

博士論文

哺乳類の減数分裂期に染色体末端“テロメア”に形成
される新規タンパク質複合体の同定と機能解析

平成 23 年度進学

東京大学 農学生命科学研究科 応用生命工学専攻

氏名 澁谷大輝

指導教官 渡邊嘉典

目次

目次	1
論文内容の要旨	2
第一章 序論	6
第二章 結果と考察	15
第一節 生体内電気穿孔法によるマウス減数分裂組織への外来遺伝子導入	16
第二節 新規テロメアタンパク質のスクリーニング	24
第三節 <i>Terb1</i> KO マウスは減数分裂の異常により不妊の表現型を示す	30
第四節 相互作用タンパク質の探索	38
第五節 TERB1 はコヒーシン局在を介してテロメア DNA を構造的に補強する	46
第六節 SUN1/KASH5/Dynactin のテロメア局在制御	54
第三章 展望	57
第四章 材料と方法	60
謝辞	66
発表論文	67
引用文献	68

論文内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 23 年度博士課程 進学
氏 名 澁谷 大輝
指導教員名 渡邊 嘉典

論文題目

哺乳類の減数分裂期に染色体末端“テロメア”に形成される
新規タンパク質複合体の同定と機能解析

1. 序論

我々哺乳類の体は DNA にコードされた遺伝情報とその緻密な発現制御によって形成され、維持されている。DNA は種々の構造タンパク質と結合し染色体と呼ばれる構造体を形成する。細胞は分裂の際に染色体を正確に複製・分配することで遺伝情報を次世代へと伝えており、その分配異常は様々な遺伝子疾患の原因となることが知られている。特に、配偶子形成に特化した細胞分裂である減数分裂時における染色体分配の異常は、不妊症やダウン症、ターナー症候群など、重度の先天的遺伝子疾患を引き起こすことが知られており、医学的な観点からも、その分子メカニズムの解明は早急な課題である。

近年、分裂酵母を用いたモデル研究から、染色体末端構造であるテロメアが減数分裂時の染色体制御において重要な機能を持つことが明らかにされた (Chikashige et al., 2006)。通常、染色体分配の際には染色体のセントロメア領域が動きの出発点 (動原体) として働くが、減数第一分裂前期にはテロメアが起点となり、染色体は核膜に沿った運動を行う。平岡らは、分裂酵母において減数分裂期特異的に発現するテロメアタンパク質 Bqt1/2 が、核膜タンパク質複合体 SUN/KASH と結合することでこの染色体運動を促進していることを見いだした。SUN/KASH は核膜を貫通し、その核質側でテロメアと、細胞質側で Dynein-Dynactin などの細胞質モータータンパク質と結合する。この橋渡しにより、細胞質モータータンパク質による駆動力が核内の染色体へと伝達される。この運動は最終的に相同染色体の対合・組換えを促進することで減数第一分裂における正常な染色体分配を保証している。

哺乳類を代表するモデル生物であるマウスにおいても、核膜タンパク質 SUN1/KASH5 が正常な減数分裂の進行に必須であることが報告されているが (Ding et al., 2007; Horn et al., 2013; Morimoto et al., 2012)、分裂酵母 Bqt1/2 のようなこれらと相互作用するテロメアタンパク質は知られていない (Hiraoka and Dernburg, 2009; Scherthan et al., 2011)。また細胞内で実際にテロメアを起点とした染色体運動を観察した例も存在せず、その制御メカニズ

ムは現象の存否もふくめて不明であった。酵母等のモデル生物と比較して、マウスにおける遺伝学的研究が遅れている主な要因は、その遺伝子操作の困難さにある。高等動物の減数分裂前期の進行には組織内で隣接して働く支持細胞の働きが必要であり、酵母等の単細胞生物やヒト培養細胞等に用いられる *in vitro* での簡便な遺伝子操作が適用できない。従って、その解析には遺伝子導入マウスや KO マウスなど個体レベルでの遺伝子操作を必要とする。

本研究で筆者らは、電気穿孔法による生体マウス減数分裂組織内への一過的な外来遺伝子導入システム (*in vivo electroporation* 法) を導入し、条件検討の結果、マウス精母細胞へと効率よく外来遺伝子を発現させることに成功した。そして *in vivo electroporation* 法を用いた GFP 融合タンパク質の発現やそれによる減数分裂期染色体運動の live 観察、新規遺伝子の局在スクリーニングを行い、減数分裂期テロメアによる染色体制御分子メカニズムを明らかにした。

2. 減数分裂期前期における染色体運動の live 観察

脳神経科学の分野でマウス脳組織への遺伝子導入技術的として確立・応用されている生体内電気穿孔法 (*in vivo electroporation*) を用い、マウス精巣内への外来遺伝子の一過的な導入を試みた。DNA 濃度やマウスの週齢、パルス電圧などのパラメーターの至適化を行った結果、外来遺伝子をコードした組換え Plasmid DNA を生体マウスの精母細胞内へと効率よく導入することに成功した。この技術をもとに、蛍光タンパク質 GFP と融合させたテロメアタンパク質 TRF1 (GFP-TRF1) を一過的に精母細胞内に発現させ、減数分裂期におけるテロメア動態の live 観察を行った。その結果、酵母等のモデル生物と同様に、第一分裂前期特異的に染色体のテロメア領域が核膜へと連結され、連結されたテロメアを起点として染色体全体がダイナミックに運動する様子が観察された。微小管重合阻害剤である Nocodazole の添加でこの運動が抑圧されたことや、免疫染色法により細胞質モータータンパク質 p150 (Dynactin) のテロメアへの集積が観察されたことから、細胞質微小管および微小管結合モータータンパク質がこの運動に寄与していることが示唆された。

3. 減数分裂期特異的なテロメアタンパク質 TERB1 の同定

次に、DNA マイクロアレイなどの遺伝子発現データベースから減数分裂組織 (精巣・卵巣) で発現が高いことが予測されていた遺伝子群 349 遺伝子に着目し、実際にマウスの各組織から抽出した RNA をテンプレートに用いた RT-PCR 法により、各標的遺伝子 mRNA の組織特異的な発現量を査定した。その結果、うち 4 つの遺伝子が減数分裂前期で特異的に発現していることを見いだした。これら 4 つの遺伝子に GFP を融合させ、*in vivo electroporation* 法によりマウス精母細胞内へと発現させた結果、新規遺伝子 *Ccdc79* がコードするタンパク質が染色体末端に特異的な局在を示すことが明らかになった。CCDC79 はヒトを含む哺乳動物間に広く保存されたタンパク質であり、その後の解析か

ら既知のテロメアタンパク質 TRF1 とヘテロ複合体を形成することでテロメアリピート DNA に配列特異的に結合し、テロメアへと局在することが示された。上記の結果から筆者らは、この新規タンパク質を TERB1 (Telomere repeat binding bouquet formation protein) と命名した。

4. TERB1 はテロメアを起点とした染色体運動を促進する

Gene trap 法により *Terb1* 遺伝子の発現を欠損させたマウス (*Terb1KO*) を作製し、その表現型解析を行った。その結果、*Terb1KO* マウスは雌雄共に一見正常な発育を示したが、減数分裂進行の異常により配偶子形成が起きず、不妊の表現型を示すことが明らかになった。次に、減数分裂の過程で具体的にどのような異常が生じているかについて免疫染色法による検証を行った。まずテロメアの動態を観察すると、野生型では、TERB1 が局在する減数第一分裂前期を通じてテロメアが核膜へと連結されていたのに対して、*Terb1KO* マウスでは多くのテロメアが核膜から離脱している様子が観察された。さらに GFP-TRF1 を発現させ live 観察を行ったところ、野生型で観察されたテロメアを起点とした染色体運動が *Terb1KO* マウスでは著しく抑圧されていることが明らかになった。同様の異常は *Sun1KO* マウスでも観察された。さらに、SUN1/KASH5 タンパク質や細胞質モータータンパク質 p150 の局在を精査したところ、いずれも野生型ではテロメアに局在したのに対し、*Terb1KO* ではそれらの局在が完全に消失していた。以上の結果から、TERB1 が SUN1/KASH5/p150 のテロメア局在を介してテロメアと核膜の結合および続く染色体運動を制御していることが示唆された。

5. TERB1 は cohesin 局在を介してテロメア DNA を構造的に補強する

酵母 two-hybrid 法により TERB1 と相互作用する因子の網羅的スクリーニングを行った結果、減数分裂期において染色体軸構造形成に働くことが知られている cohesin 複合体のサブユニット SA3 が同定された。その後の解析から SA3 は TERB1 の Myb ドメインを含む C 端領域と結合することが明らかになった。さらに免疫染色法により cohesin 複合体のテロメア局在を観察すると、野生型では染色体の軸形成前段階からテロメアへと集積し、軸形成後もその末端においてテロメアと共局在したのに対して、*Terb1KO* マウスでは顕著にその局在が減少しており、cohesin の減少に起因することが報告されているテロメア DNA 間の異常な連結や伸張が頻繁に観察された。これらの表現型は *in vivo* electroporation 法による野生型 TERB1^{Full} の発現により有意に抑圧されることが明らかになった。さらに live 観察の結果、*Terb1KO* で低下した染色体運動が TERB1^{Full} の発現によって有意に回復する様子が観察された。一方で、Myb ドメインを欠いた TERB1^{ΔMyb} を発現させた細胞では cohesin のテロメア局在やテロメア構造異常が抑圧されないばかりか、より重度のテロメア構造異常が引

き起こされた。これは **cohesin** の集積がないまま、染色体運動が回復したためだと考えられる。実際に、**live** 観察の結果、**TERB1^{ΔMyb}** を発現した場合には **TERB1^{Full}** より弱いものの染色体運動の回復が観察された。以上の結果から、**TERB1** を介した **cohesin** のテロメア集積が、染色体駆動力に耐えうる強固なテロメア構造を形成することや、それによりその駆動力を染色体全体へと効率良く伝搬することに働いていることが示唆された。

6. 総括

本研究により高等動物であるマウスにおいても、染色体のテロメア領域が減数第一分裂前期特異的に染色体運動の起点“テロメア動原体”として重要な働きを担っていることが明らかになった。またその分子メカニズムは、**SUN1/KASH5** との協調的な作用など、分裂酵母で示された枠組みと類似した点が見られる一方で、**cohesin** を介したテロメア DNA の補強など、進化の過程で獲得されたと考えられる、より複雑化した制御が働いていることも同時に示唆された。**cohesin** は染色体分配の際に動きの起点として働くセントロメア/動原体においてもその構造維持に働いている事が知られており、共通した制御が“テロメア動原体”で観察されたことは大変興味深い知見である。また、本研究で導入された *in vivo electroporation* 法は哺乳類減数分裂期における分子機能解析において有用なツールになり得るばかりか、遺伝子欠損マウスに対する表現型相補にも応用可能であったことから、将来的にはヒト不妊症患者に対する遺伝子治療への応用が期待される。

発表論文

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

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

The Journal of Cell Biology, vol.198, No.2, pp.165-172 (*同等貢献)

Shibuya H, Ishiguro K, Watanabe Y.

“The TRF1-binding protein TERB1 promotes chromosome movement and telomere rigidity in meiosis.”

Nature Cell Biology, vol.16, No.2, pp.145-156

第一章 序論

1, 序

我々哺乳類の体はゲノムにコードされた複雑な遺伝情報とその緻密な発現制御によって形成され、維持されている。これらのゲノム情報は、A (アデニン)・T (チミン)・G (グアニン)・C (シトシン) という僅か4種類の核酸の順列として暗号化され、DNA分子として細胞核内に折り畳まれている。DNAはさらに種々の構造タンパク質と結合し、染色体と呼ばれる構造体を形成する。生物は細胞分裂の際にこの染色体を正確に複製し分配する事で遺伝情報を次世代へと伝えている。そして染色体にコードされた暗号、すなわち塩基配列は、進化の過程で無秩序に(突然変異)、あるいは方向性を持って(自然選択的に)変動し、高度に複雑化したと考えられている。このようにDNA・染色体は生命の設計図ともいえる重要な情報を媒介しているが、その一方でDNA塩基配列のうち実際に遺伝子をコードする領域はごく僅かであることが知られている。例えば人の場合、およそ90%以上のDNA配列が遺伝子として機能しないランダムな配列、あるいは反復配列からなる。ゲノムプロジェクト以降急速に蓄積されてきた遺伝子機能に関する知見と比して、それら一見無意味な塩基配列(非コード領域)が持つ役割に関しては、未だその多くは明らかにされていない。

我々哺乳類の染色体末端テロメア(“telos”末端、“meros”部位)は、機能性のある非コード領域として古くから知られており、細胞分裂の際に染色体分配の起点となるセントメア同様に染色体の構造維持やゲノムの安定性において重要な役割を持つことが知られている(Palm and de Lange, 2008)。テロメアDNAはTTAGGGを基本単位とする6塩基DNAの反復配列からなる。TTAGGG反復配列には、その配列に特異的な結合能を有するタンパク質複合体Shelterinが結合し、強固なDNAタンパク質複合体(nucleoprotein complex)を形成することでテロメアの構造維持や機能制御に関わっている。例えば、直鎖DNAの末端は、それがDNAの損傷箇所(DNA double strand break)と構造的に類似することから、潜在的にDNA修復経路の標的になり得る。DNA修復経路の活性化は染色体同士の異常な結合(non homologous end-joining)や細胞増殖の停止(DNA damage response)を引き起こすことが知られており、細胞の癌化や細胞死、老化のリスクファクターとなる。Shelterinを構成するTRF2(telomere repeat binding factor 2)タンパク質は、DNA末端にT-loopと呼ばれるキャップ構造を作ることで、これらの応答からテロメアDNAを保護している(Doksani et al., 2013)。また、TRF1(telomere repeat binding factor 1)タンパク質はDNA複製期においてテロメアDNAの複製を促進することで、テロメア長やその構造維持に働くことが知られている(Martinez et al., 2009; Sfeir et al., 2009)。さらに、DNA複製を繰り返すことで生じるテロメアDNAの短縮(末端複製問題)は細胞老化の指標として広く知られており、TRF1/TRF2やその下流で働くTIN2/TPP1/POT1タンパク質がテロメア伸張に働く酵素であるテロメラーズの局在・活性を制御することでテロメア長の安定化に働いていると考えられている(Latrack and Cech, 2010; Nandakumar et al., 2012)。

2, テロメアによる減数分裂期染色体運動の制御

これら細胞の老化や癌化の抑制といった機能の他にも、テロメアは減数分裂時の染色体制御において極めてユニークな機能を持つことが知られている。減数分裂は体細胞分裂から進化したと考えられている特殊な細胞分裂様式のひとつである (Fig.1)。通常、体細胞分裂とは異なり、1回のDNA複製の後に2回の連続した分裂(第一分裂・第二分裂)がおこるため、結果として生じる娘細胞のDNA量・染色体数は半減される。従って酵母などの単細胞真核生物においては2倍体から1倍体の細胞を産生する際に、高等動物においては精巣・卵巣において配偶子を産生する際に行われる。通常、細胞分裂期における染色体の運動は、体細胞分裂・減数分裂いずれにおいても、紡錘体を形成するスピンドル微小管と染色体上のセントロメア領域に形成された動原体タンパク質との結合により制御される。動原体とスピンドル微小管の結合は染色体全体に張力を伝え、染色体の分裂中期での細胞中央領域への整列や、続く後期における均等分配を制御する。ところがこの分裂中期における染色体運動とは別に、減数分裂の前段階(第一分裂前期)においては、染色体が核膜に沿ってランダムに(あるいは方向性を持って)運動を行うことが知られており、この時、染色体はセントロメアではなくテロメアを起点とした運動をおこなう (Fig.2a) (Hiraoka and Dernburg, 2009)。

第一分裂前期特異的なテロメア主導の染色体運動は、古くから報告があり、興味深い生命現象の1つとして多くの議論がなされてきた。その生物学的機能としては減数第一分裂期前期特異的な染色体制御である相同染色体の対合・組換え反応を促進していると考えられている。我々真核生物は父方・母方から由来する2本1組の染色体(相同染色体)を持っている。各染色体には生命活動に必須な遺伝情報がコードされているため、減数分裂の際に再びそれらを別々の配偶子へと振り分ける(減数させる)際には、まず、第一分裂において相同染色体同士が対になり、別々の細胞へと均等に分配される必要がある (Fig.1)。例えばヒトの場合23対46本の染色体があり、それぞれの染色体は自身を除いた残り45本の染色体の中から正しいペアを認識し、物理的に近接し、対合する必要がある。この相同染色体同士が物理的に近接する過程にテロメア主導の染色体運動が働いていると考えられている。

3, Bqt1/2 タンパク質の発見

減数分裂期におけるテロメア主導の染色体運動は、現象レベルでの報告は古くからあったものの、その分子メカニズムは近年まで謎であった。2006年に平岡らは分裂酵母を用いた研究により、減数分裂期特異的なテロメアタンパク質Bqt1/Bqt2がこの染色体運動に働いていることを明らかにした (Fig.2b) (Chikashige et al., 2006)。平岡らはまず、分裂酵母において、減数分裂期特異的に発現量が上昇する遺伝子群に着目し、それらの遺伝子の一つ一つ欠損させ

Figure 1

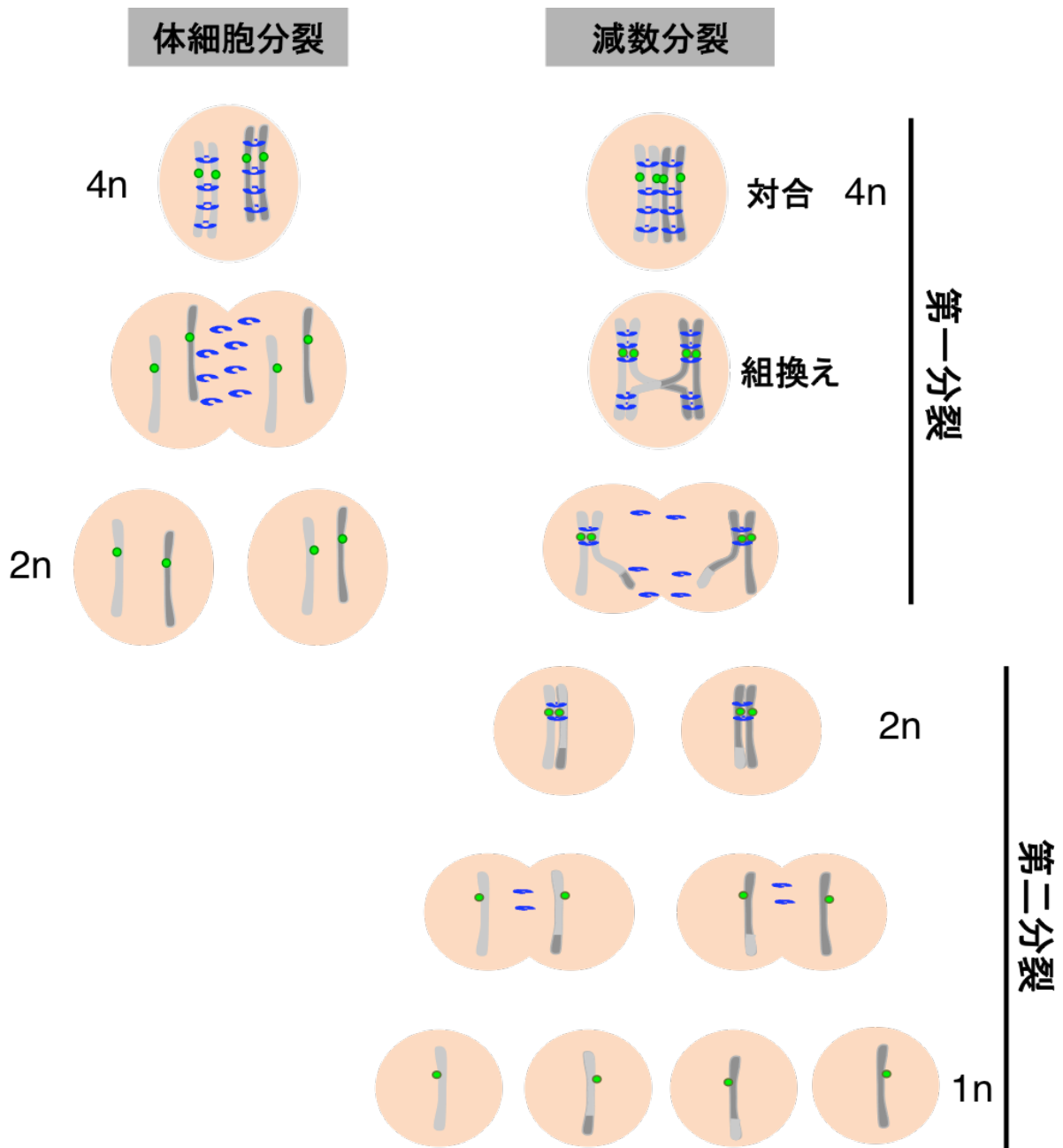


Fig1.体細胞分裂時および減数分裂時における染色体分配様式

体細胞分裂では複製された姉妹染色分体が2つの娘細胞に分配される。一方、減数分裂では、まず相同染色体が2つの娘細胞に分配され(第一分裂)、続いて姉妹染色分体がそれぞれ4つの配偶子に分配される(第二分裂)。このように、2回の連続した分裂が起こる事で、減数分裂の結果産生される配偶子が有するDNA量・染色体数は体細胞(2n)の半分(n)に減数される。また、減数分裂においてこの多段階的な染色体分配を正確に行うためには、第一分裂の前段階にあたる前期において、相同染色体同士が対合し、組換え反応により物理的な結合を獲得する必要がある。これにより、第一分裂中期における相同染色体の整列・分配が保証される。

た酵母株を作製した。次に、それらの遺伝子破壊株を減数分裂に誘導し、顕微鏡観察により染色体運動を観察した。その結果、Bqt1 およびその相互作用因子として同定された Bqt2 破壊株では、テロメアを起点とした核膜に沿った染色体運動が著しく阻害されること、そして最終的に相同染色体の対合・組換え頻度の低下による孢子形成の異常が起こることを発見した。その後の解析により、Bqt1/2 がテロメアタンパク質 Rap1 との結合を介してテロメアに局在すること、さらに核膜上で核膜タンパク質複合体である SUN/KASH（分裂酵母においては Sad1/Kms1）と複合体を形成すること、そしてその結合が細胞質のモータータンパク質 Dynein や Kinesin による駆動力を、核膜を隔てた染色体へと伝達していることなどが明らかになった (Fig.2b)(Chikashige et al., 2006; Yoshida et al.)。その後、出芽酵母でも同様に、Ndj1 という減数分裂期特異的なタンパク質が核膜上でテロメアと SUN/KASH (Mps3/Csm4) との連結を担うことで、テロメアを起点とした核膜上での染色体運動を促進していることが明らかになった(Conrad et al., 2008)。また、線虫を用いた研究からも、染色体末端付近に形成される Pairing center と呼ばれる減数分裂期特異的な構造体が、テロメアに代わり、核膜タンパク質 SUN/KASH (SUN1/ZYG12) への橋渡しに機能していることが明らかになった(Phillips and Dernburg, 2006; Sato et al., 2009)。我々哺乳類を代表するモデル生物であるマウスにおいても、やはり減数分裂期に入るとテロメアが核膜へと連結される現象が古くから観察からされており、その特徴的な SUN domain や KASH domain の配列から、減数分裂期にテロメアと連結される核膜タンパク質 SUN1/KASH5 が同定されている(Ding et al., 2007; Horn et al., 2013; Morimoto et al., 2012)。

4、マウス核膜タンパク質複合体 SUN1/KASH5 の発見

真核生物の核膜は内膜と外膜からなる二重膜構造をとる。SUN domain タンパク質は核膜の内膜に埋め込まれ、その一端 (N 端) を核質側に、SUN domain を含むもう一端 (C 端) を内膜と外膜に挟まれた領域 (膜間腔、Lumen) に突出させている。KASH domain タンパク質は核膜の外膜に埋め込まれており、KASH domain を含む一端 (C 端) を Lumen 側に突出させ、そこで内膜から伸びた SUN domain と結合し、もう一端 (N 端) を細胞質側に突出させ、そこで細胞質のモータータンパク質等と相互作用する (Fig.2b)。この SUN/ KASH を介した細胞質と核質の橋渡しは、細胞質のモーター駆動力を核内の構造体に伝達しており、遺伝子の転写から細胞形態の維持など、細胞機能における多くの重要な役割を担うことが知られている。減数分裂期染色体運動の制御もその一つである(Hiraoka and Dernburg, 2009)。

マウスでは 5 つの SUN domain タンパク質、5 つの KASH ドメインタンパク質がこれまでに見つかっており、それぞれ組織特異的な発現・機能を有している。Min Hung らのグループは、これらマウス SUN ドメインパラログのうち、減数分裂組織を含む多くの組織で普遍的に発現が見られる SUN1 のノック

アウト (KO) マウスの表現型解析を行い、マウスにおいても SUN1 が減数分裂期特異的なテロメアと核膜の結合に必須であること、そしてそれが相同染色体の対合や組換えを促進していることを見いだした(Ding et al., 2007)。また、筆者と森本らは、マウスにおいて SUN1 と複合体を形成する減数分裂組織特異的な KASH domain タンパク質 KASH5 を同定し(Morimoto et al., 2012)、続く Roux らによる KO マウスの解析と合わせて、マウス減数分裂期における SUN1/KASH5 複合体の役割を明らかにした(Horn et al., 2013) (Fig.2b)。

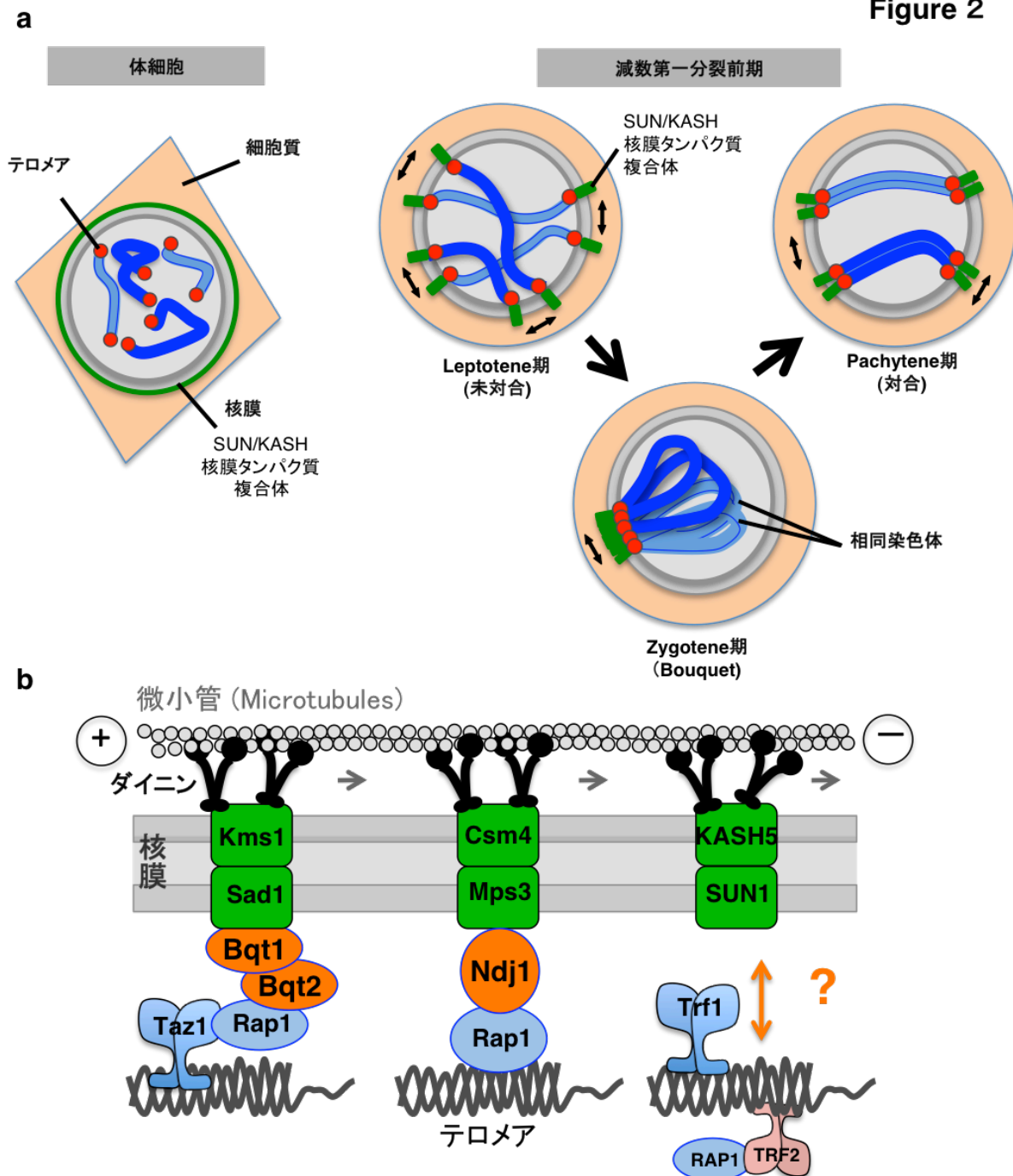


Fig2.テロメアによる核膜に沿った染色体運動が相同染色体の対合を促進する

(a)体細胞分裂期において、脊椎動物の染色体末端(テロメア)は細胞核内に分散して局在している。この時、核と細胞質を橋渡しする核膜タンパク質複合体SUN/KASHは核膜表層に沿った一様の局在を示す。一方で、減数第一分裂前期ではテロメアが核膜へと連結され、その連結部位にSUN/KASH複合体が集積し、染色体は核膜に沿った二次元運動を行う。対合が始まるZygotene期には、核膜上の限られた領域にテロメアが集積するBouquetという現象が観察される。その後、相同染色体は対合を完了する(Pachytene期)。(b)分裂酵母や出芽酵母を用いたモデル研究から、減数分裂期特異的なタンパク質(Bqt1/Bqt2, Ndj1)がテロメアタンパク質Rap1との結合を介し、減数分裂期テロメアへと特異的に局在することが示されている。これらのタンパク質はSUN/KASH核膜タンパク質と複合体を形成することで、細胞質モータータンパク質による駆動力を核内の染色体へと伝達する。哺乳類を代表するモデル生物であるマウスでも、核膜側の制御因子SUN1/KASH5タンパク質が同定されているが、テロメアを制御するメカニズムは明らかにされていない。

5, 高等動物における減数分裂期テロメア制御

減数分裂期の核膜側を制御する遺伝子群 SUN/KASH が酵母からヒトまで進化的に広く保存されていたのに対して、テロメア側の制御には、分裂酵母 (Bqt1/Bqt2) と出芽酵母 (Ndj1) の間ですら全く異なる独自の遺伝子が機能しており、その進化的保存性は極めて低い。従って、高等動物であるマウスの減数分裂期においては、核膜タンパク質 SUN1/KASH5 の関与以外には全く知見がなく、細胞内で実際にテロメアを起点とした染色体運動を観察した例もないため、その制御メカニズムは現象の存否もふくめて不明であった。Scherthan らは、酵母において Bqt1/2 や Ndj1 のテロメア局在に必要であった Shelterin タンパク質の 1 つである Rap1 に着目し、そのマウスホモログ *Rap1* 遺伝子のノックアウト (KO) マウスを作製することでそのメカニズムの解明を試みた (Schertan et al., 2011)。しかし予想に反して *Rap1*KO マウスでは雌雄共に減数分裂の進行が正常であることが明らかになった。

酵母等のモデル生物と比較してマウスにおける減数分裂の研究が遅れている主な要因は、その遺伝子操作の困難さにあると言える。高等動物における減数分裂前期の進行には組織内で隣接して働く支持細胞の働きを必要とするため、減数分裂前期細胞 (前期精母細胞・前期卵母細胞) の生体外 (*in vitro*) 培養技術は未だ確立されていない。従って酵母等の単細胞生物やヒト培養細胞等に用いられる遺伝子ノックアウトやノックダウン、外来遺伝子の導入による一過的な形質転換などの簡便な遺伝子操作が適用できず、その解析には遺伝子導入マウスや KO マウスの作製など、多くの時間と費用、そして労力を要する個体レベルでの遺伝子操作を必要とする。

6, 本研究の内容

本研究で筆者らは、電気穿孔法による生体マウス減数分裂組織内への一過的な外来遺伝子導入システム (*in vivo* electroporation 法) を導入し、条件検討の結果、マウス精母細胞へと効率よく外来遺伝子を発現させることに成功した。この技術をもとに、GFP 融合タンパク質を発現した精母細胞の live 観察を行い、高等動物であるマウスの減数分裂期においても、染色体がテロメアを起点としてダイナミックに運動していることを明らかにした。

さらに、DNA マイクロアレイなどの遺伝子発現データベースから減数分裂組織 (精巣・卵巣) で発現が高いことが予測されていた機能未知の遺伝子群に着目し、*in vivo* electroporation 法を用いた網羅的な局在スクリーニングを行なった。その結果、機能未知の新規遺伝子 *Ccdc79* が減数分裂期特異的なテロメアタンパク質をコードしていることを見いだした。CCDC79 はヒトを含む哺乳動物間に広く保存されたタンパク質であり、その後の解析から、CCDC79 が既知のテロメアタンパク質 TRF1 とヘテロ複合体を形成することでテロメアリピート DNA に配列特異的に結合し、テロメアへと局在することが示された。上記の結果から、筆者らはこの新規タンパク質を TERB1 (Telomere repeat

binding bouquet formation protein) と命名した。

Terb1 は減数分裂進行に必須な遺伝子であり、*Terb1* 遺伝子を欠損させたマウス(*Terb1*KO マウス) は、雌雄共に不妊の表現型を示した。また、*Terb1*KO マウスを用いた分子機能解析から、TERB1 が酵母等のモデル生物で示されたように SUN1/KASH5 や細胞質モータータンパク質 P150 のテロメア局在を促進することで核膜に沿ったテロメア主導の染色体運動を引き起こしていることが明らかになった。そして、その染色体運動が、続く相同染色体の対合・組換え反応を正常に遂行する上で必須な制御であることが示された。

さらに、興味深い事に、TERB1 は染色体の軸構造を形成するコヒーシナンパク質複合体のテロメア局在を促進しており、それにより運動の起点となるテロメア DNA 領域を構造的に補強していることが示された。コヒーシンは染色体分配の際に動きの起点として働く動原体/セントロメアにおいても、その構造維持に働くことが知られており、共通した制御が減数分裂期の“テロメア動原体”で観察されたことは大変興味深い発見である。

以上、本研究では TERB1 の分子機能解析を通じて、高等動物の減数分裂期におけるテロメアによる染色体制御分子メカニズムの大枠を解明する事ができた。減数分裂における染色体制御の異常は不妊症やダウン症、ターナー症候群といった多くの先天的遺伝子疾患の原因になると考えられており、本研究により得られた知見は、基礎生物学的な観点からみて大変意義深いものであるばかりか、将来的にはヒト疾患原因遺伝子の究明やそれによる遺伝子治療など、医学・臨床への応用にも繋がるものだと考えられる。

第二章 結果と考察

第一節 生体内電気穿孔法によるマウス減数分裂組織への外来遺伝子導入

哺乳類の減数分裂進行には、組織内で精母・卵母細胞に隣接する支持細胞の働きが必要である事が知られている。従って、精母・卵母細胞の *in vitro* での培養技術は未だ確立されておらず、簡便な遺伝子操作による形質転換（外来遺伝子導入）が困難である。そこで、本章では脳神経科学などの分野で技術的に確立され、用いられている生体内電気穿孔法 (*in vivo electroporation* 法)を用いて、マウス精巣内への外来遺伝子の一過的導入を試みた。電気穿孔法 (*electroporation*) は、細胞に電気パルスをかけることで細胞膜を一時的に不安定化し、外来遺伝子を細胞内に取り込ませる形質転換法である。培養細胞だけでなく組織内での遺伝子導入にも応用でき、実際にこの技術を用いてマウスの精巣内へと GFP タンパク質を一過的に発現させた先行研究も少なからず存在する (Ogawa et al., 1997)。しかし、その効率は非常に低く分子機能解析などの実用化にまで至った例はこれまでに報告されていない。

1-1 *In vivo electroporation* 法の手順

哺乳類細胞で強い遺伝子発現を誘導することが知られている CMV あるいは CAG プロモーターの下流に、GFP タンパク質および目的遺伝子の cDNA をサブクローニングした plasmid DNA (pCAG-GFP-X, pCMV-GFP-X) を調整した (なお、融合タンパク質は GFP 以外にも、HA や MYC タンパク質が強い発現を示した)。DNA は、大腸菌ペレットからアルカリ法により精製し、終濃度が $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ になるように HBS バッファーに懸濁した。1 精巣 1 回あたり $9 \mu\text{l}$ の DNA 溶液をインジェクションに用い、また、DNA 溶液には色素 10× Fast Green (Sigma) を $1 \mu\text{l}$ 添加した。DNA 溶液の精巣内への導入にはガラスキャピラリー (1×90mm, NARISHIGE) を用いた。ガラスキャピラリーはプーラー (PC-10, NARISHIGE) によって熱変成させ、その先端が約 0.05-0.1mm 径になるよう調整した。

17-20 日齢の ICR 雄マウスを用意し、インジェクションの約 10 分前に適量の 0.5% ペントバルビタールナトリウム水溶液を腹腔注射し、麻酔させた (Fig.3a)。これにより約 1-5 時間麻酔が効いた状態を維持できる。次に、マウス腹部を正中線に沿って切開し、精巣を露出させた。マウスピペットを用いて DNA 溶液をガラスキャピラリー内に充填し、輸精管の付け根周辺に位置する精巣網 (*rete testis*) と呼ばれる領域にインジェクションした。精巣網には精細管が寄せ集まっており、この領域にインジェクションすることで精細管内部へと効率良く DNA 溶液が浸透する。インジェクション後、DNA 溶液が精細管内部まで良く浸透するよう、約 1 時間放置した。その後、ピンセット型の電極を装備した *electroporator* (CUY21, BEX) によって *electroporation* を行った (Fig.3a)。Electroporation の際には生理食塩水を精巣に滴下し、通電を改善さ

せた。35V50 ミリ秒のパルスを計4回かけた後、電極板を逆転させて逆方向へと同様の電気パルスをかけた。その後、精巣を腹部に戻し、真皮および表皮を縫合した。

1-2 DNA 濃度の検討

DNA 濃度が発現効率に与える影響を査定するために、様々な DNA 濃度で electroporation を行い、その発現効率を調べた。Electroporation から 24 時間後に精巣から精母細胞を回収し、Dry-down 法による固定後、GFP 抗体を用いた免疫染色法によって GFP 融合タンパク質の発現頻度を測定した。SYCE3 (Synaptonemal complex)、MIS12 (Kinetochore)、KASH5 (Telomere)、SCP3 (Axial element)、RAD21L (Axial element) の 5 種類のタンパク質を試したが、いずれも DNA 濃度依存的に発現効率が改善される傾向が見られた (Fig.3b)。例えば SYCE3 の場合、 $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度で electroporation を行うと平均して 34% の精母細胞で GFP の染色体軸への局在が観察されたが、DNA 濃度を希釈するとその効率は顕著に減少し、 $0.32 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ の DNA 溶液を用いた場合では 9% の細胞でしか発現が確認できなかった。なお、 $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 以上の濃度では、DNA 溶液の粘性が上昇し、マウスピペットによる扱いが困難になるため electroporation には適さないと判断した。

さらに、この見かけの発現効率は発現させる遺伝子にも大きく依存した (Fig.3b)。例えば染色体軸 Axial element の構成タンパク質である SCP3 や RAD21L の場合、 $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度においてもそれぞれ 6.5%・7.2% の精母細胞でしかその発現が確認できなかった。この見かけの発現効率の違いは、タンパク質の発現実量のみならず、発現したタンパク質の細胞内での安定性や turnover 効率の相違にも大きく依存すると考えられる。実際に、GFP 抗体を用いた Western blot により精巣抽出液内での GFP 融合タンパク質の発現量を査定した結果、GFP-RAD21L は免疫染色による観測と同様に発現が非常に低く Western blot による検出が困難であったのに対して、GFP-SCP3 は免疫染色による観測とは異なり強い発現が観察された (Fig.3c)。Gfp-Scp3 遺伝子を electroporation した細胞集団の中には、染色体軸への局在は見られないが、核全体に GFP の強いシグナルが観察される細胞 (GFP は過剰発現されているが内在性のものと置き換わっていない細胞) (Fig.3d) が含まれていたことから、少なくとも GFP-SCP3 の場合はタンパク質の turnover 効率が低い事が、その見かけの発現効率を左右する一因になっていると考えられる。

1-3 マウス週齢の検討

次に、マウスの週齢が発現効率に与える影響を査定するために、生後 17、30、60 日齢 (dpp) の ICR 雄マウスに対して Gfp-Syce3 遺伝子の electroporation を行ない、その発現効率の相違を免疫染色法により測定した (Fig.3e)。17 日目は first wave (第一波) と呼ばれる、減数分裂が半同調的に進行している時期に

あたる。30日目は First wave の精母細胞が減数分裂を終え、精子形成段階に入る時期にあたる。そして、60日目は精子形成が完了し、雄マウスが性成熟する時期にあたる。また、週齢が上がると精巣が大きくなることから、その体積に比例させてインジェクションに用いる DNA 量を増やし、また大きさに比例させてパルス電圧を強くした (Fig.3e)。

Electroporation から 24 時間後に精巣から精母細胞を回収し、GFP 抗体を用いた免疫染色法によって GFP-SYCE3 の発現頻度を測定した結果、17dpp では 31% の精母細胞で発現が見られたのに対し、30dpp では 22%、60dpp では 3.5% にまで減少した。このことから幼齢のマウスを用いるほど高い発現効率を得られることが結論された。その理由としては、成熟マウスでは、精細管の内部に半数体細胞が充填されており、精細管の表層に位置する精母細胞まで DNA 溶液が浸透しづらくなることや、あるいは、精巣の体積が大きくなることで電気パルスの通電効率が下がることなどが考えられるが、定かではない。なお、17日齢よりも若いマウスの場合、精巣が小さく扱いが困難であるばかりか、電気刺激によって組織が壊死してしまうケースが多かったため electroporation には適さないと判断した。

1-4 インジェクションから electroporation までの待機時間の検討

インジェクションした DNA が精細管に拡散し、充填されるにはある程度の時間を要すると考えられる。そこで、インジェクションから electroporation までの待機時間を変化させ、その待機時間が発現効率に与える影響を査定した。生後 17 日 (dpp) の ICR 雄マウス精巣に対して *Gfp-Syce3* 遺伝子のインジェクションを行ない、その直後 (0min)、30 分後 (30min)、60 分後 (60min) に electroporation を行い、腹部を縫合した。electroporation から 24 時間後に精母細胞を回収し、GFP 抗体を用いた免疫染色法によって GFP-SYCE3 の発現頻度を測定した。

その結果、インジェクション直後 (0min) と 60 分後 (60min) に electroporation した場合は、後者の方が 2 倍以上の高い発現効率を得られることが明らかになった (Fig.3f)。実際に、60 分間待機することで DNA 溶液に混合した色素 (FastGreen; Sigma) が精巣内に広く拡散している様子が観察できた。また、60 分以上の待機時間は、マウスが麻酔から覚めてしまう危険性が高まるため、実験には適さないと判断した。

以上の結果から、DNA 濃度、マウスの週齢、インジェクションから electroporation までの待機時間という、3 つのパラメーターを至適化する事が、マウス精巣への *in vivo* electroporation 法において高い発現効率を得るために重要な要素になることが示された。

Figure 3

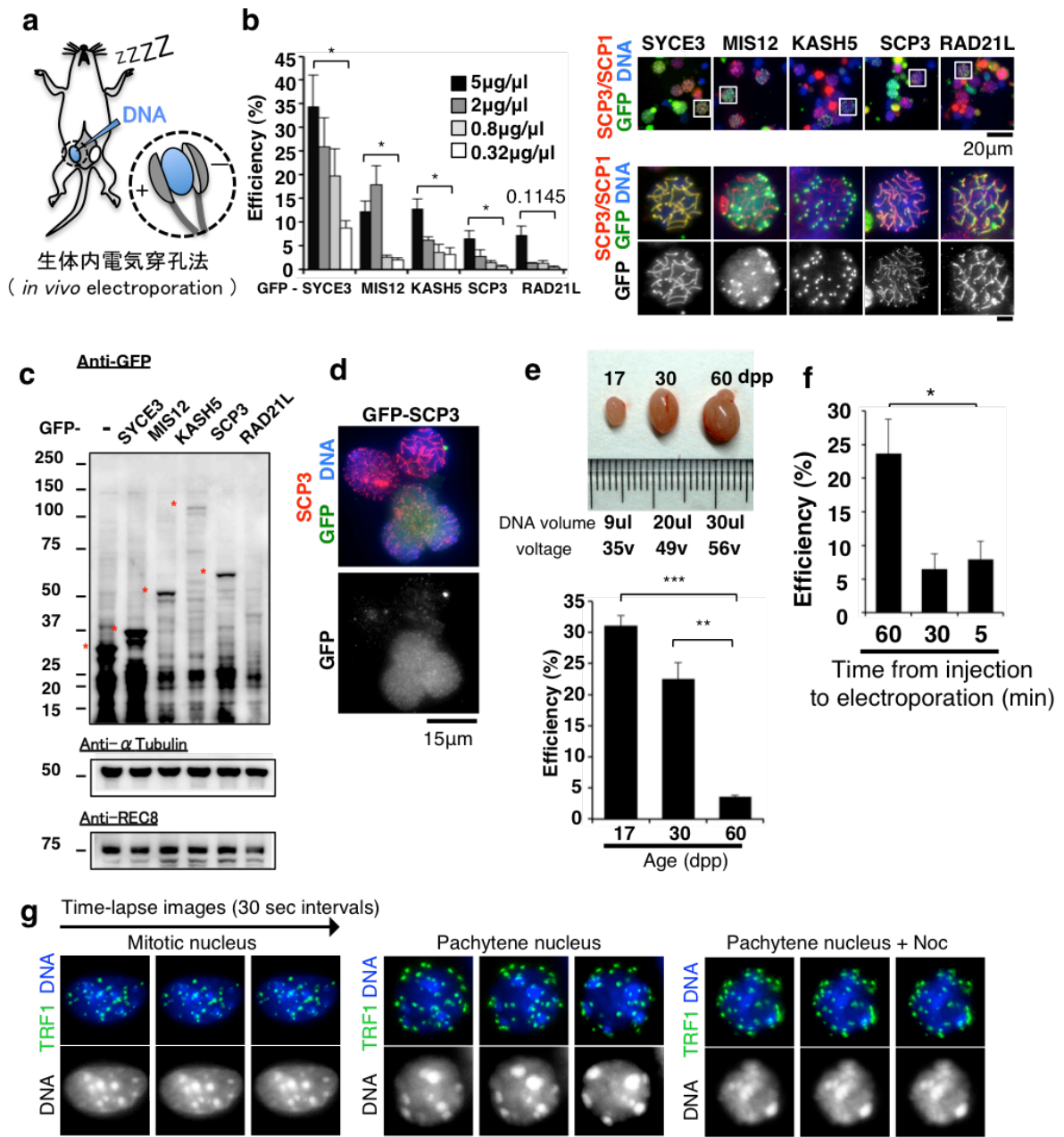


Fig3. 生体内電気穿孔法によるマウス減数分裂組織への外来遺伝子導入

(a) マウス精巣組織内への生体内電気穿孔法。(b) 生体内電気穿孔法により、生後16-20dppの野生型ICRマウス精巣内へとcDNAを導入し、24時間後に、GFP抗体を用いた免疫染色法によりGFP融合タンパク質の発現効率を定量した。SYCE3の母数集団にはSCP1のシグナルが観察されたZygotene期からDiplotene期の精母細胞を、その他の融合タンパク質の場合にはSCP3のシグナルが観察された前期精母細胞を選んだ。(c) 外来遺伝子発現後の精巣抽出液を用いたWestern blot。(d) GFP-SCP3を発現した精母細胞。核質に分散した強いGFPシグナルが観察される。(e) 生後17, 30, 60日目のICR雄マウスの精巣 (左)。数値は電気穿孔法に用いたDNA溶積、パルス電圧を表す。グラフは各条件下におけるGFP-SYCE3の発現効率を定量したもの (右)。(f) DNAのinjectionからelectroporationまでの時間を変化させ、GFP-SYCE3の発現効率を定量した。(g) GFP-TRF1のelectroporationから24時間後の精巣から細胞を回収し、蛍光顕微鏡を用いたLive観察によって染色体運動を可視化した。DNAは培地に添加したHoechst33342により可視化した。各フレーム間の時差は約30秒。グラフY軸は3-4回の独立した実験の平均値を表す。統計的有意性はT検定により査定した (* < 0.05, ** < 0.005, *** < 0.005)。Error bar; S.E.M. スケールバー; 5 μm (あるいは図示の通り)。

1-5 減数分裂期染色体運動の live 観察

分裂酵母や出芽酵母、線虫などのモデル生物における先行研究から、減数第一分裂前期には染色体末端テロメア（線虫の場合は pairing center）が核膜タンパク質 SUN/KASH と連動することで、染色体が核膜に沿った運動を行うことが知られている(Hiraoka and Dernburg, 2009)。マウスにおいても、固定細胞の観察から減数第一分裂前期に核膜とテロメアが連結されること、また SUN1/KASH5 がその連結に必要であることが報告されているが、実際に生きた細胞内でテロメア運動を観察した報告はない(Ding et al., 2007; Horn et al., 2013; Morimoto et al., 2012; Scherthan et al., 2000)。

そこで、*in vivo electroporation* 法を用いて蛍光タンパク質 GFP とテロメアタンパク質 TRF1 の融合タンパク質 GFP-TRF1 をマウス精巣内に一過的に発現させ、減数分裂期テロメア運動の live 観察を試みた。Electroporation から 24 時間後に精巣を取り出し、細胞をばらし、PBS および液体培地で洗浄後、Cell-Tak (BD Bioscience) により細胞接着処理を行った dish に細胞をまいた。そして、約 30 分静地した後、蛍光顕微鏡を用いて live 観察を行った。その結果、精母細胞（Pachytene 期）において GFP-TRF1 のシグナルが非常にダイナミックな運動を行っている様子が観察された (Fig.3g)。さらに、培地に添加した Hoechst33342 によって DNA（特にセントロメア近傍ヘテロクマチン領域が強く染まる）を可視化すると、やはり GFP-TRF1 同様に、染色体全体が激しい運動を行っている様子が観察された。このような染色体運動はテロメアが核質に分散している体細胞分裂期の細胞では観察されなかった。また、培地に微小管重合阻害剤である nocodazole を添加した場合にはこのような運動は観察されなかった。以上の結果から、マウスにおいても、減数分裂期の細胞では細胞核膜に連結されたテロメアを起点として染色体がダイナミックに運動を行うこと、そしてそれが細胞質微小管および微小管結合モータータンパク質（第六節参照）の働きによるものであることが明らかになった。

1-6 欠損遺伝子 (KO) の相補実験

最後に *in vivo electroporation* 法による欠損遺伝子の相補実験を行った。具体的には減数分裂異常の表現型を示すことが知られている *Sun 1* 遺伝子欠損マウス (*Sun1KO*)(Ding et al., 2007) の精巣内に、*in vivo electroporation* 法により *Gfp-Sun1*、あるいは *Sun1-Myc* 遺伝子を発現させ、その表現型が抑圧されるかどうかを検証した。Electroporation から 72 時間後に精巣を取り出し、免疫染色法により減数分裂進行を観察した結果、*Sun1* の欠損による減数分裂期の表現型が SUN1-MYC が発現した精母細胞において有意に抑圧されていることが明らかになった (Fig.4a-c)。

まず、テロメア (TRF1) の動態を観察すると、SUN1-MYC が発現していない細胞では多くのテロメアが核の内部に分散していたのに対して（平均 15 個のテロメアが内部に局在）、SUN1-MYC が発現した細胞では殆ど全てのテロメ

アが核表層へと連結されており(平均すると約 1 個のテロメアが内部に局在)、SUN1 の欠如によるテロメアと核膜の連結異常が相補されたことが示された (Fig.4a)。また SUN1-MYC 自体の局在を観察すると、TRF1 と核表層において共局在することが明らかになった。

次に、TRF1 のシグナル数を定量することで相同染色体の対合状態をモニターした。通常、未対合だと 80 個、XY 染色体の片腕以外が完全に対合すると 41 個の TRF1 シグナルが理論上観察される。*Sun1KO* マウスでは対合異常により 72 個 (中央値) の TRF1 シグナルが観察されたのに対して、SUN1-MYC が発現している細胞では 57 個 (中央値) にまで減少していた (Fig.4b)。このことから、SUN1-MYC の発現により *Sun1KO* マウスにおける対合異常が相補されたことが示された。実際に相同染色体の対合領域にのみ特異的に局在することが知られている Synaptonemal complex の構成因子である SCP1 タンパク質の局在を免疫染色によって観察すると、SUN1-MYC が発現していない細胞ではその染色体上への局在は部分的にしか観察されなかったものの、発現している細胞では染色体全長に渡って SCP1 が局在している様子が観察された (Fig.4c)。

これらの表現型相補は GFP-SUN1 を発現させた細胞では観察されなかったことから、electroporation 操作によって引き起こされたものではなく、SUN1-MYC の発現によって *Sun1* 遺伝子の機能相補が起きた結果であると考えられる。また、SUN1-MYC とは対照的に、GFP-SUN1 は細胞内で機能できないことも同時に示唆された (Fig.4a-c)。

さらに、*Sun1KO* マウスだけではなく、染色体軸の構造形成過程に必須な減数分裂期特異的なタンパク質 RAD21L 欠損マウス (*Rad21KO*) (Herran et al., 2011) に対しても *Gfp-Rad21l* の electroporation による同様の相補実験を行い、やはりその軸構造形成の異常や相同染色体対合異常が有意に抑圧できることが示された (Fig. 4d-e)。

Figure 4

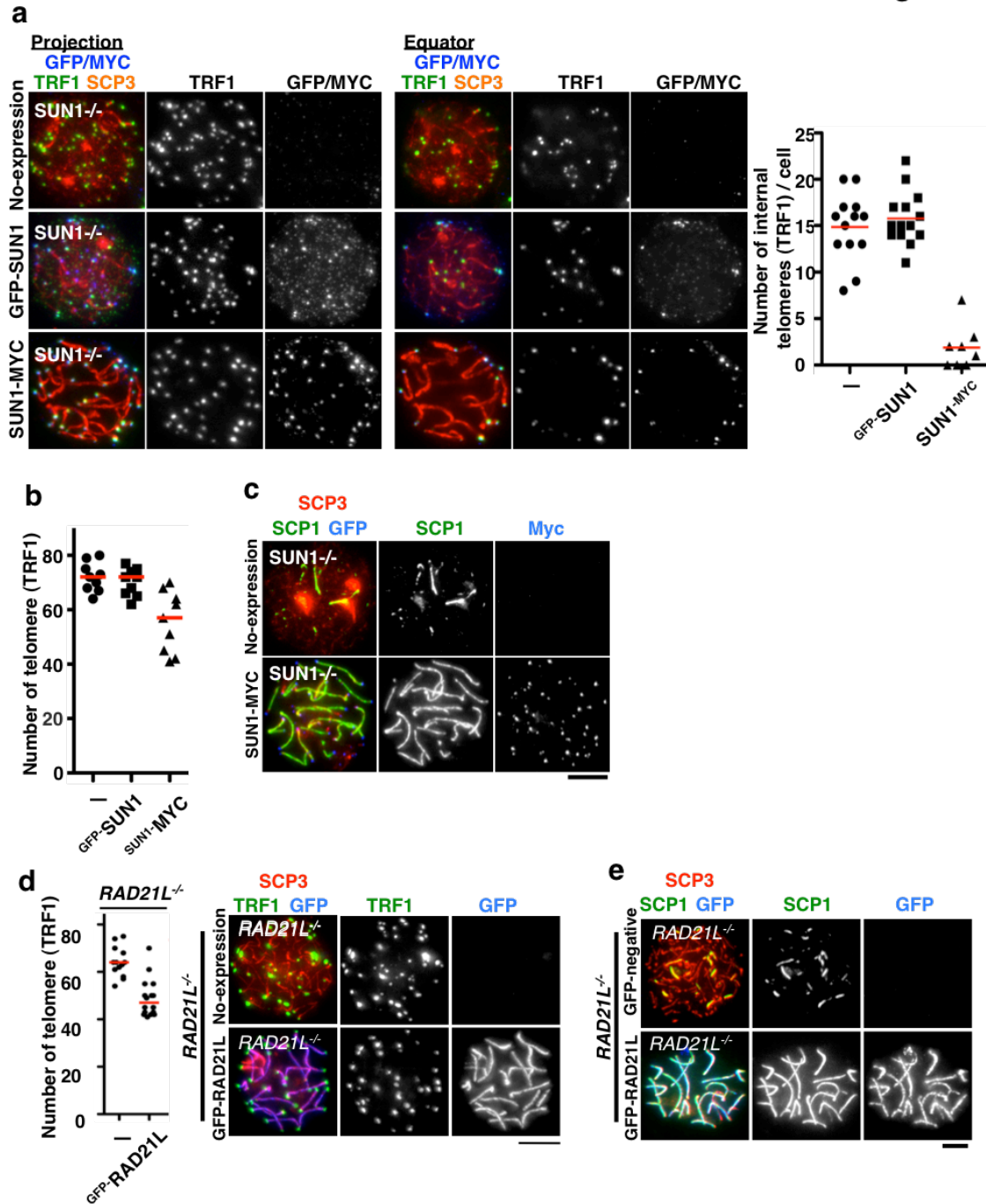


Fig4. In vivo electroporation法による欠損遺伝子 (KO) 相補実験

(a) *Sun1*KOマウス精巢内にGFP-SUN1またはSUN1-MYCを*in vivo* electroporation法によって発現させ、72時間後に細胞を回収し免疫染色法によってテロメアの挙動を観察した。グラフは細胞毎に定量した核表層から離脱したTRF1シグナル数を示す。(b)(a)と同様に*Sun1*KOマウスへの相補実験を行い、細胞毎のTRF1シグナルの数を定量した。(c)(a)と同様に*Sun1*KOマウスへの相補実験を行い、SCP1抗体を用いた免疫染色によって相同染色体の対合を観察した。(d)(a)と同様の操作によって*Rad21*KOマウスへの相補実験を行い、細胞毎のTRF1シグナルの数を定量した。(e) (a)と同様の操作によって*Rad21*KOマウスへの相補実験を行い、SCP1抗体を用いた免疫染色によって相同染色体の対合を観察した。グラフ中のバーは中央値を示す。スケールバー;5μm

1-7 総括

本章ではマウス精巣への *in vivo electroporation* 法による外来遺伝子導入を試みた。さらに、その技術を基に、減数分裂組織におけるテロメア運動の *live* 観察を行ない、これまで報告されているモデル生物と同様に、マウスにおいても微小管依存的なテロメア主導の染色体運動が減数分裂前期細胞特異的に観察されることが明らかになった。さらに、*Sun1* や *Rad21l* などの遺伝子欠損マウスでみられる減数分裂期染色体制御の異常を、*in vivo electroporation* 法による一過的な遺伝子導入により相補する実験にも成功した。今後の課題としては、相補実験に用いた *Sun1KO* および *Rad21KO* マウスにおいて、減数分裂の進行だけではなく、最終的な個体レベルの表現型である、精子形成不全および不妊の表現型を抑圧できるかどうかを見極めたい。正常な精子形成まで相補された場合には、体外受精や顕微授精などの手法を用いることで不妊個体由来の子孫を産生することが可能になると考えられる。従って、ヒト不妊症患者に対してもその原因遺伝子を特定することで配偶子形成を相補することが可能になると予想され、遺伝子治療への応用が期待される。

第二節 新規テロメアタンパク質のスクリーニング

酵母等のモデル生物で報告があるように、哺乳類の減数分裂期においても染色体のテロメア領域が減数第一分裂前期特異的に染色体運動の起点“テロメア動原体”として機能することが示唆された(第一節)。しかし、その分子メカニズムに関しては、保存された核膜タンパク質複合体 SUN/KASH の関与以外には知見がない。本節では、哺乳類の減数分裂期にテロメア動態を制御する遺伝子を同定するため、減数分裂期特異的な遺伝子群の網羅的局在解析を試みた。

2-1 マイクロアレイおよび *in vivo* electroporation 法による新規遺伝子の局在スクリーニング

マイクロアレイを用いた先行研究によりマウスの精巣および卵巣において相対的に高い発現を示す遺伝子群が特定されている(Gallardo et al., 2007)。これら 349 遺伝子の中から、データベース検索を行い、これまでにその機能の報告がないもの 27 遺伝子を絞った。次に、マウスの各組織から抽出した RNA をテンプレートに用いた RT-PCR 法により、各標的遺伝子 mRNA の組織特異的な発現量を定量的に査定した(Fig.5a)。その結果、うち4つの遺伝子(*Gm364*、*Tex16*、*1700011F14Rik*、*Ccdc79*)が減数分裂前期の細胞を含む精巣および胎児期の卵巣で特異的に発現していることを見いだした。これら4遺伝子の全長 cDNA をクローニングし、*GFP* と融合させ、*in vivo* electroporation 法によりマウス精巣内へと一過的に発現させた。その後、これらの遺伝子がコードするタンパク質の精母細胞内における局在を、*GFP* 抗体を用いた免疫染色法により査定した。その結果、*1700011F14 Rik* および *Ccdc79* の2遺伝子がコードするタンパク質が、それぞれ染色体上において特異的な局在パターンを示すことが明らかになった。

1700011F14Rik 遺伝子がコードする機能未知タンパク質は、精母細胞(Pachytene 期)において染色体軸(SCP3)に沿った点状の局在を示した(Fig.5b)。SCP3 が強く染色される XY 染色体に限定してこのような局在を示す細胞も観察された。これらの局在パターンは相同組換え反応を制御するタンパク質群(RAD51、DMC1、RPA、MSH4/5 など)のそれと酷似しており、おそらく *1700011F14RIK* はこれらのタンパク質と同様に相同組換え反応の制御に関与した機能を有していると予想された。

次に *Ccdc79* 遺伝子の解析を行った。まずマウスの各組織から抽出した RNA をテンプレートに用いた RT-PCR 法により *Ccdc79* 遺伝子の発現が減数分裂組織で高い特異性を示すことを再確認した(Fig.5c)。さらに *GFP* 融合タンパク質を精巣内に発現させ免疫染色法による局在解析を行った結果、*GFP-CCDC79* が精母細胞特異的に染色体軸末端へと局在することが明らかになった(Fig.5d)。このシグナルは既知のテロメアタンパク質である *TRF1* と共局在したことからテロメアであると結論された(Fig.5e)。後述する機能解析から、我々はこの新

規タンパク質を TERB1 (telomere repeat binding bouquet formation protein) と命名した。

Figure 5

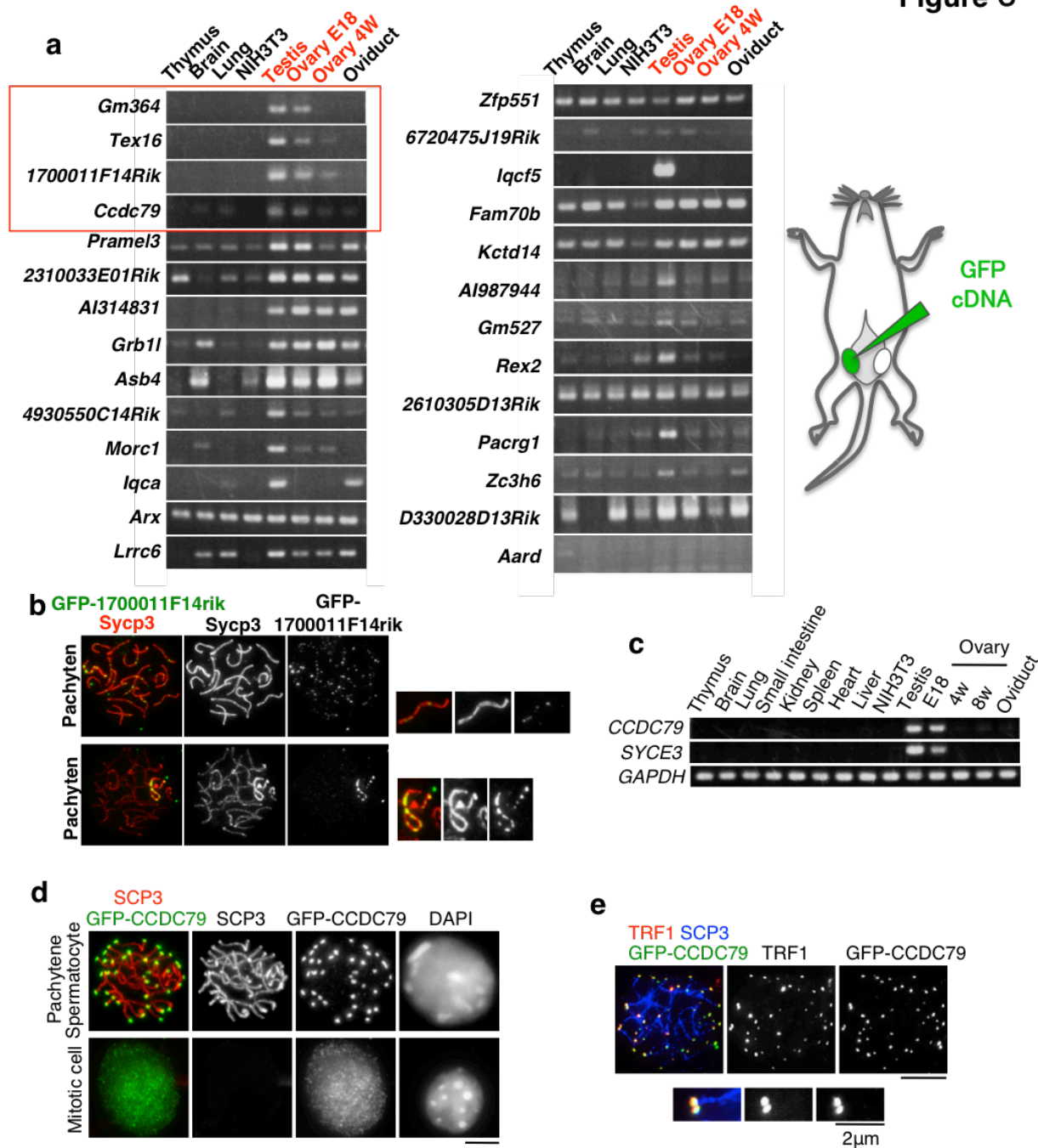


Fig5. In vivo electroporation法による新規テロメアタンパク質のスクリーニング

(a) マウス各体組織から回収したトータルRNAをテンプレートに用いたRT-PCR法により、標的遺伝子の組織特異的な発現量を半定量的に示した。赤四角は減数第一分裂期細胞を含む組織(精巣、胎児期卵巣)で特異的な発現を示した遺伝子群。(b) 野生型精母細胞に一過的に発現させたGFP-1700011F14Rikの局在を、GFP抗体を用いた免疫染色法によって観察した。(c) (a)で同定された新規遺伝子Ccdc79の組織特異的な発現パターンを示す。Syce3は減数分裂特異的な遺伝子のコントロールとして、GAPDHはローディングコントロールとして用いた。(d) 野生型精母細胞に一過的に発現させたGFP-CCDC79の局在を、GFP抗体を用いた免疫染色法によって観察した。(e) GFP-CCDC79とテロメアタンパク質TRF1との共染色。スケールバー; 5µm (あるいは図示の通り)。

2-2 TERB1 は脊椎動物間に保存された減数分裂期テロメアタンパク質である

免疫染色法により内在性 TERB1 の局在を査定するため、リコンビナント TERB1 タンパク質 (523-767a.a.) を抗原に用いて、抗ラビット抗体を作製した。作製した抗体を用いて免疫染色を行った結果、TERB1 は精母細胞および卵母細胞いずれにおいても減数第一分裂の前期特異的にテロメアへと局在することが明らかになった (Fig.6a-b)。また TERB1 タンパク質のアミノ酸配列を解析すると、その N 末に 2 箇所のアルマジロリピート、中央領域に 1 箇所のコイルドコイル、C 末に 1 箇所の Myb ドメインを有することが分かった (Fig6c)。興味深いことに既知のテロメア DNA 結合タンパク質である TRF1/TRF2 も、やはり C 末に 1 箇所の Myb ドメインを有しており、その Myb ドメインを介してテロメア DNA に直接結合することが知られている (Jain and Cooper, 2010; Palm and de Lange, 2008)。TERB1 の Myb ドメイン配列を他の Myb ドメインタンパク質のそれと比較すると、テロメア結合能をもつ TRF1/TRF2 のそれと最も相同性が高く、TERB1 が進化的に TRF タンパク質から派生した可能性が示唆された (Fig6c)。一方で、TRF1/TRF2 の Myb ドメインを構成するアミノ酸残基のうち、構造解析からテロメア DNA と直接接触すると考えられている残基に関しては、TERB1 の Myb ドメイン内にはあまり保存されていないことも同時に明らかになった (Nishikawa et al., 2001)。従って TERB1 の Myb ドメインが、それ自体でテロメア DNA に結合する性質があるか否かに関しては、未だ結論がついていない (第四節参照)。

次に、*Terb1* 遺伝子の進化的保存性を調べるために、NCBI データベースを用い、他の生物群のゲノム中から TERB1 のアミノ酸配列と類似したタンパク質をコードする遺伝子を探索した。その結果、*Terb1* 遺伝子が魚類 (*D.rerio*) からヒト (*H.sapiens*) を含む脊椎動物間に高度に保存されたことが明らかになった (Fig.7)。

2-3 総括

In vivo electroporation 法を用いた網羅的局在解析から、新規遺伝子 *Ccdc79/Terb1* が脊椎動物間に広く保存された減数分裂期特異的なテロメアタンパク質をコードしていることが明らかにされた。

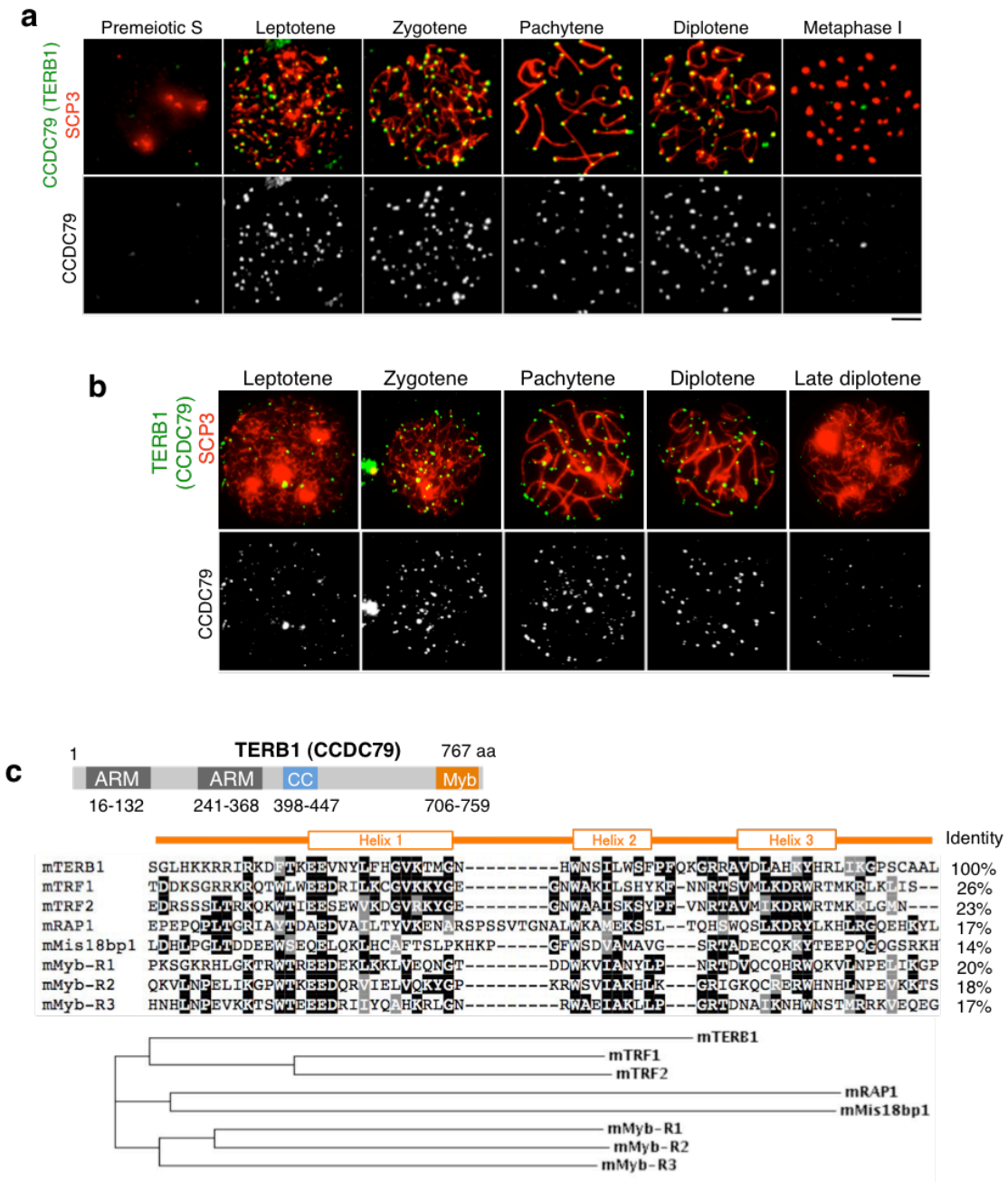


Fig6. Ccdc79/Terb1は減数分裂前期特異的なテロメアタンパク質をコードする
 (a)CCDC79/TERB1抗体を用いた免疫染色法によって検出した精母細胞におけるCCDC79/TERB1の時期特異的な局在パターン。(b)前期卵母細胞におけるCCDC79/TERB1の時期特異的な局在パターン。Leptotene期の卵母細胞は14日胎児から、Zygotene期およびPachytene期は15日胎児から、Diplotene期は18日胎児からそれぞれサンプリングした。(c)TERB1のドメイン構成。Armadiillo Repeat; ARM、Coiled Coil; CC、Myb; Myb like domain。またマウスの様々なMybドメインタンパク質のMybドメイン配列をTERB1のそれと比較した。黒で示したアミノ酸は同一のアミノ酸を、灰色で示したアミノ酸は類似した性質を持つものを示す。またClustalWプログラムによって相同性を示す樹形図を作製した。スケールバー;5μm

Figure 7

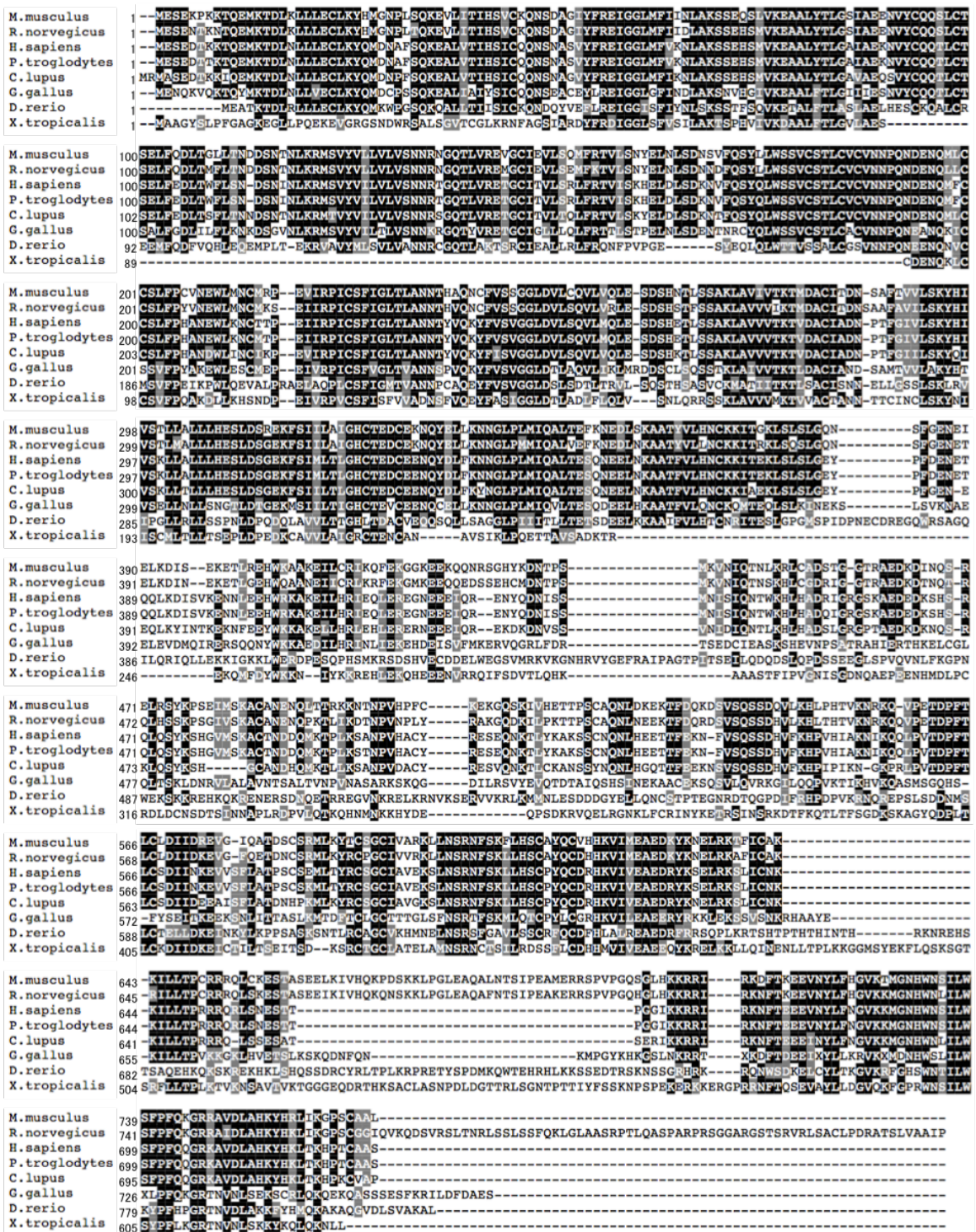


Fig7. TERB1は脊椎動物間に広く保存されている

Blastデータベース検索から検出されたTERB1/CCDC79のホモログタンパク質配列、および筆者らがクローニングしたマウスTERB1配列の比較。ClustalWプログラムを用いて相同性に基づいた整列を行った。黒で示したアミノ酸は同一のアミノ酸を、灰色で示したアミノ酸は類似した性質を持つものを示す。

第三節 *Terb1KO* マウスは減数分裂の異常により不妊の表現型を示す

本節では *Terb1* 遺伝子欠損マウス (*Terb1KO*) を作製し、その表現型を解析することで TERB1 タンパク質の分子機能解明を試みた。

3-1 *Terb1KO* マウスは雌雄共に不妊の表現型を示す

Terb1 遺伝子の 12 番目と 13 番目のエクソンに挟まれたイントロン領域に gene trap カセットが挿入された遺伝子座を持つ ES 細胞株 (KOMP) (Fig.8a) を基に、*Terb1* gene trap キメラマウスを作製した。キメラマウスと野生型マウスの戻し交配からヘテロマウスが得られ、さらにヘテロ同士の交配からメンデル則に従った確率でホモマウスが得られた (Fig.8b)。これらのマウス精巣抽出液に対して TERB1 抗体を用いた Western blot を行った結果、野生型で観察された TERB1 タンパク質の発現が、ヘテロ (+/-) では半減し、ホモ (-/-) では消失していることが明らかになった (Fig.8c)。また、精母細胞の免疫染色からも、野生型 (+/+) で観察された TERB1 のテロメア局在が、ホモ (-/-) では完全に消失していることが示された (Fig.8d)。以上の結果からホモ gene trap マウスでは TERB1 の発現が消失していることが示された。従って以降このマウスを *Terb1KO* マウスと表記する。

Terb1KO マウスは一見正常な発育を見せたが、雌雄共に不妊の表現型を示した。雄マウスの精巣を摘出すると、野生型の同腹と比較しその大きさに顕著な退縮が観察された (Fig.8e)。組織切片を用いた HE 染色および TUNEL アッセイから、*Terb1KO* マウスでは半数体細胞が産生されていないことや (Fig.8f)、精細管表層付近に位置する精母細胞において TUNEL 陽性細胞が多く観察されること (自己細胞死が多発していること) が明らかになった (Fig.8g)。雌マウスにおいても同様に、*Terb1KO* では卵巣が顕著に退縮し、濾胞や成熟卵の発育が観察されないことが明らかになった (Fig.8h-i)。以上の結果から、TERB1 は減数分裂の進行に必須であり、*Terb1KO* マウスは雌雄共に配偶子形成の不全から不妊の表現型を示すことが示された。

Figure 8

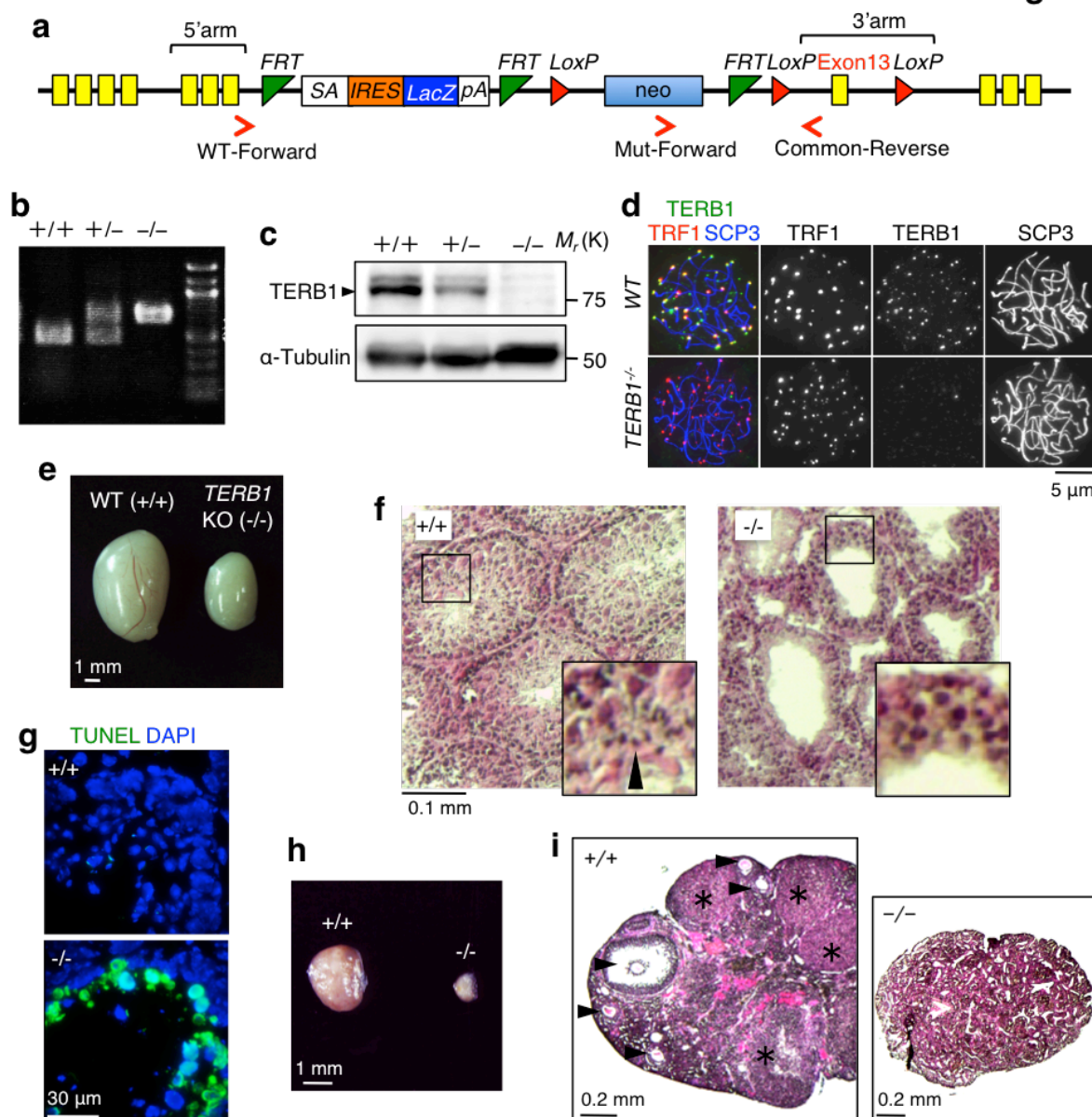


Fig8. *Terb1*KOマウスは雌雄共に不妊の表現型を示す。

(a) *Terb1* gene trap alleleの模式図。黄色四角はエクソンを示す。(b)マウスの遺伝型をPCRにて検出した。プライマーの場所は(a)に示した通り。(c)図示した遺伝型マウスから抽出した精巣抽出液に対して、TERB1抗体によるWestern Blotを行った。(d)図示した遺伝型マウス由来の精母細胞をに対し、TERB1抗体による免疫染色を行った。(e)図示した遺伝型マウス(生後4週齢)由来の精巣の外観。(f)(e)で示した精巣から組織切片を作製しヘマトキシリンおよびエオジンによって染色した。(g) TUNELアッセイにより精巣組織切片から自己細胞死を検出した。(h)図示した遺伝型マウス(生後4週齢)由来の卵巣の外観。(i)(h)で示した卵巣から組織切片を作製しヘマトキシリンおよびエオジンによって染色した。矢頭およびアスタリスクはそれぞれ、発達した濾胞および黄体を示す。スケールバー;5 μ m(あるいは図示の通り)。

3-2 TERB1 は相同染色体の対合に必要である

次に、*Terb1KO* において減数分裂進行のいずれの過程に異常が生じているかを明らかにするために、細胞レベルでの表現型解析を行った。まず、染色体軸 Axial element を構成するタンパク質 SCP3 と相同染色体の対合領域にのみ局在することが知られている Synaptonemal complex を構成するタンパク質 SCP1 の共免疫染色により、精母細胞における相同染色体の対合状態を観察した (Meuwissen et al., 1992)。その結果、ヘテロ由来の精母細胞は生後 18 日目において、すでに 7 割以上の精母細胞で相同染色体の対合が完了していた

(Pachytene 期; SCP3 と SCP1 が常染色体上において完全に共局在する) のに対して、*Terb1KO* 由来の精母細胞は全く対合が起きていないか (Leptotene 期; SCP1 が染色体上に局在しない)、あるいは非常に限定された領域においてのみ部分的な対合が観察されるに止まった (Zygotene 期; SCP3 と SCP1 が常染色体上において部分的に共局在する) (Fig.9a)。このような対合異常は胎児期の卵母細胞においても同様に観察された (Fig.9b)。以上の結果から TERB1 が相同染色体の対合過程に必須であることが結論された。

相同染色体の対合は続く相同染色体の組換え反応に必要であることが知られている (Fig.1)。そこで組換え反応の初期に観察される DNA 二重差切断 (DSB) 箇所に結合する事が報告されている DMC1 タンパク質の局在を免疫染色法により観察することで、*Terb1KO* マウスにおける相同組換え反応の進行を査定した。その結果、野生型の精母細胞では減数分裂の進行に伴い DMC1 の局在が増え (Leptotene から Zygotene 期)、対合の完了とともに DSB が修復され減少したのに対し (Pachytene 期)、*Terb1KO* では DMC1 局在の異常な蓄積が観察された (Fig.9c)。さらに DNA 損傷のマーカーである H2AX ヒストンのリン酸化シグナル (γ H2AX) を観察したところ、*Terb1KO* ではやはりその異常な蓄積が観察された (Fig.9d)。以上の結果から、*Terb1KO* マウスでは相同組換えの開始反応である DNA 二重差切断は正常に起こるが、その後の修復過程が起こらずに組換え反応が異常停止していることが示された。組換え反応の最終産物であるキアズマ構造の形成に機能する MLH1 タンパク質の免疫染色においても、野生型で観察されたシグナルが *Terb1KO* マウスでは観察されなかったことから (Fig.9e)、*Terb1KO* では相同組換え反応、特に DSB の修復過程の異常により、キアズマ形成が起きていないことが結論された。

相同染色体の対合や組換え反応には、それに先立つ相同染色体の相互認識・接近過程 (pairing) が必要であると考えられている。相同染色体が正しいペアを相互認識する分子メカニズムは未だ明らかにされていないが、その接近過程にはテロメアを主導とした染色体運動が必要であると考えられている (Fig.2a)(Hiraoka and Dernburg, 2009)。対合や組換えの異常が観察されたことから、*Terb1KO* ではその接近過程に異常が生じている可能性が考えられた。そこで免疫 FISH (Fluorescence in situ hybridization) 法によってマウス 8 番染色体を蛍光標識し、相同染色体の近接状態を観察した。その結果、野生型

では対合に先立って相同染色体同士が近接することで、8番染色体が1つの融合したシグナルとして観察されたのに対して（Leptotene期で70%が pairing していた）、*Terb1KO* では部分的な対合が始まる Zygotene 期においてすら、殆どの細胞で2つの分断されたシグナルが観察されることが明らかになった（Zygotene 期においても30%しか pairing していない）（Fig.9f）。これらの観測から *Terb1KO* では対合に先立つ相同染色体の近接過程に異常が生じている事が結論された。またテロメアタンパク質 TRF1 のシグナル数の定量からも同様の結論が得られた（Fig.9g）。

Figure 9

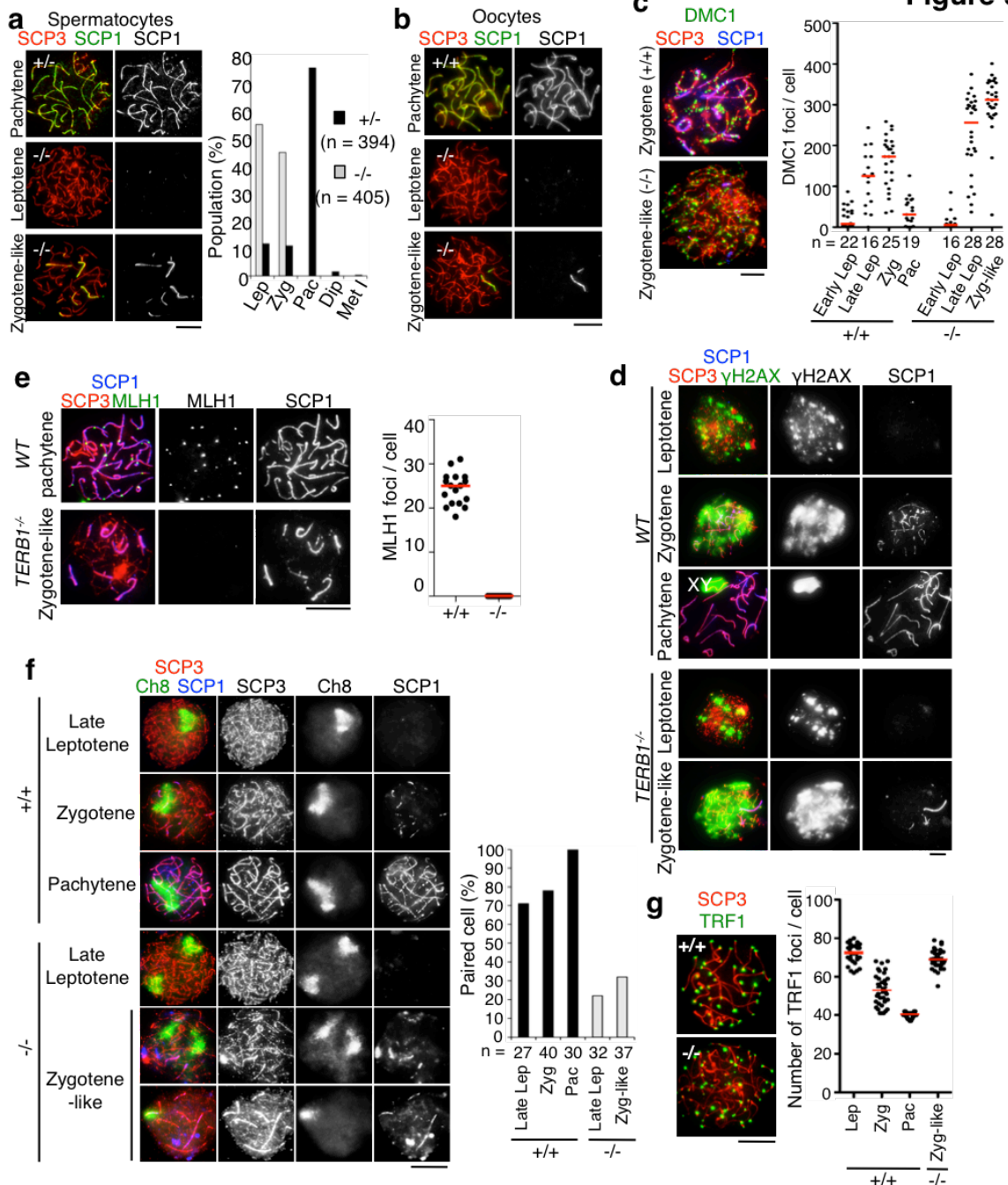


Fig9. TERB1は相同染色体のpairing/対合/組換えに必要である

(a)野生型 (+/+) および *Terb1*KO (-/-) 由来の精母細胞を、SCP3およびSCP1の免疫染色によってサブステージに分類した。Lep;Leptotene, Zyg; Zygotene, Pac; Pachytene, Dip; Diplotene, Met I; Metaphase I. (b)図示した遺伝型マウス由来の胎児期19日目の卵巣から卵母細胞を回収し、SCP3およびSCP1の免疫染色によってサブステージに分類した。(c)図示した遺伝型マウス由来の精母細胞をDMC1、SCP3、SCP1抗体で染色した。(d)図示した遺伝型マウス由来の精母細胞を γ H2AX、SCP3、SCP1抗体で染色した。(e)図示した遺伝型マウス由来の精母細胞をMLH1、SCP3、SCP1抗体で染色した。野生型の定量には後期Pachytene期の細胞を、KOにはZygotene-like期のもを選んだ。(f)図示した遺伝型マウス由来の精母細胞をマウス8番染色体のFISHポローブで標識した後、SCP3およびSCP1抗体による免疫染色を行った。(g)図示した遺伝型マウス由来の精母細胞をTRF1、SCP3、SCP1抗体で染色した。グラフは細胞当たりのTRF1シグナルの数を定量したもの。グラフ中のバーは中央値を示す。スケールバー;5 μ m

3-3 TERB1 はテロメア主導の染色体運動に必要である

Terb1KO では相同染色体の近接/対合/組換え過程に異常が生じていることから、それらに必要であると考えられているテロメア主導の染色体運動 (Fig.2、Fig.3f) が正常に起きていないことが予測された。そこでまず、核膜 LAMIN B とテロメア TRF1 の共免疫染色により、テロメアと核膜の結合状態を観察した。その結果、野生型では減数分裂前期の精母細胞において、ほぼ全てのテロメアが核膜上に連結されていたのに対して、*Terb1KO* では多くのテロメアが核膜から離脱している様子が観察された (Fig.10a)。すでに報告があるように *Sun1KO* マウスでも同様の異常が観察された (Ding et al., 2007)。また、*Terb1KO* や *Sun1KO* マウスと同様に、対合異常によって Zygotene-like 期で減数分裂が異常停止することが知られている *Scp3KO* や *Spo11KO* マウスでは、テロメアと核膜の結合自体は正常に起きていた。従って、*Terb1KO* や *Sun1KO* で観察されたテロメアと核膜の結合異常は、対合の異常や細胞周期の停止によって間接的に引き起こされたものではないと結論された (Fig.10a)。なお、同様の表現型は雌の卵母細胞においても観察された (Fig.10b)。以上の結果から、TERB1 が減数分裂期前期におけるテロメアと核膜の結合を促進していることが示された。

次に、*in vivo electroporation* 法により、生きた精母細胞内に GFP-TRF1 および GFP-SCP3 を共発現させ、テロメアおよび染色体軸を可視化することで、減数分裂期染色体運動の live 観察を行った。その結果、以前の観察 (Fig.3g) と同様に野生型では非常にダイナミックな染色体運動が観察されることが明らかになった (Fig.10c)。また、三次元で得られた live イメージを精細に解析し、同一のテロメア (矢頭で示した) およびヘテロクロマチン領域 (*で示した) を時間毎に追跡した結果、染色体はその相対的な位置をおおよそ維持しながら、全体として一方向的に回転運動を行っていることが明らかになった (Fig.10c)。さらに、個々のテロメア間の相対的な距離も同時に変動しており (Fig.10c; グラフ)、また特徴的なクネクネとうねるような染色体軸の運動 (chromosome wiggling) (Fig.10d) が観察されたことから、個々のテロメアは回転と同時にランダムな運動を行っていることが示された。また、これらの運動は培地内に微小管重合阻害剤 nocodazole を添加することで停止したことから、細胞質微小管の働きによるものだと結論された (Fig.10e)。

次に、*Terb1KO* 由来の精母細胞を用いて同様の解析を行った結果、野生型で観察されたダイナミックな染色体運動が著しく抑圧されている様子が観察された (Fig.10e)。また同様の表現型は *Sun1KO* 精母細胞においても観察された。以上の結果から、TERB1 および SUN1 は減数分裂期特異的なテロメアと核膜の結合に必要であり、それにより核膜に沿ったテロメア主導の染色体運動を促進していることが示された。

Figure 10

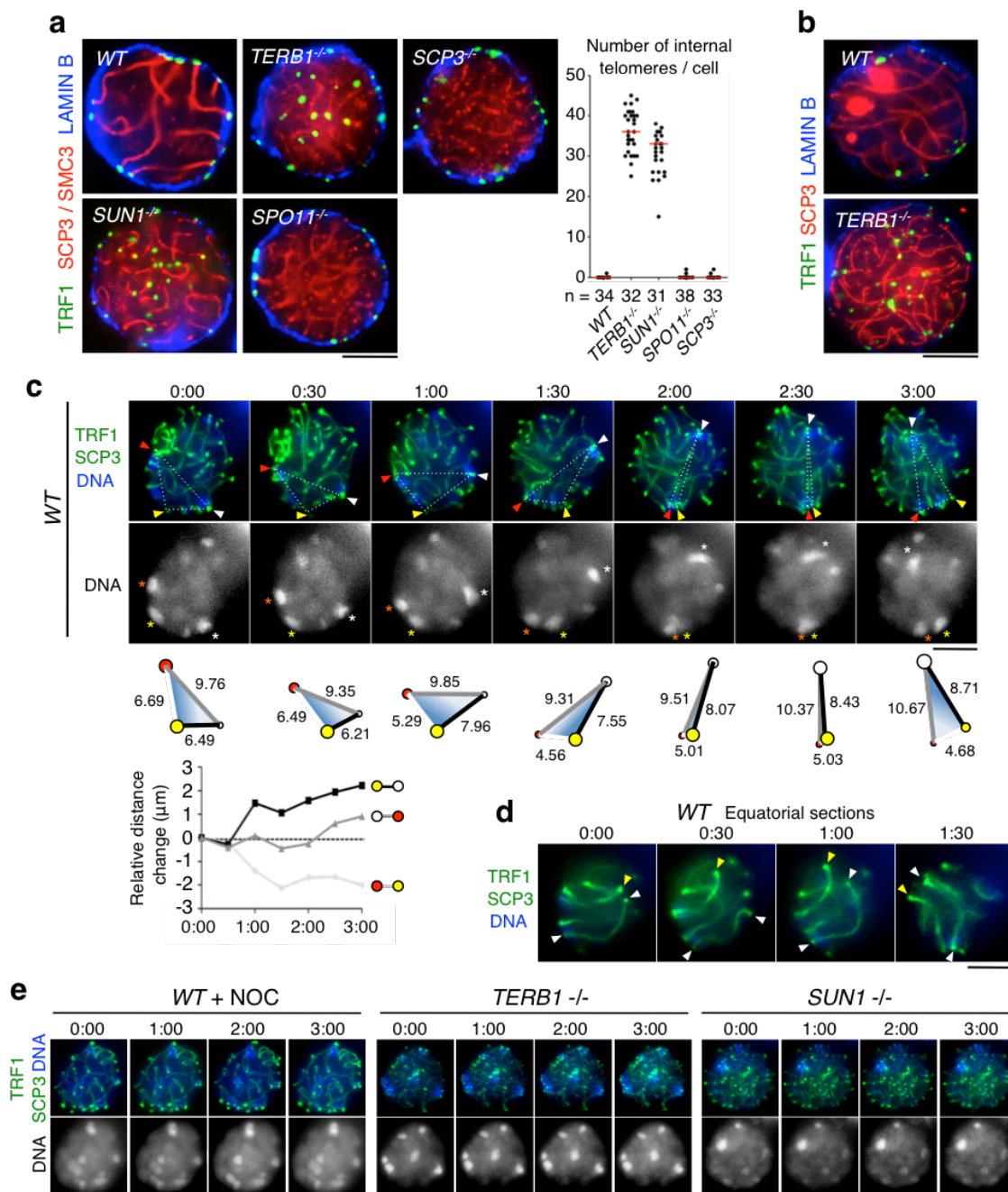


Fig10. TERB1はテロメアを起点とした染色体運動に必要である

(a) 図示した遺伝型マウス由来の精母細胞をSCP3、TRF1、LAMIN B抗体で染色した。グラフはLAMIN Bと共局在しないTRF1の数 (internal telomere) を定量したもの。(b) 図示した遺伝型マウス (胎児期19日) 由来の卵母細胞をSCP3、TRF1、LAMIN B抗体で染色した。(c) 野生型精母細胞内にGFP-TRF1およびGFP-SCP3を同時に発現させ、Hochst33342を含む液体培地上でlive観察を行った。写真は部分的にZセクションを重ね合わせた図を30秒間隔で示したもの。また、3Dイメージを詳細に観察し、同一のテロメア (各色の矢頭) およびヘテロクロマチン (各色のアスタリスク) を追跡した。またアニメーションは各テロメア間の3D距離を定量したもの。グラフはその相対変化を時間を追って示した。(d) (c)と同一の細胞で観察された染色体のランダムな運動。白で示した矢頭は同一の染色体の両テロメアを、黄で示した矢頭は異なる染色体のテロメアを示した。(e) (c)と同様のlive観察をnocodazoleを添加した培地 (WT+NOC) あるいは、図示した遺伝型マウス由来の精母細胞を用いて行った。グラフ中のバーは中央値を示す。スケールバー; 5μm

3-4 総括

*Terb1*KO マウスを用いた組織病理学的な表現型解析から、TERB1 が配偶子形成に必須であることや、細胞レベルでの分子機能解析から、TERB1 がテロメアと核膜の結合を担うことでテロメア主導の核膜に沿った染色体運動を促進していることが明らかになった。また、その核膜に沿った染色体運動は減数分裂の進行に必須な過程である相同染色体の近接/対合/組換え反応に必須であることも同時に示された。

第四節 相互作用タンパク質の探索

本節までの解析から TERB1 が減数分裂期特異的なテロメアタンパク質であり、核膜に沿った染色体運度を制御することで相同染色体の近接/対合/組換え反応を促進していることが示された。本節ではその分子メカニズムを明らかにするため、TERB1 と相互作用する因子の探索を試みた。

4-1 TERB1 は TRF1、SUN1、SA3 と直接結合する

TERB1 の分子機能を明らかにするため、酵母 two-hybrid 法により TERB1 と相互作用するタンパク質の網羅的スクリーニングを行った。まず、TERB1 の全長をベイトに、マウスの精巣 cDNA library をプレイに用いた酵母 two-hybrid スクリーニングを行った結果、テロメアタンパク質である TRF1 および染色体軸タンパク質であるコヒーシ複合体の構成因子 SA3 が同定された (Fig.11a)。その後の解析から TRF1 および SA3 が TERB1 の C 断片 (372-767a.a.) と直接結合することが示された (Fig.11b)。さらに、TERB1 と相互作用する可能性が高い候補因子として、テロメアタンパク質 TRF2・RAP1 や核膜タンパク質 SUN1・SUN2 との結合を酵母 two-hybrid 法により検証した結果、TERB1 の N 端 (1-371a.a.) が SUN1 の N 端 (1-210a.a.) と直接結合することが明らかになった (Fig.11b)。

これらの相互作用が実際に *in vivo* においても起きているかどうかを検証するために、マウス精巣抽出液から TERB1 抗体を用いた免疫沈降実験を行った。その結果、TRF1、SUN1/KASH5 複合体、SA3 コヒーシが、いずれも TERB1 と有意に共免疫沈降されることが明らかになった (Fig.11c)。以上の結果から、TERB1 がテロメアタンパク質 TRF1 やコヒーシ SA3、そして SUN1/KASH5 複合体の SUN1N 末端と相互作用していることが結論された。

なお、SUN1 のパラログである SUN2 に関しては酵母 two-hybrid 法および免疫沈降法いずれにおいても TERB1 との結合は観察されなかった (Fig.11b,d)。さらに、マウス精巣に対して SUN2 抗体を用いた免疫染色を行った結果、体細胞においては、SUN2 の核膜に沿った一様な局在が観察されたが、SCP3 シグナルが観察される減数分裂前期の細胞や特徴的な DNA 形状を呈する半数体細胞では、細胞内のいずれの領域にもその局在が観察されないことが明らかになった (Fig.11e)。マウスの生殖組織内においては、SUN1・SUN2 以外の SUN ドメインタンパク質は発現していないことがすでに報告されており (Horn et al., 2013)、本研究の結果と考え合わせると、SUN ドメインタンパク質のうち、SUN1 パラログのみが減数分裂期テロメアにおいて機能していると考えられる。

Figure 11

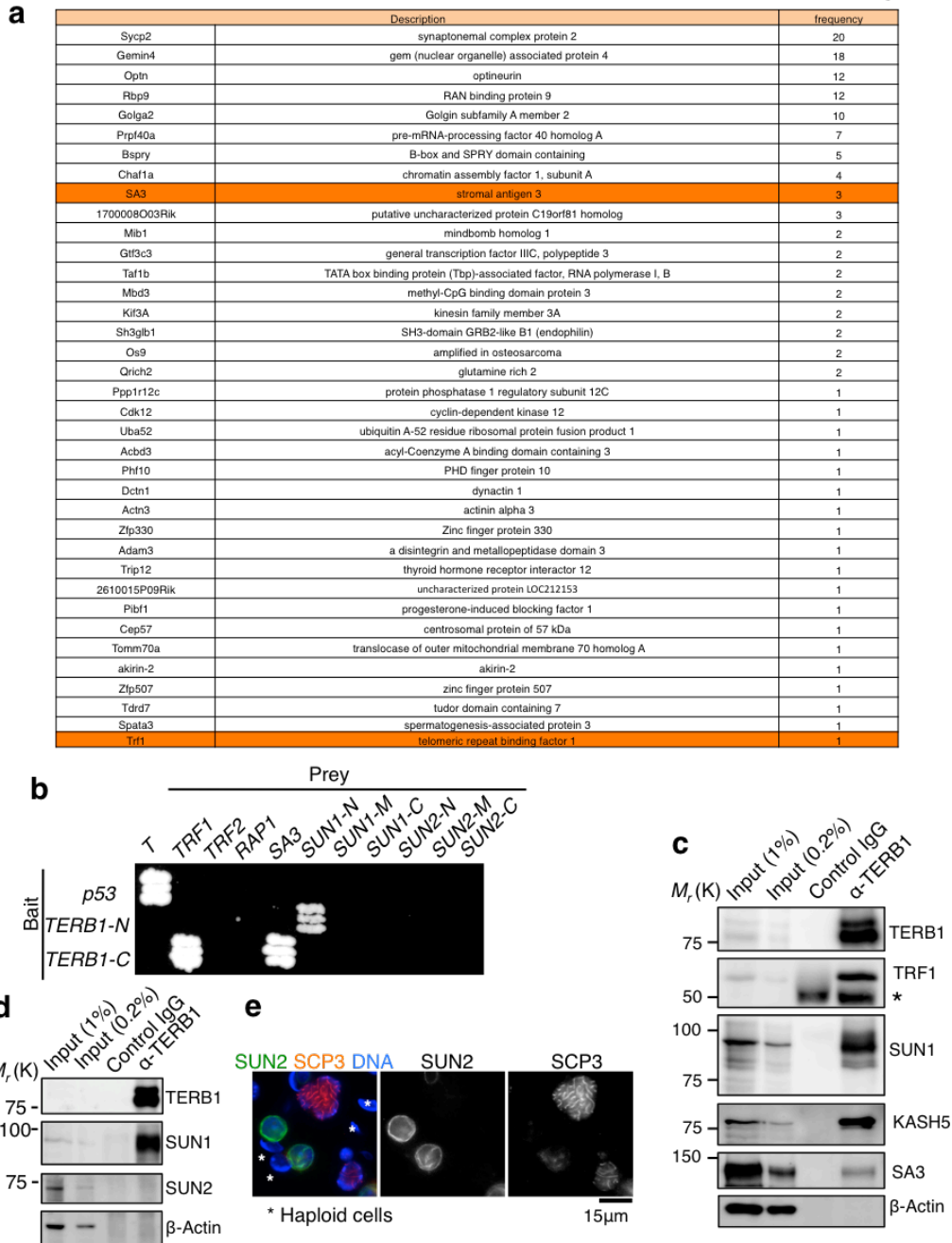


Fig11. TERB1はTRF1、SUN1、SA3と直接結合する

(a) 全長TERB1 (1-767a.a.) をベイトに用いた酵母two-hybrid法により、マウス精巣cDNAライブラリーからTERB1と相互作用するタンパク質の網羅的スクリーニングを行った。同定されたタンパク質およびその略称 (description)、また検出頻度 (frequency) を図示した。(b) 酵母two-hybrid法によって検出したTERB1N (1-371a.a.) またはC (372-767a.a.) と図示したタンパク質との相互作用。TRF1およびSA3はマウス精巣由来のcDNA libraryを用いたスクリーニングから同定された。T抗原とp53はポジティブコントロールとして用いた。(c) 野生型精母細胞抽出液からのTERB1抗体を用いた免疫沈降実験。TERB1の免疫沈降産物を図示したタンパク質に対する抗体でプロットした。アスタリスクは抗体の重鎖を示す。(d)(c)と同様に、TERB1の免疫沈降産物を図示したタンパク質に対する抗体でプロットしたもの。(e) 野生型マウス由来の精巣から回収した細胞をSCP3およびSUN2B抗体で染色した。アスタリスクは減数分裂を終えた半数体の細胞を示す。SUN2のシグナルは体細胞期の細胞においてのみ観察される。スケールバーは図示の通り。

4-2 TERB1 は TRF1 とヘテロ複合体を形成することでテロメア DNA に結合する

TERB1 のテロメア局在メカニズムを明らかにするため、GFP と融合させた様々な TERB1 断片を野生型精母細胞内へと発現させ、そのテロメア局在能を、GFP 抗体を用いた免疫染色法により査定した。その結果、TERB1 の Myb ドメインに隣接する C 端領域 (523-699a.a.) がテロメア局在に必要な十分な領域であることが明らかになった (Fig.12a)。この領域は酵母 two-hybrid 法において TRF1 と相互作用するのに必要十分な領域と一致したことから (Fig.12b)、我々はこの領域を TRF1 結合ドメイン (TRFB; TRF1 binding domain) と命名した。さらに、MBP タンパク質と TRFB ドメインの融合タンパク質 (MBP-TRFB) をヒスチジンタグした TRF1 (HIS-TRF1) と共に大腸菌内に発現させ、アミロースビーズによる精製を行った結果、両者が正確に 1:1 の量比からなるヘテロ複合体を形成することが明らかになった (Fig.12c)。TRF1 は体細胞分裂期において 1:1 の量比からなる安定したホモダイマーを形成することでテロメア DNA に結合していると考えられている (Bianchi et al., 1997)。本研究の結果から、減数分裂期においては TRF1 ホモダイマーの一部が TRF1-TERB1 ヘテロ複合体 (あるいはヘテロダイマー) に置き換わることで、減数分裂期特異的なテロメア機能を発揮していることが示唆された。また、この TRF1 とのヘテロ複合体形成が、TERB1 のテロメア局在に必要な十分な制御である事も同時に示された。

次に、*in vitro* で調整したタンパク質 MBP-TERB1、HIS-TRF1、MBP-TERB1-HIS-TRF1 複合体 (Fig.12d) をそれぞれ RI (Radio Isotope) 標識した 12 連テロメア反復 DNA (TTAGGG)₁₂ と混合し、その *in vitro* における DNA 結合能の査定を行った (Electron mobility shift assay; EMSA) (Fig.12e)。その結果、既に知られている通り HIS-TRF1 は強い DNA 結合能を有し、プローブ DNA の移動度低下が観察されたが (Fig.12e, lane3)、MBP-TERB1 はそれ自体では DNA 結合能を示さないことが明らかになった (Fig.12e, lane2)。また、別々に調整した HIS-TRF1 を MBP-TERB1 と混合しても HIS-TRF1-DNA 複合体の移動度に大きな変化をもたらさなかったことから (Fig.12e, lane4)、MBP-TERB1 が *in vitro* において安定化した TRF1 ホモダイマーに対しては効率良く結合できない可能性が示唆された。一方で、MBP-TERB1-HIS-TRF1 のヘテロ複合体は DNA 結合能を有しており、プローブ DNA の著しい移動度低下が観察された。さらに、この結合は RI 標識を行っていない過剰量のテロメア DNA の競合添加で抑圧され、ランダムな配列では抑圧されなかったことからテロメア DNA 配列特異的な結合であることが示された (Fig.12e, lane6-10)。ただし、TERB1 は *in vitro* において、それ自体でオリゴマーを形成する性質があり (データは示さない)、MBP-TERB1-HIS-TRF1 複合体もその性質を引きずることで非常に高分子量の複合体を形成しており、ゲルへの貫入は観察できなかった (Fig.12e, lane6)。

Figure 12

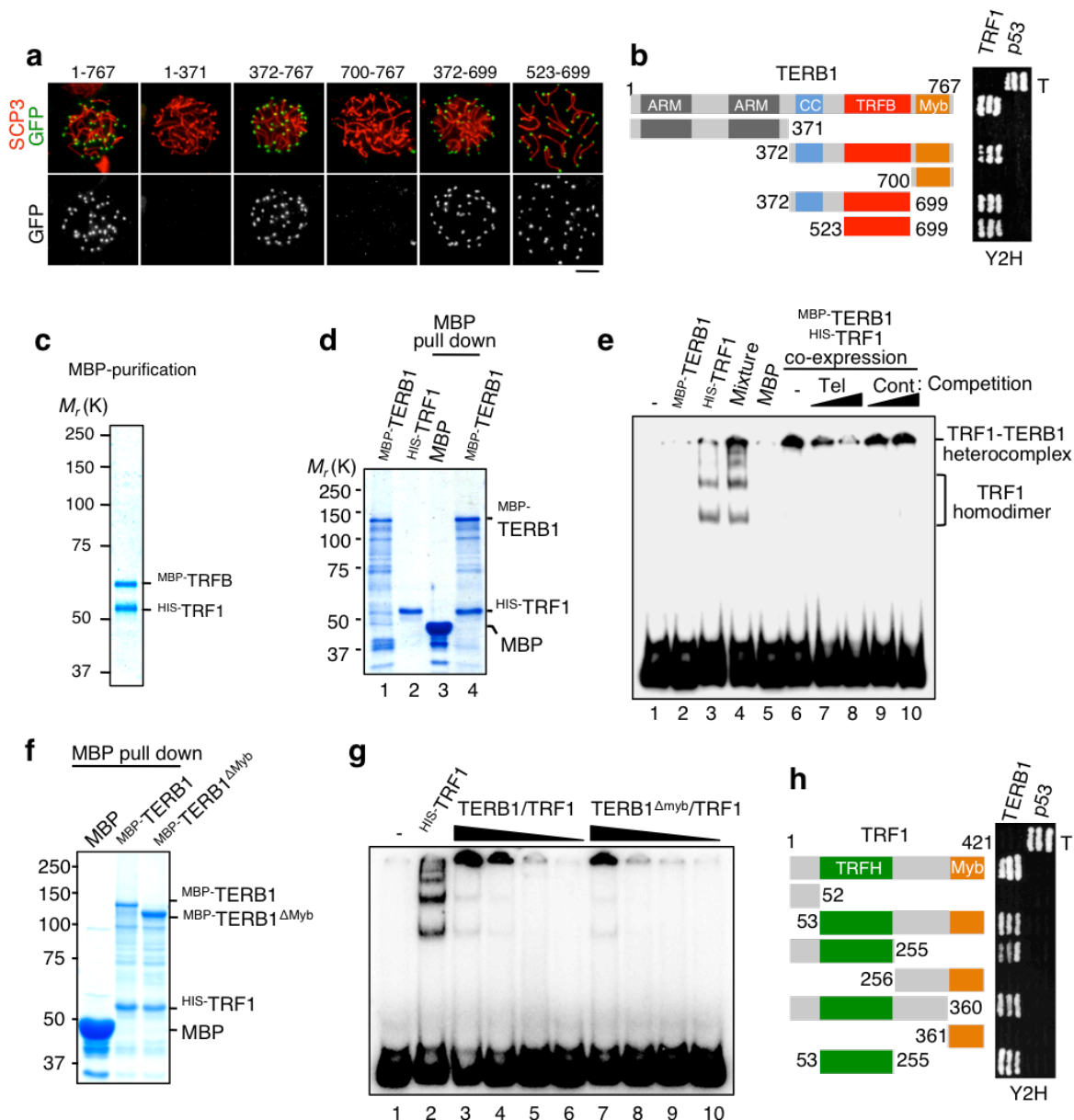


Fig12. TERB1はTRF1と1:1の量比のヘテロ複合体を形成しテロメアへと局在する
 (a) 図示した領域を含むTERB1断片とGFPとの融合タンパク質を野生型精母細胞へと発現させ、GFP抗体を用いた免疫染色によってその局在を観察した。(b) TERB1断片とTRF1との相互作用を酵母two-hybrid法によって検出した。T抗原とp53はポジティブコントロールとして用いた。(c) 大腸菌内でMBP-TRFBとHIS-TRF1を共発現させ、アミロースビーズによってMBPを吸着し両者のヘテロ複合体を精製した。(d) MBP-TERB1、HIS-TRF1および(c)と同様に精製したMBP-TERB1とHIS-TRF1のヘテロ複合体。(e) (d)で示したタンパク質を用いたEMSAアッセイ。DNAにはRI標識した12連テロメアリピート配列を用いた。また競合実験にはRI標識を行っていない12連テロメアリピート配列あるいは同長のランダムなDNA配列を用いた。(f) と同様に調整したヘテロ複合体。(g) (f)で示したタンパク質を用いたEMSAアッセイ。タンパク量を半量ずつ希釈した (lane2-6, 7-10)。(h) TRF1断片とTERB1との相互作用を酵母two-hybrid法によって検出した。緑・オレンジの領域はそれぞれ、TRF homology domain (TRFH) およびMyb like DNA結合ドメイン (Myb) を示す。T抗原とp53はポジティブコントロールとして用いた。スケールバー; 5 μ m

次に TERB1 の Myb ドメインが MBP-TERB1-HIS-TRF1 のヘテロ複合体の DNA 結合能に関与しているかどうかを検証するために、TERB1 の Myb ドメインを欠損させたヘテロ複合体 MBP-TERB1^{ΔMyb}-HIS-TRF1 を調整した (Fig.12f)。タンパク質量を希釈させ DNA 結合能を査定した結果、TERB1-Myb ドメインを欠いた MBP-TERB1^{ΔMyb}-HIS-TRF1 は全長の MBP-TERB1-HIS-TRF1 と比較して、その DNA 結合能がおよそ半分程度に低下することが明らかになった (Fig.12g)。従って、TERB1 の Myb はそれ自体では DNA 結合能を持たないが (少なくともでは *in vitro* では検出されなかったが)、TRF1 とヘテロ複合体を形成した場合においてのみ、その DNA 結合の安定化に働いていることが示唆された。

上記の EMSA アッセイにおいて、別々に調整した HIS-TRF1 (ホモダイマー) と MBP-TERB1 を混合しても両者の結合が観察されなかったことから、TERB1 が TRF1 のホモ相互作用に必要な領域と排他的に結合する可能性が示唆された。そこで、酵母 two-hybrid 法により、TERB1 が TRF1 のいずれの領域と結合するかを検証した結果、予想した通り、TRF1 のホモ相互作用を媒介することが報告されている TRF1 の N 端に位置する TRFH ドメイン (Fairall et al., 2001) が、TERB1 との結合に必要な十分な領域であることが明らかになった (Fig.12h)。以上の結果から、TERB1 が TRF1 と (おそらくそのホモ相互作用と排他的に) 結合することでヘテロ複合体を形成し、テロメア DNA に配列特異的に結合することが示された。

4-3 TERB1 はリン酸化制御によってテロメアから脱局在する

リン酸化酵素 (Kinase) によって媒介されるタンパク質のリン酸化修飾は、基質タンパク質に負電荷を付加することでその構造変化やタンパク質間の相互作用調節に働くことが知られている。従って *in vivo* におけるリン酸化修飾部位や時期の特定は、目的タンパク質の分子制御機構を理解する上で重要な情報になると考えられている。質量分析法を用いた先行研究において、マウス組織内におけるタンパク質リン酸化修飾部位が網羅的に同定されており (Huttlin et al., 2010)、それらのデータベースから TERB1 の 647 番目のスレオニン (T647) が *in vivo* でリン酸化修飾を受けることが見いだされた。

脊椎動物間で TERB1 のアミノ酸配列を比較すると T647 やその周辺配列は進化的に高度に保存されており、この領域が TERB1 の分子機能において重要な機能を有することが予測された (Fig.13a)。さらに、T647 は TRF1 との相互作用に必要な十分な領域 (TRFB ドメイン) 内に位置しており、この残基へのリン酸化が TERB1 と TRF1 との相互作用を調節している可能性が示唆された。そこで、T647 の非リン酸化型変異体 (T647A) およびリン酸化模倣型変異体 (T647D) を用いて、酵母 two-hybrid 法による TRF1 との結合能の査定を行った。その結果、T647D 変異体では、野生型や T647A と比較して、TRF1 との結合能が顕著に減少することが明らかになった (Fig.13a)。さらに、GFP と融

合させたこれら変異体を野生型マウスの精巣内に一過的に発現させ、そのテロメア局在量を定量した結果、T647D 変異体ではその局在が有意に減少することが明らかになった (Fig.13b)。

T647 は細胞周期調節に関わる kinase である CDK1 の標的配列と一致し、さらにこの標的配列を構成するアミノ酸残基はいずれの生物種においても保存されていた (Fig.13a)。CDK1 活性が上昇する減数第一分裂前期の終盤から中期にかけて TERB1 のテロメア局在が消失する事実 (Fig.6a) と考え合わせると、*in vivo* において TERB1 のテロメア局在、すなわち TRF1 との結合能が、時期特異的な CDK1 によるリン酸化によって負に制御されている可能性が考えられた。そこでまず、TERB1 の T647 番が実際に CDK1 によってリン酸化修飾を受けるかどうかを *in vitro* において検証した。リコンビナント CDK1-CyclinB 複合体を酵素に、TERB1 の T647 を含む C 断片を基質に用い、IR 標識した ATP の取込みによりリン酸化を検出した結果、TERB1 の C 断片が実際に CDK1-CyclinB によってリン酸化されていること、そしてそのリン酸化が非リン酸化型変異体 T647A で減少することが明らかになった (Fig.13c)。このことから TERB1 の T647 が *in vitro* において CDK1-CyclinB によってリン酸化修飾を受けることが明らかになった。

次に、TERB1 のリン酸化 T647 番を特異的に認識するリン酸化抗体 (pT647 抗体) を作製し、TERB1 との反応性を Western blot により検証した。その結果、pT647 抗体が、TERB1 を ATP の存在化で CDK1-CyclinB と反応させた場合においてのみ、そのリン酸化を特異的に認識することが明らかになった。さらに非リン酸化型である T647A や他の CDK1 の標的配列である S696 のリン酸化には反応しなかったことから、pT647 抗体が T647 のリン酸化に対して高い特異性が持つことが示された (Fig.13d)。

T647 のリン酸化が実際に *in vivo* において起きているのかを検証するため、野生型精母細胞に対して pT647 抗体を用いた免疫染色を行った。コントロールとして TERB1 抗体を用いた免疫染色も同時に行った。その結果、TERB1 のシグナルは前期を通じてほぼ一定してテロメアに観察されたのに対して (対合することで Pachytene 期には Leptotene 期の約 2 倍になり、対合の途中段階 Zygotene 期や対合が解消される時期 Diplotene 期にはその中間的な値になる)、テロメアにおける pT647 のシグナルは前期の終盤 (Pachytene 期から Diplotene 期) にかけて急激に強くなることが明らかになった (Fig.13e)。実際に pT647 のテロメアシグナルを TERB1 のそれで平均化すると、Diplotene 期に向けて顕著に増加する傾向が見て取れた (Fig.13f)。酵母ツーハイブリッド法の結果と考え合わせると (Fig.13a)、このリン酸化は TERB1 と TRF1 との結合を弱めることで TERB1 のテロメア離脱を促進していると考えられ、実際にリン酸化が増える前期の終盤 (Pachytene 期から Diplotene 期) にはテロメアから離脱し、核質に分散した TERB1 のシグナルが顕著に観察されることが明らかになった (Fig.13e)。

Figure 13

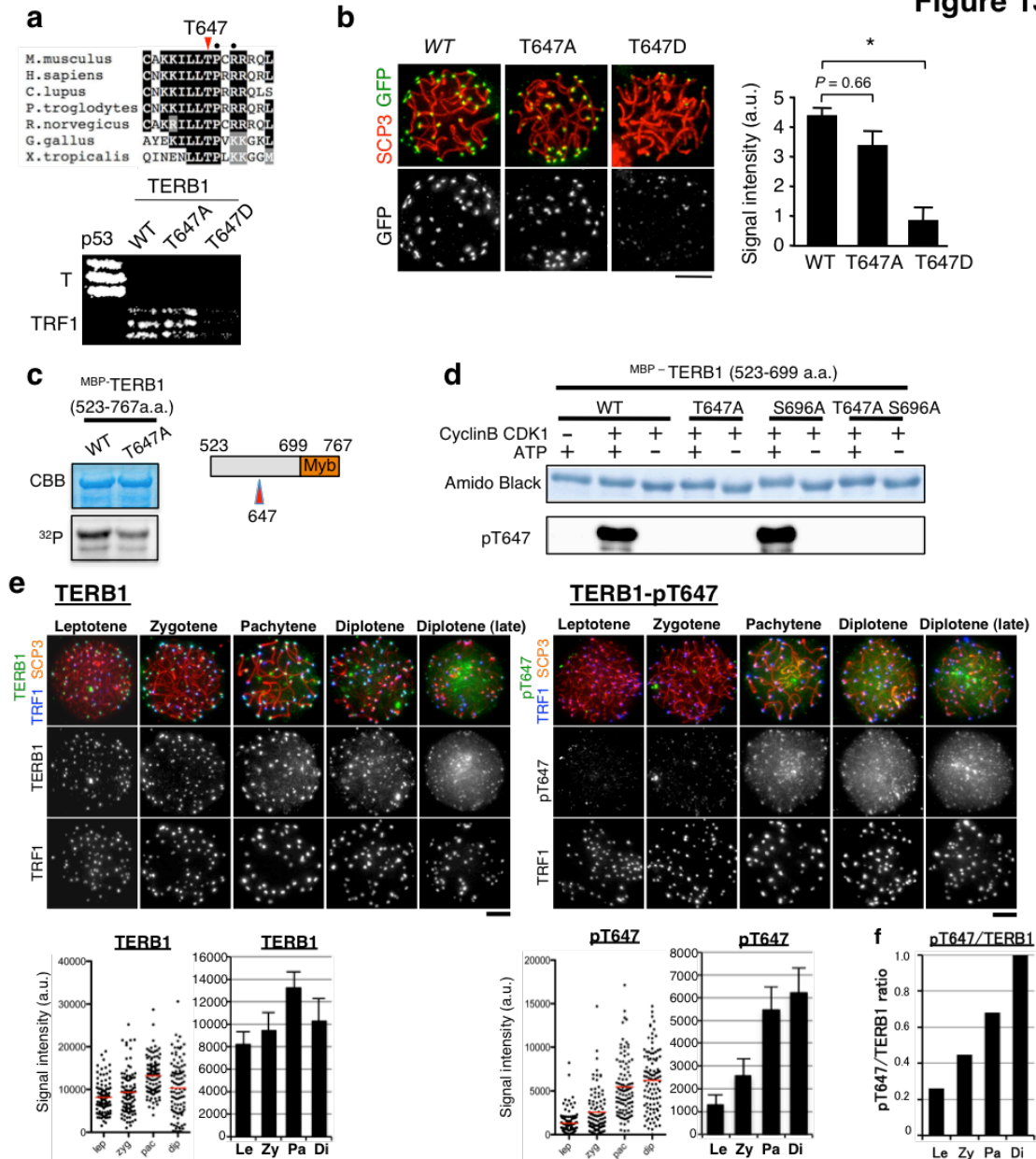


Fig13. TERB1のT647へのリン酸化がTERB1のテロメアからの脱局在を誘導する
(a) TERB1の647番スレオニンおよび周辺配列を種間で比較した。黒で示したアミノ酸は同一のアミノ酸を、灰色で示したアミノ酸は類似した性質を持つものを示す。黒丸(●)はCDK1の標的配列(S/T-P-X-K/R)を構成するアミノ酸を示す。また、下図はTERB1-T647変異体とTRF1を用いた酵母two-hybrid法。**(b)** GFP融合TERB1T647変異体のテロメア局在量を定量した。グラフY軸は3回の独立した実験の平均値を表す。統計的有意性はT検定により査定した(* < 0.05)。**(c)** MBP-TERB1C断片およびその変異体T647Aを基質に用い、CDK1-CyclinB複合体による*in vitro*リン酸化反応を行った。リン酸化はIR標識したATPの取り込みにより検出した。**(d)** MBP-TERB1C断片およびその変異体T647A、S696A、T647AS696Aを基質に用いて、CDK1-CyclinB複合体による*in vitro*リン酸化反応を行った後、pT647を用いたWestern blotによりそのリン酸化を検出した。**(e)** TERB1およびpT647抗体を用いた精母細胞の免疫染色。各ステージにおけるテロメア上でのシグナル変化をグラフにまとめた。**(f)** TERB1シグナルに対するpT647シグナルの変化を、減数分裂前期のサブステージ毎に定量した。各ステージの値はDiplotene期の値(Dip)によって平均化したもの。bar; S,E,M. スケールバー; 5μm。

4-4 総括

TERB1 の相互作用因子の解析から、TERB1 が核膜タンパク質 SUN1 や染色体軸を形成するコヒーシン SA3 と直接結合することが示された。さらに、TERB1 が TRF1 とヘテロ複合体を形成することでテロメア DNA へと直接結合することや、この TRFB ドメインを介した TRF1 とのヘテロ複合体形成が TERB1 のテロメア局在に必要な制御である事が明らかになった。さらに、減数第一分裂前期終盤には CDK1 による TERB1 へのリン酸化修飾が起こり、TRF1 との相互作用が弱まる事で、TERB1 のテロメアからの脱局在が促進されることが示唆された。

第五節 TERB1 はコヒーシン局在を介してテロメア DNA を構造的に補強する

酵母ツーハイブリッド法および免疫沈降法による相互作用因子の解析から、TERB1 がコヒーシン複合体の構成因子 SA3 と直接相互作用することが明らかになった (第四節)。コヒーシン複合体は複製された姉妹染色分体を繋ぎ止める役割を持ち、さらに染色体の構造維持やそれによる遺伝子の転写制御などにも働いている (Nasmyth and Haering, 2009)。また、減数分裂期には体細胞とは異なる構成因子からなるコヒーシン複合体が働くことが知られており、体細胞期の機能に加え、減数分裂期特異的な染色体軸構造 (Axial element) の形成などに機能していることが知られている (Herran et al., 2011; Ishiguro et al., 2011; Lee and Hirano, 2011; Llano et al., 2012)。本節では TERB1 と SA3 との相互作用がもつ機能的意義の解明を試みた。

5-1 コヒーシン複合体は TERB1 依存的にテロメアへと局在する

コヒーシン複合体の減数分裂期特異的な構成因子である SMC1 β および RAD21L の KO マウス精母細胞において、部分的に核膜から離脱したテロメアが観察されることが報告されている (Adelfalk et al., 2009; Herran et al., 2011)。筆者らの解析からも、RAD21L そしてそのパラログである REC8 の KO 精母細胞において、テロメアが部分的に核膜から離脱している様子が観察された (Fig.14a)。RAD21L および REC8 は、哺乳類の減数分裂前期にそれぞれ独立した異なるコヒーシン複合体を形成しているが、TERB1 と直接相互作用した SA3 サブユニットは (Fig.11a-b)、そのいずれにも含まれる共通サブユニットであることが知られている (Lee and Hirano, 2011)。従って、これらテロメアで機能していると考えられるコヒーシン複合体は、RAD21L 型および REC8 型いずれも、TERB1 と SA3 の相互作用を介してテロメアに集積している可能性が考えられた。実際、精母細胞において SA3 の免疫染色を行うと、染色体軸構造が形成される前段階 (Leptotene 期) から TERB1 と共局在し、軸構造が形成された後 (Zygotene 期) も TERB1 が局在するテロメア領域に集積している様子が観察された (Fig.14b)。

上記の可能性に対してさらなる検証を行うために、TERB1 およびコヒーシン複合体のテロメアにおける局在依存性を精査した。テロメアマーカーとして TRF1 抗体を、コヒーシンマーカーとして SMC3 抗体 (全てのコヒーシン複合体に含まれる共通サブユニット) を用いて精母細胞の共免疫染色を行ったところ、野生型では両者が染色体末端において共局したのに対して、*Terb1* KO ではその共局在が顕著に減少することが明らかになった (Fig.14c)。また、TRF1 と RAD21L、TRF1 と REC8、いずれの共免疫染色においても同様の傾向が観察された (Fig.14d)。さらに、TERB1 の免疫沈降サンプルを各コヒーシン抗体でプロットしたところ、共通サブユニットである SA3・SMC3 のみならず、

REC8・RAD21L とともに TERB1 との共免疫沈降が検出された (Fig.14e)。以上の結果から、TERB1 が *in vivo* においてコヒーシン複合体と相互作用していることや、それによりのコヒーシン複合体のテロメアへの集積を促進していることが結論された。

また、これらの免疫染色において、TRF1 シグナルの形状を詳細に解析した結果、*Terb1* KO 細胞ではテロメア領域の異常な伸張 (*split*) やテロメア間の連結 (*bridge*) が頻繁に観察されることが明らかになった (Fig.14f)。同様のテロメア構造異常はコヒーシン SMC1 β の KO マウスにおいてすでに報告があり (Adelfalk et al., 2009)、コヒーシンがテロメアから減少した結果生じたものであると考えられる。

逆に、コヒーシン KO マウスにおける TERB1 の局在を検証した結果、REC8、RAD21L いずれの KO マウスにおいても TERB1 は正常にテロメアに局在する事が明らかになった (Fig.14g)。

以上の結果から TERB1 がコヒーシンの上流で働き、そのテロメア局在を促進することで、テロメア構造の維持に働いていることが結論された。

Figure 14

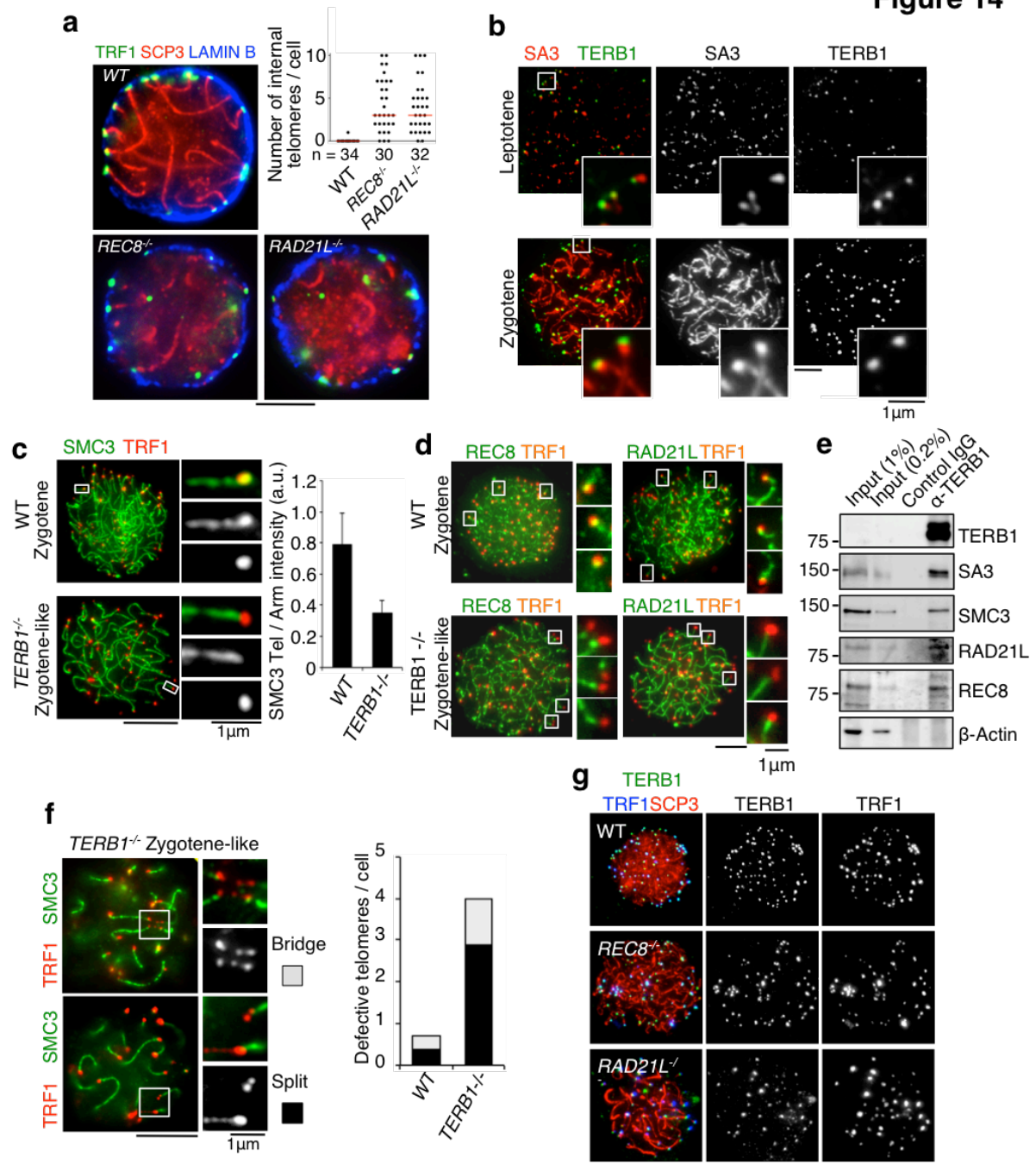


Fig14. TERB1はコヒーシンのテロメア局在を介してテロメアの構造維持に働く

(a) 図示した遺伝型マウス由来の精母細胞をSCP3、TRF1、LAMIN B抗体で染色した。グラフはLAMIN Bと共局在しないTRF1の数 (internal telomere) を定量したもの。(b) 野生型精母細胞におけるSA3およびTERB1の共免疫染色。(c) 野生型および *Terb1* KO 精母細胞におけるSMC3およびTRF1の共免疫染色。グラフはTRF1と共局在するSMC3シグナルを、隣接する染色体軸上のSMC3シグナルで平均化したもの。水平方向に伸長した染色体を各細胞あたり3つ選出し定量を行った。n=10cells (d) 図示した遺伝型マウス由来の精母細胞におけるRAD21L/REC8およびTRF1の共免疫染色。(e) 精母細胞抽出液からTERB1抗体を用いて免疫沈降を行ない、図示した各抗体でプロットした。(f) 野生型精母細胞におけるSMC3およびTRF1の共免疫染色。グラフはTRF1シグナルの形状から判断されたテロメアの構造異常頻度を定量したもの。異常な伸張が見られたものをSplit、異常な伸張が見られ、かつ他の染色体由来のテロメアと融合したものをBridgeと定義した。(g) 図示した遺伝型マウス由来の精母細胞をSCP3、TRF1、TERB1抗体で染色した。bar; S,E,M. スケールバー; 5 μ m (あるいは図示の通り)。

5-2 TERB1 によるコヒーシオン集積は染色体動力に耐える強固なテロメア構造の形成やそれによる染色体運動の促進に機能している

次に SA3 との結合が TERB1 のどの領域によって媒介されているかを明らかにするため TERB1 の様々な断片を用いて酵母 two-hybrid 法による相互作用解析を行った。その結果、SA3 は TRFB ドメインおよび Myb ドメインを含む TERB1 の C 端領域 (372-767 a.a.) と結合することが明らかになった。この結合は Myb ドメインを欠くことで顕著に減少し、さらに、Myb ドメイン単独でも SA3 との結合能を有する事が明らかになった (Fig.15a)。

In vivo における Myb ドメインの機能を検討するため、*Terb1KO* マウスの精巣に対して GFP 標識した TERB1 の全長 GFP-TERB1^{Full} または Myb ドメインを欠いた GFP-TERB1^{ΔMyb} を相補し、*Terb1KO* の表現型が抑圧されるかどうかの検証を行った (Fig.15b)。その結果、興味深いことに GFP-TERB1^{Full} の発現によって *Terb1KO* の表現型が有意に抑圧されたのに対して、GFP-TERB1^{ΔMyb} を発現させた細胞ではテロメアにおけるコヒーシオンの集積が特異的に相補されないことが明らかになった (Fig.15c)。また、コヒーシオンの減少によってもたらされるテロメア構造の異常も同様に、GFP-TERB1^{Full} の発現においてのみ相補された (Fig.15c)。なお、テロメアと核膜の結合 (Fig.15d) や相同染色体の pairing/対合異常 (Fig.15e) は GFP-TERB1^{ΔMyb} の発現により、GFP-TERB1^{Full} ほどではないが、非常に効率よく相補されたことから、TERB1 の Myb ドメインが *in vivo* においてコヒーシオン局在に特化した機能を有していることが示された。

さらに、*Terb1KO* 精母細胞に対して GFP-TERB1^{Full} または GFP-TERB1^{ΔMyb} を発現させ、染色体運動の live 観察を行った結果、GFP が発現していない細胞 (*Terb1KO*) では染色体運動が殆ど観察されなかったのに対して、GFP-TERB1^{Full} や GFP-TERB1^{ΔMyb} を相補した細胞では、染色体運動が有意に回復している様子が観察された (Fig.16a)。また、DNA (Hoechst33342) のシグナルを基に定性的な解析を行った結果、いずれの変異体を発現させた細胞でも DNA 運動の回復が見られたものの、GFP-TERB1^{Full} と比較して GFP-TERB1^{ΔMyb} を発現した細胞では染色体運動の回復が悪いことが明らかになった (Fig.16b)。実際に個々の GFP シグナル (テロメア) を 3 次元的に追跡しその移動速度を定量した結果、GFP-TERB1^{Full} (0.147 μ m/sec) と比較して GFP-TERB1^{ΔMyb} (0.113 μ m/sec) ではその移動速度が約 77% にまで減じていることが示された (Fig.16c)。さらに、興味深いことに、live 観察後の精母細胞を固定し、免疫染色法によりテロメア構造の異常 (split length) を観察した結果、GFP-TERB1^{Full} を発現させた細胞では *Terb1KO* で観察されるテロメアの異常伸張が有意に抑圧されていたのに対して、GFP-TERB1^{ΔMyb} を発現させた細胞では、核膜上において、GFP を発現していない細胞よりも重度のテロメア構造異常が引き起こされる事が明らかになった (Fig.15d)。これは GFP-TERB1^{ΔMyb} の発現により、コヒーシオン集積を欠いた状態でテロメアが核膜へと連結され、運動が回復した結

果であると考えられる (Fig.15e)。

以上の結果から、TERB1 を介したコヒーシンのテロメア集積が、染色体駆動力に耐える強固なテロメア構造を形成し、駆動力を染色体全体へと効率良く伝搬することで染色体運動の促進に機能していることが示された。

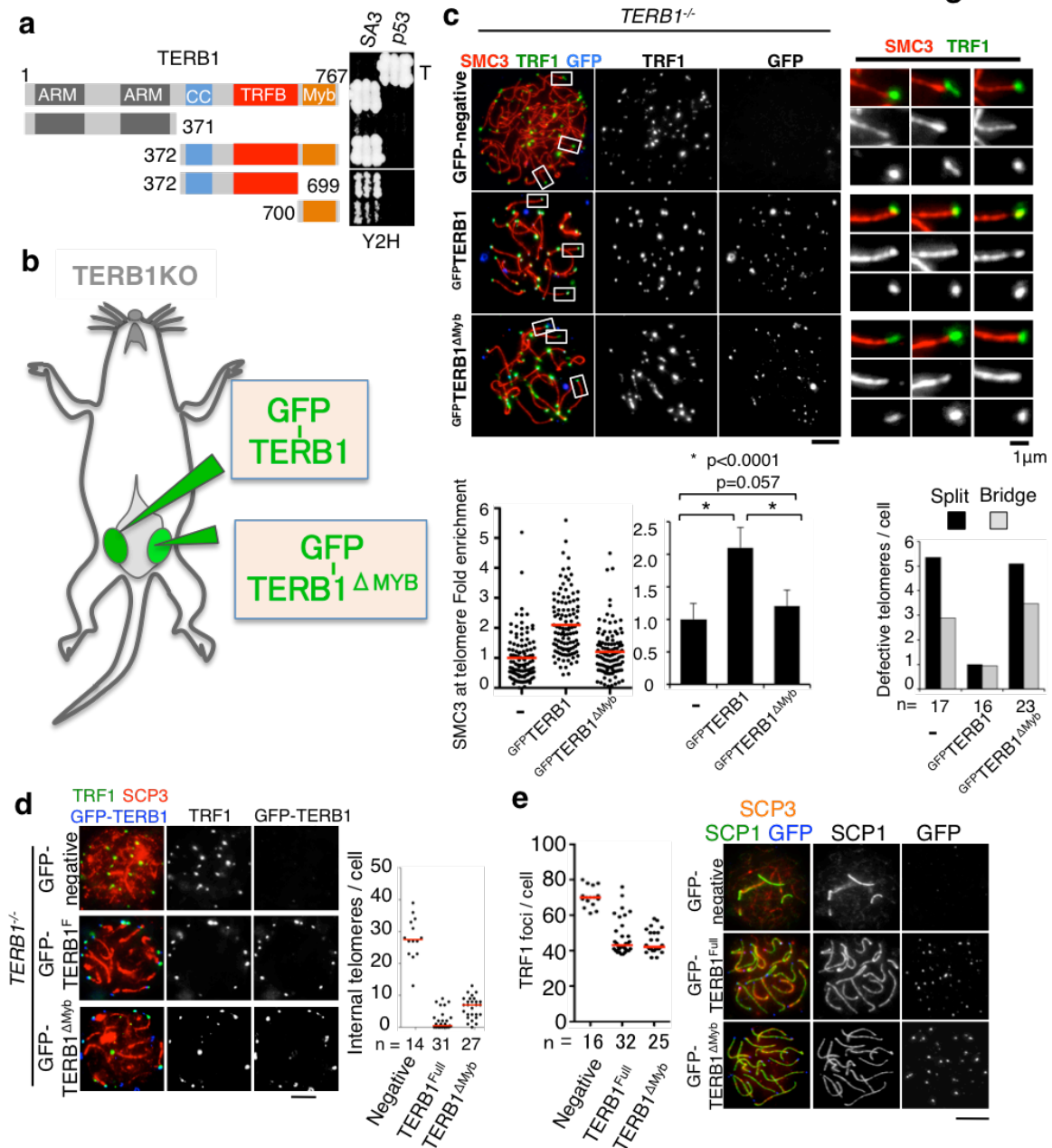


Fig15. TERB1 Mybドメインはコヒーシンのテロメア局在に必要である

(a) TERB1の図示した断片とSA3との相互作用を酵母two-hybrid法によって検出した。T抗原とp53はポジティブコントロールとして用いた。(b)生体内電気穿孔法により *Terb1*KOマウス精巣内に GFP-TERB1^{FULL}あるいはGFP-TERB1^{ΔMyb}融合タンパク質を発現させ、相補実験を行った。(c) *Terb1* KOマウス精巣内へcDNAを導入し、72時間後に精母細胞を回収し、固定後に免疫染色を行った。グラフはテロメアに局在するSMC3のシグナルを、1細胞あたり10個のテロメアで、10個の独立した細胞から定量したもの (n=100 テロメア)。また、TRF1シグナルから判断したテロメア構造異常の頻度を定量した (定量に用いた細胞数は図示した通り)。(d) *Terb1*KOマウス精巣内にGFP-TERB1^{FULL}あるいはGFP-TERB1^{ΔMyb}融合タンパク質を発現させ、72時間後に図示した抗体を用いて免疫染色を行った。グラフは細胞当たりの核質に分散したTRF1シグナル (internal telomere) の数を定量したもの。(e) (d)と同様の操作を行った後、図示した抗体を用いて免疫染色を行った。グラフは細胞当たりTRF1シグナル (TRF1 foci) の数を定量したもの。グラフ中のバーは平均値 (c)、あるいは中央値 (d,e) を示す。統計的有意性はT検定により査定した (* < 0.0001) bar; S,E,M.スケールバー; 5μm (あるいは図示の通り)。

Figure 16

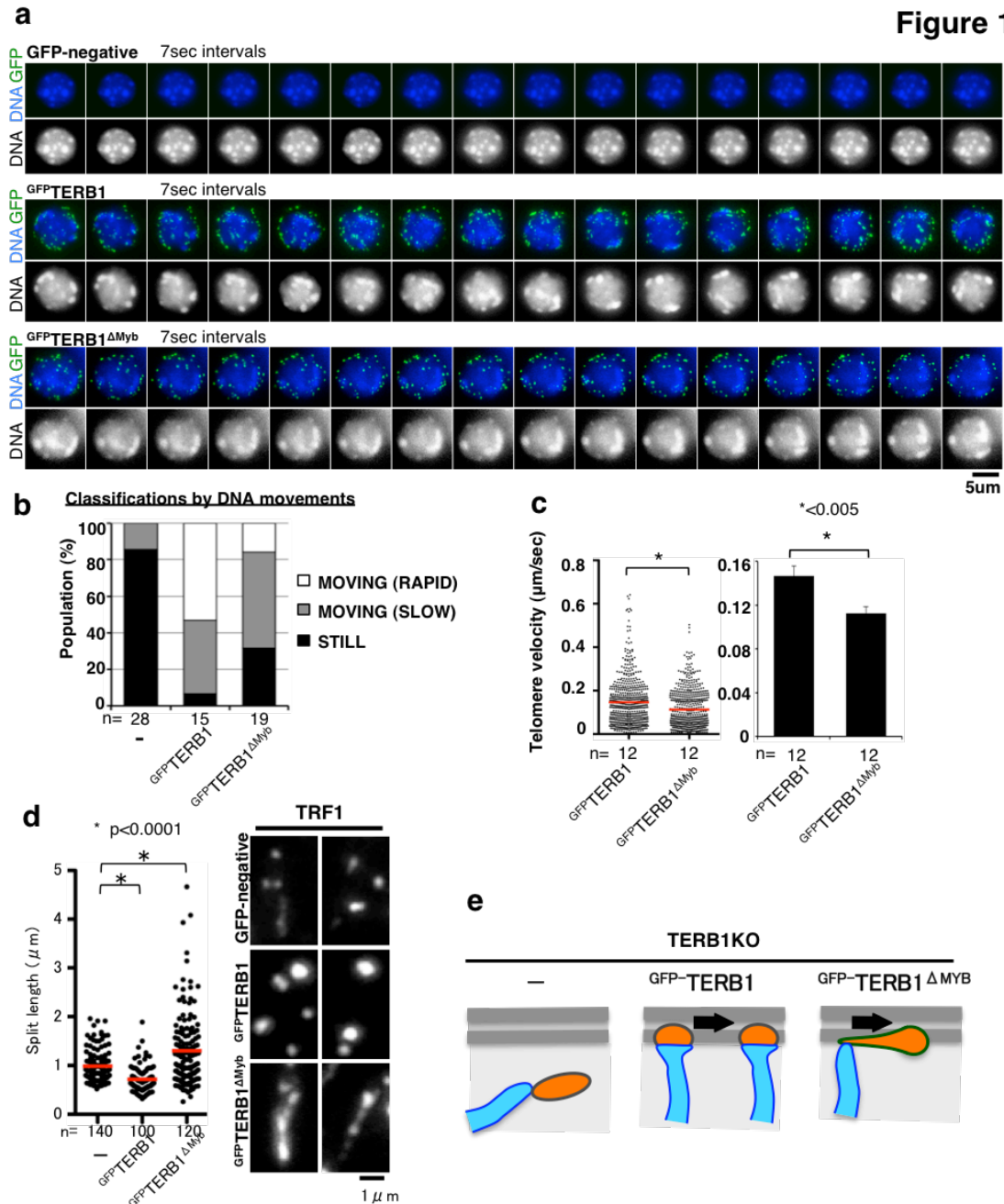


Fig16. TERB1Mybドメインは正常な染色体運動に必要である

(a) *Terb1*KOマウスの精巣内にGFP⁺TERB1^{FULL}あるいはGFP⁺TERB1 Δ Mybを発現させ、24時間後にlive観察を行った。各フレーム間の時差は約7秒。(b)(a)で観察されたDNA運動を定性的に分類した。ヘテロクロマチン (Hoechst33342で強く染まる領域) の相対位置が変化しなかった細胞を still、1-2組で相対位置変化が見られた細胞を MOVING-(SLOW)、3組以上の大規模な相対位置変化が見られた細胞を MOVING-(RAPID)と定義した。細胞数は図示の通り。(c) (a)で観察されたGFP⁺-TERB1及びGFP⁺TERB1 Δ Mybの運動を、各細胞 (n=12細胞) あたり5つ、10フレーム追跡し、フレーム毎の移動速度を定量した。統計的有意性はT検定により査定した (* < 0.005)。(d)(a-c)のライブ観察後に細胞を固定し、TRF1抗体を用いた免疫染色を行った。各細胞あたり5つの最も伸長したテロメア (TRF1) を選び、シグナル両端の直線距離 (split length) を定量した (定量に用いたテロメア数は図示した通り)。GFPが発現していない細胞、GFP⁺TERB1^{FULL}あるいはGFP⁺TERB1 Δ Mybを発現させた細胞は、それぞれ28, 20, 24個の独立した細胞を定量に用いた。グラフ中のバーは平均値を示す。(* < 0.0001)。Error bar; S,E,M. スケールバー; 5 μ m (あるいは図示の通り) (e)(a-d)の結果から推測された、テロメア運動の模式図。

5-3 総括

酵母 two-hybrid 法による相互作用ドメイン解析から TERB1 の Myb ドメインを含む C 端領域が SA3 コヒーシンと直接相互作用することや、*Terb1* KO マウスを用いた相補実験から Myb ドメインが *in vivo* においてコヒーシンのテロメア局在に必要であることが明らかになった。この Myb ドメインを介したコヒーシンのテロメア局在は、染色体運動によってテロメアと核膜の連結部位で生じる負荷からテロメアを構造的に保護することに働いていると考えられる。その結果、染色体駆動力が染色体全体へと適切に伝搬され、正常な染色体運動が促進される。コヒーシンは染色体分配の際に動きの起点として働くセントロメア/動原体領域にも集積することが知られており、おそらくコヒーシン集積を介した強固な染色体構造の形成は、運動起点となるクロマチン領域に共通してみられる機構であると考えられる。

第六節 SUN1/KASH5/Dynactin のテロメア局在制御

酵母からヒトまで進化的に高度に保存された核膜タンパク質複合体 SUN/KASH は、核膜構造の維持や細胞質/核質間の橋渡し因子として機能していることが知られている。特に分裂酵母・出芽酵母・線虫の減数分裂期においては、テロメア領域（線虫の場合は **pairing center**）に集積することで、細胞質モータータンパク質による駆動力を染色体へと伝搬し、核膜に沿った染色体運動を促進していることが知られている (Hiraoka and Dernburg, 2009)。マウスにおいても SUN1 および減数分裂期特異的な KASH ドメインタンパク質 KASH5 が減数分裂の進行に必須な機能を持つことが報告されている (Ding et al., 2007; Horn et al., 2013; Morimoto et al., 2012)。本研究では、マウスの減数分裂期においても、やはり同様に染色体が核膜に沿ってダイナミックな運動を行う事や、その運動が TERB1 および SUN1 に依存することが明らかにされた (第一・三節)。さらに、TERB1 と SUN1 が直接結合することから、両者が減数分裂期テロメアにおいて密接な機能的相関性を有している事が示唆された (第四節)。そこで、本節では TERB1 と SUN1/KASH5 複合体のテロメア局在における相互依存性の検証を試みた。

6-1 TERB1 は SUN1/KASH5 のテロメア局在に必要である

TERB1 抗体を用いた免疫染色法により、野生型精母細胞における TERB1 の局在を精査した結果、テロメアと核膜の結合が開始する初期 **Leptotene** 期において、TERB1 は核膜上に連結されたテロメアへと強く集積したのに対して、核質に取り残されたテロメアには殆ど局在しないことが明らかになった (Fig.17a)。シグナル強度を上げると核質内のテロメアにも微弱な局在が観察されたことから、TERB1 はまず、核質内で微弱な局在をし、その後テロメアが核膜上に連結されることでその局在が安定化されると考えられる。また、*Sun1* KO 精母細胞においても同様の局在パターンが観察されたことから、TERB1 のテロメア局在および核膜上での集積は SUN1 には依存しないことが示された (Fig.17a)。

次に、SUN1 抗体を用いた免疫染色により野生型精母細胞における SUN1 の局在を精査した。その結果、初期 **Leptotene** 期において、核膜上のテロメアには SUN1 の点状の局在が観察されたのに対して、核質内のテロメアには全くその局在が観察されないことが明らかになった (Fig.17a)。これらの観察結果は、本来 SUN1 が核膜タンパク質として機能している事を考えると理に叶っている。さらに、*Terb1* KO 精母細胞を用いた解析の結果、*Terb1* KO 細胞では核質内のテロメアだけでなく核の表層付近に位置するテロメアからも、SUN1 の局在が消失していることが明らかになった (Fig.17b)。SUN1 と複合体を形成し、そのテロメア局在が SUN1 に依存することが知られている外膜タンパク質 KASH5 (Morimoto et al., 2012) も同様に、*Terb1* KO 精母細胞ではそのテロメ

ア局在が消失していた (Fig.17c)。また *Terb1KO* 精母細胞において、テロメアから離脱した SUN1/KASH5 が核膜上の限られた領域に集積している様子が頻繁に観察された (Fig.17c)。

以上の結果から、TERB1 が SUN1/KASH5 非依存的にテロメアへと結合し、核膜表層において SUN1/KASH5 のテロメア集積を促進していることが明らかになった。

6-2 Dynactin は TERB1/SUN1 依存的にテロメアに局在する

先行研究において著者らは、KASH5 が *in vivo* において Dynein-Dynactin complex の構成サブユニット p150 と相互作用していることを示した (Morimoto et al., 2012)。Dynein-Dynactin complex は微小管依存的なモータータンパク質であり、減数分裂期におけるテロメア主導の染色体運動の駆動力を生んでいると考えられる。そこで p150 抗体を用いた免疫染色法によりその局在の検証を行った。その結果、p150 が減数第一分裂前期を通してテロメア領域に特異的に局在することが明らかになった (Fig.17d)。次に、*Sun1KO* および *Terb1KO* 精母細胞を用いて同様の観察を行ったところ、いずれの変異体においても p150 のテロメア局在が消失することが明らかになった (Fig.17e)。以上の結果から、細胞質モータータンパク質 Dynactin p150 が TERB1/SUN1 依存的に減数分裂期テロメアへと特異的に局在することが示された。

6-3 総括

TERB1 が SUN1/KASH5 非依存的にテロメアへと局在し、核膜上のテロメア結合部位に SUN1/KASH5 を集積させること、さらにその下流で染色体運動の駆動力となる細胞質モータータンパク質 Dynactin p150 のテロメア局在が制御されていることが明らかになった。

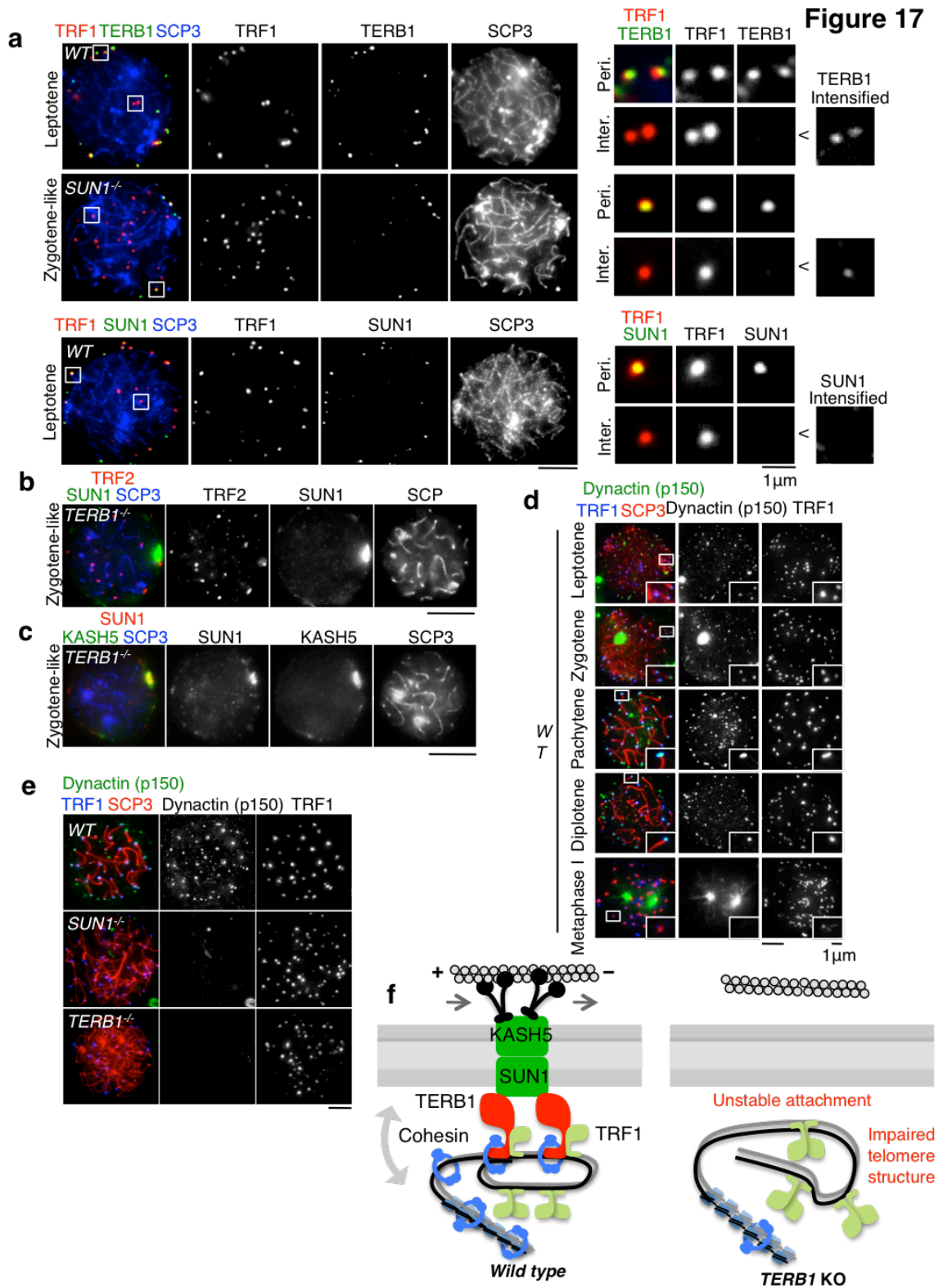


Fig17. TERB1はSUN1/KASH5/p150のテロメア局在を制御する
 (a) 図示した遺伝型マウス由来の精母細胞をSCP3、TRF1、TERB1/SUN1抗体で染色した。(b) TRF2、SUN1、SCP3抗体を用いた *Terb1* KO 精母細胞の免疫染色。(c) SUN1、KASH5、SCP3抗体を用いた *Terb1* KO 精母細胞の免疫染色。(d) p150、TRF1、SCP3抗体を用いた野生型精母細胞の免疫染色。(e) 図示した遺伝型マウス由来の精母細胞をSCP3、TRF1、p150抗体で染色した。(f) TERB1の分子機能を要約したモデル図。スケールバー; 5 μ m (あるいは図示の通り)。

第三章 展望

1 テロメア-核膜結合部位の電子顕微鏡解析

本研究において新規に同定されたテロメアタンパク質 TERB1 は、哺乳類の減数分裂期において、核膜タンパク質 SUN1 と協調することで減数分裂期特異的に見られるテロメア-核膜間の結合を保証していると考えられる (Fig.10a)。その一方で、*Terb1KO* および *Sun1KO* いずれにおいても半数近くのテロメアが未だ核表層に局在していることも明らかになった。これらはテロメアがランダムに核質に分散した結果とも考えられるが、TERB1 や SUN1 非依存的な何らかの制御メカニズムによって積極的に核表層へとテロメアが運ばれている可能性も残されている。これらの可能性は、電子顕微鏡解析によりテロメア-核膜連結部位のミクロ構造を観察する事で区別できると考えられる。電子顕微鏡を用いた先行研究から、野生型精母細胞ではテロメアと核膜の連結部位に attachment plate と呼ばれる電子密度の濃い特徴的な構造体が形成される事が報告されている (Liebe et al., 2004)。この attachment plate の有無が、野生型で観察される正常なテロメア-核膜間の結合を示す指標になると考えられる。従って、*Terb1KO* および *Sun1KO* において attachment plate が正常に形成されているか否かを、電子顕微鏡解析により今後明らかにしていきたい。

2 TERB1 の下流で働く TAP1/2 複合体の機能解析

本研究における酵母 two-hybrid 法を用いた解析から、TERB1 の N 末端が SUN1 と直接相互作用することが示された (Fig.11a-b)。また SUN1 のテロメア局在は TERB1 に依存しており (Fig.16b)、この直接結合を介して TERB1 が SUN1 の局在・機能制御を行っている可能性が示唆された (Fig.16f)。しかし TERB1 の N 端を介した SUN1 との相互作用の *in vivo* における機能的意義は未だ推測の域を出ていない。むしろ、上記の仮説に反するデータとして、筆者らは *Terb1KO* マウス精巣内に TERB1 の N 末端を欠いた断片 TERB1^{ΔN} を発現させる事で、部分的にはあるが、テロメアと核膜の結合、SUN1 のテロメア局在、そして相同染色体の対合が相補されることを見いだしている (データは示さない)。従って、TERB1 には、N 末を介した相互作用以外にも、SUN1 の局在やそれによる染色体運動や対合を促進する何らかの機能があると考えられる。それらの制御に関わる候補因子として、筆者らは TERB1 と直接結合し、TERB1 依存的にテロメアへと局在する 2 つの新規テロメアタンパク質 TAP1/2 (TERB1 associated protein 1/2) を同定している (データは示さない)。TAP1/2 は TERB1 の C 端との直接結合する事でテロメアへと局在し、実際に *Terb1KO* 精母細胞に TERB1^{ΔN} を発現させる事でその局在が相補される事が示されている。従って、この TERB1C 端を介した TAP1/2 の局在が、TERB1 の N を介した SUN1 との相互作用とは独立に、SUN1 の局在・機能制御に働いていることが予測される。今後 TAP1/2 の KO マウスを作製し、その表現型解析を通じて

TERB1 やその下流で働く TAP1/2 複合体による減数分裂期テロメア制御の分子メカニズムをより詳細に明らかにしていきたい。

3 *In vivo* electroporation 法による配偶子形成相補

本研究では高等動物減数分裂組織への簡便な外来遺伝子導入技術として *in vivo* electroporation 法を導入した。そして条件検討の結果、外来遺伝子をコードする組換え Plasmid DNA を生体マウスの精母細胞内へと効率よく導入することに成功した (Fig.3)。実際に本研究を通じて行った種々の解析から、本手法が高等動物の減数分裂期分子制御メカニズムを明らかにする上で極めて有用かつ実用的なツールになり得ることが証明された。さらに特筆すべきは、*Sun1*、*Rad21L*、*Terb1KO* マウスで観察された相同染色体の対合異常や減数分裂進行の異常停止が、本手法による欠損遺伝子の相補によって有意に抑圧できた点である (第一・五章)。本研究では、減数分裂の進行が Pachytene 期まで相補されることを確認するに止まったが、今後はこれらの精母細胞が実際に減数分裂を完了し、妊娠可能な精子にまで分化可能か否か検証を行いたい。もし精子形成が可能になった場合には人工授精や顕微授精などの手法を用いることで個体形成まで可能になると考えられる。従って将来的には、ヒト不妊症患者に対しても、その原因遺伝子を特定する事で本手法による遺伝子治療が可能になると考えられる。

第四章 材料と方法

1 大腸菌株

プラスミドの構築、一般的な遺伝子操作には DH5 α 株を、組換えタンパク質の発現には BL21(DE3)c+株を用いた。大腸菌は LB 培地 (1%BactoTRYPTONE, 0.5%Yeast Extract, 0.5%NaCl) で培養し、必要に応じて抗生物質 (40 μ g/ml, Ampicilin, 35 μ g/ml, Kanamycin) を添加した。

2 大腸菌からの組換えタンパク質の精製

タンパクの発現には大腸菌株 BL21(DE3)c+を用いた。HIS および MBP 融合組換えタンパク質の発現にはそれぞれ pET28c+, pMal-C2 ベクターを用い、精製には Ni-NTA セファロースビーズおよびアミロースベーズをそれぞれ用いた。MBP-TERB1 と HIS-TRF1 のヘテロ複合体は、それぞれのベクターを同時に形質転換した大腸菌抽出液からアミロースベーズによって精製した。

3 マウス臓器および培養細胞からの Total RNA の抽出

4 週齢のマウス体内から摘出した臓器、または、10cm Dish において 100% コンフレントになるまで培養したマウス NIH3T3 細胞を、それぞれ 1ml の Trizol に懸濁後、常温にて 30 分間攪拌した。破碎しにくい臓器の場合は、予め液体窒素によって凍結させ、乳鉢等で粉碎してから同様の操作を行った。その後 200 μ l のクロロホルムを添加し、懸濁し、3 分常温に静置後、4 $^{\circ}$ C1300rpm で 15 分遠心した。上清を回収し、別のチューブに移し、500 μ l のイソプロパノールを加えて懸濁し、再び 4 $^{\circ}$ C1300rpm で 15 分間遠心した。上清を捨て、1ml の 75%エタノールを添加し、4 $^{\circ}$ C1300rpm で 5 分間遠心した。上清を捨て風乾し、得られたペレットを RNase Free 滅菌水 200 μ l に懸濁した。回収した total RNA は -80 $^{\circ}$ Cにて凍結保存した。

4 RT-PCR

3 で得られた total RNA を希釈し、うち 0.02 μ g を 1 反応あたりのテンプレートに用いた。目的遺伝子 cDNA 配列から、イントロンを挟む 200-500bp の断片を増幅するプライマーを設計し (下に示す)、One step RT-PCR

(Invitrogene) によって逆転写 PCR 反応を行った。PCR のサイクル数は 35-45cycle の間で適宜変化させた。

Primers

mTERB1-F : 5'-gtctgaagtatcacatgggc-3'

mTERB1-R : 5'-ttcttttcaaatttggtgtt -3'

GAPDH-F:5'-ttcaccaccatggagaaggc-3'

GAPDH-R:5'-ggcatggactgtgtggtcatga-3'

mSYCE3-F:5'-atggetgattccgatcctg-3'

mSYCE3-R:5'-tcactgcttgcgcttg-3'

5 マウス遺伝子のクローニング

遺伝子 cDNA のクローニングは、マウス (B6 由来) testis cDNA library をテンプレートに用いた PCR 反応により行った。

6 酵母ツーハイブリッドスクリーニング

Gal4 DB-Myc 融合タンパク発現ベクター (pGBKT7) にクローニングした全長 *Terb1* を Bait とし、これを出芽酵母 AH109 株に形質転換したのち、市販のマウス testis cDNA library (Clontech) を Prey として形質転換し、制限培地によるセレクションを行った。ライブラリーサイズの約 2 倍に相当する 739×10^4 個の細胞に形質転換を行い、総計 181 コロニーが陽性クローンとして検出された。いくつかの陽性クローンに関しては、回収した plasmid を再び bait と共に形質転換することで再現性の確認を行った。陽性コントロールとして pGBKT7-p53 および pGADT7-T 抗原を用いた。選択培地には His 合成阻害剤である 3AT を終濃度にして 5mM 添加した SD-HisAde プレートを用いた。

7 ウェスタン解析

サンプルを SDS-PAGE により分離した後、タンパク質を PVDF Immobilon (MILLIPORE) メンブレンに転写した。メンブレンを 1 時間、5%BSA/TBST (0.9% NaCl, 20mM Tris-Cl (PH7.4), 0.05% Tween-20) でブロッキングした後、同様の液に一次抗体を適量加えて、室温で 1 時間インキュベートした。TBST で 3 回洗浄後、5%BSA/TBST に二次抗体を適量加えて室温で 1 時間インキュベートした。TBST で 3 回洗浄後、ECL plus (Amersham) により検出した。

8 抗血清の作製

遺伝子の全長あるいは断片を含む cDNA をクローニングし (下に示す)、pET28c+ベクターにサブクローニングした。大腸菌株 BL21 (DE3) c+にベクターを導入して、His 融合組換えタンパクを精製した。得られたタンパク質を抗原として、2 週間おきに 4 回に分けて免疫を行い、最後の免疫から 1 週間後に全採血により抗血清を得た。抗血清には 0.1% (W/V) の NaN_3 を添加し 4°C で保存した。

Antigens

TRF1 Full : 1-421 a.a. TERB1 C : 523-767 a.a. SUN1 N: 1-210 a.a.

9 抗体のアフィニティー精製

CNBr-activated Sepharose (Pharmacia) 0.35g を 1mM HCL により洗浄し、coupling buffer (6M グアニジン塩酸塩、PBS) に懸濁した。次に同様の buffer でよく透析したリコンビナントタンパク質を混ぜ、2 時間反応させた。さらに Coupling buffer で洗浄したのち、0.1M Tris-HCL (PH8.0) を加え 2 時

間ブロッキングを行った。その後、100mM Glycine-HCL (PH2.5)、10mM Tris-HCl (PH8.0)、PBS の順に洗浄し抗原結合ビーズを得た。抗血清に対し適量の抗原結合ビーズを加え、1時間反応させたのち、ビーズをPBSで洗浄した。100mM Glycine-HCl (PH2.5) を加え抗体を溶出させ、直ちに 1/10 量の 1M Tris-HCl (PH8.0) を加え中和した。得られた抗体はPBSで透析し、4°Cで保存した。

10 マウス精母細胞サンプルの調整 (Dry-Down 法)

マウス精母細胞サンプルは Dry-Down 法(Peters et al., 1997; Tarkowski, 1966)によって調整した。精巣を性成熟した雄マウスから摘出したのち、PBS中で懸濁した。フィルターで組織片を除いた後、遠心し、細胞ペレットを再びPBSで洗浄した。血球計測板により細胞数を計測し、 $1\sim 5 \times 10^3$ cells / μ l の細胞密度になるようPBSに懸濁した。低張処理を行った後 (30mM Tri-HCl PH7.5, 17mM Tri Sodium Citrate, 5mMEDTA, 50mM Sucrose) (100mM Sucrose)、低張液と等量の固定液 (1%PFA, 0.1%Triton X-100, PBS) を添加した。細胞懸濁液をスライドグラス上にスポットし、湿潤な環境下で 4-12hr 固定を行ったのち自然乾燥させた。サンプルは-80°Cで保存した。

11 マウス卵母細胞サンプルの調整 (Dry-Down 法)

卵巣を受精後 15 日-19 日経過した雌胎児から摘出し、PBSで洗浄後、37°C20分間コラゲナーゼで処理した。PBSで洗浄後、低張液 (30mM Tri-HCl PH7.5, 17mM Tri Sodium Citrate, 5mMEDTA, 50mM Sucrose) に 10 分間浸したのち、等量の固定液 (1%PFA, 0.1%Triton X-100, PBS) とともにスライドグラスにスポットし、湿潤な環境下でゆっくり自然乾燥させた。自然乾燥後は-80°Cで保存した。

12 マウス精母・卵母細胞の免疫染色

Dry-Down 法によって調整したプレパラートを、解凍後すぐに 0.1%Triton X-100 を含む PBS に浸し、10 分静置した。PBS で 2 回洗浄した後、5%BSA/PBS で 15 分間ブロッキングを行い、その後同様の液に一次抗体を希釈し、抗体反応を約 1 時間から O/N で行った。PBS により 5 分 3 回洗浄した後、二次抗体反応を 1 時間行った。PBS により 5 分 3 回洗浄し、マウンティング剤 (70%グリセロール/PBS/DAPI) を添加後、カバーグラスで封入した。

13 マウス精母細胞の免疫 FISH 染色

免疫 FISH 染色は先行研究に基づいて行った(Ding et al., 2007)。まず、Dry-down 法で調整したサンプルにビオチン標識されたマウス 8 番染色体プローブ (Applied Spectral Imaging) を添加し、カバーグラスで封入後、85°Cで 10 分間変成させた。37°Cで 72 時間結合反応をさせた後、42°Cにて 50%ホルム

アミド/0.5×SSC および 1×SSC でそれぞれ 5 分 2 回ずつ洗浄した。その後、12 で示した手順に従って免疫染色を行った。また二次抗体反応時にストレプトアビジン標識された Cy5 を添加する事で FISH プローブを色素標識した。

14 マウス精巣抽出液の調整および免疫沈降

約 25 匹の成熟雄マウスから回収した精巣に 25ml の低塩 IP バッファー (20mM Tris-HCL, PH7.4, 50mM KCl, 0.4mM EDTA, 5mM MgCl₂, 10% glycerol, 0.1% Triton X-100, 1mM β-mercaptoethanol, protease inhibitor, phosphatase inhibitor) を添加して、ホモジナイズした。円心分離後のペレットに対して 25ml の高塩 IP バッファー (20mM HEPES, PH7.0, 400mM KCl, 0.4mM EDTA, 5mM MgCl₂, 10% glycerol, 0.1% Triton X-100, 1mM β-mercaptoethanol, protease inhibitor, phosphatase inhibitor) を添加して、氷冷下で sonication を行った。4°C で 30 分放置したのち、再び氷冷下で sonication を行なった。4°C で遠心分離し上澄みを回収した。回収した上澄みを 4°C で超円心し、上澄みを 0.45 μm ポアサイズのシリンジフィルターにて濾過して、高塩精巣抽出液を得た。免疫沈降実験はこの高塩精巣抽出液に 100 μg の TERB1 抗体または等量の Rabbit IgG を添加して行った。4°C で 1 時間抗体と反応させた後、さらに適量の protein A セファロースビーズを添加して 1 時間反応させた。円心により回収したビーズを 1ml の高塩 IP バッファーにより 5 回以上洗浄した後、結合タンパク質を 100mM Glycine-HCl (PH2.5) によって溶出した。

15 *in vivo* electroporation 法

CAG あるいは CMV プロモーターの下流に GFP および目的遺伝子 cDNA をクローニングしたプラスミドを設計し、約 5 μg/ul の濃度になるよう HBS バッファーに懸濁した。うち 9 μl を色素 (FastGreen) と混合し 1 回あたりのインジェクションに用いた。16-30 週齢の雄マウスを用意し、インジェクションの約 10 分前に、適量のペントバルビタールナトリウム水溶液を腹腔注射し麻酔させた。麻酔後、腹部を切開し、精巣を露出させた。グラスキャピラリーおよび口腔ピペットにより DNA 溶液を操作し、双眼実体顕微鏡下において精巣網領域にインジェクションを行った。約 60 分放置した後、エレクトロポレーションを行った。35V50msec の電気パルス を 4 回流し、さらに電極版を逆転させて同様のパルスを流した。その後、精巣を腹部に戻し、真皮および表皮を縫合した。局在解析や live 観察はエレクトロポレーションから 24 時間後に、また KO マウスの相補実験は 72 時間後に、精巣から精母細胞を回収して行った。

16 精母細胞の live 観察

14 で記した手法に基づき GFP 融合タンパク質を精巣内に発現させ、24 時間後に精巣から精母細胞を回収した。PBS で 2 回、live 観察用液体培地

(Leibovitz's L-15 medium with 4mM L-Glutamine, 10% FBS and 400ng/mL Hoechst33342) で1回洗浄を行った後、あらかじめ30分間 Cell-tak (BD Biosciences) 処理 (細胞接着処理) を行った dish に細胞を広げた。33°C 恒温条件下においた顕微鏡のステージ上にて、30分間静地した後、同条件下で live 観察を行った。培地には必要に応じて終濃度 5 μ M の Nocodazole を添加した。露光時間は 0.15 秒 (GFP)、0.025 秒 (Hoechst33342) を目安にした。

17 EMSA アッセイ

in vitro において調整した 12 連テロメアリピート DNA (TTAGGG)₁₂ の末端を制限酵素 EcoRI/NOTI で切断後、クレノー酵素によって α ³²P-dCTP の存在下で 37°C 1 時間反応させ、その末端を RI 標識した。反応バッファー (20 mM HEPES-KOH pH 7.9, 5% Glycerol, 4% ficoll, 20 ng carrier DNA, 0.5 μ g poly(dI-dC), 0.5 mM DTT, 100 mM KCL, 1 mM MgCl₂) 中で、1 反応あたり 200ng のリコンビナントタンパク質 (ヘテロ複合体や 2 種類のタンパク質を混合する場合は合計 400ng になるように添加した) を 0.5ng のラベルしたプローブと混合し、最終容積を 10 μ l になるよう調整した。室温で 30 分反応させた後、反応液を 6% の未変性ポリアクリルアミドゲルにロードし、0.5 \times TBE バッファー中で 130V、2 時間電気泳動を行った。電気泳動後ゲルを乾燥させ、イメージアナライザーにて DNA 移動度を検出した。競合実験は、RI 標識を行っていない 12 連テロメアリピート DNA (TTAGGG)₁₂ またはコントロール配列 (GATGGT)₁₂ を 50ng または 150ng 反応系に添加して行った。

謝辞

5年間の長きに渡り終始懇切なるご指導、御教鞭を賜りました渡邊嘉典先生・石黒啓一郎氏に深く感謝申し上げます。

熊本大学動物資源開発研究部門の竹田直樹先生には TERB1 キメラマウスの製作過程において多大なるご指導・ご協力を頂きました。心より感謝申し上げます。

東京大学後藤由季子研究室の岸雄介氏、伊藤靖浩氏、小野口真広氏にはマウスの実験指導を、東京大学泊幸秀研究室の佐々木浩氏、依田真由子氏には EMSA 解析における生化学実験のご指導を賜りました。感謝申し上げます。

共同研究者である渡邊研究室の森本晃弘氏には *in vivo* electroporation 法の減数分裂組織への導入やその後のスクリーニング過程において、共に条件検討を行い、日々活発な情報交換や議論を行って頂きました。感謝申し上げます。

最後に、共に研究生活に励み、実験材料を共有し、刺激的な議論を交わして頂いた渡邊研究室のメンバー皆様に、感謝申し上げます。

平成 25 年 12 月 16 日
東京大学農学部生命科学研究科
応用生命工学専攻 博士 3 年
澁谷大輝

発表論文

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

(*同等貢献)

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

The Journal of Cell Biology, vol.198, No.2, pp.165-172

Shibuya H, Ishiguro K, Watanabe Y.

“The TRF1-binding protein TERB1 promotes chromosome movement and telomere rigidity in meiosis.”

Nature Cell Biology, vol.16, No.2, pp.145-156

引用文献

- Adelfalk, C., Janschek, J., Revenkova, E., Blei, C., Liebe, B., Gob, E., Alsheimer, M., Benavente, R., de Boer, E., Novak, I., *et al.* (2009). Cohesin SMC1beta protects telomeres in meiocytes. *J Cell Biol* 187, 185–199.
- Bianchi, A., Smith, S., Chong, L., Elias, P., and de Lange, T. (1997). TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA. *EMBO J* 16, 1785–1794.
- Chikashige, Y., Tsutsumi, C., Yamane, M., Okamasa, K., Haraguchi, T., and Hiraoka, Y. (2006). Meiotic proteins bqt1 and bqt2 tether telomeres to form the bouquet arrangement of chromosomes. *Cell* 125, 59–69.
- Conrad, M.N., Lee, C.Y., Chao, G., Shinohara, M., Kosaka, H., Shinohara, A., Conchello, J.A., and Dresser, M.E. (2008). Rapid telomere movement in meiotic prophase is promoted by NDJ1, MPS3, and CSM4 and is modulated by recombination. *Cell* 133, 1175–1187.
- Ding, X., Xu, R., Yu, J., Xu, T., Zhuang, Y., and Han, M. (2007). SUN1 is required for telomere attachment to nuclear envelope and gametogenesis in mice. *Dev Cell* 12, 863–872.
- Doksani, Y., Wu, J.Y., de Lange, T., and Zhuang, X. (2013). Super-resolution fluorescence imaging of telomeres reveals TRF2-dependent T-loop formation. *Cell* 155, 345–356.
- Fairall, L., Chapman, L., Moss, H., de Lange, T., and Rhodes, D. (2001). Structure of the TRFH dimerization domain of the human telomeric proteins TRF1 and TRF2. *Mol Cell* 8, 351–361.
- Gallardo, T.D., John, G.B., Shirley, L., Contreras, C.M., Akbay, E.A., Haynie, J.M., Ward, S.E., Shidler, M.J., and Castrillon, D.H. (2007). Genomewide discovery and classification of candidate ovarian fertility genes in the mouse. *Genetics* 177, 179–194.
- Herran, Y., Gutierrez-Caballero, C., Sanchez-Martin, M., Hernandez, T., Viera, A., Barbero, J.L., de Alava, E., de Rooij, D.G., Suja, J.A., Llano, E., *et al.* (2011). The cohesin subunit RAD21L functions in meiotic synapsis and exhibits sexual dimorphism in fertility. *EMBO J* 30, 3091–3105.
- Hiraoka, Y., and Dernburg, A.F. (2009). The SUN rises on meiotic chromosome dynamics. *Dev Cell* 17, 598–605.
- Horn, H.F., Kim, D.I., Wright, G.D., Wong, E.S., Stewart, C.L., Burke, B., and Roux, K.J. (2013). A mammalian KASH domain protein coupling meiotic chromosomes to the cytoskeleton. *J Cell Biol* 202, 1023–1039.
- Huttlin, E.L., Jedrychowski, M.P., Elias, J.E., Goswami, T., Rad, R., Beausoleil, S.A.,

Villen, J., Haas, W., Sowa, M.E., and Gygi, S.P. (2010). A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression. *Cell* *143*, 1174–1189.

Ishiguro, K., Kim, J., Fujiyama-Nakamura, S., Kato, S., and Watanabe, Y. (2011). A new meiosis-specific cohesin complex implicated in the cohesin code for homologous pairing. *EMBO Rep* *12*, 267–275.

Jain, D., and Cooper, J.P. (2010). Telomeric strategies: means to an end. *Annu Rev Genet* *44*, 243–269.

Latrick, C.M., and Cech, T.R. (2010). POT1–TPP1 enhances telomerase processivity by slowing primer dissociation and aiding translocation. *EMBO J* *29*, 924–933.

Lee, J., and Hirano, T. (2011). RAD21L, a novel cohesin subunit implicated in linking homologous chromosomes in mammalian meiosis. *J Cell Biol* *192*, 263–276.

Liebe, B., Alsheimer, M., Hoog, C., Benavente, R., and Scherthan, H. (2004). Telomere attachment, meiotic chromosome condensation, pairing, and bouquet stage duration are modified in spermatocytes lacking axial elements. *Mol Biol Cell* *15*, 827–837.

Llano, E., Herran, Y., Garcia-Tunon, I., Gutierrez-Caballero, C., de Alava, E., Barbero, J.L., Schimenti, J., de Rooij, D.G., Sanchez-Martin, M., and Pendas, A.M. (2012). Meiotic cohesin complexes are essential for the formation of the axial element in mice. *J Cell Biol* *197*, 877–885.

Martinez, P., Thanasoula, M., Munoz, P., Liao, C., Tejera, A., McNees, C., Flores, J.M., Fernandez-Capetillo, O., Tarsounas, M., and Blasco, M.A. (2009). Increased telomere fragility and fusions resulting from TRF1 deficiency lead to degenerative pathologies and increased cancer in mice. *Genes Dev* *23*, 2060–2075.

Meuwissen, R.L., Offenbergh, H.H., Dietrich, A.J., Riesewijk, A., van Iersel, M., and Heyting, C. (1992). A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *EMBO J* *11*, 5091–5100.

Morimoto, A., Shibuya, H., Zhu, X., Kim, J., Ishiguro, K., Han, M., and Watanabe, Y. (2012). A conserved KASH domain protein associates with telomeres, SUN1, and dynactin during mammalian meiosis. *J Cell Biol* *198*, 165–172.

Nandakumar, J., Bell, C.F., Weidenfeld, I., Zaug, A.J., Leinwand, L.A., and Cech, T.R. (2012). The TEL patch of telomere protein TPP1 mediates telomerase recruitment and processivity. *Nature* *492*, 285–289.

Nasmyth, K., and Haering, C.H. (2009). Cohesin: its roles and mechanisms. *Annu Rev Genet* *43*, 525–558.

Nishikawa, T., Okamura, H., Nagadoi, A., Konig, P., Rhodes, D., and Nishimura, Y. (2001). Solution structure of a telomeric DNA complex of human TRF1. *Structure* *9*, 1237–1251.

Ogawa, T., Arechaga, J.M., Avarbock, M.R., and Brinster, R.L. (1997). Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules. *Int J Dev Biol* *41*, 111–122.

Palm, W., and de Lange, T. (2008). How shelterin protects mammalian telomeres.

Annu Rev Genet 42, 301–334.

Peters, A.H., Plug, A.W., van Vugt, M.J., and de Boer, P. (1997). A drying-down technique for the spreading of mammalian meiocytes from the male and female germline. *Chromosome Res* 5, 66–68.

Phillips, C.M., and Dernburg, A.F. (2006). A family of zinc-finger proteins is required for chromosome-specific pairing and synapsis during meiosis in *C. elegans*. *Dev Cell* 11, 817–829.

Sato, A., Isaac, B., Phillips, C.M., Rillo, R., Carlton, P.M., Wynne, D.J., Kasad, R.A., and Dernburg, A.F. (2009). Cytoskeletal forces span the nuclear envelope to coordinate meiotic chromosome pairing and synapsis. *Cell* 139, 907–919.

Scherthan, H., Jerratsch, M., Li, B., Smith, S., Hulten, M., Lock, T., and de Lange, T. (2000). Mammalian meiotic telomeres: protein composition and redistribution in relation to nuclear pores. *Mol Biol Cell* 11, 4189–4203.

Scherthan, H., Sfeir, A., and de Lange, T. (2011). Rap1-independent telomere attachment and bouquet formation in mammalian meiosis. *Chromosoma* 120, 151–157.

Sfeir, A., Kosiyatrakul, S.T., Hockemeyer, D., MacRae, S.L., Karlseder, J., Schildkraut, C.L., and de Lange, T. (2009). Mammalian telomeres resemble fragile sites and require TRF1 for efficient replication. *Cell* 138, 90–103.

Tarkowski, A.K. (1966). An air-drying method for chromosome preparations from mouse eggs. *Cytogenetics* 5, 394–400.

Yoshida, M., Katsuyama, S., Tateho, K., Nakamura, H., Miyoshi, J., Ohba, T., Matsuhara, H., Miki, F., Okazaki, K., Haraguchi, T., *et al.* Microtubule-organizing center formation at telomeres induces meiotic telomere clustering. *J Cell Biol* 200, 385–395.