

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| ID No.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 2052                                           |
| 研究課題名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | CCR4-NOT 複合体による精子形成における転写後制御の解析                |
| 研究代表者                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 柳谷 朗子 （沖縄科学技術大学院大学・研究員）                        |
| 研究組織<br>受入教員<br>研究分担者                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 小沢 学 （東京大学医科学研究所・准教授）<br>伊川 正人 （東京大学医科学研究所・教授） |
| 研究報告書                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                |
| <p>本研究は、mRNAの3'末端に存在するポリA鎖を短縮することによりmRNA分解を制御するCCR4-NOTデアデニレース複合体の精子形成における転写後制御の分子機構を解明することを目的とした。CCR4-NOTデアデニレース複合体の脱アデニル化活性をもつ構成分子であるCNOT6、CNOT6L、CNOT7、およびCNOT8に着目して実験を行った。Cnot6欠損マウスとCnot6l欠損マウスの精子形成は野生型と比較して正常であり、精巣の大きさと生殖能力は共に差がなかった。Cnot6/Cnot6lダブル欠損マウスの8週齢の精巣の大きさは野生型の精巣と比較して60%ほどの大きさであった。しかし、野生型の雌との交配による仔マウスの匹数には異常がなかったため、CNOT6/CNOT6Lのダブル欠損は精巣の大きさを減少させるが、生殖能力には差がないことを明らかにした。</p> <p>Cnot7欠損マウスは異常な精子形成を示し男性不妊であるが、それが体細胞であるセルトリ細胞におけるCNOT7の機能破綻によるのか、生殖細胞である精子細胞におけるCNOT7の機能破綻によるのかが不明である。セルトリ細胞または精子細胞におけるCNOT7による転写後制御を明らかにするために、精子細胞特異的Cnot7欠損マウスとセルトリ細胞特異的Cnot7欠損マウスを作製した。その作製に必要な精子細胞特異的にCre組換え酵素を発現するNanos3-Creマウスとセルトリ細胞特異的にCre組換え酵素を発現するAmh-Creマウスは共同研究者である東京大学・医科学研究所の小沢先生に供与して頂いた。新規に作製したCnot7-floxマウスとNanos3-CreマウスまたはAmh-Creマウスと掛け合わせて、精子細胞特異的Cnot7欠損マウスとセルトリ細胞特異的Cnot7欠損マウスを作製した。</p> <p>CNOT7のホモログであるCNOT8は、脱アデニル活性などに関してCNOT7と同様の機能を持つと考えられていたが、近年の研究により胚発生などの生理機能におけるCNOT7とCNOT8の機能の違いが示唆されてきている。異常な精子形成を示し男性不妊であるCnot7欠損マウスの精巣では、CNOT8が過剰発現していることをウエスタンブロット法により明らかにした。このことは精子形成においてCNOT7とCNOT8は異なる機能を示すことを示唆している。精子形成におけるCNOT8の機能を明らかにするために、精子</p> |                                                |

細胞特異的Cnot8欠損マウスとセルトリ細胞特異的Cnot8欠損マウスを作製した。

Cnot7欠損マウスの精巣内で発現変動を示す遺伝子を同定するために、精巣からRNAを抽出しRNAシーケンス解析を行った。RNAシーケンス解析により、Cnot7欠損マウスの精巣内では精子形成に必要な遺伝子である精子のクロマチン凝集に関わるPrm3と、piRNAと複合体を形成してmRNA分解や翻訳を制御するPiwil2のmRNA発現量が減少していることを明らかにした。

Cnot7欠損マウスの精巣における蛋白質発現量をプロテオーム解析により検討した。その結果、Cnot7欠損マウスの精巣では、Prm3とPiwil2と共に精子の運動性に必要なAkap4の蛋白質量が減少していることを明らかにした。

Cnot7欠損マウスの精巣を用いたBulk-poly(A)法により、mRNAのポリA鎖の長さを包括的に解析し、Cnot7欠損マウスの精巣では、野生型の精巣に比べてポリA鎖が一般的に伸長していることを明らかにした。

Cnot7欠損マウスの精巣ではCnot8のmRNA発現量は変化しないのにも関わらず、CNOT7のホモログのCNOT8の蛋白質量が野生型と比較して増加していることをRT-qPCR法とウエスタンブロット法により明らかにした。