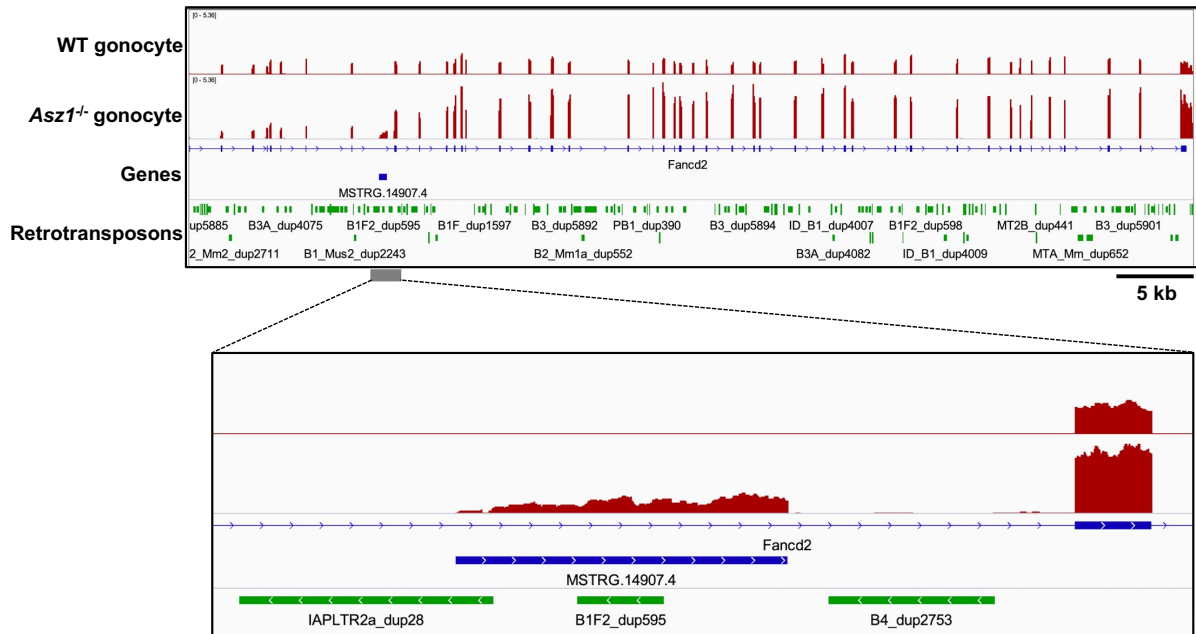


図 3-8 前精原細胞における *Fancd2* の発現

Fancd2 の発現をゲノムビューワーで示す。遺伝子領域のトラックには *Fancd2* 遺伝子が示されており、*Fancd2* の転写は左側から右側へ向かってなされる。図の拡大部分は *Fancd2* の9番エクソン付近を示しており、遺伝子領域のトラックにおいて青色の太線で示される MSTRG.14907.4 は StringTie によりアSEMBルされた *Fancd2* の異常なトランスクリプトバリエーションの1番エクソンを示す。*Fancd2* は典型トランスクリプトが遺伝子型を問わずに前精原細胞で発現していたが、*Asz1*^{-/-} 前精原細胞では典型トランスクリプトに加えて、レトロトランスポゾンのプロモーター活性により転写された異常なトランスクリプトバリエーション (*IAP-Fancd2*) の発現が確認された。

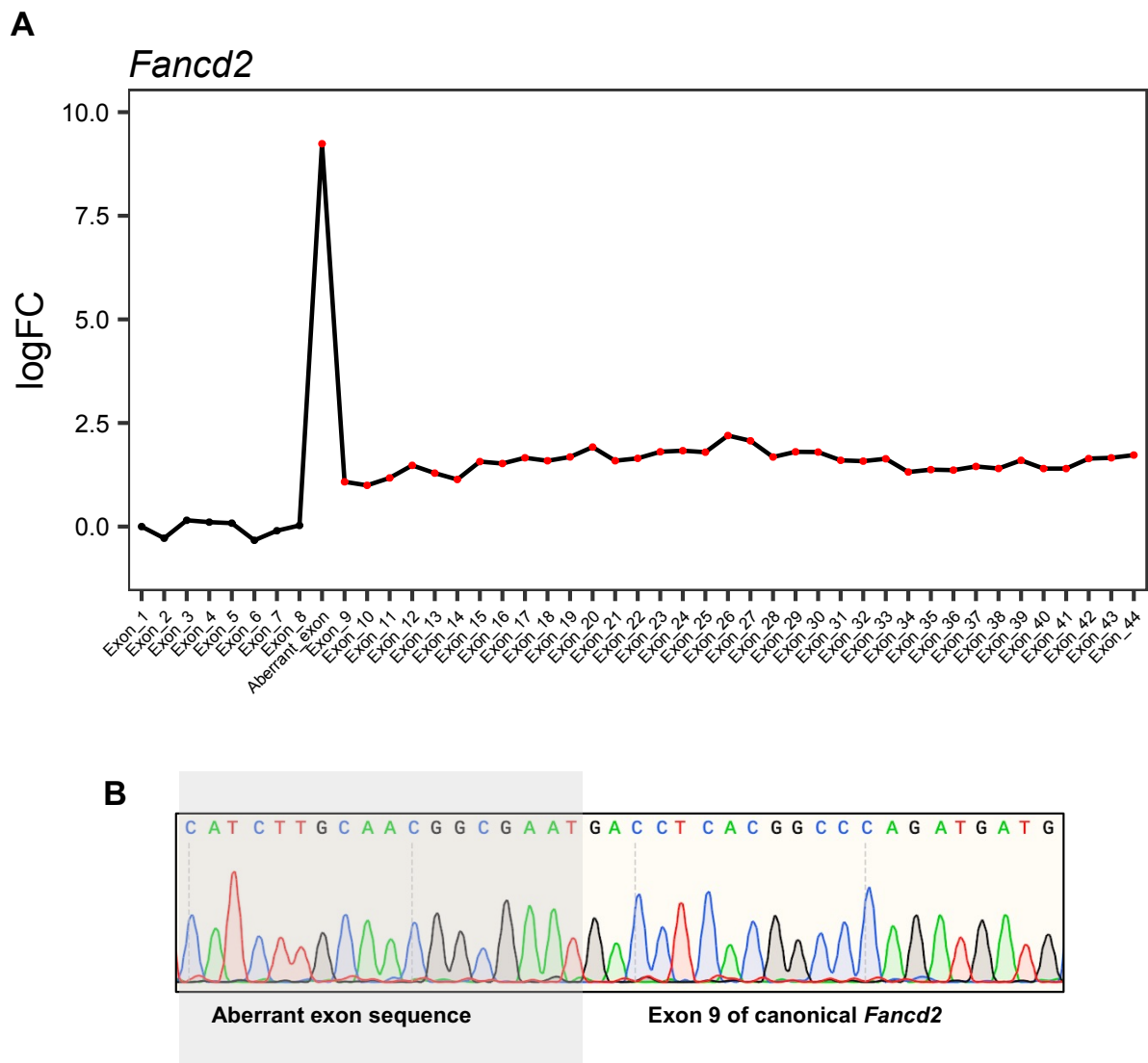


図 3-9 *IAP-Fancd*が*Fancd2*の有意な遺伝子発現をもたらしているかの検証

(A) 野生型に対する*Asz1*^{-/-}前精原細胞における*Fancd2*のエクソンレベルでの発現比較の結果を示す。縦軸は変動比 (log₂-fold change) を、横軸は*Fancd2*の全エクソンと*IAP-Fancd*の異常な転写開始点 (Aberrant_exon, 図 3-8におけるMSTRG.14907.4) を示す。有意な発現変動を示したエクソンは赤色の点で示される (FDR < 0.05)。既知の*Fancd2*は44のエクソンを保持しており、異常な融合トランスクリプトバリエント (*IAP-Fancd2*) の転写開始点は8番と9番エクソンの間に存在する。*IAP-Fancd*の異常な転写開始点よりも下流に存在するエクソンでのみ*Asz1*^{-/-}前精原細胞で発現上昇が確認されたことから、*IAP-Fancd2*が*Fancd2*遺伝子領域における有意なリード数の増加をもたらしていることが示唆された。(B) *IAP-Fancd2*のIAPと*Fancd2*の融合部分 (スプライシングジャンクション) のシーケンス結果である。

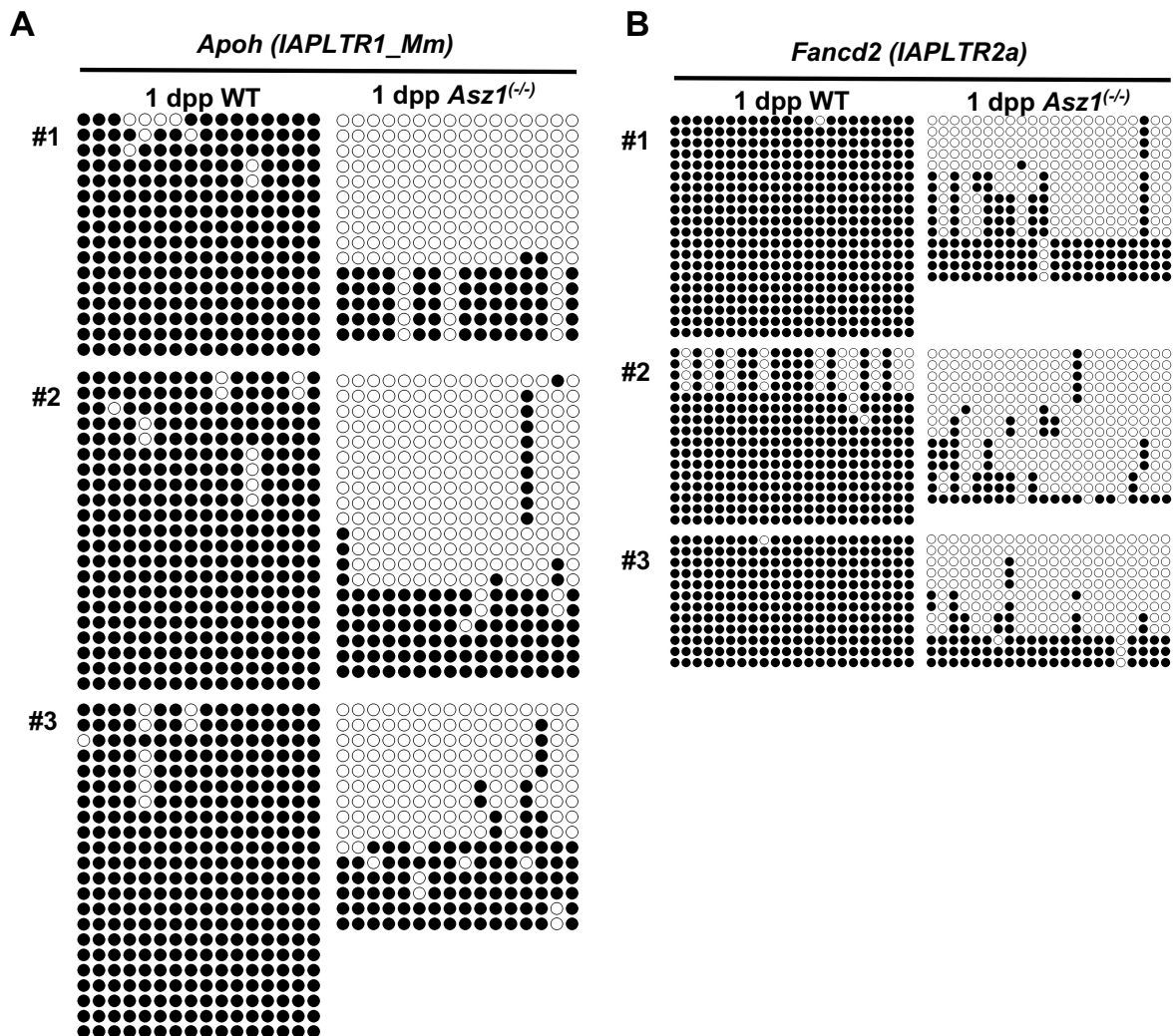


図 3-10 出生後1日齢の前精原細胞におけるレトロトランスポゾンのDNAメチル化解析

(A) 出生後1日齢の前精原細胞における、*IAP-Apoh*の転写への関与が示唆されたIAPLTR1_Mm_dup60のDNAメチル化解析の結果を示す。黒丸がメチル化されていたCpGシトシン、白丸がメチル化されていなかったCpGシトシンを示す。(B) *IAP-Fancd2*の転写への関与が示唆されたIAPLTR2a_dup28のDNAメチル化解析を示す。出生後1日齢の前精原細胞を供試した。

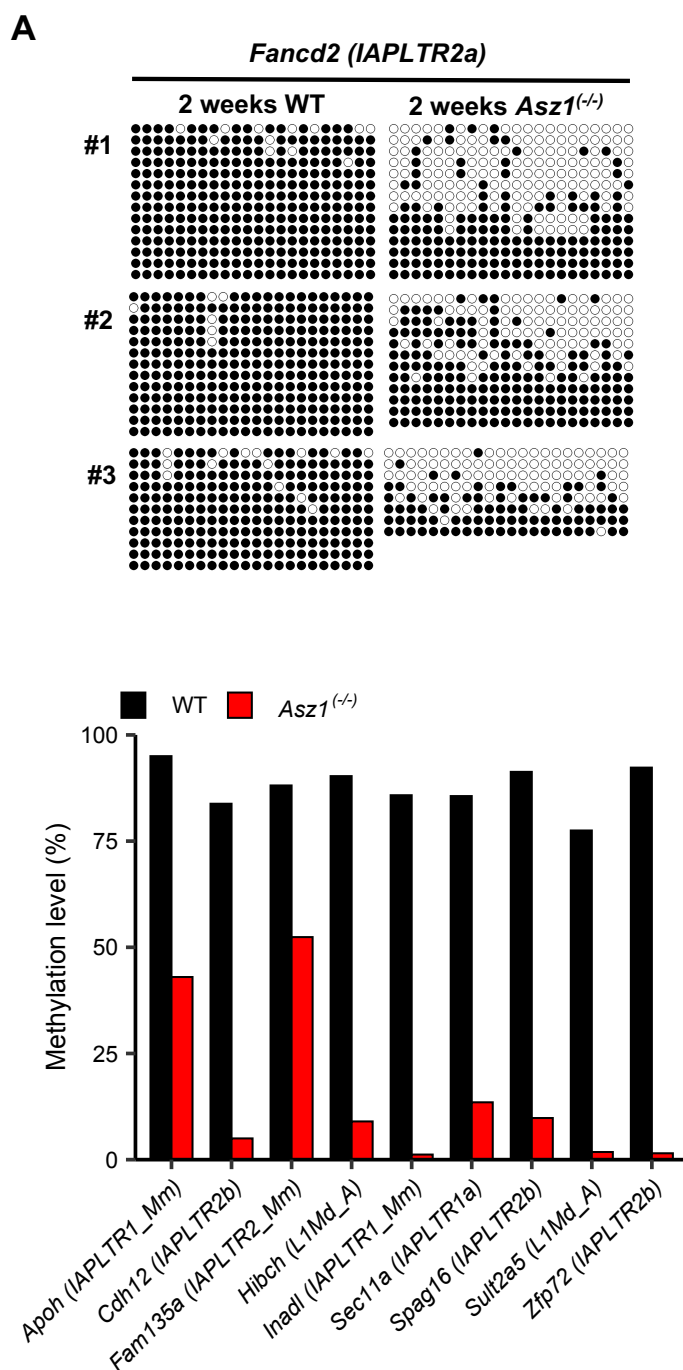


図 3-11 2週齢マウス精巣生殖細胞におけるレトロトランスポゾンのDNAメチル化解析

(A) 2週齢の精巣生殖細胞における、*IAP-Fancd2*の転写への関与が示唆されたIAPLTR2a_dup28のDNAメチル化解析を示す。(B) 2週齢の精巣生殖細胞における、異常な融合トランスクリプトバリエントの1 kb上流圏に存在したレトロトランスポゾンのDNAメチル化解析の結果。

第四章 初期卵母細胞におけるレトロトランスポゾン制御機構の解析

第一節 緒言

雌性生殖系列においても、雄性生殖系列と同様に piRNA 経路を構成する遺伝子群が発現していることが知られている。*Mili* や *Asz1*、*Mvh* の欠損は原始卵胞中の卵母細胞において、intermitochondrial cement の消失と LINE1 や IAP の発現上昇を引き起こすことが報告されている [25, 26]。また、maelstrom homolog (*Mael*) の欠損マウスは胎仔期卵母細胞における LINE1 の脱抑制のモデルとして用いられており、piRNA 経路は初期卵母細胞においても雄性生殖系列と同様にレトロトランスポゾンの抑制を担っていることがわかる [28]。しかしながら、雌性生殖における piRNA 経路は雄性生殖系列におけるそれとは大きく異なる。*Mili* や *Asz1*、*Mvh* を欠損すると雄性個体では精子形成障害を伴う不妊を引き起こすが、雌性個体においてはこれらの 3 重欠損体においてさえ妊孕性を失わないことが知られている [25]。卵子形成過程ではレトロトランスポゾンの DNA メチル化を担う *Miwi2* が発現しておらず、前精原細胞と同時期の初期卵母細胞では piRNA 経路を介したレトロトランスポゾンの DNA メチル化が行われていないものと考えられる [26]。このことから、初期卵母細胞においてはレトロトランスポゾンの制御に DNA のメチル化が重要ではないとも推察される。このことを裏付けるように、初期卵母細胞においては DNA メチル化酵素が発現していないことが報告されている [27]。

DNA メチル化によるレトロトランスポゾン抑制機構の不在は、初期卵母細胞におけるレトロトランスポゾンの制御について 2 つの仮説を立てることができ。一つ目は、初期卵母細胞においてはレトロトランスポゾンの転写レベルでの

強固な抑制がなされておらず、spontaneous に活性化したレトロトランスポゾンの影響を受けているという仮説である。卵母細胞は spontaneous に LINE1 を発現していることが知られており、レトロトランスポゾンの発現を許容していることが報告されている [28]。また、卵母細胞は精母細胞と比較して第一減数分裂前期に留まっている期間が長く、レトロトランスポゾンによるダメージを修復する時間をとることができるため、レトロトランスポゾンの活性化に対して耐性があるのではないかという考察がなされている [25]。二つ目の仮説は DNA メチル化に依存しない方法でレトロトランスポゾンを抑制しているという仮説である。PGCs では全ゲノムレベルで DNA 脱メチル化がなされる際にヒストン修飾のリモデリングも行われることが報告されており、これらがレトロトランスポゾンの抑制に重要な役割を担っている可能性が考えられる [58]。

仮に初期卵母細胞でレトロトランスポゾンの転写レベルでの強固な抑制がなされていなかった場合、piRNA 経路を失った前精原細胞のように活性化したレトロトランスポゾンにより異常な融合トランスクリプトバリエーションの発現が起きている可能性が考えられる。そこで初期卵母細胞において異常な融合トランスクリプトバリエーションが発現しているかを検証するとともに、公共データベースを利用して、該当レトロトランスポゾンのヒストン修飾を再解析することにより、レトロトランスポゾンが初期卵母細胞の遺伝子発現に影響を与えているかどうか明らかにすることとした。

第二節 材料および方法

1. 供試動物

第二章に準ずる。

2. 新生仔卵母細胞の FACS による分取

安楽死後の 1 dpp マウスから卵巣を摘出し、C. T. K. solution (0.025% トリプシン、0.1 mg/ml コラゲナーゼ、1 mM CaCl₂、10% KSR を含む PBS) で 35 分、Accutase (Nacalai) で 15 分処理した。その後、4°Cにて 1500 rpm で 5 分間遠心して上清を除去した。FACS Buffer 200 μ l で再懸濁後、CD16/32 antibody を 2 μ l 加えて氷上で 15 分間静置し、Fc レセプターのブロッキングを行なった。続いて Brilliant Violet 421 anti-mouse c-kit antibody を 2 μ l 加えて氷上で 1 時間静置し、卵母細胞を標識した。FACS Buffer 1000 μ l を加えた後に 4°Cにて 1500 rpm で 5 分間遠心して上清を除去した。FACS Buffer 200 μ l で再懸濁した。

細胞懸濁液を 35 μ m セルストレーナーに通し、BD FACS Aria ii (BD Biosciences) にて細胞を 700 μ l の FACS Buffer に分取した。4°Cにて 1500 rpm で 30 分間遠心後、1 \times PBS (-) 10 μ l で再懸濁した。細胞懸濁液をガラスボトムディッシュ上に移し、共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った。

3. 新生仔卵母細胞の mRNA-seq データ解析

出生後 1 日齢の新生仔卵母細胞の mRNA-seq データは DRA005345 からダウンロードして解析に供試した [59]。解析方法は第三章に準ずる。

4. *IAP-Fancd2* の qRT-PCR による発現解析

FACS による Buffer RLT Plus に分取した卵母細胞から RNeasy Plus Micro Kit

(Qiagen)を用い、キットのプロトコルに従って、Total-RNA を抽出した。Total-RNA から PrimeScrip RT reagent Kit with gDNA Eraser (Takara) を用いてゲノム DNA を除去して cDNA を合成した。Power SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いた quantitative RT-PCR (qRT-PCR) により、*IAP-Fancd2* と *Tbp* の検量線との比較による絶対定量を行った。qRT-PCR は QuantStudio 3 real-time PCR system (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) にて行った。*IAP-Fancd2* の発現量は *Tbp* を内部標準遺伝子として補正し、統計検定を行った。使用したプライマーは表 3-1 に示した。

5. Chromatin immunoprecipitation sequencing データの解析

Chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq) データは DRA006633 よりダウンロードして使用した [59]。リードを Trimmomatic (version 0.36) でトリミングした後、ペアエンドを維持したリードのみを以降の解析に供試した。リードは Bowtie2 を用いてゲノムにマッピングした。マッピング後のデータから ENCODE blacklist と Y 染色体、ミトコンドリア DNA 上にマッピングされたリードを除去した。Dimethylation and trimethylation of histone H3 lysine 9 (H3K9me2 and H3K9me3) を検出するために、MACS2 (ver. 2.1.4) を用いてピークコールを行った [60]。MACS2 は以下の設定で使用した : -f BAMPE -g mm --broad -p 1e-5。検出されたヒストン修飾のピークのうち、バイオリジカルレプリケート間で重複するピークを bedtools で抽出し、再現性のあるピークとしてゲノムビューワに表示した。

6. 統計検定

qRT-PCR による遺伝子発現解析での Dunnett's test は R software (ver. 3.6.1) 上

で Multicomp package (ver. 1.4.17) を用いて行った [61]。

第三節 結果

1. 初期卵母細胞における *IAP-Fancd2* の発現

初期卵母細胞においてレトロトランスポゾンが活性化し、異常な融合トランスクリプトバリエントを転写しているかどうかを検証するにあたり、*Asz1* 欠損前精原細胞で検出された異常な融合トランスクリプトバリエントのうち、前精原細胞と初期卵母細胞の両方で典型遺伝子が発現しているものを選定することとした。これは、抑制的なクロマチン状態により、そもそも卵母細胞で対象の遺伝子を含む領域全体が抑制されていた場合は、レトロトランスポゾンが活性化しているか否かを評価することが困難であると考えたからである。*Fancd2* は第一減数分裂前期における相同染色体の対合に関与していることが報告されており、第一減数分裂前期にある初期卵母細胞においても発現が期待された。そのため、*IAP-Fancd2* の発現に着目して、その卵母細胞における発現を明らかにすることとした。

公開されている 1 dpp 卵母細胞の mRNA-seq のデータ (DRA005345)を用いて解析を行った結果、*Fancd2* は前精原細胞と同様に卵母細胞においても発現が確認された (図 4-2A) [59]。*Asz1* 欠損前精原細胞における *IAP-Fancd2* の転写開始エクソン (MSTRG.14907.4) に着目した結果、卵母細胞においてもリードの蓄積が確認されたが、*Asz1* 欠損前精原細胞のそれと比較すると低発現であった (図 4-2A、拡大部)。qRT-PCR により野生型前精原細胞と *Asz1* 欠損前精原細胞、野生型の初期卵母細胞間での *IAP-Fancd2* の発現を比較したところ、*Asz1* 欠損前精原細胞における発現は野生型前精原細胞と比較して有意に高い発現を示したのに対し、野生型初期卵母細胞における発現量は野生型前精原細胞と比較して有意な差はなかった (図 4-2B)。このことから、piRNA 経路を介したレトロトランス

ポゾンの DNA メチル化機構が存在しない初期卵母細胞においても、*IAP-Fancd2* は野生型の前精原細胞と同程度まで抑制されていることがわかった。

2. 初期卵母細胞における抑制型ヒストン修飾を介した *IAP-Fancd2* の抑制

以上のことから、初期卵母細胞には piRNA 経路を介した DNA メチル化機構は存在しないものの piRNA 経路を欠損した前精原細胞のように、活性化したレトロトランスポゾンによる異常な融合トランスクリプトの影響を受けることはなく、何らかのレトロトランスポゾン抑制機構が存在することが示唆された。そこで抑制型のヒストン修飾に着目した。当研究室において過去に行われた生殖細胞における包括的なヒストン修飾の ChIP-seq データ (DRA006633) を再解析した [9]。その結果、*IAP-Fancd2* の転写開始点付近に H3K9me2 のシグナルの蓄積が確認された (図 4-3A)。よって、初期卵母細胞においては *IAP-Fancd2* の転写に参与する *IAPLTR2a* は抑制型ヒストン修飾により抑制されており、*IAP-Fancd2* の転写も低レベルに抑制されていることが示唆された。この抑制型のヒストン修飾がいつから存在するのかを明らかにするために、胎齢 13.5 日の雌性生殖細胞において同様の解析を行った。その結果、胎齢 13.5 日の雌性生殖細胞の時点ですでに *IAP-Fancd2* の転写開始点付近には H3K9me2 の蓄積が確認された (図 4-3B)。その一方で、胎齢 13.5 日の雌性生殖細胞では H3K9me2 に加えて H3K9me3 の蓄積も確認された。*IAP-Fancd2* の転写開始点付近における抑制型のヒストン修飾は前精原細胞と胎齢 13.5 日の雄性生殖細胞においても確認された (図 4-4)。また、これらの初期雌雄生殖細胞においては *IAP-Apoh* の領域においても抑制型ヒストン修飾の蓄積が確認された (図 4-5)。

第四節 考察

piRNA をガイドとしたレトロトランスポゾンの抑制を担う MIWI2 や de novo 型 DNA メチル化酵素である DNMT3A、その補酵素である DNMT3L は初期の卵母細胞では発現していないことが報告されている。しかしながら *IAP-Fancd2* の発現は低レベルに抑えられており、これには抑制型ヒストン修飾である H3K9me3 の蓄積が関与していることが示唆された。レトロトランスポゾンへの抑制型ヒストン修飾の蓄積は胎齢 13.5 日の雌雄生殖細胞においてすでに確認された。しかしながら、前精原細胞においては一時的なレトロトランスポゾンの活性化に先行して H3K9 および H3K27 のヒストン脱メチル化と H3K4 のトリメチル化が起こることが報告されている [62]。この現象はレトロトランスポゾンの逆鎖の配列を含む piRNA cluster の転写や piRNA の産生に付随して起こると考えられる [19]。

レトロトランスポゾンの DNA メチル化に際しては、胎仔期前精原細胞において lysine (K)-specific demethylase (KDM) 1A と 5B が MIWI2 と相互作用し、H3K4 のヒストン脱メチル化を促すと考えられている [63]。本研究では、胎齢 13.5 日の雄性生殖細胞と出生後 1 日齢の前精原細胞において *IAP-Apoh* と *IAP-Fancd2* の領域において H3K9 のジメチル化とトリメチル化修飾の蓄積が確認されたが、前精原細胞における抑制型ヒストン修飾が、胎仔期の時の修飾が維持されたものなのか、それとも DNA メチル化が行われる際に一度消去された後に再獲得されたものなのかは不明である。一方で、初期卵母細胞においては piRNA 経路を介した DNA メチル化に代わり、H3K9 のメチル化がレトロトランスポゾンの抑制に重要であることが示唆された。これまでに、tissue-nonspecific alkaline phosphatase-Cre recombinase (TNAP-Cre) マウスとの交配により SET domain

bifurcated 1 (*Setdb1*, encoding a histone lysine methyltransferase) をコンディショナルノックアウトした E13.5 胚の雌性生殖細胞では IAP を主とするレトロトランスポゾンと遺伝子の融合トランスクリプトが発現上昇することが報告されている。DNA メチル化レベルが低下した性分化直後の胎仔期生殖細胞におけるレトロトランスポゾン抑制に対するヒストン修飾の重要性を垣間見ることができる [64]。しかしながら、これらのコンディショナルノックアウトマウスにおいては卵巣サイズが減少し、母性の *Setdb1* 欠損アレルの産子への伝達が確認されていないことから、卵母細胞が出生前後までに死滅している可能性がある。よって、ノックアウトマウスを用いて出生前後の卵母細胞において *Setdb1* がレトロトランスポゾン抑制に役割を担っているかどうか検証するのは困難である。これについては、*Setdb1* のノックダウンならばノックアウトにくらべて表現型が穏やかになることが期待されるため、報告されている卵子形成過程特異的な遺伝子ノックダウンシステムを改変して利用することで初期の卵母細胞における *Setdb1* の機能を明らかにすることができるかもしれない [65]。

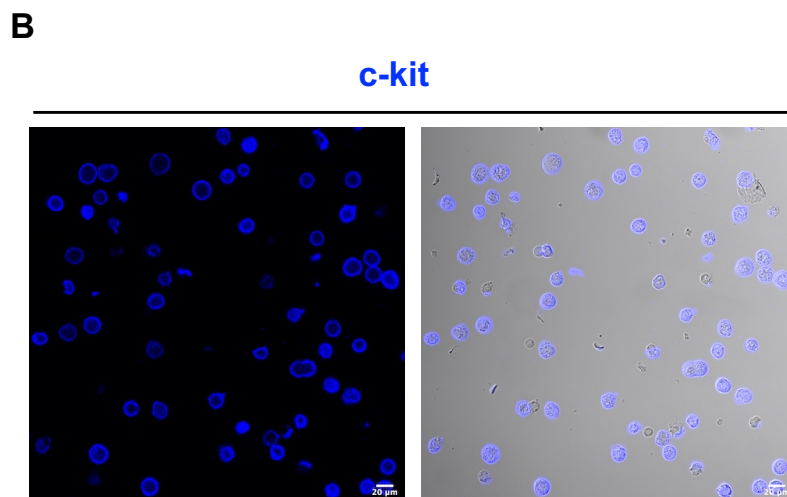
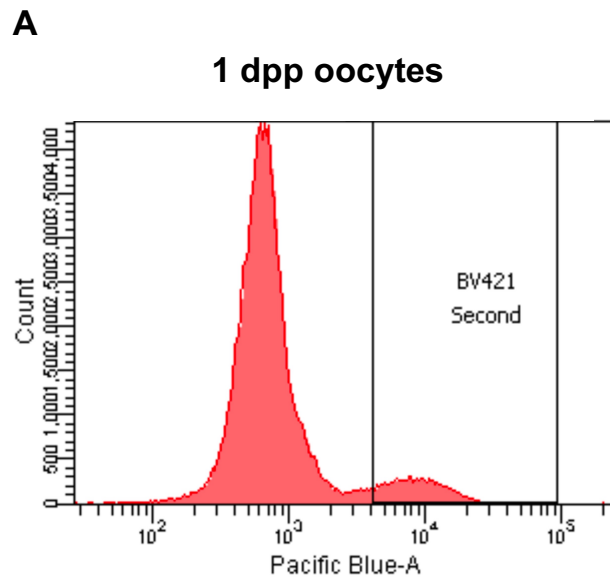


図 4-1 FACSによる新生仔卵母細胞の分取

(A) 出生後1日齢の卵巣の精巣細胞懸濁液のフローサイトメトリーによる解析および卵母細胞分取時のゲートを示す。横軸はPacific Blueの検出器で検出された相対蛍光強度を示しており、右へ向かうほど強い蛍光を示した細胞がプロットされている。卵母細胞の蛍光標識はc-kit抗体を用いた。(B) FACSにより精製した新生仔卵母細胞の観察結果である。スケールバーは20 μm を示す。

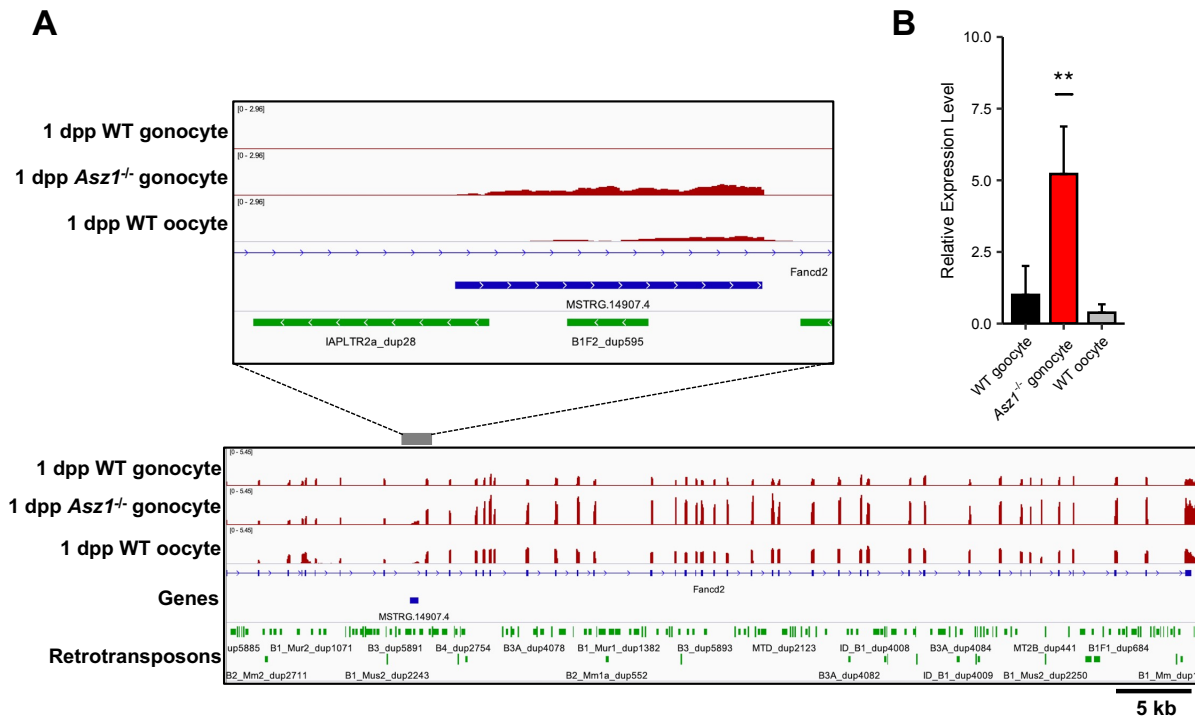


図 4-2 初期卵母細胞における *IAP-Fancd2* の発現

(A)ゲノムビューワーによる出生後1日齢の野生型前精原細胞、*Asz1*^{-/-}前精原細胞、野生型初期卵母細胞における*IAP-Fancd2*の発現の図示。図 3-8で示したデータに出生後1日齢の初期卵母細胞のRNA-seqデータ (DRA005345)を追加した。図の拡大部分は*IAP-Fancd2*の異常な転写開始点の領域を示しており、MSTRG.14907.4はStringTieによりアセンブルされた*IAP-Fancd2*の1番エクソンを示す。(B) qRT-PCRを用いた出生後1日齢の野生型前精原細胞、*Asz1*^{-/-}前精原細胞、野生型初期卵母細胞における*IAP-Fancd2*の発現解析。初期卵母細胞における*IAP-Fancd2*の発現は野生型前精原細胞と変わらなかった。データはmean ± SDを示し、他軍間比較はDunnett's testを用いて行われた (**P < 0.01)。

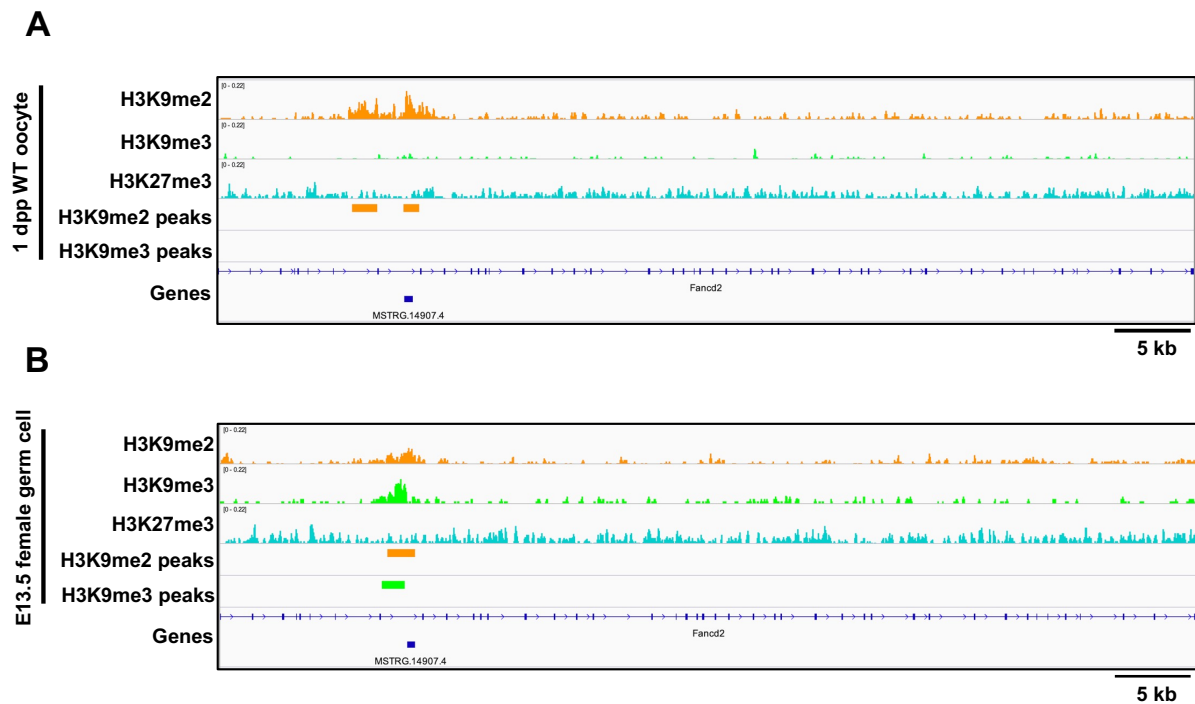


図 4-3 初期卵母細胞における *IAP-Fancd2* 領域への抑制型ヒストン修飾の蓄積

(A) ゲノムビューワーによる、出生後1日齢の野生型初期卵母細胞における Chip-seq データの解析結果。図は *Fancd2* 遺伝子領域を示しており、上段からクロマチン免疫沈降により得られた H3K9me2、H3K9me3、そして H3K27me3 のシグナルが山として図示されている。その下には H3K9me2 と H3K9me3 の有意なシグナルの蓄積が確認された領域がそれぞれ色掛けで示されている。ChIP-seq のデータは公開されているものを供試した (DRA006633)。(B) (A) と同様の領域における、胎齢13.5日の雌性生殖細胞の Chip-seq データの解析結果を示す。

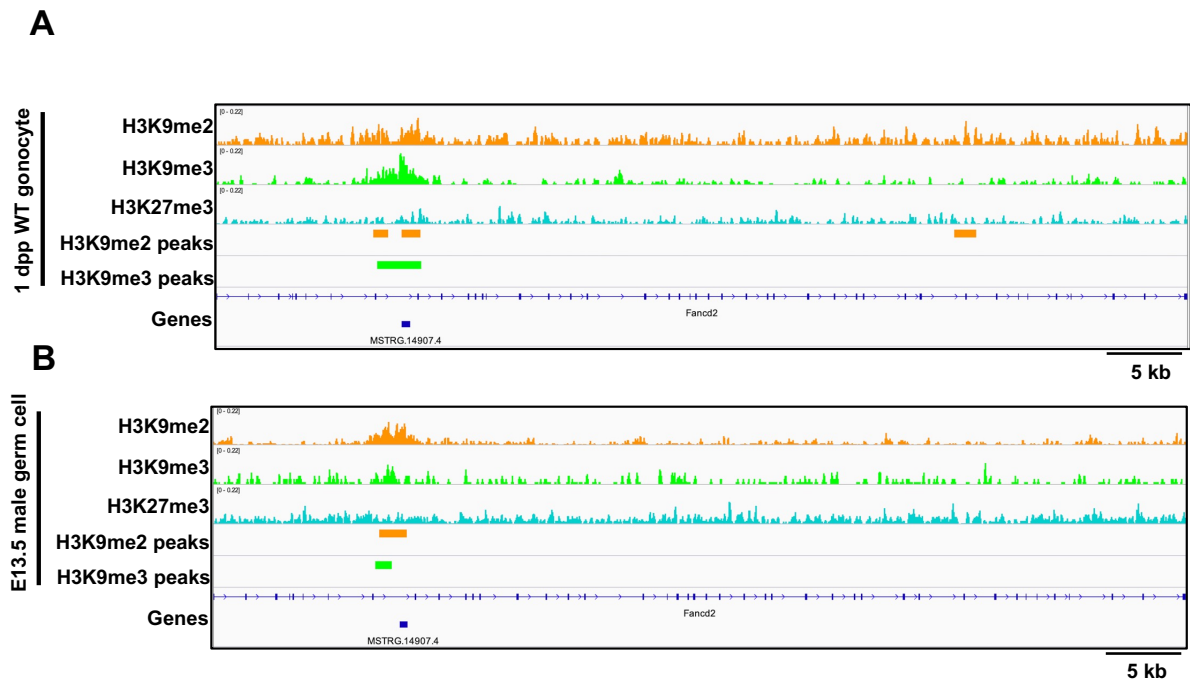


図 4-4 前精原細胞における *IAP-Fancd2* 領域への抑制型ヒストン修飾の蓄積

(A) ゲノムビューワーによる、出生後1日齢の前精原細胞におけるChIP-seqデータの解析結果。図は *Fancd2* 遺伝子領域を示しており、上段からクロマチン免疫沈降により得られたH3K9me2、H3K9me3、そしてH3K27me3のシグナルが山として図示されている。その下にはH3K9me2とH3K9me3の有意なシグナルの蓄積が確認された領域がそれぞれ色掛けで示されている。ChIP-seqのデータは公開されているものを供試した (DRA006633)。(B) (A)と同様の領域における、胎齢13.5日の雄性生殖細胞のChIP-seqデータの解析結果を示す。

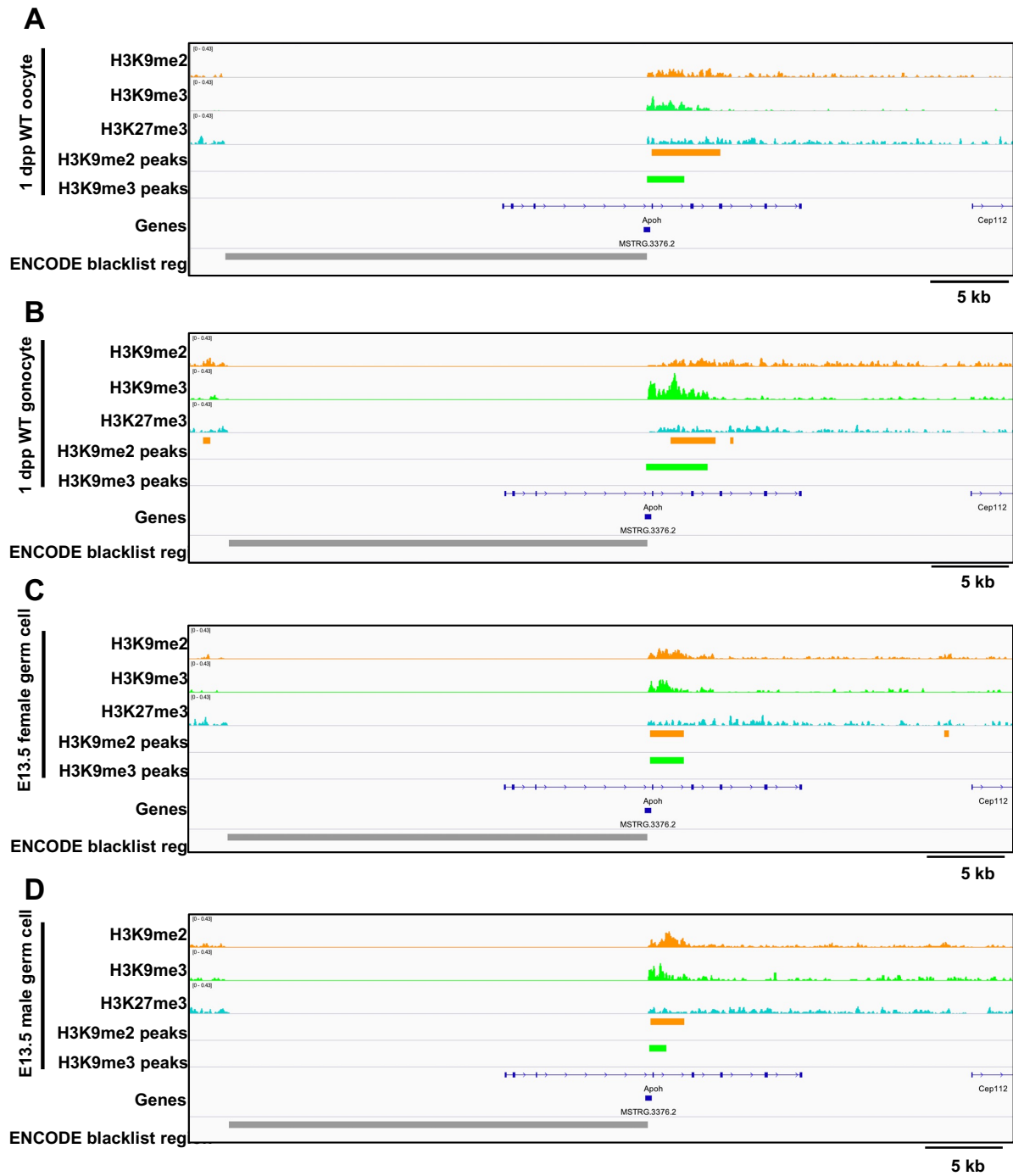


図 4-5 周産期生殖細胞における *IAP-Apoh* 領域への抑制型ヒストン修飾の蓄積

ゲノムビューワーによる Chip-seq データの解析結果。図は *Apoh* 遺伝子領域を示しており、(A) 出生後1日齢の卵母細胞、(B) 出生後1日齢の前精原細胞、(C) 胎齢13.5日の雌性生殖細胞、(D) 胎齢13.5日の雄性生殖細胞を示す。

第七章 総合考察

本研究では piRNA 経路の欠損により活性化したレトロトランスポゾンが前精原細胞に与える影響に着目して解析を行うとともに、DNA メチル化機構が存在しない初期卵母細胞においてレトロトランスポゾンがどのように制御されているかを解析し、考察することでレトロトランスポゾンが雌雄生殖細胞に与える影響を明らかにすることを目的とした [66]。

前精原細胞における、piRNA 経路の欠損によるレトロトランスポゾンの活性化のモデルとして、*Asz1* 欠損マウスを用いることとした [31]。それにあたり、*Asz1* 欠損マウスにおける精子形成障害の表現型を再解析した。精母細胞におけるシナプトネマ複合体の免疫染色を行った結果、*Asz1* の欠損は第一減数分裂前期のザイゴテン期以前で精子形成の停止を引き起こすことが明らかとなった。この表現型は *Mili* や *Miwi2* の欠損体と酷似しており、*Pnlcd1* 欠損マウスなどの比較的穏やかな精子形成障害を示すマウスとは異なり、piRNA 経路関連遺伝子の中でも欠損により最も深刻な表現型を示す遺伝子の一つであることが明らかとなった [15, 21, 34]。さらに、*Asz1* 欠損マウスの前精原細胞では MIWI2 の核内局在が消失していた。これまでの報告では *Asz1* を欠損した前精原細胞では MILI の発現が著しく低下していることが報告されてきた [31]。しかしながら、MILI の発現低下は *Asz1* の欠損による二次的な影響であるため、それが実際に MIWI2 の機能を損なうか否かは不明であった。本研究により *Asz1* 欠損前精原細胞では MIWI2 の核内局在が完全に消失していたことから、MILI は *Asz1* 欠損前精原細胞において MIWI2 に piRNA を供給できないほど発現低下していたことが示唆された。これが *Mili* や *Miwi2* の欠損に匹敵する精子形成障害をもたらしたと考えられた。その一方で、この深刻な精子形成障害を引き起こす直接的な原因を明

らかにすることはできなかった。第一減数分裂前期での精子形成の停止の要因として、染色体の不对合が考察されることが多い。しかしながら、本研究で示されたように、*Asz1* 欠損マウスの精子形成停止は染色体の対合が完了すべき時期よりも前に起きており、染色体の対合不全の結果とは断定できない。*Asz1* 欠損マウスで確認された表現型は胎仔期の前精原細胞に限ってレトロトランスポゾンの DNA メチル化のみを担う *Miwi2* の欠損でも確認されることから、この表現型は胎仔期前精原細胞でのレトロトランスポゾンに対する DNA メチル化不全、または、それに付随するヒストン修飾のリモデリング不全に起因すると考えられる。前精原細胞で抑制を受けなかったレトロトランスポゾンが減数分裂開始時の DNA 二本鎖切断の標的となった結果、DNA 損傷が許容範囲を逸脱した精母細胞がアポトーシスするのではないかという研究も報告されている [36]。しかしながら、レトロトランスポゾンが脱抑制した精母細胞では DNA 二本鎖切断が増加傾向にはあるものの、全ゲノムレベルで増加しているとは言い難い増加であり、この仮説も精子形成障害を十分説明しうるものではなかった。レトロトランスポゾン抑制不全マウスの精子形成障害の解明には、今後さらなる研究が必要であると考えられる。

次に、piRNA 経路の欠損によるレトロトランスポゾンの活性化が前精原細胞に与える影響を、トランスクリプトーム解析により解析した。*Asz1* の欠損により、前精原細胞において 275 遺伝子の発現上昇と 216 遺伝子の発現低下を確認することができた。これらの遺伝子の発現変動が、*Asz1* 遺伝子の欠損の直接的な影響によるものなのか、あるいは別の遺伝子の発現変動の二次的な影響によるものなのかは GO 解析や遺伝子経路の解析を行なった上でも不明であった。その一方で、発現上昇遺伝子群には、DNA の低メチル化により活性化したレトロトランスポゾンと遺伝子の異常な融合トランスクリプトバリエントが含まれ

ていることが明らかとなった。これまでに前精原細胞において、DNA メチル化はレトロトランスポゾンの抑制に重要ではなく、転写後の抑制が役割を果たしていると考えられてきた [55]。しかしながら本研究により、DNA のメチル化不全により活性化したレトロトランスポゾンは前精原細胞の遺伝子発現の完全性を乱すことが明らかとなり、piRNA 経路はこれを抑制する潜在的な役割があることが明らかとなった。その一方で、これらの異常な融合トランスクリプトが精子形成障害に与える具体的な影響については明らかにすることができなかった。異常な融合トランスクリプトバリエントの影響を解析する上で最も効果的なのは異常な融合トランスクリプトバリエントがコードするタンパク質を検出し、それらが異常な遺伝子経路の活性化や、ドミナントネガティブ効果によるタンパク質機能の阻害について解析することである。しかしながら、タンパク質の検出は抗体に依存するため、タンパク質の大きさや翻訳の読み枠が不明な異常な融合トランスクリプトバリエントがコードするタンパク質の検出は困難だった。過剰発現ベクターに異常な融合トランスクリプトをクローニングし、3'末端側にタンパク質タグを付与することでトランスクリプトのコードするタンパク質の検出を試みたが、ベクターを組み込むことでスプライシングの有無や 5'末端側の非翻訳領域の大きさなど、タンパク質の翻訳に影響を与える構造に関して *in vivo* の状態を完全に模倣することができなくなってしまう。この問題については、dead Cas9 (dCas9) と遺伝子発現活性化因子の組み合わせにより、ゲノム上の標的領域を転写活性化させることができれば今後解析を進めることができるかもしれない。

本研究において検出された異常な融合トランスクリプトバリエントの中で興味深いものの一つが *IAP-Fancd2* である。*IAP-Apoh* とは異なり、*IAP-Fancd2* はこれまでに *Miwi2* や *Dnmt3l* 欠損マウスの雄性生殖細胞でもその存在が報告されて

いない。*IAP-Fancd2* は通常の *Fancd2* とともに発現していたことからその検出は困難であると考えられる。*Fancd2* は DNA 損傷の修復に関与しており、*Asz1* 欠損前精原細胞で *Fancd2* が発現上昇していたのは、活性化したレトロトランスポゾンをもたらす DNA 二本鎖切断を修復するためと解釈されかねない。しかし実際は *IAP-Fancd2* の発現量によりリードカウントが増加していたことで有意な発現上昇が生み出されていた。このようにレトロトランスポゾンの活性化が起きている細胞においては必ずしも遺伝子発現の上昇が期待される効果をもたらすとは限らないことが明らかとなった。このことは、レトロトランスポゾンの活性が細胞機能に与える影響を考察する上で重要な知見であり、この現象を実際に示すことができた意義は大きいものと考えられる。

前精原細胞とは異なり、*Miw12* や *de novo* 型 DNA メチル化酵素である DNMT3A、その補酵素である DNMT3L は初期の卵母細胞では発現していないことが報告されている [26, 27]。しかしながら野生型の前精原細胞と比較した結果、*IAP-Fancd2* の発現は初期卵母細胞において同レベルに抑えられており、これには抑制型ヒストン修飾である H3K9me2 の蓄積が関与していることが明らかにされた。このことから、DNA メチル化経路を持たない初期卵母細胞においてもレトロトランスポゾンの活性化はヒストン修飾によってある程度抑制されていることが示唆された。しかしながら、本研究で用いた卵母細胞の Chip-seq データセットは細胞をプールして得られたデータであり、単一細胞の情報は失われている。そのため、初期の卵母細胞集団の中には *IAP-Fancd2* の転写開始点付近に H3K9me2 の蓄積を持たない卵母細胞が存在することも否定できない。これについては、シングルセルレベルでのヒストン修飾解析技術の進歩が待たれる。

第八章 総括

雌雄配偶子の祖細胞である始原生殖細胞はマウスにおいて胎齢 7.25 日に体細胞の系譜から分離することで出現する。始原生殖細胞では分化能を獲得するために、全ゲノムレベルで DNA の脱メチル化が行われるが、それに伴いレトロトランスポゾンが脱抑制してしまう。こうしたレトロトランスポゾンの脱抑制はゲノムの完全性を維持し、それを子孫細胞や次世代へ継承する上での脅威となりうる。雄性生殖系列において、レトロトランスポゾンは精子幹細胞の前駆細胞である周産期前精原細胞の段階において piRNA 経路により再抑制される。piRNA 経路は小分子 RNA である piRNA をガイドに DNA のメチル化を行うことでレトロトランスポゾンの抑制を担う。piRNA 経路の欠損は雄性生殖細胞系列において、レトロトランスポゾンの脱抑制と幼若期 (2 週齢) 以降における第二減数分裂前 (一次精母細胞) での発生停止を引き起こすことが知られている。このように周産期でのレトロトランスポゾンの抑制は出生後の正常な精子形成に必須の役割を持つ。しかしながら、piRNA 経路の欠損は前精原細胞に顕著な表現型異常を生じさせない。前精原細胞は、精子幹細胞、精母細胞、精子を含む雄性生殖細胞の根幹となる細胞であり、piRNA 経路の破綻によるレトロトランスポゾンの活性化が前精原細胞にどのような影響を及ぼし、後に精子形成不全に至らしめるのか理解する生物学定義は大きい。一方、雌性生殖系列においては piRNA による DNA メチル化を介したレトロトランスポゾンの抑制機構が働いていないことが報告されてきている。実際、前精原細胞と同時期の卵母細胞では DNA メチル化酵素は発現しておらず、また、piRNA 経路に属する遺伝子を欠損しても雌の妊孕性には影響を与えない。このことから、雌性生殖系列においては、前精原細胞では piRNA 経路により抑制される、レトロトランスポゾンの活

性化がもたらす機能が許容されている可能性がある。あるいは DNA メチル化に依存しない、レトロトランスポゾンを抑止する別の機構が存在する可能性が示唆される。

そこで本研究では、レトロトランスポゾンの活性化が初期の雌雄生殖細胞の機能に及ぼす影響を解明することを目的とし、まず第一に piRNA 経路のマスターレギュレーターである ankyrin repeats, SAM, and basic leucine zipper domain-containing 1 (*Asz1*) 遺伝子の欠損マウスを解析することとした。第二に、DNA メチル化に依存的なレトロトランスポゾンの抑制機構が存在しない初期雌性生殖系列において、レトロトランスポゾンが *Asz1* 欠損マウスの前精原細胞と同様に活性化し、機能しているかを検証することとした。

1. *Asz1* 欠損マウスの表現型

研究を進めるにあたり、*Asz1* 欠損マウスの表現型を詳細に解析した。3 週齢の精巣に対してウェスタンブロットを行ったところ、野生型とは対照的に *Asz1* 欠損マウスの精巣では ASZ1 タンパク質が検出されなかった。精巣の組織学的な解析を行った結果、*Asz1* 欠損マウスの精巣では、野生型の精巣で伸長精子細胞が出現する時期になってもそれらの細胞は見られず、精子形成が途中で停止していた。それに伴い、野生型の精巣と比較して *Asz1* 欠損マウスの精巣は萎縮していた。これらの表現型は過去に報告している *Asz1* 欠損マウスの表現型と一致していた。

次に、*Asz1* 欠損マウスにおける精子形成の停止時期を正確に把握するために、3 週齢精巣由来の精母細胞におけるシナプトネマ複合体に対する蛍光免疫染色を行った。その結果、野生型では第一減数分裂前期を構成するレプトテン期、ザイゴテン期、パキテン期とディプロテン期の全てのサブステージの精母細胞が

確認されたのに対し、*Asz1* 欠損マウスでは最も減数分裂が進行している精母細胞はザイゴテン期に相当する精母細胞であり、相同染色体の対合が完了するパキテン期以降の精母細胞は確認されなかった。これらの表現型は、同じく piRNA 経路の構成遺伝子である *Mili* や *Miwi2* の欠損マウスでも報告されており、*Asz1* 欠損マウスにおいてもそれらの遺伝子と同様に piRNA 経路の機能不全が起きていることが示唆された。

2. *Asz1* 欠損マウス前精原細胞における MIWI2 の核内局在の消失

Asz1 欠損マウスの前精原細胞においてはレトロトランスポゾン mRNA の分解と piRNA の産生を同時に担う MILI の発現が著しく発現低下することが知られている。その一方で、piRNA 依存的にレトロトランスポゾンへの DNA メチル化導入を担う MIWI2 の *Asz1* 欠損による挙動の変化は明らかになっていない。そこで、胎仔期前精原細胞における MIWI2 の発現を解析した。その結果、野生型の前精原細胞において MIWI2 は細胞質と核の両方に局在していたが、*Asz1* 欠損マウスの前精原細胞では MIWI2 の核内局在が消失し、細胞質にのみ局在していた。このことから、*Asz1* 欠損マウスの前精原細胞では DNA メチル化導入の失敗により、全ゲノムレベルでレトロトランスポゾンの転写抑制が破綻していることが示唆された。このことを支持するように、前精原細胞においてレトロトランスポゾン LINE1 の発現が上昇していた。

3. piRNA 機構の破綻が前精原細胞の遺伝子発現に及ぼす影響

これまでの結果から *Asz1* 欠損マウスの前精原細胞ではレトロトランスポゾンの転写レベルおよび転写後レベルでの抑制機構が破綻していることが示唆された。次に *Asz1* 欠損が前精原細胞の遺伝子発現に与える影響を RNA-seq により解

析した。想定される通り、*Asz1* 欠損マウスの前精原細胞では LINE 型および LTR 型のレトロトランスポゾンが野生型に対して発現上昇していた。遺伝子については、それぞれ 275 と 216 の遺伝子が有意に発現上昇および発現低下していた。発現上昇遺伝子のうち、100 倍以上の著しい発現上昇比を示し、精子形成におけるアポトーシスへの関与が示唆されている *Apoh* 遺伝子に着目した。その結果、*Asz1* 欠損マウスの前精原細胞で発現上昇していた *Apoh* 遺伝子は、*Apoh* のイントロン上に存在するレトロトランスポゾン IAPLTR1_Mm と *Apoh* の 4 番から 8 番エクソンが融合した異常なトランスクリプトバリエントであることが明らかとなった (以降 *IAP-Apoh* と呼称する)。このことから、*Asz1* 欠損マウスの前精原細胞では脱抑制したレトロトランスポゾンが新たな転写開始点を形成し、異常トランスクリプトバリエントを産生することが示唆された。

4. 前精原細胞における異常な融合トランスクリプトの検出

次に、*Asz1* 欠損マウスの前精原細胞で存在が示唆された異常な融合トランスクリプトの検出を試みた。その結果、32 の遺伝子について異常な融合トランスクリプトの発現が確認された。これら 32 遺伝子について野生型と *Asz1* 欠損マウスの前精原細胞での発現パターンを元に階層的クラスタリング解析を行ったところ、大きく二つのグループに分けられることがわかった。一つ目のグループは、典型トランスクリプトが野生型と *Asz1* 欠損前精原細胞のどちらでも発現していないが、*Asz1* 欠損前精原細胞において異常な融合トランスクリプトが発現しており、発現が著しく上昇しているように見えるグループである。このグループには *IAP-Apoh* が含まれた。2 つ目のグループは、典型トランスクリプトが両方の遺伝子型の前精原細胞で発現しているが、*Asz1* 欠損前精原細胞では典型トランスクリプトに加えて異常な融合トランスクリプトが発現しており、発現量

を傘増ししているグループである。後者のグループは正常な精子形成に必要な *Fancd2* 遺伝子の異常な融合トランスクリプトである *IAP-Fancd2* が含まれた。検出された 32 の異常な融合トランスクリプトは、ほとんどが上流 1 kb 以内に 1 つ以上の LINE 型もしくは LTR 型のレトロトランスポゾンを含んでいた。以上のことから、*Asz1* 欠損前精原細胞において、異常な融合トランスクリプトにより遺伝子発現の恒常性が失われていることが明らかとなった。

5. *Asz1* 欠損前精原細胞における DNA メチル化

続いて、異常な融合トランスクリプトの転写への関与が疑われるレトロトランスポゾンの DNA メチル化解析を行った。その結果、*IAP-Apoh* と *IAP-Fancd2* の上流に存在するレトロトランスポゾン IAP はどちらも野生型の前精原細胞では高メチル化であったのに対し、*Asz1* 欠損前精原細胞では高メチル化されたアレルを保持してはいるものの低メチル化傾向にあることがわかった。この二峰性の DNA メチル化パターンは 2 週齢の精巣生殖細胞においても確認された。これらの結果から、レトロトランスポゾンの活性化および異常な融合トランスクリプトの転写は DNA メチル化不全により引き起こされていることが示唆された。

6. 新生仔卵母細胞における *IAP-Fancd2* の DNA メチル化非依存的な抑制

レトロトランスポゾンの DNA メチル化に重要な MIWI2 は卵子形成においては発現しておらず、加えて新生仔卵母細胞では DNA メチル化酵素も発現しないことが知られている。しかしながら、qRT-PCR 解析の結果、レトロトランスポゾン由来の異常な融合トランスクリプトの 1 つである *IAP-Fancd2* は *Asz1* 欠損前精原細胞に比べて発現が著しく低いことが示され、DNA メチル化に依存しない

抑制機構が存在することが示唆された。そこで新生仔卵母細胞における抑制型ヒストン修飾に着目して解析を行った。その結果、野生型の新生仔卵母細胞では、*IAP-Fancd2* の転写開始点付近に抑制型ヒストン修飾の1つである H3K9me2 の蓄積が確認された。この蓄積は胎齢 13.5 日の生殖細胞ですでに確認されたことから、初期の生殖細胞と卵母細胞において異常な融合トランスクリプトはヒストン修飾依存的に抑制されていることが示唆された。

考察

piRNA 経路の欠失によるレトロトランスポゾンの活性化が初期の雄性生殖細胞である前精原細胞そのものに与える影響については不明であったが、本研究により、レトロトランスポゾンの活性化は前精原細胞においてレトロトランスポゾン由来の異常な融合トランスクリプトの転写を引き起こすことが明らかとなった。*Asz1* 欠損前精原細胞において観察されたこの現象は、piRNA をガイドにレトロトランスポゾンへの DNA のメチル化導入を担う MIWI2 が機能不全となり、DNA メチル化を失って活性化したレトロトランスポゾンのプロモーター活性により引き起こされたことが示唆された。実際、異常な融合トランスクリプトの転写への関与が疑われるレトロトランスポゾンは *Asz1* 欠損前精原細胞において低メチル化傾向を示した。前精原細胞において DNA メチル化はレトロトランスポゾンの制御に重要ではなく、このような異常な融合トランスクリプトは存在しないと考えられてきた。しかしながら本研究により前精原細胞の時点でレトロトランスポゾンの活性化は異常な融合トランスクリプトの発現を誘起することで前精原細胞の遺伝子発現の完全性を乱すことが明らかとなり、piRNA 経路は前精原細胞においてこれらの抑制に重要な役割を担っていることが明らかとなった。さらに piRNA 経路は雄性生殖系列が不均一な遺伝子発現動態を示

す集団になることを抑制する潜在的な機能があることが明らかとなった。

一方で、前精原細胞とは異なり、初期卵母細胞では DNA メチル化酵素が発現しないことが知られているが、*Fancd2* の異常な融合トランスクリプト (*IAP-Fancd2*) は初期卵母細胞で抑制されており、これには抑制型ヒストン修飾の 1 つである H3K9me2 の関与が示唆された。これらのことから、雌性生殖細胞ではレトロトランスポゾンの活性は piRNA 経路を介した DNA メチル化に非依存的な機構で抑制されており、レトロトランスポゾンによるトランスクリプトームへの影響は限定的であった。

Summary

Primordial germ cells, which are the origin of gametes, segregate from the somatic lineage on embryonic day 7.25 (E7.25) in mice. These cells then undergo genome-wide DNA demethylation to acquire pluripotency. However, this causes the derepression of the retrotransposons. This retrotransposon activation in the germline can threaten genomic integrity and the transmission of genomic information to the next generation. To eliminate this threat, PIWI-interacting RNA (piRNA) machinery is activated in the male germline. The piRNA machinery in gonocytes introduces DNA methylation in retrotransposons. The defective piRNA pathway causes spermatogenic arrest before entering meiosis II in 2-week-old mice, concomitant with the upregulation of retrotransposons. Thus, establishing retrotransposon repression during the perinatal period is crucial for intact spermatogenesis at the post-pubertal stage. In contrast, the destruction of the piRNA pathway does not generate prominent phenotypes in gonocytes. Gonocytes are the only source of spermatogenic cells, including spermatogonial stem cells, spermatocytes, and sperm. Thus, understanding the effect of retrotransposon derepression caused by the destruction of the piRNA pathway in gonocytes has great biological significance. However, it has been reported that the piRNA pathway mediated DNA methylation does not function in early female germ cells. Indeed, early oocytes, equivalent to the gonocyte stage in the male germ line do not express DNA methyltransferases. Moreover, knockout of component genes in the piRNA pathway does not cause female infertility. This indicates that the female germline has other retrotransposon repression mechanism (s) substitutes for the piRNA pathway. Early oocytes may tolerate the effects of retrotransposons.

As described above, the effects of retrotransposon activity on early female and male germ cells remain unclear. To gain insights to ensure robust spermatogenesis, we investigated the transcriptome of gonocytes with impaired piRNA pathways using male *Asz1* (Ankyrin repeats, SAM, and basic leucine zipper domain-containing 1) knockout (KO) mice. Furthermore, to understand the effects of retrotransposons on oocytes that lacked piRNA machinery by default, we compared retrotransposon-derived transcripts of oocytes with those of gonocytes.

First, we investigated spermatogenic defects in the *Asz1* KO mice. Western blotting showed completely depleted ASZ1 levels in the testes of 3-week-old *Asz1*^{-/-} mice contrary to those in WT mice. Histological analysis clearly showed spermatocytes in both *Asz1*^{+/-} and *Asz1*^{-/-} testes from 2-week-old mice. However, elongated spermatids appeared in the testes of 4-week-old *Asz1*^{+/-} mice, but not in those of *Asz1*^{-/-} mice. Consequently, spermatogenic cells degenerated in 6-week-old *male Asz1*^{-/-} mice. This phenotype was consistent with that in previously reported in *Asz1*-null mice.

Immunostaining against the synaptonemal complex can clarify when the spermatogenic defect was most prominent. Spermatocytes were observed in the testes of 3-week-old WT mice at all stages of the meiotic prophase I. In contrast, spermatocytes of *Asz1*^{-/-} mice did not reach pachytene stage. The most advanced spermatocytes in *Asz1*^{-/-} testes were in the late zygotene stage, in which homologous chromosomes underwent partial synapsis. This finding indicates that spermatogenesis in *Asz1*^{-/-} mice is arrested at the same stage not only in *Mili*^{-/-} mice but also in *Miwi2*^{-/-} mice.

Asz1 deficiency has been reported to downregulate MILI, which induces post-transcriptional repression of retrotransposons in gonocytes. However, it remains unclear whether *Asz1*-deletion affects MIWI2 expression, which introduces DNA methylation

markers in retrotransposons. Therefore, we investigated MIWI2 expression in fetal testes. Although MIWI2 was detected in both the cytoplasm and nuclei of WT fetal gonocytes, the nuclear localization of MIWI2 was completely eliminated in the gonocytes of *Asz1*^{-/-} embryos. This suggests that the transcriptional repression of retrotransposon elements is disrupted in *Asz1*^{-/-} gonocytes, presumably due to the lack of robust DNA methylation. Indeed, prominent upregulation of the LINE1 open reading frame1 protein (L1ORF1p) in *Asz1*^{-/-} gonocytes was consistent with the fact that piRNA pathway dysfunction causes retrotransposon derepression in gonocytes.

Next, we investigated the influence of retrotransposon derepression on the gonocyte transcriptome. Our RNA-seq data showed that LINE and long terminal repeat (LTR)-type retrotransposons were upregulated in 1 dpp *Asz1*^{-/-} mouse gonocytes compared to those in WT mice. Furthermore, differential gene expression analysis revealed that 275 and 216 genes, excluding retrotransposons, were significantly upregulated and downregulated, respectively, in the gonocytes of *Asz1*^{-/-} 1 dpp mice relative to those in WT mice. Among the upregulated genes, the expression level of apolipoprotein H (*ApoH*), which is expressed in adult testes and is suggested to be involved in apoptosis, was approximately 100-fold higher in *Asz1*^{-/-} mouse gonocytes than in those of WT mice. *ApoH* expressed in *Asz1*^{-/-} mouse gonocytes was identified as an aberrant chimeric transcript variant in which the ectopic transcription start site was generated by IAPLTR1_Mm_dup60 (hereafter referred to as *IAP-ApoH*). Specifically, an aberrant chimeric transcript variant was activated by the promoter activity of a derepressed retrotransposon in gonocytes.

We attempted to detect retrotransposon-driven transcript variants among the DEGs in *Asz1*^{-/-} gonocytes. Consequently, 32 transcripts were identified to be aberrant

chimeric transcript variants. These transcripts were divided into two groups based on the hierarchical clustering of their expression patterns between WT and *Asz1*^{-/-} mouse gonocytes. Group A contained transcripts that were not constitutively expressed in WT mouse gonocytes, but were expressed by upstream retrotransposons in *Asz1*^{-/-} mouse gonocytes, such as *ApoH*. In contrast, transcripts classified into group B exhibited higher expression levels in *Asz1*^{-/-} mouse gonocytes than in those of WT mice because of retrotransposon-driven aberrant transcripts in *Asz1*^{-/-} mouse gonocytes. The latter group contained the aberrant chimeric transcript variant of *Fancd2* (hereafter referred to as *IAP-Fancd2*). *IAP-Fancd2* has been suggested to be essential for spermatogenesis. One or more LTR- or LINE-type retrotransposons were located within 1 kb upstream of 28 out of 32 aberrant chimeric transcript variants. Collectively, our results indicate that aberrant chimeric transcript variants disrupt the normal transcriptome profile of gonocytes by derepressing retrotransposons in *Asz1*^{-/-} mice.

Next, we examined the DNA methylation status of retrotransposons that caused transcript variants in the gonocytes of 1 dpp mice. At the IAPLTR1_Mm_dup60 locus, which drives *IAP-ApoH* transcription, both hyper- and hypomethylated DNA strands were detected in the gonocytes of *Asz1*^{-/-} mice, although they were almost completely hypermethylated in the gonocytes of WT mice. DNA methylation analyses of IAPLTR2a_dup28, which drives *IAP-Fancd2* transcription, also showed similar tendencies. Bimodal methylation was also observed in testicular germ cells of 2-week-old *Asz1*^{-/-} mice. Thus, the loss of DNA methylation of retrotransposons in *Asz1*^{-/-} mouse gonocytes may be the underlying cause of the derepression of retrotransposons and expression of aberrant chimeric transcript variants.

MIWI2, which is critical for the DNA methylation of retrotransposons, was not

expressed in oocytes during oogenesis. Our previous study established that DNA methyltransferase 3a2 (DNMT3A2) and 3L (DNMT3L) were not expressed in non-growing oocytes of 1 dpp female mice. However, qRT-PCR analysis revealed much lower expression levels of *IAP-Fancd2* in 1 dpp oocytes than in *Asz1*^{-/-} mouse gonocytes. We investigated repressive histone modifications to understand *IAP-Fancd2* repression in non-growing oocytes lacking MIWI2, DNMT3A2, or DNMT3L expression. ChIP-seq data showed that H3K9me2 was enriched at the transcriptional start site of *IAP-Fancd2* in the non-growing oocytes of 1 dpp mice. Since repressive histone markers in this region were also observed in female germ cells of E13.5, the repression of retrotransposon-driven aberrant transcripts may be achieved through histone modification in a piRNA-independent manner during early oogenesis.

The effects of the absence of the fetal piRNA pathway on gonocytes are not fully understood. In the present study, we investigated the transcriptomic effects of fetal piRNA dysfunction in gonocytes using *Asz1* KO mice. We revealed that gonocytes lacking piRNA machinery gave rise to aberrant chimeric transcripts before mitotic resumption. A lack of DNA methylation was suggested to cause derepressed retrotransposons to activate aberrant chimeric transcripts, thereby delocalizing MIWI2 from the nucleus. Indeed, retrotransposons located in a region upstream of aberrant chimeric transcript variants showed a lower methylation tendency in *Asz1*^{-/-} mouse gonocytes than in the gonocytes of WT mice. In gonocytes, it has been considered that DNA methylation is not important for the repression of retrotransposons, and chimeric transcripts are not expressed in gonocytes. However, aberrant chimeric transcripts triggered by retrotransposons lose DNA methylation, impairing the integrity of the gonocyte transcriptome. Our results suggest that the piRNA pathway plays a role in repressing aberrant chimeric mRNAs via

DNA methylation in gonocytes. Furthermore, the piRNA pathway, including ASZ1, has the potential to prevent heterogeneity in spermatogonial stem cells. In contrast, *IAP-Fancd2* was repressed in non-growing oocytes that lacked the expression of DNA methyltransferases and MIWI2. It has been suggested that *IAP-Fancd2* is repressed by H3K9me2, a repressive histone modification. Thus, oocytes may depend on H3K9me2 to repress retrotransposons instead of DNA methylation via the piRNA pathway.

謝辞

稿を終えるに臨み、終始懇切なる御指導と多大なるご尽力を賜りました東京農業大学生命科学部バイオサイエンス学科動物発生工学研究室の尾畑やよい教授に心より感謝申し上げます。

また、多大なるご助勢をいただきました東京農業大学動物発生工学研究室の河野友宏名誉教授、小川英彦教授と樋浦仁准教授に深く感謝致します。

さらに研究遂行にあたり御協力をいただきました、東京農業大学動物発生工学研究室の佐々木恵亮研究員、広島大学自然科学研究支援開発センターの外丸祐介教授、神田暁史研究員に御礼申し上げます。また、研究遂行にあたり御助力をいただきました、東京農業大学動物発生工学研究室の田中康貴さん、大谷麗子さん、蓮沼智也さんに感謝の意を表します。

参考文献

1. **Crichton JH, Dunican DS, MacLennan M, Meehan RR and Adams IR.** Defending the genome from the enemy within: mechanisms of retrotransposon suppression in the mouse germline. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2014; **71**: 1581–1605.
2. **Mouse Genome Sequencing Consortium.** Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 2002; **420**: 520–562.
3. **Walsh CP, Chaillet JR and Bestor TH.** Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nature Genetics* 1998; **20**: 116–117.
4. **Jachowicz JW, Bing X, Pontabry J, Bošković A, Rando OJ and Torres-Padilla M-E.** LINE-1 activation after fertilization regulates global chromatin accessibility in the early mouse embryo. *Nature Genetics* 2017; **49**: 1502–1510.
5. **Percharde M, Lin C-J, Yin Y, Guan J, Peixoto GA, Bulut-Karslioglu A, Biechele S, Huang B, Shen X and Ramalho-Santos M.** A LINE1-Nucleolin Partnership Regulates Early Development and ESC Identity. *Cell* 2018; **174**: 391–405.e19.
6. **Saitou M, Kagiwada S and Kurimoto K.** Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells. *Development (Cambridge, England)* 2012; **139**: 15–31.
7. **Sakashita A, Kawabata Y, Jincho Y, Tajima S, Kumamoto S, Kobayashi H, Matsui Y and Kono T.** Sex Specification and Heterogeneity of Primordial Germ Cells in Mice. *PLOS ONE* 2015; **10**: e0144836.
8. **Adams IR and McLaren A.** Sexually dimorphic development of mouse primordial germ cells: switching from oogenesis to spermatogenesis. *Development* 2002; **129**: 1155–1164.
9. **Kawabata Y, Kamio A, Jincho Y, Sakashita A, Takashima T, Kobayashi H, Matsui Y and Kono T.** Sex-specific histone modifications in mouse fetal and neonatal germ cells. *Epigenomics* 2019; **11**: 543–561.
10. **Kobayashi H, Sakurai T, Miura F, Imai M, Mochiduki K, Yanagisawa E, Sakashita A, Wakai T, Suzuki Y, Ito T et al.** High-resolution DNA methylome analysis of primordial germ cells identifies gender-specific reprogramming in mice. *Genome Research* 2013; **23**: 616–627.
11. **Aravin AA, Sachidanandam R, Bourc’his D, Schaefer C, Pezic D, Toth**

- KF, Bestor T and Hannon GJ.** A piRNA Pathway Primed by Individual Transposons Is Linked to De Novo DNA Methylation in Mice. *Molecular Cell* 2008; **31**: 785–799.
12. **Aravin AA, van der Heijden GW, Castañeda J, Vagin VV, Hannon GJ and Bortvin A.** Cytoplasmic Compartmentalization of the Fetal piRNA Pathway in Mice. *PLoS Genetics* 2009; **5**: e1000764.
13. **Watanabe T, Chuma S, Yamamoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Totoki Y, Toyoda A, Hoki Y, Fujiyama A, Shibata T, Sado T et al.** MITOPLD Is a Mitochondrial Protein Essential for Nuage Formation and piRNA Biogenesis in the Mouse Germline. *Developmental Cell* 2011; **20**: 364–375.
14. **Nishimasu H, Ishizu H, Saito K, Fukuhara S, Kamatani MK, Bonnefond L, Matsumoto N, Nishizawa T, Nakanaga K, Aoki J et al.** Structure and function of Zucchini endoribonuclease in piRNA biogenesis. *Nature* 2012; **491**: 284–287.
15. **Nishimura T, Nagamori I, Nakatani T, Izumi N, Tomari Y, Kuramochi-Miyagawa S and Nakano T.** PNLDC1, mouse pre-piRNA Trimmer, is required for meiotic and post-meiotic male germ cell development. *EMBO Reports* 2018; **19**: e44957.
16. **De Fazio S, Bartonicek N, Di Giacomo M, Abreu-Goodger C, Sankar A, Funaya C, Antony C, Moreira PN, Enright AJ and O’Carroll D.** The endonuclease activity of Mili fuels piRNA amplification that silences LINE1 elements. *Nature* 2011; **480**: 259–263.
17. **Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K, Takamatsu K, Chuma S, Kojima-Kita K, Shiromoto Y, Asada N, Toyoda A, Fujiyama A et al.** MVH in piRNA processing and gene silencing of retrotransposons. *Genes & Development* 2010; **24**: 887–892.
18. **Yoshimura T, Watanabe T, Kuramochi-Miyagawa S, Takemoto N, Shiromoto Y, Kudo A, Kanai-Azuma M, Tashiro F, Miyazaki S, Katanaya A et al.** Mouse GTSF1 is an essential factor for secondary piRNA biogenesis. *EMBO Reports* 2018; **19**: e42054.
19. **Watanabe T, Cui X, Yuan Z, Qi H and Lin H.** MIWI 2 targets RNAs transcribed from pi RNA -dependent regions to drive DNA methylation in mouse prospermatogonia. *The EMBO Journal* 2018; **37**..
20. **Kojima-Kita K, Kuramochi-Miyagawa S, Nagamori I, Ogonuki N, Ogura A, Hasuwa H, Akazawa T, Inoue N and Nakano T.** MIWI2 as an Effector of DNA Methylation and Gene Silencing in Embryonic Male Germ Cells. *Cell Reports* 2016; **16**: 2819–2828.
21. **Bao J, Zhang Y, Schuster AS, Ortogero N, Nilsson EE, Skinner MK and**

- Yan W.** Conditional inactivation of Miwi2 reveals that MIWI2 is only essential for prospermatogonial development in mice. *Cell Death & Differentiation* 2014; **21**: 783–796.
22. **Ernst C, Odom DT and Kutter C.** The emergence of piRNAs against transposon invasion to preserve mammalian genome integrity. *Nature Communications* 2017; **8**: 1411.
23. **Unhavaithaya Y, Hao Y, Beyret E, Yin H, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T and Lin H.** MILI, a PIWI-interacting RNA-binding Protein, Is Required for Germ Line Stem Cell Self-renewal and Appears to Positively Regulate Translation. *Journal of Biological Chemistry* 2009; **284**: 6507–6519.
24. **Phillips BT, Gassei K and Orwig KE.** Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 2010; **365**: 1663–1678.
25. **Lim AK, Lorthongpanich C, Chew TG, Tan CWG, Shue YT, Balu S, Gounko N, Kuramochi-Miyagawa S, Matzuk MM, Chuma S et al.** The nuage mediates retrotransposon silencing in mouse primordial ovarian follicles. *Development* 2013; **140**: 3819–3825.
26. **Kabayama Y, Toh H, Katanaya A, Sakurai T, Chuma S, Kuramochi-Miyagawa S, Saga Y, Nakano T and Sasaki H.** Roles of MIWI, MILI and PLD6 in small RNA regulation in mouse growing oocytes. *Nucleic Acids Research* 2017; gkx027.
27. **Hara S, Takano T, Fujikawa T, Yamada M, Wakai T, Kono T and Obata Y.** Forced expression of DNA methyltransferases during oocyte growth accelerates the establishment of methylation imprints but not functional genomic imprinting. *Human Molecular Genetics* 2014; **23**: 3853–3864.
28. **Malki S, van der Heijden GW, O'Donnell KA, Martin SL and Bortvin A.** A Role for Retrotransposon LINE-1 in Fetal Oocyte Attrition in Mice. *Developmental Cell* 2014; **29**: 521–533.
29. **Yan W, Rajkovic A, Viveiros MM, Burns KH, Eppig JJ and Matzuk MM.** Identification of Gasz, an Evolutionarily Conserved Gene Expressed Exclusively in Germ Cells and Encoding a Protein with Four Ankyrin Repeats, a Sterile- α Motif, and a Basic Leucine Zipper. *Molecular Endocrinology* 2002; **16**: 1168–1184.
30. **Zhang J, Wang Q, Wang M, Jiang M, Wang Y, Sun Y, Wang J, Xie T, Tang C, Tang N et al.** GASZ and mitofusin-mediated mitochondrial functions are crucial for spermatogenesis. *EMBO Reports* 2016; **17**: 220–234.
31. **Ma L, Buchold GM, Greenbaum MP, Roy A, Burns KH, Zhu H, Han DY,**

- Harris RA, Coarfa C, Gunaratne PH *et al.*** GASZ Is Essential for Male Meiosis and Suppression of Retrotransposon Expression in the Male Germline. *PLoS Genetics* 2009; **5**: e1000635.
32. **Shoji M, Tanaka T, Hosokawa M, Reuter M, Stark A, Kato Y, Kondoh G, Okawa K, Chujo T, Suzuki T *et al.*** The TDRD9-MIWI2 Complex Is Essential for piRNA-Mediated Retrotransposon Silencing in the Mouse Male Germline. *Developmental Cell* 2009; **17**: 775–787.
33. **Peters AHFM, Plug AW, Vugt MJ van and Boer P de.** SHORT COMMUNICATIONS A drying-down technique for the spreading of mammalian meiocytes from the male and female germline. *Chromosome Research* 1997; **5**: 66–68.
34. **Kuramochi-Miyagawa S, Kimura T, Ijiri TW, Isobe T, Asada N, Fujita Y, Ikawa M, Iwai N, Okabe M, Deng W *et al.*** Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Development* 2004; **131**: 839–849.
35. **Meikar O, Da Ros M, Korhonen H and Kotaja N.** Chromatoid body and small RNAs in male germ cells. *REPRODUCTION* 2011; **142**: 195–209.
36. **Zamudio N, Barau J, Teissandier A, Walter M, Borsos M, Servant N and Bourc'his D.** DNA methylation restrains transposons from adopting a chromatin signature permissive for meiotic recombination. *Genes & Development* 2015; **29**: 1256–1270.
37. **Yoshida S, Sukeno M, Nakagawa T, Ohbo K, Nagamatsu G, Suda T and Nabeshima Y.** The first round of mouse spermatogenesis is a distinctive program that lacks the self-renewing spermatogonia stage. *Development* 2006; **133**: 1495–1505.
38. **Kuroki S, Maeda R, Yano M, Kitano S, Miyachi H, Fukuda M, Shinkai Y and Tachibana M.** H3K9 Demethylases JMJD1A and JMJD1B Control Prospermatogonia to Spermatogonia Transition in Mouse Germline. *Stem Cell Reports* 2020; **15**: 424–438.
39. **Li J, Kannan M, Trivett AL, Liao H, Wu X, Akagi K and Symer DE.** An antisense promoter in mouse L1 retrotransposon open reading frame-1 initiates expression of diverse fusion transcripts and limits retrotransposition. *Nucleic Acids Research* 2014; **42**: 4546–4562.
40. **Bolger AM, Lohse M and Usadel B.** Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 2014; **30**: 2114–2120.
41. **Kim D, Langmead B and Salzberg SL.** HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods* 2015; **12**: 357–360.
42. **Quinlan AR and Hall IM.** BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* 2010; **26**: 841–842.

43. **Liao Y, Smyth GK and Shi W.** featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 2014; **30**: 923–930.
44. **Chen Y, McCarthy D, Ritchie M, Robinson M and Smyth G.** edgeR: differential analysis of sequence read count data User’s Guide. 119.
45. **Ramírez F, Ryan DP, Grüning B, Bhardwaj V, Kilpert F, Richter AS, Heyne S, Dündar F and Manke T.** deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Research* 2016; **44**: W160–W165.
46. **Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G and Mesirov JP.** Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology* 2011; **29**: 24–26.
47. **Pertea M, Pertea GM, Antonescu CM, Chang T-C, Mendell JT and Salzberg SL.** StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nature Biotechnology* 2015; **33**: 290–295.
48. **Kumaki Y, Oda M and Okano M.** QUMA: quantification tool for methylation analysis. *Nucleic Acids Research* 2008; **36**: W170-175.
49. **Giuffrida V, Pezzino FM, Romano F, Litrico L, Garofalo MR, Nicotra G, Libra M, D’Amico F, Castrogiovanni P, Imbesi R et al.** Gene expression in mouse spermatogenesis during ontogenesis. *International Journal of Molecular Medicine* 2006; **17**: 523–528.
50. **Makino Y, Jensen NH, Yokota N, Rossner MJ, Akiyama H, Shirahige K and Okada Y.** Single cell RNA-sequencing identified Dec2 as a suppressive factor for spermatogonial differentiation by inhibiting Sohlh1 expression. *Scientific Reports* 2019; **9**: 6063.
51. **Schöpp T, Zoch A, Berrens RV, Auchynnikava T, Kabayama Y, Vasiliauskaitė L, Rappsilber J, Allshire RC and O’Carroll D.** TEX15 is an essential executor of MIWI2-directed transposon DNA methylation and silencing. *Nature Communications* 2020; **11**: 3739.
52. **Christy RJ and Huang RC.** Functional analysis of the long terminal repeats of intracisternal A-particle genes: sequences within the U3 region determine both the efficiency and direction of promoter activity. *Molecular and Cellular Biology* 1988; **8**: 1093–1102.
53. **Manakov SA, Pezic D, Marinov GK, Pastor WA, Sachidanandam R and Aravin AA.** MIWI2 and MILI Have Differential Effects on piRNA Biogenesis and DNA Methylation. *Cell Reports* 2015; **12**: 1234–1243.
54. **Vasiliauskaitė L, Berrens RV, Ivanova I, Carrieri C, Reik W, Enright AJ**

- and O'Carroll D. Defective germline reprogramming rewires the spermatogonial transcriptome. *Nature Structural & Molecular Biology* 2018; **25**: 394–404.
55. Inoue K, Ichiyanagi K, Fukuda K, Glinka M and Sasaki H. Switching of dominant retrotransposon silencing strategies from posttranscriptional to transcriptional mechanisms during male germ-cell development in mice. *PLOS Genetics* 2017; **13**: e1006926.
56. Houghtaling S, Timmers C, Noll M, Finegold MJ, Jones SN, Meyn MS and Grompe M. Epithelial cancer in Fanconi anemia complementation group D2 (Fancd2) knockout mice. *Genes & Development* 2003; **17**: 2021–2035.
57. Molaro A, Falciatori I, Hodges E, Aravin AA, Marran K, Rafii S, McCombie WR, Smith AD and Hannon GJ. Two waves of de novo methylation during mouse germ cell development. *Genes & Development* 2014; **28**: 1544–1549.
58. Nie Y, Wilson AF, DeFalco T, Meetei AR, Namekawa SH and Pang Q. FANCD2 is required for the repression of germline transposable elements. *Reproduction* 2020; **159**: 659–668.
59. Sakashita A, Wakai T, Kawabata Y, Nishimura C, Sotomaru Y, Alavattam KG, Namekawa SH and Kono T. XY oocytes of sex-reversed females with a Sry mutation deviate from the normal developmental process beyond the mitotic stage†. *Biology of Reproduction* 2019; **100**: 697–710.
60. Zhang Y, Liu T, Meyer CA, Eeckhoute J, Johnson DS, Bernstein BE, Nusbaum C, Myers RM, Brown M, Li W *et al.* Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biology* 2008; **9**: R137.
61. Hothorn T, Bretz F and Westfall P. Simultaneous inference in general parametric models. *Biometrical Journal. Biometrische Zeitschrift* 2008; **50**: 346–363.
62. Yamanaka S, Nishihara H, Toh H, Eijy Nagai LA, Hashimoto K, Park S-J, Shibuya A, Suzuki AM, Tanaka Y, Nakai K *et al.* Broad Heterochromatic Domains Open in Gonocyte Development Prior to De Novo DNA Methylation. *Developmental Cell* 2019; **51**: 21-34.e5.
63. Nagamori I, Kobayashi H, Nishimura T, Yamagishi R, Katahira J, Kuramochi-Miyagawa S, Kono T and Nakano T. Relationship between PIWIL4-Mediated H3K4me2 Demethylation and piRNA-Dependent DNA Methylation. *Cell Reports* 2018; **25**: 350–356.
64. Liu S, Brind'Amour J, Karimi MM, Shirane K, Bogutz A, Lefebvre L, Sasaki H, Shinkai Y and Lorincz MC. *Setdb1* is required for germline development and silencing of H3K9me3-marked endogenous retroviruses in primordial germ cells. *Genes & Development* 2014; **28**: 2041–2055.

65. **Sasaki K, Takaoka S and Obata Y.** Oocyte-specific gene knockdown by intronic artificial microRNAs driven by Zp3 transcription in mice. *The Journal of Reproduction and Development* 2021; **67**: 229–234.
66. **Ikeda S, Tanaka K, Ohtani R, Kanda A, Sotomaru Y, Kono T and Obata Y.** Disruption of piRNA machinery by deletion of ASZ1/GASZ results in the expression of aberrant chimeric transcripts in gonocytes. *Journal of Reproduction and Development* 2022; **advpub**: