

# 博士論文

精子形成における RNA 結合タンパク質 PTBP1 の機能解析  
(PTBP1 contributes to spermatogenesis  
through regulation of proliferation in spermatogonia)

妹尾 真奈美

## 目次

略語…3

序論…4

方法…8

結果…13

図表…19

考察…52

参考文献…58

謝辞…65

## 略語

BSA : bovine serum albumin  
CC3 : cleaved caspase-3  
cDNA : complementary deoxyribonucleic acid  
cKO : conditional knock out  
CLIP: cross-linking RNA immunoprecipitation  
DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole  
DDW : double distilled water  
E(日数) : embryonic day(日数)  
EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid  
ES : embryonic stem  
EtOH : ethanol  
FACS : fluorescence activated cell sorting  
FBS : fetal bovine serum  
FGF2 : fibroblast growth factor 2  
fl(flox) : flanked *loxP*  
GDNF : glial cell line-derived neurotrophic factor  
GO : gene ontology  
GS : germline stem  
HE : hematoxylin and eosin  
IRES : internal ribosome entry site  
KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes  
MEF : mouse embryonic fibroblast  
mRNA : messenger RNA  
MVH : mouse vasa homolog  
Ngn3 : neurogenin3  
NMD: nonsense mediated decay  
PBST : phosphate-buffered saline-Tween20  
PFA : paraformaldehyde  
PGC : primordial germ cell  
PLZF : promyelocytic leukaemia zinc finger protein  
PTBP1 : polypyrimidine tract-binding protein 1  
RNA : ribonucleic acid  
qRT-PCR : quantitative reverse transcription polymerase chain reaction  
SC : sodium citrate  
SPF : specific pathogen free  
TE : tris-EDTA  
TGF  $\beta$  : transforming growth factor  $\beta$   
4OHT : 4-hydroxy tamoxifen

## 序論

### 生殖細胞の発生について

生殖細胞は次世代に遺伝情報を伝えることのできる唯一の細胞系譜であり、生体を構成する多種の体細胞とは異なる際立った特性を有している。生殖細胞の持つ体細胞と異なる最大の特徴として、減数分裂を行い染色体構成を半分にすることが挙げられる。また、減数分裂の際に高頻度に相同組換えが起これ、父母から受け継いだ各染色体の再構成が起これる。この相同組換えは次世代における遺伝的多様性を確保する上で極めて重要な役割を果たしている。また減数分裂の結果、オスでは鞭毛を持つ運動性の高い精子が形成され、メスでは巨大な細胞質を持つ卵子という特徴的な形態を持つ細胞が生み出される。精子あるいは卵子へと終末分化した生殖細胞は受精能を獲得し、精子と卵子の融合により 2 倍体の核を持つ受精卵となる。受精卵は全能性を有しており、分裂を繰り返しながら多様な体細胞や組織へ分化し新たな世代の個体を形成するとともに、その一部は改めて生殖細胞系譜へと分化する。この繰り返しにより生命の連続性が維持されているといえる。

図 1A にマウスのオスの生殖細胞の発生を示す。すべての生殖細胞の起源である始原生殖細胞 (Primordial Germ Cells、以下 PGC) は、マウスにおいて E6.25 前後に胚体外中胚葉中に出現する (Ginsburg et al., 1990)。PGC はその後、生殖原基へと移動し、性特異的な分化を開始する (Bowles and Koopman, 2007)。雌の場合、E13.5 ころに減数分裂を開始し、第一減数分裂 (ディプロテン期) まで進行したところで分裂を停止する (McLaren, 2003)。一方雄の場合、E13.5 から E15.5 の間に生殖細胞の体細胞分裂が G0/G1 期で停止し、出生直後に再び体細胞分裂が開始する。体細胞分裂を停止してから再開するまでの期間の生殖細胞は前精原細胞 (gonocyte または prospermatogonia) と呼ばれる (Culty, 2009)。出生後 5 日目頃までには精原細胞の集団が確立され、この集団中に自己複製能と分化能の双方を有する精原幹細胞が含まれる (McCarrey, 2013; Culty, 2009)。哺乳動物のオスが生涯に渡って精子形成を行うことが可能であるのは、精原幹細胞の自己複製と分化のバランスが正しく保たれているからである。図 1B に精子形成の模式図を示す。精子形成は、精巣の中に折り畳まれて存在する直径約 200 $\mu$ m の精細管内で律動的に進行する。精細管内に存在する体細胞はセルトリ細胞のみであり、各発生段階の精細胞はセルトリ細胞の間に存在している。精細管同士の間隙には精子形成の進行に重要なステロイドホルモンを合成するライディッヒ細胞が存在する (Tremblay, 2015)。精原幹細胞の自己複製は、セルトリ細胞および精巣血管内皮細胞から分泌される TGF- $\beta$  スーパーファミリーに属する細胞増殖因子 GDNF によって維持されている (Meng et al., 2000;

Tadokoro et al., 2002; Hofmann et al., 2005; Naughton et al., 2006; Oatley and Brinster, 2012, Bhang et al., 2018)。精原幹細胞は自己複製により集団のサイズを保ちながら、一部が分化し、減数分裂期の精母細胞、半数体の円形精子細胞となる。鞭毛形成期である伸長精子細胞の段階では核の凝集およびヒストンからプロタミンへの置換と細胞質の縮小が起こり、最終的に分化開始から約 35 日かけて成熟精子となる (Oakburg, 1956)。出生後最初に精子形成が完了するのは 5 週齢頃であり、8 週齢頃に性成熟を迎えると精子は精細管内腔から一時的な精子の貯蔵部位である精巣上体へと運ばれ、ここで運動性と受精能を獲得し (McCarrey, 2013)、輸精管を經由して体外へ射出される。

このように、精子形成過程は体細胞分裂を行う精原細胞からコンパクトな核と高い運動性を持った精子が作られるという、構造的および機能的にダイナミックな変化を伴う過程であり、それが一生涯に渡って持続するという永続性も維持されている。

こうした複雑な生殖細胞の発生や精子形成過程を制御する分子基盤として、転写因子を介した遺伝子発現ネットワークや、DNA やヒストンのエピジェネティックな修飾などが重要な役割を果たしていることがこれまでに報告されている (Mochizuki and Matsui, 2010)。例えば、PGC の運命決定に必須の遺伝子である *Blimp1* は転写抑制因子として体細胞系譜の遺伝子発現を負に制御することで生殖細胞系譜への分化を可能とする役割を持ち、*Blimp1* 欠損マウスでは著しい PGC の発生不全が生じる (Ohinata et al., 2005)。また、*Blimp1* を転写因子である *Prdm14* と *Tfap2c* とともにエピブラストに強制発現させることで、体外培養下で PGC の誘導が可能である (Nakaki et al., 2013)。また種々の DNA あるいはヒストン修飾酵素のノックアウトマウスは精子形成不全を引き起こすことも報告されている。H3K36 の脱メチル化酵素である FBXL10 ノックアウトマウスは加齢と共に精子形成が破綻すること (Ozawa et al., 2016)、KDM1A ノックアウトマウスでは精原細胞の分化不全が生じること (Lambrot et al., 2015) などが報告されてきた。それらの既往の研究に加え、現在におけるシーケンス技術の革新的向上に伴い、選択的スプライシングによる特異的なスプライシングアイソフォームの発現制御が生殖細胞の発生ならびに精子形成に重要な役割を果たしていることが近年報告されるようになった (Schmid et al., 2013; Bao et al., 2014)。本研究で遺伝子機能に着目する *Ptbp1* は、この選択的スプライシングを制御する遺伝子の一つである。

#### 生殖細胞の発生における選択的スプライシングについて

選択的スプライシングは、遺伝情報をコードするエクソンの組み合わせを変えることにより、

同一の遺伝子座から多様なスプライシングアイソフォームを作り出すメカニズムである。ヒトでは約 70%の遺伝子がスプライシングアイソフォームを有し、更に 1 つの遺伝子あたり平均 11 個のスプライシングアイソフォームのタンパク質が翻訳されている (Djebali et al., 2012; Schmid et al., 2013)。選択的スプライシングの正常な制御が免疫応答や細胞周期の制御、シグナルトランスダクション等、種々の細胞の生理機能の維持において極めて重要な役割を果たしており (Kalsotra and Cooper, 2011)、その破綻は様々な疾患の原因となる。例えば、精神疾患患者 (Morikawa et al., 2010) や癌患者 (Matsushita et al., 2006; Climente-Gonzalez et al., 2017) においてスプライシングバリエントの異常な発現が起こっていることが知られている。また選択的スプライシング制御遺伝子を欠損したモデルマウスの多くが様々な組織において発生異常を呈することから、個体の発生・分化において細胞種特異的なスプライシングアイソフォームの発現が極めて重要な役割を果たしていることが明らかである。例えば、スプライシング制御因子 ASF/SF2 ノックアウトマウスでは、心臓の成長段階における特定の転写産物のスプライシング異常により心筋の収縮異常が引き起こされる (Xu et al., 2005)。

Polypyrimidine tract-binding protein (PTB) ファミリーは多様な組織において選択的スプライシングを制御する因子として知られている (Garcia-Blanco et al., 1989; Gil et al., 1991; Patton et al., 1991; Valcarcel and Gebauer, 1997)。PTB は 4 つの RNA 認識モチーフを持ち、未成熟 mRNA のピリミジンリッチな領域に結合することで選択的スプライシングに関与する (Schmid et al., 2013)。また、選択的スプライシングの制御以外にも IRES 依存性の翻訳調節 (Gosert et al., 2000) や mRNA のポリアデニル化 (Castelo-Branco et al., 2004) にも関与することが報告されるなど、遺伝子の転写・翻訳過程において様々な役割を果たすことも知られている。

*Ptbp1* は PTB ファミリーに属する遺伝子の一つであり、広汎な細胞や組織での発現が認められる。例えば、PTBP1 は germinal center の B 細胞において高発現し、その増殖と抗体親和性の成熟に必要である (Monzon-Casanova et al., 2018)。また ES 細胞においては、その増殖性を正に制御すること (Shibayama et al., 2009) や解糖系関連の遺伝子の発現を調節し代謝を正に制御することが報告されている (Sun et al., 2018)。神経系においては PTBP1 の機能に関する報告がこれまでに数多くなされており、PTBP1 による選択的スプライシングの制御が脳皮質における神経細胞の運命決定において重要な役割を果たしていることが報告されている (Zhang et al., 2016)。加えて、PTBP1 は哺乳動物の精巣においても高発現していることが既往の研究ならびに我々の研究室の先行研究により明らかである (Xu and Hecht, 2007; 瀧尻、

東京大学大学院修士論文、2013)。哺乳類の精巣は選択的スプライシングの変容が脳と並んで最も多様な組織であること (Yeo et al., 2004; Kan et al., 2005)、また、ショウジョウバエにおいて、*Ptbp1* のホモログである dmPTB に変異を持つ雄は、精子形成不全を示し不妊となることが報告されている (Robida and Singh, 2003)。これらの既往の研究から、PTBP1 が選択的スプライシングを介して精子形成に寄与する可能性が強く示唆される。

PTBP1 のパラログである PTBP2 も精巣で高発現しているが、精子形成過程における PTBP1 と PTBP2 の発現の局在は異なっている (Schmid et al., 2013) (図 2)。PTBP1 は精原細胞において高発現しており、減数分裂期の精母細胞以降では発現が減弱する。一方で PTBP2 は精原細胞では発現が弱い、精母細胞以降で高発現する。このことから、PTBP1 と PTBP2 は精子形成過程においてそれぞれ異なる役割を果たしている可能性が示唆される。近年、PTBP2 を精細胞特異的にノックアウトしたマウスでは選択的スプライシングの大きな変化が生じ、減数分裂期以降の生殖細胞の発生・分化に重篤な障害が生じることが報告されている (Zagore et al., 2015)。しかしながら精原細胞において高発現する PTBP1 の機能的役割と選択的スプライシングへの関与について、生体を用いた実証的な研究はこれまでに報告がない。

そこで本研究では、精子形成における選択的スプライシング制御因子 PTBP1 の機能に着目し、精原細胞特異的 PTBP1 欠損マウスを用いて表現型の解析を行った。その結果、PTBP1 欠損に起因して新生仔期の精原細胞の増殖性の低下が起こっていることが示されるとともに、加齢に伴う精子形成の活性の低下も起こっていることが明らかになった。PTBP1 を欠損した精原細胞の性質についてより詳細な解析を行うために、精原幹細胞の体外培養株 (Germline Stem Cells, GS 細胞) において後発的に PTBP1 の欠損を誘導したところ、著しい増殖不全を示しアポトーシスの亢進と細胞周期異常が起こっていることが明らかになった。さらに、RNA-seq により精原細胞における PTBP1 欠損に起因した遺伝子発現および選択的スプライシングパターンの変化について網羅的に解析したところ、種々の選択的スプライシングパターンのうちエクソンスキッピングが変動した遺伝子が最多であった。また、PTBP1 欠損に起因して発現上昇した遺伝子群の Gene Ontology (GO) を同定した結果、有意に集積する 4 個の KEGG pathway の中に p53-signaling pathway が含まれていた。

以上の結果から、PTBP1 は精原細胞の増殖性を正に調節することで、持続的精子形成の維持に寄与することが示された。

## 方法

### マウス

解析に用いた *Ngn3-Cre; Ptbp1<sup>flox/wt</sup>* マウス (control) および *Ngn3-Cre; Ptbp1<sup>flox/flox</sup>* マウス (cKO) は、*Ngn3-Cre* マウス (理研バイオリソースセンターより入手) (Yoshida et al., 2004) と *Ptbp1<sup>flox/flox</sup>* マウス (Shibayama et al., 2009) を交配させることにより作出した。

4-ヒドロキシタモキシフェン (4OHT) 誘導的に *Ptbp1* を欠損する精原幹細胞の体外培養株 (Germline Stem Cells, 以下 GS 細胞) を樹立するために、まず *Rosa26<sup>mTmG</sup>* マウス (The Jackson Laboratory より入手) (Muzumdar et al., 2007) と *Ptbp1<sup>flox/flox</sup>* マウスとの交配により *Rosa26<sup>mTmG</sup>; Ptbp1<sup>flox/flox</sup>* マウスを作出した。また、*CAG-CreMer* マウス (Ichise et al., 2016) と *Ptbp1<sup>flox/flox</sup>* マウスを交配させることで *CAG-CreMer; Ptbp1<sup>flox/wt</sup>* マウスを作出した。*Rosa26<sup>mTmG</sup>; Ptbp1<sup>flox/flox</sup>* マウスと *CAG-CreMer; Ptbp1<sup>flox/wt</sup>* マウスを交配させることにより *Rosa26<sup>mTmG</sup>; CAG-CreMer; Ptbp1<sup>flox/wt</sup>* マウスまたは *Rosa26<sup>mTmG</sup>; CAG-CreMer; Ptbp1<sup>flox/flox</sup>* マウスを作出し、GS 細胞樹立に用いた(以下の、GS 細胞の培養および遺伝子欠損誘導、の項に詳細を記述)。樹立した GS 細胞は、培地に 4-ヒドロキシタモキシフェン (4OHT) を添加することで Cre が核内移行し、*loxP* 配列を認識して組換えを起こすことでレポーターが tdTomato から GFP へと変化する。それと同時に、*Ptbp1* の欠損を誘導することが可能である (図 3)。全てのマウスは室温 21±1°C、湿度 40~60%、SPF 環境の動物室内で飼育されており、動物実験は東京大学動物実験実施マニュアルに従って行った (承認番号: PA17-64)。また、遺伝子欠損マウスは遺伝子組み換え生物等の第二種拡散防止措置に従って使用した。

### パラフィン包埋組織を用いた免疫組織化学染色

マウスを頸椎脱臼により安楽殺し、個体から回収した精巣を 4% (w/v) PFA-PBS 中で 4°C にて固定した。固定後の組織は PBS で 3 回洗浄し、エタノール中で段階的に脱水 (25%、50%、70%、80%、90%、100%) した後、レモゾール (LemosolA、和光純薬工業) に置換し、パラフィンに包埋した。組織切片はマイクローム (サクラファインテックジャパン) を用いて 5µm の厚さで作成し、スライドガラスに乗せ 42°C の伸展板上で一晩伸展・乾燥させた。組織切片は、レモゾールで脱パラフィン処理 (レモゾール中に 20 分間の浸漬を 3 回繰り返す) し、エタノールを用いて段階的に親水化を行った (100%エタノールに 10 分間の浸漬を 2 回、70%エタノールに 10 分間の浸漬を 2 回行った後、DDW に 5 分間の浸漬を 2 回行った)。その後、SC buffer (10mM Sodium Citrate, 0.05% (v/v) Tween20, pH 6.0) または TE buffer (10mM



Tris Base, 1mM EDTA solution, 0.05% (v/v) Tween20, pH 9.0) 中において 120°Cで 20 分間加温することで抗原を賦活化した。スライドはそれぞれの抗原賦活化バッファー中で室温まで戻した後、DDW で 5 分間ずつ 2 回洗浄し、PBS-0.3% (v/v) TritonX または TBS-0.025% (v/v) TritonX で室温にて 5 分間の浸透化処理をした。その後、BSA (ナカライまたは Sigma) で室温にて 1 時間のブロッキングを行い、一次抗体溶液 (Signal Stain Antibody Diluent, Cell Signaling Technology) と 4°Cで一晩反応させた。一次抗体を洗浄の後、一次抗体の動物種特異的な蛍光標識二次抗体を用いて室温・暗所にて 1 時間反応させた。二次抗体を洗浄後、組織の自家蛍光を落とすために 70%エタノールに 0.1% (w/v) の濃度で溶解した Sudanblack B 液 (Sigma-Aldrich) 中に 1 時間浸漬した (Erben et al., 2016; Kajimura et al., 2016)。その後、核を DAPI で染色し、封入剤 (PermaFluor Aqueous Mounting Medium, Thermo Fisher または ProLong Glass, Thermo Fisher) で封入した。染色した切片は蛍光顕微鏡 BZ-9000 または BZ-X700 (KEYENCE) を用いて観察、撮影を行った。画像は全て Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>) を用いて解析した。一次抗体は抗 PLZF 抗体 (1:500; Santa Cruz, sc-22839)、抗 PTBP1 抗体 (1:400; Santa Cruz, sc-16547)、抗 SCP3 抗体 (1:100; Santa Cruz, sc-20845)、TRA54 抗体 (1:400; Abcam, ab15903)、抗 MVH 抗体 (1:500; Abcam, ab13840)、TRA98 抗体 (1:1000; BioAcademia, 0073)、抗 GATA4 抗体 (1:400; Santa Cruz, sc-1237)、抗 Cleaved Caspase-3 (CC3) 抗体 (1:500, Cell Signaling Technology, 9664)、抗 Ki67 抗体 (1:200; Bio Legend, 652402) を用いた。二次抗体は、一次抗体の動物種に合わせて Alexa Fluor 抗体 (1:500; Thermo Fisher) を用いた。

### HE 染色

パラフィン包埋切片を、免疫組織化学染色と同様の方法で脱パラフィンと親水化を行った後、PBS で 1 分間洗浄した。ヘマトキシリン (武藤化学) によって核の染色を 5 分間行った。冷水で余剰のヘマトキシリンを洗浄した後、熱水 (60°C~70°C) 処理により色素を定着させた。その後、エオシン (和光純薬工業) で細胞質の染色を 1 分間行った後、冷水で洗浄した。50%エタノール中に 1 分間、70%エタノール中に 1 分間の浸漬を行い、100%エタノール中に 1 分間の浸漬を 2 回行った。続いてレモゾール中で 2 分間の浸漬を 2 回行って透徹し、乾燥させた。切片はマウントクイック (大道産業) で封入した後、BZ-9000 または BZ-X700 で観察、撮影した。

## GS細胞の培養および遺伝子欠損誘導

GS細胞は既往の方法 (Kanatsu-Shinohara et al., 2003; Kubota et al., 2004) に従って樹立し、GDNF (Pepro Tech, 20ng/ml)、FGF2 (Pepro Tech, 10ng/ml) を添加した GS 細胞培地 (Kanatsu-Shinohara et al., 2003) を用いて培養した (37°C、5%CO<sub>2</sub>)。フィーダー細胞として X 線照射またはマイトマイシン C 処理した MEF を用いた。2~3 日ごとに培地を交換し、7~14 日間隔で 2×10<sup>5</sup> cells/ml の細胞濃度で継代した。継代後 3 日目の GS 細胞に 4OHT を 1μM の濃度で添加することで PTBP1 欠損を誘導した。

## フローサイトメトリー

GS細胞において PTBP1、CC3 の検出および細胞周期の解析を行うためにフローサイトメーターを用いた。PTBP1、CC3 の検出の際には、それぞれ 4OHT 投与後 5 日目および 8 日目の GS 細胞を用いた。GS 細胞コロニーを 0.25% (w/v) トリプシン-EDTA 処理することでシングルセルに分解した後、FBS でトリプシンを不活化した。シングルセルになった GS 細胞を PBS-EDTA-1% (w/v) BSA に懸濁し、4°C、280×g で 5 分間遠心して上清を取り除いた後、PBS-1% (w/v) PFA で 10 分間固定した。固定後、洗浄し、90%メタノールによる透過処理を氷上で 30 分間行った。更に、洗浄後 PBS-EDTA-1%(w/v) BSA 中で室温にて 10 分間のブロッキングを行った。ブロッキング液を除去した後、PBS-EDTA-1%(w/v) BSA で希釈した一次抗体溶液を加えてタッピングし、室温にて 1 時間反応させた。一次抗体には抗 CC3 抗体 (1:400; Cell Signaling Technology, 9664) または抗 PTBP1 抗体 (1:2000; Santa Cruz, sc-16547)を用いた。一次抗体反応後の細胞を PBS-EDTA-1% (w/v) BSA で 2 回洗浄した。続いて PBS-EDTA-1%(w/v) BSA で二次抗体 (1:20000; Alexa Fluor, Thermo Fisher) を希釈し、希釈溶液を加えて室温・暗所にて反応させた。抗体反応終了後、細胞を PBS-EDTA-1%(w/v) BSA で 2 回洗浄し、適量の PBS-EDTA-1%(w/v) BSA に再懸濁しセルストレイナーで濾した。細胞周期の解析の際には 4OHT 添加後 5 日目の GS 細胞を用いた。細胞を 0.25% (w/v) トリプシン-EDTA 処理し、FBS で不活化した後、PBS に懸濁し、4°C、280×g で 5 分間の遠心を行った。上清を取り除いた後、1ml の PBS に懸濁し、ゆっくりと 9ml の 70%エタノールを加え、-20°C中で 1 時間の固定を行った。4°C、850×g で 5 分間の遠心を行い、PBS で洗浄した。PI (50μg/ml, Sigma, P4864) および RNase (200μg/ml, Novagen, 2778643) を PBS-0.1% (w/v) TritonX に溶解し、細胞をこの溶液中において 37°Cで 20 分間インキュベートしセルストレイナーで濾した。FACSCalibur または FACSVerse (BD Biosciences) を用いて蛍光を検出

した。データは FlowJo (FlowJo, LLC; <https://www.flowjo.com>) を用いて解析した。

### RNA の抽出

肝臓、肺、心臓、骨髄、腎臓および精巢は、その一部を切り取りセパゾール（ナカライ）の中に入れ、氷上において 18 ゲージの注射針中を勢い良く通すことによって組織をホモジェナイズした。サンプル液を室温に 5 分間静置した後、クロロホルムを加えてボルテックスした。更に室温に 2~3 分静置し、4°C、12,000×g において 15 分間遠心した。遠心後のサンプル液から RNA を含む水相を回収し、エタ沈メイト（ニッポンジーン）および酢酸ナトリウム（ニッポンジーン）を加えた上で、サンプル液と等量の 2-プロパノールを加えボルテックスした。室温で 10 分間静置した後、4°C、12,000×g において 10 分間遠心することで RNA を沈殿させた。上清を取り除き、70%エタノールで RNA ペレットをリンスし、更に 4°C、12,000×g で 5 分間遠心した。エタノールを除去後、RNA ペレットを TE に溶解した。

脳および GS 細胞からの RNA の回収には、NucleoSpin RNA II system (Macherey-Nagel) を用いた。GS 細胞は、4OHT 投与後 5 日目に 0.25% (w/v) トリプシン-EDTA を作用させることでディッシュから剥離し回収した。回収した GS 細胞は PBS-EDTA-1% (w/v) BSA に懸濁し、セルストレイナーで漉して FACS Aria (BD Biosciences) で tdTomato 単独陽性あるいは GFP 単独陽性の分画をソーティングし、細胞ペレットを RNA 抽出時まで -80°C にて保存した。得られた RNA は後述の方法で逆転写して cDNA を合成し、qRT-PCR に供した。

### qRT-PCR

マウス組織および GS 細胞から抽出した RNA を鋳型とし、Superscript VILO Mastermix (Invitrogen) を用いてサーマルサイクラーで逆転写反応を行い cDNA を合成した。得られた cDNA を用いて THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) により定量的 PCR 反応を行った。PCR 反応および SYBR の蛍光強度の検出には Step One Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いた。Gapdh の発現量をリファレンスとし、各遺伝子の相対的発現量を  $\Delta\Delta Ct$  法 (Schmittgen and Livak, 2008) により求めた。また DNA のコンタミネーションがないことを確認する目的で、逆転写反応を行っていない RNA も同時に PCR 反応を行い、増幅されないことを確認した。用いたプライマーの配列は表 1 に示す。

## RT-PCR

GS 細胞から抽出した RNA を鋳型とし、上記の方法によって cDNA を合成した。得られた cDNA をテンプレートとし、KOD FX Neo (TOYOBO) を用いて、RNA-seq で選択的スプライシングの有意な変動があった遺伝子について RT-PCR を行った。PCR は 98°C: 10 秒、58°C: 30 秒、68°C: 30 秒を 1 サイクルとして 35 サイクル行った。PCR 産物に Novel Juice (Gene Dire) を加えて泳動し、蛍光を Chemi doc (BioRad) で検出した。プライマーは選択的スプライシングが変化したエクソンをはさむように設計した。用いたプライマーの配列を表 2 に示す。

## RNA-seq

GS 細胞から回収した RNA から、TrueSeq Standard mRNA Sample Preparation Kit (Illumina) によりプロトコルに従ってシーケンシング用ライブラリを作成した。シーケンシングは Next Seq 500 (Illumina) を用いて行った。

## データ解析

選択的スプライシングの inclusion ratio、統計・クラスタリング解析は Microsoft SQL server と R を用いて行った。遺伝子発現解析は 4OHT による PTBP1 欠損誘導後に発現が対照区と比較して 2 倍以上、あるいは 0.5 倍以下に変動した遺伝子について行った。遺伝子発現のクラスタリング解析には R を用いた。Gene Ontology 解析には Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.8 を用いた。

## 統計処理

全ての実験において 3 反復以上の繰り返しを行い、平均値±標準誤差でデータを示した。各実験で得られた観測値を t-test により control と比較し、 $P < 0.05$  の場合に有意差があると判定した。GS 細胞の増殖性については一元配置分散分析と多重比較検定を行った。

## 結果

### PTBP1 は精原細胞において高発現する

マウスの組織ごとの *Ptbp1* の発現量を調べるため、回収した組織から RNA を回収し qRT-PCR を行った。その結果、*Ptbp1* は脳、肝臓、肺、心臓、骨髄、腎臓、精巣の全てで発現が認められ、その中で精巣において最も発現が高いことが明らかになった (図 4)。次に、精巣における PTBP1 の局在を調べるために、各分化段階における精細胞マーカーに対する抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。その結果、PTBP1 は未分化精原細胞 (PLZF 陽性) において高発現しており (図 5A)、精母細胞 (SCP3 陽性) に分化すると発現がやや減弱し、減数分裂の進行と共に発現が低下してゆくことが明らかになった (図 5B)。また、半数体精子細胞 (TRA54 陽性) においては PTBP1 の発現はほとんど確認することができなかった (図 5C)。以上の結果から、PTBP1 は他の組織と比較して精巣において高発現し、その中でも特に初期の発生段階にある未分化な精原細胞において何らかの役割を果たす可能性が示唆された。

### cKO では著しい精巣重量・精子数の減少が生じる

*Ptbp1* を全身で欠損したマウスは着床直後に致死となることが報告されている (Shibayama et al., 2009; Suckale et al., 2011)。そこで、精細胞特異的に *Ptbp1* を欠損させるマウスを作成し、解析に供試することにした。精原細胞において *Cre* を発現する *Ngn3-Cre* マウスと *Ptbp1<sup>flox/flox</sup>* マウスを交配させ、*Ngn3-Cre; Ptbp1<sup>flox/wt</sup>* マウスを得た。更に、この *Ngn3-Cre; Ptbp1<sup>flox/wt</sup>* マウスと *Ptbp1<sup>flox/flox</sup>* マウスを交配させることで *Ngn3-Cre; Ptbp1<sup>flox/flox</sup>* マウス (以下、cKO) を作出した (図 6A)。このマウスを用い、精子形成過程における PTBP1 の役割を明らかにすることを目的として表現型の解析を行った。

cKO の体重は control と同等であり、個体の成長に顕著な差は確認されなかった (図 7A, B)。精細胞において PTBP1 の欠損が起こっていることを確認するために、control および cKO の精巣を回収し、精細胞マーカーである MVH に対する抗体および PTBP1 に対する抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。その結果、ほとんど全ての MVH 陽性細胞において PTBP1 の発現が消失していることが確認できた (図 6B)。

続いて、cKO の精巣の成長を調べるために精巣を経時的に回収し重量を計測した。3 週齢の時点までは control と cKO の精巣重量に差は認められなかった一方、2 ヶ月齢において cKO の精巣重量は control と比較して有意に低下しており、6 ヶ月齢においてその差はより顕著となった (図 8A)。また、精巣上部尾部から回収した精子数は 2 ヶ月齢では有意差がなかった一方

で、6ヶ月齢の cKO では control の 4 分の 1 程度であった (図 8B)。2ヶ月齢の cKO の精巣の外観は control よりも小さかった (図 9A)。これらの結果から、cKO では精子形成異常が生じていることが示唆された。そこで、精巣を組織学的に観察するため HE 染色を行った結果、cKO では精細胞を含まない精細管、または精子形成は進行しているが精細胞の層が薄くなっている異常な精細管が観察された (図 9B)。一方で、交配実験の結果、cKO の大部分の個体が妊孕性を有していた (データ省略)。以上の結果から、*Ptbp1* は精子形成および次世代の作出に不可欠な遺伝子ではないものの、正常な精子形成を行う上で重要な働きを持つことが示唆された。

#### cKO では出生後 5 日目における精原細胞を含まない精細管の割合が増加する

PTBP1 の欠損に起因して精子形成異常が起こる時期およびその異常の特性を明らかにすることを目的とし、精巣を経時的に回収してすべての分化段階の精細胞で発現する生殖細胞特異的抗原に対する抗体 (TRA98) および体細胞マーカーである GATA4 に対する抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。出生後 5 日目頃までの新生仔期は精原細胞が体細胞分裂によりその数を増やす時期であり、精細管に徐々に精細胞 (精原細胞) が充填されてゆく。そのため出生直後には精細胞が充填されていない精細管が多数観察される一方、その数は細胞の増殖と共に出生後 5 日目頃までに減少してゆく。精細胞を含まない精細管の割合を調べたところ、control, cKO 共にその割合は出生後 5 日目までに減少した。しかし、control においては出生後 1 日目から 5 日目にかけての精細胞を含まない精細管の割合が  $34.5 \pm 4.5\%$  から  $2.7 \pm 1.1\%$  まで低下したのに対し、cKO では 5 日目の時点で  $17.6 \pm 3.3\%$  の精細管が精細胞を含んでおらず、同時期の control と比較して有意に高い割合に留まっていた (図 10A, B)。この結果から、PTBP1 欠損に起因して出生直後の精原細胞の維持不全または増殖不全が起こっていることが示唆された。そこで、アポトーシスの亢進あるいは細胞増殖の低下の有無を検証するため、それぞれ CC3 および Ki67 に対する抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。その結果、単位面積あたりの CC3 陽性細胞の割合および Ki67 陽性となる精原細胞の割合に有意な差は認められなかった (図 11A, B, C, D)。Ki67 は増殖期にある全ての細胞に発現しているため、免疫組織化学染色によって増殖細胞の量的判定はできるものの、増殖している細胞周期の進行速度までは定量することができない。本実験の結果で、cKO で精原細胞の増殖は抑制されていた一方で、増殖期にある細胞数に有意差がなくアポトーシスの亢進も起こっていなかったことから、PTBP1 欠損に起因して起こる精原細胞を含まない精細管の増加は、精原細胞の増殖速度の低下によるも

のであると考えられる。

次に、PTBP1 欠損に起因して、初回精子形成の進行にも何らかの異常が生じている可能性を検証するために、3 週齢の精巣を回収し免疫組織化学染色を行うことにより、この時期に最も進んだ発生段階にある半数体精子細胞を含む精細管の割合を調べた。その結果、control と cKO の間に有意差はなかった(図 12A, B)。このことから、PTBP1 は出生直後の精原細胞の増殖性に重要な役割を果たす一方、PTBP1 を欠損しても少なくとも初回精子形成時の減数分裂の進行には大きな影響がないことが示唆された。

#### cKO は加齢と共に精子形成の活性が低下する

2 ヶ月齢および 6 ヶ月齢の cKO の精巣重量および精子数は control と比べて低下していた。また 6 ヶ月齢の方がより control との差が顕著であったことから、加齢と共に精子形成能が低下している可能性が示唆された。持続的精子形成は精原細胞の未分化性の維持と分化の進行のバランスが正しく保たれることで可能となる。そこで 2 ヶ月齢および 6 ヶ月齢の cKO の未分化精原細胞の分布を比較するため、PLZF に対する抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。2 ヶ月齢、6 ヶ月齢ともに、cKO では control と比較して PLZF 陽性細胞を含まない精細管の割合が有意に多く、更に 2 ヶ月齢と 6 ヶ月齢の cKO を比較すると、6 ヶ月齢の cKO でその割合が多くなる傾向にあった(図 13A, B)。これらの結果から、cKO では加齢と共に精原細胞の集団が減少し、精子形成の活性が低下している可能性が示唆された。

精子形成の活性が低下すると精細管の断面積が減少することが知られている (Gow et al., 1999; Wu et al., 2012; Dong et al., 2014)。そこで、精子形成が進行しており、かつ長径が短径の 2 倍を超えない精細管の断面積を計測して比較した結果、control では 2 ヶ月齢から 6 ヶ月齢の間に断面積が有意に増加する一方、cKO では同じ期間に有意に減少していた。この結果より、PTBP1 欠損に起因して加齢と共に精子形成の活性が低下することが明らかになった(図 14)。

精子形成の活性が低下する原因の一つとしてアポトーシスの亢進により精細胞の集団の減少が起こっている可能性を検証するために、6 ヶ月齢の精巣において免疫組織化学染色により CC3 陽性細胞の検出を行った。その結果、単位面積あたりの CC3 陽性細胞数に control と cKO で有意な差は認められなかった(図 15A, B)。以上の結果から、PTBP1 は精子形成の活性に関与する一方、cKO で見られる加齢に伴う精子形成の活性の低下はアポトーシスが原因ではないことが明らかになった。このことから cKO において加齢と共に精原細胞の増殖速度が低

下している可能性が示唆された。

#### PTBP1 を欠損した GS 細胞は著しい増殖不全を呈する

PTBP1 を欠損した精原細胞の性質について詳細な解析を行うため、出生後 7~10 日目の *Rosa26<sup>mTmG</sup>; CAG-CreMER; Ptbp1<sup>fllox/wt</sup>* マウスまたは *Rosa26<sup>mTmG</sup>; CAG-CreMER; Ptbp1<sup>fllox/fllox</sup>* マウス（それぞれ *Ptbp1-FW*, *Ptbp1-FF*）から精原幹細胞の体外培養株である GS 細胞を樹立した。4OHT 添加後の tdTomato レポーターおよび PTBP1 の消失を確認することを目的として、フローサイトメーターで解析を行った結果、高い効率で tdTomato および PTBP1 の発現の消失が起こっていることが確認できた（図 16A, B）。そこでこの実験系を用いて、PTBP1 を欠損した GS 細胞の増殖能力を調べる目的で 4OHT 添加後の長期培養を行った。その結果、4OHT を添加した *Ptbp1-FF* のみ著しい増殖不全を示した（図 17A, B）。

PTBP1 欠損に起因した著しい増殖不全の原因としてアポトーシスが亢進している可能性を検証するために、フローサイトメーターにより CC3 陽性細胞の割合を定量したところ、*Ptbp1-FF* (4OHT) においてその割合が有意に増加していた（図 18）。また、PTBP1 を欠損した ES 細胞では G2/M 期の細胞集団が増加することで細胞周期の進行が遅延することが報告されており（Shibayama et al., 2009）、GS 細胞において PTBP1 を欠損した場合にも、アポトーシスの亢進に加えて細胞周期の進行が遅延が生じている可能性が考えられた。そこで PI 染色を行いフローサイトメーターにより細胞周期の解析を行った結果、*Ptbp1-FF* (4OHT) において G2/M 期および S 期の細胞の割合が有意に増加していた（図 19）。これらの結果から、PTBP1 は GS 細胞において、アポトーシスの抑制および細胞周期の正の制御に関与することが示唆された。

#### GS 細胞における PTBP1 欠損により選択的スプライシングおよび遺伝子発現のパターンが変化する

PTBP1 は RNA 結合タンパク質であり、その主な役割は選択的スプライシングである。そこで GS 細胞から RNA を回収し、次世代シーケンサーを用いて 6 つのスプライシングパターン（Skipped exon: 選択的エクソンの獲得または排除、Mutually exclusive exon: 隣接する選択的エクソンのうちどちらかのみがスキップされる、Alternative 5' splice site または Alternative 3' splice site: 特定のエクソンの 5'あるいは 3'側のスプライス部位が変化することでエクソンの伸長や短縮が起こる、Alternative first exon または Alternative last exon: 転写開始点やポリ A サイ



トが変化する)の変動を網羅的に解析した。その結果、PTBP1 欠損により 85 個の遺伝子におけるべ 103 箇所ですプライシングパターンが有意に変動した (inclusion ratio の差が 0.2 以上、FDR $\leq$ 0.05 を満たす)。103 箇所のリストを表 3 に、スプライシングパターンの内訳を図 20 に示しており、PTBP1 の選択的スプライシングにおける代表的な機能であるエクソンスキッピングに変動があった箇所が最多の 69 箇所を占めた。inclusion ratio の値からクラスタリング解析を行ったところ、*Ptbp1-FF* (4OHT) のみ他の 3 処理区とは異なるスプライシングパターンを示すことが確認された (図 21)。エクソンスキッピングに変化があった遺伝子のうち、inclusion ratio の差が大きかった *Cers5*、*Dpf2*、*Ralgapa1* について RT-PCR を行ったところ、*Ptbp1-FF* (4OHT) のみ PCR 産物のバンドがシフトしていた (図 22)。これらの結果から、GS 細胞において PTBP1 を欠損することにより、選択的スプライシングのパターンが大きく変動することが明らかになった。

次に、PTBP1 を欠損した GS 細胞の遺伝子発現パターンについて解析を行った。今回、*Ptbp1-FW* (EtOH) と *Ptbp1-FW* (4OHT) を比較した場合の差の大きさよりも、*Ptbp1-FF* (EtOH) と *Ptbp1-FF* (4OHT) を比較した場合の差の大きさの方が大きかった遺伝子、かつ *Ptbp1-FF* (EtOH) と *Ptbp1-FF* (4OHT) を比較した場合に 2 倍以上の発現差があった遺伝子を、PTBP1 欠損に起因して発現が変動した遺伝子として定義した。遺伝子発現のクラスタリング解析を行ったところ、*Ptbp1-FF* (4OHT) のみ他の 3 処理区とは異なる発現パターンを示すことが明らかになった (図 23A)。

上述した定義に基づくと、PTBP1 欠損により 2 倍以上の発現変動があった遺伝子の個数は 276 個であり、うち発現量が上昇した遺伝子の数は 163 個、発現量が低下した遺伝子の数は 113 個であり、これらの遺伝子リストを表 4 に示した。この 276 個の遺伝子の中で、選択的スプライシングの変動が起こった 85 個の遺伝子と重複したものはなかった。すなわち、この結果は PTBP1 欠損による選択的スプライシングの変動と発現量の変動は独立であることを示唆している。実際、選択的スプライシングに有意な変動があった遺伝子について、その発現量を *Ptbp1-FF* (EtOH) と *Ptbp1-FF* (4OHT) で比較すると、非常に高い相関を示した (R=0.97, 図 23B)。

発現上昇した遺伝子 163 個、発現低下した遺伝子 113 個について、Gene Ontology を解析し濃縮されている Biological Process および KEGG pathway の同定を行った (図 24)。発現上昇した遺伝子群の KEGG pathway の 1 つには "p53 signaling pathway" が含まれていた。PTBP1 欠損により発現量が大きく上昇した遺伝子の 1 つにアポトーシス誘導経路において CC3 の切

断と活性化を行う *Caspase-8* が含まれており、*Ptbp1-FF* (4OHT) において確認されたアポトーシスの亢進が生じた原因の 1 つとして *Caspase-8* が発現上昇していることが示唆された。また発現低下した遺伝子群には *Nanos2*、*Nanos3*、*Glis3* といった精子形成に極めて重要な役割を果たす遺伝子が含まれており、RNA-seq と同様の結果が qRT-PCR でも確認でき (図 25)、これらの遺伝子の発現量の低下が *Ptbp1-FF* (4OHT) で観察された著しい増殖不全に寄与している可能性が示唆された。

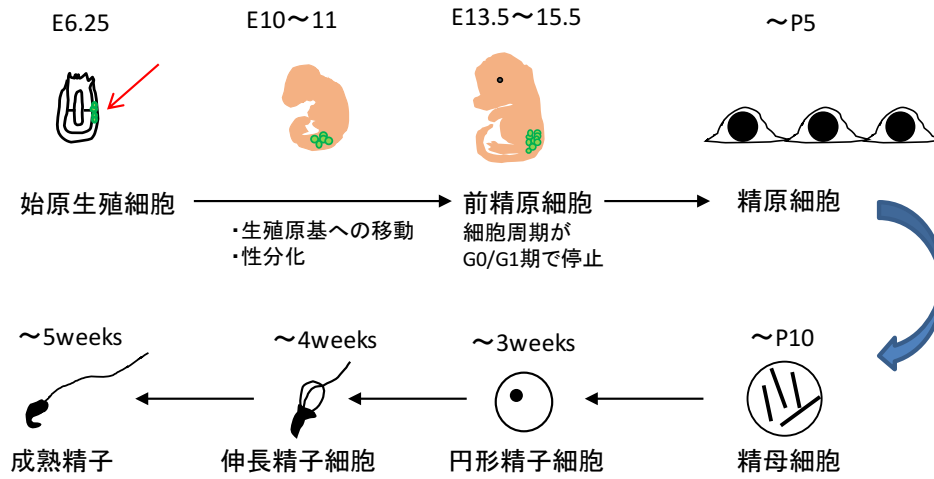
### *Nanos3*、*Ptbp1* の両遺伝子をヘテロ欠損したマウスでは精子形成異常が生じる

*Ptbp1* 欠損に起因して発現量が低下した、精子形成に極めて重要な役割を果たす 3 つの遺伝子のうち、まず *Nanos3* に注目した。NANOS3 は PTBP1 と同様、精原細胞において高発現する RNA 結合タンパク質である。精子形成過程においても NANOS3 と PTBP1 が共役して働いており、GS 細胞の場合と同様、PTBP1 の発現が低下することで NANOS3 の発現も低下し精子形成に何らかの障害が生じる可能性があると考えた。そこで、GS 細胞における PTBP1 と NANOS3 の発現に類似したモデルマウスの作出を試みた。*Nanos3* ホモ欠損マウスは始原生殖細胞が発生することができず、*Ptbp1* ホモ欠損マウスは胎生致死となるため、いずれのホモ欠損マウスも出生後の精子形成の解析を行うことができない。そこで、*Nanos3* と *Ptbp1* 両方の遺伝子をヘテロ欠損したマウス (*Nanos3*<sup>wt/-</sup> ; *Ptbp1*<sup>wt/-</sup>) を作出し、その精子形成の進行を *Nanos3*<sup>wt/-</sup>マウスまたは *Ptbp1*<sup>wt/-</sup>マウス (いずれも単独ヘテロ欠損) と HE 染色を行うことにより比較した。その結果、*Nanos3*<sup>wt/-</sup>および *Ptbp1*<sup>wt/-</sup>マウスでは精子形成異常を起こした精細管がほとんど観察されなかったのに対し、*Nanos3*<sup>wt/-</sup> ; *Ptbp1*<sup>wt/-</sup>では cKO と同様、精子形成異常を起こした精細管が多数観察された (図 26A, B)。この結果から、NANOS3 と PTBP1 は精子形成過程において共役して働いている可能性が示唆された。

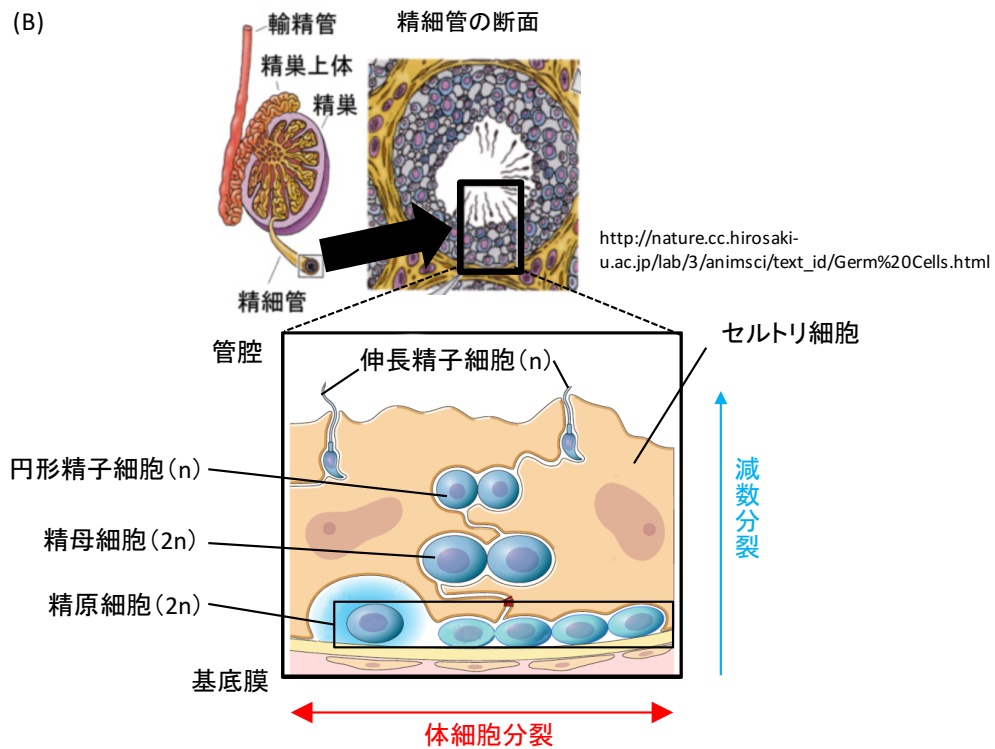
以上の結果より、図 27 のモデル図で示すように、PTBP1 は精原細胞の増殖性を正に制御しており、その際、下流で精子形成に極めて重要な役割を果たす NANOS3 の発現量の調節を介している可能性が示唆された。

図表

(A)



(B)

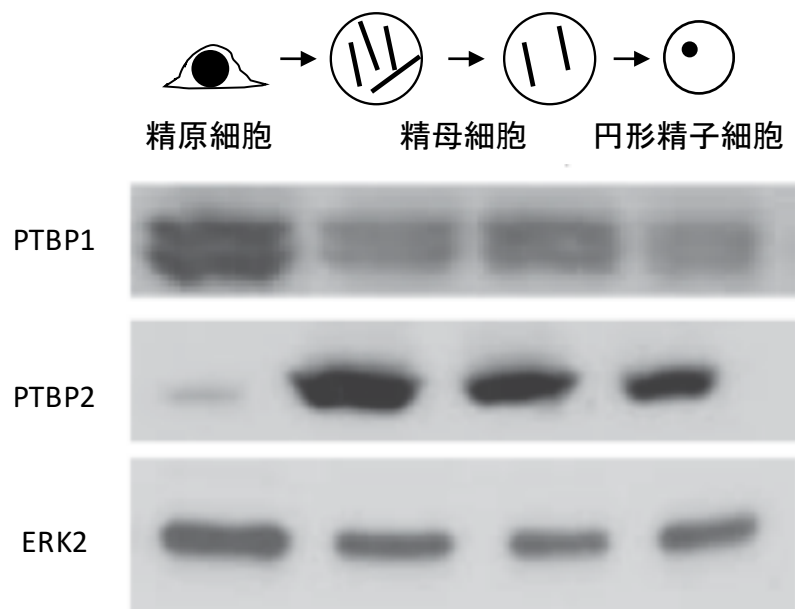


Oatley and Brinster, Physiological Reviews 2012 一部改変

図1 オスマウスの生殖細胞の発生および持続的精子形成の模式図

(A) 胎生期の始原生殖細胞から出生後に成熟精子となるまでの各分化段階の精細胞を、初めて出現する時期とともに示した。

(B) オスでは生涯に渡って精子形成が持続する。精原細胞は、横方向への体細胞分裂で集団のサイズを維持しながら、縦方向（基底膜側から管腔側）へと分化を進行させる。



Schmid et al., 2013 一部改変

図2 精巣の各分画での PTBP1、PTBP2 の発現量のウェスタンブロットによる定量 (Schmid et al., 2013)

PTBP1 は精原細胞において、PTBP2 は減数分裂期以降に高発現している。

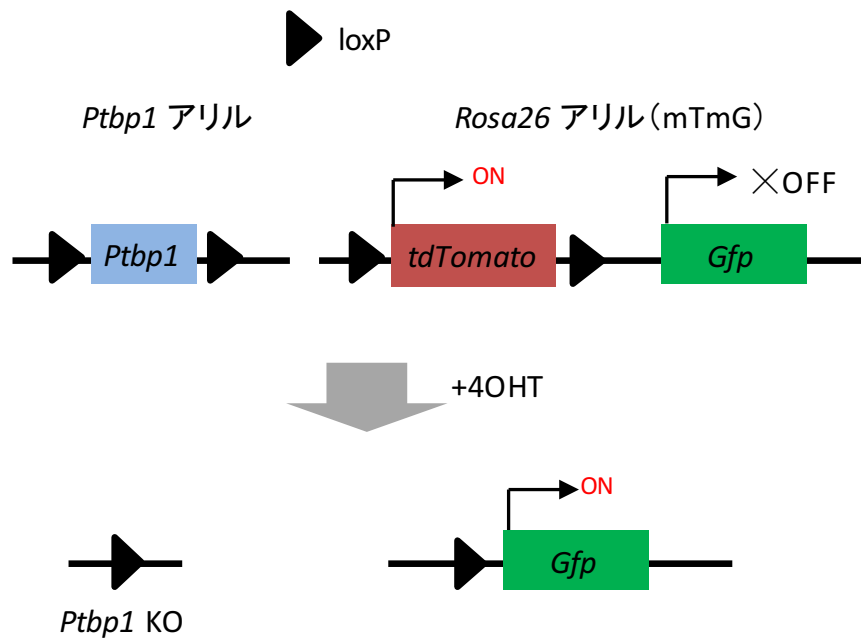


図3 *Rosa26<sup>mTmG</sup>; CAG-CreMer; Ptbp1<sup>lox</sup>*マウスの Cre タンパク質による組み換えの模式図  
4OHT 添加後、*loxP* にはさまれた *Ptbp1* および *tdTomato* が欠損し、*Gfp* が発現する。

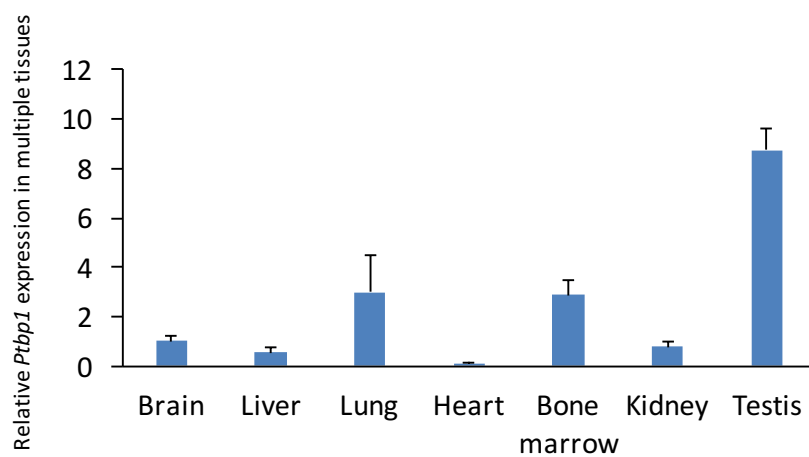


図4 マウスの各組織における *Ptbp1* mRNA の発現量の定量  
 マウスの脳、肝臓、肺、心臓、骨髄、腎臓、精巣から RNA を回収し、*Ptbp1* mRNA の発現量を qRT-PCR により定量した。内在性コントロールには *Gapdh* を用い、脳での発現量を 1 とした場合の相対値を示した (n=3、精巣のみ n=2)。

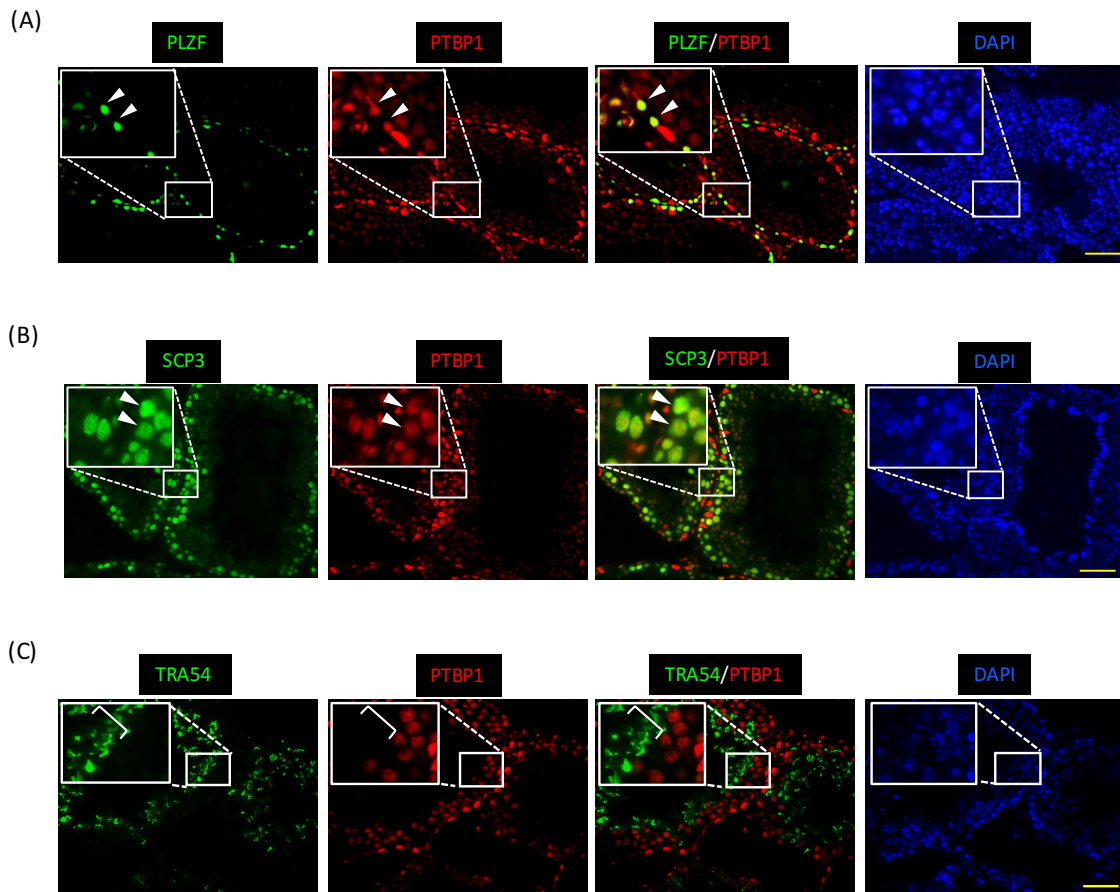


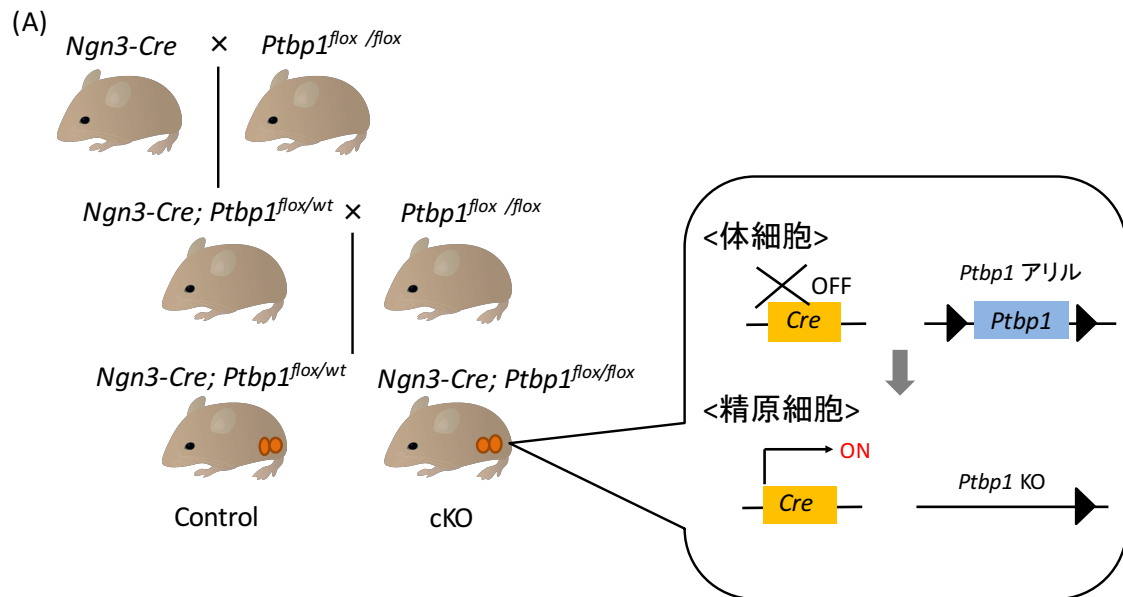
図5 7ヶ月齢の野生型マウスの精巣の免疫組織化学染色

(A) PLZF (未分化精原細胞) と PTBP1 に対する抗体を用いて行った。矢頭は PLZF と PTBP1 の共陽性の細胞を示す。

(B) SCP3 (第一減数分裂期にある精母細胞) と PTBP1 に対する抗体を用いて行った。矢頭は SCP3 と PTBP1 の共陽性の細胞を示す。

(C) TRA54 (半数体精子細胞) と PTBP1 に対する抗体を用いて行った。半数体精子細胞では PTBP1 の発現が消失している。

スケールバーは 50 $\mu$ m。



(B)

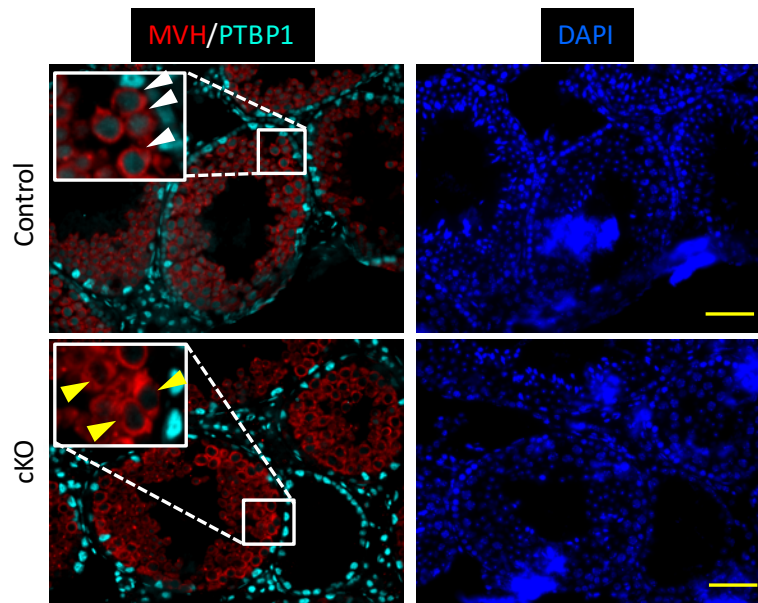


図6 cKOは精細胞特異的にPTBP1を欠損する

(A) 精原細胞特異的に Cre を発現する *Ptbp1* コンディショナルノックアウトマウスの作出の模式図。cKO では、精原細胞において Cre が発現し *loxP* で挟まれた *Ptbp1* の領域が欠損する。

(B) 5 週齢の control および cKO の精巣の MVH (精細胞) および PTBP1 に対する抗体を用いた免疫組織化学染色。白矢頭は PTBP1 陽性の精細胞を、黄矢頭は PTBP1 陰性の精細胞を示す。スケールバーは 50 $\mu$ m。



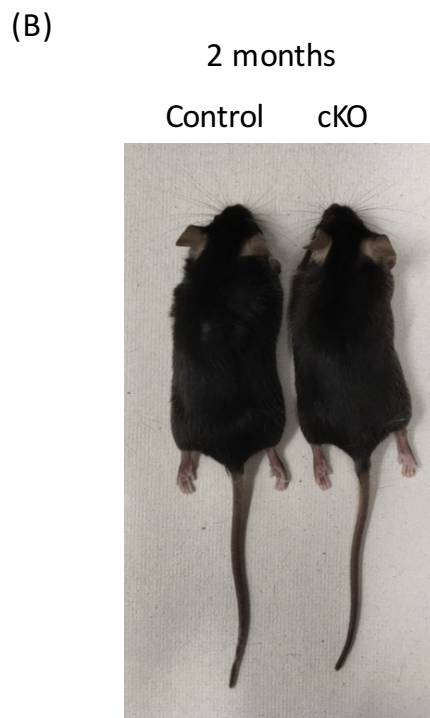
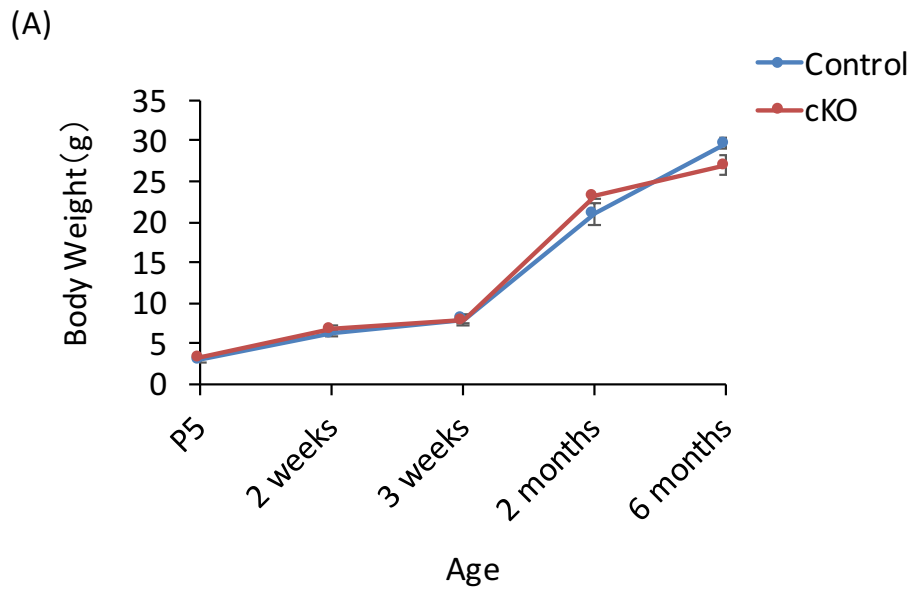


図7 control、cKO の体重の増加に有意差はない  
 (A) control および cKO の体重の推移 ( $n \geq 3$ ;  $P > 0.05$ )。  
 (B) 2ヶ月齢の control および cKO の外観。

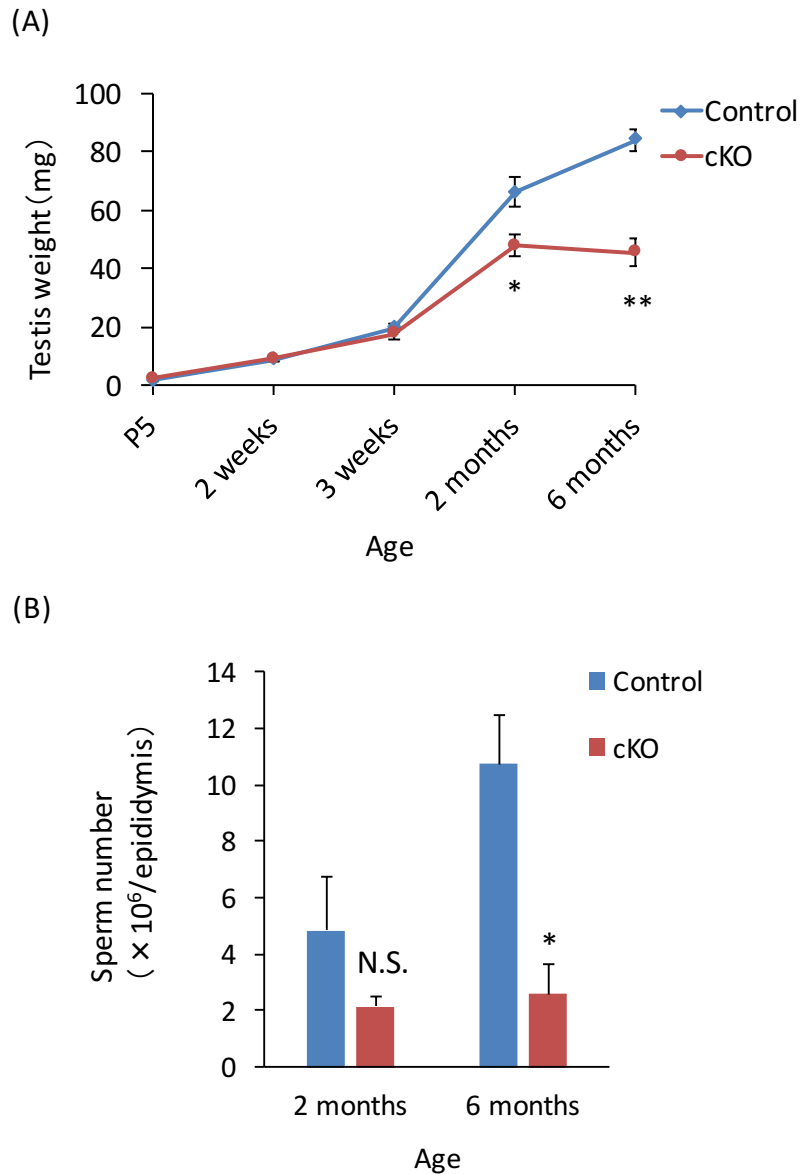


図8 cKOでは精巣重量および精子数の減少が生じる

(A) control および cKO の精巣を経時的に回収し、精巣重量を測定した(\*P<0.05, \*\*P<0.01; n≧3)。

(B) 2 ヶ月齢および 6 ヶ月齢の精巣上体から精子を回収しその数を測定した (\*P<0.05; n≧3)。

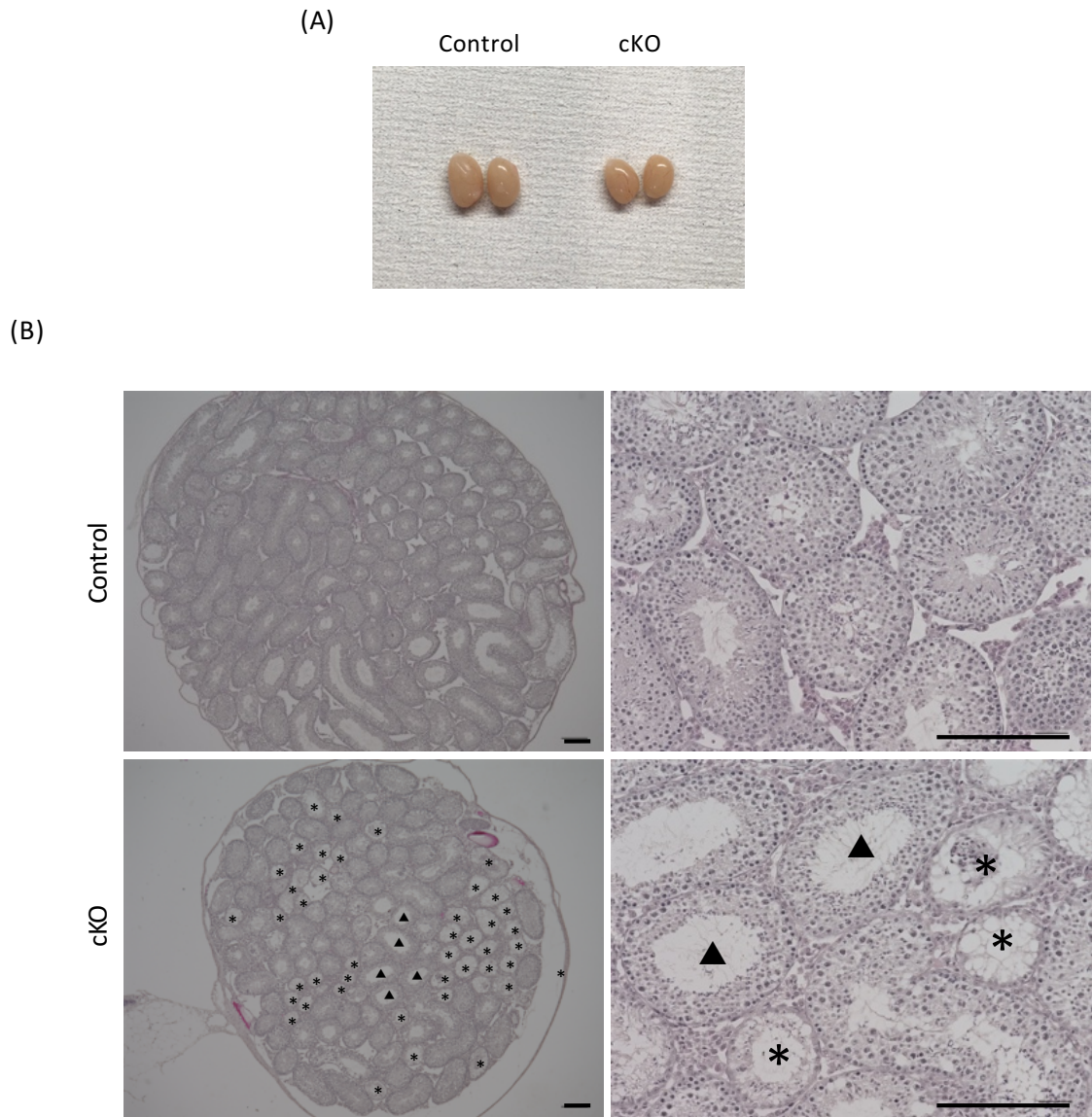


図9 cKOは精子形成異常を呈する

(A) 2ヶ月齢の control および cKO の精巣の外観。

(B) 2ヶ月齢の control および cKO の精巣の HE 染色。アスタリスクは精細胞が枯渇した精細管を、▲は精細胞の層が薄い精細管を示す。スケールバーは 200 $\mu$ m。

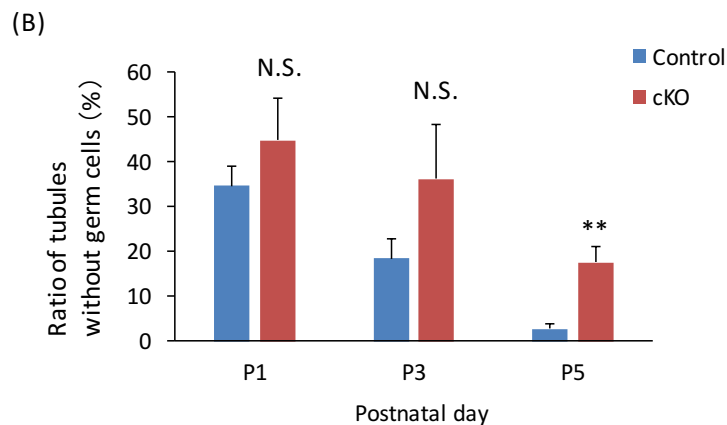
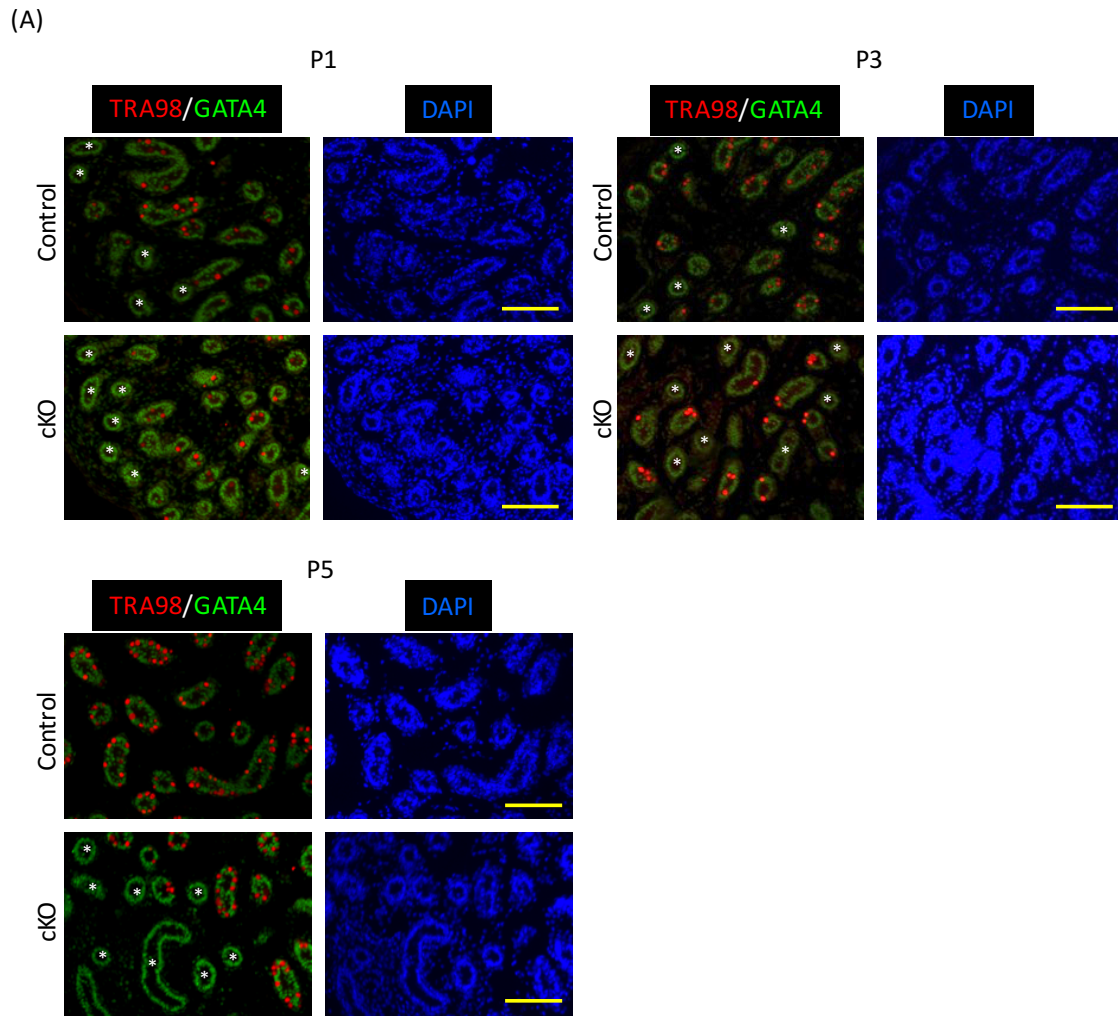


図 10 出生後 5 日目の cKO は精細胞を含まない精細管の割合が有意に高い

(A) 出生後 1 日目、3 日目、5 日目の control および cKO の精巣の、TRA98 (精細胞) および GATA4 (セルトリ細胞) に対する抗体を用いた免疫組織化学染色。アスタリスクは精細胞を含まない精細管を示す。スケールバーは 100 $\mu$ m。

(B) 精細胞を含まない精細管の割合をグラフで示した (\*\* $P < 0.01$ ;  $n \geq 3$ )。

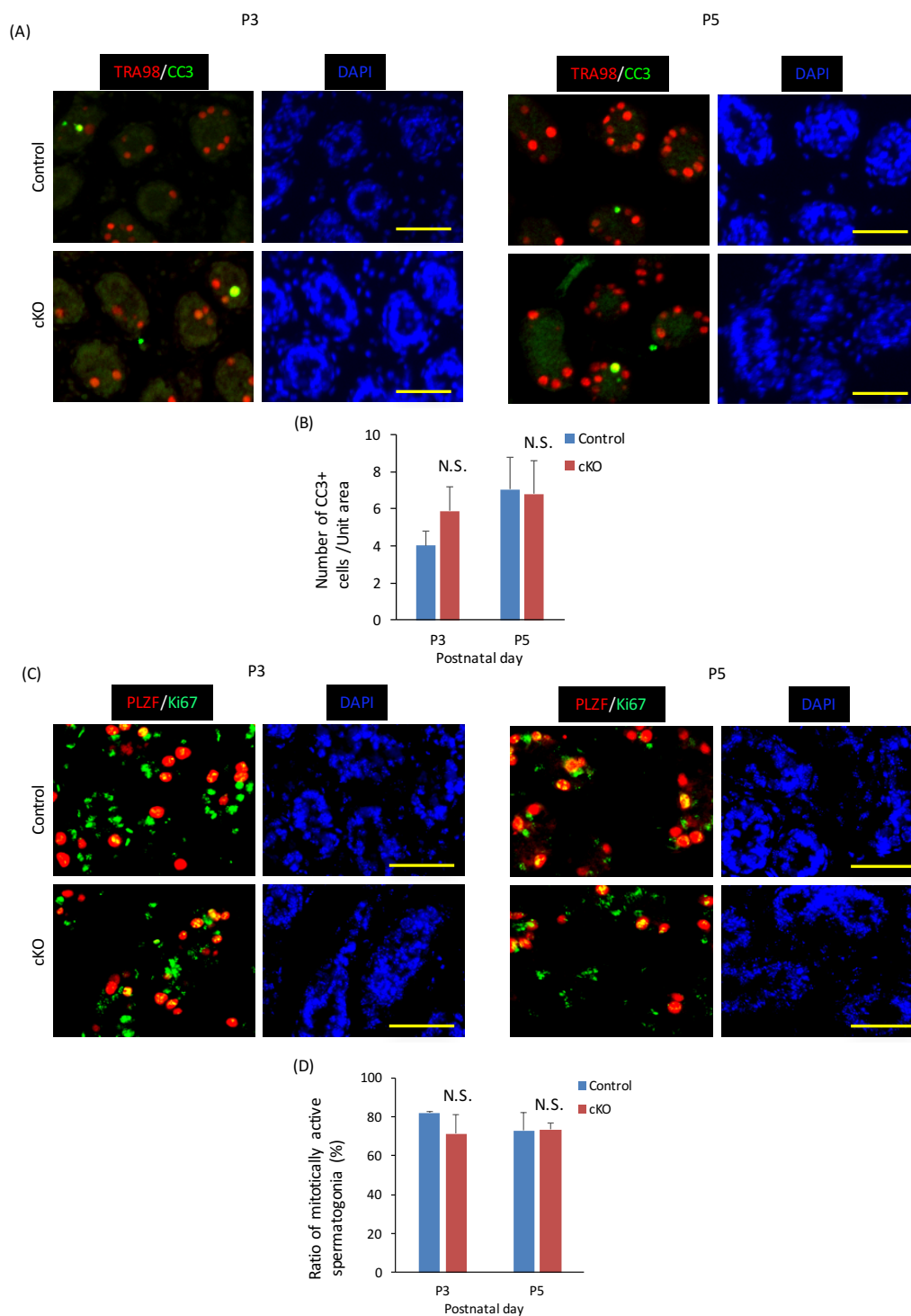


図 11 出生後 3 日目および 5 日目のアポトーシスおよび細胞分裂活性に有意差はない

(A) control および cKO の精巣の、TRA98 (精細胞) および CC3 に対する抗体を用いた免疫組織化学染色。スケールバーは 50 $\mu$ m。

(B) 単位面積あたりの CC3 陽性細胞数をグラフで示した ( $P>0.05$ ;  $n\geq 3$ )。

(C) Ki67 (増殖期にある細胞)、PLZF (未分化精原細胞) に対する抗体を用いた免疫組織化学染色。スケールバーは 50 $\mu$ m。

(D) Ki67 陽性となる PLZF 陽性細胞の割合をグラフで示した ( $P>0.05$ ;  $n=3$ )。

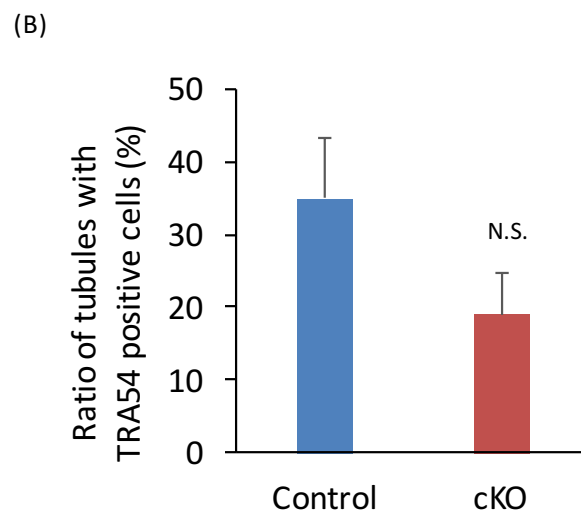
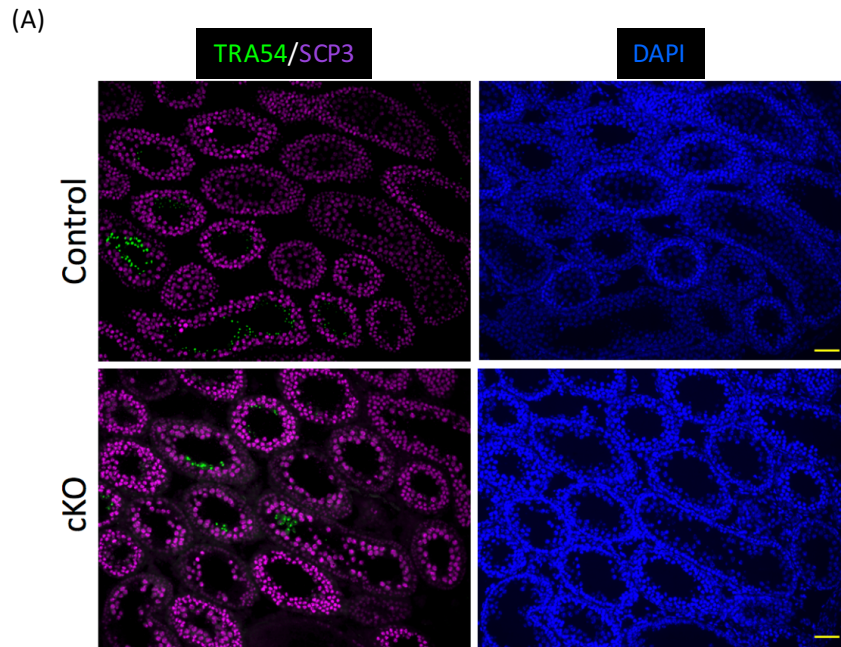


図 12 初回精子形成が進行する 3 週齢の時点では、半数体精子細胞が出現している精細管の割合に有意差はない

(A) TRA54 (半数体精子細胞)、SCP3 (第一減数分裂期の精母細胞) に対する抗体を用いた免疫組織化学染色。スケールバーは 50 $\mu$ m。

(B) TRA54 陽性細胞を含む精細管の割合をグラフで示した (P>0.05; n $\geq$ 3)。

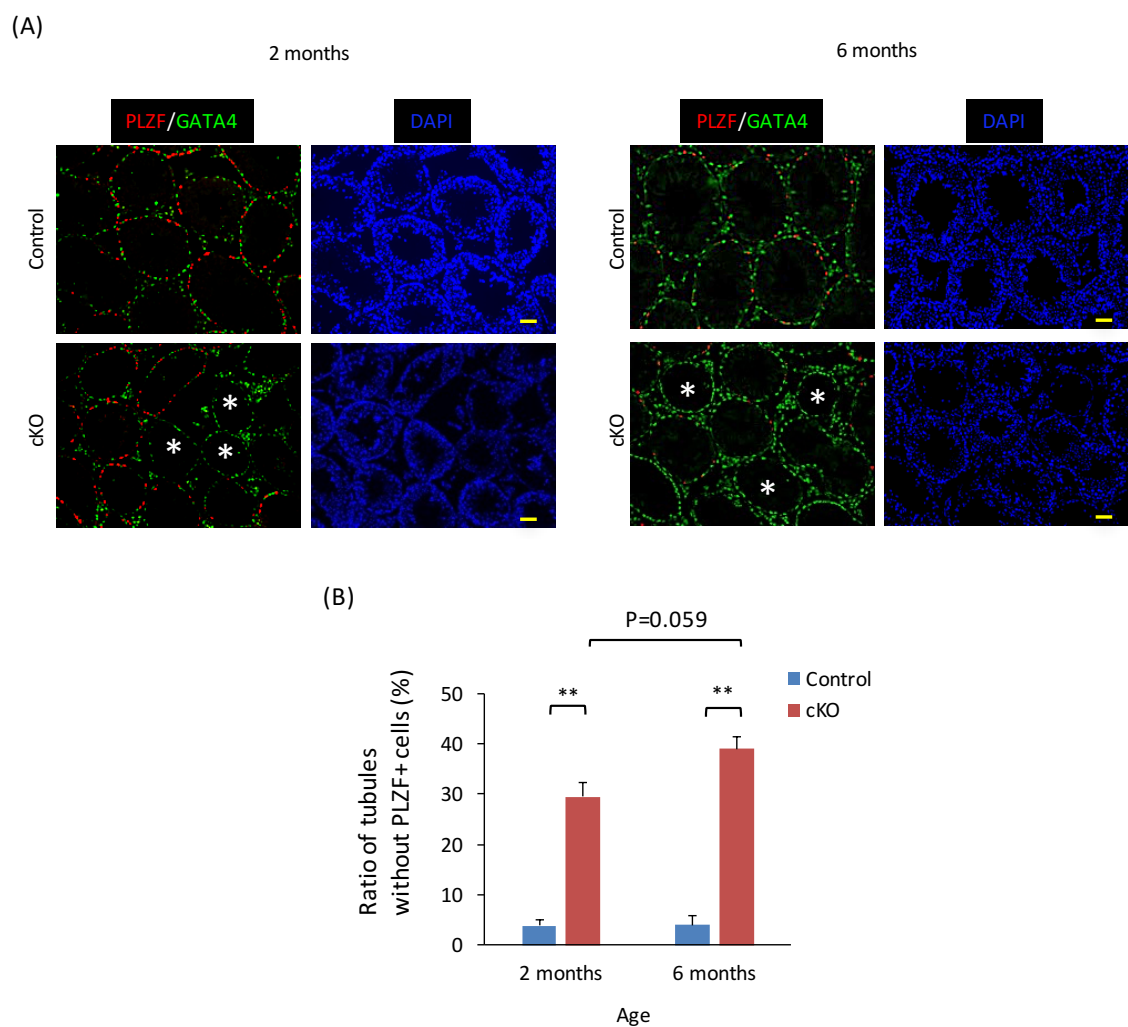


図13 cKOは加齢と共に精原細胞を含まない精細管の割合が増加する傾向にある

(A) 2ヶ月齢、6ヶ月齢のcontrol、cKOの精巣を比較するため、PLZF(未分化精原細胞)、GATA4(セルトリ細胞)に対する抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。アスタリスクはPLZF陽性細胞を含まない精細管を示す。スケールバーは50 $\mu$ m。

(B) 2ヶ月齢、6ヶ月齢のcontrol、cKOの精巣で、PLZF陽性細胞を含まない精細管の割合をグラフにした(\*\* $P < 0.01$ ,  $n = 3$ )。

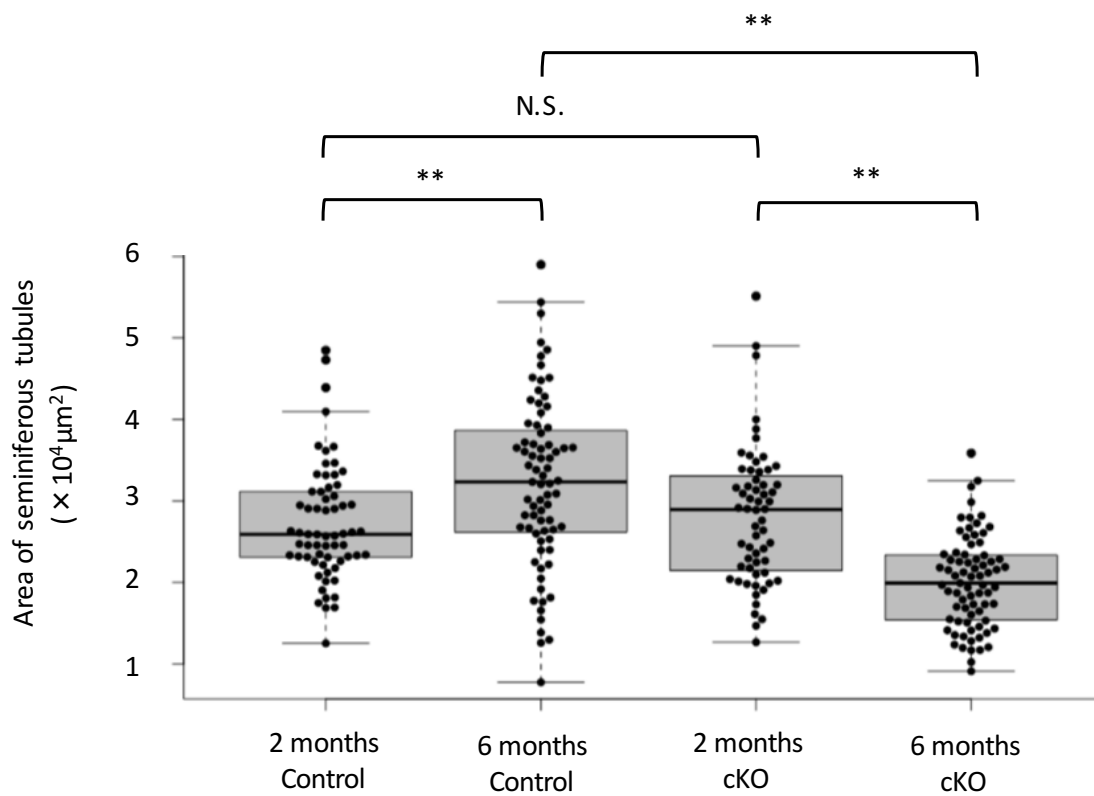


図 14 cKO は加齢と共に精細管の断面積が減少する  
 2 ヶ月齢、6 ヶ月齢の control と cKO の精細管のうち、精子形成が進行しており、かつ長径が短径の 2 倍を越えない精細管の断面積を測定しグラフにした。プロットは 1 つの精細管の断面積を示す (\*\* $P < 0.01$ ;  $n = 3$ )。



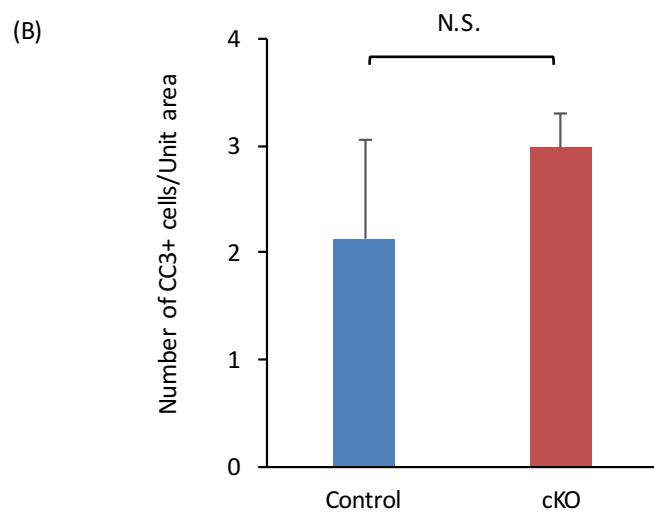
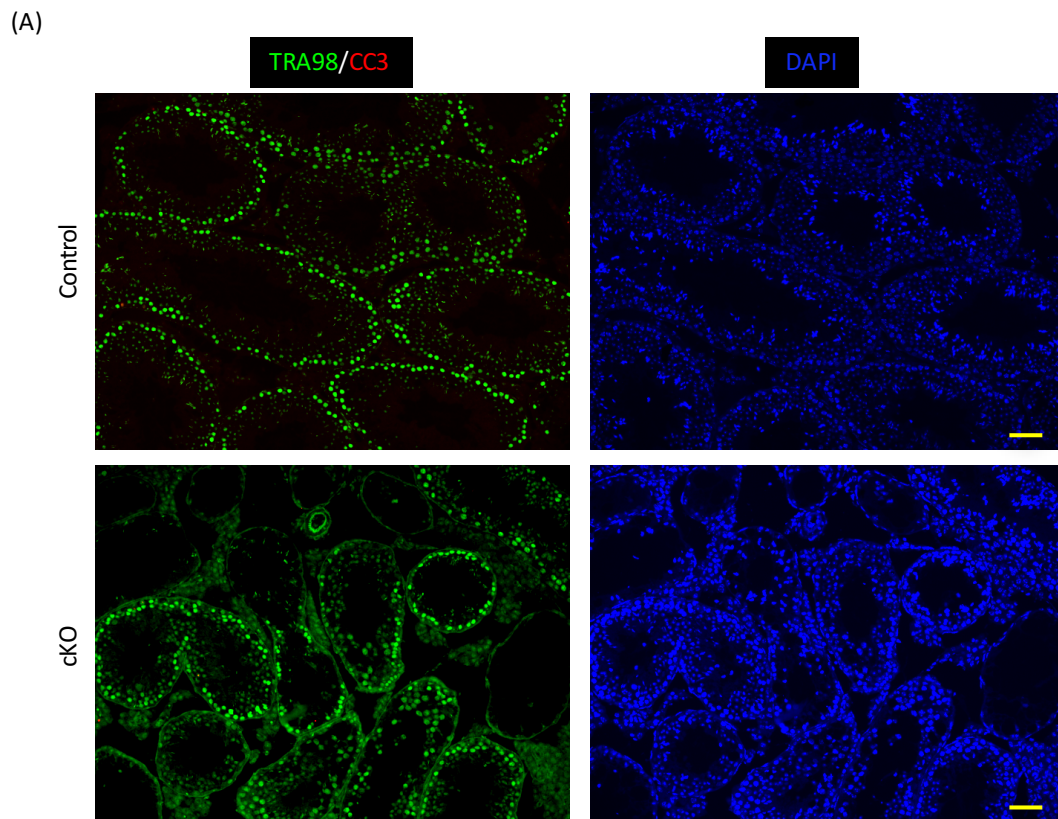


図 15 6ヶ月齢の cKO の精巣ではアポトーシスの亢進は起こっていない

(A) 6ヶ月齢の control、cKO の精巣の、TRA98 (精細胞) および CC3 に対する抗体を用いた免疫組織化学染色。スケールバーは 50 $\mu$ m。

(B) 単位面積あたりの CC3 陽性細胞数をグラフで示した ( $P>0.05$ ;  $n=3$ )。

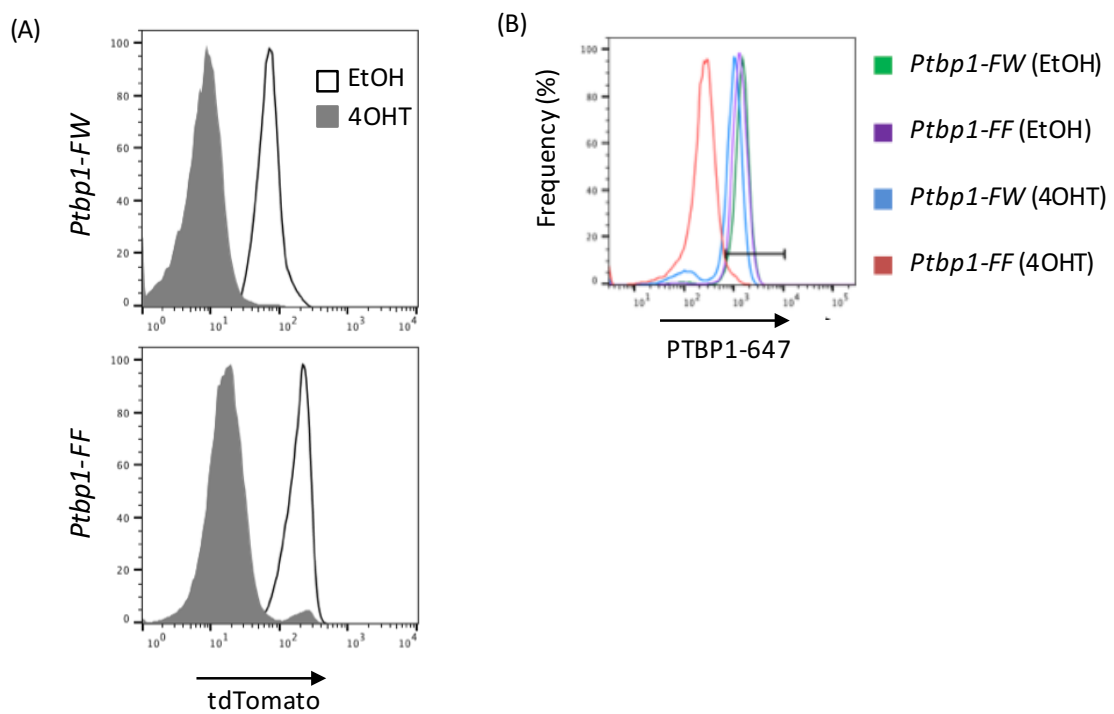
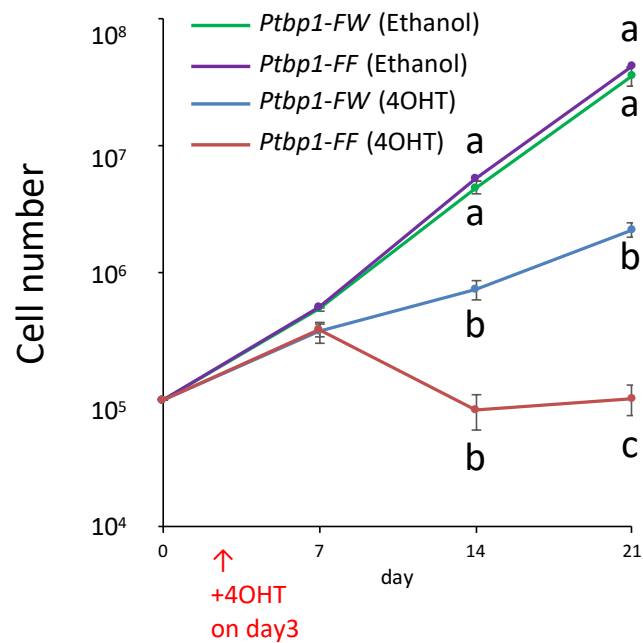


図 16 4OHT 添加により tdTomato および PTBP1 の発現が低下する

(A) *Ptbp1-FW* または *Ptbp1-FF* にそれぞれエタノール、4OHT を添加した時の tdTomato 陽性細胞の割合をフローサイトメーターにより定量し、ヒストグラムで示した。

(B) *Ptbp1-FW* または *Ptbp1-FF* にそれぞれエタノール、4OHT を添加した時の PTBP1 陽性細胞の割合をフローサイトメーターにより定量し、ヒストグラムで示した。

(A)



(B)

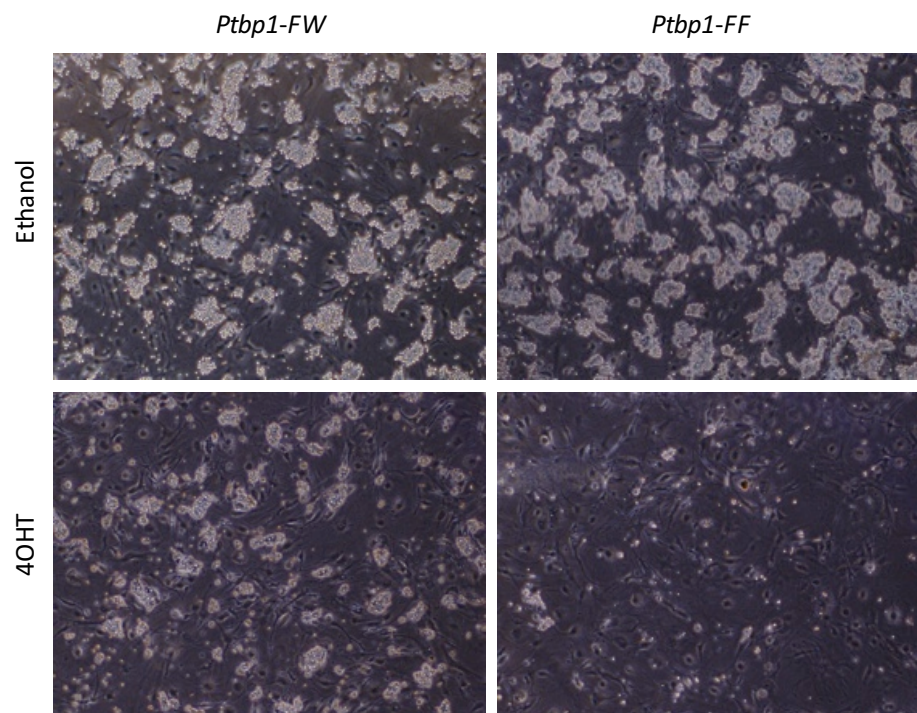


図 17 PTBP1 を欠損した GS 細胞は著しい増殖不全を示す

(A) *Ptbp1-FW* または *Ptbp1-FF* にそれぞれエタノール、4OHT を添加した場合の増殖曲線。異なる文字同士は有意差があることを示す。

(B) *Ptbp1-FW* または *Ptbp1-FF* にそれぞれエタノール、4OHT を添加し、培養した時の外観。

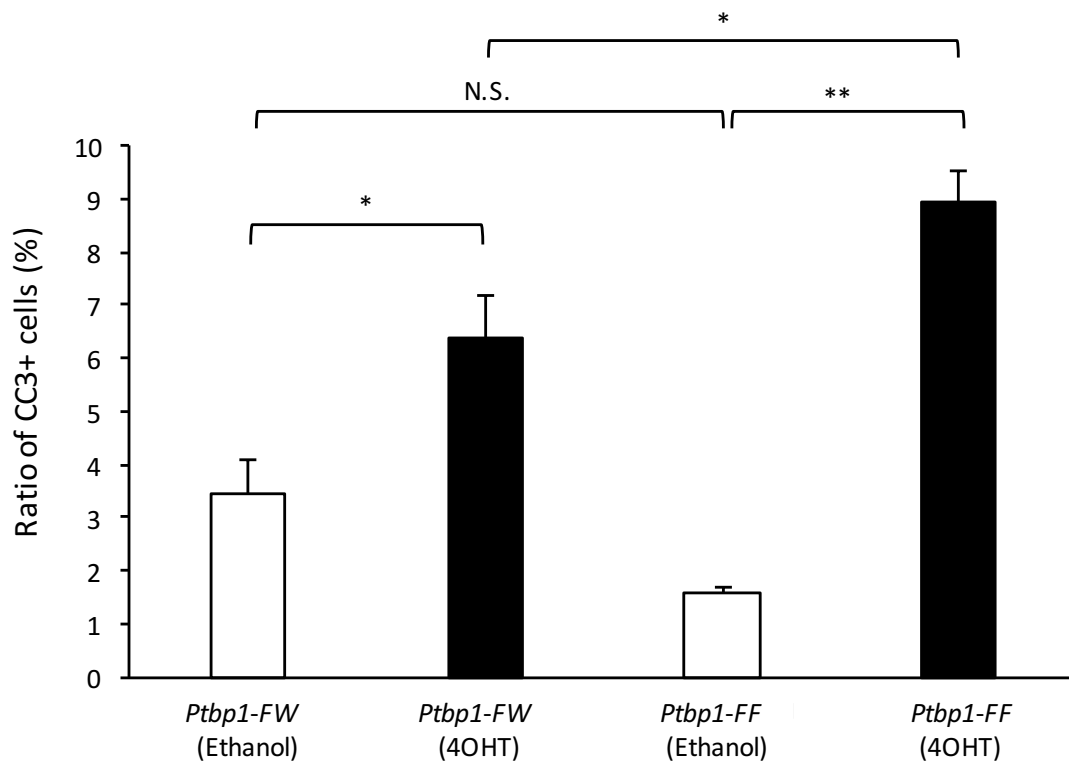


図 18 PTBP1 を欠損した GS 細胞ではアポトーシスが亢進する  
*Ptbp1-FW* または *Ptbp1-FF* にそれぞれエタノール、4OHT を添加し、フローサイトメーターにより各処理区の CC3 陽性細胞の割合を定量してグラフで示した (\*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ ;  $n \geq 4$ )。

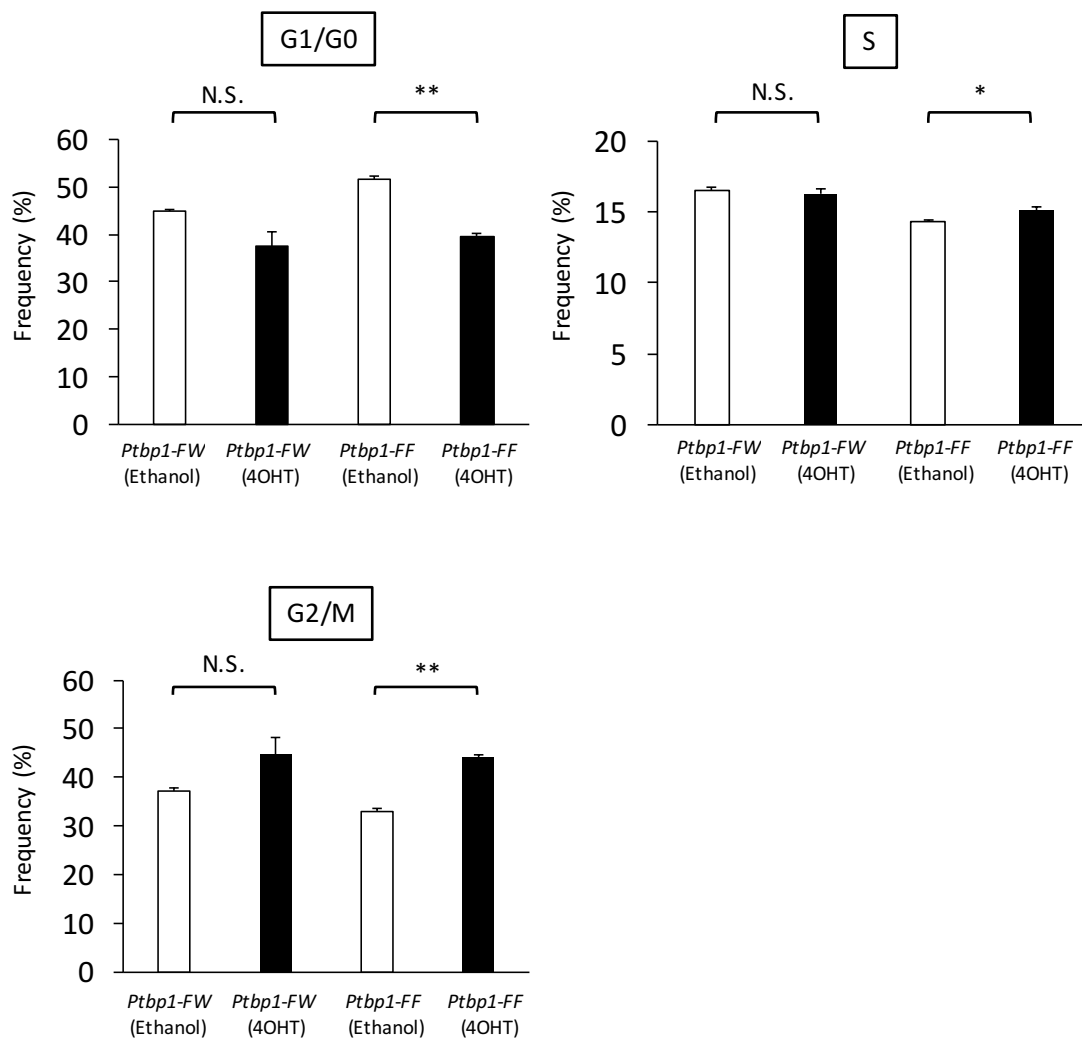


図 19 PTBP1 を欠損した GS 細胞では G2/M 期が長期化する  
 フローサイトメーターにより細胞周期の解析を行い、G1/G0 期、S 期、G2/M 期の割合をグラフで示した (\*\*P<0.01, \*P<0.05; n=3)。

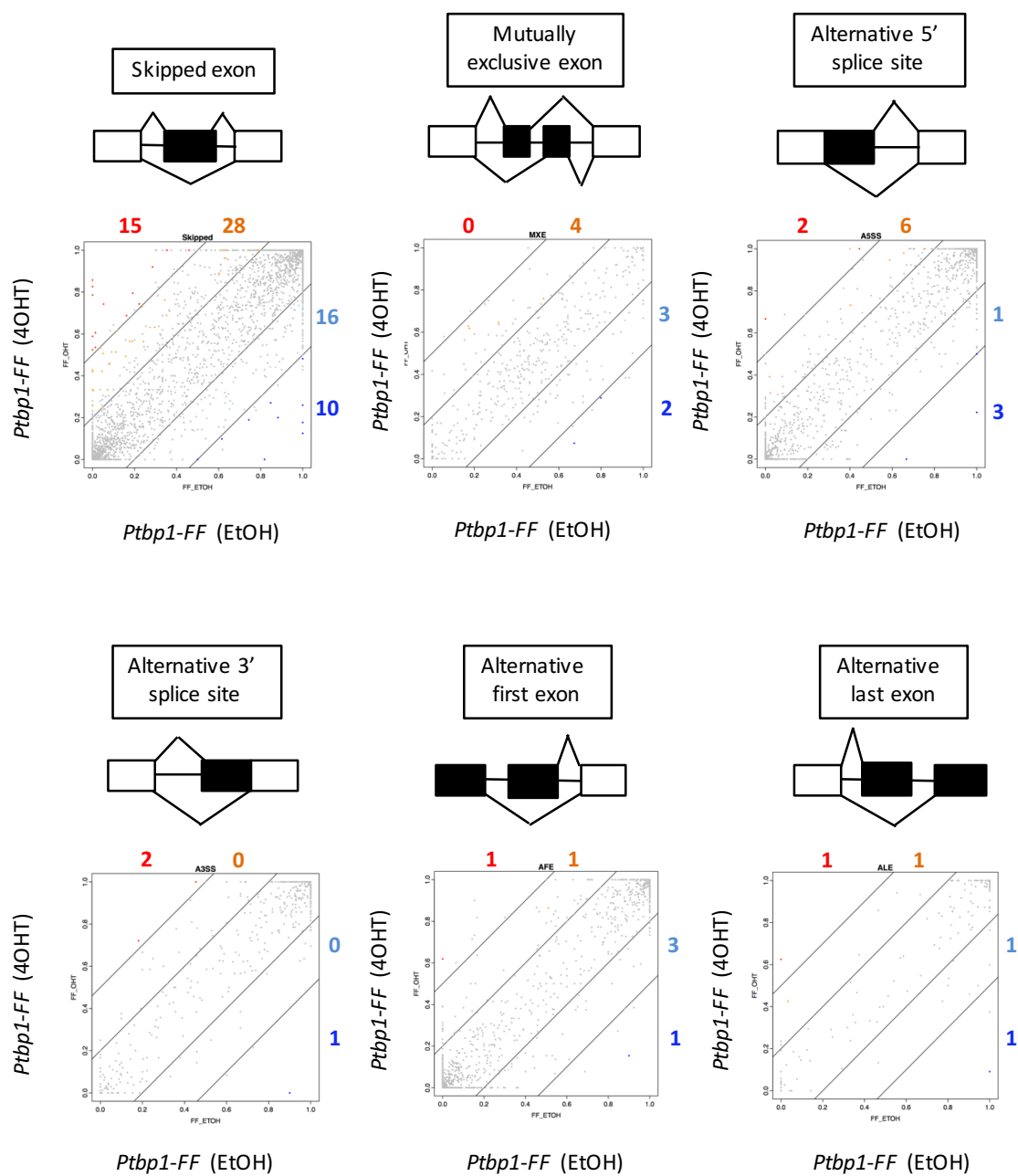


図 20 PTBP1 を欠損した GS 細胞ではエクソンスキッピングが変化する遺伝子が最多となる 6 つのタイプのスプライシング (Skipped exon、Mutually exclusive exon、Alternative 5' splice site、Alternative 3' splice site、Alternative first exon、Alternative last exon) について解析した。inclusion ratio はエクソン-エクソンジャンクションに相当するリードの数を用いて定義した。散布図において個々の点は 1 つのスプライシングイベントを表しており、縦軸と横軸はそれぞれ *Ptbp1-FF* (EtOH) と *Ptbp1-FF* (4OHT) の inclusion ratio を示している。2 つの処理区の間で inclusion ratio の差が 0.2 以上でありかつ統計的有意であるプロットには色を付けた。図中の数字は散布図において同色で示した点の数を表す。文字およびプロットの色が赤色または青色の場合 inclusion ratio の差が 0.5 以上であることを示す。またオレンジ色または水色の場合、inclusion ratio の差が 0.2 以上 0.5 未満であることを示す。

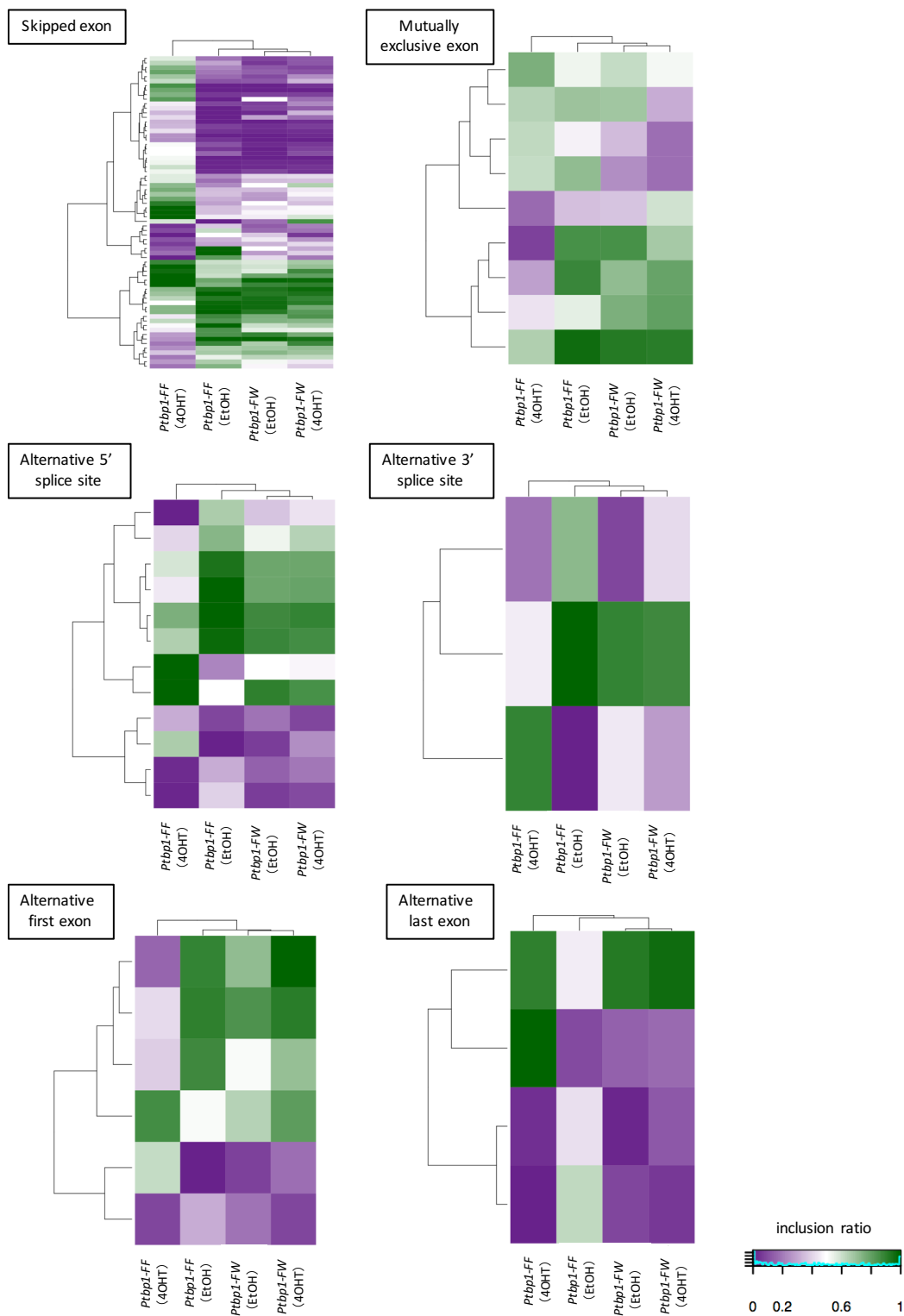


図 21 PTBP1 を欠損した GS 細胞ではスプライシングパターンが大きく変動する inclusion ratio を元にした *Ptbp1-FW* (EtOH)、*Ptbp1-FW* (4OHT)、*Ptbp1-FF* (EtOH)、*Ptbp1-FF* (4OHT) のスプライシングパターンが有意に変動した遺伝子 (inclusion ratio の差が 0.2 以上、FDR $\leq$ 0.05) のクラスタリング解析。各行は 1 つのスプライシングイベントを示す。inclusion ratio は凡例に従った色で表した。

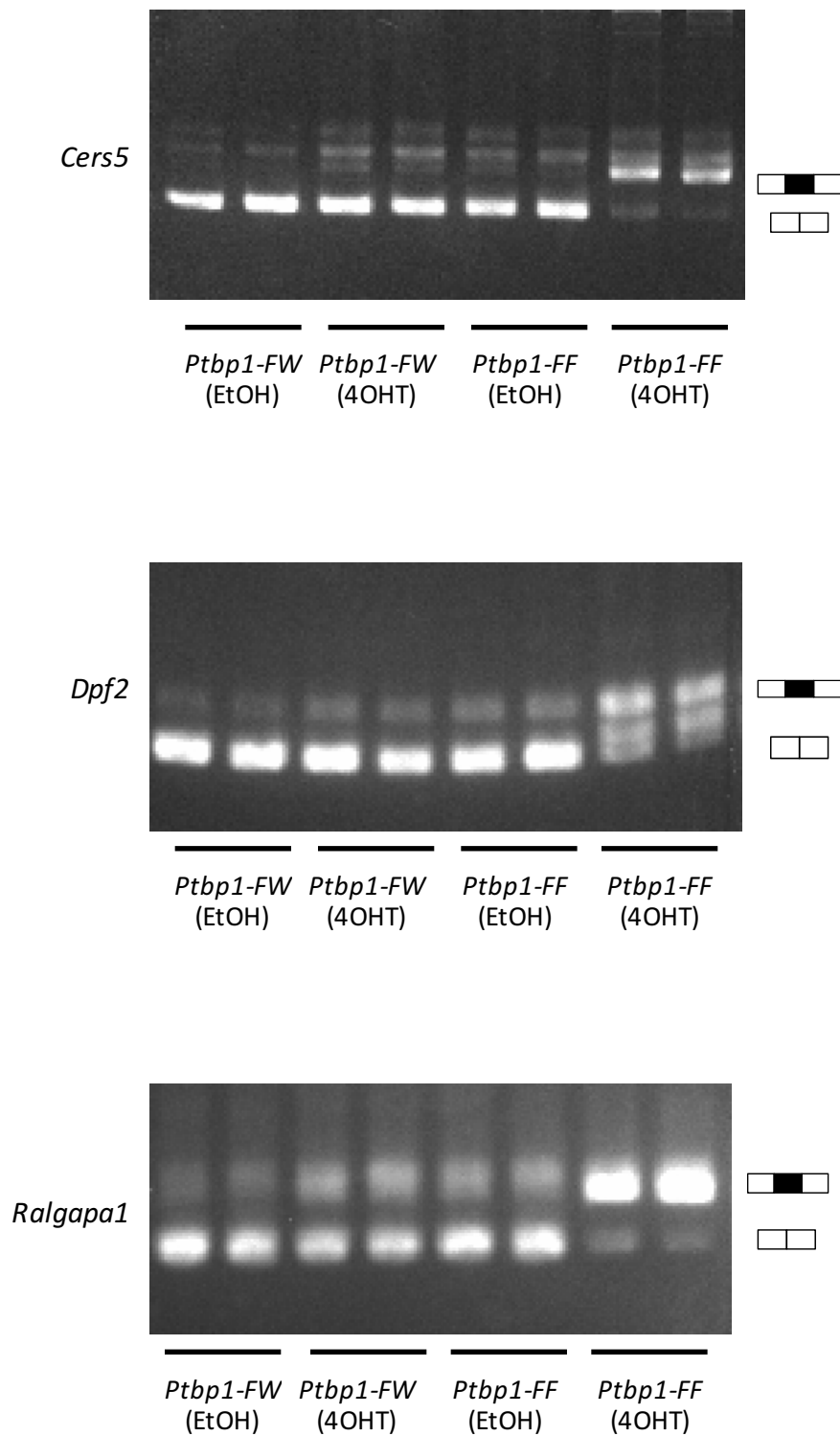


図 22 選択的スプライシングに変動があった遺伝子の RT-PCR によるバリデーション  
*Cers5*、*Dpf2*、*Ralgapa1* について、*Ptbp1-FF* (4OHT) でスキッピングが起こらなかったエクソンを挟むようにプライマーを設計し 2 反復ずつ RT-PCR を行った。



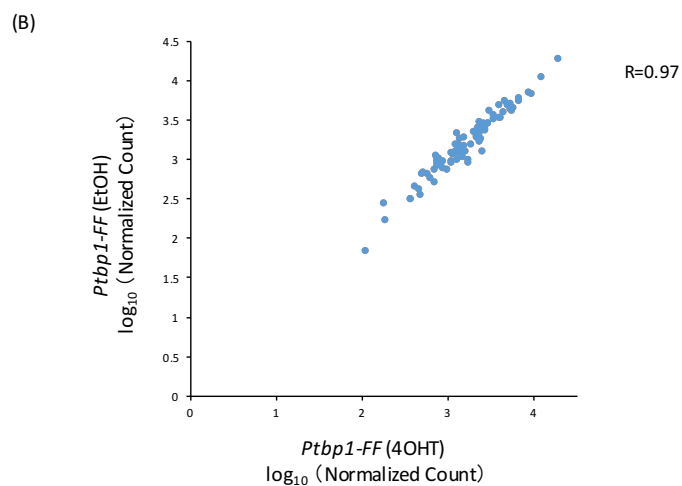
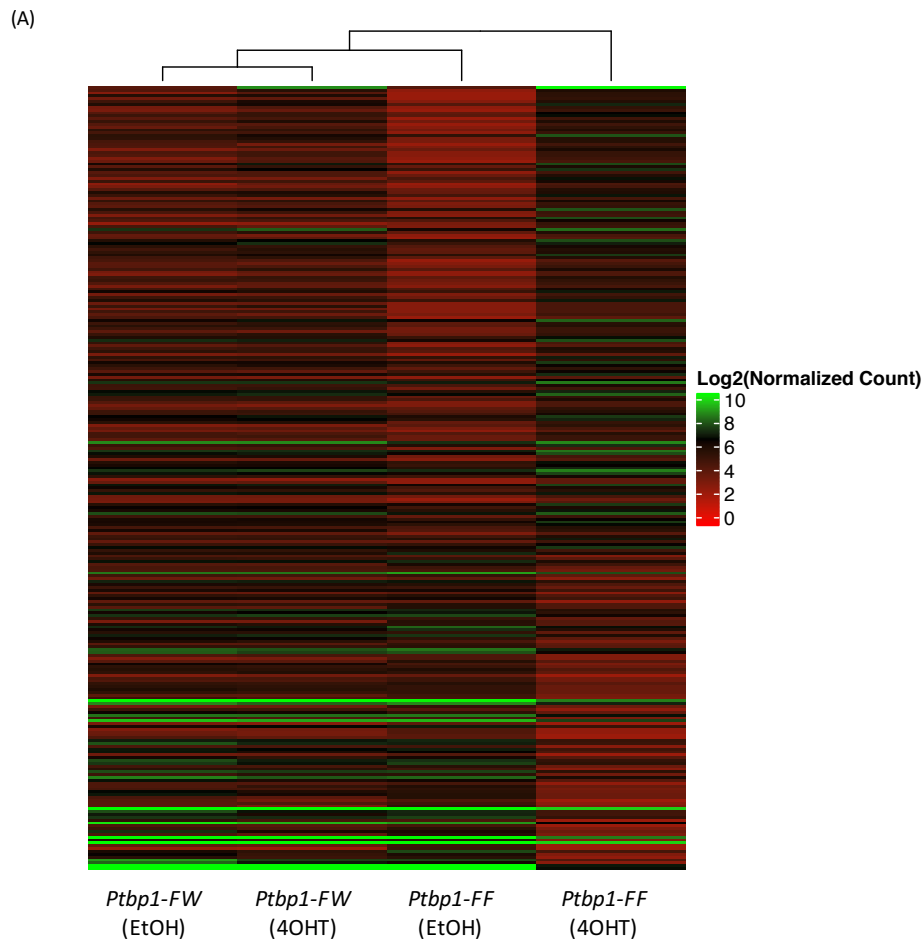
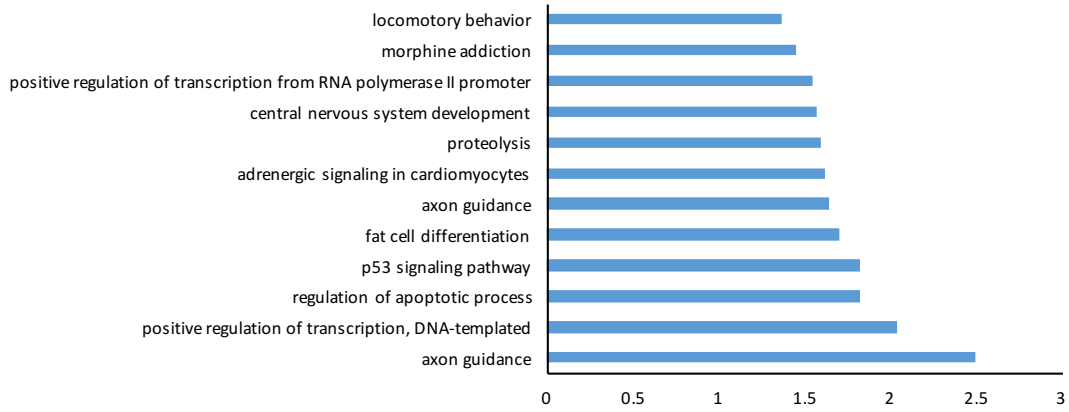


図 23 PTBP1 を欠損した GS 細胞では遺伝子発現パターンが大きく変化する

(A) *Ptp1-FF* (EtOH) と *Ptp1-FF* (4OHT) の比較で 2 倍以上の発現差があった遺伝子についてのクラスタリング解析を行った。

(B) 選択的スプライシングに有意な変化があった遺伝子について、その発現量を *Ptp1-FF* (EtOH) と *Ptp1-FF* (4OHT) で比較した。

>2-fold Upregulated



>2-fold Downregulated

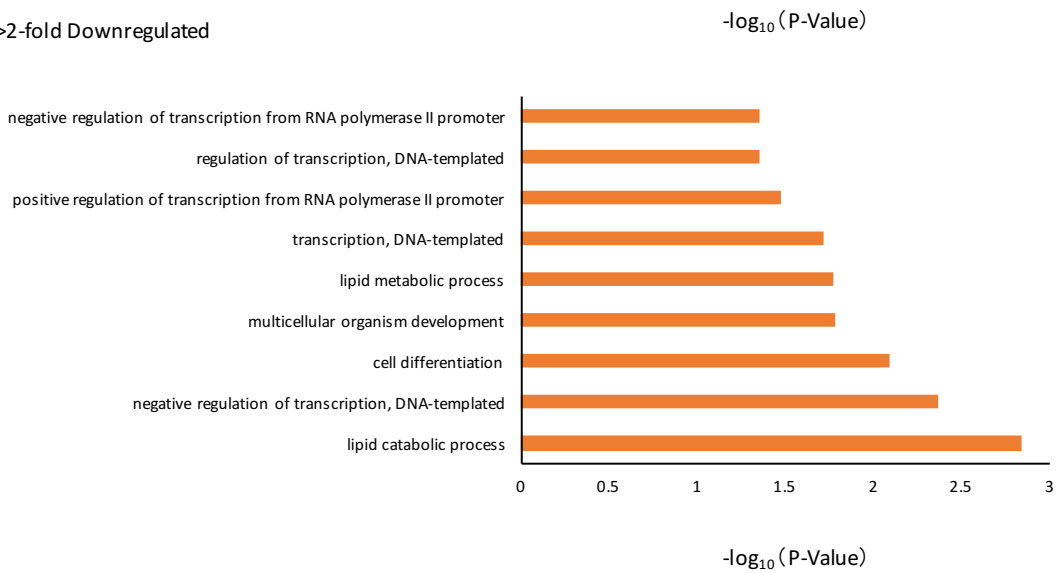


図 24 PTBP 1 欠損により遺伝子発現が変動した遺伝子の Gene Ontology 解析

GS 細胞を用いた RNA-seq の結果、PTBP1 欠損により発現上昇した遺伝子 163 個、および発現低下した遺伝子 113 個について DAVID を用いて Gene Ontology 解析を行い、 $P < 0.05$  であったタームの P 値を示した。

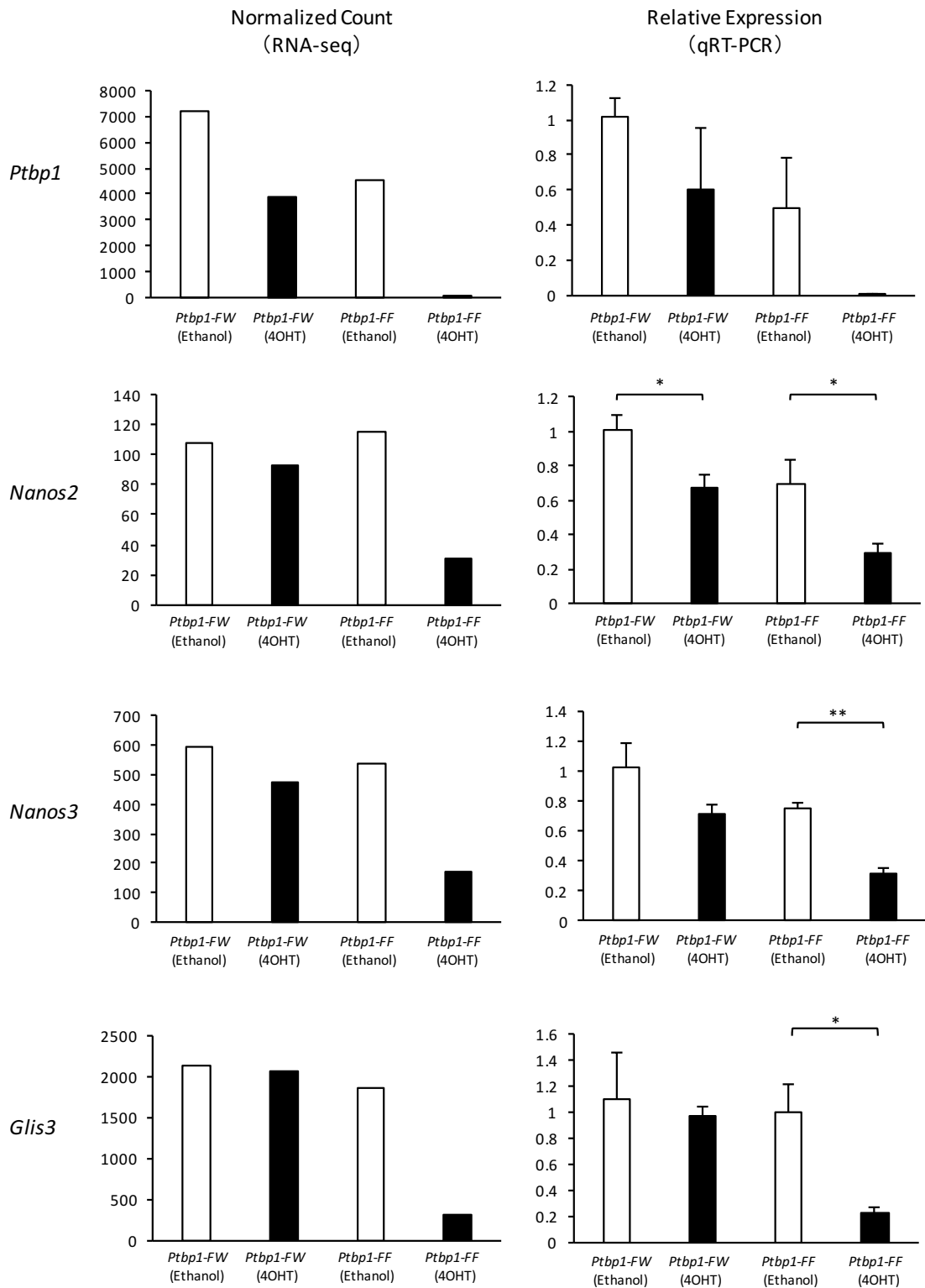
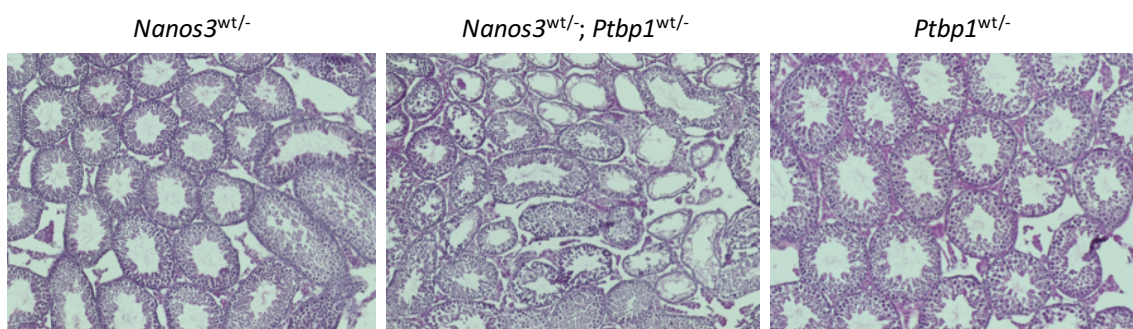


図 25 PTBP1 欠損に起因して精子形成に極めて重要な遺伝子の発現が低下する *Nanos2*、*Nanos3*、*Glis3* の発現量を qRT-PCR により確認した。内在性コントロールには *Gapdh* を使い、*Ptbp1-FW* (EtOH) の発現量を 1 とした場合の相対値を示した (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ;  $n \geq 3$ )。

(A)



(B)

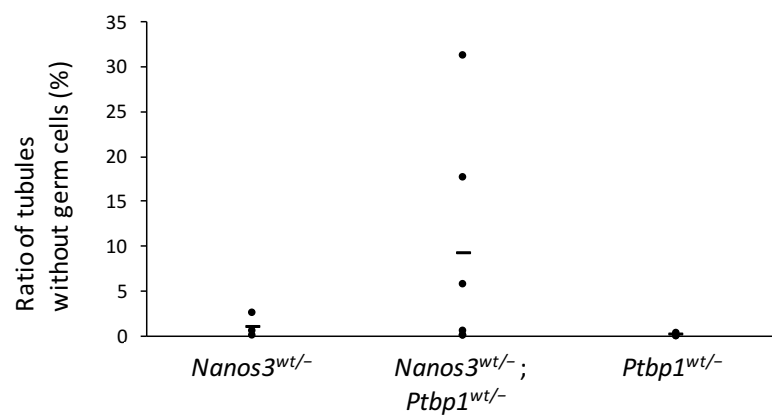


図 26 *Nanos3<sup>wt/-</sup>; Ptbp1<sup>wt/-</sup>* マウスでは精子形成異常が生じる

(A) 5 週齢のマウスの精巣の HE 染色により精子形成の進行を確認した。

(B) 精細胞を含まない精細管の割合を定量し、グラフで示した。

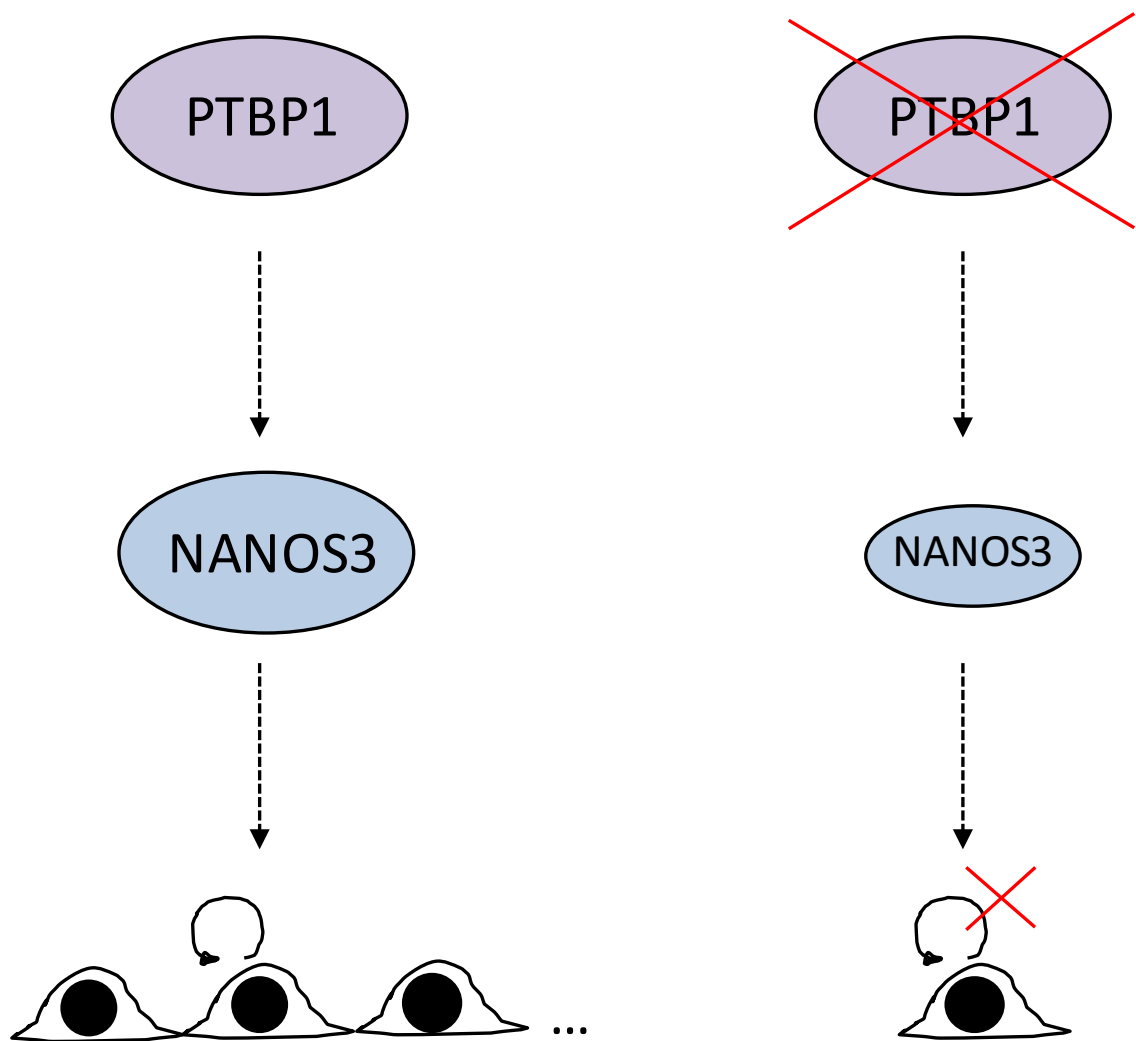


図 27 予想される PTBP1 による精子形成の制御メカニズムの模式図  
*Nanos3*、*Ptbp1* の両遺伝子をヘテロ欠損したマウスの HE 染色の結果から、PTBP1 が下流で NANOS3 の発現量を調節し、精原細胞の増殖性を正に制御している可能性が示唆される。

表1 qRT-PCR に用いたプライマー

Gene	Fw/Rv	Sequence (5'→3')
<i>Ptbp1</i>	Fw	GGTCTCTTCCGTGTGCCATG
<i>Ptbp1</i>	Rv	AGGTGACAACAGGAGCGCAG
<i>Gapdh</i>	Fw	ATGAATACGGCTACAGCAACAGG
<i>Gapdh</i>	Rv	CTCTTGCTCAGTGTCCCTTGCTG
<i>Nanos2</i>	Fw	CTGCAAGCACAATGGGGAGT
<i>Nanos2</i>	Rv	CGTCGGTAGAGAGACTGCTG
<i>Nanos3</i>	Fw	CACTACGGCCTAGGAGCTTGG
<i>Nanos3</i>	Rv	TGATCGCTGACAAGACTGTGGC
<i>Glis3</i>	Fw	CCATGTCCACGGATTTTATGG
<i>Glis3</i>	Rv	CACAGTTCTTTGGGAATCAGGAT

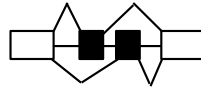
表 2 RT-PCR に用いたプライマー

Gene	Fw/Rv	Sequence (5'→3')
<i>Cers5</i>	Fw	CCTACCCTTCCTGGTGGCTCTTC
<i>Cers5</i>	Rv	GGTTGCCAGTGGCTTTACAAGTC
<i>Dpf2</i>	Fw	AACCCGATGACTTCCTTGATGACC
<i>Dpf2</i>	Rv	TTTCTGCTCCTCAGACCTCTGG
<i>Ralgapa1</i>	Fw	CAGGAACTGAGAAGGCCAGG
<i>Ralgapa1</i>	Rv	TGGCTCGCTCAACAGTGAAT



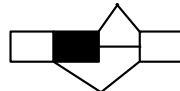


### Mutually exclusive exon



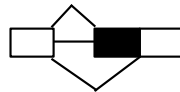
Gene	chr	Pos1	Pos2	Pos3	Pos4	Pos5	Pos6	Ptbp1-FF (EtOH) ratio	Ptbp1-FF (4OHT) ratio	p-value	FDR	inclusion ratio
<i>Tnnd2</i>	chr15	18426560	18429810	18429877	18436560	18436618	18437501	0.171428571	0.62962963	0.000430515	0.048920232	0.458201058
<i>Sar1a</i>	chr10	61680414	61682098	61682149	61684060	61684188	61684879	0.176470588	0.617647059	0.000415578	0.047603802	0.441176471
<i>Pirc2c</i>	chr1	162676690	162675842	162675604	162674152	162674098	162673657	0.314285714	0.646153846	0.000142279	0.020834355	0.331868132
<i>Pkm</i>	chr9	59672074	59675028	59675196	59675567	59675735	59678043	0.527528809	0.758810573	2.46989E-23	1.16941E-19	0.231281763
<i>Actn4</i>	chr7	28896088	28895513	28895431	28895187	28895120	28894660	0.913194444	0.655660377	8.63996E-13	1.20134E-09	-0.257534067
<i>Mapk14</i>	chr17	28728976	28737010	28737091	28740679	28740760	28741787	0.803030303	0.438596491	3.39738E-05	0.007003541	-0.364433812
<i>Esc1</i>	chr18	10596338	10595876	10595675	10588551	10588438	10586042	0.596153846	0.169811321	7.74305E-06	0.002340049	-0.426342525
<i>Actn4</i>	chr7	28912239	28911576	28911489	28909989	28909902	28907065	0.799107143	0.288888889	1.34023E-25	1.90366E-21	-0.510218254
<i>Tpm1</i>	chr9	67032793	67032542	67032465	67032027	67031950	67031515	0.673076923	0.073170732	6.16198E-18	1.45875E-14	-0.599906191

### Alternative 5' splice site



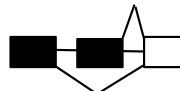
Gene	chr	Pos1	Pos2	Pos3	Ptbp1-FF (EtOH) ratio	Ptbp1-FF (4OHT) ratio	p-value	FDR	inclusion ratio
<i>Anapc13</i>	chr9	102626347	102626688	102629762	0	0.666666667	0.000160039	0.022732002	0.666666667
<i>Aldh18a1</i>	chr19	40574216	40574210	40573862	0.444444444	1	5.3201E-05	0.01021172	0.555555556
<i>Scrib</i>	chr15	76048114	76047921	76047673	0.018867925	0.391304348	2.54291E-06	0.001088744	0.372436423
<i>Clsn</i>	chr4	126557126	126557138	126559207	0.588235294	0.945945946	0.000415168	0.047603802	0.357710652
<i>Cbfb</i>	chr8	105202548	105202579	105215903	0.402439024	0.732394366	4.55394E-05	0.008983918	0.329955342
<i>Racd1</i>	chr1	74506215	74506462	74517069	0.654545455	0.98	1.03011E-05	0.002813789	0.325454545
<i>Nup98</i>	chr7	102180427	102180376	102176406	0.022222222	0.314285714	6.99261E-05	0.012262107	0.292063492
<i>Neur14</i>	chr11	69903453	69903720	69903864	0.755102041	1	9.98125E-05	0.015618396	0.244897959
<i>Txn14a</i>	chr18	80206902	80207062	80207153	0.316666667	0.085271318	4.99767E-06	0.001690164	-0.231395349
<i>Rpl26</i>	chr11	68901758	68901813	68902269	1	0.5	1.66698E-06	0.000763802	-0.5
<i>Vrk1</i>	chr12	106070616	106071642	106073618	0.666666667	0	6.35241E-06	0.002051004	-0.666666667
<i>Lrrc14</i>	chr15	76710928	76711531	76712866	1	0.222222222	1.91076E-05	0.004600072	-0.777777778

### Alternative 3' splice site



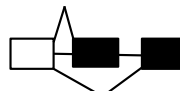
Gene	chr	Pos1	Pos2	Pos3	Ptbp1-FF (EtOH) ratio	Ptbp1-FF (4OHT) ratio	p-value	FDR	inclusion ratio
<i>Map4k4</i>	chr1	40000750	40003756	40003762	0.454545455	1	0.000236552	0.03199982	0.545454545
<i>Enah</i>	chr1	181923559	181922501	181921769	0.181818182	0.720930233	5.26006E-05	0.01021172	0.539112051
<i>Iffo1</i>	chr6	125151526	125151794	125152613	0.9	0	3.40217E-05	0.007003541	-0.9

### Alternative first exon



Gene	chr	Pos1	Pos2	Pos3	Ptbp1-FF (EtOH) ratio	Ptbp1-FF (4OHT) ratio	p-value	FDR	inclusion ratio
<i>Cdc7</i>	chr5	106964426	106964834	106964932	0	0.619047619	6.80062E-05	0.012074508	0.619047619
<i>Rely</i>	chr2	154791232	154791549	154857268	0.510638298	0.863636364	0.000325378	0.039842009	0.352998066
<i>AC131065.2</i>	chr18	80206902	80207062	80207153	0.316666667	0.085271318	4.99767E-06	0.001690164	-0.231395349
<i>Dnnd2</i>	chr2	164486244	164487005	164488241	0.906976744	0.411764706	0.000147499	0.021378308	-0.495212038
<i>Ldb1</i>	chr19	46044829	46039054	46036366	0.877192982	0.380952381	2.94183E-05	0.00648196	-0.496240602
<i>Numa1</i>	chr7	101969970	101970355	101977379	0.9	0.153846154	2.63117E-05	0.005932251	-0.746153846

### Alternative last exon



Gene	chr	Pos1	Pos2	Pos3	Ptbp1-FF (EtOH) ratio	Ptbp1-FF (4OHT) ratio	p-value	FDR	inclusion ratio
<i>Cers5</i>	chr15	99738664	99737654	99736437	0	0.625	2.3065E-09	1.56007E-06	0.625
<i>H13</i>	chr2	152700269	152703994	152704621	0.032258065	0.425	0.000100062	0.015618396	0.392741935
<i>Morf4l2</i>	chrX	136739804	136735623	136734502	0.902439024	0.459459459	2.43659E-05	0.005582144	-0.442979565
<i>Blvra</i>	chr2	127086943	127090243	127092038	1	0.090909091	3.40217E-05	0.007003541	-0.909090909



>2-fold Downregulated

Gene	Ptbp1-FF (EtOH)	Ptbp1-FF (4OHT)	fold change
<i>Adnp</i>	58.76060244	28.27373701	0.481168263
<i>Ada</i>	133.0428735	63.87770214	0.480128702
<i>Slc22a4</i>	17.73904979	8.377403559	0.47225774
<i>Ptar1</i>	38.80417143	17.80198256	0.458764661
<i>Bend5</i>	135.2602547	61.78335125	0.456773879
<i>Xpa</i>	66.52143673	30.3680879	0.456515815
<i>Khdrbs2</i>	32.15202775	14.66045623	0.45597299
<i>Bhlha15</i>	25.49988408	11.51892989	0.451724794
<i>Phf11c</i>	443.4762449	198.9633345	0.448644853
<i>DeI8</i>	37.69548081	16.75480712	0.444477873
<i>RP24-228M19.1</i>	16.63035918	7.330228114	0.44077389
<i>RspH1</i>	105.3256082	46.0751957	0.437459801
<i>Nrgn</i>	50.99976816	21.99068434	0.431191849
<i>Isoc2b</i>	32.15202775	13.61328078	0.423403491
<i>Hmx1</i>	72.06488979	30.3680879	0.421399214
<i>RP24-300N16.3</i>	17.73904979	7.330228114	0.413225522
<i>MyI4</i>	50.99976816	20.9435089	0.410658904
<i>Klhl32</i>	74.28227101	30.3680879	0.408820133
<i>Hist1h2bj</i>	15.52166857	6.283052669	0.404792348
<i>NgB</i>	54.32584	21.99068434	0.404792348
<i>Prelid2</i>	54.32584	21.99068434	0.404792348
<i>Zc3h12a</i>	129.7168016	52.35877224	0.403639094
<i>Gjb2</i>	106.4342988	42.93419324	0.403386819
<i>Msx2</i>	185.1513322	74.34945659	0.401560473
<i>Iack</i>	36.5867902	14.66045623	0.400703537
<i>Pla2g2d</i>	49.89107755	19.89633345	0.398795424
<i>Il3ra</i>	47.67369632	18.84915801	0.395378573
<i>Cplx2</i>	249.4553877	98.43449182	0.394597578
<i>Zfp819</i>	140.8037077	55.50029858	0.394167877
<i>RP23-303F24.3</i>	39.91286204	15.70763167	0.393548116
<i>Spata24</i>	151.8906139	59.68900036	0.392973593
<i>Cd6</i>	43.23893387	16.75480712	0.38749353
<i>Rgs9</i>	24.39119347	9.424579004	0.386392696
<i>Dffb</i>	41.02155265	15.70763167	0.382911681
<i>Myo5b</i>	46.56500571	17.80198256	0.382303884
<i>Nudt14</i>	294.9117028	112.0477726	0.379936678
<i>Hes5</i>	207.3251445	78.53815836	0.378816369
<i>Ak5</i>	22.17381224	8.377403559	0.377806192
<i>Mmp28</i>	22.17381224	8.377403559	0.377806192
<i>Cfap57</i>	50.99976816	18.84915801	0.369593014
<i>Cfap53</i>	25.49988408	9.424579004	0.369593014
<i>Gja3</i>	34.36940898	12.56610534	0.365618895
<i>St8sia5</i>	57.65191183	20.9435089	0.363275184
<i>Zmynd15</i>	43.23893387	15.70763167	0.363275184
<i>Defb36</i>	14.41297796	5.235877224	0.363275184
<i>Bdkrb2</i>	32.15202775	11.51892989	0.358264492
<i>Pnpla1</i>	32.15202775	11.51892989	0.358264492
<i>Atp4a</i>	38.80417143	13.61328078	0.350820035
<i>Efcab10</i>	38.80417143	13.61328078	0.350820035
<i>Fam169b</i>	38.80417143	13.61328078	0.350820035
<i>Gm10130</i>	29.93464653	10.47175445	0.349820548
<i>RP23-228A20.3</i>	27.7172653	9.424579004	0.340025573
<i>Dnmt3b</i>	962.3434513	323.5772125	0.336238805
<i>RP23-41J14.2</i>	364.7592114	122.519527	0.335891523

Gene	Ptbp1-FF (EtOH)	Ptbp1-FF (4OHT)	fold change
<i>Slc44a3</i>	37.69548081	12.56610534	0.333358405
<i>Crybb3</i>	18.84774041	6.283052669	0.333358404
<i>Ripk1</i>	44.34762449	14.66045623	0.330580418
<i>B3gnt7</i>	304.8899183	100.5288427	0.329721767
<i>Fibcd1</i>	28.82595592	9.424579004	0.326947666
<i>Nanos3</i>	539.9323281	172.7839484	0.320010378
<i>Pla1a</i>	16.63035918	5.235877224	0.314838493
<i>Arrb1</i>	109.7603706	34.55678968	0.314838493
<i>Cpne8</i>	21.06512163	6.283052669	0.298268046
<i>Morn5</i>	21.06512163	6.283052669	0.298268046
<i>Kcnn4</i>	17.73904979	5.235877224	0.295161087
<i>Pla2g10</i>	17.73904979	5.235877224	0.295161087
<i>Fam83f</i>	128.608111	35.60396513	0.276840744
<i>Reck</i>	117.5212049	32.46243879	0.276226225
<i>Igdcc4</i>	27.7172653	7.330228114	0.264464334
<i>Nanos2</i>	115.3038237	30.3680879	0.263374509
<i>Bcl7a</i>	87.58655836	23.03785979	0.263029627
<i>Baiap2l2</i>	19.95643102	5.235877224	0.262365411
<i>Sp5</i>	72.06488979	18.84915801	0.261558133
<i>Scd3</i>	144.1297796	37.69831601	0.261558133
<i>Ttc23</i>	174.0644261	45.02854413	0.258688953
<i>Gm26620</i>	48.78238693	12.56610534	0.257595131
<i>Cxcl16</i>	28.82595592	7.330228114	0.254292629
<i>Fam163b</i>	177.3904979	45.02854413	0.253838535
<i>Scml4</i>	45.4563151	11.51892989	0.253406592
<i>Pcp4l1</i>	257.216222	63.87770214	0.248342432
<i>Fam187b</i>	76.49965224	18.84915801	0.246395342
<i>Dmbx1</i>	25.49988408	6.283052669	0.246395342
<i>Trim9</i>	55.43453061	13.61328078	0.245574025
<i>RP23-191I16.2</i>	43.23893387	10.47175445	0.242183456
<i>Tmsf5</i>	47.67369632	11.51892989	0.241620239
<i>Tph1</i>	52.10845877	12.56610534	0.241152888
<i>Vdr</i>	52.10845877	12.56610534	0.241152888
<i>Meig1</i>	22.17381224	5.235877224	0.23612887
<i>Glb1l3</i>	31.04333714	7.330228114	0.23612887
<i>Ramp1</i>	41.02155265	9.424579004	0.229747008
<i>Flnb</i>	2952.4431	677.5225128	0.229478601
<i>Lmo1</i>	128.608111	29.32091246	0.227986495
<i>Slit1</i>	124.1733486	28.27373701	0.227695696
<i>RP23-124N16.6</i>	172.9557355	37.69831601	0.217965111
<i>Wfdc10</i>	24.39119347	5.235877224	0.214662609
<i>Galnt12</i>	406.8894547	86.91556192	0.213609768
<i>Cerkl</i>	25.49988408	5.235877224	0.205329452
<i>Sp7</i>	47.67369632	9.424579004	0.197689286
<i>Alox12e</i>	64.3040555	12.56610534	0.195416996
<i>Kctd14</i>	49.89107755	9.424579004	0.188903096
<i>Glis3</i>	1865.9263	321.4828616	0.172291297
<i>Faim2</i>	49.89107755	8.377403559	0.167913863
<i>Flna</i>	4241.850282	696.3716708	0.164166961
<i>Aqp6</i>	32.15202775	5.235877224	0.162847496
<i>Caln1</i>	33.26071836	5.235877224	0.157419247
<i>Vwf</i>	187.3687135	26.17938612	0.139721225
<i>Aspg</i>	63.19536489	8.377403559	0.132563576
<i>Tekt1</i>	48.78238693	6.283052669	0.128797565
<i>RP23-345D6.8-1</i>	180.7165698	20.9435089	0.11589147
<i>Tdh</i>	74.28227101	7.330228114	0.098680722
<i>Fmnl3</i>	1112.016684	107.8590708	0.096994112
<i>Ptbp1</i>	4540.088057	98.43449182	0.021681186

## 考察

本研究では、精子形成における選択的スプライシング制御因子 PTBP1 の機能に注目し、精原細胞において PTBP1 を欠損するモデルマウスを用いた表現型の解析を行った。その結果、cKO マウスは繁殖能力を有していたものの、2 ヶ月齢の cKO の精巣重量および精子数は control と比較して有意に低下しており、精細胞が枯渇した精細管が多数観察された。また、PTBP1 欠損に起因した精細胞の増殖不全は遅くとも出生後 5 日目までに顕著になることが明らかになった。更に、精原幹細胞の体外培養系、GS 細胞において PTBP1 を後発的に欠損した結果、GS 細胞の著しい増殖不全が確認された。PTBP1 を欠損した GS 細胞を RNA-seq に供した結果、多くの遺伝子で発現変動が起こること（上昇 163 遺伝子、低下 113 遺伝子）、並びに 85 個の遺伝子において選択的スプライシングに変化が生じていることが明らかになった。以上の結果から、PTBP1 は精原細胞の増殖性を正に調節することで、持続的精子形成の維持に寄与することが示され、その分子基盤に PTBP1 を介した選択的スプライシングの変化が関与することが示唆された。

### 生殖細胞における選択的スプライシング制御因子ノックアウトマウス

精子形成において、選択的スプライシングは特に体細胞分裂期から減数分裂期へと移行する時期に大きく変動することが知られており、各発生段階特異的なスプライシングアイソフォームが発現することで細胞の機能維持、および分化に重要な役割を果たしていることが示唆される (Hannigan et al., 2017)。PTBP1 の発現は精原細胞の時期に一過性で高く、分化が進むにつれて減弱する (図 5)。加えて、PTBP1 欠損 GS 細胞では多くの遺伝子においてスプライシングアイソフォームの変化が確認されていることから (表 3)、PTBP1 は精原細胞特異的なアイソフォームの発現調整の一端を担っていることが示唆される。生殖細胞における選択的スプライシング制御因子ノックアウトマウスの表現型についてはこれまでもいくつかの報告がある。BCAS2 はスプライソソームの構成因子の 1 つであり胎生期の前精原細胞から出生後の精原細胞まで発現している。生殖細胞において BCAS2 を欠損したマウスは減数第一分裂前期以降の分化が起こらず不妊となることが報告されている (Liu et al., 2017)。RANBP9 は多数のスプライシングファクターと相互作用する因子であり、減数分裂期から円形精子細胞において特に高発現する。生殖細胞において RANBP9 を欠損したマウスでは初回精子形成の時期には組織学的な異常は認められず成熟精子までの分化が完了する一方、その後徐々に減数分裂期以降の精子形成が破綻し、精巣上体には異常な精子細胞が含まれるようになり、不妊となる

(Bao et al., 2014)。このように、異常の起こる細胞の種類や時期は欠損する遺伝子の発現時期に大きく依存しており、細胞種特異的なスプライシングアイソフォームの制御が生殖細胞の発生および分化に重要であることが強く示唆される。

#### PTBP1 と PTBP2 の機能比較

PTBP1 は 4 つの RNA 認識配列を持ち、未成熟 mRNA のピリミジン塩基に富む配列に結合する。多くの哺乳動物では PTBP1 のパラログとして PTBP2、ROD1 が報告されている (Spellman et al., 2007)。PTBP1、PTBP2 は主に神経系 (Kikuchi et al., 2000) および精巣で (Schmid et al., 2013; Zagore et al., 2015)、ROD1 は血球系細胞において発現が認められる (Yamamoto et al., 1999)。齧歯類では更に、平滑筋で発現する smPTB が報告された (Gooding et al., 2003)。これら 4 つのパラログは 70%以上のアミノ酸配列の相同性を持ち、選択的スプライシングに関与する。生殖細胞特異的 PTBP2 ノックアウトマウスは、精原細胞および第一減数分裂期の精母細胞の時期には大きな異常は見られない一方で、減数分裂を終えた円形精子細胞が凝集して巨大多核細胞として精細管の管腔内に遊離し、それ以降の分化は進行せず伸長精子細胞が出現しないという特徴的な表現型が見られており (Zagore et al., 2015)、その異常は本研究で観察された PTBP1 欠損に起因する精原細胞の増殖不全と大きく異なる。その原因として、PTBP1 と PTBP2 の時空的発現の違いが考えられる。本研究において、免疫組織化学染色により性成熟後の精巣における PTBP1 の発現の局在を調べたところ、精原細胞において高い発現が認められ、減数分裂期の精母細胞以降は発現が減弱し半数体精子細胞ではほとんど発現が認められなかった (図 5)。一方、PTBP2 の発現は精原細胞では低く、減数分裂期の精母細胞以降に上昇することが報告されている (Schmid et al., 2013)。

幹細胞の分化過程において PTBP1 から PTBP2 へと発現がスイッチするという変化は、神経の分化過程においても確認される現象である。すなわち、PTBP1 は神経幹細胞を含む未分化な神経細胞において発現し、スプライシングを介して *Ptbp2* mRNA に nonsense mediated decay (NMD) を引き起こすことで PTBP2 の発現を負に制御している。一方、神経幹細胞が分化する際には、miR-124 の発現が上昇し *Ptbp1* mRNA を抑制することで PTBP2 の発現が上昇する。この PTBP1 から PTBP2 への発現のスイッチにより分化型の神経細胞特異的なスプライシングアイソフォームの発現が可能になり、神経分化を促進する (Makeyev et al., 2007)。今後は、精子形成過程において観察される PTBP1 と PTBP2 の発現のスイッチが、神経細胞の分化と同様に細胞種特異的なスプライシングアイソフォームの発現に寄与するのかを解析す

ることが望まれる。

#### PTBP1 を欠損した精原細胞の細胞周期

cKO では出生後 5 日目までに精細管への精細胞の充填が遅れること、そして 2 ヶ月齢から 6 ヶ月齢へと加齢すると精子形成の活性が低下することが明らかになった。cKO でアポトーシスの亢進および細胞増殖抑制が生じている可能性を検証するため、免疫組織化学染色により CC3 および Ki67 の検出を行ったが、これらのタンパク質の発現に control との差は認められなかった。このことは、増殖期にある精原細胞の割合は PTBP1 を欠損しても大きな障害を受けないことを示している。一方で、Ki67 は増殖期にあるすべての細胞に発現するため、細胞周期の進行スピードまでは明らかにすることができない。既往の研究において、PTBP1 を欠損した ES 細胞でも細胞増殖が著しく抑制されることが報告されているものの、その遅延は細胞周期の休止、すなわち G0 期への脱出をした細胞が増加するからではなく G2/M 期の長期化に起因することが示されている (Shibayama et al., 2009)。本研究においても PTBP1 の欠損を誘導した GS 細胞、*Ptbp1-FF* (4OHT) で G2/M 期の細胞の割合が有意に増加することを確認している (図 19)。このことから、ES 細胞と精原細胞という細胞種の違いはあるものの、cKO の精原細胞においても細胞周期の進行速度の低下が生じている可能性が示唆される。今後の実験では精原細胞の細胞周期の進行速度についてより詳細かつ実証的に解析することが望まれる。例えば、腹腔への BrdU 投与後、一定期間の後に精巣を回収し、BrdU で標識される細胞の割合を計測する、あるいは *Ngn3-CreER* (Yoshida et al., 2006) といった精原細胞においてタモキシフェン誘導的に Cre およびレポーターを発現するトランスジーンを持ったマウスにタモキシフェンを投与することで、パルス的に精原細胞を標識しその増殖性を確認するといった研究の遂行が必要であろう。

#### PTBP1 を欠損した精原細胞の自己複製と分化のバランス

本研究の結果から、cKO では加齢に伴って精細管の断面積が縮小しており、また 2 ヶ月齢から 6 ヶ月齢の間に、PLZF 陽性未分化精原細胞を含まない精細管の割合が減少する傾向にあった (図 13B)。この結果は、cKO では週齢が進むにつれて精子形成の活性が低下することを示している。この現象と似た表現型を示す遺伝子欠損マウスとして RHOX10 ノックアウトマウス (Song et al., 2016) が挙げられる。RHOX10 ノックアウトマウスでは、若齢期には精子形成が一見正常に進行している精細管が存在しているものの、性成熟期に達しても精巣重量および精子数が増加せず、週齢が進むにつれ精細胞が枯渇し空胞が多く存在した精細管や精原細胞

の層がなくなっている精細管が増加する。これは出生直後に起こる前精原細胞から精原幹細胞への分化に障害が起こることにより精原幹細胞の数が少なくなり、自己複製により集団を維持することができなくなることが原因であると考えられている。本研究においても PTBP1 欠損に起因して出生直後の精原細胞の増加に顕著な障害が見られていることから、cKO においても精原幹細胞集団の減少が起こっている可能性がある。本研究の cKO で観察された精子形成の活性の低下は数ヶ月の時期を要しながら緩やかに進行し、加齢後も成熟精子を産生し続けるものであり、RHOX10 ノックアウトマウスほど顕著な精子形成の破綻が見られるわけではない。しかしながら精原細胞において PTBP1 を欠損することに起因して、緩やかではありながらも自己複製と分化のバランスが崩れ、徐々に精原細胞の集団を維持することができなくなるという RHOX10 ノックアウトマウスと同様の現象が生じている可能性が考えられる。今後は、PTBP1 欠損に起因した加齢に伴う未分化精原細胞の数の推移をより確度の高い解析により明らかにすることが望まれる。2 ヶ月齢および 6 ヶ月齢の control と cKO の精巣を回収し、未分化精原細胞を濃縮することができる細胞表面マーカーに対する抗体を用いてフローサイトメトリーを行うことで、精細胞全体に占める未分化な集団の割合の推移を詳細に調べることができると考えられる。

また、若齢期には精子形成は正常に進行するものの加齢と共に徐々に精子形成が破綻する遺伝子欠損マウスに FBXL10 ノックアウトマウスがある (Ozawa et al., 2016)。FBXL10 ノックアウトマウスでは薬剤により精細胞を枯渇させた後に精子形成が再開する際、PLZF 陽性未分化精原細胞の分裂活性が低下する。また FBXL10 を欠損した GS 細胞では老化マーカーである *p21* や *p19* の発現が上昇することが報告されている。cKO マウスの精原細胞を回収してこれらの老化マーカーの発現量を調べることで、精子形成の活性の低下に精原細胞の老化が関与するかどうかを明らかにすることができると考えられる。

また、加齢に伴う精細胞の分化の進行スピードの変化に注目した解析を行うことも興味深い課題である。cKO では加齢と共に精子形成の活性が低下することが明らかとなった。精子形成の活性が低下する原因の 1 つとして、精原細胞が減数分裂期へ侵入し半数体精子細胞となるまでの分化の進行が遅くなることが考えられる。そこで、分化の進行について調べるために上述した精原細胞においてタモキシフェン誘導的に Cre およびレポーターを発現するトランスジェンを持ったマウスも有効であろう。このマウスにタモキシフェンを投与し、一定期間の後に精巣を回収し、レポーターを発現する精細胞がどの発生ステージまで進行しているのかを調べることで精細胞の分化の進行スピードを明らかにすることができると考えられる。

## PTBP1 を欠損した GS 細胞について

PTBP1 を欠損した精原細胞の性質について詳細な解析を行うため、精原幹細胞の体外培養系である GS 細胞を樹立し、4OHT を培地に添加することで PTBP1 の欠損を試みた。*Ptbp1-FF* (4OHT) は著しい増殖不全を呈し、長期生存できなかつた (図 17)。これは *in vivo* で観察された増殖不全の表現型と比較してより強い細胞障害性であると言える。精巣内の精原幹細胞はセルトリ細胞と基底膜に包まれたニッチに存在しており、様々なサポートを受けながらその集団を維持している。一方で、GS 細胞はフィーダー細胞として MEF を用いているものの、その効果は生体内よりも限定的である。そういった環境の違いが *in vivo* と *in vitro* における PTBP1 欠損に起因した細胞障害性の強度の差として観察された原因の 1 つであると考えられる。

本研究の RNA-seq の結果から *Ptbp1-FF* (4OHT) では 85 個の遺伝子において選択的スプライシングの変化が確認され、そのうち多くがエクソンスキッピングの変化した遺伝子であった (表 3)。一方、選択的スプライシングに変動があった遺伝子の発現量を *Ptbp1-FF* (EtOH) と *Ptbp1-FF* (4OHT) で比較した結果、両者の発現量は高い相関を示しており、PTBP1 によるスプライシング制御と発現量の制御は独立した現象であると考えられる。

PTBP1 欠損に起因してエクソンスキッピングに大きな変動があった遺伝子の 1 つに *Exoc7* がある。*Exoc7* は PTBP1 がエクソンスキッピングの標的としている遺伝子として知られ、特定のアイソフォームが細胞の老化応答に関与することが最近報告された (Georgilis et al., 2018)。今後の研究として、精巣以外の組織や細胞において PTBP1 の選択的スプライシングのターゲットとなっていることが知られている遺伝子がどの程度精原細胞においても共通性を持つのかについて解析することも重要であろう。また、野生型の GS 細胞を用いて抗 PTBP1 抗体により cross-linking RNA immunoprecipitation (CLIP) を行い、得られた mRNA を次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析することで精原細胞における PTBP1 の選択的スプライシングの標的を明らかにすることが望まれる。

興味深いことに、PTBP1 欠損に起因して発現低下した遺伝子群には *Nanos2*、*Nanos3*、*Glis3* といった精子形成に極めて重要な役割を果たす遺伝子が含まれていた。*Nanos2*、*Nanos3* はいずれも RNA 結合タンパク質をコードする遺伝子であり、胎生期の PGC および出生後の精原細胞において発現が認められる (Tsuda et al., 2003; Suzuki et al., 2008)。*Nanos2*、*Nanos3* いずれのノックアウトマウスも PGC の形成が著しく不全となり細胞死を引き起こす (Tsuda



et al., 2003)。 *Nanos2* は精原幹細胞の自己複製能の維持においても必須であり、この遺伝子を精原幹細胞においてタモキシフェン投与により後発的に欠損させると幹細胞性を持つ集団が失われ、持続的な精子形成が破綻することが報告されている (Sada et al., 2009)。 *Glis3* は転写因子をコードする遺伝子であり、前精原細胞から精原細胞において発現している。 *Glis3* ノックアウトマウスでは前精原細胞から精原幹細胞への分化不全が生じ、出生直後の精原細胞の数が著しく減少することが報告されている (Kang et al., 2016)。いずれも精原細胞の集団の維持に極めて重要な遺伝子であり、PTBP1 欠損誘導後の GS 細胞の著しい増殖不全に、これらの遺伝子の発現低下が寄与した可能性が考えられる。今後、GS 細胞において PTBP1 欠損誘導後にそれぞれの遺伝子を強制発現させることで、増殖性や生存性が回復するかどうかを検討することが望まれる。

## 参考文献

- Bao J, Tang C, Li J, Zhang Y, Bhetwal BP, Zheng H, Yan W. RAN-binding protein 9 is involved in alternative splicing and is critical for male germ cell development and male fertility. *PloS Genet* 2014; 10:e1004825
- Bhang DH, Kim BJ, Kim BG, Schadler K, Baek KH, Kim YH, Hsiao W, Ding BS, Rafii S, Weiss MJ, Chou ST, Kolon TF, Ginsberg JP, Ryu BY, Ryeom S. Testicular endothelial cells are a critical population in the germline stem cell niche. *Nat Commun* 2018; 9: 4379
- Bowles J, Koopman P. Retinoic acid, meiosis and germ cell fate in mammals. *Development* 2007; 134:3401-11
- Castelo-Branco P, Furger A, Wollerton M, Smith C, Moreira A, Proudfoot N. Polypyrimidine tract binding protein modulates efficiency of polyadenylation. *Mol Cell Biol* 2004; 24:4174-83
- Climente-Gonzalez H, Prota-Pardo E, Godzik A, Eyraes E. The Functional Impact of Alternative Splicing in Cancer. *Cell Rep* 2017; 20(9):2215-26
- Culty M. Gonocytes, the forgotten cells of the germ cell lineage. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2009; 87(1):1-26
- Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mortazavi A, Tanzer A, Lagarde J, Lin W, Schlesinger F, Xue C et al. Landscape of transcription in human cells. *Nature* 2012; 489:101-8
- Dong Y, Zhang L, Bai Y, Zhou HM, Campbell AM, Chen H, Yong W, Zhang W, Zheng Q, Shou W, Zhang ZY. Phosphatase of regenerating liver 2 (PRL2) deficiency impairs Kit signaling and spermatogenesis. *J Biol Chem* 2014; 289: 3799-3810
- Erben T, Ossig R, Naim HY, Schnekenburger J. What to do with high autofluorescence background in pancreatic tissues - an efficient Sudan black B quenching method for specific immunofluorescence labelling. *Histopathology* 2016; 69(3): 406-22
- Garcia-Blanco MA, Jamison SF, Sharp PA. Identification and purification of a 62,000-dalton protein that binds specifically to the polypyrimidine tract of introns. *Genes Dev* 1989; 3:1874-76

Georgilis A, Klotz S, Hanley CJ, Herranz N, Weirich B, Morancho B, Leote AC, D'Artista L, Gallage S, Seehawer M, Carroll T, Dharmalingam G, Wee KB, Mellone M, Pombo J, Heide D, Guccione E, Arribas J, Barbosa- Morais NL, Heikenwalder M, Thomas GJ, Zender L, Gil J. PTBP1-Mediated Alternative Splicing Regulates the Inflammatory Secretome and the Protumorigenic Effects of Senescent Cells. *Cancer Cell* 2018; 34(1):85-102.e9.

Gil A, Sharp PA, Jamison SF, Garcia-Blanco MA. Characterization of cDNAs encoding the polypyrimidine tract-binding protein. *Genes Dev* 1991; 5:1224-36

Ginsburg M, Snow MH, McLaren A. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 1990; 110:521-8

Gooding C, Kemp P, Smith CW. A novel polypyrimidine tract-binding protein paralog expressed in smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2003; 278(17):15201-7

Gosert R, Chang KH, Rijnbrand R, Yi M, Sangar DV, Lemon SM. Transient expression of cellular polypyrimidine-tract binding protein stimulates cap-independent translation directed by both picornaviral and flaviviral internal ribosome entry sites *In vivo*. *Mol Cell Biol* 2000; 20:1583-95

Gow A, Southwood CM, Li JS, Pariali M, Riordan GP, Brodie SE, Danias J, Bronstein JM, Kachar B, Lazzarini RA. CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in *Osp/occludin-11* null mice. *Cell* 1999; 99:649-59

Hannigan MM, Zagore LL, Licatalosi DD. *Ptbp2* Controls an Alternative Splicing Network Required for Cell Communication during Spermatogenesis. *Cell Rep* 2017;19(12):2598-2612

Hofmann MC, Braydich-Stolle L, Dym M. Isolation of male germ-line stem cells; influence of GDNF. *Dev Biol* 2005; 279:114-24

Ichise H, Hori A, Shiozawa S, Kondo S, Kanegae Y, Saito I, Ichise T, Yoshida N. Establishment of a tamoxifen-inducible Cre-driver mouse strain for widespread and temporal genetic modification in adult mice. *Exp Anim* 2016;65(3):231-44

Kajimura J, Ito R, Manley NR, Hale LP. Optimization of Single- and Dual-Color Immunofluorescence Protocols for Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Archival Tissues. *J Histochem Cytochem* 2016; 64(2):112-24

Kalsotra A, Cooper TA. Functional consequences of developmentally regulated alternative splicing. *Nat Rev Genet* 2011, 12(10):715-29

Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S, Shinohara T. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol Reprod* 2003; 69:612-6

Kang HS, Chen LY, Lichti-Kaiser K, Liao G, Gerrish K, Bortner CD, Yao HH, Eddy EM, Jetten AM. Transcription Factor GLIS3: A New and Critical Regulator of Postnatal Stages of Mouse Spermatogenesis. *Stem Cells* 2016; 34(11):2772-83

Kan Z, Garrett-Engele PW, Johnson JM, Castle JC. Evolutionarily conserved and diverged alternative splicing events show different expression and functional profiles. *Nucleic Acid Res* 2005; 33:5659-66

Kikuchi T, Ichikawa M, Arai J, Tateiwa H, Fu L, Higuchi K, Yoshimura N. Molecular cloning and characterization of a new neuron-specific homologue of rat polypyrimidine tract binding protein. *J Biochem* 2000; 128(5):811-21

Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:16489-94

Lambrot R, Lafleur C, Kimmins S. The histone demethylase KDM1A is essential for the maintenance and differentiation of spermatogonial stem cells and progenitors. *FASEB J* 2015; 29(11):4402-16

Liu W, Wang F, Xu Q, Shi J, Zhang X, Lu X, Zhao ZA, Gao Z, Ma H, Duan E, Gao F, Gao S, Yi Z, Li L. BCAS2 is involved in alternative mRNA splicing in spermatogonia and the transition to meiosis. *Nat Commun* 2017; 8:14182

Makeyev EV, Zhang J, Carrasco MA, Maniatis T. The Micro RNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell* 2007; 27(3):435-48

Matsushita K, Tomonaga T, Shimada H, Shioya A, Higashi M, Matsubara H, Harigaya K, Nomura F, Libutti D, Levens D, Ochiai T. An essential role of alternative splicing of c-myc suppressor FUSE-binding protein-interacting repressor in carcinogenesis. *Cancer Res* 2006; 66(3):1409-17

McCarrey JR. Toward a more precise and informative nomenclature describing fetal and neonatal male germ cells in rodents. *Biol Reprod* 2013; 89(2):47

McLaren A. Primordial germ cells in the mouse. *Dev Biol* 2003; 262:1-15

Meng X, Lindahl M, Hyvönen ME, Parvinen M, de Rooij DG, Hess MW, Raatikainen-Ahokas A, Sainio K, Rauvala H, Lakso M, Pichel JG, Westphal H, Saarma M, Sariola H. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science* 2000; 287:1489-93

Mochizuki K, Matsui Y. Epigenetic profiles in primordial germ cells: global modulation and fine tuning of the epigenome for acquisition of totipotency. *Dev Growth Differ* 2010; 52:517-25

Monzon-Casanova E, Screen M, Diaz-Munoz MD, Coulson RMR, Bell SE, Lamers G, Solimena M, Smith CWJ, Turner M. The RNA-binding protein PTBP1 is necessary for B cell selection in germinal centers. *Nat Immunol* 2018; 19(3):267-78

Morikawa T, Manabe T, Ito Y, Yamada S, Yoshimi A, Nagai T, Ozaki N, Mayeda A. The expression of HMGA1a is increased in lymphoblastoid cell lines from schizophrenia patients. *Neurochem Int* 2010; 56(6-7): 736-9

Muzumdar MD., Tasic B., Miyamachi K., Li L. and Luo L. A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis* 2007;45(9) :593-605

Nakaki F, Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, Yabuta Y, Saitou M. Induction of mouse germ-cell fate by transcription factors in vitro. *Nature* 2013; 501(7466):222-6

Naughton CK, Jain S, Strickland AM, Gupta A, Milbrandt J. Glial cell-line derived neurotrophic factor-mediated RET signaling regulates spermatogonial stem cell fate. *Biol Reprod* 2006; 74:314-21

Oakburg EF. Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *Am J Anat* 1956;99(3):507-16

Oatley JM, Brinster RL. The germline stem cell niche unit in mammalian testes. *Physiol Rev* 2012; 92:577-95

Ohinata Y, Payer B, O'Carroll D, Ancelin K, Ono Y, Sano M, Barton SC, Obukhanych T, Nussenzweig M, Tarakhovsky A, Saitou M, Surani MA. Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature* 2005; 436(7048):207-13

Ozawa M, Fukuda T, Sakamoto R, Honda H, Yoshida N. The Histone Demethylase FBXL10 Regulates the Proliferation of Spermatogonia and Ensures Long-Term Sustainable Spermatogenesis in Mice. *Biol Reprod* 2016; 94(4):92

- Patton JG, Mayer SA, Tempst P, Nadal-Ginard B. Characterization and molecular cloning of polypyrimidine tract-binding protein: a component of a complex necessary for pre-mRNA splicing. *Genes Dev* 1991; 5:1237-51
- Robida MD, Singh R. Drosophila polypyrimidine-tract binding protein (PTB) functions specifically in the male germline. *EMBO J* 2003; 22: 2924-33
- Sada A, Suzuki A, Suzuki H, Saga Y. The RNA-binding protein NANOS2 is required to maintain murine spermatogonial stem cells. *Science* 2009; 325(5946):1394-8
- Schmid R, Grellscheid SN, Ehrmann I, Dalgliesh C, Danilenko M, Paronetto MP, Pedrotti S, Grellscheid D, Dixon RJ, Sette C, Eperon IC, Elliott DJ. The splicing landscape is globally reprogrammed during male meiosis. *Nucleic Acid Res* 2013; 41:10170-84
- Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008; 3:1101-8
- Shibayama M, Ohno S, Osaka T, Sakamoto R, Tokunaga A, Nakatake Y, Sato M, Yoshida N. Polypyrimidine tract-binding protein is essential for early mouse development and embryonic stem cell proliferation. *FEBS J* 2009; 276:6658-68
- Song HW, Bettegowda A, Lake BB, Zhao AH, Skarbrevik D, Babajanian E, Sukhwani M, Shum EY, Phan MH, Plank TM, Richardson ME, Ramaiah M, Sridhar V, de Rooij DG, Orwig KE, Zhang K, Wilkinson MF. The Homeobox Transcription Factor RHOX10 Drives Mouse Spermatogonial Stem Cell Establishment. *Cell Rep* 2016; 17(1):149-164
- Spellman R, Llorian M, Smith CW. Crossregulation and functional redundancy between the splicing regulator PTB and its paralogs nPTB and ROD1. *Mol Cell* 2007; 27(3):420-34
- Suckale J, Wendling O, Masjkur J, Jager M, Munster C, Anastassiadis K, Stewart AF, Solimena M. PTBP1 is required for embryonic development before gastrulation. *PLoS One* 2011; 6(2):e16992
- Sun Z, Zhu M, Lv P, Cheng L, Wang Q, Tian P, Yan Z, Wen B. The Long Nongoding RNA Lncenc1 Maintains Naive States of Mouse ESCs by Promoting the Glycolysis Pathway. *Stem Cell Reports* 2018; 11(3):741-55
- Suzuki H, Tsuda M, Kiso M, Saga Y. Nanos3 maintains the germ cell lineage in the mouse by suppressing both Bax-dependent and -independent apoptotic pathways. *Dev Biol* 2008; 318:133-42

Tadokoro Y, Yomogida K, Ohta H, Tohda A, Nishimune Y. Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF/FSH pathway. *Mech Dev* 2002; 113:29–39.

Tremblay JJ. Molecular regulation of steroidogenesis in endocrine Leydig cells. *Steroids* 2015;103:3-10

Tsuda M, Sasaoka Y, Kiso M, Abe K, Haraguchi S, Kobayashi S, Saga Y. Conserved role of nanos proteins in germ cell development. *Science* 2003; 310(5637):1239-41

Valcarcel J, Gebauer F. Post-transcriptional regulation: the dawn of PTB. *Curr Biol* 1997; 7:R705-8

Wu X, Peppi M, Vengalil MJ, Maheras KJ, Southwood CM, Bradley M, Gow A. Transgene-mediated rescue of spermatogenesis in *Cldn11*-null mice. *Biol Reprod* 2012; 86: 1-11

Xu M, Hecht NB. Polypyrimidine tract binding protein 2 stabilizes phosphoglycerate kinase 2 mRNA in murine male germ cells by binding to its 3'UTR. *Biol Reprod* 2007; 76(6):1025-33

Xu X, Yang D, Ding JH, Wang W, Chu PH, Dalton ND, Wang HY, Bermingham JR Jr, Ye Z, Liu F, Rosenfeld MG, Manley JL, Ross J Jr, Chen J, Xiao RP, Cheng H, Fu XD. ASF/SF2-regulated CaMK II delta alternative splicing temporally reprograms excitation-contraction coupling in cardiac muscle. *Cell* 2005; 120(1):59-72

Yamamoto H, Tsukahara K, Kanaoka Y, Jinno S, Okayama H. Isolation of mammalian homologue of a fission yeast differentiation regulator. *Mol Cell Biol* 1999; 19(5):3829-41

Yeo G, Holste D, Kreiman G, Burge CB. Variation in alternative splicing across human tissues. *Genome Biol* 2004; 5:R74

Yoshida S, Takakura A, Ohno K, Abe K, Wakabayashi J, Yamamoto M, Suda T. and Nabeshima Y. Neurogenin3 delineates the earliest stages of spermatogenesis in the mouse testis. *Dev Biol* 2004; 269:447-58

Yoshida S, Sukeno M, Nakagawa T, Ohbo K, Nagamatsu G, Suda T, Nabeshima Y. The first round of mouse spermatogenesis is a distinctive program that lacks the self-renewing spermatogonia stage. *Development* 2006; 133(8): 1495-505

Zagore LL, Grabinski SE, Sweet TJ, Hannigan MM, Sramkoski RM, Li Q, Licatalosi DD. RNA Binding Protein Ptbp2 Is Essential for Male Germ Cell Development. *Mol Cell Biol* 2015; 35(23):4030-42

Zhang X, Chen MH, Wu X, Kodani A, Fan J, Doan R, Ozawa M, Ma J, Yoshida N, Reiter JF, Black DL, Kharchenko PV, Sharp PA, Walsh CA. Cell-Type-Specific Alternative Splicing Governs Cell Fate in the Developing Cerebral Cortex. *Cell* 2016; 166(5):1147-62



## 謝辞

東京大学医科学研究所 分子発癌分野 井上純一郎教授には主査を引き受けて頂き、貴重なアドバイスを頂戴致しましたことに心より感謝申し上げます。吉田進昭名誉教授には修士課程 1 年から博士課程 2 年までの期間、発生工学研究分野にて研究を行う機会を与えて頂きましたことに深く感謝致します。東京大学医科学研究所 システム疾患モデル研究センター 生殖システム研究分野 小沢学准教授には修士課程 1 年から博士課程 3 年までの 5 年間という長い期間、実験方法やデータ解釈について丁寧かつ熱心に教えて頂き、数え切れないほどのアドバイス、根気強いご指導を頂きました。深く御礼申し上げます。生殖システム研究分野 伊川正人特任教授には何度もディスカッションに応じて頂き、アドバイスを頂いたことに深く感謝致します。

東京大学医科学研究所 先進病態モデル研究分野 山田泰広教授、京都大学 iPS 細胞研究所 未来生命開拓部門 山本拓也准教授には RNA-seq の共同研究、データに関するディスカッションをして頂き、大変お世話になりましたことに感謝申し上げます。また山田泰広教授、山本一夫教授（東京大学大学院 新領域創成科学研究科 先端生命科学専攻 医薬デザイン工学分野）、佐藤均准教授（東京大学医科学研究所 病態医療科学分野）、小沢学准教授には審査委員として博士論文作製にあたり様々なアドバイス、ご指導を頂き、誠にありがとうございました。馬場都秘書には博士課程卒業までの 5 年間、研究室での生活において細やかな心遣いを頂き、沢山のサポートをして頂きました。坂本怜子技術補佐員、菊池美緒技術補佐員には実験に必要な ES 細胞の樹立や IVF などの胚操作を何度も行っていただきました。深く感謝申し上げます。発生工学研究分野の皆様、先進病態モデル研究分野の皆様、生殖システム研究分野の皆様には研究に関する様々なアドバイスを頂いたり、解析を手伝って頂いたりと様々な場面で支えて頂きました。深く感謝致します。

両親は 5 年間の期間に渡って大学院で勉強することを支援してくれ、祖父母はいかなる時でも研究を応援してくれましたことに感謝致します。