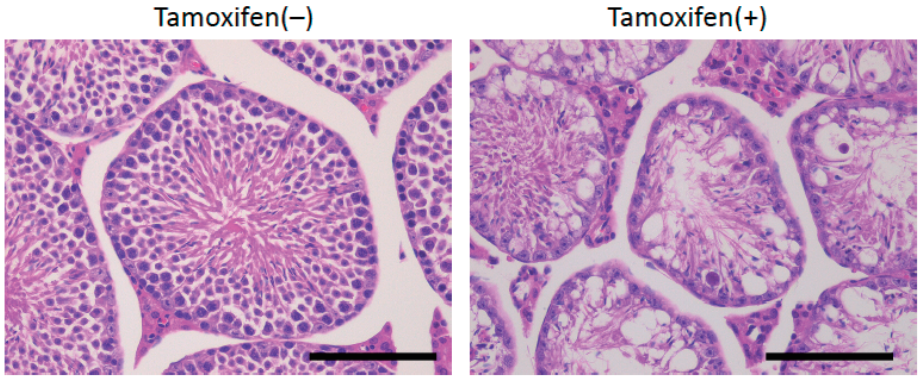
45　精原細胞維持･精子形成に関わる新たな分子機構の解明	村雲　芳樹

【目的】REV7 は DNA 損傷、細胞周期調節、遺伝子発現に関与する多機能蛋白であり、精巣の生殖細胞に高発現している。遺伝子改変マウスを用いて成体になってから *Rev7* をノックアウトすると、1 ヶ月後には精巣は著しく萎縮し、精細管内の生殖細胞はほぼ完全に消失した（下図）。このことは、REV7 が精巣の生殖細胞生存・精子形成に必須であることを示している。本研究の目的は、個体の遺伝情報を次世代に伝える役割を担う精巣の生殖細胞において、生殖細胞維持・精子形成をコントロールする新たな分子メカニズムを提唱することである。DNA 損傷応答、細胞増殖、遺伝子発現に関与する多機能蛋白 REV7 に着目して、生殖細胞における役割と作用機序を明らかにする。

【方法】1. Tamoxifen 誘導性に *Rev7* をノックアウトできる遺伝子改変マウスを用いて、*Rev7* ノックアウト前後の精巣から RNA を抽出し、cDNA マイクロアレイにより遺伝子発現変化を解析した。2. 精巣胚細胞腫瘍細胞株を用いて、BioID（近位依存性ビオチン標識）法により REV7 結合蛋白を共沈させ、質量分析にて網羅的に同定した。その中から、生殖細胞の生存に重要と思われる分子を同定した。3. ルシフェラーゼアッセイによるヒト *REV7* 遺伝子プロモーター解析を行った。そして、*REV7* 発現に重要な転写調節領域を決定し、その領域に結合する転写因子の候補を同定した。4. 男性不妊症患者の精巣生検検体を用いて、REV7 蛋白発現を免疫組織化学染色にて評価し、精子成熟度との関係を統計学的に解析した。5. Tamoxifen 投与により *Rev7* をノックアウトした遺伝子改変マウスの精巣を用いて、生殖細胞の生存に関係するヒストンメチル化への影響を解析した。

【結果】1. *Rev7* ノックアウトにより、精巣で早期に発現が変化するマウスの遺伝子を多数同定した。パスウェイ解析により、spermatogenesis のパスウェイ遺伝子に発現低下傾向が認められることが判明した。2. ヒト REV7 に結合する新規蛋白候補を多数同定した。その中で、精子形成に重要な役割を担っていることが明らかになっている蛋白 B について、免疫沈降法により REV7 との結合を確認した。3. ヒト *REV7* プロモーター領域内に 2 カ所の転写活性化領域を同定した。その領域でバイオインフォマティクス解析により転写因子結合配列を同定し、その配列に結合する転写因子が *REV7* の発現を調節していることを明らかにした。4. 男性不妊症患者の精巣生検検体を用いて、精原細胞での REV7 発現と精子成熟度との関連を解析した結果、REV7 発現と精子成熟度が相関する傾向があることが明らかになった。5. *Rev7* ノックアウトにより、精巣で早期に H3K9me2 が蓄積し、H3K9me3 が減少することを western blotting により確認した。

Tamoxifen 誘導性 *Rev7* ノックアウトによる生殖細胞の消失



Scale bar 100μm

45. 精原細胞維持･精子形成に関わる新たな分子機構の解明

村雲　芳樹

北里大学 医学部 病理学

Key words : REV7，精子形成，プロモーター解析，結合蛋白，ヒストンメチル化

緒　言

REV7 は、DNA 損傷トレランス、二本鎖切断修復などの DNA 修復機構に大きく関わり、細胞周期調節、遺伝子発現にも関与する多機能蛋白であり、研究代表者らが精巣で特異的に高発現している新規蛋白として同定した［1，2］。*Rev7* ノックアウトマウスを樹立し解析した結果、雌雄ともに生下時から生殖細胞が完全に欠損していること、胎生初期に始原生殖細胞がアポトーシスに陥り胎生中期までに完全に消失することが明らかになり、REV7 は始原生殖細胞の生存に必須であることを報告した［3］。精巣での精子形成における REV7 の重要性を明らかにするために、*Rev7-flox* マウスを用いた研究を計画した。*Rev7-flox* マウスを *Ubc-Cre/ERT2* マウスと交配して $Rev7^{flox/flox}$*/Ubc-Cre/ERT2* マウスを作製し、8 週齢にて tamoxifen を投与し *Rev7* を欠損させたところ、1 ヶ月後には精巣は著しく萎縮し、精細管内の生殖細胞はほぼ完全に消失した（図 1）。このことは、REV7 が精巣の生殖細胞生存・精子形成に必須であることを示している。*Rev7* 欠損後の精巣に生じる形態学的変化を詳細に解析した結果、tamoxifen 投与 1 週後から未分化型精原細胞が徐々に減少し、少し遅れて精母細胞の減少が始まり、最終的に 4 週後にはほぼ全ての生殖細胞が消失した。また、生殖細胞のアポトーシスの増加は認められなかったことから、*Rev7* 欠損により精原細胞の自己複製能が阻害され、精原細胞が全て分化してしまい、4 週後には全ての生殖細胞が枯渇したと考えられた。これらの結果から、REV7 は生殖細胞維持・精子形成において、非常に重要な役割を担っていると考えられるが、その作用機序については明らかになっていない。

本研究の目的は、個体の遺伝情報を次世代に伝える役割を担う精巣の生殖細胞において、生殖細胞維持・精子形成をコントロールする新たな分子メカニズムを提唱することである。DNA 損傷応答、細胞増殖、遺伝子発現に関与する多機能蛋白 REV7 に着目して、生殖細胞における役割と作用機序を明らかにする研究を遂行した。

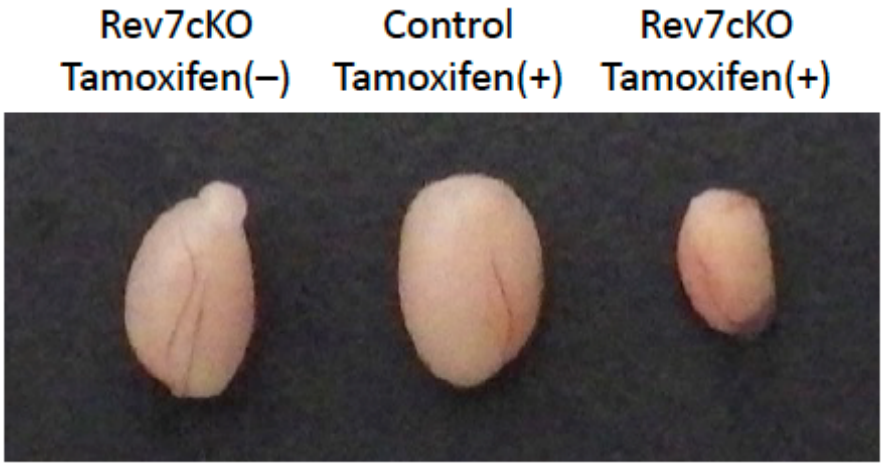


図 1. Tamoxifen 誘導性 *Rev7* ノックアウトマウスの精巣

Tamoxifen 投与 8 週間後には精巣は著明に萎縮した。

方法および結果

1. *Rev7*欠失による生殖細胞での遺伝子発現の変化の解析

Tamoxifen 誘導性に *REV7* をノックアウトできる遺伝子改変マウスを用いて、tamoxifen 投与後 5 日目、7 日目の精巣と tamoxifen 投与前の精巣（図 2）から RNA を抽出し、cDNA マイクロアレイ解析により遺伝子発現プロファイリングを行った。そして、パスウェイ解析により *Rev7* 欠損により影響を受けるパスウェイを明らかにした。その結果、spermatogenesis パスウェイに属する遺伝子に発現低下を示すものが多く認められた。

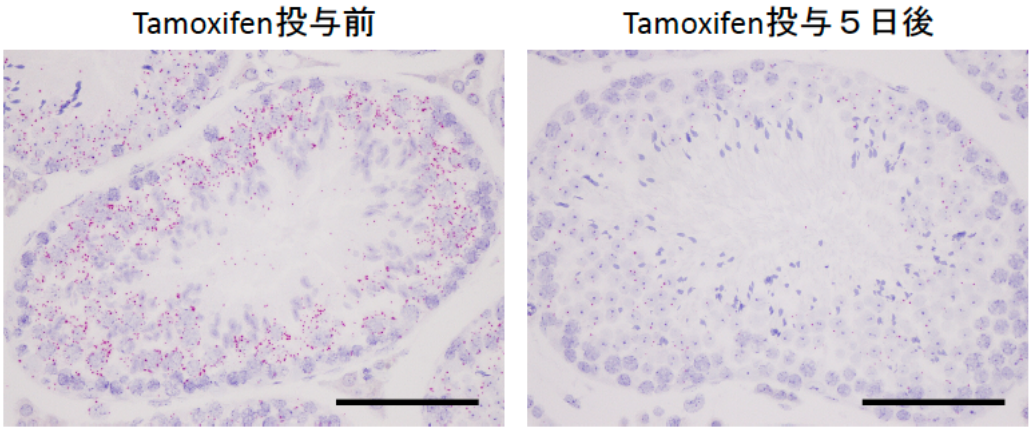


図 2. Tamoxifen 誘導性 *Rev7* ノックアウトマウスの精巣での Rev7 mRNA 発現
Tamoxifen 投与前と投与 5 日後の遺伝子改変マウスの精巣のパラフィン切片を用いて、*in situ* hybridization により *Rev7* mRNA 発現を調べ、*Rev7* がノックアウトされていることを確認した。Scale bar：100 μm。

2. 生殖細胞における新規 REV7 結合蛋白の同定

精巣胚細胞腫瘍細胞株を用いて、BioID（近位依存性ビオチン標識）法により REV7 とともに REV7 結合蛋白を共沈させ、共沈蛋白を質量分析にて網羅的に解析した。その結果、REV7 結合蛋白が多数同定され、その中には既知の結合蛋白が複数含まれており、実験方法は信頼できるものであると考えられた。同定された蛋白の中に、始原生殖細胞維持と精子形成に重要な役割を担っていることが明らかになっている蛋白 A が含まれていたため、蛋白 A を発現する発現ベクターを作製して HEK293T 細胞に発現させ、免疫沈降法により内因性 REV7 蛋白との結合を検討した。その結果、蛋白 A の免疫沈降により REV7 の共沈が確認でき、蛋白 A と REV7 は細胞内で相互作用していることが明らかになった。

3. *REV7*遺伝子プロモーター解析

ヒト REV7 の生殖細胞特異的高発現のメカニズムを解明するため、ヒト精巣胚細胞腫瘍細胞株 NEC8 とヒト胎児腎臓細胞株 HEK293T を用いてルシフェラーゼアッセイによるヒト *REV7* 遺伝子プロモーター解析を行った。その結果、*REV7* プロモーター領域内に 2 カ所の転写活性化領域を同定した（図 3）。バイオインフォマティクスによりその領域の転写因子結合配列を検索し、4 塩基の部位特異的欠損変異体を 4 カ所で作製して転写活性への影響を見たところ、1 カ所の部位特異的欠損変異体で転写活性の低下を認めた。そして、その部位に結合する可能性がある転写因子 B の発現ベクターを作製して細胞に強制発現させたところ、転写活性に変化が認められた。さらに、クロマチン免疫沈降法により転写因子 B が *REV7* プロモーター領域に結合することを確認し、内因性の REV7 の発現にも影響することを見いだした。以上より、転写因子 B は *REV7* 遺伝子の発現を調節する転写因子の可能性があることを示した［4］。

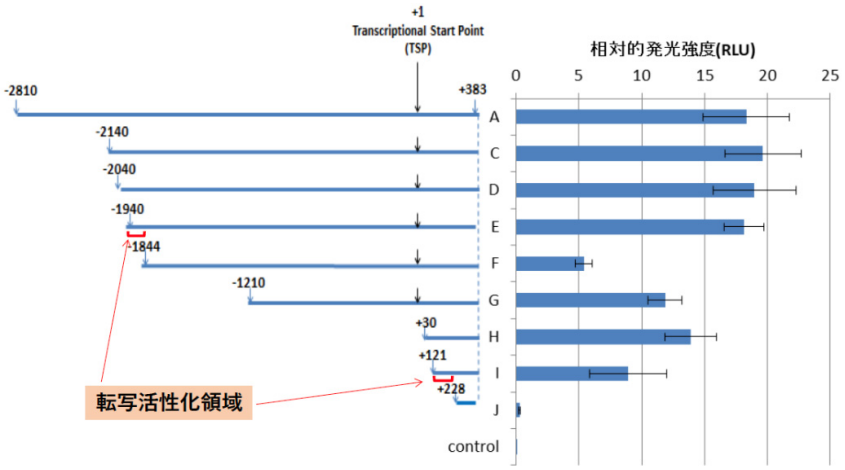


図 3. ルシフェラーゼアッセイによる *REV7* プロモーター領域の解析

REV7 プロモーター領域の欠損変異体を用いて、その領域の転写活性をルシフェラーゼアッセイにより解析した。右図は用いた変異体の領域、左は転写活性を示す。赤枠で示した領域は転写活性化領域。

4. 精子形成不全患者の臨床検体における REV7 発現の検討

男性不妊症患者の精巣生検検体を用いて、REV7 蛋白発現を免疫組織化学染色にて評価した。そして、精原細胞における REV7 発現の低下と Johnsen スコアによる精子成熟度の関係を統計学的に解析した。その結果、精原細胞における REV7 発現レベルは、精子成熟度と正の相関を示す傾向があることが明らかになった。

5. *Rev7*欠失によるエピゲノム制御への影響の解析

REV7 は始原生殖細胞のエピゲノム制御への関与が報告されているため [5]、tamoxifen 投与後の遺伝子改変マウスの精巣を用いて、生殖細胞の生存に関係するヒストンメチル化への影響を解析した。H3K9me2、H3K9me3、H3K27me3 について *Rev7* 欠失後の経時的な変化を western blotting により解析したところ、tamoxifen 投与後 1 週間で H3K9me2 の増加、H3K9me3 の減少が認められた。H3K27me3 には影響は認められなかった。

考　察

本研究により、REV7 は精巣における精子形成に必須の蛋白であることが明らかになった。その作用機序として、本研究の結果から *REV7* 欠損によりヒストンメチル化に影響を及ぼし、その結果、精子形成が障害される可能性が考えられる。また、精子形成に重要な働きをしている蛋白 A との相互作用が明らかになったことから、*REV7* の欠損が蛋白 A の機能に影響を及ぼしている可能性も考えられる。また、*REV7* 発現をコントロールする転写因子として、始原生殖細胞生存に必須である蛋白 B が同定されたことから、REV7 が蛋白 B の下流分子として重要な機能を担っている可能性も考えられた。さらに、男性不妊症症例において、精原細胞における REV7 発現が精子成熟度と関連を示したことから、REV7 の発現低下が男性不妊症の原因になっている可能性も考えられた。今後のさらなる研究の進展により、精巣における精子形成において、REV7 の重要性とその作用機序が解明され、将来的に男性不妊症治療の分子標的としての有用性も明らかになると考えられる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、中部大学生命健康科学部生命医科学科の市原正智教授である。静岡済生会総合病院病理部長の北山康彦医師と技師の皆さんに精巣生検検体の提供について感謝申し上げます。

文　献

1) Murakumo Y, Sakurai Y, Kato T, Hashimoto H, Ichinoe M. REV7 in Cancer Biology and Management. Cancers (Basel). 2023 Mar 11;15(6):1721. PMID: 36980607,　doi: 10.3390/cancers15061721.

2) Murakumo Y, Roth T, Ishii H, Rasio D, Numata S, Croce CM, Fishel R. A human REV7 homolog that interacts with the polymerase zeta catalytic subunit hREV3 and the spindle assembly checkpoint protein hMAD2. J. Biol. Chem. 2000;275:4391-7. PMID: 10660610, doi: 10.1074/jbc.275.6.4391.

3) Watanabe N, Mii S, Asai N, Asai M, Niimi K, Ushida K, Kato T, Enomoto A, Ishii H, Takahashi M, Murakumo Y. The Rev7 Subunit of DNA Polymerase ζ Is Essential for Primordial Germ Cell Maintenance in the Mouse. J. Biol. Chem. 2013;288:10459-71. PMID: 23463509, doi: 10.1074/jbc.M112.421966.

4) Shimada Y , Kato T, Sakurai Y, Watanabe H, Nonaka M, Nanaura N, Ichinoe M, Murakumo Y. Identification of the promoter region regulating the transcription of the *REV7* gene. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2023;662:8-17. PMID: 37094431, doi: 10.1016/j.bbrc.2023.04.056.

5) Pirouz M, Pilarski S, Kessel M. A critical function of Mad2l2 in primordial germ cell development of mice. PLoS Genet. 2013;9:e1003712. PMID: 24009519, doi: 10.1371/journal.pgen.1003712.