

# ヒトY染色体上における新規無精子症因子領域の同定

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9418">http://hdl.handle.net/2297/9418</a>

## ヒトY染色体上における新規無精子症因子領域の同定

金沢大学医学部医学科泌尿器科学講座 (主任: 並木幹夫教授)

野 田 透

特発性無精子症, および高度乏精子症患者 151 例のゲノム DNA に対して行った配列標識部位 (sequence-tagged site, STS) 分析の結果, Y 染色体長腕部遠位側に微小欠失を持つ 18 例の患者を認めた. これら患者の欠失領域は STS プライマー DYS7C を中心に共通しており, 無精子症因子 (azoospermia factor, AZF) の候補領域と考えられた. 一方, 妊孕性のある父親と無精子症患者間に, STS 上共通した領域を欠失する稀な家系を見いだした. 本研究は STS 法やゲノムサザンプロット法によって, その父子における DNA 配列の差を同定することにある. 短腕から長腕に至る 18 の座, および既知 AZF 候補遺伝子である RNA 結合モチーフ (RNA binding motif, RBM) と無精子症欠失 (deleted in azoospermia, DAZ) の有無について検証した. その結果, この患者と父の欠失は DYS7C から DYS239 まで共通していた. したがって, 父親の欠失は共通領域内において息子のそれより小さい可能性が示唆された. この配列の差こそが新規 AZF 候補領域と考えられ, 既知 AZF 候補遺伝子の RBM, DAZ も含んでいないことも確認した. さらに, この欠失領域を含む酵母人工 Y 染色体ライブラリーから yOX21 を選択確定した. これを消化した 100k 塩基対 (base pair, bp) DNA 断片をプローブとしたゲノムサザンプロット法において両者間の DNA 鎖長に明かな差を認めたため, 新規 AZF 候補領域がこの 100kbp 断片内に存在することが明らかになった.

**Key words** azoospermia, Y chromosome, male infertility, sequence-tagged site

少子高齢化社会をむかえた現在, 不妊に関わる医療への期待は日増しに高まっており, 産婦人科領域では体外授精, 顕微授精や胚移植などが普及しつつある. 一方, 不妊症のもうひとつの大きな要因である男性に起因する不妊症の治療は遅々として進歩していないのが現状である. それは男性不妊症の原因の半分を占める特発性精子形成障害の病態が未だ不明である点に起因している.

従来, 精子形成に関わる遺伝子あるいは制御領域は, 無精子症患者に対する染色体分析によって Y 染色体上にあることが指摘されていた. さらに, 細胞遺伝学的手法による染色体構造の精密パターンの分析, および患者 DNA を直接用いた欠失地図の作製によって, その長腕上にあることも明らかになった<sup>1)2)</sup>. 1980 年代には Y 染色体長腕 (Y chromosome long arm, Yq) 上 11.23 に無精子症因子 (azoospermia factor, AZF) 遺伝子, すなわち精子形成関連遺伝子が存在するという基本概念が確立された<sup>3)~6)</sup>. これ以降分子生物学的アプローチが本格化し, 1992 年には Y 染色体におけるユークロマチン領域を網羅するヒト遺伝子の酵母人工染色体 (yeast artificial chromosome, YAC) ライブラリーが構築され<sup>7)~9)</sup>, 飛躍的な成果をみることになった.

AZF 候補遺伝子は, 1993 年 Ma ら<sup>10)</sup>による Y 染色体上の RNA 結合モチーフ (RNA binding motif, RBM) の発見より新たな展開をむかえたが, RBM は精子形成に関わる主責任遺伝子ではないことが最近明らかになってきている<sup>11)12)</sup>. さらに, 1995 年には無精子症欠失 (deleted in azoospermia, DAZ) が単一遺伝子と

して発表され<sup>13)</sup>, AZF 候補遺伝子のひとつと考えられている. 1996 年 Vogt ら<sup>14)</sup>は特発性無精子症, および高度乏精子症患者の微小欠失領域を分析したところ, Y 染色体長腕遠位部の 3 領域に集中していることを報告し, 無精子症が多遺伝子疾患であることを示唆した.

本研究では特発性無精子症, および高度乏精子症患者のゲノム DNA 分析を Y 染色体上の配列標識部位 (sequence-tagged site, STS) プライマーを用いて PCR 法にて行った. これら患者の一部に, 父子ともに同一部位を欠失している稀な家系を見だし, この両者の DNA 配列の差を検討することにより新たな AZF 候補領域を同定した.

## 対象および方法

## I. 対象症例

## 1. 対象症例の選択

不妊外来を受診した特発性無精子症, および高度乏精子症患者 151 例について, Y 染色体特異的 STS マーカー法により DNA 欠失の有無について検索を行った. STS マーカーのおよその位置を図 1 に示し, その結果を表 1 に示した. これらのうち 133 例は全く欠失がなかったが, DYS7C, および DYS1 に共通した欠失をもつ無精子症 12 例, 高度乏精子症患者 4 例 (精子数  $1 \times 10^3 \sim 7 \times 10^6$ /ml) を認めた. また, DYS1 が存在しているにもかかわらず, DYS7C を含む近位側数カ所の欠失をもつ無精子症 2 例を認めた. したがって, DYS7C の近傍に精子形成と関連

平成 10 年 11 月 27 日受付, 平成 11 年 3 月 12 日受理

Abbreviations : AZF, azoospermia factor; bp, base pair; DAZ, deleted in azoospermia; FSH, follicle stimulating hormone; LH, luteinizing hormone; RBM, RNA binding motif; SRY, sex determining region of the Y; STS, sequence-

する領域が存在すると考えられた。さらに、STS法により無精子症患者(表1の患者番号1~5)の父親に対して行ったDNA分析において、1例(患者番号1)を除く4例には全く欠失を認めなかった。なお、欠失を認めた患者1の父は子と同じDYS7CとDYS1のみを欠失していた。本研究ではこの稀な症例である患者1の父子DNA配列の差から精子形成と関連する新規AZF領域を決定しようとした。なお、マーカープライマーは短腕遠位側より、Y染色体偽常染色体部境界(pseudoautosomal region border on the Y, PABY)、性決定領域Y(sex determining region of the Y, SRY)、亜鉛フィンガータンパクY(zinc finger protein Y, ZFY)、DXYS5, DXYS73, DYF27B, DYF27C, DYS131B, DYS7A,

DYS7B, DYS130, アメロゲン様遺伝子(amelogenin like, AMGL), DYS7D, さらに長腕近位側より, DYS11, DYS140, DYS139, DYS133, DYS134, DYS132, DYS135, DYF27A, DYS131A, DYS7E, DYS7C, DYS1, DYZ1を用いた。

## 2. 特発性無精子症患者1の背景

患者1は35歳, 甲状腺, 副腎, および下垂体に検査上異常がなかった。精液検査は標準的な射出精液を検鏡し無精子症であることを確認し, 両側精管・精囊造影を行い精子輸送路に閉塞のないことを確認した。さらに, 両側精巣生検を行い, 試料をブアン液(氷酢酸5%, ホルマリン20%, ピクリン酸飽和液75%)にて固定, パラフィン包埋切片を作製しHEで染色した。その組織学的精子形成能はジョンセン指数(Johnsen's score count)<sup>10)</sup>によって評価した。末梢血培養による染色体分析(Gバンド法およびQバンド法)では, 異常所見を認めなかった。理学所見および黄体化ホルモン(luteinizing hormone, LH), 卵胞刺激ホルモン(follicle stimulating hormone, FSH), エストラジオール(estradiol), テストステロン(testosterone), プロラクチン(prolactin)などの内分泌値は表2に示した。患者1の父親から同意を得て末梢血からDNAを採取し, その分析も行った。対照として, Y染色体短腕(Y chromosome short arm, Yp)とYqのみを持つ患者, さらに正常男女のゲノムDNAも用いた。

## II. STSプライマーによるY染色体上における欠失の確認

Y染色体ゲノム上での欠失位置を決定するために特異的DNAマーカーとしてY染色体上のSTSを用いた。

### 1. ヒトゲノムDNAの抽出

末梢血よりリンパ球画分を調製しゲノムDNAを採取した。すなわち, 5mlのEDTA加末梢血をプラスチック遠心管に移し500 xgで5分間遠心分離して上層の血漿を除去した。血球画分に5倍容量の0.2%塩化ナトリウムを加えて遠心管を転倒混和し1,000 xgで5分間遠心分離した。遠心後管底に沈殿している白血球を吸い取らないように注意しながら上清を除去した。この操作を沈殿の色が白くなるまで繰り返しマイクロチューブに移した。核酸抽出剤SepaGene<sup>®</sup>(三光純薬, 東京)の操作法に従って核酸を抽出した後, 混在するRNAを分解除去するために核酸ペレットを100  $\mu$ lの20 mg/ml RNase 溶液 |リボヌクレアーゼA (Sigma, St. Louis, USA) をTE [10mM Tris-塩酸 (pH 7.4)-0.1 mM EDTA]に溶解し37°Cで30分静置した後, エタノール沈殿を行った。

### 2. Y染色体特異 STS プライマーセットの選択

Vollrathら<sup>8)</sup>はY染色体上のSTSを報告している。本研究の主な分析領域はヒト染色体Qバンド法におけるY染色体バンドパターンYq11.23にある遺伝子座(loci)であり, 表1に示したDYS7C付近を中心に選択した。これらのプライマーは20塩基前後の合成オリゴヌクレオチドプライマー(北海道システムサイエンス, 札幌)セットであり, このPCRによる産物は数100塩基対(base pair, bp)程度の鎖長である。

本研究で用いたマーカープライマーは短腕側においてSRY, ZFYおよびセントロメアマーカーを用いた。長腕側は表1で示した欠失を認めるDYS7C, DYS1付近のものを選び, その位置はセントロメア近位側より順にDYS230, DYS224,

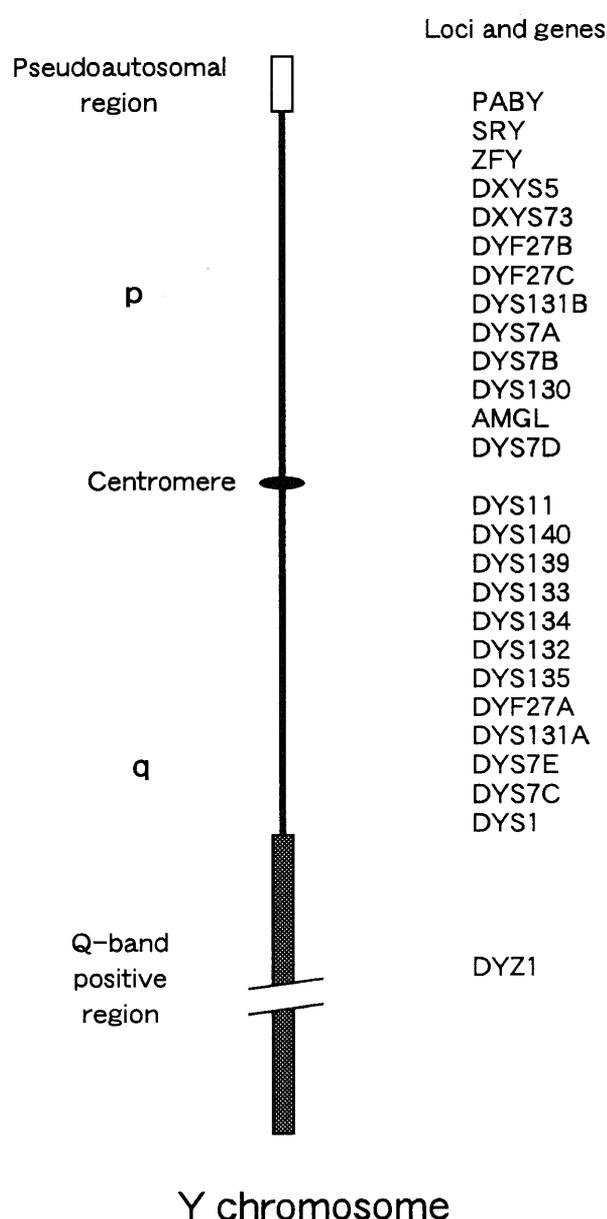


Fig. 1. Position of 26 loci across Y chromosome. Short arm (p), centromere and long arm (q) are shown.

tagged site; YAC, yeast artificial chromosome; Yp, Y chromosome short arm; Yq, Y chromosome long arm; ZFY, zinc finger protein Y; コンティグ, 整列クローン

DYS226, 42C-A, DYS7C, DYS233, DYS232, DYS1, DYS236, DYS237, DYS238, DYS240, DYS239, DYS247 などであり, またヘテロクロマチン (heterochromatin)部のDYZ1も選択した<sup>9)</sup>. これらマーカープライマーのY染色体上での位置の概略を図2に示した. また, 表3には座, STSマーカー, プライマーの左右塩基配列, その産物の鎖長, およびPCR設定条件を示した.

### 3. PCR法によるSTSの同定

各々のゲノムDNA10 ngを取りPCR緩衝液 [終濃度10 mM Tris-塩酸(pH 8.3), 50 mM 塩化カリウム, 1.5 mM 塩化マグネシウム], デオキシリボスクレオチド混合液 (dATP, dCTP, dGTP, dTTP 各々終濃度250  $\mu$ M), 左右プライマー各々50 pmol, Taq DNAポリメラーゼ(Parkin Elmer Cetus, Norwalk, USA) 1単位および滅菌蒸留水を加え全量30  $\mu$ lにしたPCR反応液を調製

し, サーマルサイクラーPC7000 (アステック, 福岡)を用いてPCR反応を行った. 条件設定プロトコールは文献8に従い, 表3註に示す3条件にて施行した. 分子量マーカーは, 100 bp ラダー (Promega, Madison, USA)を用いた.

### 4. 増幅DNA断片の検出

PCR反応後のDNA溶液に滅菌蒸留水70  $\mu$ lとクロロホルム150  $\mu$ lを加えて振とうした後, 上層の水層を採取した. この溶液に10  $\mu$ lの3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2)と99%エタノールを300  $\mu$ l添加し,  $-80^{\circ}\text{C}$ で30分間放置した後,  $4^{\circ}\text{C}$ , 15,000xgで20分間遠心しDNAを沈殿させた. このDNAを80%エタノールで洗浄後, 減圧乾燥し, 試料溶解液[(0.06%プロモフェノールブルー (半井, 京都), 0.06%キシレンシアンオール (半井), 6.7%グリセロールを含むTris-EDTA緩衝液 [10 mM Tris-塩酸,

Table 1. Summary of DNA analysis on the Y chromosome in 151 patients with azoospermia and severe oligozoospermia

Loci	Controls		Patients																			
	Male	Female	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13*	14*	15*	16*	17	18	Other 133 patients	
PABY	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
SRY	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
ZFY	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
DXYS5	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
DXYS73	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
DYF27B	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
DYF27C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
DYS131B	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
DYS7A	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
DYS7B	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
DYS130	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
AMGL	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
DYS7D	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
DYS11	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
DYS140	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
DYS139	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
DYS133	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
DYS134	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
DYS132	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
DYS135	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
DYF27A	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
DYS131A	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
DYS7E	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
DYS7C	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
DYS1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
DYZ1	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

-, absence; +, presence. \* severe oligozoospermia.

Table 2. Summary of clinical findings of the patient 1

Age	Height (cm)	Body Wt. (kg)	Testis volume (ml)		Luteinizing hormone (mIU/ml)	Follicle stimulating hormone (mIU/ml)	Estradiol (pg/ml)	Testosterone (ng/dl)	Prolactin (ng/ml)	Johnsen's score count	
			Right	Left						Right	Left
35	175	72	12	12	4.7	15.7	<25	510	6.7	3~4	3~4

Table 3. Loci, STSs, nucleotic sequences of primers, products sizes and thermocycling conditions

Loci and genes	STSs	Left primer	Right primer	Product sizes (bp)	PCR thermocycling conditions
SRY	sT14	GAATATTCCTCCGCTCTCCGGA	GCTGGTGCTCCATTCTTGAG	472	b)
ZFY	sT238	AACAAGTGAGTTCACAGGG	GCAAAGCAGCATTCAAAAACA	350	b)
Centromere	sY78	TCCTTTTCCACAATAGACGTCA	GGAAGTATCTCCCTTAAAAGCTATG	170	b)
DYS230	sY142	AGCTTCTATTCCGAGGGCTTC	CTCTCTGCAATCCCTGACAT	196	a)
DYS224	sY134	GTCTGCCTCACCATAAAAACG	ACCACTGCCAAAACCTTCAA	301	a)
DYS226	sY136	CACATGAAGCACTGGAAGCTG	GTTGTCTGAAAATCCCTGTG	235	a)
42C-A		AGTAGCTGGGACTACAAGCA	GATTCTGGGCTTATCTTGCA	1500	c)
DYS7C	50f2C	CTCAAGCTAGGACAAAAGGGAAAGG	GAGGTAGATGCTGAAGCGGTATAG	195	a)
DYS233	sY148	AAATGAAAAAAGATACGAAACTCG	GAATCCCACCAAGAATCTG	202	a)
DYS232	sY147	TTTCTCGTTTGATGATCCTAG	TTAATATGAGAATGAGAACAGATGT	100	a)
DYS1	sY149f	TGTCACACTGCCCTAATCCT	TGGTCATGACAAAAGACGAA	132	a)
DYS236	sY152	AAGACAGTCTGCCATGTTTCA	ACAGGAGGGTACTTAGCAGT	125	a)
DYS237	sY153	GCATCCTCATTTTATGTCCA	CAACCCAAAAGCACTGAGTA	139	a)
DYS238	sY154	TTTGCACCAGGATTAAGTGA	TTTTTTTCAGATAAACTTTCAGTGG	245	a)
DYS240	sY157	CTTAGGAAAAAGTGAAGCCG	CCTGCTGTGAGCAAGATACA	285	a)
DYS239	sY156s	AGGAAGCTGGCAGGATTAGCC	ATGTCAGGGTTTCCTTTGCC	950	b)
DYS247	sY166	GAACTCCAATCATCCCTGA	TTGGCTCTACTTTTCCCCTT	115	a)
DYZ1	sY160	TACGGGTCTCGAATGGAATA	TCATTGCATTCTTTCCATT	236	b)

PCR thermocycling conditions are as follows.

- a) Initial denaturation of 3 min at 94°C; 25 cycles of 1 min at 95°C, 4 min at 65°C; and, finally, 12 min at 72°C.
- b) Initial denaturation of 3 min at 94°C; 26 cycles of 0.5 min at 94°C, 1 min at 55°C, 1 min at 72°C; and, finally, 5 min at 72°C.
- c) Initial denaturation of 3 min at 95°C; 30 cycles of 0.5 min at 94°C, 1 min at 50°C, 1 min at 72°C; and, finally, 5 min at 72°C.

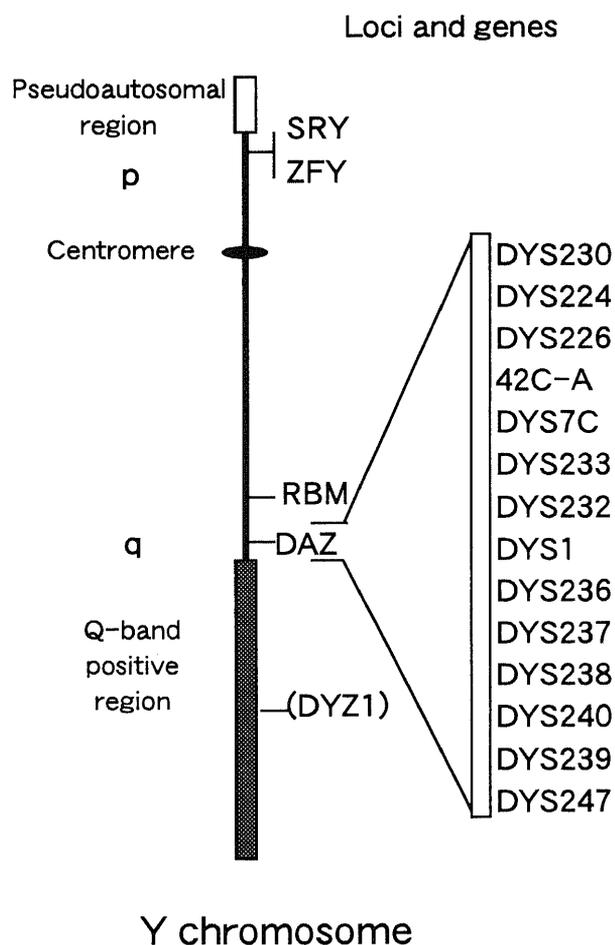


Fig. 2. Position of 18 loci on Y chromosome. On the right side of the chromosome, the probes (loci) examined in our study are shown. Short arm (p) and long arm (q) are shown.

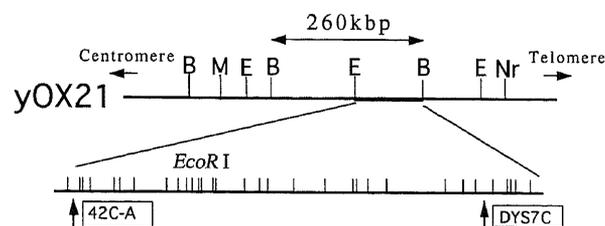


Fig. 3. Position and restriction map of the *BssH* II-*Eag* I fragment from YAC yOX21. YAC yOX21 spans the microdeletion region. B, *BssH* II; M, *Mlu* I; E, *Eag* I; Nr, *Nru* I.

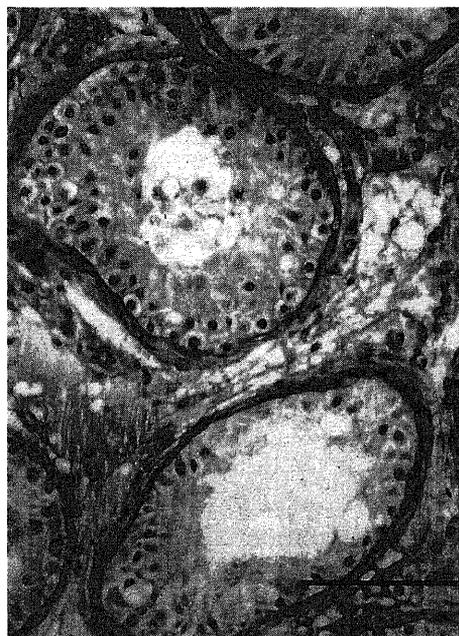


Fig. 4. Photograph of testis histology in a patient 1 with azoospermia. A few spermatogonia and spermatocytes are observed in the testis tubules. No postmeiotic germ cell stages are observed. The bar indicates 50 μm in length.

1 mM EDTA (pH 8.0)] 9  $\mu$ lに溶解した。各試料は0.5  $\mu$ g/mlの臭化エチジウムを含む泳動緩衝液 TBE (90 mM Tris-塩酸, 90 mM ホウ酸, 2 mM EDTA) 中で, 2% アガロースゲルを用いて定電圧100 Vにて電気泳動を行った。泳動後のゲルは紫外線照射下に写真撮影した。

### Ⅲ. 既知AZF候補遺伝子の確認

患者1および父親について, 既知AZF候補遺伝子であるRBM<sup>10)</sup> および DAZ<sup>13)</sup> の有無をPCR法にて確認した。RBMプライマーは各々, 5'-CTTTGAAAACAATTCCTTTTCC-3', 5'-TGCACTTCAGAGAGTACGG-3'であり, その産生サイズは約800bpである。PCR条件は94℃ 2分の熱変性後, 94℃ 30秒, 55℃ 1分, 72℃ 1分を30サイクル施行した。DAZプライマーは各々5'-CAGTGATACACTCGGACTTGTTGTA-3', 5'-GTTATTGAAAAGCTACACGGG-3'であり増幅サイズは375bpである。PCR条件は94℃ 1分の熱変性後, 94℃ 1分, 55℃ 30秒, 72℃ 30秒を30サイクル施行した。また, 上記プライマー

で増幅されるRBMはDYS230より近位側にあり, DAZはDYS7Cより遠位側で, DYS239とDYS247の間にある<sup>11)</sup>(図2)。

### Ⅳ. YAC DNAの選択とサザンプロット法を用いた解析

#### 1. YACライブラリーとその整列クローン(コンティグ)地図

Footeら<sup>9)</sup>はヒト男性のXYYYYゲノムDNAをYACにクローン化し, 約98%以上のユークロマチン領域をカバーするライブラリーを構築した。このうち214個のY染色体特異YACを分離し(平均サイズは580 kbp), 196個がコンティグとしてY染色体ユークロマチン上をカバーした。これらは「yOX番号」をつけられて96ウェル マイクロタイター プレートに分配して供給されており (Research Genetics, Huntsville, USA), 本邦ではコスモバイオ社 (東京) から購入することができる。

#### 2. YACコンティグからプローブDNAの選択

共同研究している徳島大学医学部公衆衛生学講座の黒木, 中堀らは, Y染色体YACコンティグより, Yq上の11.23の一部を含むYAC yOX21を選択した。彼らは, まずSTSマーカー 42C-

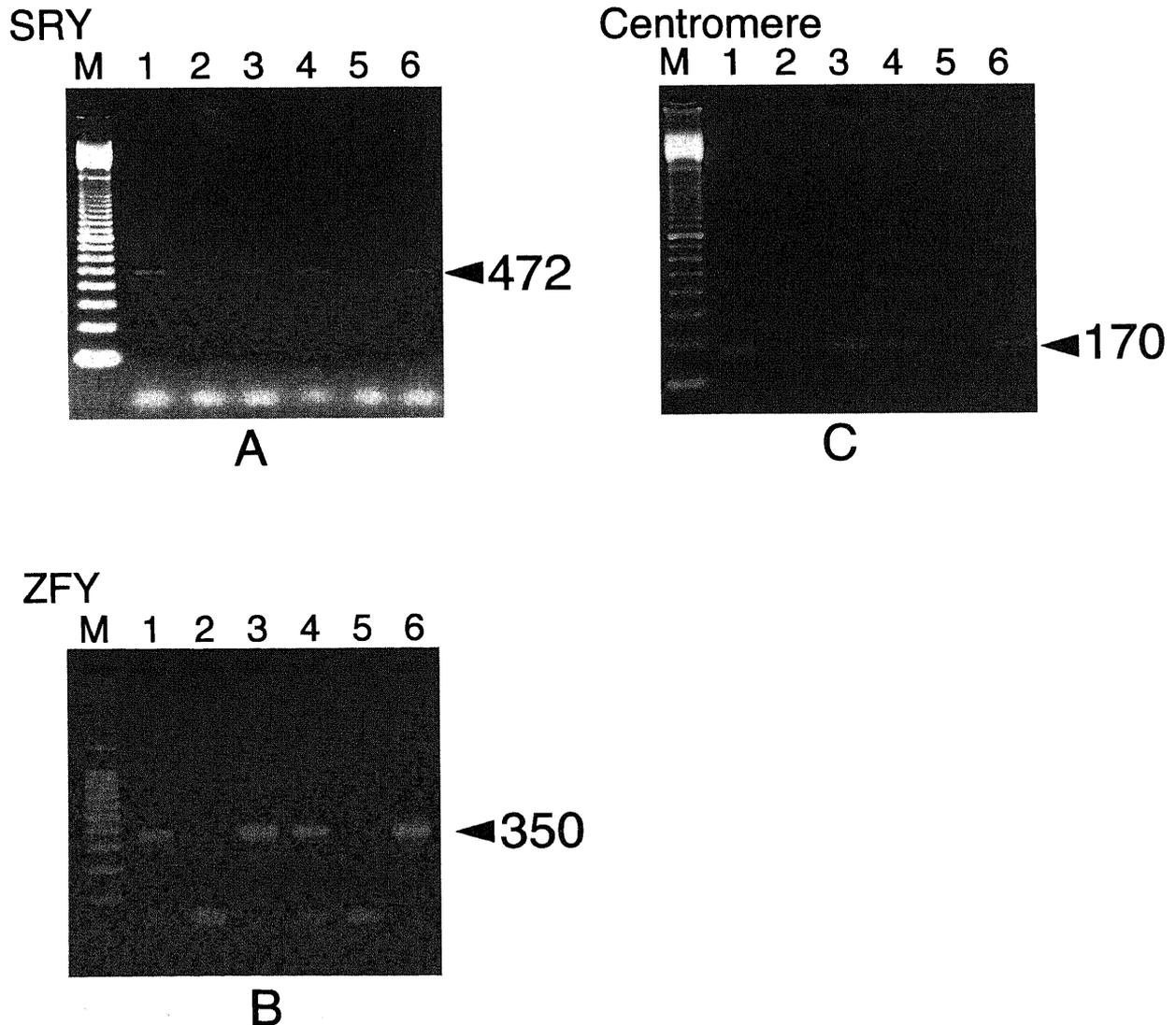


Fig. 5. PCR analysis of various loci. (A) SRY (B) ZFY (C) centromere. The DNAs are from the Yp patient (lane 1), Yq patient (lane 2), the patient 1 (lane 3), his father (lane 4), a normal female (lane 5) and a normal male (lane 6). The expected sizes (base pair) of the products are indicated at the right with arrow heads. The molecular weight marker (M) shows the 100 base pair DNA ladder.

AおよびDYS7Cを含む*BssH* II (Toyobo, 大阪) の消化断片260kbpを取り, その断片をさらに*Eag* I (Toyobo)で消化して鎖長約100kbpの*BssH* II - *Eag* I断片を選択した(図3). 著者はこの断片の供与を受け本研究に用いた. この*BssH* II - *Eag* I DNA断片に42C-AおよびDYS7Cが含まれていることを確認するために, 鋳型としてこれを10ngを取り, 表3の42C-AおよびDYS7Cのプライマーを用いてPCRを行なった. なお, その条件は94℃1分の熱変性後, 94℃1分, 55℃30秒, 72℃30秒を30サイクル施行した.

### 3. ゲノムサザンプロット法による分析

正常男女, 患者1, およびその父親のゲノムDNA 10 μgを*Pst* I (Toyobo)および*Hind* III (Toyobo)を用いて一晩十分消化させたのち, 0.6% アガロースゲルにて電気泳動した. ゲルを0.5 M 塩酸溶液中で20分間振とうして長鎖長DNAを断片化した後, 蒸留水で洗浄した. 次にアルカリ液(1.5 M 塩化ナトリウム, 0.5 M 水酸化ナトリウム)に浸し1時間軽く振とうして変

性させた. 続けて中和液[3 M 塩化ナトリウム, 0.5 M Tris-塩酸(pH 7.5)]に浸し, さらに1時間振とうした. 一晩, ナイロンメンブレンフィルター Hybond-N+® (Amersham, Little Chalfont, UK)に転写した後, DNAを固着させるために3200 Jの紫外線を照射した. フィルターはハイブリダイゼーション緩衝液[6×SSC (1×SSC: 0.15 M 塩化ナトリウム, 0.015 M クエン酸ナトリウム), デンハルト液 (0.1% ポリビニルピロリドン, 0.1% ウシ血清アルブミン, 0.1% フィコール400), 10% 硫酸デキストラン, 0.1% SDS, 0.1 mg/ml サケ精子DNA (Sigma)]中で, 42℃の恒温水槽において3時間のプレハイブリダイゼーションを行った. そこへ DNA labeling beads® (Pharmacia, Uppsala, Sweden)を用いて各々<sup>32</sup>Pで標識したプローブDNAを加え42℃において16時間のハイブリダイゼーションを行なった. フィルターは2×SSC, および0.1% SDSを含む溶液中で45℃, 15分の洗浄を2回行なった後, 0.1×SSCおよび0.1% SDSを含む溶液中で45℃, 1時間の洗浄を行った. 洗浄後, -80℃でX線

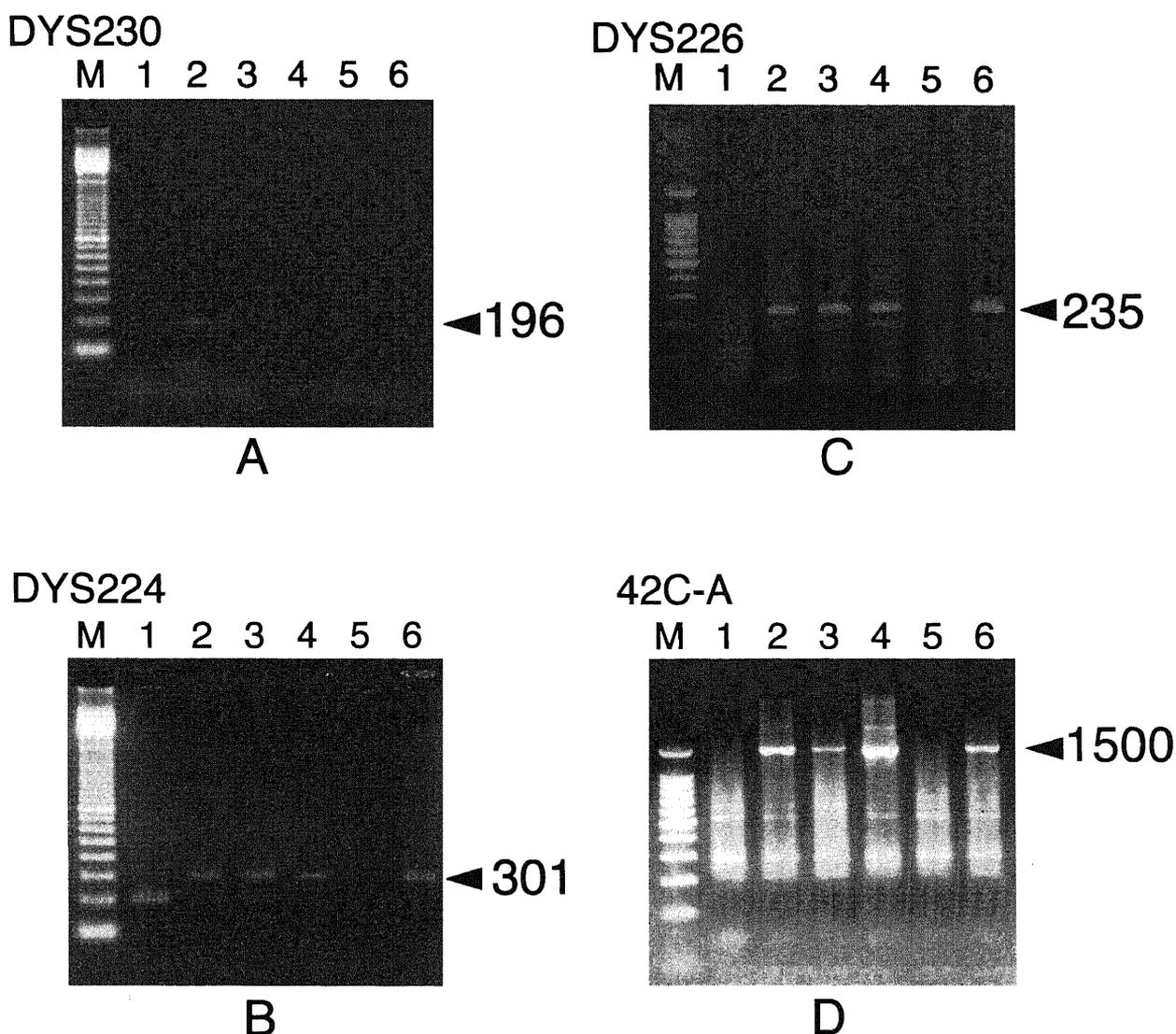


Fig. 6. PCR analysis of various loci. (A) DYS230 (B) DYS224 (C) DYS226 (D) 42C-A. The DNAs are from the Yp patient (lane 1), Yq patient (lane 2), the patient 1 (lane 3), his father (lane 4), a normal female (lane 5) and a normal male (lane 6). The expected sizes (base pair) of the products are indicated at the right with arrow heads. The molecular weight marker (M) shows the 100 base pair DNA ladder.

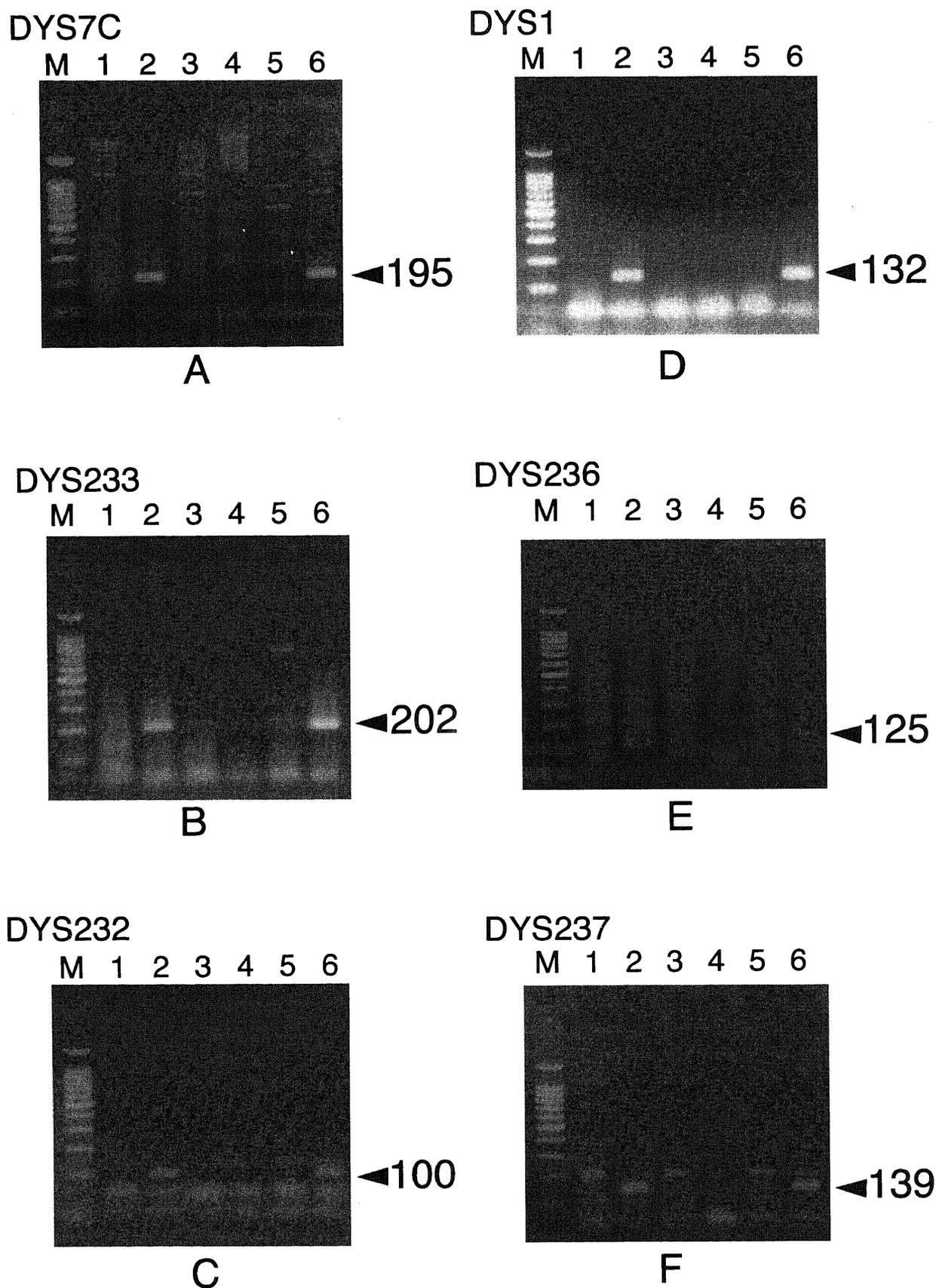


Fig. 7. PCR analysis of various loci. (A) DYS7C (B) DYS233 (C) DYS232 (D) DYS1 (E) DYS236 (F) DYS237. The DNAs are from the Yp patient (lane 1), Yq patient (lane 2), the patient 1 (lane 3), his father (lane 4), a normal female (lane 5) and a normal male (lane 6). The expected sizes (base pair) of the products are indicated at the right with arrow heads. The molecular weight marker (M) shows the 100 base pair DNA ladder.

フィルム (Kodak, New York, USA) へ12-18時間露光させた。

### 成 績

#### I. 患者1の精巢生検像、および内分泌学的検査

患者1の精巢生検像では、精細管基底膜の肥厚、間質における細胞増殖を認め、精細管内におけるセルトリ細胞の増生を認めた。また、精細胞系においてはわずかな精祖細胞、および精母細胞を認めるものの精子細胞および精子を認めず減数分裂前の分化停止像と考えられた (図4)。内分泌学的にはFSHの軽度上昇を認めたが、これは精子形成障害によるフィードバック性の上昇と考えられた。なお、LHおよびテストステロン値は正常範囲内であった。

#### II. STS プライマーによるY染色体上における欠失の確認

ゲノムDNAは、対照としてYp、およびYqのみをそれぞれ持つ患者のもの、さらに正常男女のものを用いた。試料として患者1およびその父親のものを用いた。

#### 1. Y染色体の短腕上、およびセントロメアにおける遺伝子座、および遺伝子の存在の確認

短腕側にあるSRY, ZFY遺伝子、およびセントロメアのマーカープライマーを加えYp患者、患者1、その父、正常男性それぞれにPCRバンドを認めた (図5A, B, C)。しかし、Yq患者および正常女性には、これらのバンドは検出されなかった。

#### 2. Y染色体の長腕上における座の存在の確認

セントロメア近位側から座DYS230, DYS224, DYS226, 42C-A (図6A, B, C, D) に対して行ったPCRにおいてYq患者、患者1、その父親、正常男性それぞれにPCRバンドを認めた。しかし、Yp患者、および正常女性にはこれらのバンドは検出されなかった。DYS7C, DYS233, DYS232, DYS1, DYS236, DYS237, (図7A, B, C, D, E, F), さらにDYS238, DYS240, DYS239 (図8A, B, C) をプローブとして用いると、Yq患者と、正常男性にのみバンドを認めた。しかし、患者1、その父親、Yp患者、および正常女性にはこれらのバンドは検出されなかった。さらに長腕遠

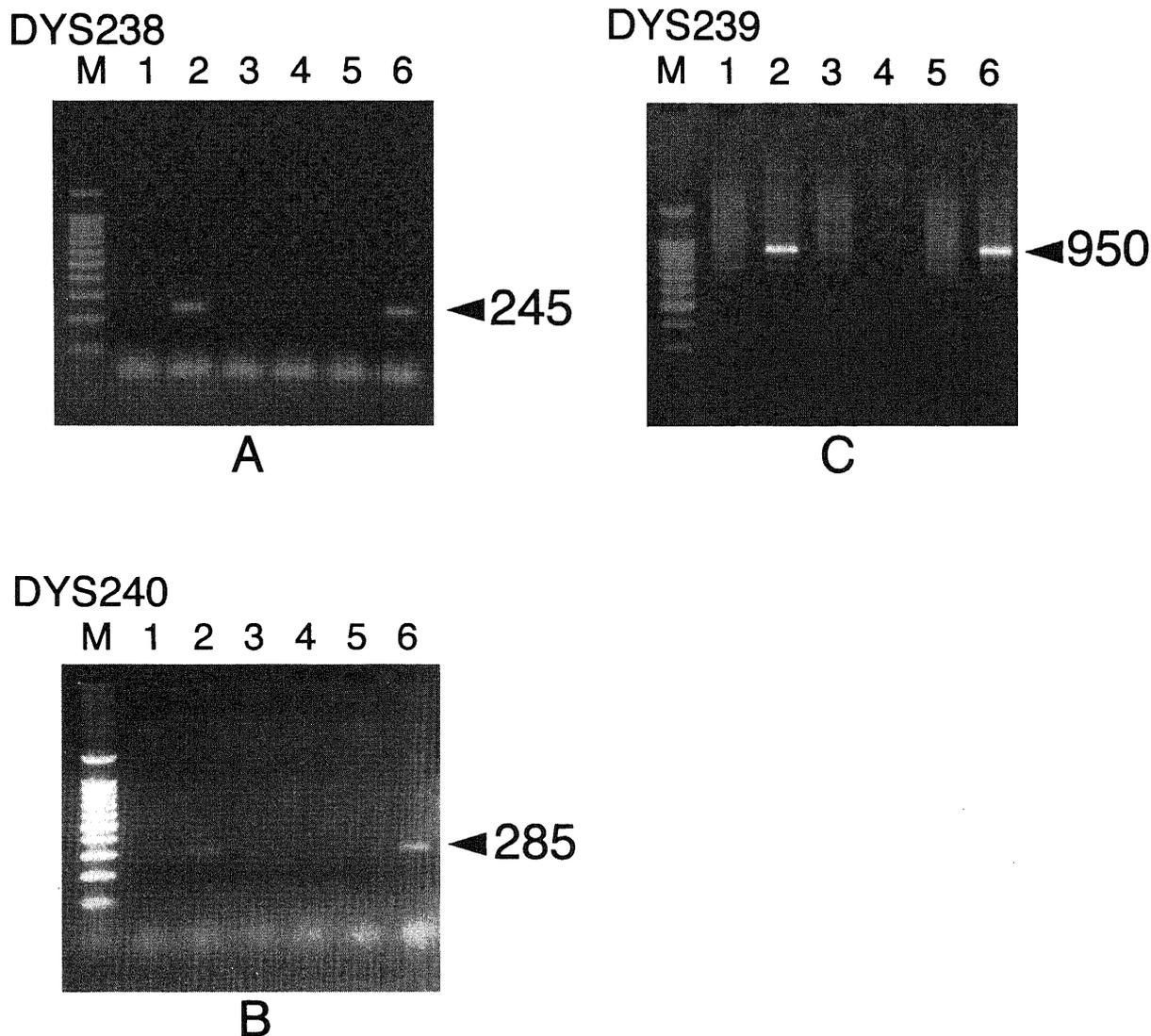


Fig. 8. PCR analysis of various loci. (A) DYS238 (B) DYS240 (C) DYS239. The DNAs are from the Yp patient (lane 1), Yq patient (lane 2), the patient 1 (lane 3), his father (lane 4), a normal female (lane 5) and a normal male (lane 6). The expected sizes (base pair) of the products are indicated at the right with arrow heads. The molecular weight marker (M) shows the 100 base pair DNA ladder.

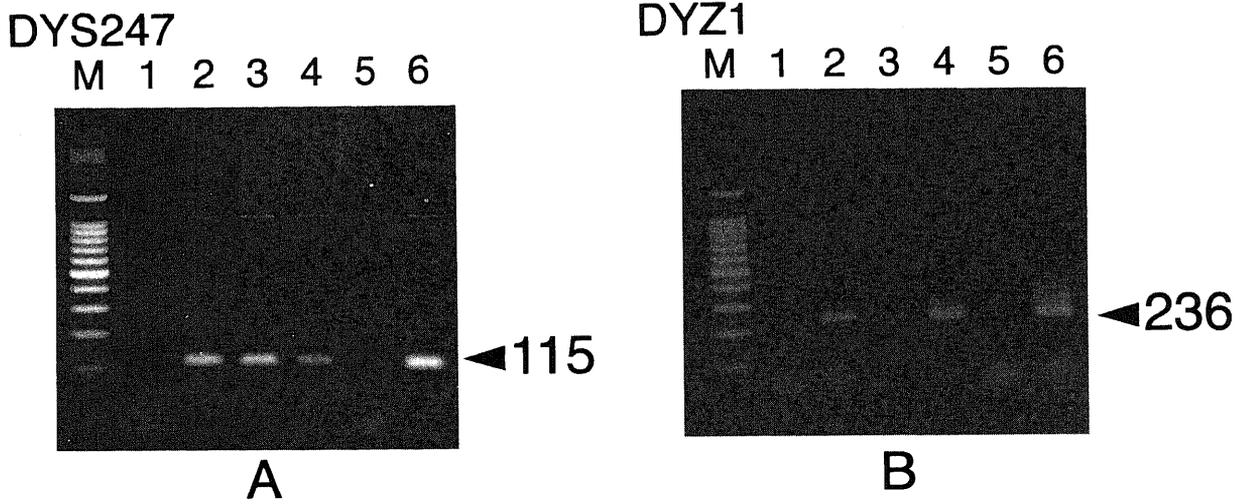
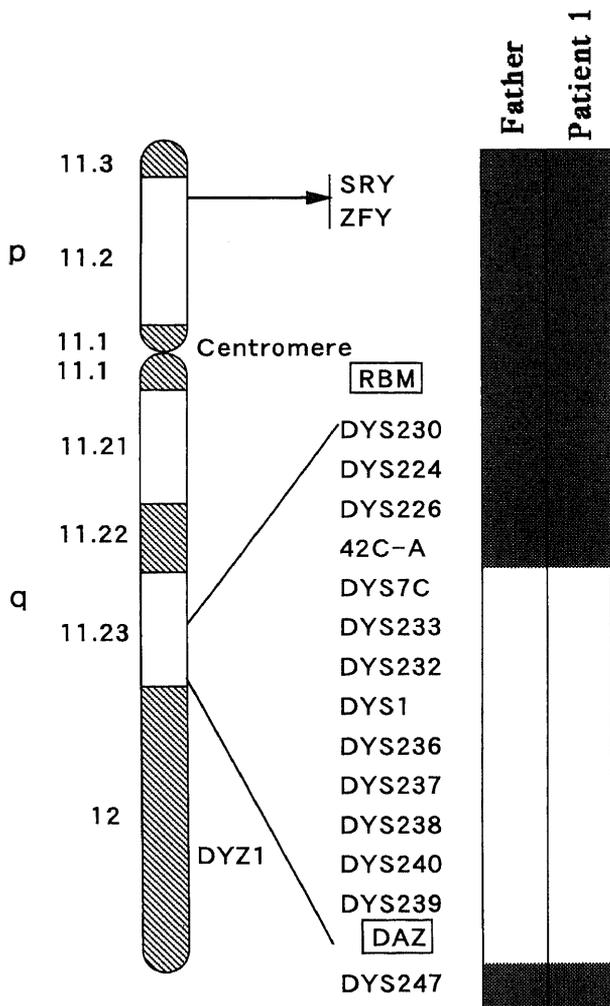


Fig. 9. PCR analysis of various loci. (A) DYS247 (B) DYZ1. The DNAs are from the Yp patient (lane 1), Yq patient (lane 2), the patient 1 (lane 3), his father (lane 4), a normal female (lane 5) and a normal male (lane 6). The expected sizes (base pair) of the products are indicated at the right with arrow heads. The molecular weight marker (M) shows the 100 base pair DNA ladder.



Y chromosome

Fig. 10. Summary of analysis of the DNA of the patient 1 and his father. Closed bars indicate the presence of loci, while open bars indicate the absence. Hatched regions indicate the region of heterochromatin. Short arm (p) and long arm (q) are shown.

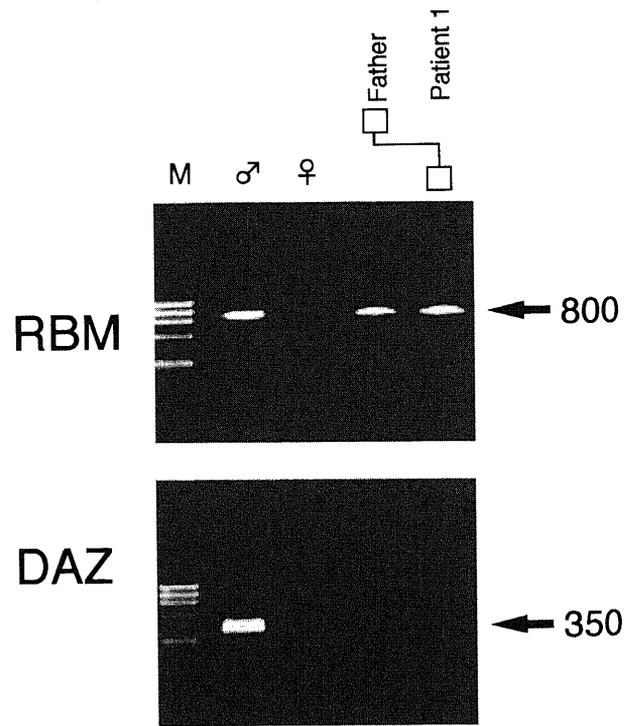


Fig. 11. PCR analysis of patient 1 and his father using RBM or DAZ primer. The DNAs are from a normal male (lane 1), a normal female (lane 2), his father (lane 3) and the patient 1 (lane 4). The expected sizes (base pair) of the products are indicated at the right with arrow heads. The molecular weight marker (M) shows the  $\phi$  X174 dsDNA *Hae* III digests.

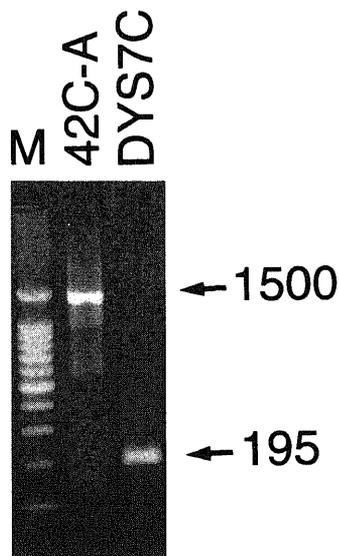


Fig. 12. PCR analysis of the *Bss*H II-*Eag* I fragment using 42C-A and DYS7C primers. The expected sizes (base pair) of the products are indicated at the right with arrow heads. The molecular weight marker (M) shows the 100 base pair DNA ladder.

位側にあるプライマー DYS247 とヘテロクロマチン部にある DYS1 を用いると、Yq 患者、患者 1、その父親、正常男性ともにバンドを認めた(図 9A, B)。なお、予想される鎖長は表 3 に示した。

### 3. 共通欠失領域の存在

患者 1 と妊孕性をもつ父親の Y 染色体核型分析において明らかな異常を認めないにもかかわらず、STS による分析において 42C-A から DYS247 の範囲に微小欠失領域を確認し(図 10)、これまで調べた限りでは他の領域には欠失は認めなかった。なお、この領域を欠失している無精子症患者、および高度乏精子症患者は、表 1 に示した通り 16 例を確認しており、この共通欠失領域をわれわれは精子形成と関連する領域と考えている。

### 4. 既知 AZF 候補遺伝子 RBM および DAZ の確認

RBM は図 10 において DYS230 よりセントロメア側、すなわち近位側にあり、DAZ は DYS7C より遠位側にある。PCR 法により RBM、および DAZ の有無を患者 1 および父親について調べた。RBM は父子ともに存在していたが、DAZ は両者とも存在しなかった(図 11)。

### 5. 新規 AZF 領域は共通欠失領域の近位側に存在する

ゲノム DNA は折り畳まれた構造を取っているが、基本的には一本の線状を呈している。したがって、STS 上患者 1 とその父親の DNA 間に共通の欠失が存在するにもかかわらず、その一方が精子形成能をもつことから、欠失部の両端のどちらかに僅かな差が存在していると考えられる。一方、表 1 において患者 17、18 は DYS1 の遠位側が存在しているにもかかわらず無精子症である。もし、これら 18 例の患者が同じ位置に欠失を持つと仮定するならば、共通欠失部の近位側、すなわち 42C-A と DYS7C の間に新規 AZF 領域が存在する可能性が高い。

### Ⅲ. サザンプロット法による解析

DYS7C、および 42C-A をプライマーとした PCR 法によって、

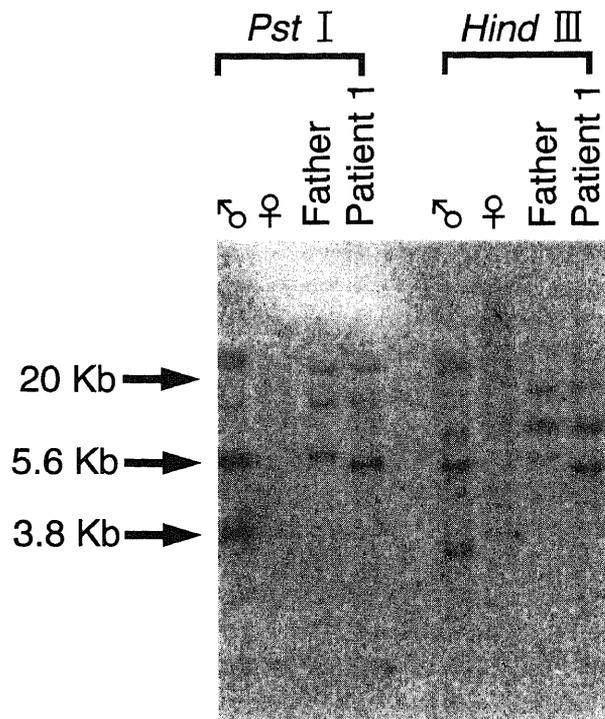


Fig. 13. Southern blot analysis of the the patient 1, his father, a normal male and a normal female. The molecular weights are shown the left side of panel.

*Bss*H II-*Eag* I 断片が共通欠失領域の近位端を網羅していることを確認した(図 12)。次に、正常男女、患者 1、およびその父親のゲノム DNA を *Pst* I、および *Hind* III で消化した後サザンプロット法にて分析した。この両者とも 5.6kbp 付近において患者 1、およびその父親間にバンドの大きさに差があり、しかも正常男性とも明かな違いがあった(図 13)。さらに、正常男性で認められる 20kbp より大きいバンドの一部がこの父子で欠失している事より、この部には父子で共通に欠失している領域が存在することも明らかにした。以上より、新規 AZF 領域は YAC yOX21 上の *Bss* II-*Eag* I 消化物の約 100kbp 断片のなかに存在している可能性が示された。

### 考 察

Y 染色体はヒトゲノムのおよそ 2% の 50 Mbp の DNA より構成されている。細胞遺伝学的にみると形態的に単純な構造をしており、これといった特徴がなく、大きな Q 蛍光陽性部を長腕にもっているのみである<sup>16)17)</sup>。したがって、直接 DNA を用いた様々な分析が必要とされる。また、ヒトの性染色体 X と比較すると形や大きさがかなり異なり、さらに常染色体の減数分裂時における対合は全長にわたって行われるのに対し、X 染色体、および Y 染色体では偽常染色体領域と呼ばれている部分だけで対合、交叉を起こし DNA の組換えが起こる。男性は母親から X 染色体を、父親から Y 染色体を受け継ぐことから、ヒトの Y 染色体は父から息子へと男性のみに継承される。特に女性は性染色体が XX であり、Y 染色体なしで生きていくことにならざる支障がないことから、Y 染色体は男性を決定する以外に特に重要な意味を持たないと考えられている。現在 Y 染色体上にお

る遺伝子やその候補は、SRY 遺伝子などの性分化に関わる遺伝子、体を大きくする遺伝子、精子形成に関連する遺伝子 RBM, DAZ などを含めて約 20 報告されているのみである<sup>17)</sup>。既知の AZF 候補遺伝子である RBM, DAZ は RNA 結合ドメインを持つことや、塩基配列内に完全な繰り返し配列が存在し、精巢のみで発現するなどの共通した特徴をもっている。

AZF が無精子症の原因遺伝子として Y 染色体上長腕遠位側に位置することは、多数の無精子症患者の欠失地図やリンケージ地図より予想されていた<sup>18)~20)</sup>。また、患者 DNA を中心とした分子生物学的研究において、染色体の形態上異常のない、いわゆる微小欠失症例が多く報告されるようになった<sup>21)~26)</sup>。1996 年 Vogt ら<sup>14)</sup>は精子形成遺伝子もしくは関連領域を 3 領域に分け、近位部から AZFa, AZFb, AZFc 領域に分類した。これらに対する精巢組織像における表現型は AZFa 領域では思春期前の精子分化停止像であり、AZFb 領域においては減数分裂以降の精細胞成熟障害が前面に表われるが、AZFc 領域に対してはその特徴的な表現型を認めないとしている。

本研究では、STS 法において Y 染色体ユークロマチン部遠位端に対する微小欠失を確認することができた。これは Vogt らのいう AZFc 領域にあたり、その精巢組織像は減数分裂前の分化障害と考えられた。

AZF 候補遺伝子の解明は、RBM がその端緒となったが、これは約 20~50 の遺伝子や偽遺伝子が Y 染色体上の長、短腕に広く分布しており<sup>11)</sup>、その多くは AZFb 領域を中心に存在している。一方、DAZ は AZFc 領域において同定された単一遺伝子であり、この両者とも精巢において特異的に発現しており、RNA 結合ドメインを持つ。本研究で推測した新規 AZF 候補領域は最遠位側 RBM より、さらに遠位側にあり、DYS7C をマーカーにするとその近位側にある。DAZ は DHS7C より遠位側に存在することから、われわれの新規 AZF 候補領域は RBM, DAZ とは異なる新規領域と考えられる。さらに、本患者と妊孕性を有する父親の共通欠失部をプローブとしたサザンブロット法において欠失領域の鎖長に明確な差を見いだしたことから、精子形成に関与する領域はこの部分に存在する可能性がある。すなわち、42C-A と DHS7C の間にあり、約 100 kbp 程度の範囲に限定できる。したがって、このゲノム配列領域に精子形成に関与する新規 AZF が存在する可能性がある。今後、この部の領域におけるエクソントラッピングを中心とした遺伝子の検索や直接 DNA 配列の決定によって新規 AZF 領域の探索を行う予定である。

## 結 論

特発性無精子症・高度乏精子症患者およびその父親のゲノム DNA を用いて、次のような結論を得た。

1. 特発性無精子症・高度乏精子症患者 151 例の STS 法によるゲノム DNA 分析において 18 例の Yq 遠位側に微小欠失領域を認めた。
2. 無精子症患者とその父親のゲノム DNA 分析において、STS 上、父親にも共通微小欠失をもつ稀な家系を発見し、この部をプローブとしたサザンブロット法によりこの両者の鎖長に明らかな差を認めた。
3. 新規 AZF 候補領域は既知の精子形成候補遺伝子 RBM および DAZ とは異なる領域であった。
4. 以上の結果より新規 AZF 候補領域は、42C-A と DHS7C

の間にあり、その鎖長は約 100 kbp と考えられた。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導と本論の後校閲を賜りました金沢大学医学部泌尿器科学講座の並木幹夫教授に深甚なる謝意を表します。また、終始直接のご指導を賜りました同講座の高柴哲助手に心から感謝いたします。さらに、本研究にあたり様々な支援とご助言を頂きました徳島大学公衆衛生学講座の中堀豊教授と黒木陽子修士に心より感謝致します。またご助言とご協力を頂きました金沢大学医学部泌尿器科学講座の皆様にも感謝いたします。

## 文 献

- 1) Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 34: 119-124, 1976
- 2) Yunis E, Garcia-Conti FL, de Caballero OMT, Giraldo A. Yq deletion, aspermia and short stature. *Hum Genet* 39: 117-122, 1977
- 3) Chandley AC, Ambros P, McBeath S, Hargreave TB, Kilanowski F, Sporwart G. Short arm dicentric Y chromosome with associated statural defects in a sterile man. *Hum Genet* 73: 350-353, 1986
- 4) Vergnaud G, Page DC, Simmler MC, Brown L, Rouyer F, Noel B, Botstein D, de la Chapelle A, Weissenbach J. A deletion map of the human Y chromosome based on DNA hybridization. *Am J Hum Genet* 38: 109-124, 1986
- 5) Andersson M, Page DC, Pettay D, Subrt I, Turleau C, de Grouchy J, de la Chapelle A. Y; autosome translocations and mosaicism in the aetiology of 45, X maleness: assignment of fertility factor to distal Yq11. *Hum Genet* 79: 2-7, 1988
- 6) Bardini B, Zuffardi O, Guioli S, Ballabio A, Simi P, Cavalli P, Grimoldi MG, Fraccare M, Camerino G. A deletion map of the human Yq11 region: implications for the evolution of the Y chromosome and tentative mapping of a locus involved in spermatogenesis. *Genomics* 11: 443-451, 1991
- 7) Albertsen HM, Abderrahim H, Cann HM, Dausset J, le Paslier D, Cohen D. Construction and characterization of a yeast artificial chromosome library containing seven haploid human genome equivalents. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 4256-4260, 1990
- 8) Vollrath D, Foote S, Hilton A, Brown LG, Beer-Romero P, Bogan JS, Page DC. The human Y chromosome: a 43-interval map on naturally occurring deletions. *Science* 258: 52-59, 1992
- 9) Foote S, Vollrath D, Hilton A, Page DC. The human Y chromosome: overlapping DNA clones spanning the euchromatic region. *Science* 258: 60-66, 1992
- 10) Ma K, Inglis JD, Sharkey A, Bickmore WA, Hill RE, Prosser EJ, Speed RM, Thomson EJ, Jobling M, Taylor K, Wolfe J, Cooke HJ, Hargreave TB, Chandley AC. A Y chromosome gene family with RNA-binding protein homology: candidates for the azoospermia factor AZF controlling human spermatogenesis. *Cell* 75: 1287-1295, 1993
- 11) Reijo R, Alagappan RK, Patrizio P, Page DC. Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. *Lancet* 347: 1290-1291, 1996
- 12) Nakahori Y, Kuroki Y, Komaki R, Kondoh N, Namiki M, Iwamoto T, Toda T, Kobayashi K. The Y chromosome region

- essential for spermatogenesis. *Horm Res* 46 (suppl 1): 20-23, 1996
- 13) Reijo R, Lee TY, Salo P, Alagappan R, Brown LG, Rosenberg M, Rozen S, Jaffe T, Straus D, Hovatta O, de la Chapelle A, Silber S, Page DC. Diverse spermatogenetic defect in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat Genet* 10: 383-393, 1995
- 14) Vogt PH, Edelman A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F, Kohn FM, Schill WB, Farah S, Ramos C, Hartmann M, Hartschuh W, Meschede D, Behre HM, Castel A, Nieschlag E, Weidner W, Grone HJ, Jung A, Engel W, Haidl G. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* 5: 933-943, 1996
- 15) Johnsen SG. Testicular biopsy score count- A method for reestimation of spermatogenesis in human testis. *Hormones* 1: 2-25, 1970
- 16) Affara N, Bishop C, Brown W, Cooke H, Davey P, Ellis N, Graves JM, Jones M, Mitchell M, Rappold G, Tayler-Smith C, Yen P, Lau YFC. Report of the second international workshop on Y chromosome mapping 1995. *Cytogenet Cell Genet* 73: 33-76, 1996
- 17) Vogt PH, Affara N, Davey P, Hammer M, Jobling MA, Lau YFC, Mitchell M, Schempp W, Tayler-Smith C, Williams G, Yen P, Rappold GA. Report of the third international workshop on Y chromosome mapping 1997. *Cytogenet Cell Genet* 79: 1-20, 1997
- 18) Fitch N, Richer CL, Pinsky L, Kahn A. Deletion of the long arm of the Y chromosome and review of Y chromosome abnormalities. *Am J Med Genet* 20: 31-42, 1985
- 19) Bourrouillou G, Dastugue M, Colombies P. Chromosome studies in 952 infertile males with a sperm count below 10 million/ml. *Hum Genet*, 71, 366-377, 1985
- 20) Micic M, Micic S, Babic M, Diklic V. Phenotype of two males with abnormal Y chromosomes. *Clin Genet* 37: 321-326, 1990
- 21) Nakahori Y, Tamura T, Nagafuchi S, Fujieda K, Minowada S, Fukutani K, Fuse H, Hayashi K, Kuroki Y, Fukushima Y, Agematsu K, Kuno T, Kaneko S, Yamada K, Kitagawa T, Nonomura M, Fukuda S, Kusano M, Onigata S, Hibi I, Nakagome Y. Molecular cloning and mapping of 10 new probes on the human Y chromosome. *Genomics* 9: 765-769, 1991
- 22) Ma K, Sharkey A, Kirsch S, Vogt P, Keil R, Hargreave TB, McBeath S, Chandley AC. Toward the molecular localization of the AZF locus : mapping of microdeletions in azoospermic men within 14 subintervals of interval 6 of the human Y chromosome. *Hum Mol Genet* 1: 29-33, 1992
- 23) Vogt P, Chandley AC, Hargreave TB, Keil R, Ma K, Sharkey A. Microdeletions in interval 6 of the Y chromosome of males with idiopathic sterility point to disruption of AZF, a human spermatogenesis gene. *Hum Genet* 89: 491-496, 1992
- 24) Bostock CJ, Gosden JR, Mitchell AR. Localization of a male-specific DNA fragment to a sub-region of the human Y chromosome. *Nature* 272: 324-328, 1978
- 25) Nagafuchi S, Namiki M, Nakahori Y, Kondoh N, Okuyama A, Nakagome Y. A minute deletion of the Y chromosome in men with azoospermia. *J Urol*.150: 1155-1157, 1993
- 26) Kobayashi K, Mizuno K, Hida A, Komaki R, Tomita K, Matsushita I, Namiki M, Iwamoto T, Tamura S, Minowada S, Nakahori Y, Nakagome Y. PCR analysis of the Y chromosome long arm in azoospermic patients: evidence for a second locus required for spermatogenesis. *Hum Mol Genet* 3: 1965-1967, 1994

**Isolation of a Novel Azoospermia Factor Region on the Y Chromosome** Toru Noda, Department of Urology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., **108**, 260 — 272 (1999)

**Key words** azoospermia, Y chromosome, male infertility, sequence-tagged site

#### **Abstract**

We examined 151 patients with azoospermia or severe oligozoospermia by means of sequence-tagged site (STS) mapping, and identified 18 patients with microdeletions in the distal Y chromosome long arm (Yq). Because all these patients lacked the same region around *DYS7C*, it was hypothesized that this microdeletion on Yq was a candidate site for the azoospermia factor (AZF). Furthermore, we found a family in which the fertile father had the same microdeletion as that of his infertile son in the STS analysis. The aim of this study was to detect differences in the sequences of the patient with azoospermia and his fertile father by means of STS analysis and Southern blotting. We examined 18 loci distributed over both the long arm to the short arm, as well as other AZF candidate sites such as the loci, RNA binding motif (RBM) and deleted in azoospermia (DAZ) loci. The peripheral leukocytes of the patient and his father were subjected to genomic DNA analysis. Interestingly, both father and son had an identical microdeletion between *DYS7C* and *DYS239*. One possible explanation is that the Yq deletion of the father is smaller than that of the son. The region of this putative microdeletion constitutes a novel AZF candidate gene, which would be different from known genes such as RBM or DAZ. This microdeletion region is assumed to be located proximally to locus *DYS7C*. From the Y chromosome yeast artificial chromosome (YAC) library we isolated a YAC that spans this microdeletion region. Hybridization using a part of *yOX21* (a 100 kbase pair fragment) showed different sized bands for the patient and his father. It is possible that a segment that is absent in the son but present in the father contains a gene or part of a gene that which is crucial to spermatogenesis. We therefore identify this 100 kbase pair region as possibly containing a candidate gene for a novel AZF.