

【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半明した。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

