OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ヒト雄性不妊に関わるY染色体領域AZFaのマウス精子形成における機能解析
Author(s)	松村, 貴史
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/72336
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

ヒト雄性不妊に関わるY染色体領域*AZFa*のマウス精子形成における機能解析

大阪大学薬学研究科

創成薬学専攻

松村　貴史

目次

略語一覧 2

第一編　緒論 3

第二編　本論

第一章　*Ddx3y* とそのパラログ *Ddx3x* の精子形成における機能の解析 5

第一節　*Ddx3y* 欠損雄マウスの作製と解析 6

第二節　*Ddx3x* 欠損雄マウスの作製と解析 13

第三節　*Ddx3x*、*Ddx3y* 両欠損 ES 細胞株の樹立 18

第四節　キメラマウスを用いた両欠損マウスの解析 21

第五節　小括 24

第二章　*Azfa* 領域欠失マウスの表現型解析 26

第一節　*Azfa* 欠失マウスの作製と妊孕性の解析 26

第二節　*Ddx3y* のマウス特異的パラログ、*D1pas1* の発現量解析 31

第三節　小括 33

第三編　考察 34

第四編　結論 37

第五編　謝辞 38

第六編　主論文・参考論文リスト 39

第七編　参考文献 40

略語一覧

Actb　：actin, beta
AZF　：azoospermia factor
bp　：base pair
cDNA　：complementary deoxyribonucleic acid
Cas9　：CRISPR-Associated Proteins 9
CRISPR：clustered regularly interspaced short palindromic repeats
D1pas1　：DNA segment, Chr 1, Pasteur Institute 1
DDX　：DEAD-box polypeptides
Ddx3x　：DEAD （Asp-Glu-Ala-Asp） box polypeptide 3, X-linked
Ddx3y　：DEAD （Asp-Glu-Ala-Asp） box polypeptide 3, Y-linked
DMEM　：Dulbecco's Modified Eagle's Medium
dKO　：double knockout
EDTA　：ethylenediaminetetraacetic acid
EGFP　：enhanced green fluorescent protein
ES　：embryonic stem
EST　：expressed sequence tag
FBS　：fetal bovine serum
hCG　：human chorionic gonadotropin
He-PAS　：hematoxylin-Periodic Acid-Schiff
HEK293T　：human embryonic kidney 293 with T antigen of SV40
KO　：knockout
KSOM　：K+ Simplex Optimization Media
MEF　：mouse embryonic fibroblast
mRNA　：messenger ribonucleic acid
PAM　：Proto-spacer Adjacent Motif
PBS　：phosphate buffered saline
PCR　：polymerase chain reaction
PFA　：paraformaldehyde
PMSG　：pregnant mare serum gonadotropin
RT-PCR：reverse transcription polymerase chain reaction
SCOS　：Sertoli cell-only syndrome
sgRNA　：single-guide RNA
TALEN　：transcription activator-like effector nucleases
Uba1　：ubiquitin-like modifier activating enzyme 1
Uba1y　：ubiquitin-activating enzyme, Chr Y
Usp9y　：ubiquitin specific peptidase 9, Y chromosome
Uty　：ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene, Y chromosome
WT　：wild-type

＊ヒトの遺伝子名・ゲノム領域：大文字・斜体
＊マウスの遺伝子名・ゲノム領域：頭文字のみ大文字・斜体
＊ヒト・マウスのタンパク質名：大文字

第一編　緒論

現在、日本を含む先進諸国では不妊症が大きな社会問題になっている。国立社会保障・人口問題研究所の統計調査によると日本では、約 6 組に 1 組のカップルが不妊といわれている。世界保健機関（WHO）の報告では、その約半数に男性不妊が関与している[1]。男性不妊の主な原因は造精機能障害や性機能障害、精路の閉塞など様々だが、厚生労働省による 2015 年の調査では、日本の男性不妊の原因として最も多くを占める（82.4%）のは造精機能の障害である。顕微授精といった生殖補助医療技術の発展により、不妊男性においても、精巣または精液から数匹の精子が回収できれば子供を望むことができるものの、精巣の精細管の中で精子形成が途中で停止し、半数体の精細胞や精子が回収できない場合や、生殖細胞が完全に喪失し支持細胞であるセルトリ細胞しか観察されない「セルトリ細胞遺残症候群（Sertoli -cell-only syndrome: SCOS）」では、有効な治療法は未だ確立されていない。

1970 年代よりこのような重度の男性不妊患者の 1 割程度で、Y 染色体上の特定の領域に微小欠失が見られることが報告されている[2]。「無精子症領域（azoospermia factor region: AZF region）」と名付けられたこの領域は、*AZFa*、*AZFb*、*AZFc* の 3 か所が知られている[3]。興味深いことに *AZFa* の欠失は SCOS と、*AZFb* の欠失は精子形成の停止と、*AZFc* の欠失は重度の乏精子症と相関があることが知られているが、欠失による発症のメカニズムは未だ解明されていない。

著者は、最も重度の精子形成不全である SCOS の原因と目される *AZFa* 領域に着目した。*AZFa* 領域には、Ubiquitin Specific Peptidase: *USP9Y*、DEAD-box polypeptide 3, Y-linked: *DDX3Y*、Ubiquitously transcribed Tetratricopeptide repeat gene, Y chromosome: *UTY* の 3 遺伝子が存在する。また、この領域はマウスの Y 染色体にも保存されている（マウス *Azfa* 領域）。これまでに、健常男性でも *USP9Y* のコード領域が欠失しているケースが報告されている[4, 5]他 、*Uty* 遺伝子欠損（knockout: KO）雄マウスは生殖能力に異常を示していないことが示されている[6]。著者は、残る DDX3Y が SCOS に関わる分子ではないかと考えた。雄性生殖細胞の分化には、精子形成が起こる精巣内でセルトリ細胞やライディッヒ細胞といった体細胞との相互作用が必要不可欠である。そのため、不妊の原因遺伝子の機能を理

解するには個体レベルでその機能を理解することが重要であり、遺伝子改変マウス、中でも内在性遺伝子を破壊した KO マウスを用いた実験が求められる。近年登場した clustered regularly interspaced short palindromic repeats/ CRISPR-associated proteins 9: CRISPR/Cas9 は、細菌や古細菌が外来性ウイルス DNA やプラスミドを切断するための獲得免疫[7]であり、ゲノム上の標的配列を CRISPR RNA: crRNA と trans-activating crRNA: tracrRNA により認識し、Cas9 ヌクレアーゼにより DNA 二本鎖切断を誘導する[8, 9]。著者が所属する遺伝子機能解析分野では、受精卵の前核へ Cas9 ヌクレアーゼと single-guide RNA: sgRNA（crRNA と tracrRNA を組み合わせた単一の RNA）を発現するプラスミドを注入することで、産仔の約 50%という効率で変異マウスが得られることを報告しており[10]、これまで精巣に発現する 50 以上の遺伝子 KO マウスを解析してきた[11]。そこで、本研究においては CRISPR/Cas9 システムを用いた受精卵のゲノム編集[10]により *Ddx3y* の KO マウスを作製し、その精子形成の解析を行った。さらに、ゲノム編集技術を ES 細胞へ応用することで、370 kb に及ぶ *Azfa* のほぼ全長の領域を欠失させたマウスの作出を行うことで、マウスにおける *Azfa* 領域関連遺伝子の精子形成における機能を解析した。

第二編　本論

第一章　*Ddx3y* とそのパラログ *Ddx3x* の精子形成における機能の解析

DDX3Y は、アスパラギン酸（D)、グルタミン酸（E)、アラニン（A)、アスパラギン酸（D）からなる特徴的なモチーフを持った RNA ヘリケースドメイン : DEAD-box を持つ、DDX（DEAD-box polypeptides） RNA ヘリケースファミリーに属しており、主に mRNA の転写やスプライシング、分解などに関わっているとされる。この遺伝子は *AZFa* 領域内の他の遺伝子である *USP9Y*、*UTY* に比べ、最も不妊男性において欠失が見られる遺伝子であることに加え[12]、タンパク質は、精巣のみで発現し、特に未分化な精原細胞や一部の精母細胞に局在している[13]。マウスにおいても、*Ddx3y* の mRNA は精巣で発現しており、その中でも精原細胞における発現が顕著である[14]。ヒト *DDX3Y* とマウス *Ddx3y* は 88%のアミノ酸配列相同性を有しており、ヒトとマウスの DDX3Y は同様な機能を持っていると考えられる。また、ヒト・マウスともに *DDX3Y*（*Ddx3y*）は X 染色体に、パラログとして *DDX3X*（*Ddx3x*）を持っており、精巣で発現している。本章では *Ddx3y* の機能を欠失させたマウスを用いて、精子形成における *Ddx3y* の解析を行った他、*Ddx3y* と *Ddx3x* の機能を同時に欠損（double KO: dKO）した生殖細胞の精子形成能についても解析した。

第一節　*Ddx3y* 欠損雄マウスの作製と解析

Y 染色体は、反復配列やパリンドローム（回文）配列に富んでおり、変異を導入したい配列の上流、下流に両側あわせて 5 kb 以上の長い相同配列が必要な従来の相同組み換え法では、遺伝子を特異的にターゲティングすることが難しかった[15]。一方、transcription activator-like effector nucleases: TALEN[16, 17]や CRISPR/Cas9 といったゲノム編集技術は、短い配列で特異的に標的遺伝子 DNA の二本鎖切断を誘導し、遺伝子の機能を欠損させることができる。特に CRISPR/Cas9 システムにおいては Cas9 ヌクレアーゼがたった 20 bp の標的配列と PAM 配列（5'-NGG-3'の 3 塩基）を配列特異的な sgRNA を用いて認識する[7]。本節では、CRISPR/Cas9 システムを用いた受精卵のゲノム編集により *Ddx3y* KO マウスを作製し、その妊孕性の解析を試みた。

実験方法

実験に用いたマウス

本研究のすべての動物実験、動物の取り扱いは、大阪大学動物実験規程に従って大阪大学微生物病研究所の動物実験委員会の許可を得て行った（承認番号：動微 H25-02-0）。以下、野生型の B6D2F1、C57BL/6NCr、ICR マウスは日本エスエルシー株式会社もしくは、日本クレア株式会社より購入して用いた。

Ddx3y を認識する sgRNA/Cas9 発現ベクターの作製

Ensembl （https://m.ensembl.org）で得たゲノム情報より、*Ddx3y* 遺伝子領域内の PAM 配列（NGG 配列；N には A, T, G, C のいずれかが入る）を検索し、上流 20 塩基を標的配列の候補とした。候補配列がゲノム上の他の領域を標的とする可能性を少なくするため、Bowtie ソフトウェア（http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml ）を用いて、候補配列の 3'側の 12～14 塩基と PAM 配列が相同な *Ddx3y* 上の配列以外の領域（オフターゲット配列）をマウスゲノム上で検索し、オフターゲット配列の数が少ないものを選別した（表 1）。4 種類の標的配列を選び（表 1）、参考文献[10]の通りにヒト化 Cas9 ヌクレアーゼと sgRNA を発現する pX330 プラスミドベクター（Addgene #42230,

https://www.addgene.org/42230/）を作製した。簡潔に記載すると、選別した標的配列の 5’末端に cacc の 4 塩基を付加したオリゴヌクレオチドを、5’側に aaac の 4 塩基を付加した相補オリゴヌクレオチドと 95 ℃; 5 分- 65 ℃; 5 分- 16 ℃; 30 分処理してアニーリングし、二本鎖 DNA にした。pX330 プラスミドを制限酵素 *Bbs*I（New England BioLabs）で切断したものに、標的配列の二本鎖 DNA をライゲーションして、大腸菌にトランスフォーメーションし、目的のプラスミドを得た。

表 1.*Ddx3y* に対する sgRNA 配列と PAM 配列、sgRNA 配列の 3’側 12、13、14 塩基が一致する、*Ddx3y* の標的配列以外の領域の数

Gene	ID	Target sequence（5' to 3'）	PAM	No. of off-target sites		
				12 bp	13 bp	14 bp
Ddx3y	1	GTCTGTGATAAGGACAGTTC	AGG	19	7	0
	2	GTGATAAGGACAGTTCAGGA	TGG	28	9	2
	3	AAAGATGCCTACAGCAGTTT	TGG	17	6	1
	4	TATTTCAGTGATCGTGGAAG	TGG	3	2	0

sgRNA/Cas9 の切断活性を評価する pCX-EGxxFP-*Ddx3y* プラスミドの作製

sgRNA が標的とする配列を含む約 500 bp の *Ddx3y* ゲノム領域を、制限酵素認識配列を 5’側に付加したプライマーを用いてマウスのゲノム DNA から PCR 法により増幅した。増幅に用いたプライマーは以下の通り（制限酵素認識配列には下線を引いた）。Forward primer 5’-AAGAATTCCATGCCCTCATCTCAATATCCCATAAGGT -3’、Reverse primer 5’-AACTGCAGGGATAGCCATTGTTGGACTAGTTGGACA -3’。 EGFP の DNA 配列 1/3 を重複させることで蛍光タンパク質の機能を失わせた pCX-EGxxFP プラスミド （Addgene #50716, https://www.addgene.org/50716/）のマルチクローニングサイト （*Bam*HI, *Nhe*I, *Pst*I, *Sal*I, *Eco*RI, *Eco*RV）に *Eco*RI と *Pst*I を用いて PCR 産物を挿入し、目的のプラスミドを得た。

sgRNA/Cas9 複合体の切断効率の評価

6 穴プレートに HEK293T 細胞を 1×10^6 cells/well の濃度で播種し、6～7 時間後にリン酸カルシウム法により pCX-EGxxFP-*Ddx3y* プラスミドと pX330-sgRNA プラスミドを同時にトランスフェクションし（各 1 μg/well）、37 ℃、5% CO_2 条件下で一晩培養した。トランスフェクション後 48 時間後に細胞内の EGFP 蛍光を蛍

光顕微鏡下で観察した。Cas9/sgRNA 複合体が EGxxFP 中間部に挿入された標的配列を切断し、EGxxFP の前半部分と後半部分の相同性を利用して EGFP 配列が正しく修復された場合のみ、EGFP 蛍光が観察される[18]。この蛍光強度による各 sgRNA の切断活性を評価した。ポジティブ・コントロールとして、当研究室で KO マウスの作出に成功している *Cetn1* 遺伝子を標的とした pX330-*Cetn1* プラスミドと pCX-EGxxFP-*Cetn1* プラスミドを用い、ポジティブ・コントロールの活性と比較して、変異マウス作製に用いる pX330 プラスミドベクターを選別した。また観察される EGFP 蛍光が自家蛍光ではないことを確認するため、pCX-EGxxFP-*Ddx3y* のみをトランスフェクションしたものをネガティブ・コントロールとして用いた。

マウス前核期卵への pX330-sgRNA 顕微注入による変異個体作出

各 5 U の PMSG、hCG（あすか製薬株式会社）により過排卵処理した B6D2F1 雌マウス と、性成熟した B6D2F1 雄マウスを交配し、hCG 投与 18 時間後に安楽死させた雌マウスから卵管を摘出した。卵管膨大部より卵丘細胞と卵子の複合体を採取し、常温の FHM 培地へ移した。最終濃度 300 μg/mL のヒアルロニダーゼ溶液（Sigma-Aldrich）を培地に加え 37 ℃、5 分間の処理により、受精卵のまわりを覆っている卵丘細胞を取り除いた。受精卵を 37 ℃、5% CO_2 条件下で平衡化した KSOM 培地に移し、37 ℃、5% CO_2 インキュベータ内で雌雄前核が確認できるまで培養した。pX330-sgRNA プラスミドはスピンカラムにより精製した後、$T_{10}E_{0.1}$ 溶液（10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.4）により DNA 濃度を 5 ng/μL に調製した。2 種類の pX330-sgRNA（pX330-sgRNA-1 と pX330-sgRNA-4）を等量混合し、マイクロマニピュレーターを用いて、FHM 培地へ移した前核期卵の雌雄前核のどちらか一方へ注入した。その後、受精卵を再度 KSOM 培地へ移して 37 ℃、5% CO_2 インキュベータ内で培養した。翌日、2 細胞期胚に発生したものを、交配当日の偽妊娠マウスの卵管に胚移植した。胚移植から 19 日後に、自然分娩もしくは帝王切開により仔マウスを得た。

遺伝子型解析

生後 1～3 週齢の仔マウスの指、耳または尾を細切し、lysis buffer（20 mM Tris-HCl（pH 8.0）、5 mM EDTA、400 mM NaCl、0.3% SDS、200 μg/mL Proteinase

K）で溶解してゲノム DNA を抽出し、プライマーを用いて、標的部位を PCR により増幅した。PCR には KOD DNA ポリメラーゼ（KOD-Fx Neo、東洋紡株式会社）を用いて、94 ℃; 2 分-[94 ℃; 30 秒-65 ℃; 30 秒-72 ℃; 30 秒（40 サイクル）]- 72 ℃; 2 分-16 ℃の条件で行った。増幅産物をスピンカラムにより精製し、ダイレクトシークエンスにより変異の有無を調べた。増幅に用いたプライマーは pCX-EGxxFP-*Ddx3y* の作製に用いたものを使用した。

cDNA の合成と RT-PCR

性成熟した、C57BL/6NCr もしくは *Ddx3y* 変異雄マウスを安楽死させ、精巣を採材し、TRI-zol（Thermo Fisher Scientific）を用いて total RNA を抽出した。ゲノム DNA を DNase によって除いた後、SuperScript III First Strand Synthesis（Thermo Fisher Scientific）を用いて cDNA を合成した。この際プライマーには Oligo dT を使用した。5 ng の cDNA を鋳型として、*Ddx3y* を PCR によって増幅した。PCR は KOD-Fx Neo を用い、94 ℃; 2 分-[94 ℃; 30 秒-65 ℃; 30 秒-72 ℃; 2 分（35 サイクル）]-72 ℃; 2 分-16 ℃の条件で行った。*Ddx3y* 増幅に用いたプライマーは以下の通り。Forward primer 5'- ATGAGTCAAGTGGCAGCGG -3'、Reverse primer 5'- TCAATTGCCCCACCAGTCAACTGCC -3'。

タンパク質のドメイン構造予測

RT-PCR によって得られた C57BL/6NCr もしくは *Ddx3y* 変異雄マウス由来の *Ddx3y* 遺伝子の転写産物の配列をダイレクトシークエンス解析により取得し、翻訳されるタンパク質のアミノ酸配列を予測した。予測したアミノ酸配列から、SMART ウェブツール（http://smart.embl-heidelberg.de/）によりタンパク質のドメイン構造を予測した。

精巣切片の作製と He-PAS 染色

生後 15 週齢の B6D2F1 ならびに *Ddx3y* KO 雄マウスを安楽死させ、精巣を採材した。4% パラホルムアルデヒド（PFA）で 10 時間以上固定した後、Technovit 8100（三井化学株式会社）のプロトコルに沿って包埋した。簡潔に書くと固定した精巣を PBS で 4 ℃、1 時間洗浄し、アセトンに置き換え 4 ℃、1 時間脱水した。

その後、Technovit 8100 主液と硬化剤 I の混合液に 5 時間ほど浸透させ、硬化剤 II 50 µl を加えて精巣を半切した後、包埋した。作製した精巣ブロックをミクロトーム（MICROM HM325、Thermo Fisher Scientific）によって 5 µm の厚さに薄切し、APS コートスライドグラス（松波硝子工業株式会社）に貼付した。作製した切片を、1% periodic acid 溶液（ナカライテスク株式会社）に 10 分間、Schiff 試薬（富士フィルム和光純薬株式会社）に 20 分間浸漬し、流水水洗後、ヘマトキシリン溶液（富士フィルム和光純薬株式会社）に 5 分間浸漬して核染色をした。染色後の切片は 70%、90%、100%のエタノールの希釈系列およびキシレンで脱水し、封入後、光学顕微鏡で観察を行った。

精子の形態観察

生後 15 週齢の B6D2F1 ならびに *Ddx3y* KO 雄マウスを安楽死させ、精巣上体を採材した。マイクロ剪刀で精巣上体を切り、精子を絞り出して TYH 培地[19]へ懸濁、遊泳させ、その後 PBS で 10 分懸濁させた。精子懸濁液をスライドグラスに滴下、封入し、光学顕微鏡で観察した。

交配実験と産仔数の計測

性成熟した KO 雄マウス 1 匹に対して、8 週齢の雌マウス 2 匹を 2 か月以上同居させた。産仔が確認できれば、その数を記録した。

統計解析

平均値±SD で示したデータは少なくとも 3 回以上の独立した実験結果から計算した。統計解析は Student の t 検定を用いて行い、$P < 0.05$ のときに有意な差があるとした。

実験結果

切断標的配列の選定と各 sgRNA/Cas9 複合体の活性評価

Ddx3y は 17 のエキソンからなり、第一エキソンに開始コドンが存在する。そのうち、RNA ヘリケースドメインがコードされ始める第 6 エキソンより上流の配列の中

で、オフターゲット配列数の少なさから、第 4 エキソンに 4 種類の sgRNA を設計した（図 1A）。切断活性の良い sgRNA/Cas9 複合体を選んでマウス受精卵へ注入するため、pCAG-EGxxFP-*Ddx3y* プラスミドと HEK293T 細胞を用いて切断活性評価を行った。EGFP 蛍光強度（図 1B）とオフターゲット配列の数（表 1）から、pX330-sgRNA-1、pX330-sgRNA-4 を以後の実験に用いた。

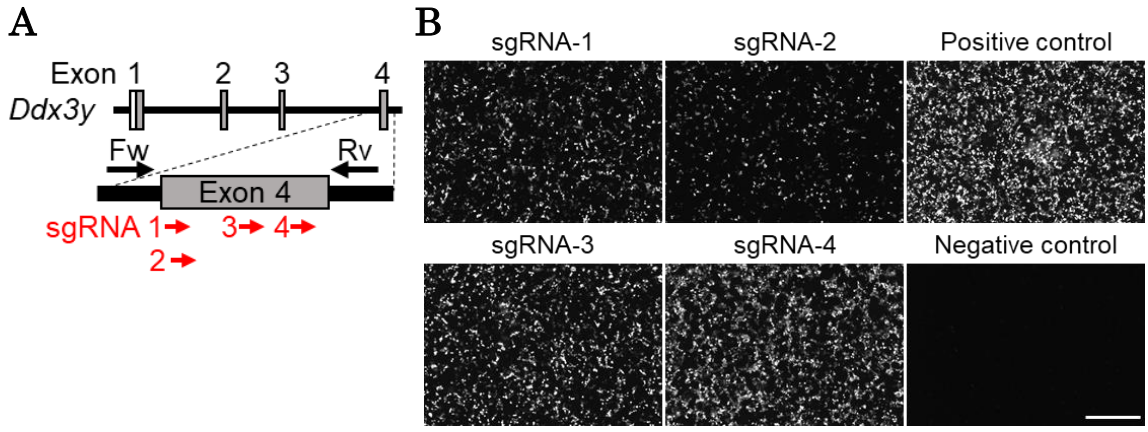


図 1. *Ddx3y* を標的とする sgRNA の設計とその活性評価 (A) *Ddx3y* の第 4 エキソンを標的とする sgRNA（赤矢印）の設計。エキソンは非翻訳領域（白四角）、翻訳領域（灰色四角）で示す。遺伝子判定型には黒矢印で示すプライマーセットを使用した。(B) EGFP 蛍光（白）による各 sgRNA を挿入した pX330 の活性評価。スケールバー: 200 μm。

Ddx3y KO 雄マウスの作製

標的遺伝子に変異が導入されたマウスを作製するため、前項で決定した pX330-sgRNA-1、pX330-sgRNA-4 プラスミドをマウス受精卵の前核へ注入し、2-cell まで発生した胚を偽妊娠マウスへ移植した（表 2）。出産後、1 週齢まで生存したファウンダーマウス（F0）の遺伝子型を確認した結果、5 匹の雄マウスのうち 2 匹（40%）に変異が観察された（表 2）。このうち、フレームシフト変異を誘導する 16（10＋6）塩基の欠失変異を持つマウス（X/Y$^{Ddx3y\text{-}em2}$）（図 2A）を野生型雌マウスと交配させたところ、変異は雄の仔マウス（F1）に伝達した。この変異アレル（*Ddx3y-em2*）から機能を持つ DDX3Y が生成される可能性を検証するため、RT-PCR によって *Ddx3y* のコーディング領域全長を増幅し、シークエンスを解析した。RT-PCR の結果、予測した通り *Ddx3y-em2*（16 塩基欠失）のバンドは野生型 *Ddx3y* のバンドと類似したサイズに観察され、他にバンドは検出されなかった（図 2B）。シークエンス解析の結果、増幅された *Ddx3y-em2* はフレームシフト変異により RNA ヘリケースドメインの前に終始コドンがコードされていた。以上のことから *Ddx3y-em2* から翻訳された

タンパク質はドメイン構造を持たないことが予測された（図 2C）ため、F1 以降の X/Y$^{Ddx3y\text{-}em2}$雄マウスを *Ddx3y* KO マウスとして用いた。

表 2. 受精卵への pX330-sgRNA 注入結果と変異導入効率

Injected eggs	2-cell	Pups	Analyzed pups	Males	Mutant mice
94	72	16	16	5	2

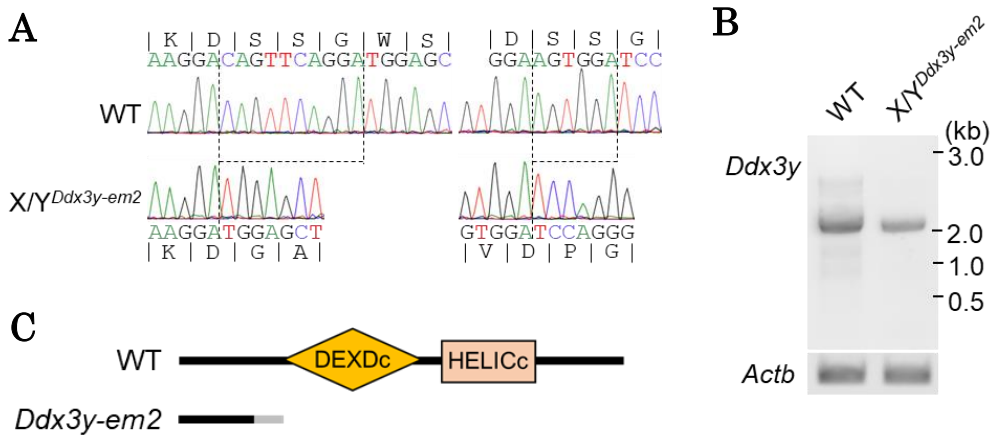


図 2. *Ddx3y* 変異アレル（*Ddx3y-em2*）と翻訳されるタンパク質のドメイン構造予測 (A) 野生型並びに *Ddx3y* 変異マウス（X/Y$^{Ddx3y\text{-}em2}$）の遺伝子型。破線は変異マウスで欠失した領域を示す。(B) 野生型マウスならびに X/Y$^{Ddx3y\text{-}em2}$ の精巣 cDNA を用いた、*Ddx3y* 全長の RT-PCR。野生型 *Ddx3y* の予想サイズは 1,974bp。 (C) RT-PCR で増幅された cDNA のシークエンス解析により予想されたタンパク質のドメイン構造。灰色部は野生型と異なるアミノ酸を表す。

Ddx3y KO 雄マウス精巣の組織学的解析と精子形態、妊孕性の解析

生後 15 週齢の野生型並びに X/Y$^{Ddx3y\text{-}em2}$ 雄マウスから精巣を摘出し、精巣切片を作製、PAS 染色にて、形態を観察したところ、精子形成に異常は見られなかった（図 2A 左）。また精巣上体尾部から採取した精子の形態にも、異常は認められなかった（図 2A 右）。性成熟した野生型並びに X/Y$^{Ddx3y\text{-}em2}$ 雄マウスと野生型の雌マウスを交配させたところ、KO マウス雄マウスの交配実験から得られた産仔数は野生型雄マウスから得られた産仔数に匹敵し、妊孕性の低下は見られなかった（図 2B）。

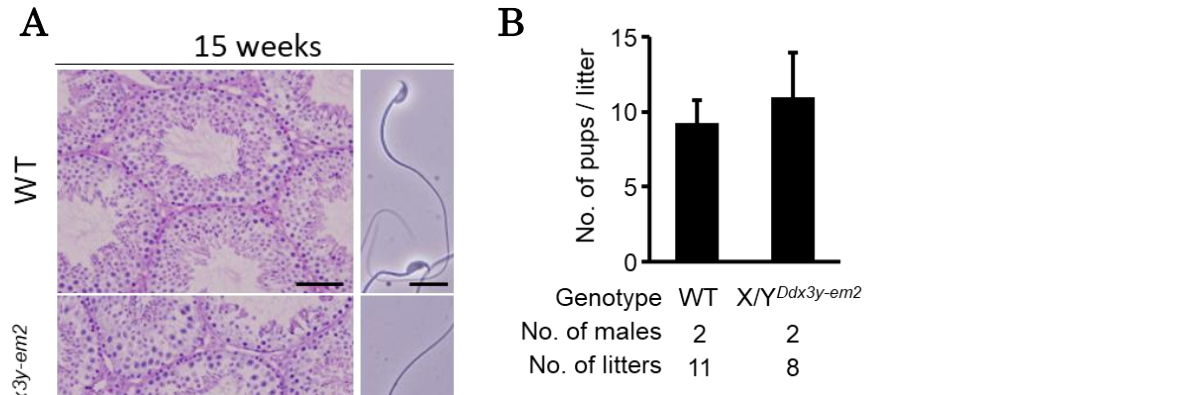


図 2. *Ddx3y* KO マウス（X/Y$^{Ddx3y\text{-}em2}$）の表現型解析
（A）15 週齢の野生型ならびに KO マウスの精巣（左）と精子（右）。（左）精巣は He-PAS で染色。スケールバー: 50μm。（右）精巣上体尾部精子。スケールバー: 20 μm。(B)野生型雄マウスならびに KO 雄マウスから得られた平均産仔数。エラーバー: SD。

第二節　*Ddx3x* 欠損雄マウスの作製と解析

DDX3Y と *DDX3X* は、アミノ酸配列、塩基配列における相同性が、それぞれ、91%、88%とよく似ている。*Ddx3x* はマウス X 染色体にも存在し、*Ddx3y* とのアミノ酸配列、塩基配列の相同性は、90%、84%である。精巣特異的にタンパク質が発現する DDX3Y と異なりヒトにおいて DDX3X は精巣の他、脳、腎臓、卵巣にも発現している[13]。また、マウス DDX3X は精巣において全ての細胞種で発現していることが示唆されており、*Ddx3y* と *Ddx3x* が精巣において類似の機能を持つ可能性が考えられる。しかし現在まで両遺伝子の精子形成における機能は明らかになっていない。そこで、*Ddx3y* と *Ddx3x* を同時に欠損させ、精子形成における両遺伝子の機能を解析することを試みた。

実験方法

Ddx3x を認識する sgRNA/Cas9 発現ベクターの作製

第一章第一節と同様に Bowtie ソフトウェア（http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml ）を用いて、候補配列の 3'側の 14 塩基と PAM 配列が相同な領域をマウスゲノム上で検索し、その領域が、目的とする *Ddx3x* 上の配列以外の領域と相同でないものを 4 種類選び（表 3)、pX330 プラスミドベクターを作製した。

表 3. *Ddx3x* に対する sgRNA 配列と PAM 配列、sgRNA 配列の 3'側 12、13、14 塩基が一致する、*Ddx3y* の標的配列以外の領域の数

Gene	ID	Target sequence（5' to 3'）	PAM	No. of off-target sites		
				12 bp	13 bp	14 bp
Ddx3x	5	CTCTTCAGGGATGAGTCATG	AGG	25	11	3
	6	AGGGATGAGTCATGTGGCAG	TGG	32	14	3
	7	GTGGCAGTGGAAAATGCGCT	TGG	3	0	0
	8	AGTGGAAAATGCGCTCGGGC	TGG	1	0	0

sgRNA/Cas9 の切断活性を評価する pCX-EGxxFP-*Ddx3x* プラスミドの作製

sgRNA が標的とする配列を含む約 500 bp の *Ddx3x* ゲノム領域を、制限酵素認識配列を 5'側に付加したプライマーを用いてマウスのゲノム DNA から PCR 法により増幅し pCX-EGxxFP プラスミドのマルチクローニングサイトに *Eco*RI と *Nhe*I を用いて PCR 産物を挿入し、目的のプラスミドを得た。増幅に用いたプライマーは以下の通り（制限酵素認識配列には下線を引いた)。Forward primer 5'-AAGAATTCCCAAGGCTTCTTTATGAGCCGACG -3'、Reverse primer 5'-AAGCTAGCCCACCTGCGGGTCACTAATCAAC -3'。

sgRNA/Cas9 複合体の切断効率の評価

第一章第一節に準じて行った。pCX-EGxxFP-*Ddx3x* のみをトランスフェクションしたものをネガティブ・コントロールとして用いた。

マウス前核期卵への pX330-sgRNA 顕微注入による変異個体作出

第一章第一節に準じて行った。二種類の pX330-sgRNA プラスミド（pX330-sgRNA-4 と pX330-sgRNA-7）を $T_{10}E_{0.1}$ 溶液により DNA 濃度を 5 ng/μL に調製し、等量ずつ混合した。

遺伝子型解析

第一章第一節に準じて行った。PCR には KOD DNA ポリメラーゼ（KOD-Fx Neo、東洋紡株式会社）を用いて、94 ℃; 2 分-[94 ℃; 30 秒-65 ℃; 30 秒-72 ℃; 30 秒（40 サイクル）]- 72 ℃; 2 分-16 ℃の条件で行った。*Ddx3x* の増幅に用いたプライマーは pCX-EGxxFP-*Ddx3x* の作製に用いたもの、*Ddx3y* の増幅に用いたプライマーは pCX-EGxxFP-*Ddx3y* の作製に用いたものを使用した。

交配実験と産仔数の計測

性成熟した *Ddx3x* ヘテロ変異雌（$X^{Ddx3x\text{-}em1}/X^{WT}$）1 匹に対して、性成熟した *Ddx3y* KO 雄マウス（$X^{WT}/Y^{Ddx3y\text{-}em2}$）1 匹を 3 か月以上同居させた。産仔が確認できれば、遺伝子型の解析を行い、その数を記録した。

マウス胚の形態観察

性成熟した *Ddx3x* ヘテロ変異雌マウス（$X^{Ddx3x\text{-}em1}/X^{WT}$）を性成熟した *Ddx3y* KO 雄マウス（$X^{WT}/Y^{Ddx3y\text{-}em2}$）と交配し、毎朝膣栓を確認して交配の有無を調べた。膣栓が見られた日を胎生 0.5 日とし、胎生 10.5 日目に雌マウスを安楽死させ胎仔を取り出した。実態顕微鏡下で形態を観察した後、マイクロ剪刀で細切し、遺伝子型解析を行った。胎仔の性別は、X 染色体の *Uba1* 遺伝子領域もしくは、Y 染色体の *Uba1y* のどちらも増幅することができるプライマーセットを用いた PCR によって判定した。PCR による増幅産物は *Uba1* が 211 bp、*Uba1y* が 183 bp であり、電気泳動後のバンドの数によって雌（1 本）雄（2 本）を判別した。増幅に用いたプライマーは以下の通り。Forward primer 5'-TGGTCTGGACCCAAACGCTGTCCACA -3'と Reverse primer 5'-GGCAGCAGCCATCACATAATCCAGATG -3'。また、PMSG、hCG により過排卵処理した $X^{Ddx3x\text{-}em1}/X^{WT}$ を $X^{WT}/Y^{Ddx3y\text{-}em2}$ と交配し、胎生 1.5 日で卵管を灌流して胚

を回収した。胚は胚盤胞期になるまで（4 日間）KSOM で、37 ℃、5% CO_2 の条件で培養し 24 時間ごとに発生を観察した。

統計解析

平均値±SD で示したデータは少なくとも 3 回以上の独立した実験結果から計算した。統計解析は Tukey HSD 検定を用いて行い、$P < 0.05$ のときに有意な差があるとした。

実験結果

切断標的配列の選定と各 sgRNA/Cas9 複合体の活性評価

Ddx3x も 17 のエキソンから構成され、第一エキソンに開始コドンが存在する。開始コドンの直下に 4 種類の sgRNA を設計（図 3A）し、pCAG-EGxxFP-*Ddx3y* プラスミドと HEK293T 細胞を用いて切断活性評価を行った。EGFP 蛍光強度（図 3B）とオフターゲット配列の数（表 3）から、pX330-sgRNA-7 を以後の実験に用いた。

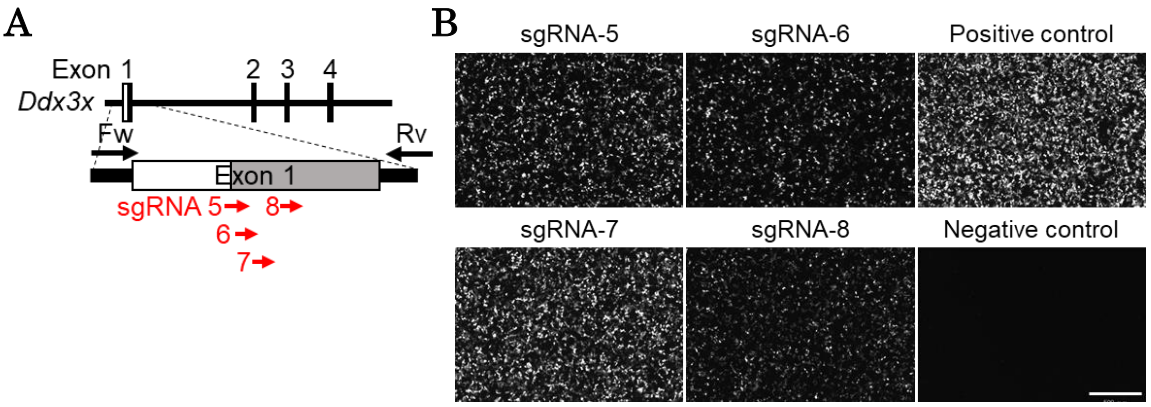


図 3. *Ddx3x* を標的とする sgRNA の設計とその活性評価 (A) *Ddx3y* の第 4 エキソンを標的とする sgRNA（赤矢印）の設計。エキソンは非翻訳領域（白四角）、翻訳領域（灰色四角）で示す。遺伝子判定型には黒矢印で示すプライマーセットを使用した。(B) EGFP 蛍光（白）による各 sgRNA を挿入した pX330 の活性評価。スケールバー: 200 μm。

Ddx3y、*Ddx3x* 両遺伝子欠損（double KO: dKO）雄マウスの作製

Ddx3y、*Ddx3x* の両方に変異が導入されたマウスを作製するため、前項で決定した pX330-sgRNA-7、pX330-sgRNA-4 プラスミドをマウス受精卵の前核へ注入し、2-cell まで発生した胚を偽妊娠マウスへ移植した（表 4）。1 週齢まで生存した 7 匹

（雄 1 匹、雌 6 匹）の F0 マウスの遺伝子型を確認した結果、雄 1 匹、雌 1 匹の計 2 匹で *Ddx3x* の変異が観察された（表 4）。*Ddx3y* と *Ddx3x* の両方に変異を持つ雄マウスは得られなかった。2 匹の *Ddx3x* 変異マウスのうち雌マウスはフレームシフト変異を誘導する 8 塩基の欠失変異（$X^{Ddx3x\text{-}em1}/X^{WT}$）を持っていた（図 4A）。この雌マウスを野生型雌マウスと交配させたところ、変異は雌の仔マウス（F1）に伝達した。この変異アレル（*Ddx3x-em1*）から翻訳されるタンパク質は、RNA ヘリケースドメインの前に終始コドンがコードされることで、機能ドメインを持たないことが予測された（図 4B）。目的の両欠損マウスを得るため、$X^{Ddx3x\text{-}em1}/X^{WT}$ 雌マウスと $X/Y^{Ddx3y\text{-}em2}$ 雄マウスを交配させたが、両欠損マウスを得ることはできなかった（図 4C）。

表 4. 受精卵への pX330-sgRNA 注入結果と変異導入効率

Injected eggs	2-cell	Pups	Analyzed pups	Males		Females
				Ddx3x mutants	*Ddx3y* mutants	*Ddx3x* mutants
119	82	19	7	1	0	1

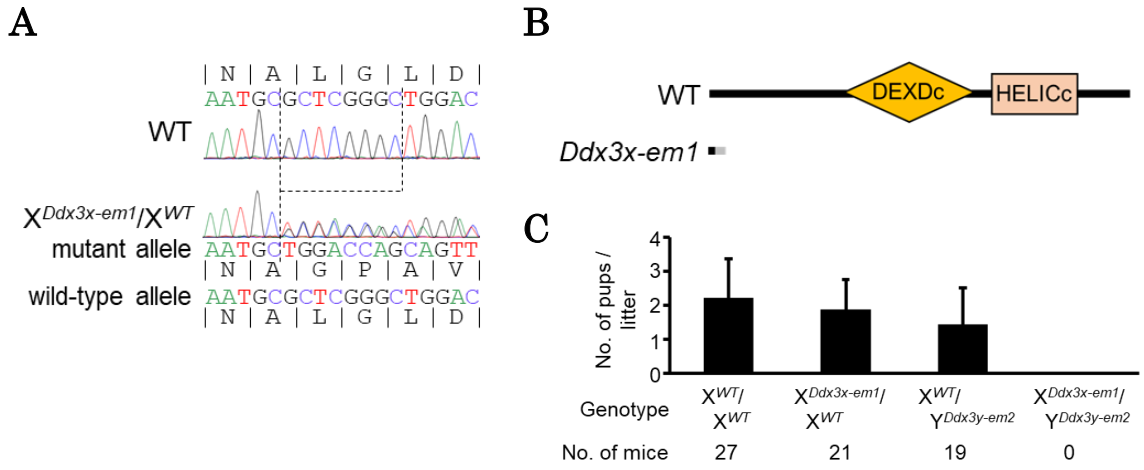


図 4. *Ddx3x* 変異アレル（*Ddx3x-em1*）と翻訳されるタンパク質のドメイン構造予測 (A) 野生型並びに *Ddx3x* 変異マウス（$X^{Ddx3x\text{-}em1}/X^{WT}$）の遺伝子型。破線は変異マウスで欠失した領域を示す。 (B)ゲノム配列から予想されたタンパク質のドメイン構造。灰色部は、野生型配列と異なるアミノ酸を表す。 (C) $X^{Ddx3x\text{-}em1}/X^{WT}$ と $X/Y^{Ddx3y\text{-}em2}$ の交配で生まれたマウスの遺伝子型。エラーバー: SD。

Ddx3y、*Ddx3x* dKO 雄マウスの胎生期における胚発生の解析

dKO マウスは胚発生に異常があると考えた。そこで、$X^{Ddx3x\text{-}em1}/X^{WT}$ 雌マウスと $X/Y^{Ddx3y\text{-}em2}$ 雄マウスを交配させ、胎生 1.5 日目の 2-cell を回収し、胚盤胞までの発生率を観察した。3 匹の雌マウスから回収した 2-cell は 94.5%（86/91）が胚盤胞まで発生し、野生型雌マウスと野生型雄マウスとの交配で得られた 2-cell の発生率

（28/28: 100%）と比べて大きな異常は見られなかった（図 5）。次に、$X^{Ddx3x\text{-}em1}/X^{WT}$雌マウスと $X/Y^{Ddx3y\text{-}em2}$雄マウスを交配させ胎生 10.5 日で胎仔を回収し、遺伝子型解析を行ったところ、34 匹の胎仔のうち dKO 雄マウス（$X^{Ddx3x\text{-}em1}/Y^{Ddx3y\text{-}em2}$）は 1 匹（2.9%）であった（表 5）。これは、メンデルの法則で予想される存在比（25%）より少なく、また、得られた $X^{Ddx3x\text{-}em1}/Y^{Ddx3y\text{-}em2}$ は同腹の $X^{WT}/Y^{Ddx3y\text{-}em2}$ に比べて小さかった（図 6）。以上の結果から、*Ddx3x*、*Ddx3y* dKO マウスは着床後の胚発生に異常があることが示された。

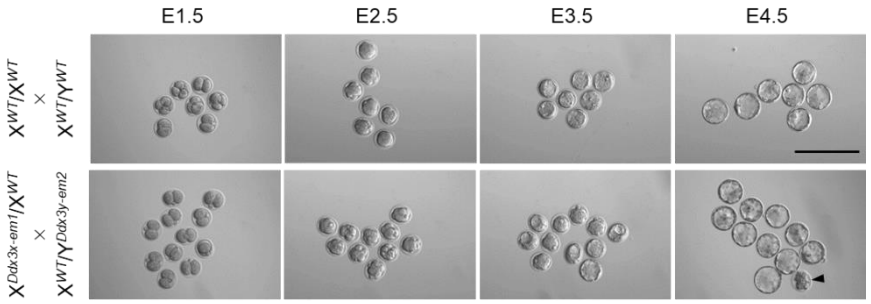


図 5. $X^{Ddx3x\text{-}em1}/X^{WT}$ と $X^{WT}/Y^{Ddx3y\text{-}em2}$ の交配から得られた 2-cell の胚発生。胚盤胞までの発生を示す。黒矢頭: 発生異常卵。スケールバー: 200μm。

表 5. $X^{Ddx3x\text{-}em1}/X^{WT}$ と $X^{WT}/Y^{Ddx3y\text{-}em2}$ の交配から得られた胎生 10.5 日胚の遺伝子型

No. of females	No. of total embryos	No. of embryos			
		X^{WT}/X^{WT}	$X^{Ddx3x\text{-}em1}/X^{WT}$	$X^{WT}/Y^{Ddx3y\text{-}em2}$	$X^{Ddx3x\text{-}em1}/Y^{Ddx3y\text{-}em2}$
3	34	17 (50.0%)	4 (11.7%)	12 (35.2%)	1 (2.9%)

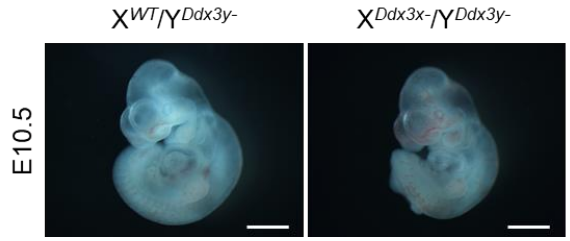


図 6. 胎生 10.5 日の $X^{WT}/Y^{Ddx3y\text{-}em2}$、並びに $X^{Ddx3x\text{-}em1}/Y^{Ddx3y\text{-}em2}$ マウス。スケールバー: 1mm。

第三節　*Ddx3x*、*Ddx3y* 両欠損 ES 細胞株の樹立

第二節で得られた結果は、*Ddx3x* KO マウスが胎生期の胚発生異常と胎盤の機能不全のために胎生致死を示すという近年の報告[20]とも一致した。そこで胎生致死を示す dKO マウスの精子形成を解析するため、ES 細胞を用いたキメラマウスでの解析（図 7）[21, 22]を試みた。この解析法では、欠損すると胎生致死を示す遺伝子の KO ES 細胞を樹立することで、野生型マウスの 8 細胞期に注入してキメラマウスを作製すると、野生型の細胞により胎生致死が回避できることを利用する。著者

が所属する研究室で樹立された全身で *Egfp* 遺伝子を発現する ES 細胞[23]を用いることで EGFP 蛍光により、キメラマウス精巣内で KO ES 細胞由来の生殖細胞を判別し、その挙動を観察することができる[21, 22]。本節では、キメラマウスを利用した dKO の精子形成解析を行うため、dKO ES 細胞の樹立を行った。

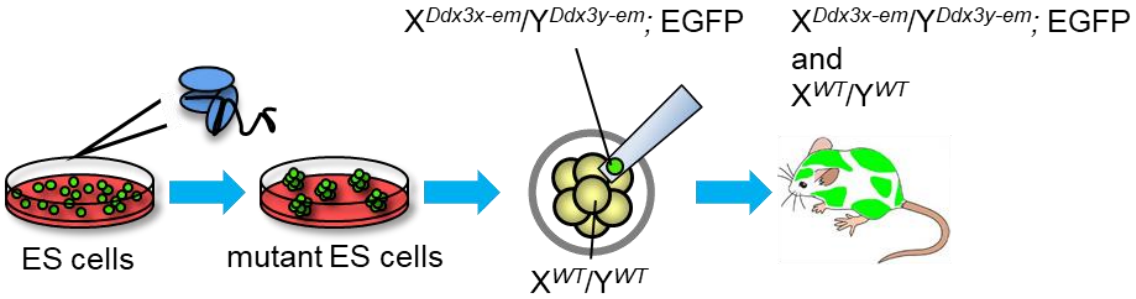


図 7. EGFP 蛍光を有する ES 細胞を用いたキメラマウス作製の模式図。参考論文[21]から適用。

実験方法

ES 細胞の培養

当研究室で樹立した、全身および精子の先体で EGFP を発現するトランスジェニックマウス[129S2 x (cag/acr-EGFP)B6]由来の ES 細胞（EGR-G01）[23]を用いた。フィーダー細胞には、胎齢 13.5 日目のマウス胎仔より調製した繊維芽細胞(MEF) を、Mitomycin C 処理後に凍結保存したものを用時融解して用いた[24]。培養液は、KnockOut™ DMEM（Thermo Fisher Scientific）に 1 mM Sodium Pyruvate Solution（Thermo Fisher Scientific）、0.1 mM MEM Non-Essential Amino Acids Solution（Thermo Fisher Scientific）、0.5 mg/mL penicillin–streptomycin–glutamine solution（Thermo Fisher Scientific）、0.1 mM 2-mercaptoethanol（Thermo Fisher Scientific）、1×Nucleosides solution[100×ストック；3 mM Adenosine、3 mM Guanosine、3 mM Cytidine、3 mM Uridine、1 mM Thymidine（すべて Sigma Aldrich）を超純水に溶かして濾過滅菌したものを作製]、20% FBS（Biowest）、1,000 U/mL mouse LIF（Merck Millipore）を混和して用いた。ES 細胞は、37 ℃、5% CO_2 インキュベータ内で、フィーダー細胞を前日に播種したゼラチンコートディッシュ上で培養した。継代は 0.25% トリプシン/1 mM EDTA/PBS 処理により実施した。

ES 細胞へのトランスフェクションと、モノクローン化

ゼラチンコート処理をした 6 穴プレートに 5×10^5 個の MEF を播種し、接着させた後に 1×10^5 個の ES 細胞を播種した。6-8 時間後、Lipofectamine® LTX & Plus Reagent（Thermo Fisher Scientific）を用いて各 1 μg の pX330-sgRNA プラスミド 2 種類と 0.1 μg の puromycin 耐性遺伝子を発現する pPGK-puro プラスミドをトランスフェクションした。トランスフェクション後 18 時間から 1 μg/mL puromycin を含む培地で 48 時間培養し、その後 puromycin を除いてコロニーを形成するまで培養した（約 5 日間)。コロニーをピックアップして 96 穴プレートで培養し、十分に細胞が増殖した時点で 4/5 の細胞を凍結ストックとし、残った 1/5 の細胞を lysis buffer で溶解し、ゲノム DNA を抽出した。遺伝子型解析は第一章第二節に準じて行った。

核型解析

変異が導入されていたクローンについて、凍結ストックを 96 穴プレートに播種し、2 日後に、コンフルエントになった ES 細胞を全量 24 穴プレートに継代した。更にその 2 日後に、コンフルエントとなった ES 細胞の 1/4 量を、MEF を播いていない 6 穴プレートに継代した。継代して 24 時間後に 20 μL の 10 μg/mL コルセミド溶液（Thermo Fisher Scientific）を加え、37 ℃で 1.5 時間インキュベートした。培地を除き、PBS で洗浄後、0.25% トリプシン 200 μL で処理した。1000 rpm で 5 分遠心し上清を取り除いた後 PBS で 1 回洗浄し、上清を取り除き 1% クエン酸ナトリウム溶液で懸濁した。5 分静置後、1000 rpm で 5 分遠心し、約 1 mL 残して上清を取り除いた。用事調製した固定液（酢酸 1: メタノール 3）を 4 mL 加え、強く撹拌した。15 分後、1000 rpm で 5 分遠心し上清を取り除いた後、再度固定液を加え懸濁した。1000 rpm で 5 分遠心後、約 1 mL を残して上清を取り除き、再懸濁した。このように調製したサンプルをスライドグラスに滴下し、Hoechst 33342 で染色した後、蛍光正立顕微鏡下で染色体数をカウントした。

実験結果

Ddx3y、*Ddx3x* dKO ES 細胞株の樹立

pX330-sgRNA-7 と pX330-sgRNA-4 を ES 細胞にトランスフェクションして KO ES 細胞株を樹立した。ピックアップした 16 クローンの中で、シークエンスを解析した 8 クローン全てにおいて、両遺伝子に変異が導入されていた。そのうち、フレームシフト変異により両遺伝子の機能が欠失すると思われる 3 クローンを選別した。これら 3 クローンの核型を解析したところ、3 クローンとも全て 70%以上の細胞が正常な染色体数（40 本）を持っていた。今回は、*Ddx3x*、*Ddx3y* にそれぞれ 29 塩基欠失（*Ddx3x-em2*）、124 塩基欠失（125 塩基欠失＋1 塩基挿入、*Ddx3y-em3*）を持つ ES 細胞（#1B）（図 8）を用いて以後の解析を行った。

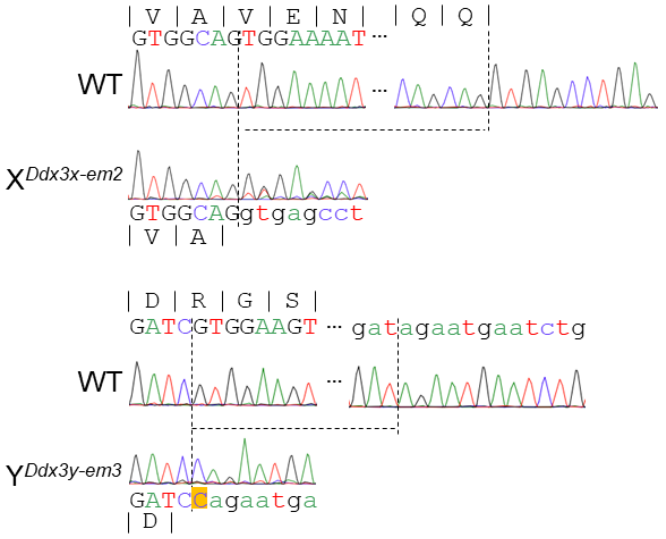


図 8. *Ddx3x* 変異アレル（*Ddx3x-em2*、上）；29 bp が欠失。 *Ddx3y* 変異アレル（*Ddx3y-em3*、下）； 124 bp が欠失（125 bp の欠失と 1 塩基の挿入）。破線は変異マウスで欠失した領域を、オレンジ色部は挿入された塩基を示す。

第四節　キメラマウスを用いた両欠損マウスの解析

本節では、樹立した *Ddx3x*、*Ddx3y* dKO ES 細胞を 8 細胞胚に注入して作製したキメラマウスを用いて、*Ddx3x* と *Ddx3y* の欠損が精子形成に及ぼす影響を解析した。マウスの精子形成は、生後すぐに初めて起こる精子形成（First wave）とそれ以降に起こる精子形成の 2 種類がある。First wave では、精子は、精子幹細胞を経ずに前精原細胞から分化する一方、それ以降の精子形成では、前精原細胞の一部が分化した精子幹細胞から精子形成が行われる[25]。そこで、First wave で作られた精子が観察される 6 週齢のキメラマウス精巣を解析するとともに、*Ddx3x*、*Ddx3y* の精子形成の維持もしくは精子幹細胞の生存に与える影響を解析するため、18 か月齢のキメラマウスを用いた解析も行った。

実験方法

キメラマウスの作製

PMSG、hCG により過排卵処理した ICR 雌マウスと、性成熟した ICR 雄マウスを交配し、膣栓が確認された日の翌日（胎生 1.5 日）の雌マウスから 2 細胞期～4 細胞期胚を卵管から灌流して回収した。胚は 8 細胞期胚（胎生 2.5 日）になるまで KSOM で、37 ℃、5% CO_2 の条件で培養した。調製した ES 細胞を 1 個、ピエゾドライブ (Prime Tech LTD, PMAS-CT150) を用いて 8 細胞期胚内へ注入した。ES 細胞の注入を終えた胚は KSOM 内で胚盤胞になるまで約 24 時間培養し、妊娠 2.5 日目の偽妊娠 ICR マウスに移植した。妊娠 19.5 日目に自然分娩もしくは帝王切開によって産仔を得た。偏光板とブルーライトを用いて観察し、緑色蛍光を発するものをキメラマウスと判定した。また 3 週目のキメラマウスの毛色を観察し、ICR 由来の白色の毛に混ざる、ES 細胞由来のアグーチの毛の割合から、ES 細胞の、キメラマウスへの寄与率を判定した。

キメラマウスの精巣および精子の観察

生後 10 日齢、36 日齢、18 か月齢の寄与率の高いキメラマウスを安楽死させ、精巣と精巣上体を摘出した。精巣は、第一章第一節に準じて、精巣切片を作製し、蛍光顕微鏡下で EGFP 蛍光を観察し、ES 細胞由来の生殖細胞の観察に用いた。また、精巣上体尾部から取り出した精子は TYH に懸濁し、顕微鏡下で精子が動いていることを確かめた。精子懸濁液をスライドグラスに滴下し、カバーガラスで封入後、蛍光顕微鏡下で EGFP 蛍光と形態を観察した。

実験結果

dKO ES 細胞を用いたキメラマウスの作製

クローン化した dKO ES 細胞株において野生型 ES 細胞の混入の可能性は極めて少ないが否定することは難しい。そこで、1 細胞の dKO ES 細胞株#1B を ICR の 8 細胞期胚に注入してキメラマウスを作製した。注入後 24 時間の桑実胚もしくは胚盤胞を観察したところ、注入した ES 細胞が分裂したと考えられる 2 個の EGFP 陽性細胞が観察された（図 9)。これら胚盤胞を偽妊娠雌マウスへ移植し、得られたキメラマウス（図 10A）における ES 細胞の寄与率は、生後 1 週齢で毛色により判定した（表 6)。90%の個体を含むすべてのキメラマウス（13/13）が離乳するまで生存し、性成熟しても異常は見られなかった（図 10B)。

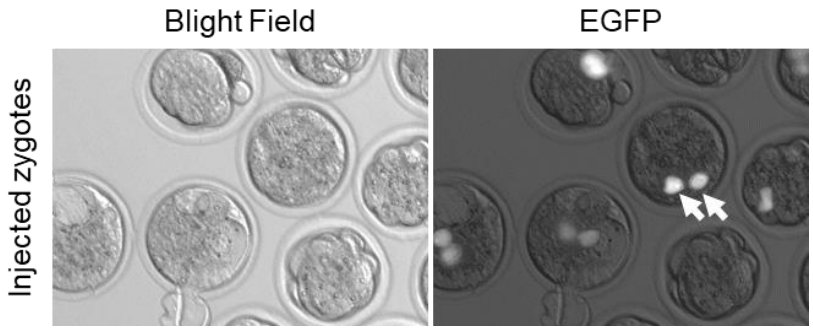


図 9. 1 細胞の ES 細胞#1B を注入し 24 時間後の桑実胚もしくは胚盤胞。白矢印は注入された ES 細胞を示す。

表 6. dKO ES キメラマウスにおける ES 細胞の寄与率

	No. of male chimeras according to ES cell contribution rate			
	<30%	30-60%	60-90%	>90%
Birth	2	5	2	3
Wean	2	5	2	3

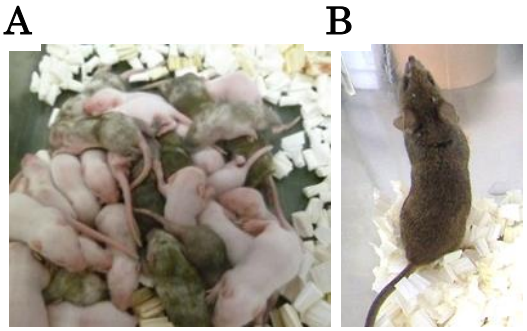


図 10. 作製した ES キメラマウス (A)里親の ICR に交じる雄または雌のキメラマウス (B)ES 細胞が 90%以上寄与した成熟雄キメラマウス

dKO ES キメラマウスの精巣、精子の観察

dKO ES 細胞#1B がキメラマウスの生殖系列に寄与しているかどうかを確認するため、生後 10 日齢のキメラマウスの精巣切片を観察したところ、EGFP 蛍光陽性の生殖細胞を確認した（図 11A 左)。また、精子形成が完了し、精子が見え始める生後 36 日齢の精巣を観察したところ、EGFP 蛍光を発する精細胞、精子、セルトリ細胞が観察された（図 11A、C)。さらに、18 か月齢のキメラマウスにおいても精細管内には EGFP 蛍光の精子が存在した（図 11B）ことから、*Ddx3x*、*Ddx3y* は生殖細胞における、精子形成能や、精子幹細胞の維持に必須ではないことが示された。性成熟したキメラマウスを野生型雌マウスと交配したところ、EGFP 陽性産仔（F1）が得られ、その雌、雄にはそれぞれ、*Ddx3x*、*Ddx3y* の変異アレルの伝達が確認された（図 11D)。このことから、dKO ES 細胞由来の精子に受精能があることが明らかとなった。

第五節　小括

ヒトにおいて SCOS の原因と考えられてきた、*Ddx3y* の KO マウスを作製し、その生理的機能を解析したが、マウスにおいて *Ddx3y* は精子形成に必須ではなかった。*Ddx3y* には X 染色体にアミノ酸配列が 90%一致する *Ddx3x* というホモログがあり、その保証機構についても検討した結果、*Ddx3x* は胎生期の胚発生に重要な役割を果たしている一方、キメラマウスを用いた実験の結果では、精子形成においては *Ddx3x*、*Ddx3y* が重要な役割を果たしていないことが示唆された。

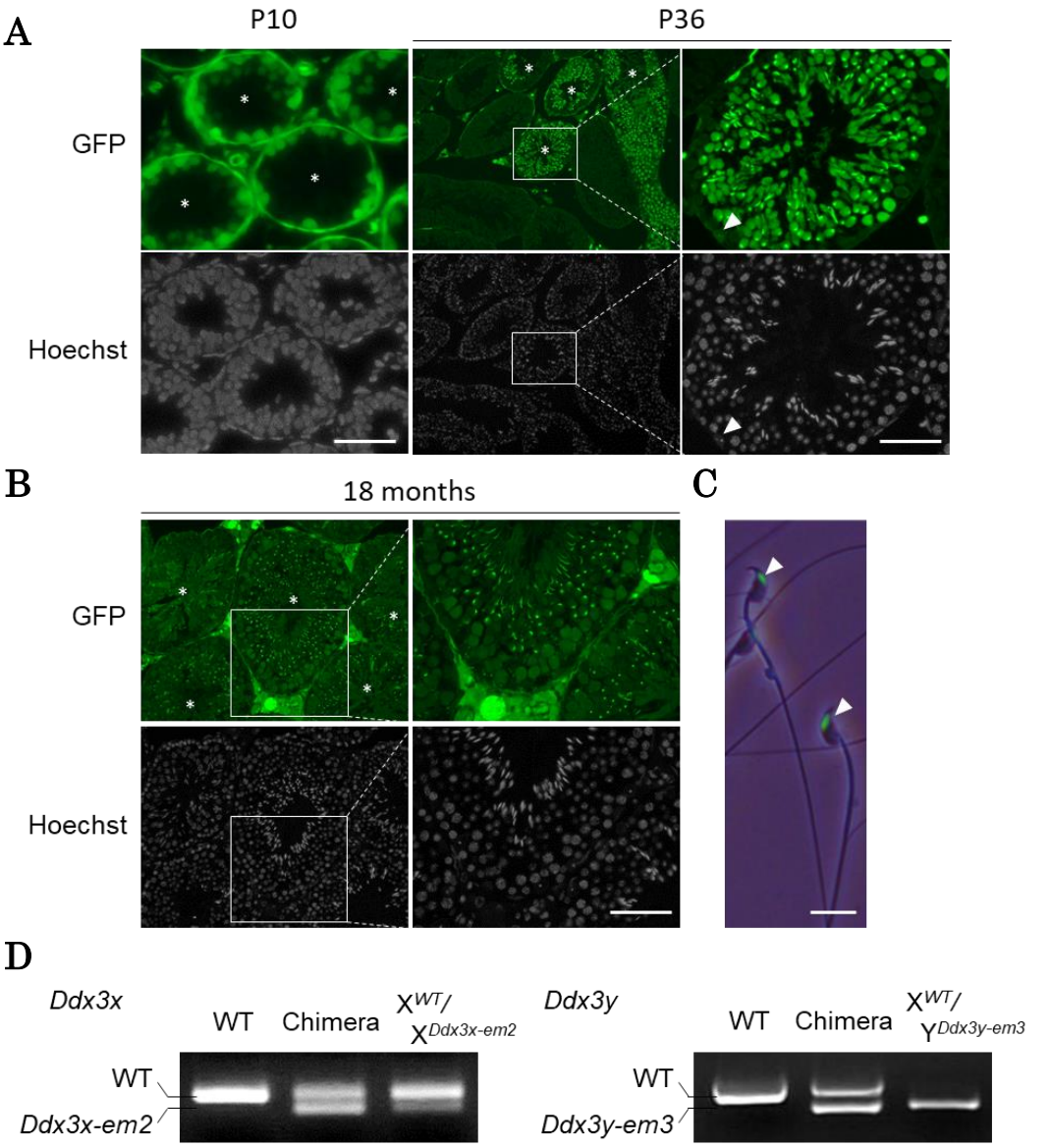


図 11. *Ddx3x*、*Ddx3y* ES キメラマウスの妊孕性解析（A 左）生後 10 週齢の dKO ES キメラマウスの精巣。アスタリスクは ES 細胞由来の生殖細胞が見られる精細管を示す。スケールバー: 50 μm。（A 中央)生後 36 日齢の dKO ES キメラマウスの精巣。アスタリスクは ES 細胞由来の生殖細胞が見られる精細管を示す。（A 右）中央の白四角で囲まれた画像の拡大図。白矢頭は ES 細胞由来のセルトリ細胞を示す。スケールバー: 50 μm。(B)生後 18 か月齢の dKO ES キメラマウスの精巣。アスタリスクは ES 細胞由来の生殖細胞が見られる精細管を示す。スケールバー: 50 μm。（C）生後 36 日齢の dKO ES キメラマウスの精巣上体尾部精子。白矢頭は ES 細胞由来の精子を示す。（D）dKO ES キメラマウスより得られた、F1 世代の、雌マウス（左; $X^{WT}X^{Ddx3x\text{-}em2}$)と雄マウス(右; $X^{WT}Y^{Ddx3y\text{-}em3}$)の遺伝子型。

第二章　*Azfa* 領域欠失マウスの表現型解析

これまでに KO マウスについて報告されていた *Uty*[6]に加え、*Ddx3y* に関してもマウスの精子形成に必須ではないことが明らかとなった。また、妊孕性があるヒト男性で *USP9Y* 領域の欠失が見られており、その欠失が男児に伝わっている報告例[4, 5]から、*Usp9y* についても精子形成には必須でないことが示唆される。一方 SCOS 患者では、*AZFa* 領域内の複数の遺伝子にまたがる欠失がみられる[26]ことから、1 遺伝子のみの KO マウスでは、残り 2 つの遺伝子が機能を補完して、精子形成不全がみられない可能性、また、*Azfa* 領域内の非遺伝子領域内に精子形成に重要な役割を果たす領域がある可能性を考えた。これらの可能性を検証するため、*Azfa* 領域の 3 遺伝子全てを含む（360 kb に及ぶ）領域を欠失させた KO マウスを作製し、精子形成を観察することにした。CRISPR/Cas9 システムでは、2 種類の sgRNA を用いることで sgRNA 間の領域欠損を誘導することができ、特に、受精卵と違って一度に数十～数百クローンを処理できる ES 細胞の系を用いることで効率的に目的の変異体を得ることが可能である[21]。本章では、*Usp9y*―*Uty* 間を欠失させた ES 細胞を用いてマウスを作製し、*Azfa* 領域の欠失がマウスの妊孕性に及ぼす影響を解析した。

第一節　*Azfa* 欠失マウスの作製と妊孕性の解析

USP9Y、DDX3Y、UTY はそれぞれ、ユビキチン特異的プロテアーゼドメイン、RNA ヘリケースドメイン、ヒストン脱メチル化ドメインを持つタンパク質であり、下流遺伝子の発現量の制御に関わる遺伝子である。ヒトとマウスの遺伝子の相同性は、*USP9Y* が 82.5%、*DDX3Y* が 89.2%、*UTY* が 79.5%であり、2 種間でよく保存されている。この 3 遺伝子が互いに機能を補完している可能性を検証するため 3 遺伝子の機能すべてを欠損したマウスを作出することにした。また、*AZFa*、*Azfa* で保存されている非遺伝子領域が精子形成に重要な役割を果たす可能性を検証するため、380kb の *Azfa* 領域の大部分を欠損することを試みた。CRISPR/Cas9 システムでは、2 種類の sgRNA を用いることで sgRNA 間の領域欠損を誘導することができるものの、著者が所属する研究室では、60kb を越える領域欠損は、受精卵前核へ

の pX330 の注入法では得ることが困難であることが示唆されている。一方、それら 2 種類の pX330 を ES 細胞に導入すると 840kb ほどの領域欠損に関してもクローンを得ることに成功している[21]。本節では、*Usp9y* と *Uty* に設計した sgRNA を用いて *Azfa* 欠失 ES 細胞株を樹立し、キメラマウスを作製して解析を行った。

実験方法

sgRNA/Cas9 発現ベクターの作製

第一章と同様に、*Usp9y* と *Uty* を認識する sgRNA（sgRNA-9、sgRNA-10）を設計し、pX330-sgRNA-9、pX330-sgRNA-10 を作製した。それぞれの sgRNA が標的とする配列（PAM 配列）は以下の通り。sgRNA-9: 5'-ATCATGACAATCACAACTCG（TGG）-3'、sgRNA-10: 5'-TGAGGAAAAGAAAATGGCGG（CGG）-3'

ES 細胞の培養

第一章第三節に準じて行った。

ES 細胞へのトランスフェクションと、モノクローン化

第一章第三節に準じて行った。pX330 に puromycin 耐性遺伝子が搭載された pX459 (Addgene #62988, https://www.addgene.org/62988/) を 2 種類、各 1 μg ずつトランスフェクションし、pPGK-puro プラスミドは使用しなかった。トランスフェクション後 18 時間から 1 μg/mL puromycin を含む培地で 48 時間培養し、その後 puromycin を除いてコロニーを形成するまで培養した (約 5 日間)。コロニーをピックアップして 96 穴プレートで培養し、十分に細胞が増殖した時点で 4/5 の細胞を凍結ストックとし、残った 1/5 の細胞を lysis buffer で溶解し、ゲノム DNA を抽出した。領域欠損の確認に用いたプライマーは以下の通り。Forward primer 5'-AAATTAGAGATTTTAGGGCCTGGCATATGG -3'、Reverse primer 5'-TTTCAGAGTAGGGAGAGGCTCCAG -3'。

核型解析

第一章第三節に準じて行った。

キメラマウスの作製

第一章第四節に準じて行った。生後 1～3 週齢のマウス毛色から ES 細胞の寄与率を判定し、寄与率が高いもの（体表の 6 割以上）のものを解析に用いた。

キメラマウスの精巣の観察

第一章第四節に準じて、生後 8 週齢のキメラマウスを安楽死させ、精巣を摘出した。第一章第一節に準じて、精巣切片を作製し、蛍光顕微鏡下で EGFP 蛍光を観察し、ES 細胞由来の生殖細胞の観察に用いた。

Azfa 欠失マウスの作製と交配実験による産仔数の計測

性成熟した雄のキメラマウスを B6D2F1 雌マウスと交配させ産仔のうち、EGFP 蛍光が観察される仔マウスの遺伝子型を第一章第一節に準じて調べた。領域欠損の確認は第二章第一節で用いたプライマーを使用した。また、仔マウスの性別を、Y 染色体遺伝子 *Eif2s3y* を増幅するプライマーセットで確認した。用いたプライマーは以下の通り。Forward primer 5'- TTGTGCGTTTTGTGACGCGACAG -3'、Reverse primer 5'- AGCATTCTAACTGGGACAATTGGAGTCTG -3'。

Azfa 欠失マウスの精巣切片の He-PAS 染色ならびに精子の観察

生後 6 か月齢の B6D2F1 ならびに *Azfa* 欠失雄マウスを安楽死させ、精巣、精巣上体を採材した。精巣は、第一章第一節に準じて精巣切片を作製、He-PAS 染色後に観察した。精巣上体より精子を取り出し、形態を光学顕微鏡で観察した。

交配実験と産仔数の計測

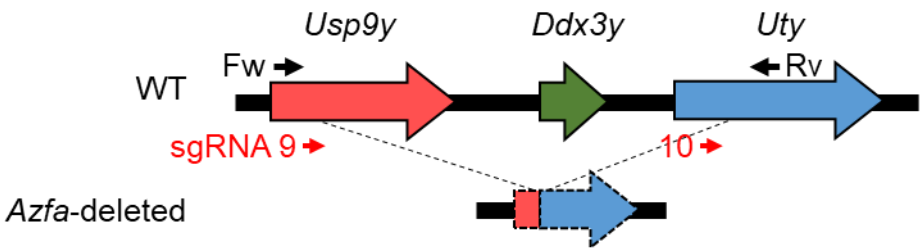
性成熟した B6D2F1 ならびに *Azfa* 欠失雄マウス 1 匹に対して、8 週齢の雌マウス 2 匹を 2 か月同居させた。産仔が確認できれば、その数を記録した。データは平均値±SD で示し、Student の t 検定を用いて統計解析を行い、$P < 0.05$ のときに有意な差があるとした。

実験結果

Azfa 欠失 ES 細胞株の樹立とキメラマウスの作製

Usp9y の開始コドンの 14 塩基下流の PAM 配列を標的とする pX330-sgRNA-9 と *Uty* の開始コドンの 61 塩基下流の PAM 配列を標的とする pX330-sgRNA-10（図 12A）を ES 細胞にトランスフェクションして KO ES 細胞株を樹立した。ピックアップした 64 クローンにおいて、15 クローン（23.4%）の *Azfa* 欠失 ES 細胞が得られた。核型解析とシークエンス解析を行い、細胞の 90%が正常な数の染色体を有し、*Usp9y* の開始コドンと、*Uty* の開始コドンを含む約 360 kb の領域が欠失した、クローン#4G（図 12B）を ICR の 8 細胞期胚に注入してキメラマウスを作製した（図 12C）。

A



B

ES #4G　GTCTGCTCTTTGATCGCCTACTAGCGGCGGAAAAGGCTAGAGGC

C

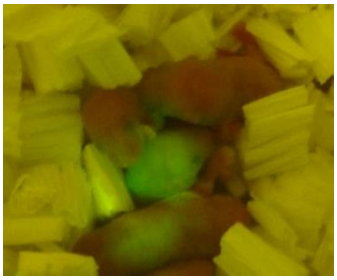


図 12. *Azfa* 欠失 ES キメラマウスの作出　(A) *Usp9y* の第 4 エキソンを標的とする sgRNA-9（赤矢印）と *Uty* の第 1 エキソンを標的とする sgRNA-10（赤矢印）の設計。破線は欠失が起こると予想される領域を表す。また破線で囲まれた矢印は、欠失により機能が欠損すると予想される *Usp9y*、*Uty* を表す。 (B) *Azfa* 欠失 ES 細胞株#4G の遺伝子型。赤字は *Usp9y* の配列、青字は *Uty* の配列、黒字は挿入塩基を示す。(C) 作出されたキメラマウス。EGFP 蛍光を発する。

Azfa 欠失 ES キメラマウス精巣の観察

Azfa 欠失 ES 細胞#4G がキメラマウスの生殖系列に寄与しているかどうかを確認するため、生後 10 日齢のキメラマウスの精巣切片を観察したところ、EGFP 蛍光陽性の生殖細胞を確認した（図 13A 左)。また、生後 8 週齢の成熟キメラマウスの精巣切片において、EGFP 蛍光を有する精子が観察された（図 13A 右)。性成熟したキメラマウスを野生型雌マウスと交配したところ、得られた雄の EGFP 陽性産仔（F1）には *Azfa* 欠失アレルの伝達が見られ、*Azfa* 領域は、生殖細胞における精子形成能に必須ではないことが示唆された（図 13B)。

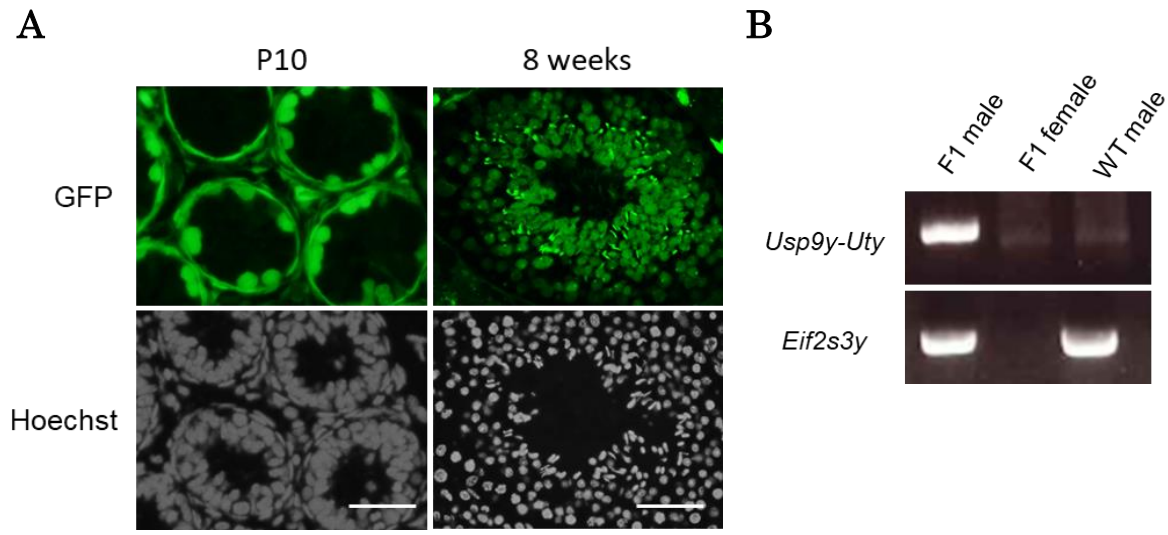


図 13. *Azfa* 欠失 ES キメラマウスの妊孕性解析（A 左）生後 10 週齢の dKO ES キメラマウスの精巣。スケールバー: 50μm。 (A 右)生後 8 週齢の *Azfa* 欠失 ES キメラマウスの精巣。スケールバー: 50μm。（B）*Azfa* 欠失 ES キメラマウスより得られた、F1 世代の、EGFP 蛍光を有する雄マウスと雌マウスの遺伝子型。

Azfa 欠失マウスの精巣の組織学的解析と精子の観察、妊孕性の評価

Azfa 欠失 ES キメラマウスから、*Azfa* 欠失アレルが伝達した F1 雄マウスは、野生型細胞の混入が無く全身の細胞で *Azfa* 領域が欠失している。この *Azfa* 欠失マウスを生後 6 か月齢で安楽死させ、精巣の組織学的解析を行ったところ、やはり精子形成に異常は見られず（図 14A 左)、精巣上体尾部から採材した精子の形態にも異常は見られなかった（図 14A 右)。さらに、*Azfa* 欠失雄マウスと野生型雌マウス交配させたところ、野生型に匹敵する数の産仔が得られた（図 14B)。

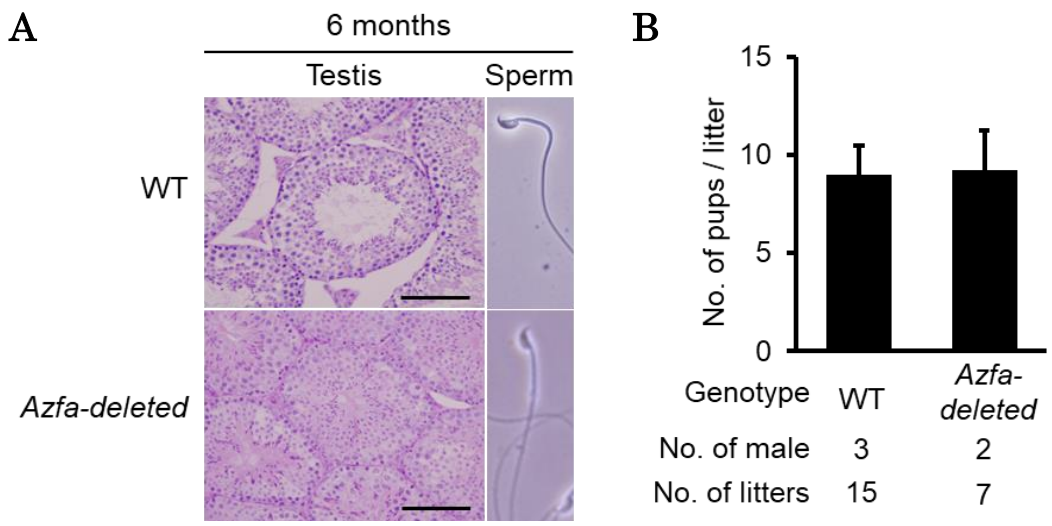


図 14. *Azfa* 欠失マウスの妊孕性解析（A 左）生後 6 か月齢の野生型ならびに *Azfa* 欠失マウスの精巣。スケールバー: 100μm。(A 右)生後生後 6 か月齢の野生型ならびに *Azfa* 欠失マウスの精巣上体尾部精子。(B) 野生型雄マウスもしくは *Azfa* 欠失雄マウスより得られた産仔の平均数。

第二節　*Ddx3y* のマウス常染色体パラログ、*D1pas1* の発現量解析

ヒト *AZFa* 領域に存在する遺伝子は *USP9Y*、*DDX3Y*、*UTY* の 3 遺伝子であり、X 染色体にパラログ遺伝子としてそれぞれ *USP9X*、*DDX3X*、*UTX* を持つ。一方マウスにおいて、*Azfa* 領域に存在する 3 遺伝子は、ヒトと同様 X 染色体にパラログ *Usp9x*、*Ddx3x*、*Utx* を持つだけでなく、1 番染色体に *Ddx3y* のパラログ、*D1pas1* を持つ[27]。*D1pas1* と *Ddx3y* の遺伝子相同性は、87%と高く、ヒト *DDX3Y* とも 89%の遺伝子相同性を持つ。*D1pas1* はヒト *DDX3Y*、マウス *Ddx3y* と同様に、DEAD-box RNA ヘリケースドメインが保存されており[14]、精巣特異的な発現を示す[14]。*D1pas1* が *Azfa* 欠失マウスにおける、3 遺伝子の機能欠失を補償する可能性を探るため、*Azfa* 欠失マウスにおける *D1pas1* の発現量を、リアルタイム PCR を用いて解析した。

実験方法

<u>cDNA の作製とリアルタイム RT-PCR</u>

生後 0 日齢、6 日齢、8 日齢、12 日齢、14 日齢、28 日齢、35 日齢の C57BL/6NCr もしくは *Azfa* 欠失雄マウスを安楽死させ、精巣を採材し、第一章第一節に準じて cDNA を合成した。5 ng の cDNA を鋳型として、TB Green™ Premix Ex Taq™を用いて *Ddx3y*、*D1pas1* または *Actb* を Thermal Cycler Dice

Real Time System TP800 を用いたリアルタイム PCR によって増幅した。それぞれの遺伝子のサイクル値（Ct）は、あらかじめ 2.5 ng、5 ng、10 ng、20 ng の各雄マウス由来の cDNA を用いて作製した各プライマーセットの増幅効率と、内在性ノーマライザーとして用いた *Actb* の発現量で標準化し、発現量を比較した。各実験では、一つのサンプルにおいて 2 つの測定値の平均を算出し、独立した実験を 3 回行った。サンプルの増幅に用いたプライマーは以下の通り。*Ddx3y*: Forward primer 5'- CTCGTGATTCCAGAGGGAAG -3'、Reverse primer 5'- AGCGTTCACTTGGTGGAAGT -3'。*D1pas1*: Forward primer 5'- CGAGAGCCAAGTCCAGTTTC -3'、Reverse primer 5'- CATCCTCGTCTGCTTTGTCA -3'。*Actb*: Forward primer 5'- CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC -3'、Reverse primer 5'- ATGGAGCCACCGATCCACA -3'。

実験結果

野生型マウスにおける *D1pas1* の発現量の解析

マウスの生殖細胞は、生後すぐに増殖・分化を開始する[28]。精子幹細胞は、生後 3～6 日齢で現れ、生後 10 日前後で、減数分裂期の細胞が観察される。その後、生後 21 日ごろに半数体の精細胞、生後 35 日以降に精子が観察される[29]。
野生型マウス精巣においては、*Ddx3y* は精子形成の初期から発現し、しかしその後発現量が上昇しないことから、精子形成の初期から存在する精原細胞など一部の細胞で発現していることが示唆された（図 15）。一方 *D1pas1* は精原細胞では発現しておらず、減数分裂期から高発現していることが示された。この結果は、既報[14]と同様であった。

Azfa 欠失マウスにおける *D1pas1* の発現量の解析

Azfa 欠失マウス精巣における *D1pas1* の発現量を解析したところ、生後 0 日齢において、*D1pas1* の発現量は野生型マウス精巣での発現量と大きく変わらなかった。しかし精原細胞が現れた生後 6 日齢においては、*D1pas1* が発現していない野生型マウス精巣と異なり、*Azfa* 欠失マウス精巣では *D1pas1* が発現し、野生型マウス精巣での *Ddx3y* の発現量を上回っていた（図 15）。以上の結果より、*Azfa* 欠失マウスでは *Ddx3y* のパラログ、*D1pas1* の発現が上昇し、領域欠失により欠損した遺伝子の機能が補償される可能性が示された。

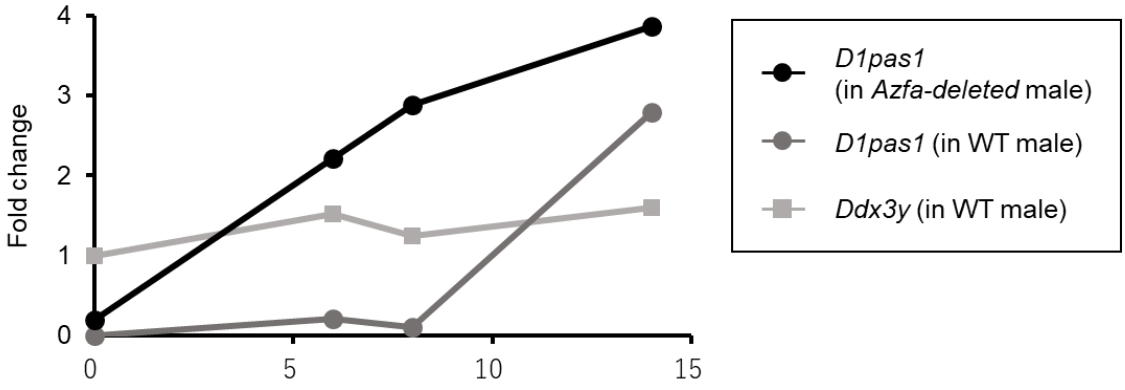


図 15. 野生型ならびに *Azfa* 欠失マウス精巣における *Ddx3y*、*D1pas1* の発現量。横軸は、マウスの日齢、縦軸に生後 0 日齢の野生型マウス精巣における *Ddx3y* の発現量を 1 とした時の各遺伝子の相対的な発現量。エラーバーは SD を表す。

第三節　小括

マウスにおいて、*Azfa* 領域は、精子形成、精子幹細胞の維持に必須でないことが明らかとなった。*Azfa* 欠失マウスでは、*Ddx3y* のマウス特異的なパラログ、*D1pas1* の発現量が上昇しており、*Azfa* 欠失により欠損した機能の補償を行っている可能性が示された。

第三編　考察

DDX3Y・DDX3X の生理機能

DDX3Y はヒト・マウスのみならず、イヌ、ブタ、チンパンジーなどの哺乳類や、魚類、両生類、鳥類にも保存されている。*DDX3Y*の重要性を支持するデータとして、近年、*AZFa* 欠失患者から樹立した iPS 細胞をマウス精巣内へ移植する際、*DDX3Y* 遺伝子を iPS 細胞に導入すると、生殖細胞様の細胞の形成率が上昇することが報告されている[30]。

一方マウスにおいては従来、ターゲティングベクターを用いた Y 染色体遺伝子の遺伝子改変マウス作出が難しかったことから *Ddx3y* の機能は不明なままであった。本研究では CRISPR/Cas9 システムを用いて、*Ddx3y* の KO マウス作出に成功した。KO マウスは予想に反して、精子形成に異常は見られず、妊孕性も正常であった。そこで *Ddx3x* に注目した。ヒト *DDX3X* は精巣で発現しているものの、*DDX3Y* に比べると発現は弱い[13]。反対に、マウス精巣においては *Ddx3x* が *Ddx3y* よりも強く発現している[14]。また、マウス DDX3X は精原細胞を含む、精巣のすべての細胞種で発現していることが示唆されており[31]、マウスでは、*Ddx3x* が *Ddx3y* とともに精子形成に重要な役割を果たしている可能性を考えた。しかし、キメラマウスを用いた解析により、*Ddx3x*、*Ddx3y* は精子形成に必須でないことが示された。また *Ddx3x* は先行研究[32]と同様、本研究においても胎生期の胚発生に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。ヒトにおいて統合失調症患者や、白血病患者のゲノムで *DDX3X* の変異が見つかっており[33]、ヒトならびにマウスにおいて、*Ddx3x* は精巣以外の臓器で機能を果たしていることが考えられる。なお、本研究では、KO に用いた sgRNA は Bowtie ソフトウェアを用いて、オフターゲット配列の数が少ないものを選別した。また、ファウンダーマウス（F0）と野生型マウスを掛け合わせた F1 世代以降のマウスを解析に用いた。実際にオフターゲット変異の有無は確認していないものの、『on-target 変異による KO マウスの精子形成に異常がない』という結論は変わらないと考えられる。

興味深いことにマウスにおいて *Ddx3y* が脳機能に関わることが示唆されている[34]。しかし、相同性の高い 2 つのパラログ DDX3X、D1PAS1 を持つマウス DDX3Y

には特異的な抗体が存在しないため、詳細な解析が行われていない。本研究でもDDX3Y に対する抗体作製には至らなかったため、作製した変異マウスが KO マウスであることは、RT-PCR によって増幅した *Ddx3y* から、翻訳されるタンパク質のドメイン構造を予測することで判定した。マウス DDX3Y の発現・局在解析や精巣以外の臓器における生理機能については今後更なる解析が必要である。

Azfa 領域の関連遺伝子の生理機能

1976 年、Y 染色体 *AZF* 領域の欠失と男性不妊の相関が報告されて以降、不妊男性への治療方針を決定する際、精子の有無を判断するマーカーとして *AZFa* 領域の欠失検査が行われている。現在に至るまで、これら領域の欠失は様々な地域のクリニックで、治療方針を決めるマーカーとして用いられている。2018 年に、Colaco と Modi は、これまで報告されてきた、データをまとめ、アジア、アメリカ、ヨーロッパの不妊男性 40,127 人の 7.5%が Y 染色体 *AZF* 領域に欠失を持つことを示した[35]。

一方、本研究で作製した *Azfa* 欠失マウスでは 6 か月齢のマウスでも妊孕性の低下は見られなかった。*Azfa* に存在する 3 遺伝子 *Usp9y*、*Ddx3y*、*Uty* には、ヒトと同様マウスでも、それぞれ X 染色体パラログ *Usp9x*、*Ddx3x*、*Utx* が存在する。ヒトにおいては、男性不妊患者が、これら X パラログの変異を持つ報告はない。また男性不妊患者の精巣内でこれら X パラログの発現量は変化しないことが報告されている[36]。また、*USP9X* の変異は発達障害患者で、*DDX3X* の変異は統合失調症患者や白血病患者で、*UTX* の変異は知能発育不全を示す患者で確認されている[33, 37, 38] ことから、X パラログ遺伝子群はそれぞれの Y パラログ遺伝子と異なる機能を果たしていると考えられる。本研究においては *Ddx3x* が胎児の発生に重要である一方、精子形成には必須でないことを明らかにした。

マウスの 1 番染色体には *Ddx3y* のパラログ *D1pas1* が存在する。この遺伝子は、マウスやハムスター、メガネザルで確認されている。ヒト、ラットにおいても、類似した配列が常染色体上にあることが報告されているが[39]、偽遺伝子として、機能を持たないと考えられている。近年、KO マウスの精巣内で、精子形成が late pachytene で停止することから、*D1pas1* は、第一減数分裂期に必須な役割を果たすことが示唆された[40]。しかしながら、この KO マウスで見られる異常は、ヒト *AZFa* 欠失患者で見られる生殖細胞の喪失（SCOS）とは異なる。また、野生型マウスでは *D1pas1*

は精原細胞では転写が行われていないことから、精原細胞での発言を示すヒト DDX3Y[13]やマウス *Ddx3y*[14]とは異なる機能を有していると考えられた。しかしながら、本研究において作製した *Azfa* 欠失マウスでは、*D1pas1* の発現が変化し、未分化な精原細胞でも *D1pas1* が発現していることが示された。このことから、*Azfa* の領域欠失により欠損した遺伝子の機能を、*D1pas1* が補償している可能性が示唆された。今後、*Azfa* 領域と *D1pas1* のどちらも欠失したマウスを作製することで、更なる機能解明につながるだろう。

第四編　結論

I. ヒトにおける SCOS の原因遺伝子と考えられる *Ddx3y* の KO マウスは精子形成に異常が見られなかったことから、マウスでは *Ddx3y* が精子形成に必須でないことが示された。

II. *Ddx3y* の X 染色体パラログ *Ddx3x* は胎生期の胚発生に重要な役割を果たしている一方、キメラマウスを用いた解析から、精子形成においては重要な機能を果たしていないことが示された。

III. ES 細胞における CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集により作出に成功した 360kb の *Azfa* 欠失マウスの解析から、マウスにおいて *Azfa* 領域は精子形成に必須でないことが明らかとなった。

IV. *Azfa* 欠失マウスにおける遺伝子発現量の変化から、マウス特異的な *Ddx3y* の常染色体パラログ *D1pas1* による機能補償が起こっている可能性を提示した。

第五編　謝辞

ここに博士論文としてまとめることができましたのは、大阪大学微生物病研究所教授　伊川正人先生のご指導、ご鞭撻の賜物であり、心より感謝申し上げます。

また、実験に関することで多くのご指導とご助言をいただいた大阪大学微生物病研究所遺伝子機能解析分野助教　藤原祥高先生、宮田治彦先生、遠藤墾先生、淨住大慈先生、野田大地先生、Julio M. Castaneda 先生、嶋田圭祐先生、特任研究員　櫻井伸行博士、Lu Yonggang 博士、大阪大学微生物病研究所教務職員　紀田一宏先生、奈良先端科学技術大学院大学准教授　磯谷綾子先生、理研 CDB 研究員　森雅志先生、大字亜沙美研究員、大阪大学微生物病研究所遺伝子機能解析分野の諸氏に感謝いたします。

さらに、実験や論文の執筆にあたり種々のご助言をいただきました Baylor College of Medicine Martin M. Matzuk 先生、University of Hawaii John A. Burns School of Medicine Monika A. Ward 先生に感謝いたします。

そして、本論文を指導、審査していただきました大阪大学薬学研究科教授　水口裕之先生、辻川和丈先生に感謝いたします。

第六編　主論文・参考論文リスト

主論文

An Azoospermic Factor gene, *Ddx3y* and its paralog, *Ddx3x* are dispensable in germ cells for male fertility
J Reprod Dev. 2019 Jan 7. doi: 10.1262/jrd.2018-145. [Epub ahead of print]
Takafumi Matsumura, Tsutomu Endo, Ayako Isotani, Masaki Ogawa, and Masahito Ikawa.

参考論文

Genome engineering uncovers 54 evolutionarily conserved and testis-enriched genes that are not required for male fertility in mice.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2016, Jul 12;113（28）:7704-10. doi: 10.1073/pnas.1608458113. Epub 2016 Jun 29.
Miyata H, Castaneda JM, Fujihara Y, Yu Z, Archambeault DR, Isotani A, Kiyozumi D, Kriseman ML, Mashiko D, Matsumura T, Matzuk RM, Mori M, Noda T, Oji A, Okabe M, Prunskaite-Hyyrylainen R, Ramirez-Solis R, Satouh Y, Zhang Q, Ikawa M, Matzuk MM.

CRISPR/Cas9 mediated genome editing in ES cells and its application for chimeric analysis in mice.
Sci Rep. 2016, Aug 17;6:31666. doi: 10.1038/srep31666.
Oji A, Noda T, Fujihara Y, Miyata H, Kim YJ, Muto M, Nozawa K, Matsumura T, Isotani A, Ikawa M.

Chimeric analysis with newly established EGFP/DsRed2-tagged ES cells identify HYDIN as essential for spermiogenesis in mice.
Exp Anim. 2018 Aug 9. doi: 10.1538/expanim.18-0071. [Epub ahead of print]
Oura S, Miyata H, Noda T, Shimada K, Matsumura T, Morohoshi A, Isotani A, Ikawa M.

第七編　参考文献

1. Kumar N, Singh AK. Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. In: J Hum Reprod Sci, vol. 8; 2015: 191-196.
2. Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. Hum Genet 1976; 34:119-124.
3. Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F, Kohn FM, Schill WB, Farah S, Ramos C, Hartmann M, Hartschuh W, et al. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. Hum Mol Genet 1996; 5:933-943.
4. Krausz C, Degl'Innocenti S, Nuti F, Morelli A, Felici F, Sansone M, Varriale G, Forti G. Natural transmission of USP9Y gene mutations: a new perspective on the role of AZFa genes in male fertility. Hum Mol Genet 2006; 15:2673-2681.
5. Luddi A, Margollicci M, Gambera L, Serafini F, Cioni M, De Leo V, Balestri P, Piomboni P. Spermatogenesis in a man with complete deletion of USP9Y. N Engl J Med 2009; 360:881-885.
6. Shpargel KB, Sengoku T, Yokoyama S, Magnuson T. UTX and UTY demonstrate histone demethylase-independent function in mouse embryonic development. PLoS Genet 2012; 8:e1002964.
7. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A 2012; 109:E2579-2586.
8. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science 2013; 339:819-823.
9. Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. Cell 2013; 153:910-918.
10. Mashiko D, Fujihara Y, Satouh Y, Miyata H, Isotani A, Ikawa M. Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. Sci Rep 2013; 3:3355.
11. Miyata H, Castaneda JM, Fujihara Y, Yu Z, Archambeault DR, Isotani A, Kiyozumi D, Kriseman ML, Mashiko D, Matsumura T, Matzuk RM, Mori M, et al. Genome engineering uncovers 54 evolutionarily conserved and testis-enriched genes that are not required for male fertility in mice. Proc Natl Acad Sci U S A 2016; 113:7704-7710.
12. Foresta C, Ferlin A, Moro E. Deletion and expression analysis of AZFa genes on the human Y chromosome revealed a major role for DBY in male infertility. Hum Mol Genet 2000; 9:1161-1169.
13. Ditton HJ, Zimmer J, Kamp C, Rajpert-De Meyts E, Vogt PH. The AZFa gene DBY (DDX3Y) is widely transcribed but the protein is limited to the male germ cells by translation control. Human Molecular Genetics 2018; 13:2333-2341.
14. Vong QP, Li Y, Lau YF, Dym M, Rennert OM, Chan WY. Structural characterization and expression studies of Dby and its homologs in the mouse. J Androl 2006; 27:653-661.
15. Reijo R, Lee TY, Salo P, Alagappan R, Brown LG, Rosenberg M, Rozen S, Jaffe T, Straus D, Hovatta O. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. Nat Genet 1995; 10:383-393.
16. Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaye T, Nickstadt A, Bonas U. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. Science 2009; 326:1509-1512.
17. Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. Science 2009; 326:1501.
18. Mashiko D, Young SA, Muto M, Kato H, Nozawa K, Ogawa M, Noda T, Kim YJ, Satouh Y, Fujihara Y, Ikawa M. Feasibility for a large scale mouse mutagenesis by injecting

CRISPR/Cas plasmid into zygotes. Dev Growth Differ 2014; 56:122-129.
19. Toyoda Y, Yokoyama M, Hosi T. Studies on the fertilization of mouse eggs *in vitro*. The Japanese journal of animal reproduction 1971; 16:152-157.
20. Chen CY, Chan CH, Chen CM, Tsai YS, Tsai TY, Wu Lee YH, You LR. Targeted inactivation of murine Ddx3x: essential roles of Ddx3x in placentation and embryogenesis. Hum Mol Genet 2016; 25:2905-2922.
21. Oji A, Noda T, Fujihara Y, Miyata H, Kim YJ, Muto M, Nozawa K, Matsumura T, Isotani A, Ikawa M. CRISPR/Cas9 mediated genome editing in ES cells and its application for chimeric analysis in mice. Sci Rep 2016; 6:31666.
22. Oura S, Miyata H, Noda T, Shimada K, Matsumura T, Morohoshi A, Isotani A, Ikawa M. Chimeric analysis with newly established EGFP/DsRed2-tagged ES cells identify HYDIN as essential for spermiogenesis in mice. Exp Anim 2018.
23. Fujihara Y, Kaseda K, Inoue N, Ikawa M, Okabe M. Production of mouse pups from germline transmission-failed knockout chimeras. Transgenic Res 2013; 22:195-200.
24. Bryja V, Bonilla S, Arenas E. Derivation of mouse embryonic stem cells. Nat Protoc 2006; 1:2082-2087.
25. Bellve AR, Cavicchia JC, Millette CF, O'Brien DA, Bhatnagar YM, Dym M. Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. J Cell Biol 1977; 74:68-85.
26. Kamp C, Huellen K, Fernandes S, Sousa M, Schlegel PN, Mielnik A, Kleiman S, Yavetz H, Krause W, Küpker W, Johannisson R, Schulze W, et al. High deletion frequency of the complete AZFa sequence in men with Sertoli-cell-only syndrome. MHR: Basic science of reproductive medicine 2018; 7:987-994.
27. Session DR, Lee GS, Wolgemuth DJ. Characterization of D1Pas1, a mouse autosomal homologue of the human AZFa region DBY, as a nuclear protein in spermatogenic cells. Fertil Steril 2001; 76:804-811.
28. Nagano M, Brinster RL. Spermatogonial transplantation and reconstitution of donor cell spermatogenesis in recipient mice. Apmis 1998; 106:47-55; discussion 56-47.
29. Oakberg EF. Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. Am J Anat 1956; 99:507-516.
30. Ramathal C, Angulo B, Sukhwani M, Cui J, Durruthy-Durruthy J, Fang F, Schanes P, Turek PJ, Orwig KE, Reijo Pera R. DDX3Y gene rescue of a Y chromosome AZFa deletion restores germ cell formation and transcriptional programs. Sci Rep 2015; 5:15041.
31. Sekiguchi T, Iida H, Fukumura J, Nishimoto T. Human DDX3Y, the Y-encoded isoform of RNA helicase DDX3, rescues a hamster temperature-sensitive ET24 mutant cell line with a DDX3X mutation. Exp Cell Res 2004; 300:213-222.
32. Chen C-Y, Biology IoBaM, Chan C-H, Biology IoBaM, Chen C-M, Sciences DoLSaIoG, VYM Genome Research Center NY-MU, Taipei 112, Taiwan, Tsai Y-S, Biology IoBaM, Tsai T-Y, Biology IoBaM, Wu Lee Y-H, et al. Targeted inactivation of murine Ddx3x: essential roles of Ddx3x in placentation and embryogenesis. Human Molecular Genetics 2018; 25:2905-2922.
33. Study DDD. Large-scale discovery of novel genetic causes of developmental disorders. Nature 2015; 519:223-228.
34. Vakilian H, Mirzaei M, Tabar MS, Pooyan P, Rezaee LH, Parker L, Haynes PA, Gourabi H, Baharvand H, Salekdeh GH. DDX3Y, a Male-Specific Region of Y Chromosome Gene, May Modulate Neuronal Differentiation. 2015.
35. Colaco S, Modi D. Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility. Reprod Biol Endocrinol 2018; 16:14.
36. Ahmadi Rastegar D, Sharifi Tabar M, Alikhani M, Parsamatin P, Sahraneshin Samani F, Sabbaghian M, Sadighi Gilani MA, Mohammad Ahadi A, Mohseni Meybodi A, Piryaei A, Ansari-Pour N, Gourabi H, et al. Isoform-Level Gene Expression Profiles of Human Y Chromosome Azoospermia Factor Genes and Their X Chromosome Paralogs in the Testicular Tissue of Non-Obstructive Azoospermia Patients. J Proteome Res 2015; 14:3595-3605.
37. Reijnders M, Zachariadis V, Latour B, Jolly L, Mancini G, Pfundt R, Wu K, van Ravenswaaij-Arts C, Veenstra-Knol H, Anderlid BM, Wood S, Cheung S, et al. De Novo Loss-of-Function Mutations in USP9X Cause a Female-Specific Recognizable Syndrome with Developmental Delay and Congenital Malformations. In: Am J Hum Genet, vol. 98;

2016: 373-381.
38. Van der Meulen J, Speleman F, Van Vlierberghe P. The H3K27me3 demethylase UTX in normal development and disease. Epigenetics 2014; 9:658-668.
39. Kim YS, Lee SG, Park SH, Song K. Gene structure of the human DDX3 and chromosome mapping of its related sequences. Mol Cells 2001; 12:209-214.
40. Inoue H, Ogonuki N, Hirose M, Hatanaka Y, Matoba S, Chuma S, Kobayashi K, Wakana S, Noguchi J, Inoue K, Tanemura K, Ogura A. Mouse D1Pas1, a DEAD-box RNA helicase, is required for the completion of first meiotic prophase in male germ cells. Biochem Biophys Res Commun 2016; 478:592-598.