

学位論文 (要約)

組換えホットスポット活性化因子 Prdm9 の機能解析
(Functional analysis of recombination hotspot activator Prdm9)

東京大学大学院理学系研究科

生物化学専攻

河野 宏光

目次

目次	1
要旨・Abstract	3
略語一覧	5
序章	7
1. 生物の多様性を生む原動力	7
2. 相同組換えによる遺伝的多様性の増大	8
3. 組換えを支えるメカニズム	9
4. 組換えホットスポットにおける組換え頻度	10
5. ヒストン修飾と組換えホットスポット	12
6. 組換えホットスポット活性化因子 Prdm9	13
7. 種分化と雑種不妊、種分化遺伝子としての Prdm9	16
本研究の意義および目的	17
内容の概略	17
《第1章》マウスにおける Prdm9 多型の系統地理的解析	17
《第2章》Prdm9 遺伝子への低形質性変異の導入とその機能解析	19
《第3章》新規組換え検出系を持つマウスの作成	19
第1章 マウスにおける Prdm9 多型の系統地理的解析	21
序論	21
1. Prdm9 の機能に関する報告	21
2. 実験動物マウス	22
3. 野生由来マウス系統	24
4. 野生マウス資源を用いた Prdm9 の機能解析	24
<u>第1章は共著者全員の同意が得られていないため、以下の部分はインターネット非公表</u>	
材料と手法	26

結果	29
<i>Prdm9</i> cDNA の配列多型	29
野生マウスの ZFA 多型	29
野生マウス集団における <i>Prdm9</i> ZFA の系統地理学的解析	30
t-ハプロタイプマウスの ZFA の系統解析	31
考察	34
第 2 章 <i>Prdm9</i> 遺伝子への低形質性変異の導入とその機能解析	54
序論	54
材料と手法	56
結果	62
<i>Prdm9</i> KI マウスの作成	62
<i>Prdm9</i> KI マウスの表現型	62
受精卵前核へのインジェクションを利用した遺伝子交換の試み	63
考察	65
第 3 章 新規組換え検出系を持つマウスの作成	78
序論	78
材料と手法	80
結果	83
組換えホットスポット導入マウスの作成と表現型	83
リコンビナーゼ保持系統との交配による組換え頻度検出マウスの作成	83
組換え頻度検出マウスの表現型解析	84
考察	87
総合討論	99
謝辞	101
参考文献	102

要旨

減数分裂期相同組換えは、遺伝的多様性獲得に重要な役割を果たす。組換えホットスポットは相同組換えの頻発部位で、酵母からヒトに至る真核生物の染色体上に普遍的に存在する。近年、組換えホットスポットの位置決定におけるエピゲノム修飾の重要性が指摘され、マウスやヒトではヒストンメチル化酵素 *Prdm9* が過半のホットスポットの位置決定に関与することが報告された。一方、*Prdm9* は配偶子形成に重要な多型に富む転写因子であり、野生マウス亜種間雑種の不妊要因、すなわち種分化遺伝子の一つと想定されている。しかしながら、減数分裂期組換えの不全も配偶子形成不全を伴うこと、多型が DNA 配列認識ドメインに集中してことなどから、転写因子として配偶子形成に普遍的に関与するかは不明である。そこで本研究では、多型解析と遺伝子改変マウスを用いた実験系により *Prdm9* の機能を検証した。

まず、主要な野生マウス亜種集団を網羅したゲノム DNA を試料とし、*Prdm9* の遺伝的多型を解析した。その結果 *Prdm9* の多型は、主要組織適合抗原に匹敵する程高頻度であり、この遺伝子の顕著な多様性が示された。一方、全ての亜種集団に拡散している単一の多型が確認されたことなどから、種分化遺伝子としての役割は支持されなかった。次に、*Prdm9* 遺伝子の低形質性変異が配偶子形成と組換えに及ぼす効果を検証した。タグ配列付加による低形質性 *Prdm9* を導入したマウスでは、交叉型組換えを示す *Mhl1* フォーサイ数が著しく減少し、受精率と繁殖率も顕著に低下した。この表現型は先行研究における *Spo11* (組換え開始を担う DNA 切断因子) の低形質性変異表現型とよく似ており、*Prdm9* の配偶子形成への影響は組換え異常によることが示唆された。さらに、変異 *lox* 配列を用いた *Prdm9* 置換アレルを有するマウスの作出により、同一の遺伝的背景で任意の亜種由来 *Prdm9* への置換を迅速化した。これに並行して、組換えホットスポット側の配列を用いた組換え頻度検出マウスの作出を試み、人工的に導入した組換えホットスポットでの組換えを確認した。この結果は、*Prdm9* によって認識される組換えホットスポットが特定の染色体部位に限定されたものではなく、染色体上で普遍的に働くことを示している。

Abstract

Homologous recombination plays an important role in acquiring genetic variation. In eukaryote, homologous recombination is observed at specific genomic sites referred to as recombination hotspots. Recent studies have revealed that a histone methyltransferase named Prdm9 makes histone modification at specific genomic regions, thereby serving a site-specific marker of the recombination hotspots. In addition, Prdm9 was originally reported to be a transcription factor, which is expressed specifically in gametogenesis. *Prdm9* gene shows high level of polymorphism, and is assumed to be responsible for hybrid sterility in mice. It is notable that meiotic recombination defects cause malfunction of gametogenesis, and polymorphic sites of Prdm9 is concentrated in a domain to recognize motif sequence for the recombination hotspot. Thus, there is some doubt whether *Prdm9* is responsible for gametogenesis and transcriptional regulation. To reveal Prdm9 functions, I analyzed the polymorphism and conducted experiments with genetic modification mice.

First, large-scale population analysis of wild-captured mice indicated that level of the *Prdm9* polymorphism is as high as that of the class I and II genes in the major-histocompatibility complex, which are known to be the most variable genes in the mammalian genome. Phylogeographic study of the *Prdm9* polymorphism did not support the possibility that *Prdm9* has a function as speciation gene. Next, I generated a hypomorphic *Prdm9* Knock-in (KI) mouse strain, and analysed its gametogenesis and the meiotic recombination. I found that Mlh1 foci counts in the spermatocyte and fertility rate are significantly reduced in the mice. This phenotype resembled that of *Spo11* hypomorph mutant, suggesting that the recombination abnormality caused incomplete spermatogenesis. As the last exon of the *Prdm9* KI allele is flanked by mutated *loxP* sequence, the KI mouse strain will be used to swap ZFA with different origins in future study. Finally, I generated recombination detector mice, introducing a well-known “*Psmb9* hotspot” in the mouse genome. As a result of recombination test, I confirmed that the homologous recombination occurred at the artificially-introduced hotspots, indicating that the hotspot sequence is able to induce recombination anywhere irrespective of sites in chromosome.

略語一覽

BAC	(Bacterial artificial chromosome)
CAG	(Modified chicken β -actin promoter with CMV-IE enhancer)
cAMP	(cyclic AMP)
CAS	(<i>Mus musculus castaneus</i>)
ChIP	(Chromatin immunoprecipitation)
ChIP-Seq	(Chromatin immunoprecipitation-sequencing)
CREB	(cAMP response element binding protein)
DAPI	(4',6-diamidino-2-phenylindole)
DOM	(<i>Mus musculus domesticus</i>)
DSB	(Double strand break)
EDTA	(Ethylenediaminetetraacetic acid)
ES	(Embryonic stem)
FBS	(Fetal bovine serum)
HA	(Hemagglutinin)
HEPES	(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
HSR1	(High-SNPs region 1)
<i>Hst1</i>	(<i>Hybrid sterility 1</i>)
IVF	(In vitro fertilization)
KI	(Knock-in)
KO	(Knock-out)
KRAB	(Krüppel associated box)
MHC	(Major histocompatibility complex)
MUS	(<i>Mus musculus musculus</i>)
PBS	(Phosphate buffered saline)
PCR	(Polymerase chain reaction)

PI	(Propidium iodide)
PITT	(Pronuclear injection-based targeted transgenesis)
PVDF	(Polyvinylidene difluoride)
RACE	(Rapid amplification of cDNA ends)
SDS-PAGE	(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)
SDSA	(Synthesis-dependent strand annealing)
SNP	(Single nucleotide polymorphism)
SSXR	(SSX repression domain)
TALLEN	(TAL effector nucleases)
TBS	(Tris buffered saline)
<i>Tcp1</i>	(<i>T-complex protein 1</i>)
Tg	(Transgenic)
TSS	(Transcription start site)
WT	(Wild-type)
ZF	(Zinc finger)
ZFA	(Zinc finger array)

要旨

減数分裂期相同組換えは、遺伝的多様性獲得に重要な役割を果たす。組換えホットスポットは相同組換えの頻発部位で、酵母からヒトに至る真核生物の染色体上に普遍的に存在する。近年、組換えホットスポットの位置決定におけるエピゲノム修飾の重要性が指摘され、マウスやヒトではヒストンメチル化酵素 *Prdm9* が過半のホットスポットの位置決定に関与することが報告された。一方、*Prdm9* は配偶子形成に重要な多型に富む転写因子であり、野生マウス亜種間雑種の不妊要因、すなわち種分化遺伝子の一つと想定されている。しかしながら、減数分裂期組換えの不全も配偶子形成不全を伴うこと、多型が DNA 配列認識ドメインに集中してことなどから、転写因子として配偶子形成に普遍的に関与するかは不明である。そこで本研究では、多型解析と遺伝子改変マウスを用いた実験系により *Prdm9* の機能を検証した。

まず、主要な野生マウス亜種集団を網羅したゲノム DNA を試料とし、*Prdm9* の遺伝的多型を解析した。その結果 *Prdm9* の多型は、主要組織適合抗原に匹敵する程高頻度であり、この遺伝子の顕著な多様性が示された。一方、全ての亜種集団に拡散している単一の多型が確認されたことなどから、種分化遺伝子としての役割は支持されなかった。次に、*Prdm9* 遺伝子の低形質性変異が配偶子形成と組換えに及ぼす効果を検証した。タグ配列付加による低形質性 *Prdm9* を導入したマウスでは、交叉型組換えを示す *Mhl1* フォーサイ数が著しく減少し、受精率と繁殖率も顕著に低下した。この表現型は先行研究における *Spo11* (組換え開始を担う DNA 切断因子) の低形質性変異表現型とよく似ており、*Prdm9* の配偶子形成への影響は組換え異常によることが示唆された。さらに、変異 *lox* 配列を用いた *Prdm9* 置換アレルを有するマウスの作出により、同一の遺伝的背景で任意の亜種由来 *Prdm9* への置換を迅速化した。これに並行して、組換えホットスポット側の配列を用いた組換え頻度検出マウスの作出を試み、人工的に導入した組換えホットスポットでの組換えを確認した。この結果は、*Prdm9* によって認識される組換えホットスポットが特定の染色体部位に限定されたものではなく、染色体上で普遍的に働くことを示している。

Abstract

Homologous recombination plays an important role in acquiring genetic variation. In eukaryote, homologous recombination is observed at specific genomic sites referred to as recombination hotspots. Recent studies have revealed that a histone methyltransferase named Prdm9 makes histone modification at specific genomic regions, thereby serving a site-specific marker of the recombination hotspots. In addition, Prdm9 was originally reported to be a transcription factor, which is expressed specifically in gametogenesis. *Prdm9* gene shows high level of polymorphism, and is assumed to be responsible for hybrid sterility in mice. It is notable that meiotic recombination defects cause malfunction of gametogenesis, and polymorphic sites of Prdm9 is concentrated in a domain to recognize motif sequence for the recombination hotspot. Thus, there is some doubt whether *Prdm9* is responsible for gametogenesis and transcriptional regulation. To reveal Prdm9 functions, I analyzed the polymorphism and conducted experiments with genetic modification mice.

First, large-scale population analysis of wild-captured mice indicated that level of the *Prdm9* polymorphism is as high as that of the class I and II genes in the major-histocompatibility complex, which are known to be the most variable genes in the mammalian genome. Phylogeographic study of the *Prdm9* polymorphism did not support the possibility that *Prdm9* has a function as speciation gene. Next, I generated a hypomorphic *Prdm9* Knock-in (KI) mouse strain, and analysed its gametogenesis and the meiotic recombination. I found that Mlh1 foci counts in the spermatocyte and fertility rate are significantly reduced in the mice. This phenotype resembled that of *Spo11* hypomorph mutant, suggesting that the recombination abnormality caused incomplete spermatogenesis. As the last exon of the *Prdm9* KI allele is flanked by mutated *loxP* sequence, the KI mouse strain will be used to swap ZFA with different origins in future study. Finally, I generated recombination detector mice, introducing a well-known “*Psmb9* hotspot” in the mouse genome. As a result of recombination test, I confirmed that the homologous recombination occurred at the artificially-introduced hotspots, indicating that the hotspot sequence is able to induce recombination anywhere irrespective of sites in chromosome.

第1章 -マウスにおける Prdm9 多型の系統地理的解析

序論

1. Prdm9 の機能に関する報告

Prdm9 は、減数分裂期に特異的に発現するヒストンメチルトランスフェラーゼドメインと Zn フィンガーアレイ (ZFA、配列特異的 DNA 結合活性を持つと考えられる) を有する転写調節因子であり、減数分裂の進行に必須な役割を果たす。Prdm9 遺伝子の ZFA 領域はマウス亜種間比較により非常に多型に富んでおり、進化速度の非常に早い遺伝子であると推定されている。減数分裂における必須機能と高速進化という 2 面性を有する Prdm9 は、2 つの遺伝的に離れた集団間の交配による生殖を妨げ、種分化の原動力とされる「生殖隔離」に結びつくとも推定されている。実際、マウスの 2 亜種 *Mus musculus domesticus* と *M. m. musculus* を交配させると、F1 のオスの中には不妊になるものが現れる (Foreit, 1996) が、この雑種不妊の責任領域 *Hybrid sterility 1 (Hst1)* は 17 番染色体にあり (Trachtulec et al., 1997)、後に *Hst1* が Prdm9 と同一であることが示された。つまり、Prdm9 は哺乳動物として初の「種分化遺伝子」として報告されたのである (Mihola et al., 2009)。しかし、Prdm9 が本当に種分化遺伝子として機能しているかについては、遺伝子改変マウスなどを用いた実験的検証が必要である。

野生動物集団の Prdm9 遺伝子の多型についての情報は、これまでの Prdm9 進化の歴史を明らかにするうえで重要な情報をもたらす。現在、ヒトやチンパンジーと一部のマウスの Prdm9 多型に焦点が当てられた研究 (Groeneveld et al., 2012, Berg et al., 2010, Berg et al., 2011, Brick et al., 2012, Sandor et al., 2012) が多く行われているが、これらの研究によって世界的な集団中に、ジンクフィンガー (ZF) の DNA 結合ドメインの繰り返し数やアミノ酸の置換といった大きな多様性があることが明らかにされている。特に ZF の α -ヘリックスを構成する 3 アミノ酸の非同義置換が重要とされ (Choo et al., 1994)、この ZFA 部位を介して配列特異的な DNA 結合が生じ、組換えホットスポットを形成していると推測されている。

一方、ノックアウト (KO) マウスを用いた研究により、Prdm9 は減数分裂特異的な転写因子としての側面を有することが報告されている (Hayashi et al., 2005)。この考えは、上記の ZFA の高速進化 (Oliver et al., 2009) と考え合わせると矛盾をはらんでいる。というのも、Prdm9 によって特定の減数分裂遺伝子群が発現するとするならば、ZFA の変化によりこれら遺

伝子の発現に影響が及ぶことが容易に推定できるからである。

これまでも主要組織適合抗原 (MHC) に代表される高速に進化する遺伝子が知られているが、それらの因子は多型を必要とする積極的な理由を有している (Figuroa et al., 1988, Borghans et al., 2004)。MHC や抗体関連の遺伝子については、機能的に外環境からの様々な異物や刺激に対応し、自己と他を区別して認識する必要があることによる説明ができる。それに比して *Prdm9* の ZFA の場合は、容易に推定可能な積極的な高速進化の理由が見いだせない。

考えられる ZFA の高速進化の理由の一つとして、SINE や LINE、レトロトランスポゾンなどの可動性 DNA 配列の活性抑制が挙げられる (Wolf et al., 2015)。ヒトやマウスでは、遺伝子内のドメインの位置が類似した 100 種類以上の KRAB-ZF タンパク質ファミリーが存在する。これらの因子の中には、可動性 DNA 配列の活性を抑制するはたらきを持つものがある。可動性 DNA 配列には多型が生じやすく、配列依存的な抑制を行うには、宿主細胞側のゲノム防衛を担当する因子も多型的である必要がある (Yoder et al., 1997, Siomi et al., 2011)。この条件を満たすのが KRAB-ZF ファミリーのタンパク質である。*Prdm9* は系統解析により最も早くから存在する KRAB-ZF タンパク質である可能性が指摘されており (Birtle and Ponting, 2006)、転移因子との軍拡競争の中から多くの多型が生み出されてきた可能性がある。

2. 実験動物マウス

現代の生物学や医学研究において遺伝子と表現型の関連性、または環境因子の影響を調べる際には実験動物を利用することが一般的である。実験動物として利用されるモデル生物の中でも最も広く用いられている一つがマウスとよばれる実験用に系統化されたハツカネズミ (*Mus musculus*) である。

マウスを実験に利用する利点として重要な要素が 3 つあり、繁殖速度が速く飼いやすい、ヒトと同じ哺乳動物である、そして ES 細胞が得られていて遺伝子改変操作が容易 (Capecchi, 2005) であるという点である。現在では、他のモデル生物と比較しても厚みのあるゲノムや遺伝子発現データベース (Bult et al., 2015, Smith et al., 2015) が公開されており、研究者はこうした情報をもとに興味のある遺伝子や領域を様々な手法で解析することができる。同時にこれまでに得られている膨大な知見は、KI マウスや Tg マウスのアーカイブとして様々な

研究機関が保存・維持 (Austin et al, 2004)しており、これらを利用して実験を行うことができる。

このような利点があるマウスのうち実験で頻用される系統は、ゲノムの大半がヨーロッパの一部地域に由来する野生マウスの近交系に過ぎない (Yang et al., 2007)。初期の野生マウスより実験用マウスにつながる飼育・愛玩用マウス系統が作成された詳細な記録は残っていないが、少なくとも 100 年以上前のヨーロッパや日本で、野生集団内では発現しにくい表現型をもったマウスを、愛玩用として交配により作成・維持していたと推測される記録が残っている (Beck et al., 2000, Yoshiki and Moriwaki, 2006)。C57BL/6 系統に代表される多くの系統は、それらの系統をもとに飼育向きの形質や、見た目で明らかな毛色の表現型、産仔数などを基準に選択されながら成立していったとされる (Beck et al., 2000, Paigen, 2003)。

しかし現在もマウスは世界中に野生集団として存在しており、ヒトにより系統化された実験用マウスが野生マウスと異なる種になってしまったわけではない。実験動物としてマウス系統が利用されるのと合わせて、野生集団マウスの解析も進み、毛色や骨格と生息地を基準に多くの細分化された亜種集団の分類が行われた (Schwarz and Schwarz, 1943, Yoshiki and Moriwaki, 2006)。当時はミトコンドリア DNA など部分的な遺伝子配列が解読可能になってきた時期であり、表現型との関連性が研究された。この際に世界から多くのマウスサンプルを収集し、生け捕りにしたマウスから亜種の遺伝的特徴を反映させた新たな系統「野生由来マウス系統」が作出された (Beck et al, 2000)。野生由来マウス系統を利用した大規模なゲノム解析の結果と、マウスの種内グループは大きく 3 亜種グループに分類されることが明らかとなった (Kaene et al., 2011)。実験用系統の多くは単一の西ヨーロッパ亜種である *M. m. domesticus* 由来 (Yonekawa et al., 2013, Yang et al., 2007) であり、限られた数の実験用近交系マウスしかこれまでの研究では用いられていない (Paranov et al., 2010, Kaene et al., 2011)。

野生マウス集団については、ユーラシア大陸の亜種集団は 50-100 万年前に分化し始めたことが明らかになっている (Suzuki et al., 2004)。これらの亜種は種分化の途上にあり、また *M. spretus*、*M. macedonicus*、*M. speciligus* といった近縁種の生息域が重複している (Suzuki et al., 2013)。そのため野生由来マウス系統と近縁種は系統地理学や種分化プロセスを理解する上で理想的な材料といえる。

3. 野生由来マウス系統

従来、野生由来マウスの表現型解析は実験用系統を野生マウスと交配させ、得られた子を実験系統に繰り返し戻し交配させつつ、表現型を維持するなどの方法によりコンジェニック系統（実験室系統のマウスのゲノムに野生型マウスの遺伝子の一部が取り込まれた系統）とよばれる系統を作出して行われていた (Wakeland et al., 1997)。本研究でも数系統の MHC 領域コンジェニックマウスを使用しているが、それらに加えて国立遺伝学研究所で作りに出された多くの野生由来系統を用いている。これらのマウスは古典的な実験用近交系が確立した後で、特定の地域で捕獲された複数個体の野生マウスをもとに兄妹交配を繰り返すことで作成された。系統樹立は現在主に用いられている MSM/Ms 系統を含め、1980 年代までに森脇らによってなされた (Sakai et al., 2004, Moriwaki et al., 2009)。

これらのマウスを用いる利点は、遺伝的多型が豊富に存在するため、既存の実験用系統との表現型の差をゲノムと対応させることができる点にある。この利点を最大限活用するために、その後 C57BL/6 系統を背景にそれぞれの染色体を 1 本ずつ MSM/Ms で置換したコンソミック系統（実験室マウスの染色体の一部が野生型マウスの染色体に置き換わった系統）、さらに相同組換えにより 1 本の染色体の MSM/Ms に由来する領域を細分化したサブコンソミック系統（コンソミック系統の野生マウス染色体の一部をさらに実験室系統に置換し直した系統）が作成された (Nadeau et al., 2000, Guenet et al., 2003, Gregorová et al., 2008, Takada et al., 2012)。それぞれのコンソミック系統マウスの表現型は様々な要素について解析されており、骨格、代謝や行動の観察により発見された表現型を最終的に責任遺伝子領域と関連づけるために用いられている (Babaya et al., 2014)。サブコンソミック系統の作成過程で組換えを起こした染色体上の位置データも蓄積されており (Shiroishi 未発表)、組換えホットスポットの位置特定などにも使用できる可能性がある。

4. 野生マウス資源を用いた Prdm9 の機能解析

これまでも Prdm9 の機能報告はなされているが、特に種分化の原因となる遺伝子としての報告 (Mihola et al., 2009) や、特定の組換えホットスポット (Baudat et al., 2010) に対する研究は、一部のマウスに由来する現象を検証しているにすぎない。機能に関わる重要なドメインが多型的であるならば、一部のマウスの結果を種全体に拡張して考えるのは、大

きな野生集団中で起こっている現象を反映していない可能性がある。

そこで Prdm9 の多型的性質が機能に及ぼす影響を明らかにするためには、まず種全体の多型の全貌を明らかにする必要がある、そのために野生由来マウス系統と「野生捕獲マウスゲノム」を利用しようと考えた。野生捕獲マウスゲノムは全世界で採集したマウスを日本に持ち帰り、それらの個体から抽出したゲノムである。なお生物の多様性に関する条約発効前に他国から収集・作製したゲノム試料を用いることは法令上問題ない。このゲノムは採集地点に基づいて分類した亜種情報ごとに国立遺伝学研究所、北海道大学、理研バイオリソースセンターなどで管理・保存されている。これまでも野生捕獲マウスに由来する試料は、主に局所的な集団の進化や亜種間の雑種に関する研究で用いられてきた (Nunome et al., 2010, Göüy de Bellocq et al., 2015) が、今回の実験では野生由来系統の cDNA の解析で、種全体で膨大な多型の存在が予測されたため、それらを網羅する試料を使用した。

インターネット公表に関する
共著者全員の同意が得られていないため、
本章の一部は非公表

インターネット公表に関する
共著者全員の同意が得られていないため、
本章の一部は非公表

インターネット公表に関する
共著者全員の同意が得られていないため、
本章の一部は非公表

インターネット公表に関する
共著者全員の同意が得られていないため、
本章の一部は非公表

インターネット公表に関する
共著者全員の同意が得られていないため、
本章の一部は非公表

インターネット公表に関する
共著者全員の同意が得られていないため、
本章の一部は非公表

インターネット公表に関する
共著者全員の同意が得られていないため、
本章の一部は非公表

インターネット公表に関する
共著者全員の同意が得られていないため、
本章の一部は非公表

インターネット公表に関する
共著者全員の同意が得られていないため、
本章の一部は非公表

インターネット公表に関する
共著者全員の同意が得られていないため、
本章の一部は非公表

インターネット公表に関する
共著者全員の同意が得られていないため、
本章の一部は非公表

インターネット公表に関する
共著者全員の同意が得られていないため、
本章の一部は非公表

インターネット公表に関する
共著者全員の同意が得られていないため、
本章の一部は非公表

インターネット公表に関する
共著者全員の同意が得られていないため、
本章の一部は非公表

インターネット公表に関する
共著者全員の同意が得られていないため、
本章の一部は非公表

インターネット公表に関する
共著者全員の同意が得られていないため、
本章の一部は非公表

インターネット公表に関する
共著者全員の同意が得られていないため、
本章の一部は非公表

インターネット公表に関する
共著者全員の同意が得られていないため、
本章の一部は非公表

インターネット公表に関する
共著者全員の同意が得られていないため、
本章の一部は非公表

インターネット公表に関する
共著者全員の同意が得られていないため、
本章の一部は非公表

インターネット公表に関する
共著者全員の同意が得られていないため、
本章の一部は非公表

インターネット公表に関する
共著者全員の同意が得られていないため、
本章の一部は非公表

インターネット公表に関する
共著者全員の同意が得られていないため、
本章の一部は非公表

インターネット公表に関する
共著者全員の同意が得られていないため、
本章の一部は非公表

インターネット公表に関する
共著者全員の同意が得られていないため、
本章の一部は非公表

インターネット公表に関する
共著者全員の同意が得られていないため、
本章の一部は非公表

インターネット公表に関する
共著者全員の同意が得られていないため、
本章の一部は非公表

インターネット公表に関する
共著者全員の同意が得られていないため、
本章の一部は非公表

第2章-Prdm9 遺伝子への低形質性変異の導入とその機能解析

序論

第1章で明らかとなった *Prdm9* ZFA の多型とその機能の関係を探るために、本章ではノックイン (KI) マウスの作成による機能解析を行った。

マウスの減数分裂期における染色体分配では、動原体によって染色体が両側に引かれる際に染色体間に一定の結合がないと均等に分配されず、最終的に減数分裂が停止する。染色体間の結合力を担保する構造は、シナプトネマ複合体と染色体間の交叉である。交叉は相同組換えの際に生じる姉妹染色分体間の乗換えによる構造であるが、正常な個数がない場合は染色体分配に異常が生じることが知られている (Hassold and Hunt, 2001, Rockmill et al., 2006)。

Prdm9 はいくつかの機能が推定されているが、その中でも注目されているのが組換えホットスポットの位置決定に関するものである。特に *Prdm9* の中の ZFA は、ホットスポット配列の認識に関わる可能性が高いという点で、ヒストンメチル化に関与すると思われる PR/SET ドメインと合わせて、*Prdm9* 機能の中心的役割を果たしていると考えられる。ZFA 型に依存して *Prdm9* が全く異なる配列と結合する可能性が示唆されているが、ZFA 配列を改変した遺伝子改変マウスを作成することで、実証的に *Prdm9* の局在と組換えホットスポット形成の関係を明らかにすることができる。また、これまでに指摘されている *Prdm9* の種分化遺伝子としての機能についても、同一のゲノム DNA 背景で ZFA のみを改変し、様々な ZFA KI マウスを作成し、交配を行うことができれば、ZFA の変化により種分化につながる不妊が引き起こされるか否かを実験的に検証することが可能になる。

既に先行研究では、*Prdm9* の KO マウスや、ミュータント、ノックインマウスが報告されている。報告された KO マウスは (Hayashi et al., 2005)、翻訳開始点付近の配列を置換して翻訳が停止する系統であり、表現型はホモ接合体で雌雄とも不妊となる。ミュータントは ZFA の前でストップコドンが入る系統が存在する (Sun et al., 2015)。ノックインマウスは *Prdm9*^{CST} マウス (Baker et al., 2015) が相当し、このマウスでは ZFA が B10. R209-wm7 系統と同じ配列に置換されている。

1章でクローニングした種々の ZFA を利用して、ZFA に着目した *Prdm9* の機能解析を行うためには、こうした ZFA 領域を迅速かつ効率的にノックインできる仕掛けを盛ったマウ

システムを作成する必要がある。そのため本研究では特に以下の3点に着目しKIマウスの遺伝子改変コンストラクト作成を行った。

第一に、本研究開始時点で抗Prdm9抗体が得られていなかったため、マウスの内在性物質に由来しないエピトープタグを導入し、Prdm9を市販の汎用的なエピトープ抗体で検出することを考えた。第1章のcDNAクローニングの段階で、他の遺伝子に比してPrdm9は発現量が低いことが予想されたため、検出感度が高く、これまでに使用実績が多い高感度の抗体およびエピトープタグを使用することが重要である。本研究ではインフルエンザウイルスのヘマグルチニンに由来するHAタグを使用した。

第二に、Prdm9の内在的活性を、低形質性変異などを導入することで、マウス生体内で制御することを考えた。これまでのPrdm9の発現解析は、KOマウスを利用しヘテロ接合体とすることで発現量を変化させるなどの取り組みしか行われていない(Baker et al., 2015)。質的な解析もPR/SETドメインに変異を導入したリコンビナントPrdm9に関する試験管内での活性解析にとどまる(Wu et al., 2013)。さらには、PR/SETドメインと並んで機能的に重要なZFAの機能解析は手付かずの状態である。Prdm9の内在活性の制御に関しては、前述のタグ配列をZFAの直後のC-末端に付加することで低形質性Prdm9を作製できる可能性がある。実際、DSBを形成するSpo11では同様なアプローチにより低形質性変異を導入した例が報告されている(Diaz et al., 2002, Martini et al., 2006)。Prdm9とSpo11、いずれのKOマウスも不妊となるため(Romanienko and Camerini-Otero, 2000, Hayashi et al., 2005)、部分的に活性を維持した形の低形質性変異の導入が機能解析を行う上で重要である。

第3にKIマウス作成後に容易にZFAの入れ替えを可能にすることがあげられる。既存の遺伝子ターゲティング手法ではKIマウス作成後に再度ES細胞を採取し同様のターゲティング・移植・交配操作を行うか、それぞれのZFAバリエントについてターゲティングを行う必要がある。これを回避するため本研究では変異lox配列を利用した遺伝子カセット交換法(Araki et al., 2002, Ohtsuka et al., 2010)を参照し、ZFAを含む最終エクソン前後に導入する。その後作成したKIマウスに由来する受精卵に組換えコンストラクトとCREリコンビナーゼを注入すると組換えが起き、その受精卵より発生した個体はZFAのみ遺伝子組換えがなされることを目標とした。

材料と手法

1. 遺伝子ターゲティングによる KI マウスの作成

本研究に使用したマウス *Prdm9*^{R209-HA} KI マウスは、C57BL/6 系統に由来する ES 細胞の *Prdm9* 最終エクソンを B10.R209-wm7 系統由来の配列で置換し、エピトープタグとして HA タグを付加し、その前後を変異 *lox* 配列で囲んだ KI マウスである。

ターゲット用遺伝子コンストラクトの作成は、まず C57BL/6 系統に由来するゲノム DNA より PCR で *Prdm9* 最終エクソンとその前後 18.5 kbp を数か所に分割してクローニングした。次に R209 系統の最終エクソンも PCR で増幅しストップコドンに変異が入り、その付近に AgeI 制限酵素サイトが付加するようにした。同時に合成した 3xHA タグ配列とスペーサー、*Frt*-ネオマイシン耐性遺伝子配列を用意した。なお、これらの塩基配列は太田研究室の pCHA No.1、城石研究室の pBlueScript-FRTNeolox、pKO Scrambler V901+DTA、Invitrogen の GeneArt に由来する (表 1.)。

また、ホモロジーアームとしてロングアームとショートアームをそれぞれ約 9.8 kbp と 5.6 kbp 設定し、予想される RNA のプロセシングの位置を考慮しながら、最終エクソンとの境付近に変異 *lox* 配列 (*lox71*, *lox2272*) を導入可能なオリゴ DNA を用意した。これらの配列を結合し、クローニングとシーケンス確認を繰り返して得られた産物を ES 細胞トランスフェクション用ベクターに入れ、ランダムに導入された場合にジフテリアトキシン A フラグメントが発現されるようにした (図 2.)。このコンストラクトを適当な制限酵素サイトで切断し直線的にした後精製し、C57BL/6 系統に由来する ES 細胞にエレクトロポレーション法で導入した。G418 を用いた薬剤選択と PCR、サザンブロットングによって、標的となる *Prdm9* 最終エクソンにコンストラクトが導入されているクローンを仮親に移植し、キメラマウスを得た。キメラマウスは 1 度野生型 (WT) マウスと交配を行い、毛色により目標とする ES 細胞由来の個体を選択し、さらにそのヘテロ接合体同士で 1 回交配を行い、KI マウスを得た。

2. サザンブロット

ES 細胞より抽出したゲノム DNA を任意の制限酵素で断片化した。この際の制限酵素は DNA プローブを設計した位置を含む制限酵素処理後の断片長が、KI で挿入された配列によ

って検出可能な変化をすることが望ましく、今回の実験では Puv I (TAKARA) を選択した。

断片化後、分子量マーカールとともに 0.7%アガロースゲル電気泳動により配列長に依存した展開を行った。その後、純水で洗浄、加水分解液 (0.25 M HCl) で 10 分ゲルを処理した。さらに洗浄後、変性溶液 (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) で 15 分処理、中和溶液 (0.5 M Tris-HCl (pH 8.0), 1.5 M NaCl) で 15 分処理、20xSSC 溶液 (3 M NaCl, 300 mM クエン酸ナトリウム (pH 7.0)) の順で処理を行った。このゲルより 1 晩かけて濃度勾配を利用し DNA をメンブレン (Hybond -N+; GE Healthcare) に移動させる。DNA の保持されている表側に紫外線を照射しメンブレンとクロスリンクさせた。その後メンブレンを純水で洗浄し塩を除き乾燥させ 4°C に保存した。

検出に用いる DNA プローブへのラベリングは PCR を用いて行い、Ex Taq (TAKARA) キット添付プロトコルのうち核酸を DIG mix Labeling Mix (Roche) に交換したものを、DNA プローブのラベリング用プライマー (表 2.) により合成した。PCR 産物は通常の 3%アガロースゲル電気泳動で分離し、切り出した後 QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) で精製した。

DNA プローブのアニーリングは、まずプラスチック製の袋を用意しブロット済みメンブレンを入れ、42°C に保温した 10 mL の DIG Easy Hyb (Roche) を加えて密封した。これを 42°C で 30 分保温しながら振とうする。同時に 500 ng の精製した DNA プローブを 50 μ L の純水に溶解させ 95°C で 5 分変性させた。氷上に移動し急冷した後、5-10 mL の DIG Easy Hyb に加えた。振とうしているメンブレンから DIG Easy Hyb を除き、DNA プローブを加えた DIG Easy Hyb と交換した。これを 42°C で 1 晩振とうした。メンブレンを取り出し、200 mL の室温 0.1% SDS, 2xSSC 溶液内で 5 分振とうし、続いて 65°C の 0.1% SDS, 0.5xSSC で 15 分 2 回振とうした。

DNA プローブの検出は以下すべて室温で、まず上述のメンブレンを 100 mL の洗浄バッファー (0.1 M マレイン酸, 0.15 M NaCl (pH 7.5) , 0.3% Tween20) 内で 5 分振とうした。次に 100 mL のブロッキング溶液 (0.1 M マレイン酸, 0.15 M NaCl (pH 7.5)) を用いて、Blocking reagent; Roche を 10 倍希釈) 内で 30 分振とうした。さらに 20 mL の抗体溶液 (Anti-Digoxigenin-AP; Roche をブロッキング溶液で 1:10000 に希釈) 内で 30 分インキュベートした。そして洗浄バッファーで 2 回洗浄後、検出バッファー (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl,

pH 9.5) 20 mL で 3 分間平衡化した。処理後、表側に CDP-Star (Roche) 数滴を 10ml 程度の検出バッファーで希釈した溶液を、シーリングされた袋の中で加え 5 分間インキュベートした。これと Hyperfilm ECL (GE Healthcare) を暗室で数分感光後、現像した。

3. PCR

基本的な操作は第 1 章で行った PCR と同様だが、用いたゲノム DNA の抽出法とプライマー (表 1.) は異なる。ゲノム DNA は主に成体 KI マウスの耳と尾から抽出・粗精製したものをを用いた。

4. 変異 *lox* 配列を利用した遺伝子交換

本研究で利用する遺伝子交換反応は、変異 *lox* 配列と CRE リコンビナーゼを使用し、受精卵へのインジェクションのみで目標とする領域の配列を交換する Pronuclear injection-based targeted transgenesis (PITT) 法と呼ばれるものである (図 3.) (Ohtsuka et al., 2010)。CRE リコンビナーゼは本来 *loxP* 配列を認識し、それらの間で組換えを生じさせる酵素だが、*loxP* 配列に変異が入っている場合には、位置選択的な組換えや平衡反応の偏りによるほぼ不可逆的な組換えを起こす。今回は *lox66*, *lox71*, *lox2272* の 3 種類の変異 *lox* 配列を利用した。CRE リコンビナーゼ存在下で *lox66* は *lox71* と組換えを起こすが、組換え後の *loxP* 配列と *lox72* 配列のうち、*lox72* 配列は *lox66*, *lox71* それぞれの配列に由来する変異により CRE リコンビナーゼが認識しなくなる。そのためほぼ不可逆的な組換えとなる。また、*lox2272* は *loxP*, *lox66*, *lox71* いずれの配列とも組換わらず、*lox2272* 配列とだけ高効率で組換えを起こす。

以上の性質を利用して、*lox71*, *lox2272* 配列で図のように囲んだ最終エクソン領域を KI マウス作成時に用意した。それに対しドナーとなるベクターには、方向を対応させた *lox66*, *lox2272* 配列を ZFA を囲むように配置した。このドナーベクターを CRE リコンビナーゼ発現ベクター (pCAGCRE) と同時に受精卵前核へ注入することで、PITT システムが作動すると考えられる。本来、CRE による相同組換え反応はそれ自体では効率が低いとされており、薬剤選択が可能な ES 細胞と遺伝子の組み合わせに対して行われることが多いが、報告によると受精卵でも 4.3% 程度の効率で相同組換え可能としている(Ohtsuka et al., 2010)。

また参照した方法では導入配列をコードしているドナープラスミドと CRE 発現ベクターは分けられていたが、本実験では同一のプラスミド上にあっても差し支えないと考え、1つのプラスミド (All in one vector: Aiov) として合成した (図 4.)。Aiov は予備実験としてトリ DT40 細胞へのトランスフェクションにより *loxP* 配列の組換えを観察しており、CRE リコンビナーゼの発現を確認している。KI ホモマウスに由来する精子と、KI ホモマウスまたは C57BL/6 系統、*CRE*/+系統マウスに由来する卵を用いた体外受精 (in vitro fertilization; IVF) で作成した受精卵の前核に、Aiov を 8 ng/μL の濃度でインジェクション用緩衝液 (Tris-HCl (pH 7.5) 5 mM, EDTA 0.1 mM) に溶解させインジェクションした。インジェクション後の受精卵は 1 晩培養後、発生の進行を確認して仮親の卵管に移植した。

遺伝子の入れ換えに用いたヒト型 *Prdm9* (*hPRDM9A*) はヒトの *PRDM9-A* 型として報告されている登録配列 (Baudat et al., 2010 ほか; Accession No. GU216222) を利用し、GeneArt (Invitrogen) の遺伝子配列最適化により核酸配列を編集、人工遺伝子合成 (Genewiz) で合成した。配列の最適化により本来のヒト由来 *PRDM9* 配列は予測されるタンパク質では保存されるが、コードしている塩基配列としては保存されていない。

5. 精母細胞の免疫染色

精母細胞は生後 18-20 日齢のオスのマウスより摘出した精巣由来のものを用いた。白膜を除き、60 μL の 10% FBS (Gibco) / PBS が入った時計皿上で、18G 注射針 2 本ですりつぶした。細切後の懸濁液を total 1.2 mL の FBS/PBS で洗いながら回収した。孔径 100 μm, 40 μm のナイロンメッシュ (Falcon 100 μm, 40 μm セルストレーナー; CORNING) に懸濁液を順に通し、4000 rpm、4°C、2 分で遠心した。その後上清を除き等量の 10% FBS/PBS を加え、同条件で遠心した。この上清を除き、1.85% ホルムアルデヒド/ 0.05 M スクローズで 1 分間固定する。1 分後ただちに 10% FCS/PBS を 500 μL 加えて 4000rpm、4°C、2 分で遠心した。10% FBS/PBS を加え 2 回洗浄し、MAS コート付きスライドガラス (松浪硝子工業) に塗布した。これをしばらく風乾させた。

スライドを PAP ペン (DAKO) で区切り、PBS で 3 分間洗浄し、続いて 0.5% TritonX-100/PBS で 10 分間処理した。その後 PBS で 3 分間 2 回洗浄し、0.1% TritonX-100/10%FBS/PBS で 1 時間ブロッキングを行った。ブロッキング後、1 次抗体として

Rabbit Anti-SCP3 抗体 (Novus biological (NB300-231))、 Mouse Anti-MLH1 抗体 (BD Pharmingen (551091))、 Rabbit Anti-phospho-H2A.X (Ser139) 抗体 (Upstate (07-164))を使用し、ブロッキング溶液にそれぞれ 200 倍、20 倍、200 倍で溶かしスライドグラスに展開した。スライドグラスは湿潤箱に入れ1晩静置した。抗体溶液をふき取り 0.05% TrionX-100/PBS で3分2回の洗浄を行い、最後に PBS で3分間洗浄した。2次抗体として Goat Anti-rabbit IgG 抗体 Alexa488、Goat Anti-mouse IgG 抗体 Alexa488、Goat Anti-rabbit IgG 抗体 Alexa568 (全て Molecular probes) をブロッキング溶液に溶かしスライドグラスに展開した。この状態で湿潤箱内において室温で 60 分反応させた。抗体溶液をふき取り 0.05% TrionX-100/PBS で3分2回の洗浄を行い、最後に PBS で3分間洗浄した。PBS 中で DAPI または Hoechst 染色を行い、PBS で洗浄した後、Vectashield (Vector laboratories) とカバーガラスで封入し顕微鏡 (BX51; オリンパス) で観察した。

6. 組織切片の作成と免疫染色

成体のオスマウスを解剖し精巣を摘出した。摘出した精巣をマイルドホルム (純水 500 mL に対し、ホルマリン原液 100 mL、リン酸二水素ナトリウム・二水和物 2.25 g、リン酸水素二ナトリウム・12 水和物 8.19 g、メタノール 100 mL を加える) に漬け、1晩常温で静置した。翌日固定した精巣を 70%エタノールに移し保存した。エタノール中で保存した精巣を密閉式自動固定包埋装置 (ETP-150CVP; SAKURA) でパラフィン包埋し、マイクロトームで 5 μ m 厚の切片としてスライドを作成した。

スライドの免疫染色処理は、まず 60°C で 20 分加熱しパラフィンを溶解させた。次にキシレンで 10 分 4 回処理し、100, 90, 80, 70%エタノールで 3 分ずつ処理した後、水道水に 10 分、さらに純水で洗浄した。続いて PBS 中に 2 分おき、抗原の賦活化処理としてクエン酸バッファー (純水 1 L あたりクエン酸二水和物 2.94 g (pH 6.0)) 中にスライドを保持した染色カゴごと漬け、800 W の電子レンジで 5-10 分加熱処理、室温まで冷却後 PBS 中に 2 分おき置換した。次に 0.1% TritonX-100/ 10%FBS /PBS で 1 時間ブロッキングし、ブロッキング液を除き、1 次抗体としてブロッキングに用いた溶液で Rabbit Anti-HA tag 抗体-ChIP Grade (ab9110) を 500 倍になるよう希釈し、PAP ペンで区切ったスライド上の組織に展開した。この状態で 1 晩 4°C で静置した。PBS で 5 分 2 回洗浄した後、2 次抗体として Goat Anti-rabbit

IgG 抗体 Alexa488 をブロッキング溶液で 500 倍希釈しスライドにアプライした。この状態で 2 時間、常温で静置し、反応後 PBS による 5 分 3 回の洗浄を行った。最後に Vectashield とカバーガラスで封入し顕微鏡で観察した。

結果

Prdm9 KI マウスの作成

ターゲティングベクターの作成は当初、*Prdm9* 領域を含む BAC クローンを利用して作成を試みた。この方法 (Narayanan and Chen, 2011) ではホモロジーアームを容易に付加することができる半面、遺伝子によっては大腸菌内での置換が困難な場合がある。本研究の場合、BAC クローンを保持している大腸菌の増殖は確認できたが、目標とする遺伝子組換えコンストラクトの導入と切り出しを行うことができず、PCR で断片を分割しクローニングする方法に変更した。

遺伝子ターゲティングにより作成した *Prdm9* 遺伝子改変マウスの確認は主に PCR とサザンブロッティングにより行った。まず、ターゲティングに用いたコンストラクト内の配列と、ホモロジーアームとして含んでいるゲノム DNA 領域の外側の配列を用いて PCR プライマーを設計した。ES 細胞より抽出した DNA に対し、このプライマーで PCR を行ったところ、144 株中 80 株の ES 細胞株で目標とする 5.4 kbp の位置にバンドが検出された (図 4)。このうち 2 株に由来する ES 細胞を胚盤胞へ注入し、仮親の子宮に移植した。仮親からはキメラマウスが生まれ、これを C57BL/6 系統と交配し生まれた仔の尾に由来する DNA を用いてサザンブロッティングを行った。結果、*Prdm9* ZFA を含むゲノム DNA の Pvu I 断片を検出する DNA プローブで、ターゲティングが行われた場合に予想される位置にバンドが出現した (図 5.)。

さらに、KI マウス精巣より抽出した mRNA をもとに合成した cDNA を PCR で増幅し、配列解析を行った (図 6.)。その結果、KI マウスの *Prdm9* cDNA は HA-tag の挿入と B10.R209-wm7 系統に由来する ZFA 型への置換がなされていることを確認した。

Prdm9 KI マウスの表現型

作成した *Prdm9* KI マウスは、ZFA とゲノムの背景に着目すれば既報の B10.R209-wm7 系統や *Prdm9*^{CST} と同様である。これらのマウスでは野生型 (Wild Type, WT) とされる C57BL/6 系統と比較して目立った表現型は観察されていない。

そのため繁殖や維持はそれらのマウスと同様に行うことができると考え飼育を行ったところ、ヘテロ接合体の状態では特に問題はなかったが、ホモ接合体の場合に繁殖に要する

時間が WT と比較して延長した。特に初産日数は KI マウスが 97.62 日 (n=13)、WT が 74.6 日 (n=20) と平均 23 日延び (p=0.00156, Welch's t-test)、*Prdm9* KO マウスのヘテロ接合体 (*Prdm9*^{+/-}) に類似する (Baker et al., 2015) 表現型となった。この結果から、今回行ったエピソードタグの付加により *Prdm9* が低形質性となり、減数分裂の進行に何らかの問題が生じたと考えられた。

そこで、減数分裂期の精母細胞を免疫染色し、シナプトネマ複合体の形成状況と正常な DSB の形成と修復が行われているかを確認した。試料はマウス精巣における減数分裂の開始時期であるパキテン期細胞の割合が最も高く生後 18-20 日齢のオスを使用した。その結果、KI ホモマウスでは *Scp3* で染色されたシナプトネマ複合体の形成が不完全な細胞が、B10.R209-wm7 系統と比較して多数確認された (図 7.)。γH2A.X は DSB の修復シグナルとして用いられるリン酸化ヒストンである。B10.R209-wm7 系統の減数分裂パキテン期の細胞で γH2A.X の局在を調べると、γH2A.X は性染色体周辺にのみ局在したのに対し、KI マウスでは先行研究で報告されている *Prdm9*^{-/-} マウスとよく似た常染色体における分布が認められた。染色体上の交叉部位に局在する修復タンパク質 *Mlh1* は、B10.R209-wm7 系統と比較すると不明瞭なシグナルしか観察できない状態だった (図 8.)。また、抗 HA-tag 抗体により *Prdm9*-HA の局在確認を試みたが、生後 18-20 日齢のオス精母細胞への免疫染色では、非特異的なシグナルしか得られず、予測される核内局在は見られなかった (図 9.)。生後 30 日齢の KI ヘテロマウスの精巣を摘出し、切片作成後に抗 HA-tag 抗体で免疫染色し、蛍光顕微鏡で観察した場合も同様だった (図 10.)。

受精前核へのインジェクションを利用した遺伝子交換の試み

今回の KI マウスに導入を確認した、*lox71-lox2272* 間の *Prdm9* ZFA を含む領域に対しヒト A 型の ZFA を導入しようと試みた。交換用ベクターを設計するに当たり、ヒト A 型 ZFA はマウスでのコドン使用率を考慮した塩基配列の最適化を行った。並行して使用した CRE リコンビナーゼをコードする配列は、3 回目の PITT まで合成したコドン最適化配列を使用した。それ以降は参照した報告で用いられている配列を使用した。

まず *Prdm9* KI マウスの 3 カ月齢以降のオスより採取した精子と、C57BL/6 系統のメスに由来する卵を用いて IVF で受精卵を作成した。IVF の結果、通常の C57BL/6 系統や C3H/HeJ

系統に由来する精子や受精卵を用いた場合と比較して受精率が低下した (表 3.)。しかし、インジェクションと移植が可能な数量の受精卵は得られたため PITT を行った。結果、これまでに全て *Prdm9* KI マウスホモ接合体に由来する精子を用いて、C57BL/6 系統との受精卵から 29 頭、*Prdm9* KI マウスホモ接合体との受精卵で 27 頭の PITT 済みの仔マウスが得られたが、1 頭のみ交換ベクターがランダムに挿入された Tg マウスが得られたのみで、目標とする交換反応は起こせなかった。

そこで、CRE 発現ベクターからのリコンビナーゼ発現効率が十分でない可能性を疑い、*CRE*+/+マウスに由来する卵を使用して作成した受精卵に対して交換ベクターをインジェクションした。この系統に由来する卵では CRE リコンビナーゼが、ゲノム DNA 中の一般的な *loxP* 配列の組換えをほぼ確実に起こす量発現しており、通常であれば高効率で組換え反応を起こすことが可能である。しかしながら、この卵を使用した場合得られた仔マウス 10 頭でも PITT は起こせなかった。なお最終的な移植胚数に対する産仔数は (表 4.) に示すようになり、同時期に行った胚操作の結果得られた産仔数より出生率が低かった。

考察

本章で作成した *Prdm9* KI マウスは、HA タグの付加により ZFA の機能を低形質性に変化させたと考えられる。これまでに酵母の Spo11 タンパクでも C-末端に HA タグ、His タグ配列の付加により Spo11 の低形質化が生じる例 (Diaz et al., 2002) が報告されている。付加したタンパク質の機能に対する相互作用を避けるため、エピトープタグは重要な機能ドメインから距離をとるために C-末端か N-末端のいずれに付加するか考慮し、セリンやアラニン、グリシンなどで構成されるスペーサー配列を挿入するなどの工夫をする必要がある。今回もマウス *Prdm9* ZFA のうち C-末端側のリピートが塩基認識をしている可能性は低いとの複数の報告 (Walker et al., 2015, Baker et al., 2015, Billings et al., 2013) をもとに、*Prdm9*^{R209} の C-末端に汎用される HA タグを3個タンデムに付加し、さらにスペーサー配列を挿入しており、これによる低形質化が原因ではないと考えられる。なお、Baker らの最近の報告によると、*Prdm9* の N-末端に Flag タグを付加した場合、培養細胞における強制発現時の結合配列は、抗 *Prdm9* 抗体による ChIP-Seq が行われた際に確認された *Prdm9*^{R209} 結合コンセンサス配列とほぼ一致していた (Baker et al., 2015)。しかし、本研究では N 末端側に Flag タグを連結するように配置すると、CRE による組換え部位から 18kb 以上も離れているため、一度で ZFA の置換を行うことが困難であると考え、C 末端側にタグを付加した。今後は、HA タグを付加しないか、N 末端側に付加するかの対応が必要と考えられる。

一方で、今回作製した *Prdm9*-HA KI マウスで、減数分裂の異常が観察され、最終的に受精率が低下したことは興味深い。この表現型は減数分裂と精子形成に関わる遺伝子の発現を低下させた場合にみられる表現型であり、特に γ H2A.X シグナルの局在は既報の *Prdm9* ミュータント (Sun et al., 2015) や、*Prdm9* KO マウスのヘテロ接合体 (Baker et al., 2015) と同様であった。このような常染色体への γ H2A.X シグナル分布は、*Prdm9* の染色体上への局在低下により、本来の組換えホットスポットとは異なる遺伝子プロモーター領域への DSB の導入が原因であるとされている (Brick et al., 2012)。交叉部位の組換え節 (組換えノジュール) と共局在する Mlh1 フォーサイの観察を試みたが、Mlh1 フォーサイは不明瞭であり、染色体上の交叉部位の個数を数えるためには不十分であった。なお、既報の *Prdm9* ミュータントにおいても Mlh1 フォーサイが消失しており (Sun et al., 2015)、今回の *Prdm9*-HA による低形質性表現型は、DSB 切断後の修復過程にも異常が生じていることを示唆している。

Prdm9 は発現の時期特異性が高く、減数分裂中の精母細胞の初期に発現することが、近年取得された抗 Prdm9 抗体を使用した研究から明らかとなった (Sun et al., 2015)。この報告によると Prdm9 は減数分裂を開始した精母細胞のうちレプトテン期の初期に強く発現する。レプトテン初期では染色体は対合しておらず、減数分裂期前 DNA 合成と減数分裂期特異的な染色体構造が形成される。またこの時期には、組換えホットスポット特有のヒストン修飾が施され、DSB など組換え関連タンパクの局在が始まる (Crichton et al., 2014, Paigen and Petkov, 2010)。本研究では主に 18 日齢付近のマウスを使用して実験を行ったが、これは Prdm9 の発現が 18 日齢まで観察されていること (Hayashi et al., 2005) と、同時期に確立されるシナプトネマ複合体との共染色により Prdm9 の減数分裂期の特異的発現を観察するためである。しかし、後に Prdm9 は減数分裂期を通じて強く発現しておらず、また発現量も限定的であるとの報告がなされた (Sun et al., 2015)。したがって、今後はより早い時期 (例えば 8 日齢付近) の試料を使用し、Prdm9 の局在を解析する予定である。

KI マウス作成後に ZFA 領域に限定した遺伝子改変を行うため本研究では PITT 法を用いた。H2-Tw3 と Rosa26 遺伝子座について、当該領域に変異 lox 配列を導入した遺伝子改変マウスの精子と、BDF1 マウスに由来する卵より作成した受精卵に、対応する変異 lox 配列を含む組換えベクターと CRE リコンビナーゼ発現ベクターを混合してインジェクションすると、最終的に生まれたマウスのうち 4.3%程度が組換えを起こしているという報告がなされている (Ohtsuka et al., 2010)。

本研究では同様の方法で PITT を行っているが、ランダムインテグレーションによるマウスが 1 頭得られたのみで期待する効率は得られていない。インジェクションを行った個数に対する組換え効率の低さと同時に、移植した受精卵からの産仔数も少なく出生率は 11.7% だった。同時期の IVF 胚の移植による出生率は細胞質にインジェクションした場合では 31.5% 程度、参照した PITT の報告では 27.4% (Ohtsuka et al., 2010) だったことを考慮すると、Prdm9 KI 胚は移植後に発生異常が起きた可能性が考えられる。

遺伝子ターゲティングの効率はゲノム上のどの領域に対して行うかで大きく異なることが知られている。遺伝子ターゲティングとして最も古くから用いられている方法では、ES 細胞に対する組換え効率は 1000 個の細胞に対し 1 個程度 (Capecchi, 2005) であり、薬剤選択をした場合でも数%程度にとどまる。近年ゲノム編集技術として任意の領域に限定した組換

え効率の向上と、工程の短縮化が盛んに議論されているが、Zinc Finger Nuclease (Geurts et al., 2009)、TALEN (Boch et al., 2009, Bogdanove and Voytas, 2014)、CRISPR-Cas9 (Wang et al., 2013) といった部位特異的な DSB を誘導する因子を併用しても、全ての標的配列で十分な効率の組換えが起こせているとは言い難い。今回の遺伝子交換反応では、変異 *lox* 配列を導入するターゲティングでは比較的高効率な結果を示した *Prdm9* ZFA 領域を標的としているが、参照した PITT の報告では *H2-Tw3* と *Rosa26* 遺伝子座を使用している。*H2-Tw3* は 17 番染色体 MHC 領域に存在し、*Rosa26* は 6 番染色体上の高頻度組換えが観察される領域である (Soriano, 1999)。CRE リコンビナーゼによる PITT を用いた場合でも、これらの遺伝子座と *Prdm9* 領域では組換え頻度が異なり、受精卵での組換えを起こすのに十分な効率ではないことが考えられる。

表 1. KI コンストラクト作成に使用したプラスミド

プラスミド名	由来	使用領域
pCHA No.1	太田研究室	3xHA tag
pCRII BluntTOPO+lox71, lox2272	太田研究室	<i>lox71</i> , <i>lox2272</i> 配列
pBlueScript-FRTNeoIox	城石研究室	<i>FRT-Neo</i> 発現領域
pKO ScramblerV901+DTA	城石研究室	外側の <i>大腸菌</i> 用選択マーカー DTA フラグメントなど

表 2. 本章の実験で使用したプライマーのうち重要なもの

プライマー名	塩基配列
Prdm9Ex11-MluI-SacII_F	TGACATCTTTGTGTGTGAGCCGAGCTATTC
Prdm9Ex11-MluI-SacII_R	CTGCCATCACTTCCTTCGGTGATGTACTG
Prdm9KI-PCRC candidate1_F	AAGACCGACCAAGCGACGTCTGAGAGC
Prdm9KI-PCRC candidate1_R	GTCCCCTGCCATTCAAGCCAGAGACCA
Prdm9-SA_side_3'ProbeF	TGGCACAGTAGAAGCAGCACCTCTATCTCT
Prdm9-SA_side_3'ProbeR	CGCCAGTATGAATCATCCGGTGTACTGCCA
Prdm9-cDNA.V1_F	TTCTAGGCTCAGGCCCGACCATAGG
Prdm9-cDNA.V1_R	GCTGTGGCTTTCTCATTCTTTTCG
Prdm9-mlox5_4.5k_F	ATCTCACCAGCCCCGAGACCTAGTATC
Prdm9-mlox5_4.5k_R	GTCTGGCCTGTTCTGAGCTCTTCCACA
hPRDM9A-swap_c_v2.3F (66:449)	GCAGAGGGTTCCGGGACAAGTCTC
hPRDM9A-swap_c_v2.3R (66:449)	TCACTCGTCGGGTATACAGGCACCG

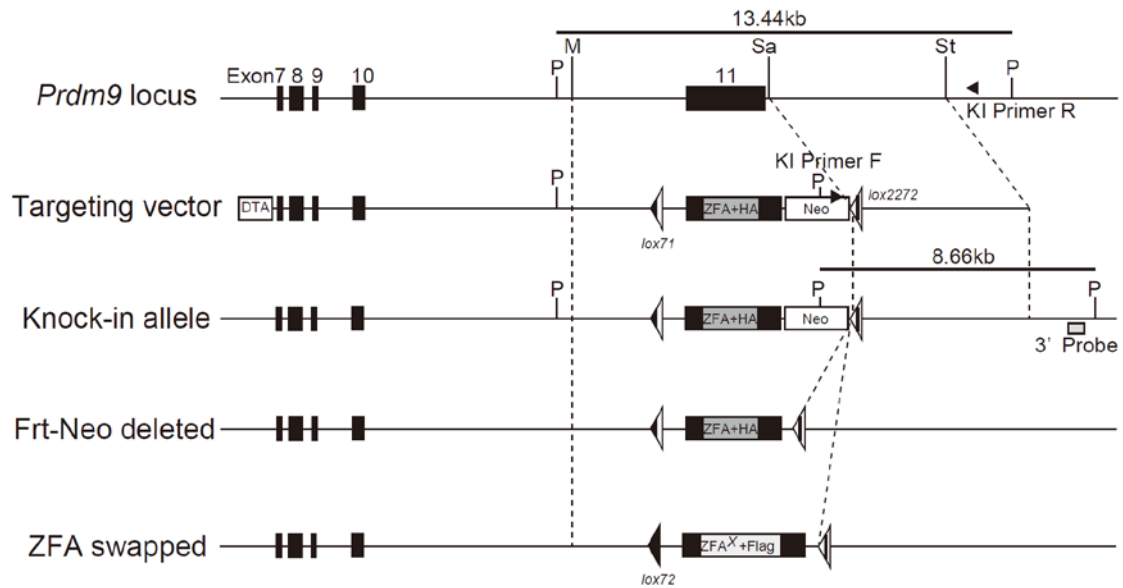


図 1. *Prdm9* ZFA のターゲティングと完成後の KI マウスの *Prdm9* 遺伝子座

クローニングした *Prdm9* 遺伝子 7 番エクソンから 11 番エクソン付近まで 18.5kb をもとに、ターゲティングベクターを作成した。ターゲティングベクターのロングアームの 5' 端にジフテリアトキシン A フラグメント (DTA) 発現配列を付加し、ランダムインテグレーションの選択マーカーとした。PCR によるターゲットされた ES 細胞の判別は、図中の KI Primer で行った。サザンブロットによる導入確認は、3' 方向付近のゲノムを認識するプローブにより行った。その際に図中の P で示した Pvu I 制限酵素サイトによる切断を行った。他の略号はそれぞれ M: Mlu I、Sa: Sac II、St: Stu I を示し、コンストラクト作成の位置の目安に使用した制限酵素サイトを示す。図中には *Flp*/+マウスとの交配によりネオマイシン耐性遺伝子を除去した状態の KI マウスと、対応する変異 *lox* 配列・CRE リコンビナーゼを作用させた場合に ZFA が相同組換えにより交換された場合の例も示した。

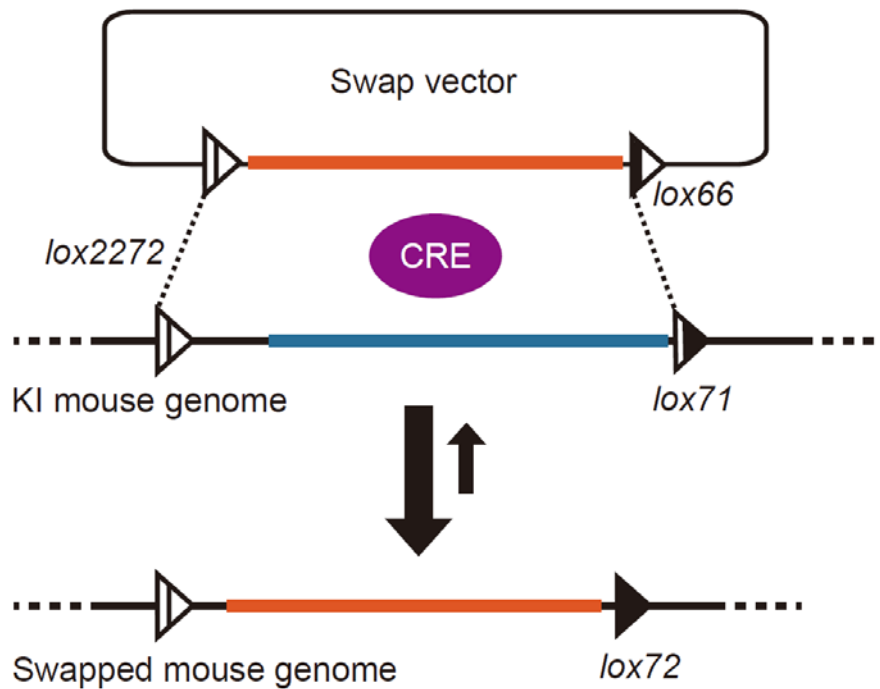


図 2. 変異 *lox* 配列と CRE リコンビナーゼを利用した相同組換え

KI マウス側のゲノムに *lox71* 配列と *lox2272* 配列で囲まれた入れ換え可能な領域 (青) がある。交換ベクター (Swap vector) 上に導入アレル (オレンジ色) を、ゲノムの *lox2272*、*lox71* 配列と対応させた方向の、*lox2272*、*lox66* 配列でそれぞれ囲む。このベクターと CRE リコンビナーゼ発現ベクターを、同時に KI マウスゲノムを含む受精卵にインジェクションすると位置特異的な組換えが生じ、ベクター側の配列がゲノムに導入される。

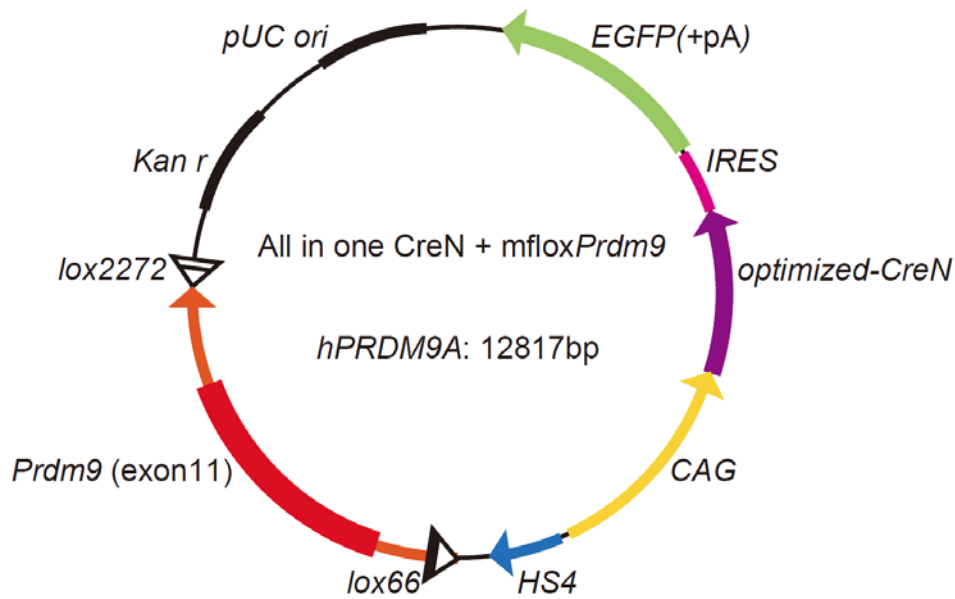


図 3. CRE リコンビナーゼ発現領域と変異 *lox* 配列をもつ入れ換えベクター

入れ換えベクターは pCRII BluntTOPO の骨格に CRE リコンビナーゼ発現領域と変異 *lox* 配列により相同組換えを起こさせる領域をそれぞれ配置した。さらに間にトリ *HS4* インシュレーター配列を配置し CAG プロモーター領域からの影響を低減させ、CRE リコンビナーゼの下流に IRES による *EGFP* 発現を同時に行うよう設計した。

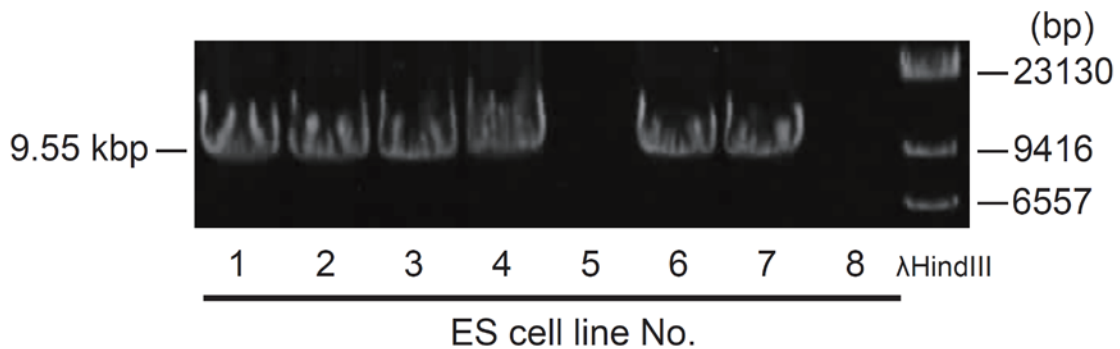


図 4. 遺伝子ターゲティング確認のための PCR

ターゲティングベクターの導入を確認するために、ベクターのショートアームをまたぐ位置で設計したプライマーを用いた PCR 産物を電気泳動した結果、組換え後に予測される 9.55 kbp の位置にバンドが観察された。この位置以外で設計したプライマーでも同様の結果が得られ、多くの ES 細胞で遺伝子ターゲティングが成功したと考えられた。

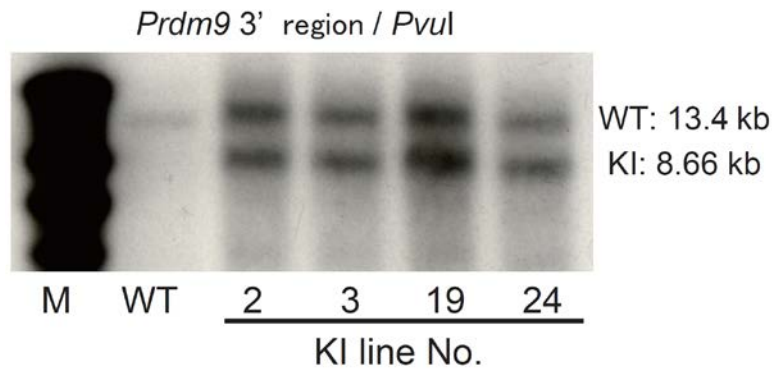


図 5. 遺伝子ターゲティング確認のためのサザンブロット

サザンブロットの結果、*Prdm9* KI の試料で目標とする領域 (WT: 13.4 kbp, KI: 8.66 kbp) の長さの変化が観察された。図の KI マウスの全てで *Prdm9* の片側アレルが遺伝子ターゲティングにより置換されている。

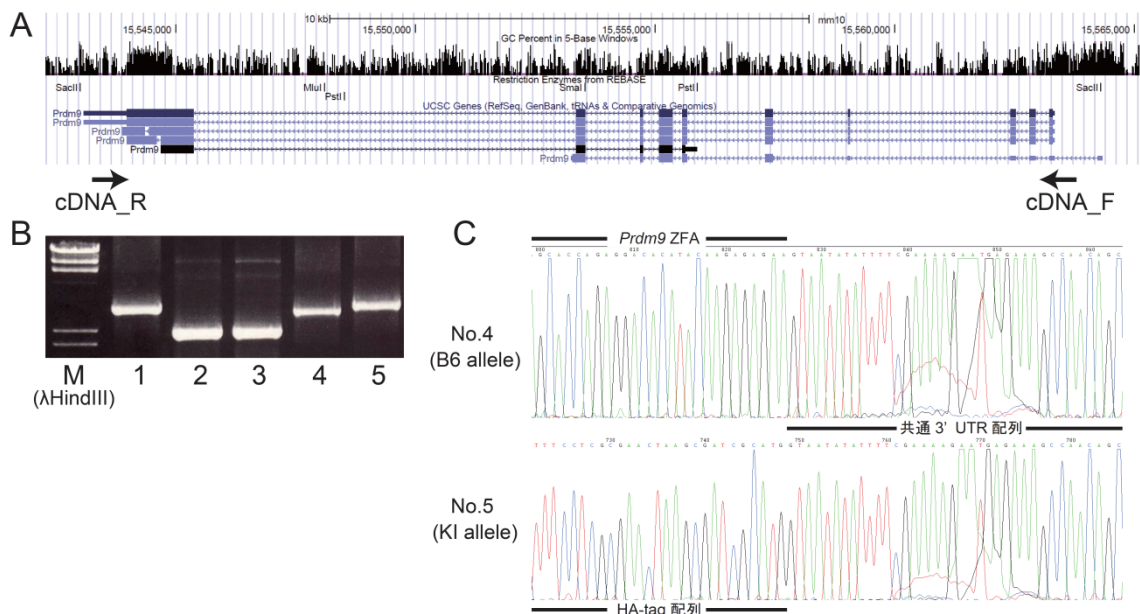


図 6. KI マウスの *Prdm9* cDNA 配列

(A) *Prdm9* のエクソン領域に設計した PCR プライマー (cDNA_F および cDNA_R) の位置。*Prdm9* 遺伝子のエクソン構造図は UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/index.html>) より引用した。第 1 エクソンから最終エクソンまでを含む全長 cDNA を増幅した。

(B) 精巣抽出の cDNA をテンプレートとし増幅した *Prdm9* cDNA の、クローニング後のコロニーに含まれる断片の PCR 増幅結果。このうち予想された増幅長に近い 4 番と 5 番のサンプルを配列解析した。

(C) 配列解析結果。上段は (B) の 4 番のサンプルで、ターゲティングされてない B6 アレル配列である。下段は 5 番のサンプルで HA-tag コード配列に置換された KI アレルである。

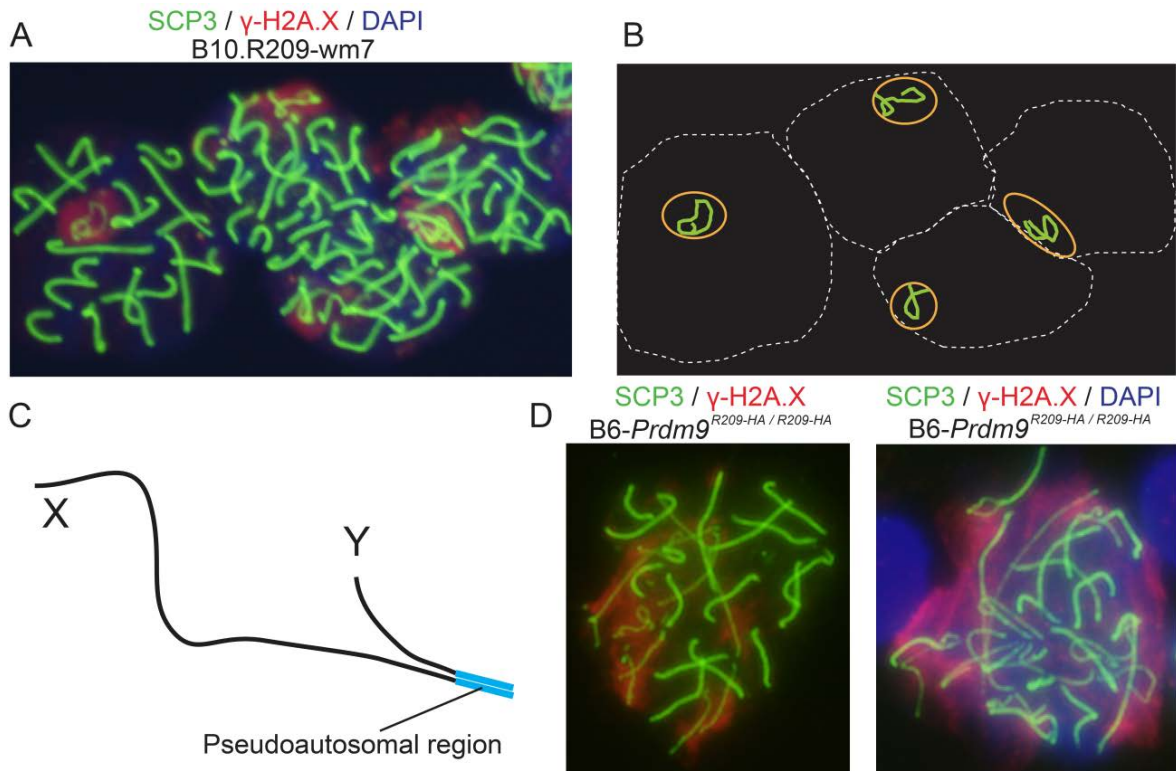


図 7. B10. R209-wm7 系統 KI マウス由来の精母細胞の免疫染色像

(A) 抗 Scp3 (緑) および抗 γ -H2A.X 抗体 (赤) と DNA 染色 (DAPI: 青) で 18 日齢の B10.R209-wm7 系統マウスの精巣より採取した精母細胞の免疫染色を行った。B10.R209-wm7 系統は KI マウスとゲノムの背景が似ており、同一の Prdm9 ZFA 型をもつが HA タグの付加がない。(B) 破線で囲った 4 領域が(A)の図における精母細胞を示す。オレンジの丸は γ -H2A.X の局在、緑の線は性染色体を示す。(C) 減数分裂の性染色体対合の模式図。オスの X, Y 性染色体は青色で示した偽常染色体領域 (Pseudoautosomal region) のみでシナプトネマ複合体を形成するし、残りの部位は対合しないため、対合していない染色体のマーカである γ -H2A.X が周囲に局在する。(D) 18 日齢 Prdm9 KI マウスの精母細胞の染色像。Scp3 で染色された減数分裂中の複数の細胞が視野中に観察できるが B10.R209-wm7 系統と比較して、分岐したような染色体や γ -H2A.X シグナルが細胞中の広範にみられ、異常がある。

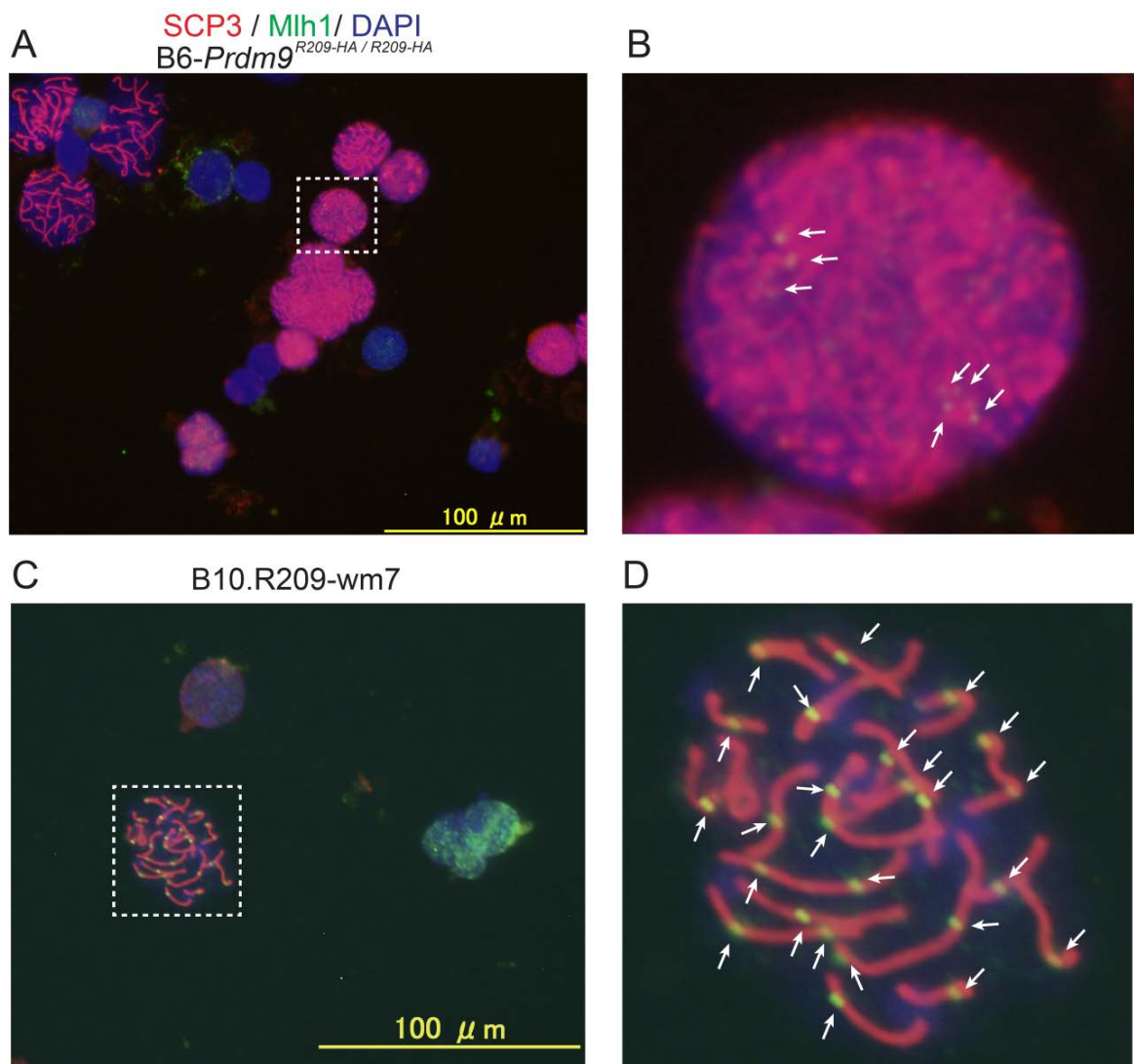


図 8. Prdm9 KI マウスと B10. R209-wm7 系統における Mlh1 フォーサイ像

(A) 抗 Scp3 および抗 Mlh1 抗体で 18 日齢の *Prdm9* KI マウス精巣より採取した精母細胞の免疫染色を行った。破線枠内の拡大像が(B)である。(B) *Prdm9* KI マウスでは減数分裂・サイゴテン期と考えられる細胞で Mlh1 フォーサイ (矢印) が観察されたが、その他の細胞では計数は困難だった。(C) (A)と同条件の染色を行った、B10.R209-wm7 系統 18 日齢の *Prdm9* KI マウス精巣より採取した精母細胞。破線枠内の減数分裂・パキテン期と考えられる細胞の拡大像が(D)である。(D) 緑色の Mlh1 フォーサイ(矢印) が染色体上に局在している。1 細胞あたり 25 個のフォーサイが観察され、これはマウスにおける標準的な交叉数 (Anderson et al., 1999) の範囲に含まれる。

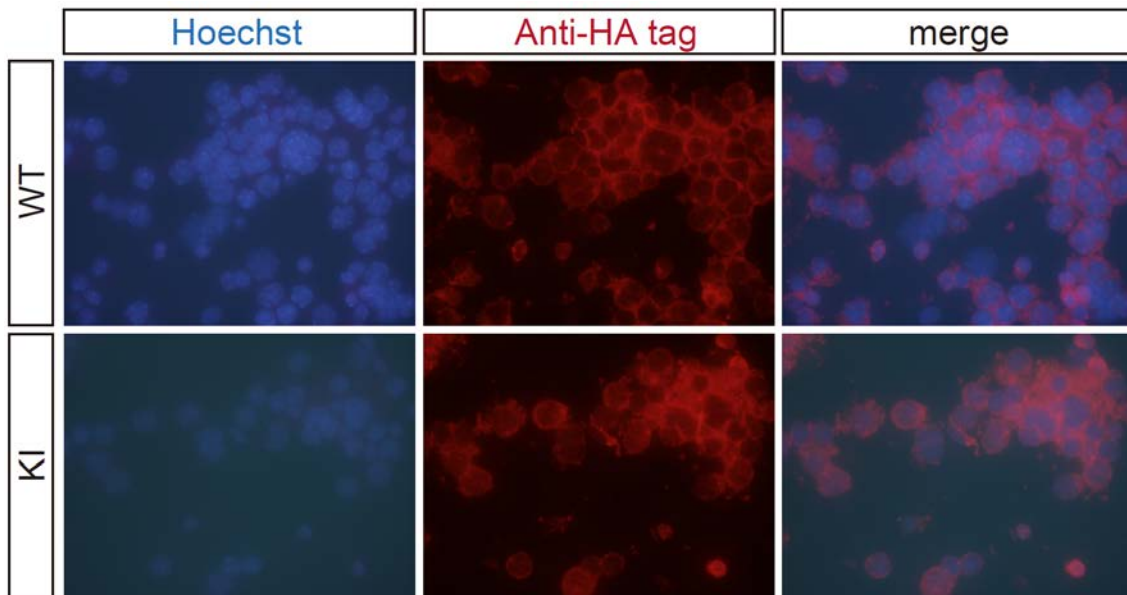


図 9. 精母細胞の免疫染色による Prdm9 タンパク質の検出

18 日齢付近のマウスの精巣より採取した精母細胞に対する抗 HA tag 抗体を用いた免疫染色。WT は C57BL/6 系統のマウス、KI は本研究で作成した KI マウスヘテロ接合体であり、同一の親から生まれている。Hoechst は DNA を染色している。

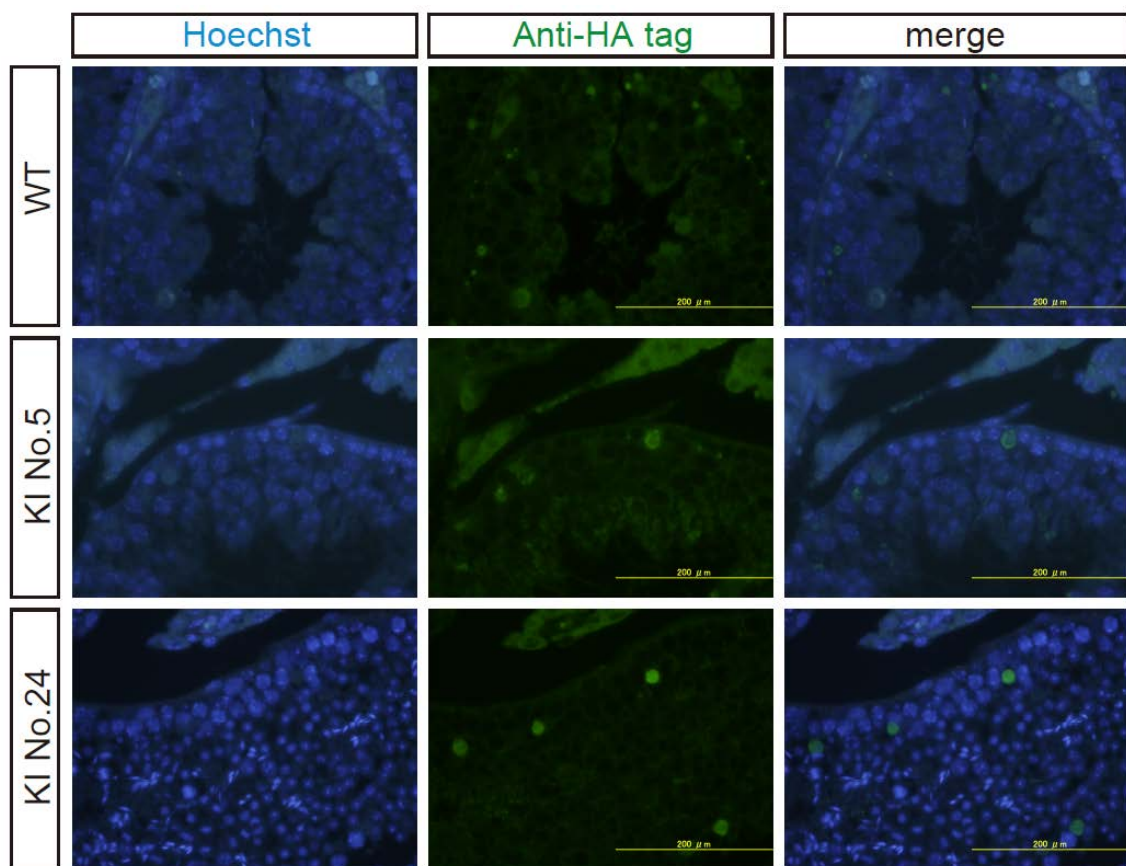


図 10. 精巣切片の免疫染色による Prdm9 タンパク質の検出

30 日齢のマウスの精巣より作成した切片に対する抗 HA tag 抗体を用いた免疫染色。WT は C57BL/6 系統のマウス、KI は本研究で作成した KI マウスヘテロ接合体であり、No. は個体の識別番号である。一部に HA タグのシグナルと思われる染色像が観察されるが、Hoechst で染色されない、WT でも同様のスポットが観察されるなどの点から HA タグ付加された Prdm9 の発現を表しているものではないと考えられる。

表 3. *Prdm9* KI マウスの IVF の受精率

メス系統	オス系統	全卵数	正常卵数	受精卵 (個)	受精率 (%)
C57BL/6	C57BL/6	1430	1144	1063	92.9
C57BL/6	<i>Prdm9</i> KI ホモ	528	422	220	52.1
<i>Prdm9</i> KI ホモ	<i>Prdm9</i> KI ホモ	228	231	149	64.5

表 4. *Prdm9* KI マウスの IVF 後の出生率

メス系統	オス系統	移植胚数	産仔数 (頭)	出生率 (%)	インジェクション先
<i>Prdm9</i> KI	<i>Prdm9</i> KI	273	28	10.3	前核
<i>CRE/+</i>	<i>Prdm9</i> KI	87	12	13.8	前核
C57BL/6	<i>Prdm9</i> KI	256	32	12.5	前核
C57BL/6	C57BL/6	820	258	31.5	細胞質

第3章 -組換え頻度検出マウスの作成

序論

生物種を問わず、染色体上の相同組換えの頻度を知ることは、多型解析の結果を実際の遺伝子機能に結びつけて考える上で重要である。例えば、強い選択圧を受けている遺伝子では多型の割合が周辺の遺伝子と大きく異なり、周辺の組換えホットスポットの影響を受けている。集団遺伝学的解析に用いられる遺伝子の連鎖解析は、ヒトやマウスの全ゲノム配列解読以降、染色体マーカーや特定の単塩基多型 (SNP, single nucleotide polymorphism) を検出する技術が発展し、主に医学分野において利用されている。特に近年、表現型と遺伝子の対応が明らかとなることで疾患の原因遺伝子特定が大きく進歩した。こうした解析においても組換えホットスポットの分布や強さを知ることは重要で、組換えが盛んな領域とそうでない領域が存在し位置が特定できなければ、ヒトにおける連鎖不均衡を利用したハプロタイプ解析やゲノムワイド関連解析のような、遺伝子と SNP の連鎖解析は正確に行うことが困難である。マウスにおいても複数の系統間で交配を行うことで、従来は困難だった表現型の責任遺伝子を探索する Collaborative Cross という手法 (Collaborative Cross Consortium, 2012, The Complex Trait Consortium, 2004) が近年着目されているが、この際にも組換えホットスポットの分布を考慮した解析が必須となる。これまでに全ゲノム上の組換えホットスポットの位置・頻度を計測した報告は酵母 (Mancera et al., 2008)、ショウジョウバエ (Chan et al., 2012)、マウス (Brunschwig et al., 2012) など複数存在する。上記に代表される報告では複数系統の多型情報を取得し処理することで、全ゲノム上での大まかな連鎖不均衡の割合と組換え頻度を求めている。

特定のホットスポットに限定した場合には、Prdm9 の関連する MHC 領域の *Psmb9* 組換えホットスポットを発見した初期の報告 (Shiroishi et al., 1982, Steinmetz et al., 1982) では、血清を利用した抗原抗体反応による検出により組換え率を求めている。系統間の多型が組換えホットスポット周囲に存在する場合は、組換えが起こった個体 (Shiroishi et al., 1982)、もしくは配偶子に由来する試料に対し PCR の増幅が起こるかどうかでも判別することが可能である (Guillon and de Massy, 2002)。しかしながら、これらの方法では組換えを起こしていると考えられる世代の個体を非常に多く消費する必要があり、代替する方法が必要とされる。

Prdm9 の機能解析を目標とする本研究において、実際に組換えホットスポットでの組換え

頻度が変化するかを測定することは重要である。これまでに用いられている組換え頻度測定方法のうち、現時点で最も有用と考えられたのは、限界希釈により 1 個の精子とみなされるゲノム DNA を試料として、組換えが起こった場合にのみ PCR で増幅されるプライマーを用いて検出する方法である (Guillon and de Massy, 2002, Guillon et al, 2005, Baudat and de Massy 2007, Cole and Jasin, 2011)。この方法で測定を行う場合、限界希釈により近似的な 1 細胞分のゲノムの組換え率を測定するため、サンプルの採取、調製と希釈全てが正確に行われる必要がある。同時に PCR の際の人工的な産物や不正確な増幅を抑制する工夫が必要となる。そこで、本研究ではこれらの点を克服した「組換え検出マウス」を新たに作成することを目標とした。

まず、Prdm9 による結合と活性化が明らかなマウス組換えホットスポットの配列を用意した。マウスではこれまでに多くのホットスポット存在領域が明らかとなっている (Mizuno et al., 1996, Isobe et al., 2002, Kauppi et al., 2007, Parvanov et al., 2009)。初期に発見された MHC 領域の *Psmb9* ホットスポットでは、PCR に依存しない非常に労力を必要とする方法で組換え頻度が計測されている (Shiroishi et al., 1982)。この領域では、既に先行研究において Prdm9 タンパク質のクロマチン免疫沈降法 (ChIP) による DNA-タンパク質間の結合解析が行われている (Grey et al., 2011, Billings et al., 2013)。そこで、この領域に焦点を絞り、組換え検出マーカーの設計、マウス作成を行った。

次に、この *Psmb9* ホットスポット配列を利用し、PCR に依存しない簡便な相同組換え検出系を考えた。具体的には、蛍光タンパク質 EYFP に代表されるレポーター遺伝子内のイントロン領域に *Psmb9* ホットスポットを導入し、Prdm9 による相同組換えが導入部位で生じた際に、その前後で遺伝子発現の制御配列が変化し、蛍光発光により非侵襲的に検出する実験系を考案した。なお、これまでに遺伝子発現に頻用されている CAG プロモーターによる EYFP 発現系と、*Psmb9* ホットスポット配列を組み合わせることで、組換えが起こった場合のみ EYFP の蛍光が観測できるマウスの作成を目指した。

材料と手法

1. Tol2 トランスポゾンによる遺伝子改変

本研究で目標とする検出系マウスは、検出に利用する蛍光タンパクの発現コンストラクトがゲノムに対し 1 コピーのみ導入されている必要がある。しかしながら、従来のランダムインテグレーションによるトランスジェニックマウス (Tg マウス) の作成法は、導入される遺伝子が 1 領域に複数コピーに挿入されてしまう可能性が指摘されている (Capecchi, 2005)。そこで Tol2 トランスポゾンを利用し、確実に 1 コピーのみがゲノム DNA に挿入される方法 (Sumiyama et al., 2010) で Tg マウスを作成した。

ミトコンドリア局在性 EYFP が全身発現する pCAG-*mitoEYFP* ベクターを改変し、CAG プロモーターと *mitoEYFP* 間に、C57BL/6 系統由来のマウス *Psmb9* ホットスポットを含む周辺配列 5.6kbp を挿入した。また CAG プロモーターは *loxP* 配列で囲み、*mitoEYFP* とポリ A シグナルは *Frt* 配列で囲んだ。次に全体配列をニワトリ *HS4* インスレーターで囲み、周囲のゲノム DNA からの影響を受けないようにし、その両末端に *Tol2x* 配列 (*Tol2* エlement) を付加した(図 1.)。なお、これらの塩基配列は城石研究室の pJC13-1 (pGEM-4Z)、pCAGEYFP-*mito*、pCR4Blunt-TOPO+*Tol2x*、ファスマックの合成オリゴヌクレオチドに由来する。この遺伝子コンストラクトを環状のベクターに保持させた状態で、*Tol2* トランスポザナーゼ発現ベクター (pCS-TP) とともに、C3H/HeJ と C57BL/6 雑種 F1 マウスの受精卵細胞質にインジェクションした。インジェクション後 1 晩培養し仮親に移植した。

移植した仮親より生まれた仔の指を生後 20 日ほどで採取し、蛍光実体顕微鏡 (MZ16F; Leica Microsystems) で EYFP の蛍光を観察した。EYFP の蛍光が強く観察された個体は C57BL/6 系統と交配させ、仔の世代に EYFP 発現が遺伝した個体を選択した。

2. インバース PCR による挿入位置の探索

尾や肝臓などから長鎖が保存されたゲノム DNA を抽出し、任意の制限酵素を 1 晩反応させ 10 μ g のゲノム DNA を断片化した。制限酵素は DNA メチル化に感受性がなく、6 塩基認識の酵素 (Avr II, Kpn I など) がふさわしい。また、周辺配列を明らかにしたい既知配列の内部に認識部位があるものは不適である。切断後の DNA 断片をフェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿の操作で精製し、適量の Tris-HCl (pH 8.0) 溶液に溶解する。この段階で

電気泳動と濃度測定を行った。問題がないことを確認した上で、T4 DNA Ligase (TAKARA) で以下の反応溶液を調製した。

最大 500 ng の断片化ゲノム DNA	X μ L
10x T4 Ligase Buffer	50 μ L
水	440-X μ L

これを震盪攪拌し、25-37°Cで30秒温めた。T4 DNA Ligase を 10 μ L 加え混合した。16°Cで1晩保温した。この反応液をフェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿の操作で精製し、PCRによって目標とする領域のPCR産物を得た。これをクローニング、または直接配列解析に用い、得られた断片の周辺配列情報をデータベース (<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/blastn?lang=ja>) で検索した。両側の配列で挿入位置のコンセンサスが得られた場合、挿入配列により増幅長が変化する通常のPCRプライマーを設計し増幅を確認した。用いたプライマーは表1. に記した。

3. 蛍光顕微鏡を利用した精子の観察

マウス精子観察の手法は (Garner et al., 1995) を参考にした。

得られたTgマウスのオスを解剖し精巣上体を摘出した。眼科用ハサミとピンセットを用いてPBS中で余分な組織を除き、精巣上体の内部があらわれるようにした。300 μ LのHEPES-0.1%BSA中に入れ、ミネラルオイルを上層に添加し36°Cで5分インキュベーションした。組織片を除き遊離した精子を含む溶液を新しいチューブに移した。これに7.5%ホルムアルデヒド/10 mM PBSを300 μ L加え、常温で10分固定した。10000 xgで2分25°Cで遠心し、上清を捨てた。0.1M酢酸ナトリウム溶液を500 μ L程度加え洗浄した。10000 xgで2分25°Cで遠心し、上清を捨てた。このとき得られた沈殿が精子を含むのでMASコートされたスライドグラスに展開し10分程度風乾させた。ヨウ化プロピジウム (PI) 250 μ g/mL染色液を10 μ Lスライドグラス上に滴下し10分静置・染色した。溶液を除き、PBSの入った染色びんで洗浄した。Vectashieldとカバーガラスで封入し顕微鏡で観察した。

4. cDNA のインバース PCR

本章における Tg マウスからの mRNA の抽出と cDNA の合成は第 1 章の cDNA 合成の方法に従ったが、本章の実験のうち *EYFP* mRNA の転写開始点の解析では、2 本鎖 cDNA を直接合成可能な、PrimeScript Double Strand cDNA Synthesis Kit (TAKARA) を使用した。キットに添付されている手法で合成を行い、得られた cDNA の濃度を測定した。測定後、以下の分量で試薬を混合した。

500 ng の cDNA	X μ L
10x T4 Ligase Buffer	50 μ L
水	(440-X) μ L
T4 Ligase	10 μ L

混合後 16°C で 1 晩保温し抽出・精製後、インバース PCR 用に設計したプライマーを用いて PCR を行い、得られた増幅断片を pCR-BluntII-TOPO クローニングした。クローニング後配列を解析し転写開始領域を決定した。

5. PCR を利用した組換えの測定

5-1. 長鎖増幅による組換えの確認

精巢より抽出したゲノム DNA をテンプレートとし、表 1.中のプライマーを用いて Tks Gflex DNA Polymerase (TAKARA) の添付プロトコルに従い反応を行った。

5-2. デジタル PCR キットを使用した組換えの検出

デジタル PCR は微小な液滴に試料を限界希釈した状態で PCR 反応を行い、増幅を蛍光試薬で確認した。最終的に増幅された液滴数を統計学的処理し、全体に対する濃度・コピー数を求める手法である。本研究では組換えの生じた分子数と組換えの生じていない分子数の比率を求めるために行った。専用の機器を用いた測定前に ddPCR EvaGreen Supermix (BioRad) のキット添付プロトコルに従い反応を行った。

結果

組換えホットスポット導入マウスの作成と表現型

Tol2 トランスポザーゼと *Tol2x* 配列を利用した、組換えホットスポットを含む *mitoEYFP* 発現コンストラクトの受精卵へのインジェクションにより得られたマウス 34 個体のうち、11 個体の前肢と耳で強い EYFP の蛍光が観察された。Tol2 システムを用いたトランスジェニック (Tg) マウス作成では、1 ゲノムあたり 4-5 個程度のコピー数でコンストラクトが導入される傾向がある (Kondrychyn et al., 2009)。また、挿入遺伝子座によって遺伝子発現が変動し、致死的な表現型につながる場合や生殖細胞系列へ伝達できない場合もあるため、C57BL/6 系統を用いた戻し交配を 1 世代行い、1 コピーで EYFP を強発現する個体を選抜した。その結果 3 系統の組換えホットスポット導入マウス系統が得られた。

これらのマウスにおける、コンストラクトの挿入位置を明らかにするため、インバース PCR 法で外側の未知配列の配列解析を試みた。いずれの系統のマウスでも、断片化ゲノム DNA 調製の段階で複数の制限酵素を用いたが、それぞれ単一の PCR 産物が得られ、クローニングと配列解析を行った。各系統から得られた配列情報を DDBJ BLAST で検索した結果、1 番染色体、3 番染色体、6 番染色体にそれぞれ挿入されていることが明らかとなった (図 2.)。次に、各系統のホモ接合体を作成し、オスの精子を採取・固定して蛍光顕微鏡で観察した。いずれの系統から採取した精子でも、尾の頭部側に *mitoEYFP* による蛍光が観察された (図 3.)、最終的な目標とする組換え頻度検出マウスのアレル状態では、精子尾部が蛍光を発することを確認した。

リコンビナーゼ保持系統との交配による組換え頻度検出マウスの作成

作成したホットスポット配列導入系統の CAG プロモーターと *mitoEYFP* コード領域は、それぞれ *loxP* 配列と *Frt* 配列に挟まれている。3 系統に対して CRE リコンビナーゼを発現する *CRE/+* 系統と、FLP リコンビナーゼを発現する *FLP/+* 系統を別々に交配させると、次世代では CAG プロモーターが消失した個体と、*mitoEYFP* が消失した個体を得られる。適切な位置での組換えを確認するため、PCR によりリコンビナーゼ応答配列周辺を増幅したところ配列長が短くなっていた。また全身の EYFP 発現を耳の蛍光で確認したところ、WT と違いが見られなかったため *mitoEYFP* の発現が消失したと判断した。

リコンビナーゼ保持系統との交配により *CRE/+* または *FLP/+* の状態になった場合、組換え頻度検出マウス作成のための交配で、発現しているリコンビナーゼの影響で組換えが起きていないもう一方の配列も消失させてしまうため、ヘテロ接合体同士の交配を経てリコンビナーゼアレルを保持しない個体を作成した。(図 4., 図 5.)

また、ここまでのマウスの *Prdm9* ZFA 型はいずれも C57BL/6 系統に由来する *Prdm9*^{B6} 型であり、導入した C57BL/6 系統に由来する *Psm9* ホットスポット配列 (*Psm9*^{B6}) には結合できない。そこで *Psm9*^{B6} に結合することが確認されている B10. R209-wm7 系統に由来する *Prdm9*^{R209} 型に置換する必要があるため、*FLP/+* の導入により *mitoEYFP* を消失させたマウスと B10. R209-wm7 系統を交配させ *Prdm9*^{R209} を導入する。*mitoEYFP* を消失させたマウスは最終的に *FLP/+* の消失を確認し、*Prdm9*^{R209/R209} の状態にした。この操作をはじめに作成した 3 系統全てで行った。

目標とする組換え頻度検出マウスはここまでの手順で作成した、*Tg (Psm9 HS-mitoEYFP)*, *Prdm9*^{B6/B6} 系統と *Tg (CAG-Psm9 HS)*, *Prdm9*^{R209/R209} 系統を交配して作成した。

組換え頻度検出マウスの表現型解析

組換え頻度検出マウス (*Tg (Psm9 HS-mitoEYFP / CAG-Psm9 HS)*, *Prdm9*^{B6/R209}) オス成体から摘出した精巣、および精巣上体から抽出した精子をもとに、蛍光観察で組換えを検出することが可能か検証した。

まず、精子の観察は、最初に作成した組換えホットスポット導入マウスと同様の手法で行った。導入されている染色体の位置が異なる 3 系統それぞれのマウスについて観察を行ったところ、いずれのマウスでも最初に作成した組換えホットスポット導入マウスと同様の蛍光を発する精子は発見できなかった。

そこで、精巣より抽出した mRNA より cDNA を合成し、PCR により *mitoEYFP* の転写を確認したところ、mRNA として転写されている場合に増幅が予想される位置にバンドが検出された。これは目標としている組換えが起きている可能性を示唆していたが、対象実験として同時に行った同マウスの肝臓・腎臓に由来する cDNA からも同様の *mitoEYFP* の転写が生じていた (図 6.)。これは相同組換えが生じない体細胞でも *mitoEYFP* を発現することを示している。なお、遺伝子コンストラクトの一部を削除した個体で *mitoEYFP* の発現消失を

蛍光観察で確認していたが、交配に利用した個体にさかのぼり再度 mRNA を抽出して発現を検証したところ、CAGプロモーターを削除した系統で同様の mRNA の発現が確認された。

そこで、系統樹立の際に確認した位置とは異なる染色体領域に発現コンストラクトが挿入されている等の可能性を検証するため、2本鎖 cDNA のインバース PCR を利用した 5' 非翻訳領域の配列解析 (Rapid Amplification of cDNA End; RACE) により、この mRNA の転写開始点 (TSS) を特定した。その結果、*mitoEYFP* をコードする配列の直前に存在した 200bp 程度のトリ β -アクチンのプロモーター領域の後半の配列の 2ヶ所から、一続きのエキソンとして転写が開始されていることが明らかとなった (図 7.)。

この結果に加え、CAG 領域と *mitoEYFP* にまたがるプライマーを用いて cDNA に対し PCR を行ったところ、イントロンの存在しない当初予想されていた転写産物が確認されたことから、Tg (*Psmb9 HS-mitoEYFP / CAG-Psmb9 HS*) マウスでは、一方の CAG 領域から転写が開始され、何らかの要因で *mitoEYFP* 側の産物と融合するスプライシングがなされている可能性が示唆された。以上より作成した 3 系統のホットスポット導入マウスでは精子の蛍光を観察による組換え頻度の検出は困難であることが明らかとなった。

しかしながら、本マウスを用いることで異所的に導入した *Psmb9* ホットスポットでの組換えを検出することは可能である。この実験は、マウス組換えホットスポットの *Prdm9* による普遍的な制御を示すうえで重要であると考え、ホットスポット配列をまたぐ長鎖の PCR による増幅で組換えの有無を確認した。プライマーを設計し、作成した 3 系統に由来する組換え頻度検出系マウスの成体オス精巣より抽出したゲノム DNA をテンプレートとし、組換えが生じている場合に約 5.4 kbp の産物が得られる PCR を行った。その結果、2 系統に由来する組換え頻度検出マウスでは精巣由来のゲノム DNA でのみ、導入した組換えホットスポット周辺で組換えが起きていることが確認された。1 番染色体に導入された個体では、遺伝子型が *Psmb9 HS-mitoEYFP / CAG-Psmb9 HS* は共通で、*Prdm9^{B6/B6}* と *Prdm9^{B6/R209}* の個体をそれぞれ作成し、同様の PCR により *Prdm9^{R209}* に依存した組換えであることを明らかにした (図 8.)。

この組換えが生じていたことが確認されたゲノム DNA と、組換えが起らない Tg (*Psmb9 HS-mitoEYFP*), *Prdm9^{B6/B6}* 系統、Tg (*CAG-Psmb9 HS*), *Prdm9^{R209/R209}* 系統のゲノム、組換え後の配列をもつ当初の組換えホットスポット導入マウスのゲノム DNA を用いて、適当な比率で

希釈・混合することで一定の組換え頻度を模倣した試料とを同時に PCR し比較を試みた。
しかしながら、使用したデジタル PCR キットでは十分な増幅効率が得られず、プロトコル
を改変した場合でも増幅しなかった。

考察

本研究で用いた組換えホットスポット *Psmb9* は最も初期に特定された組換えホットスポットであり、交配と血清を用いた解析で *Prdm9*^{R209} 存在下での組換え頻度は 3.2% と、*Prdm9*^{B6} の場合の 10 倍程度になる (Shiroishi et al., 1982)。そのため、適切に組換えが起きていれば蛍光顕微鏡の視野内に観察可能な十分量の精子が存在すると推測されたが、蛍光は観察されなかった。この結果について、発現系が適切であったかどうかを減数分裂と精子形成の特殊性に着目して考察する。

本章で用いられている発現コンストラクトに含まれる CAG プロモーターは、3'側から順にサイトメガロウイルスに由来する *CMV-IE* エンハンサー、ニワトリ β -アクチンの第 1 エキソン TSS を含むプロモーター、ウサギ β -グロビン遺伝子のスプライスアクセプターと翻訳開始点から構成されている (Miyazaki et al., 1989, Niwa et al., 1991)。このうち、*CMV-IE* エンハンサーとトリ β -アクチンの第 1 エキソンを含むプロモーターの大半の部分を *loxP* 配列で囲んでおり、*CRE/+* 系統との交配を経由した個体ではその領域が消失している。CAG プロモーターによる遺伝子発現は全身の細胞で起き、汎用プロモーターとして利用されている。精巣での CAG プロモーターによる *mitoEYFP* の発現は既に報告されており (Huang et al., 2000)、精子の尾の頭部側での蛍光が確認されている。本研究で用いた組換えベクターは、この報告で用いられた遺伝子コンストラクトに基づいて作成している。そのため、5kbp を超える組換えホットスポット配列を含むイントロン領域のスプライシングがなされれば、*EYFP* は発現し精子へと移行すると推測していた。組換えホットスポット導入マウスでは予想通りの発現が見られ、発現コンストラクトを部分的に削除したマウスも蛍光が消失したことから、報告されている CAG-*mitoEYFP* マウスと同様の精子への移行とスプライシング、CAG プロモーターの活性が確認された。

ところが、最終的に組換え検出マウスでは導入したホットスポットで相同組換えが起きているにもかかわらず蛍光は観察されなかった。これは精巣における CAG プロモーターの活性と、減数分裂後の発現遺伝子における転写活性の違いに起因していると考えた。

精子の形成には、減数分裂後に独自の構造を形成するための様々なタンパク質、プロタミンやアクロシンなどを発現する必要がある (Eddy et al., 2002)。完全に成熟した精子ではクロマチンは高度に凝縮しており転写や翻訳は行われていないと考えられる。精子形成に至

るまでに多くの遺伝子ではクロマチンの凝縮のため転写が停止し、精子形成に関わる遺伝子でのみが活発に発現する (Eddy et al., 2002)。この際の転写活性化メカニズムは特殊であり、一般的な体細胞の転写因子である TATA box binding protein に類似した、減数分裂後期以降に発現する TATA box binding protein-like 1 (Tbpl1) 等の機能により転写が開始される。そのため TATA box をもつ体細胞発現性の遺伝子の転写活性は変化する。また cyclic AMP-responsive element modulator (CREM) のように精子形成時にのみ発現する転写活性化因子は、精子形成に関連するプロモーターをもつ遺伝子の活性化に重要である。さらに 3' 端へのポリ A 付加に必要な AAUAAA 配列も、生殖細胞で発現している多くの mRNA では欠落している (McMahon et al., 2006, MacDonald and Redondo, 2002)。以上の点から、精子形成時の遺伝子発現には、他の体細胞と比較して特殊な、遺伝子をコードする配列側の構造を必要とする。

本研究で使用した CAG プロモーターでは *CMV-IE* エンハンサーからトリ β-アクチンプロモーター付近にかけて 3 か所の cAMP response element binding protein (CREB) 結合サイトがあり、CREB 依存的な転写活性化が行われると考えられる。また *mitoEYFP* をコードする領域の 3' 末端は、ウサギ β-グロビン遺伝子のポリ A 付加配列となっている。そのため、CAG プロモーターは一般的な体細胞の転写系では強く発現できるが、減数分裂後の転写系では活性化されなかった可能性が高い。なお、リコンビナーゼ作用前の組換えホットスポット導入マウスで観察された精子尾部の蛍光は、減数分裂以前から細胞内あるいはミトコンドリアに蓄積していたタンパク質と考えられる。

検出系マウスの CAG プロモーターより転写された産物が、*mitoEYFP* 側の産物と融合するスプライシングと思われる現象は、トランス・スプライシングであると考えられる。トランス・スプライシングはプロセッシングを受けていない pre-mRNA が他の pre-mRNA 間とスプライシングを起こすことで生じる (Finta and Zaphiropoulos, 2002, Berger et al., 2015)。ヒトやラットの体細胞でも頻度は高くないものの普遍的に起こっている現象と考えられる (Caudevilla et al., 1998)。本研究の場合、Tg (*Psmb9 HS-mitoEYFP*) マウスの *mitoEYFP* 領域の直前配列がプロモーター由来の高 GC 含量領域であったことから、類似する配列を含む CAG 領域の転写産物に結合し、スプライシングを受け融合した可能性が考えられる。

PCR による長鎖増幅により導入した *Psmb9* ホットスポットでの組換えを確認したが、デ

デジタル PCR による増幅には失敗した。デジタル PCR キットは従来のリアルタイム PCR で用いられる 200 bp 程度の断片の増幅に最適化されており、含まれるポリメラーゼでは本研究で目標とした 5 kbp 以上の増幅には適さないと考えられる。

しかしながら本研究の結果、Prdm9 結合配列の導入によりマウスにおける相同組換えを任意の位置で高確率に起こすことが可能であると検証できた。これは Prdm9 がマウスの組換えホットスポットの大半を普遍的に制御していることを示唆している。同時に、Prdm9 以外の因子が交叉形成の最終的な位置決定に関与している可能性を示す結果も得られた。また今回の実験結果を受け、組換え検出マウスを再構築する機会があるならば以下の点に着目したい。① 遺伝子発現を利用する場合は、減数分裂後期以降の特異的発現を示す遺伝子を用いる。② ホットスポット配列を短縮しリアルタイム PCR 等で検出可能にする。③ ゲノム編集技術を利用し工程を短縮、複雑な交配を回避する。

相同組換えはまれな現象であるため、RNA のプロセッシングを経由した場合、トランス・スプライシングのようなわずかな変動であっても、結果は重大な影響を受けた。コンストラクト作成時には、こうした要因を排除する緻密な設計が必要であると痛感した。

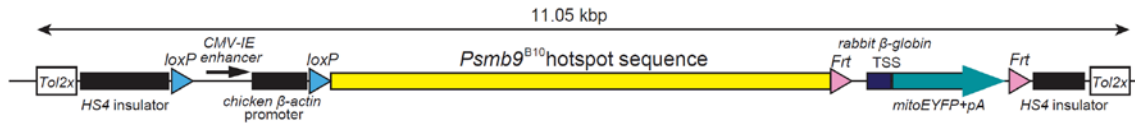


図 1. Tol2 トランスポゾンによる導入に使用した遺伝子コンストラクト

精巢における mitoEYFP 発現の報告 (Huang et al., 2000) で使用されていた発現コンストラクトの中間に B10 型 *Psmb9* ホットスポットの配列を挿入し、エンハンサー・プロモーター領域と *mitoEYFP* コード領域を分割した。さらにエンハンサー・プロモーター領域は *loxP* 配列で、*mitoEYFP* コード領域を *Frt* 配列でそれぞれ囲み、対応するリコンビナーゼで除去できるようにした。これらの配列をとり *HS4* インシュレーター配列で囲むことで、挿入周辺からの転写制御・修飾の影響を排除した。最終的に *Tol2x* 配列を両端に付加し、環状 DNA の状態でインジェクションに使用した。

表 1. 用いたプライマー

プライマー名	塩基配列
Psmb9Const1(CAG-Psmb9)_F	CTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTA
Psmb9Const1(CAG-Psmb9)_R	CACAAAGATCGCTGTTCCCTTGACATGA
Psmb9Const2(Psmb9-EYFPmito)_F	TGTCTATCCCCTCCCCTCTCAAATGTC
Psmb9Const2(Psmb9-EYFPmito)_R	GCCATGATATAGACGTTGTGGCTGTTGT
Psmb9Const3(HS4-Psmb9)CAGSkip_F	CAGTGCCACATCCCCACAGTTCTTCATC
Psmb9Const3(HS4-Psmb9)CAGSkip_R	CTGTGGAAGGAGAGGGCTGACTCCTGAA
Psmb9Const4(Psmb9-HS4)EYFPskip_F	CACAGGCACAAACCCACACAGAGACACA
Psmb9Const4(Psmb9-HS4)EYFPskip_R	GGAAAGGCCACAATGCTCATCCAGTTC
Psmb9EYFP(7ABb)-Tg_F-894	ATAGCAGGGGGTTGGAAGTGGATGAGCATTG
Psmb9EYFP(7ABb)-Wt_F-680	AGTACAGGCGGTTGGTATAGTGAGTGGATGTC
Psmb9EYFP(7ABb)-Tg/Wt_R	AGGAACGGTTTATGCTCCACACTAATGCCTGA
Psmb9EYFP(8cd)-Tg_F-1058	AGGGGAGGTTTAGGTTGGATATGAGGAGGC
Psmb9EYFP(8cd)-Wt_F-650	CCATGGTGTGACATGTAGCAGGCATAGAACG
Psmb9EYFP(8cd)-Tg/Wt_R	AGGCCATCTCCCAAACGCTGAGGTTTTATAG
Psmb9EYFP(9CDb)-Tg_F-1292	TGGAAGTGGATGAGCATTGTGGGCCTTTCC
Psmb9EYFP(9CDb)-Tg_R	CTGTGGTGATTGGTTGAGGCGTGGTTGTGG
Psmb9_Rec checker_1F(TM64)	ATGGTAATCGTGCGAGAATTGATAACTTCG
Psmb9_Rec checker_1R(TM64)	CGGACATGCTAGCTTTGCCAAAATGATG
Tol2lox-Inverse No.1_F	AACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGG
Tol2lox-Inverse No.1_R	GCGCCAGATCTCCGATTCGACAATACTC
mitoEYFP-Inverse_1F	AGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGC
mitoEYFP-Inverse_1R	ACGGACATGCTAGCTTTGCCAAAATGATGAGA
mitoEYFP-Inverse_2F	CTTCAAGATCCGCCACAACATCGAG
mitoEYFP-Inverse_2R	CACGCTGAACTTGTGGCCGTTTAC
CAG-EYFP_cDNA-1_F	GGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCA
CAG-EYFP_cDNA-1_R	CGCGGGTCTTGTAGTTGCCGTCGTCC
CAG-EYFP_cDNA-2_F	TCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAG
CAG-EYFP_cDNA-2_R	TGGGGGTGTTCTGCTGGTAGTGGTTCG
Frt-EYFP-Frt_V2_F(Tm67_2.6k)	ACTCGTTTCCTTCCCTTTCCAACCTACATGC
Frt-EYFP-Frt_V2_R(Tm67_2.6k)	ACTGCCTCCTCATATCCAACCTAAACCTCC

Chr1: 137,089,28 (GRCm38/mm10)



Chr3: 6,253,457 (GRCm38/mm10)



Chr6: 36,095,468 (NCBI37/mm9)

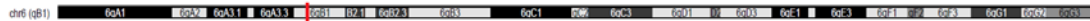


図 2. *Psemb9* ホットスポット導入マウスの系統ごとのコンストラクト挿入位置

Tol2 システムによるコンストラクト導入後、蛍光の強発現とホモ接合体の維持が確認された系統を 3 系統作成した。それぞれの系統で 1 番染色体、3 番染色体、6 番染色体上に 1 コピーずつ、図中の赤色で示した位置に挿入されていた。数字は左から染色体の番号、データベースに登録されているゲノム上の位置、参照したゲノム解析データを示す。

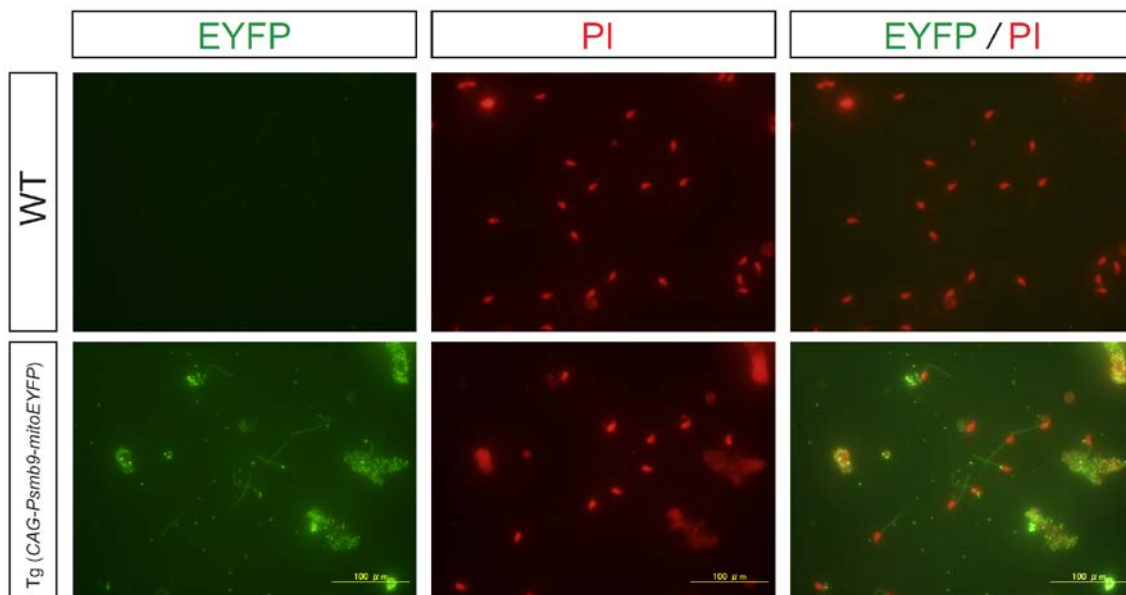
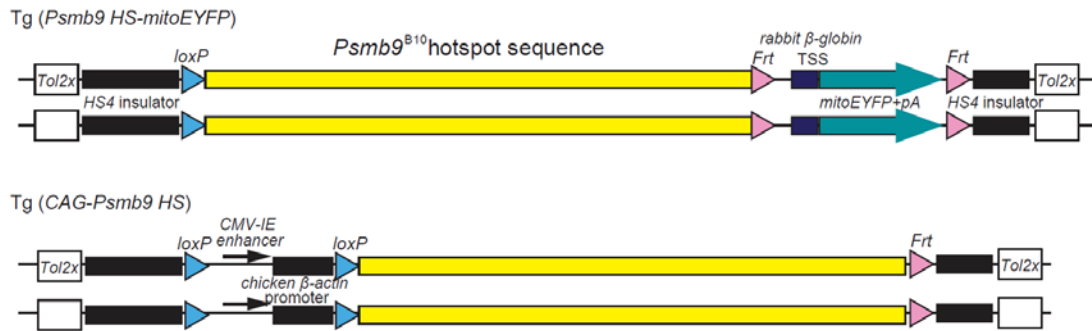


図 3. *Psemb9* 組換えホットスポット導入系統の精子の蛍光顕微鏡像

WT は C57BL/6 系統、Tg (*CAG-Psemb9-mitoEYFP*) マウスは本研究で作成した 1 番染色体組換えホットスポット導入マウスである。PI は DNA を染色し、精子の頭部のマーカーとなる。

Tg (*CAG-Psemb9-mitoEYFP*) マウスでは精子の尾部のうち頭部側が蛍光を発しており、EYFP の発現とミトコンドリアへの蓄積が観察される。

A



B

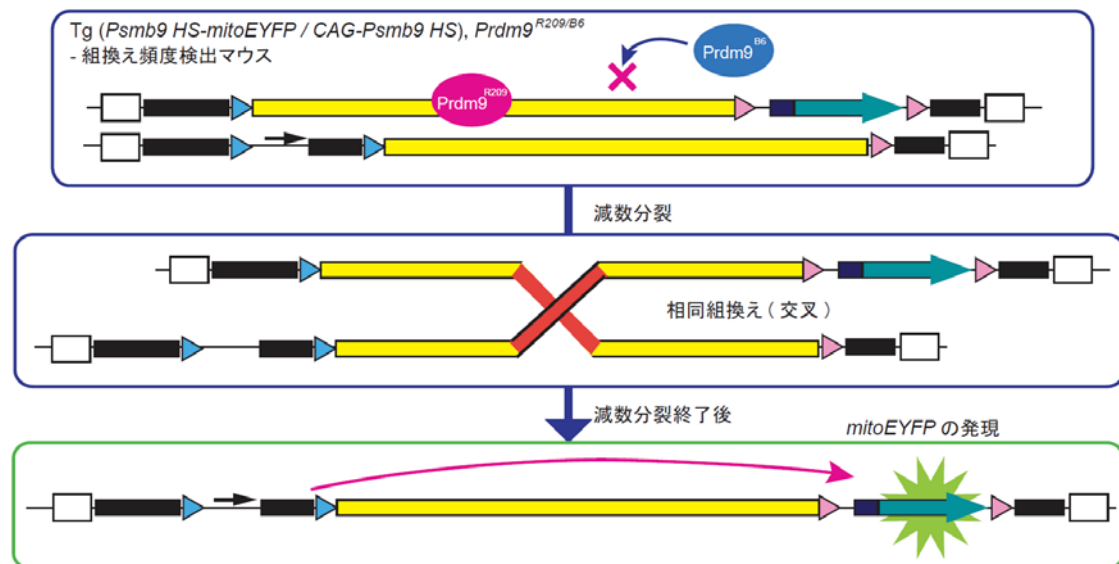


図 4. ホットスポット導入マウスの配列部分除去と組換え頻度検出マウス作成モデル

(A) *Psmb9* ホットスポット導入マウスを *CRE*/+ 系統、*FLP*/+ 系統と交配させる。すると次世代はそれぞれ導入配列が部分的に除去される (*Tg (Psmb9 HS-mitoEYFP)* 系統と *Tg (CAG-Psmb9 HS)* 系統となる)。各リコンビナーゼアレルを除くと同時に導入配列をホモ接合体とする。さらに導入した *Psmb9* ホットスポットを活性化する B10. R209-wm7 系統に由来する *Prdm9*^{R209} 遺伝子座を交配により導入する。

(B) A) で作成した 2 系統のマウスを交配させた場合、次世代の減数分裂期に *Prdm9*^{R209} により *Psmb9* ホットスポットが活性化し、一定の割合で相同組換えが起こる。すると減数分裂終了後に分割されていたエンハンサー・プロモーター領域と、*mitoEYFP* 領域が元のホットスポット導入マウスの状態となり、*mitoEYFP* が発現する。蛍光顕微鏡を用いて EYFP の蛍光を発する精子の数を測定することで、組換え頻度を求めることが可能である。

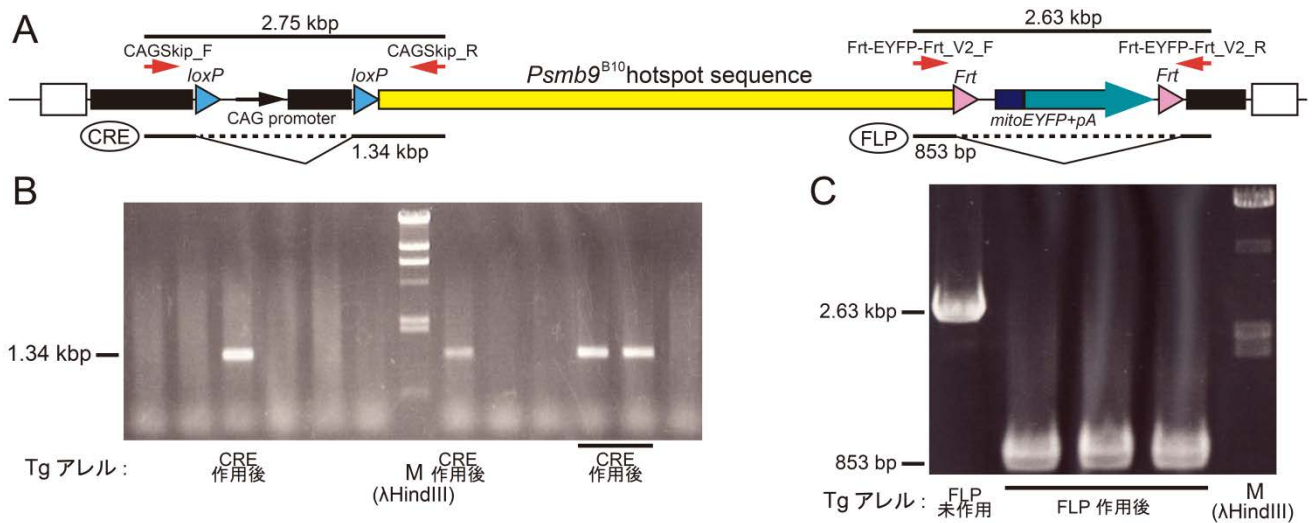


図 5. リコンビナーゼ保持系統との交配により生じた組換えの検出

(A) 導入した組換えホットスポット配列と周辺のコンストラクトに対して、*CRE*/+系統、*FLP*/+系統との交配による組換えをそれぞれ PCR で検出するために設計したプライマー配列の位置 (橙色の矢印)。交配前世代の個体における増幅長はコンストラクトの上側、交配後世代の個体における増幅長はコンストラクトの下側に表記した。

(B) 1 番染色体にホットスポットが導入された個体と、*CRE*/+系統との交配により得られた世代の個体における *loxP* 配列間の PCR 増幅結果。*CRE* リコンビナーゼが作用した個体では増幅産物が短縮し、予想された 1.34 kbp 付近にバンドが検出された。*CRE* リコンビナーゼが作用しなかったと考えられる個体では、2.75 kbp のバンドが検出されると予測していたが、増幅産物は確認できなかった。これは増幅配列内に PCR による増幅が困難な GC 含量の高いプロモーター領域が含まれていたためと考えられる。

(C) 1 番染色体にホットスポットが導入された個体と、*FLP*/+系統との交配により得られた世代の個体における *Frt* 配列間の PCR 増幅結果。最も左のレーンの *FLP*/+系統と交配していない個体では 2.63 kbp の増幅産物が得られたのに対し、*FLP*/+系統と交配により生まれた世代の個体では 853 bp の増幅産物が得られた。

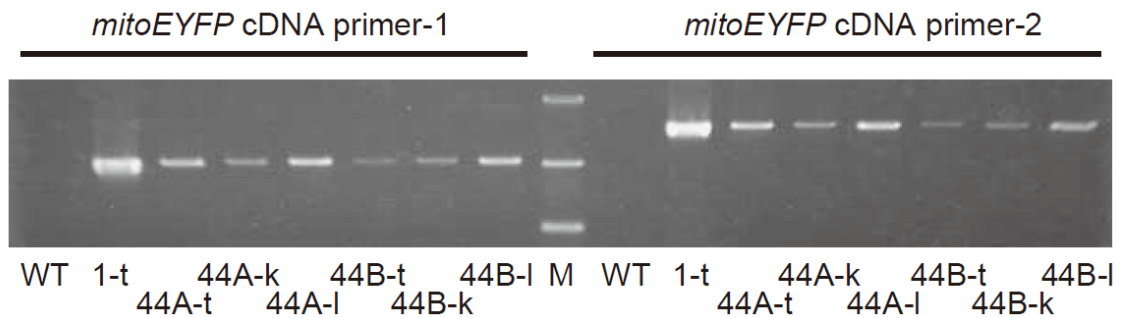


図 6. PCR による *mitoEYFP* mRNA の発現解析

mitoEYFP mRNA の発現確認は、トリ β-アクチンプロモーター内のエキソンと、*mitoEYFP* 配列にそれぞれプライマーを設計し、mRNA より合成した cDNA を PCR で検出する方法で行った。プライマーは 2 組設計した。それぞれのレーンのサンプル名は、WT が C57BL/6 系統精巣由来の cDNA、1-t がホットスポット導入マウス精巣由来の cDNA、44A は組換え頻度検出マウスを表し、-t は精巣、-k は腎臓、-l は肝臓に由来する cDNA である。44B は組換え頻度検出マウスと異なる B6 型 *Prdm9* ホモ接合体であり、*Psm9* ホットスポットで組換えは起きにくい。末尾の小文字は 44A と同様に由来する組織を表す。なお、いずれも 1 番染色体にホットスポットが導入された系統に由来する個体である。44A-t でのみ組換えが観察され、1-t と 44A-t にバンドが出ると予測していたが、WT を除くすべての試料で *mitoEYFP* mRNA に由来する cDNA の増幅産物が観察された。

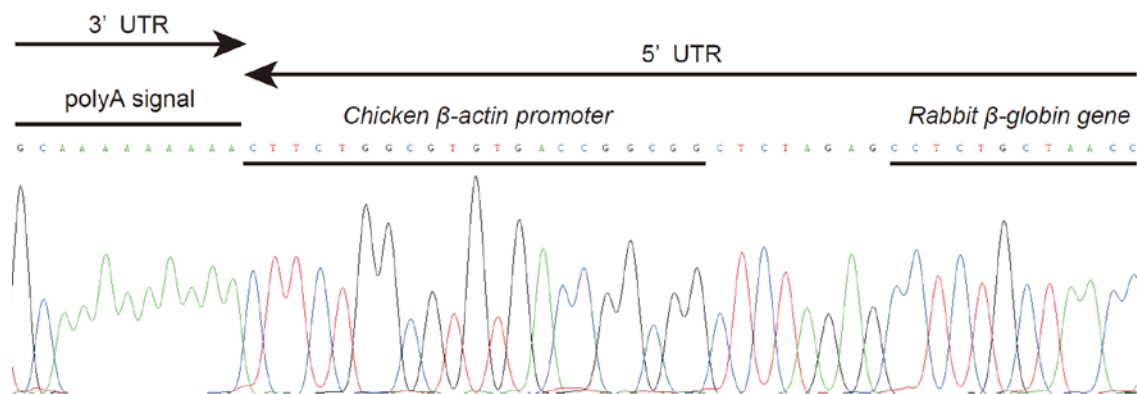


図 7. 5' RACE による転写開始点の解析

Tg (*Psmb9 HS-mitoEYFP*) マウスの cDNA を合成し、*mitoEYFP* 周辺の RACE を行い転写開始点を解析した結果。左側よりウサギ β -グロビン mRNA の 3' 非翻訳領域 (UTR) 端に付加されるポリアデニルシグナル、平滑末端の 2 本鎖環状化反応による結合点に続き、5' UTR に相当するトリ β -アクチン遺伝子のプロモーター領域、右端にかけてウサギ β -グロビン遺伝子となっている。5.6 kbp の *Psmb9* ホットスポット配列をはさんで上流側に *CMV-IE* エンハンサーとトリ β -アクチンプロモーターが存在すれば、スプライシングによりこの UTR は mRNA として検出されないはずだが、無い場合でも β -アクチンプロモーターの一部配列が機能し TSS を生成、単一エキソンの *mitoEYFP* mRNA が発現していた。

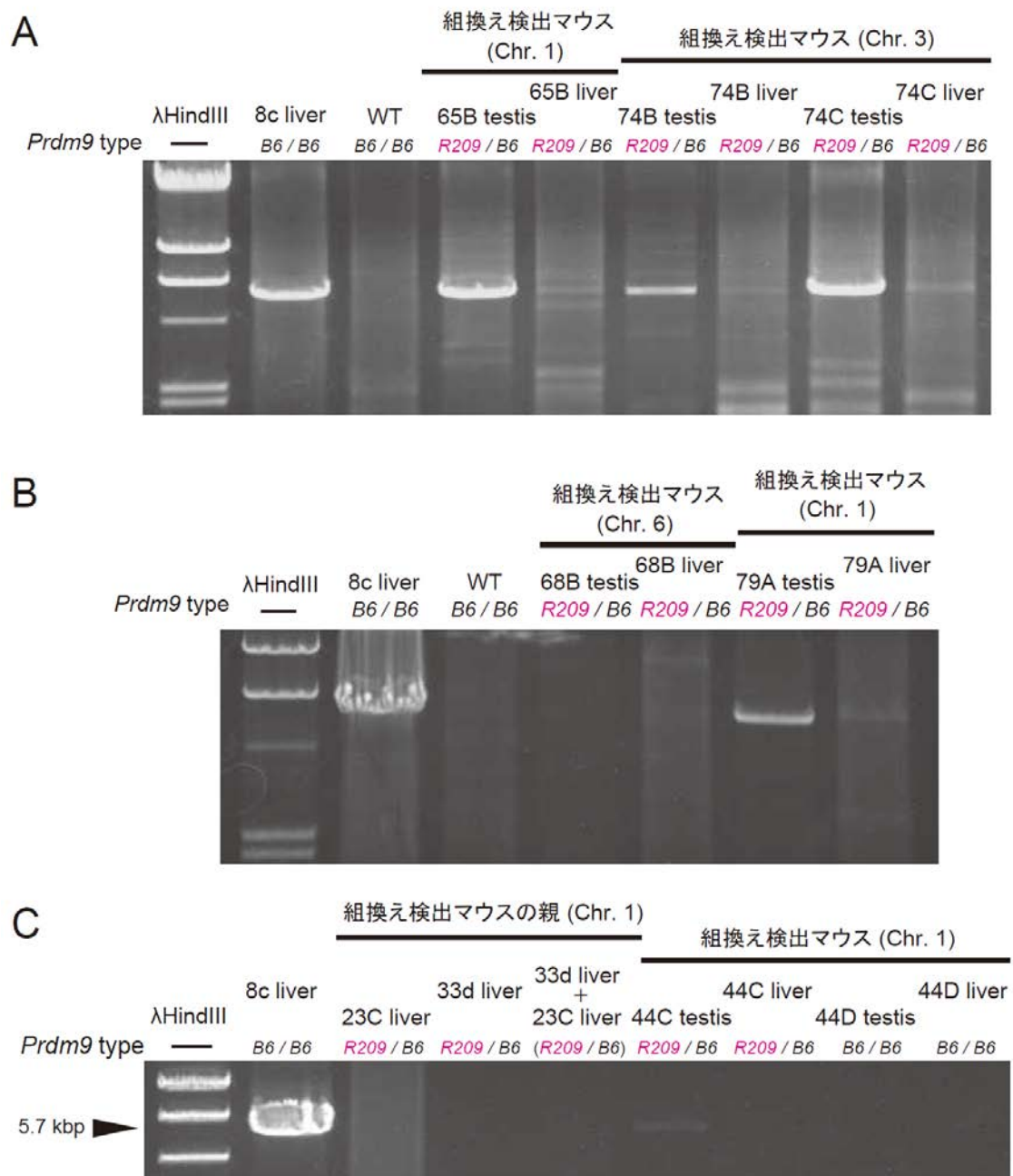


図 8. PCR による組換えの検出

(A) 1 番染色体と 3 番染色体に *Psm9* ホットスポットが導入された系統の、ゲノム DNA をテンプレートとした PCR による組換えの検出。1 番染色体の *Psm9* ホットスポット導入マウスをコントロールとした。65B、74B、74C いずれの個体でも精巣由来のゲノム DNA では増幅が見られるのに対し、肝臓由来のゲノム DNA では同位置のバンドはほとんど検出され

ない。

(B) 1 番染色体と 6 番染色体に導入された個体に対し、同様の解析を行った場合の電気泳動像。6 番染色体に導入された系統では、導入個所での組換えが検出されなかった。

(C) 1 番染色体に導入された個体に対し、PCR による人工的な増幅産物と、Prdm9 ZFA 型が *Psmb9* ホットスポットでの組換えに与える影響を検証した結果。44C は R209 型 *Prdm9* のヘテロ接合体だが、44D は B6 型 *Prdm9* ホモ接合体である。44C の精巣でのみ組換えが検出された。

総合討論

本研究では、まずマウス *Prdm9* の多型解析を行い、野生マウスの亜種集団ごとに進化の経路を反映した豊富な多型が存在することを新規に発見した。一方で、*Prdm9* が多型依存的に生殖隔離の責任遺伝子として機能する可能性があるのは、少なくとも一部の亜種間のみであることがわかった。また、*Prdm9* には転写因子としての機能が報告されていたが、配列特異的な DNA 結合ドメインと推定される ZFA に高度に多型が存在することは、特定の生殖細胞関係の遺伝子に関する転写因子として働く可能性は低いと考えられる。おそらく *Prdm9* は、組換えホットスポットの活性化が主な機能なのであろう。

Prdm9 遺伝子の ZFA 領域をタグ付加アレルで置換した KI マウスでは、減数分裂期に異常な染色体が観察され、初産日数の延長や受精率が低下する低形質性を示した。こうした表現型は KO マウスのヘテロ接合体と類似しており、*Prdm9* の染色体への結合低下が、染色体の不十分な H3K4me3 修飾につながり、同一の修飾が *Prdm9* に依存せずに施される転写プロモーターなどで DSB が偶発的に誘発され、その結果減数分裂進行に異常が生じた可能性がある。

Psm9 ホットスポット配列を利用した組換え検出系では、人工的に導入した組換えホットスポットでも相同組換えを誘導することに成功し、*Prdm9* がマウスにおける普遍的なホットスポット活性化因子であることを支持する結果が得られた。しかしながら、導入された位置によっては同一の配列であっても組換えホットスポットが活性化しない場合があった。全てのホットスポットの組換え頻度が一様でないことから、*Prdm9* 以外の因子や周辺のヒストン修飾の影響が少なからずあると推測される。

近年、*Prdm9* に関する報告は相次いでおり、特に *Prdm9* 非依存的な相同組換え機構をもつ生物の組換え部位の分布との差異などが議論されている。これらの *Prdm9* 非依存的なホットスポットは、転写開始点や CpC アイランドに代表される特殊な領域に頻繁に見出される。これら *Prdm9* 非依存的なホットスポットにおいても、一見すると何ら不都合が生じているようには見えない。また、*Prdm9* に依存しないヒストン H3K4 のメチル化は、*Prdm9* 依存的な組換えを行うヒトやマウスのプロモーター領域などで一般的に観察される。では、

ヒトやマウスにおいてなぜ Prdm9 依存的なホットスポットが維持されているのであろうか。

その理由の一つとして、Prdm9 に依存しないホットスポットが形成されやすい転写開始点や CpG アイランドを避けて DSB を生成する機構があるのではないかと考えられている (Myers et al, 2006)。減数分裂期の組換えホットスポット周辺では DNA 配列の変化が起こりやすい。切断された DNA 鎖が修復される際に多型が入る場合があるが、これが転写制御領域や遺伝子内で頻繁に起こると重大な影響を与えることが考えられる。したがって、これらの領域で組換えホットスポットが形成されることを回避することは合理的である。

もう一つの考え方は、「ホットスポットのパラドックス」に関わるものである (Boulton et al., 1997)。「ホットスポットのパラドックス」とは、組換えホットスポットで DNA が切断され、組換えによって修復が起こるとその部分の配列が変化し、もはやホットスポット配列として認識されなくなると言うものである。これが繰り返されれば、生物のゲノムからホットスポットは失われていくことになる。そこで、ホットスポットを生み出す Prdm9 の結合配列が高速に変化することに意義が生じる。組換えによってホットスポット配列が変化してしまっても、Prdm9 の高速進化により新たな染色体部位がホットスポット化することで、ホットスポットの消失を防ぐことが可能になるというわけである。相同組換え機構はゲノムの維持に関わる一方で多様性を生み出す。Prdm9 を通じてこの二律背反的な役割をマウスやヒトは調整し、ゲノム進化が持続的に行われてきたのであろう。また、ヒストンメチル化というエピジェネティック修飾を介した Prdm9 によるホットスポット形成機構は、ゲノム進化とエピゲノム制御の可能性を分子的に示すものであり、環境とゲノム進化との相互作用に関して今後重要な示唆を与えると考えられる。

謝辞

本研究を行うに当たり、指導教員である教授 太田邦史博士には研究の方針立案、論文作成等、全般にわたり多大なご指導をいただきました。また本研究の実験は主に国立遺伝学研究所・哺乳動物遺伝研究室の実験施設を利用しており、共同研究者の国立遺伝学研究所教授 城石俊彦博士をはじめ研究室のスタッフの皆様には実験の指導と結果についての議論、マウスの胚操作や系統管理で大変お世話になりました。そして国立遺伝学研究所の宿泊施設等、研究環境を支えて頂いた皆様のお力添えがなくては遂行不可能でした。研究に使用した試料の中には、現在では入手が非常に困難な野生捕獲マウスゲノムや、作成に多くの労力を要求される野生由来近交系マウスが含まれます。そのため本研究は主に 1980 年代に中東や中央アジア、東南アジアの離島にまでマウス試料収集に赴いた方々、そして野生由来近交系樹立に中心的な役割を果たした故 森脇和郎博士の存在なくして完成しませんでした。さらに現在もマウス試料を保管している北海道大学准教授 鈴木仁博士と理研 BRC チームリーダー 阿部訓也博士には、試料の提供だけでなく解析結果についても議論していただきました。集団遺伝学的な解析、特にコンピューターを用いた系統解析については北海道大学准教授 長田直樹博士にお世話になりました。理研 BRC の田村勝博士には国立遺伝学研究所において PCR やクローニングなど基礎的なところから詳細な実験手技等をご指導いただき、第 2 章、第 3 章の遺伝子コンストラクト設計では大変お世話になりました。第 3 章の Tol2 トランスポゾンシステムによる遺伝子導入では、理研 QBiC ユニットリーダー 隅山健太博士にアドバイスと実際の実験にご協力いただきました。解析配列の遺伝情報データベースへの登録にあたっては DDBJ のスタッフの方に粘り強くご指導いただきました。太田研究室の瀬尾秀宗博士と橋本講司さんには、第 2 章、第 3 章の遺伝子コンストラクトの作成と検証にご協力いただきました。本論文の内容には含まれませんが、Prdm9 の抑制因子の探索の際には太田研究室の久郷和人博士に、次世代シーケンサーを利用した解析で多くの時間を割いていただきました。その他太田研究室の皆様にも研究内容の議論はもとより、悩みごとの相談に至るまでの幅広い面でお世話になり、大変感謝しております。この場を借りて全ての皆様に心より厚く御礼申し上げます。

参考文献

- Acquaviva L, Székvölgyi L, Dichtl B, Dichtl BS, de La Roche Saint André C, Nicolas A & Géli V. The COMPASS subunit Spp1 links histone methylation to initiation of meiotic recombination. *Science*. **339**(6116):215-218.
- Anderson LK, Reeves A, Webb LM & Ashley T. (1999) Distribution of crossing over on mouse synaptonemal complexes using immunofluorescent localization of MLH1 protein. *Genetics*. **151**(4):1569-1579.
- Araki K, Araki M & Yamamura K. (2002) Site-directed integration of the cre gene mediated by Cre recombinase using a combination of mutant *lox* sites. *Nucleic Acids Res*. **30**(19):e103.
- Austin CP, Battey JF, Bradley A, Bucan M, Capecchi M, Collins FS, Dove WF, Duyk G, Dymecki S, Eppig JT, Grieder FB, Heintz N, Hicks G, Insel TR, Joyner A, Koller BH, Lloyd KC, Magnuson T, Moore MW, Nagy A, Pollock JD, Roses AD, Sands AT, Seed B, Skarnes WC, Snoddy J, Soriano P, Stewart DJ, Stewart F, Stillman B, Varmus H, Varticovski L, Verma IM, Vogt TF, von Melchner H, Witkowski J, Woychik RP, Wurst W, Yancopoulos GD, Young SG & Zambrowicz B. (2004) The knockout mouse project. *Nat Genet*. **36**(9):921-924.
- Auton A, Rui Li Y, Kidd J, Oliveira K, Nadel J, Holloway JK, Hayward JJ, Cohen PE, Grealley JM, Wang J, Bustamante CD & Boyko AR. (2013) Genetic recombination is targeted towards gene promoter regions in dogs. *PLoS Genet*. **9**(12):e1003984.
- Axelsson E, Webster MT, Ratnakumar A; LUPA Consortium, Ponting CP, & Lindblad-Toh K. (2012) Death of *PRDM9* coincides with stabilization of the recombination landscape in the dog genome. *Genome Res*. **22**(1):51-63.
- Babaya N, Ueda H, Noso S, Hiromine Y, Itoi-Babaya M, Kobayashi M, Fujisawa T & Ikegami H. (2014) Genetic dissection of susceptibility genes for diabetes and related phenotypes on mouse chromosome 14 by means of congenic strains. *BMC Genet*. **15**:93.
- Baker SM, Plug AW, Prolla TA, Bronner CE, Harris AC, Yao X, Christie DM, Monell C, Arnheim N, Bradley A, Ashley T & Liskay RM. (1996) Involvement of mouse *Mlh1* in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. *Nat Genet*. **13**(3):336-342.
- Baudat F & de Massy B. (2007) *Cis*- and *trans*-acting elements regulate the mouse *Psmb9* meiotic recombination hotspot. *PLoS Genet*. **3**(6):e100.
- Beck JA, Lloyd S, Hafezparast M, Lennon-Pierce M, Eppig JT, Festing MF & Fisher EM. (2000) Genealogies of mouse inbred strains. *Nat Genet*. **24**(1):23-25.
- Berger A, Lorain S, Joséphine C, Desrosiers M, Peccate C, Voit T, Garcia L, Sahel JA & Bemelmans AP. (2015) Repair of rhodopsin mRNA by spliceosome-mediated RNA *trans*-splicing: a new approach for autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Mol Ther*. **23**(5):918-930.
- Bhattacharyya T, Reifova R, Gregorova S, Simecek P, Gergelits V, Mistrik M, Martincova I, Pialek J & Forejt J. (2014) X

- chromosome control of meiotic chromosome synapsis in mouse inter-subspecific hybrids. *PLoS Genet.* **10**(2):e1004088
- Billings T, Parvanov ED, Baker CL, Walker M, Paigen K & Petkov PM. (2013) DNA binding specificities of the long zinc-finger recombination protein PRDM9. *Genome Biol.* **14**(4):R35.
- Birtle Z & Ponting CP. (2006) Meisetz and the birth of the KRAB motif. *Bioinformatics.* **22**(23):2841-2845.
- Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaye T, Nickstadt A & Bonas U. (2009) Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science.* **326**(5959):1509-1512.
- Bogdanove AJ & Voytas DF. (2011) TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. *Science.* **333**(6051):1843-1846.
- Borde V, Robine N, Lin W, Bonfils S, Géli V & Nicolas A. (2009) Histone H3 lysine 4 trimethylation marks meiotic recombination initiation sites. *EMBO J.* **28**(2):99-111
- Borghans JA, Beltman JB & De Boer RJ. (2004) MHC polymorphism under host-pathogen coevolution. *Immunogenetics.* **55**(11):732-739.
- Boulton A, Myers RS, Redfield RJ. (1997) The hotspot conversion paradox and the evolution of meiotic recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**(15):8058-8063.
- Buard J, Barthès P, Grey C & de Massy B. (2009) Distinct histone modifications define initiation and repair of meiotic recombination in the mouse. *EMBO J.* **28**(17):2616-2624.
- Bult CJ, Eppig JT, Blake JA, Kadin JA & Richardson JE; Mouse Genome Database Group. (2016) Mouse genome database 2016. *Nucleic Acids Res.* **44**(D1):D840-847.
- Burgoyne PS. (1982) Genetic homology and crossing over in the X and Y chromosomes of Mammals. *Hum Genet.* **61**(2):85-90.
- Burt A & Bell G. (1987) Mammalian chiasma frequencies as a test of two theories of recombination. *Nature.* **326**(6115):803-805
- Brick K, Smagulova F, Khil P, Camerini-Otero RD & Petukhova GV. (2012) Genetic recombination is directed away from functional genomic elements in mice. *Nature.* **485**(7400):642-645.
- Brunschwig H, Levi L, Ben-David E, Williams RW, Yakir B & Shifman S. (2012) Fine-scale maps of recombination rates and hotspots in the mouse genome. *Genetics.* **191**(3):757-764.
- Capecchi MR. (2005) Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat Rev Genet.* **6**(6):507-512.
- Caudevilla C, Serra D, Miliar A, Codony C, Asins G, Bach M & Hegardt FG. (1998) Natural trans-splicing in carnitine

- octanoyltransferase pre-mRNAs in rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**(21):12185-12190.
- Chan AH, Jenkins PA & Song YS. (2012) Genome-wide fine-scale recombination rate variation in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet*.**8**(12):e1003090.
- Cherry JM, Ball C, Weng S, Juvik G, Schmidt R, Adler C, Dunn B, Dwight S, Riles L, Mortimer RK & Botstein D. (1997) Genetic and physical maps of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*. **387**(6632 Suppl):67-73.
- Botstein D, White RL, Skolnick M & Davis RW. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*. **32**(3):314-331.
- Collaborative Cross Consortium. (2012) The genome architecture of the Collaborative Cross mouse genetic reference population. *Genetics*. **190**(2):389-401
- Crichton JH, Playfoot CJ & Adams IR. (2014) The role of chromatin modifications in progression through mouse meiotic prophase. *J Genet Genomics*. **41**(3):97-106.
- Dass B, McMahon KW, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG & MacDonald CC. (2001) The gene for a variant form of the polyadenylation protein CstF-64 is on chromosome 19 and is expressed in pachytene spermatocytes in mice. *J Biol Chem*. **276**(11):8044-8050.
- Diaz RL, Alcid AD, Berger JM & Keeney S. (2002) Identification of residues in yeast Spo11p critical for meiotic DNA double-strand break formation. *Mol Cell Biol*. **22**(4):1106-1115.
- Eddy EM. (2002) Male germ cell gene expression. *Recent Prog Horm Res*. **57**:103-128.
- Forejt J & Ivanyi P. (1974) Genetic studies on male sterility of hybrids between laboratory and wild mice (*Mus musculus L.*). *Genet Res*. **24**(2):189-206.
- Foulkes NS, Mellström B, Benusiglio E & Sassone-Corsi P. (1992) Developmental switch of CREM function during spermatogenesis: from antagonist to activator. *Nature*. **355**(6355):80-84.
- Fox ME, Yamada T, Ohta K & Smith GR. (2000) A Family of cAMP-Response-Element-Related DNA Sequences With Meiotic Recombination Hotspot Activity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*. **156**(1):59-68
- Finta C & Zaphiropoulos PG. (2002) Intergenic mRNA molecules resulting from *trans*-splicing. *J Biol Chem*. **277**(8):5882-5890.
- Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, Higgins J, DeFelice M, Lochner A, Faggart M, Liu-Cordero SN, Rotimi C, Adeyemo A, Cooper R, Ward R, Lander ES, Daly MJ & Altshuler D. (2002) The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science*. **296**(5576):2225-2229.
- Gerton JL, DeRisi J, Shroff R, Lichten M, Brown PO & Petes TD. (2000) Global mapping of meiotic recombination hotspots and coldspots in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**(21):11383-11390.

Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, Zeitler B, Miller JC, Choi VM, Jenkins SS, Wood A, Cui X, Meng X, Vincent A, Lam S, Michalkiewicz M, Schilling R, Foeckler J, Kalloway S, Weiler H, Ménoret S, Anegon I, Davis GD, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Jacob HJ & Buelow R (2009) Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science*. **325**(5939):433.

Goüy de Bellocq J, Baird SJ, Albrechtová J, Sobeková K & Piálek J. (2015) Murine cytomegalovirus is not restricted to the house mouse *Mus musculus domesticus*: prevalence and genetic diversity in the European house mouse hybrid zone. *J Virol*. **89**(1):406-414.

Gregorová S, Divina P, Storchova R, Trachtulec Z, Fotopulosova V, Svenson KL, Donahue LR, Paigen B & Forejt J. (2008) Mouse consomic strains: exploiting genetic divergence between *Mus m. musculus* and *Mus m. domesticus* subspecies. *Genome Res*. **18**(3):509-515

Grey C1, Barthès P, Chauveau-Le Fric G, Langa F, Baudat F & de Massy B. (2011) Mouse PRDM9 DNA-binding specificity determines sites of histone H3 lysine 4 trimethylation for initiation of meiotic recombination. *PLoS Biol*. **9**(10):e1001176.

Guénet JL & Bonhomme F. (2003) Wild mice: an ever-increasing contribution to a popular mammalian model. *Trends Genet*. **19**(1):24-31.

Guillon H, Baudat F, Grey C, Liskay RM & de Massy B. (2005) Crossover and noncrossover pathways in mouse meiosis. *Mol Cell*. **20**(4):563-573.

Guillon H & de Massy B. (2002) An initiation site for meiotic crossing-over and gene conversion in the mouse. *Nat Genet*. **32**(2):296-299.

Hassold T & Hunt P. (2001) To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet*. **2**(4):280-291.

Heil CS & Noor MA. (2012) Zinc finger binding motifs do not explain recombination rate variation within or between species of *Drosophila*. *PLoS One*. **7**(9):e45055.

Henderson KA, Kee K, Maleki S, Santini PA & Keeney S. (2006) Cyclin-dependent kinase directly regulates initiation of meiotic recombination. *Cell*. **125**(7):1321-1332.

Hirota K, Mizuno K, Shibata T & Ohta K. (2008) Distinct chromatin modulators regulate the formation of accessible and repressive chromatin at the fission yeast recombination hotspot *ade6-M26*. *Mol Biol Cell*. **19**(3):1162-1173

Huang Z, Tamura M, Sakurai T, Chuma S, Saito T & Nakatsuji N. (2000) In vivo transfection of testicular germ cells and transgenesis by using the mitochondrially localized jellyfish fluorescent protein gene. *FEBS Lett*. **487**(2):248-251.

Hunt WG & Selander RK. (1973) Biochemical genetics of hybridisation in European house mice. *Heredity* (Edinb). **31**(1):11-33.

- Irie S, Tsujimura A, Miyagawa Y, Ueda T, Matsuoka Y, Matsui Y, Okuyama A, Nishimune Y & Tanaka H. (2009) Single-nucleotide polymorphisms of the *PRDM9* (*MEISETZ*) gene in patients with nonobstructive azoospermia. *J Androl.* **30**(4):426-431
- Isobe T, Yoshino M, Mizuno K, Lindahl KF, Koide T, Gaudieri S, Gojobori T & Shiroishi T. (2002) Molecular characterization of the *Pb* recombination hotspot in the mouse major histocompatibility complex class II region. *Genomics.* **80**(2):229-235.
- Keane TM, Goodstadt L, Danecek P, White MA, Wong K, Yalcin B, Heger A, Agam A, Slater G, Goodson M, Furlotte NA, Eskin E, Nellåker C, Whitley H, Cleak J, Janowitz D, Hernandez-Pliego P, Edwards A, Belgard TG, Oliver PL, McIntyre RE, Bhomra A, Nicod J, Gan X, Yuan W, van der Weyden L, Steward CA, Bala S, Stalker J, Mott R, Durbin R, Jackson IJ, Czechanski A, Guerra-Assunção JA, Donahue LR, Reinholdt LG, Payseur BA, Ponting CP, Birney E, Flint J & Adams DJ. (2011) Mouse genomic variation and its effect on phenotypes and gene regulation. *Nature.* **477**(7364):289-294.
- Kauppi L, Jasin M & Keeney S. (2007) Meiotic crossover hotspots contained in haplotype block boundaries of the mouse genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**(33):13396-13401.
- Kauppi L, Jeffreys AJ & Keeney S. (2004) Where the crossovers are: recombination distributions in mammals. *Nat Rev Genet.* **5**(6):413-424.
- Keeney S. (2001) Mechanism and control of meiotic recombination initiation. *Curr Top Dev Biol.* **52**:1-53.
- Keeney S, Giroux CN & Kleckner N. (1997) Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell.* **88**(3):375-384.
- Kondrychyn I, Garcia-Lecea M, Emelyanov A, Parinov S & Korzh V. (2009) Genome-wide analysis of *Tol2* transposon reintegration in zebrafish. *BMC Genomics.* **10**:418.
- Kong A, Gudbjartsson DF, Sainz J, Jonsdottir GM, Gudjonsson SA, Richardsson B, Sigurdardottir S, Barnard J, Hallbeck B, Masson G, Shlien A, Palsson ST, Frigge ML, Thorgeirsson TE, Gulcher JR, Stefansson K. (2002) A high-resolution recombination map of the human genome. *Nat Genet.* **31**(3):241-247.
- Kono H, Tamura M, Osada N, Suzuki H, Abe K, Moriwaki K, Ohta K & Shiroishi T. (2014) *Prdm9* polymorphism unveils mouse evolutionary tracks. *DNA Res.* **21**(3):315-326
- MacDonald CC & Redondo JL. (2002) Reexamining the polyadenylation signal: were we wrong about AAUAAA? *Mol Cell Endocrinol.* **190**(1-2):1-8.
- Mancera E, Bourgon R, Brozzi A, Huber W & Steinmetz LM. (2008) High-resolution mapping of meiotic crossovers and non-crossovers in yeast. *Nature.* **454**(7203):479-485.
- Martini E, Diaz RL, Hunter N & Keeney S. (2006) Crossover homeostasis in yeast meiosis. *Cell.* **126**(2):285-295.

- McMahon KW, Hirsch BA & MacDonald CC. (2006) Differences in polyadenylation site choice between somatic and male germ cells. *BMC Mol Biol.* **7**:35.
- McMahill MS1, Sham CW & Bishop DK. (2007) Synthesis-dependent strand annealing in meiosis. *PLoS Biol.* **5**(11):e299.
- Mieczkowski PA, Dominska M, Buck MJ, Lieb JD & Petes TD. (2007) Loss of a histone deacetylase dramatically alters the genomic distribution of Spo11p-catalyzed DNA breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**(10):3955-3960.
- Mihola O, Trachtulec Z, Vlcek C, Schimenti JC & Forejt J. (2009) A mouse speciation gene encodes a meiotic histone H3 methyltransferase. *Science.* **323**(5912):373-375.
- Miyamoto T, Koh E, Sakugawa N, Sato H, Hayashi H, Namiki M & Sengoku K. (2008) Two single nucleotide polymorphisms in *PRDM9 (MEISETZ)* gene may be a genetic risk factor for Japanese patients with azoospermia by meiotic arrest. *J Assist Reprod Genet.* **25**(11-12):553-557
- Mizuno K, Koide T, Sagai T, Moriwaki K & Shiroishi T. (1996) Molecular analysis of a recombinational hotspot adjacent to *Lmp2* gene in the mouse MHC: fine location and chromatin structure. *Mamm Genome.* **7**(7):490-496.
- Miyazaki J, Takaki S, Araki K, Tashiro F, Tominaga A, Takatsu K & Yamamura K. (1989) Expression vector system based on the chicken beta-actin promoter directs efficient production of interleukin-5. *Gene.* **79**(2):269-277.
- Moriwaki K, Miyashita N, Mita A, Gotoh H, Tsuchiya K, Kato H, Mekada K, Noro C, Oota S, Yoshiki A, Obata Y, Yonekawa H & Shiroishi T. (2009) Unique inbred strain MSM/Ms established from the Japanese wild mouse. *Exp Anim.* **58**(2):123-134.
- Myers S, Freeman C, Auton A, Donnelly P & McVean G. (2008) A common sequence motif associated with recombination hot spots and genome instability in humans. *Nat Genet.* **40**(9):1124-1129
- Myers S1, Spencer CC, Auton A, Bottolo L, Freeman C, Donnelly P & McVean G. (2006) The distribution and causes of meiotic recombination in the human genome. *Biochem Soc Trans.* **34**(Pt 4):526-530.
- Narayanan K & Chen Q. (2011) Bacterial artificial chromosome mutagenesis using recombineering. *J Biomed Biotechnol.* **2011**:971296.
- Nadeau JH, Singer JB, Matin A & Lander ES. (2000) Analysing complex genetic traits with chromosome substitution strains. *Nat Genet.* **24**(3):221-225.
- Neale MJ & Keeney S. (2006) Clarifying the mechanics of DNA strand exchange in meiotic recombination. *Nature.* **442**(7099):153-158.
- Niwa H, Yamamura K & Miyazaki J. (1991) Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene.* **108**(2):193-199.

Ohtsuka M, Ogiwara S, Miura H, Mizutani A, Warita T, Sato M, Imai K, Hozumi K, Sato T, Tanaka M, Kimura M & Inoko H. (2010) Pronuclear injection-based mouse targeted transgenesis for reproducible and highly efficient transgene expression. *Nucleic Acids Res.* **38**(22):e198.

Oliver PL, Goodstadt L, Bayes JJ, Birtle Z, Roach KC, Phadnis N, Beatson SA, Lunter G, Malik HS & Ponting CP. (2009) Accelerated evolution of the *Prdm9* speciation gene across diverse metazoan taxa. *PLoS Genet.* **5**(12):e1000753.

Takada T, Mita A, Maeno A, Sakai T, Shitara H, Kikkawa Y, Moriwaki K, Yonekawa H & Shiroishi T. (2008) Mouse inter-subspecific consomic strains for genetic dissection of quantitative complex traits. *Genome Res.* **18**(3):500-508

Takada T & Shiroishi T. (2012) Complex quantitative traits cracked by the mouse inter-subspecific consomic strains. *Exp Anim.* **61**(4):375-388.

The Complex Trait Consortium (2004) The Collaborative Cross, a community resource for the genetic analysis of complex traits. *Nat Genet.* **36**(11):1133-1137

The International HapMap Consortium. (2007) A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature.* **449**(7164):851-861.

Thompson JD, Higgins DG & Gibson TJ. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* **22** (22): 4673-4680.

Trachtulec Z, Mihola O, Vlcek C, Himmelbauer H, Paces V & Forejt J. (2005) Positional cloning of the Hybrid sterility 1 gene: fine genetic mapping and evaluation of two candidate genes. *Biol J Linnean Soc.* **84**: 637–641.

Trachtulec Z, Mnukova-Fajdelova M, Hamvas RM, Gregorova S, Mayer WE, Lehrach HR, Vincek V, Forejt J & Klein J. (1997) Isolation of candidate hybrid sterility 1 genes by cDNA selection in a 1.1 megabase pair region on mouse chromosome 17. *Mamm Genome.* **8**(5):312-316.

Paigen K. One hundred years of mouse genetics: an intellectual history. I. The classical period (1902-1980). *Genetics.* **163**(1):1-7.

Paigen K & Petkov P. (2010) Mammalian recombination hot spots: properties, control and evolution. *Nat Rev Genet.* **11**(3):221-233.

Parvanov ED, Ng SH, Petkov PM & Paigen K. (2009) *Trans*-regulation of mouse meiotic recombination hotspots by *Rcr1*. *PLoS Biol.* **7**(2):e36.

Ponticelli AS, Sena EP & Smith GR. (1988) Genetic and physical analysis of the *M26* recombination hotspot of *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics.* **119**(3):491-497.

Reich DE, Cargill M, Bolk S, Ireland J, Sabeti PC, Richter DJ, Lavery T, Kouyoumjian R, Farhadian SF, Ward R &

- Lander ES. (2001) Linkage disequilibrium in the human genome. *Nature*. **411**(6834):199-204.
- Rockmill B, Voelkel-Meiman K, Roeder GS. (2006) Centromere-proximal crossovers are associated with precocious separation of sister chromatids during meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **174**(4):1745-1754.
- Rogner UC & Avner P. (2003) Congenic mice: cutting tools for complex immune disorders. *Nat Rev Immunol*. **3**(3):243-252.
- Romanienko PJ & Camerini-Otero RD. (2000) The mouse *Spo11* gene is required for meiotic chromosome synapsis. *Mol Cell*. **6**(5):975-987.
- Sakai T, Kikkawa Y, Miura I, Inoue T, Moriwaki K, Shiroishi T, Satta Y, Takahata N & Yonekawa H. (2005) Origins of mouse inbred strains deduced from whole-genome scanning by polymorphic microsatellite loci. *Mamm Genome*. **16**(1):11-19.
- Sasanuma H, Hirota K, Fukuda T, Kakusho N, Kugou K, Kawasaki Y, Shibata T, Masai H & Ohta K. (2008) Cdc7-dependent phosphorylation of Mer2 facilitates initiation of yeast meiotic recombination. *Genes Dev*. **22**(3):398-410.
- Shiroishi T, Hanzawa N, Sagai T, Ishiura M, Gojobori T, Steinmetz M & Moriwaki K. (1990) Recombinational hotspot specific to female meiosis in the mouse major histocompatibility complex. *Immunogenetics*. **31**(2):79-88.
- Shiroishi T, Sagai T, Hanzawa N, Gotoh H & Moriwaki K. (1991) Genetic control of sex-dependent meiotic recombination in the major histocompatibility complex of the mouse. *EMBO J*. **10**(3):681-686.
- Silver LM & Artzt K. (1981) Recombination suppression of mouse *t*-haplotypes due to chromatin mismatching. *Nature*. **290**(5801):68-70.
- Siomi MC, Sato K, Pezic D & Aravin AA. (2011) PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **12**(4):246-258.
- Smagulova F, Brick K, Pu Y, Sengupta U, Camerini-Otero RD & Petukhova GV. (2013) Suppression of genetic recombination in the pseudoautosomal region and at subtelomeres in mice with a hypomorphic *Spo11* allele. *BMC Genomics*. **14**:493.
- Smith CM, Finger JH, Hayamizu TF, McCright IJ, Xu J, Eppig JT, Kadin JA, Richardson JE & Ringwald M. (2015) GXD: a community resource of mouse Gene Expression Data. *Mamm Genome*. **26**(7-8):314-324.
- Sommer S. (2005) The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. *Front Zool*. **2**:16.
- Soriano P. (1999) Generalized *lacZ* expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet*. **21**(1):70-71.
- Steinmetz M, Minard K, Horvath S, McNicholas J, Srelinger J, Wake C, Long E, Mach B & Hood L. (1982) A molecular

- map of the immune response region from the major histocompatibility complex of the mouse. *Nature*. **300**(5887):35-42.
- Sumiyama K, Kawakami K & Yagita K. (2010) A simple and highly efficient transgenesis method in mice with the Tol2 transposon system and cytoplasmic microinjection. *Genomics*. **95**(5):306-311.
- Suzuki H, Nunome M, Kinoshita G, Aplin KP, Vogel P, Kryukov AP, Jin ML, Han SH, Maryanto I, Tsuchiya K, Ikeda H, Shiroishi T, Yonekawa H & Moriwaki K. (2013) Evolutionary and dispersal history of Eurasian house mice *Mus musculus* clarified by more extensive geographic sampling of mitochondrial DNA. *Heredity*. **111**(5):375-390.
- Suzuki H & Aplin KP. (2012) Phylogeny and biogeography of the genus *Mus* in Eurasia. In *Evolution of the House Mouse*, ed. Macholán M, Baird SJE, Munclinger P & Piálek J., Cambridge University Press, pp.35-64
- Wakeland E, Morel L, Achey K, Yui M & Longmate J. (1997) Speed congenics: a classic technique in the fast lane (relatively speaking). *Immunol Today*. **18**(10):472-477.
- Walker M, Billings T, Baker CL, Powers N, Tian H, Saxl RL, Choi K, Hibbs MA, Carter GW, Handel MA, Paigen K & Petkov PM. (2015) Affinity-seq detects genome-wide PRDM9 binding sites and reveals the impact of prior chromatin modifications on mammalian recombination hotspot usage. *Epigenetics Chromatin*. **8**:31.
- Wolf G, Greenberg D & Macfarlan TS. (2015) Spotting the enemy within: Targeted silencing of foreign DNA in mammalian genomes by the Krüppel-associated box zinc finger protein family. *Mob DNA*. **6**:17.
- Wu CI & Palopoli MF. (1994) Genetics of postmating reproductive isolation in animals. *Annu Rev Genet*. **28**:283-308.
- Wu CI & Ting CT. (2004) Genes and speciation. *Nat Rev Genet*. **5**(2):114-122.
- Wu H, Mathioudakis N, Diagouraga B, Dong A, Dombrovski L, Baudat F, Cusack S, de Massy B & Kadlec J. (2013) Molecular basis for the regulation of the H3K4 methyltransferase activity of PRDM9. *Cell Rep*. **5**(1):13-20.
- Xu L, Daly T, Gao C, Flotte TR, Song S, Byrne BJ, Sands MS & Parker Ponder K. (2001) CMV-beta-actin promoter directs higher expression from an adeno-associated viral vector in the liver than the cytomegalovirus or elongation factor 1 alpha promoter and results in therapeutic levels of human factor X in mice. *Hum Gene Ther*. **12**(5):563-573.
- Yamada S, Ohta K & Yamada T. (2013) Acetylated Histone H3K9 is associated with meiotic recombination hotspots, and plays a role in recombination redundantly with other factors including the H3K4 methylase Set1 in fission yeast. *Nucleic Acids Res*. **41**(6):3504-3517.
- Yamada T, Mizuno K, Hirota K, Kon N, Wahls WP, Hartsuiker E, Murofushi H, Shibata T & Ohta K. (2004) Roles of histone acetylation and chromatin remodeling factor in a meiotic recombination hotspot. *EMBO J*. **23**(8):1792-1803.
- Yang H, Bell TA, Churchill GA & Pardo-Manuel de Villena F. (2007) On the subspecific origin of the laboratory mouse. *Nat Genet*. **39**(9):1100-1107.
- Yang H, Wang H, Shivalila CS, Cheng AW, Shi L & Jaenisch R. (2013) One-step generation of mice carrying reporter

and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*. **154**(6):1370-1379.

Yoder JA, Walsh CP & Bestor TH. (1997) Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.* **13**(8):335-340.