

Establishment of recovery spermatogenesis after chemotherapy due to the microenvironment modulation in seminiferous tubule

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-11-16 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 高, 栄哲, Koh, Eitetsu メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00048934

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



精細管内微小環境モジュレーションによる 抗癌化学療法後精子形成回復救済療法の確立

研究課題番号：17591670

平成17年度～平成18年度 科学研究費補助金（基盤研究(C)）

研究成果報告書

平成 19 年 7 月

金沢大学附属図書館



1300-04384-9

高 栄 哲

大学院医学系研究科助教授)

はしがき

哺乳類の精子形成は、複雑で様々な環境因子に影響を受ける。悪性腫瘍に対する強力な抗癌化学療法は、精子形成すなわち妊孕能に大きな影響をおよぼす。使用される抗癌剤の種類や使用量によっては、治療終了後数年を経ても精液所見が自然妊娠可能なレベルにまで回復しないことも多い。現状では治療前の精子凍結保存や生殖補助技術を駆使することによって挙児そのものは可能なこともあるが、患者が小児の場合は、これらの治療法を適用すること自体、問題が多い。とくに近年、小児血液腫瘍に対する治療成績の向上に伴い、生殖可能年齢まで生存する症例が増加しており、寛解後の妊孕性回復は大きな問題となっている。しかし注目度が高いにもかかわらずダメージを受けた精子形成の回復過程に関する基礎的研究は進んでおらず、精子形成回復における主要なメカニズムについての十分な理解が得られていない。そこで、治療目的で投与された抗癌剤などにより一旦、障害を受けた精巣は、数ヶ月～数年に及ぶ時間をかけて、失われた精子形成を回復しようとする。これらの回復機序について、これまで系統的な研究は限られたものであった。近年、減数分裂に特異的に発現する候補遺伝子を見いだし、その遺伝子の特性について検索し、それらの中から実際に精子形成回復を補助・補完する物質候補を同定する。

金沢大学附属図書館



1300-04384-9

著 者 寄贈

研究組織

研究代表者名：高 栄哲（金沢大学医学系研究科）・助教授

研究分担者名：並木 幹夫（金沢大学医学系研究科）・教授

交付決定額（配分額）（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 17 年度	3,000	0	3,000
平成 18 年度	700	0	700
総 計	3,700	0	3,700

研究発表

（１）学会誌等

- 1) Choi, J., Koh, E., Suzuki, H., Maeda, Y., Yoshida, A., Namiki, M Alu sequence variants of the BPY2 gene in proven fertile and infertile men with Sertoli cell-only phenotype Int J urol, 200714 (5), pp. 431-435 2007
- 2) Hiromi Suzuki, Futoshi Matsui, Eitetsu Koh, Masato Fukushima, Jin Choi, Yuji Maeda, Mikio Namiki¹ and Atsumi Yoshida A useful marker for the estimation of a recombination pair in the partial AZFc (gr/gr) deletion using quantitative real-time PCR Reprod Med and Biol, 6 (2), pp. 91-97 2007

（２）口頭発表

1) 第 50 回日本不妊学会総会（ポスター）

2005 年 11 月 18 日 熊本スカイホテル（熊本）

特発性男性不妊患者精巣組織に発現する *DMC1(disrupted meiotic cDNA1)* 遺伝子のスプライシングバリエントの解析

鈴木ひろみ, 松井 太, 高 栄哲, 前田雄司, 福島正人, 並木幹夫, 吉田 淳

2) 第 10 回日本生殖内分泌学会

2005 年 11 月 27 日 東京都市センター（東京）

特発性男性不妊症患者に対する Gonadotropin-regulated testicular RNA helicase (GRTH) おけるスプライシングバリエントの検討

松井 太, 高 栄哲, 前田雄司, 山本健朗, 並木幹夫, 吉田 淳

研究成果

減数分裂に関与する *DMC1* のスプライシングバリエントに注目し、本研究の成果を下記論文に総括した。

減数分裂時に発現する *DMC1 (disrupted meiotic cDNA1)* 遺伝子のスプライシングバリエントの解析

減数分裂時に発現する DMC1 (disrupted meiotic cDNA1) 遺伝子のスプライシングバリエーションの解析

はじめに

有性生殖を行う真核生物において、減数分裂は遺伝情報を次世代に伝えるうえで必須の役割を持つ。減数分裂で最も重要な過程は相同染色体の正確な分配及び父母に由来する相同染色体間での遺伝子組み換えである【1】【2】【3】。有性生殖ではそれぞれ親由来の相同染色体にある同じ遺伝子間でDNA相同組み換えが減数分裂のときに必ず行われ、卵子・精子などの配偶子を形成する。このように相同な遺伝子の配列を認識し組み換える反応を相同組み換えといい、その機構は線虫やショウジョウバエを用いて、近年明らかにされつつある。相同組み換えは、組み換えホットスポットと呼ばれる相同組み換えが起きやすい部位での一過的な DNA 二本鎖切断 (double strand breaks: DSB) によって開始されるとされる。通常、二本鎖 DNA の切断は細胞の死を意味するが、実際には減数分裂の際に二本鎖 DNA の切断は細胞内で能動的に行われている。DSB によって切断した片方の鎖が削られ、一本鎖 DNA を持った末端が作り出される。その一本鎖 DNA の相補的な DNA 配列を認識し、その二本鎖に侵入して対合・DNA 鎖交換反応が起こる。

DNA 間の相同性の検索とその交換反応において中心的な役割を果たしているのが細菌では *RecA*、真核生物では *Rad51* である。*Rad51* は大腸菌の *RecA* のホモログであり、この反応には他に *Rad52*, *Rad54*, *Rad55*, *Rad57*, *DMC1*, *Rpa1* などのタンパク質が関与する。この中の *Dmc1* 遺伝子は大腸菌には存在しないが、酵母やその他の真核生物に見られることから減数分裂に特異的な役割を担う分子として *Rad51* から進化したとされ、減数分裂期の精巣及び胎児期の卵巣の生殖細胞にのみ発現している。

Dmc1 遺伝子ノックアウトマウスでは正常に発生し発育するが精巣と卵巣の発育に異常がみられることが知られている【4】【5】。ノックアウトマウスにおいて、*RAD51* タンパクが *DMC1* の機能を相補できないことは、*DMC1* タンパクが相同染色体間の相同性のみを認識し対合させるという減数分裂に特異的な機能を持つように進化したことを反映していると考えられる。また、*DMC1* と *RAD51* タンパクは初期組み換えで相同染色体の認識と対合を行っているだけではなく、DNA 傷害に対して修復にも関与していると考えられている【6】。

本研究では、減数分裂時に発現する *DMC1* の遺伝子に注目し、無精子症患者精巣組織から cDNA を作製し、スプライシングバリエーションによる精巣表現型について検討した。

1) 金沢大学医学部附属病院泌尿器科及び木場公園クリニックに不妊を主訴に受診した無精子症患者 117 例を選択した。精巣組織は無精子症診断のため行う精巣生検、あるいは精巣組織内精子採取術 (testicular sperm extraction; 以下 TESE) を施行する際に文書による同意を得たものを採集した。閉塞性無精子症患者の精巣組織を正常コントロールとした。

2) 患者の精巣生検像による分類

精巣生検が施行され、その病理組織型が明らかな 117 例の患者の組織像を評価するため、国際的に認められている精巣生検の組織学的分類である Johnsen の score count (以下、JS) に基づき分類した。

本研究では、JS 1 を「精細管内に無細胞」、JS 2 を「SCO」、JS 3-5 を「maturation arrest」、JS 6-7 を「精子細胞形成」、JS 8-10 を「正常精子形成」とした。患者背景は表 1 に示した

表 1 Azoospermia patients classified with Johnsen's score.

Johnsen's Score	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	total
Case Number	9	54	0	1	5	4	4	13	10	17	117

3) *DMC1* 遺伝子とそのバリエント

減数分裂は精細胞において特異的である。マウスにおいて減数分裂に関与する遺伝子で精巣特異的に発現している *Sry* 【7】 *Wnt-2* 【8】 *CREM* や *CREB* 【9】などの遺伝子は選択的スプライシングを受け、そのほか酵母などでも同様のスプライシングバリエントが報告されている。ヒト *DMC1* はマウス *cDNA* からつりあげた遺伝子であるが、クローニング当初からマウス *Dmcl* で見られるようなスプライシングバリエントが存在していることが明らかであった。選択的スプライシングを受けて翻訳されるタンパク質は様々なモチーフやドメインが変化して、その立体構造や作用を変化する。これらのイソフォームタンパクが複数存在している場合、各イソフォームタンパクが共同して減数分裂の制御に関与している可能性が考えられる。

a) ヒト *DMC1* とその構造

ヒト *DMC1* (Gene Bank No. NM_007068) は、ラット *Dmcl* をプローブにしてヒト精巣からクローニングされ、2269bp の mRNA である。又、それは 14 のエクソンを持ち、340 アミノ酸残基から成るペプチドである。開始コドンはエクソン 2 上にあり、エクソン 14 に終止コドンが存在している (図 2a)。

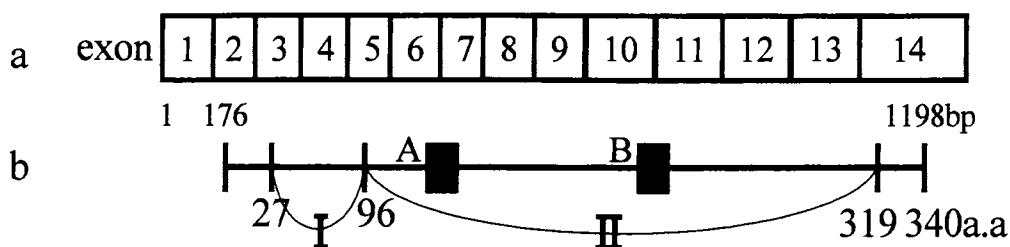


図 2 Structure of *DMC1* exon and protein.

DMC1 タンパク質は図 2b に示したように、96 番目のアミノ酸を境に 27 番～96 番目をドメイン I とし、97～319 番目までをドメイン II とその構造から分類されている。ドメイン I は本来 *DMC1* を特徴付けている領域で減数分裂時に *Rad51* と共同に作用する領域と考えられている。また、ドメイン II は減数分裂開始時に必要な DNA の結合領域と考えられている。その領域にあるモチーフ A と B は ATP に関与するモチーフであることから、ATP 要求性の DNA 結合領域であるとされている。

これらのモチーフ A,B はそれぞれ 1 本鎖および 2 本鎖の DNA 結合や切断に関与している。*DMC1* および *Rad51* タンパク質は第 1 次減数分裂開始時に生じる 2 本鎖 DNA の切断、DSB に関与し、DNA の修復にも関与している。これらの一連の遺伝子は減数分裂初期に起こる相同染色体のペアリングに深く関与すると考えられている。ヒト *DMC1* は様々なスプライシングバリエントが報告されていることから、それに対応するイソフォームタンパクが精子形成に関与している。

b) ヒト *DMC1* のスプライシングバリエントの検証

ヒト *DMC1* は、Habu らが発表した 2 種の転写物と 3 種の転写物 (*DMC1a*, *DMC1b*, *DMC1c*) が報告されている。

まず、前者は、ヒト精巣 cDNA からマウス cDNA をプローブにして 2 種の転写産物を見出した。全長アミノ酸残基をもつ *DMC1* (図 2a) と選択的スプライシングを受けたエクソン 8 と 9 がスキップした *DMC1-D* (図 2b) である【10】。

DMC1 は 340 アミノ酸残基を持ち、エクソン 2 から 14 まで全長をもつ転写物で、*DMC1-D* は選択的スプライシングされた産物であり、アミノ酸残基 142 番目から 192 番目が欠失した 268 アミノ酸残基をもつ転写物である。また、*DMC1-D* 転写産物はエクソン 7 から 10 に翻訳されることによって接続部コドンの読み枠がずれ、セリンからグリシンに変化する。

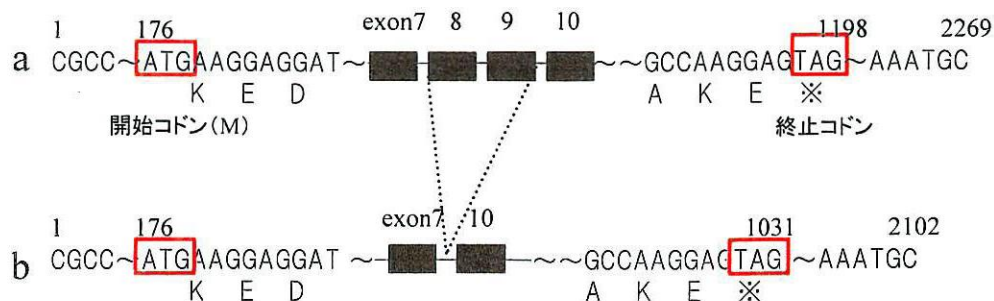


図2 Structure of *DMC1* and *DMC1-D*. a*DMC1*(Normal cDNA) b*DMC1-D*

一方、後者は、全長とその他に2つの転写産物が報告されている。エクソンスキップのない全長 *DMC1* は *DMC-a* と分類され、Habu らの *DMC1* と全く同一の塩基配列およびアミノ酸配列である。14 のエクソンと 340 アミノ酸、37.6KDa のタンパク質が産生される (図 3a)。

DMC-b は図 3a のイントロン9の5'スプライス部位(GT)が選択的スプライシングを受けず、そのまま Fig.4b のよう選択的スプライシングを受け、エクソン8'を形成し、エクソン9'までの転写物を産生する。これは全く全長 DNA とは違ったタンパクを産生することになり、1597 塩基、9 エクソンで 165 アミノ酸、18.0KDa のタンパク質が産生される (図 3b)。この転写物は卵巣に発現すると考えられている。*DMC1c* は mRNA 264 塩基、2 エクソンから構成され、38 アミノ酸からなる (図 3c)。この転写物は cDNA も確定し、それに対応するゲノム塩基配列も確定されているが、その詳細については不明である。

従って、現在文献上4種類の *DMC1* 転写物とスプライシングバリエントが存在する。本研究では、まず報告されているスプライシングバリエントが発現しているかを確認した。

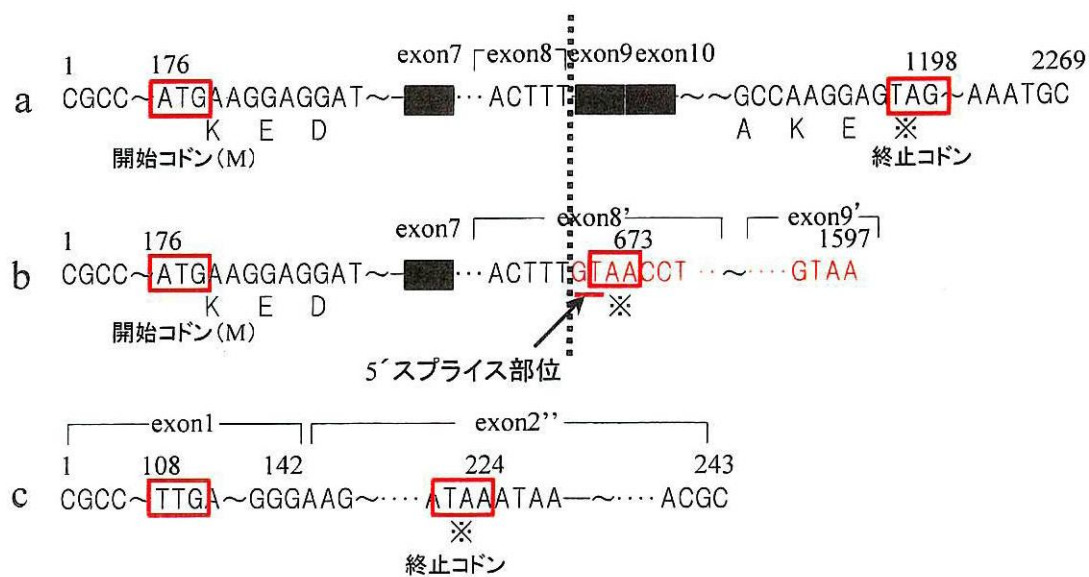


図 3 Structure of *DMC1* mRNA variants reported by Aceview.

- a *DMC1a*
- b *DMC1b*
- c *DMC1c*

結果

ポジティブコントロールとしてヒト精巣 cDNA ライブラリを用いて、エクソン 1 からエクソン 14 上にあるプライマーで RT-PCR を施行した。

図 4 のように 3 つの転写産物を認めた。サイズの大きいほうから①②③とした。①は 1220 bp であり、*DMC1* 全長の予想されたサイズであった。③は 1055 bp であり、exon8, 9 が選択的スプライシングを受けた予想サイズであった。②は①と③の間にあり、exon8 あるいは exon9 の欠失した新規の選択的スプライシング産物と考えられた。

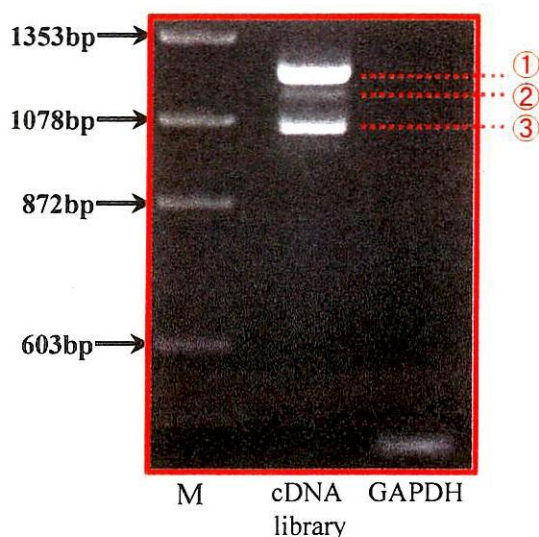


図 4 RT-PCR products of *DMC1* derived from human cDNA library.

図 4 のそれぞれのバンドが選択的スプライシング産物であることを証明するために図 4 をナイロンメンブレンに転写し、サザンブロット法によって各エクソンの有無を確認した。図 5 は、図 4 の産物のサザンブロットである。

エクソン 7~13 をプローブに用いると、②のバンドはすべてのエクソンプローブと反応し、非特異的バンドと判定した。

①および③のバンドは予想通り、前者が全長 cDNA であり、後者がエクソン 8, 9 の選択的スプライシングを受けた産物であることを証明した。

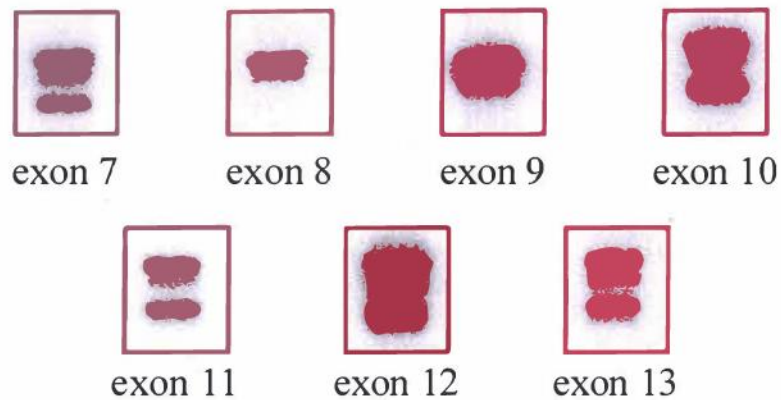


図 5 Southern blotting analysis of RT-PCR products derived from human cDNA library using each exons' probe.

次に、本研究において用いた被験サンプルのすべてのパターンの RT-PCR を図 5 に示した。

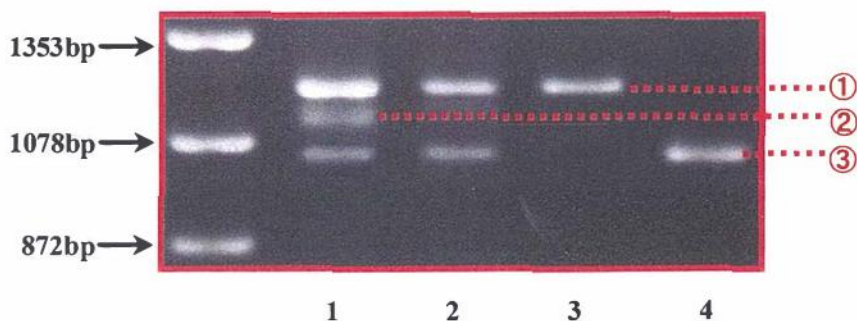


図 6 RT-PCR products of *DMC1* in various infertile patients.
lane 1. Pt. 137, lane 2. Pt. 226, lane 3. Pt. 222, lane 4. Pt. 202

図 6 の①はエクソン 1 から 14 を増幅させた PCR 産物であり、図 6 の③は PCR 産物のサイズからエクソン 8 と 9 がスキップされた選択的スプライシング産物である。Fig.7 をナイロンメンブレンに転写し、サザンブロット法によって各エクソンの有無を確認した。



図 7 Southern blotting analysis of RT-PCR products using each exons' probe.
lane 1. Pt.137 , lane 2. Pt.226 , lane 3. Pt.222 , lane 4. Pt.202

図 7 はエクソン 4 をプローブにした場合、①②③のバンドが現れ、エクソン 8, 9 をそれぞれプローブにした場合①のみのバンドしか現れない。すなわち、③のバンドにはエクソン 8, 9 がなく、②のバンドはエクソン 8, 9 を含むことが明らかであった。また、ダイレクトシーケンス測定法によって、①のバンドは選択的スプライシングバリエーションが生じておらず、③のバンドはエクソン 8, 9 の存在しない選択的スプライシングを受けた転写物であった。

②のバンドはエクソン 4, 8, 9 プローブと反応して陽性となることから、PCR による非特異的増幅産物とした。さらに、Fig.9 は Fig.7 で示した①②③のバンドを切り出し、直接シーケンス法によって塩基配列を決定した。

図 8-a はエクソンスキップを受けず、全長 cDNA を確認することができた。図 8-c は選択的スプライシングを受け、エクソン 7 から 10 にスキップしていた。図 8-b はエクソン 7 以降のシーケンスが特異的ではなく、PCR の非特異的反応とした。

本研究では上記の 3 種の転写産物を 5 患者に対して確認し、すべて同様の結果を得た。

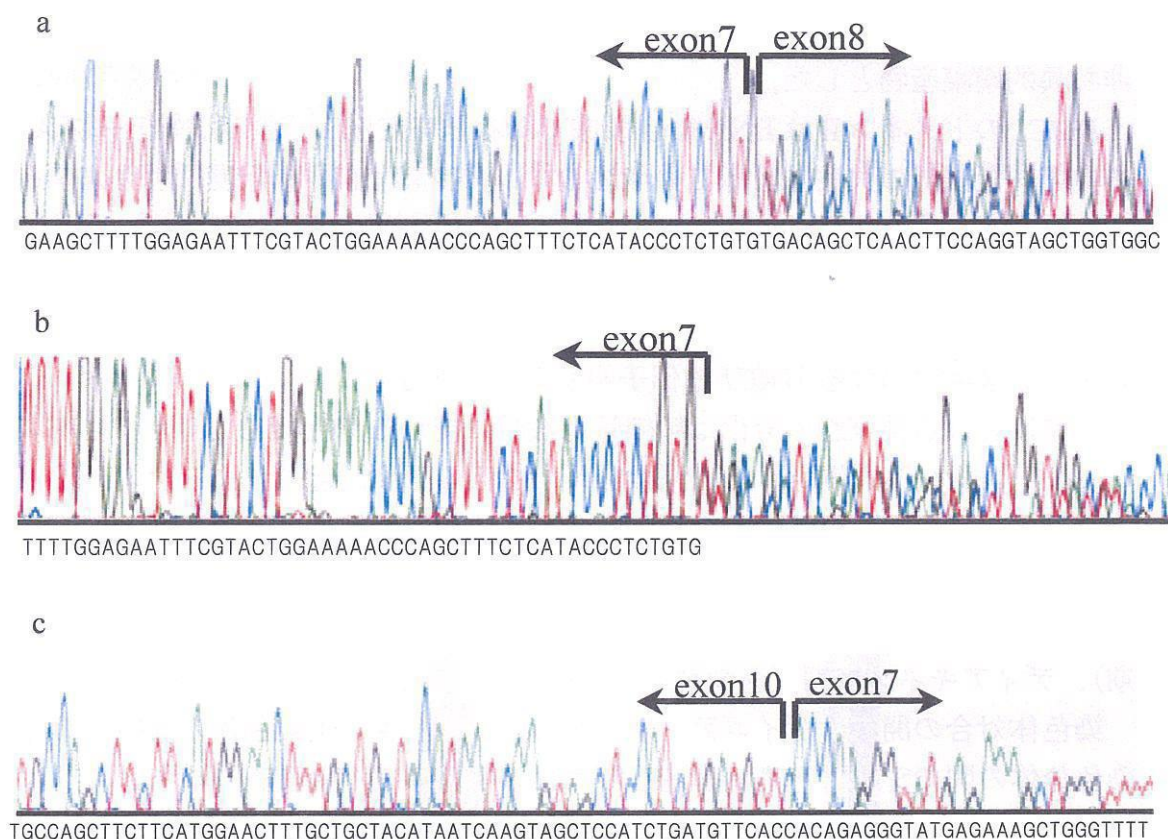


図 8 The sequence electropherograms of DMC1 transcripts.

- a The sequence of boundary between exon7 and exon8 using upper band (①) described Fig.7. Direction is 5' to 3'.
- b The sequence of boundary between exon7 and exon8 using middle band (②) described Fig.7. Direction is 5' to 3'.
- c The sequence of boundary between exon7 and exon8 using lower band (③) described Fig.7. Direction is 3' to 5'.

次章において、3種の転写産物について確認した。ただし、図6のlane1のバンドについては全体の30%(35/117)について認めたが、これらをすべてlane2のバンドを同一のものとして分類した。

結果より正常コントロールを含む特発性不妊症患者には3つの転写物が存在することが明らかとなった。3転写物はDMC1とDMC1-Dの同時発現、あるいはそれぞれ単独に発現しているかである。第2節より精巣cDNAライブラリからの転写物はDMC-DとDMC1が同時に発現している。

正常コントロールとして使用した市販の精巣cDNAは45人のcDNAのプール

であり、妊孕性も証明されていない。しかし、本研究で用いた正常精巣組織を認めた例においても同様の結果を得たことにより、図6の②のバンドはPCRの非特異的増幅産物とした。

DMC1 のドメインⅡはDNA結合領域であると考えられ、さらにモチーフA,Bの中間～近接部の欠失によって *DMC1-D* タンパクはDNA結合親和性やATPase活性の低下が考えられる。次章において、*DMC1* スプライシングバリエントについて臨床材料を用いて検証する。

d) 臨床検体における *DMC1* 遺伝子バリエントと臨床所見

精巣における精細胞の分化は精細管基底膜に接する精祖細胞（精原細胞）に始まり、減数分裂を開始する。減数分裂で2回の分裂が起こり、二次精母細胞となって、その後一倍体の精細胞が完成して成熟した精子へと分化する。

減数分裂の第一分裂前期には、染色体の形態変化によってレプトテン期（細糸期）、ザイゴテン期（合糸期）、パキテン期（太糸期）、ディプロテン期（後糸期）、ディアキネレス期（移動期）の5段階に分類することができる。

染色体対合の開始はザイゴテン期である。このとき二価染色体の2組の姉妹染色分体間でシナプトネマ構造と呼ばれる構造形成が始まる。パキテン期は対合の完了とともに始まる。次にディプロテン期になると、対合の解離が始まり、キアズマが見えるようになる。シナプトネマ構造とはパキテン期直前に生じ、直後に消失する。これは2本の相同染色体が密着して並んで、染色体の交差のため必須であると考えられている。

DMC1 は *Rad51* と同様、減数分裂初期に精細胞特異的と考えられ、また、ヒト *DMC1* はレプトテン期からザイゴテン期に特異的に発現すると考えられている *DMC1* と遺伝子構造とヒト精巣では選択的スプライシングによる二つの転写物が存在することを明らかにした。

DMC1 のスプライシングバリエントの機能についてはまだ不明であるが、減数分裂期の精細胞系に何らかの重要な作用をしていることは及ぼしていることは十分に推測できる。

本研究では、男性不妊症患者の精巣組織を用いてその病理組織型と *DMC1* のスプライシングバリエントの関係について考察するとともに、*DMC1* ノックアウトマウスにおいて精巣の著しい萎縮を認めたことにより、各発現のパターンに準じて、患者の精巣サイズについて検討した。

精巣組織型と *DMC1* 遺伝子の発現

精巣生検組織像の明らかな117例をRT-PCR法によって検討した。 *DMC1* 遺

伝子が全く発現していなかったのは「精細管無細胞」群 33%(3/9)、「SCO」群 23% (12/54)、「maturation arrest」群 0%、「精子細胞分化」群 25%(2/8)「正常」群 10% (4/40)であった。

また、20%(22/117)は全く発現を確認することができなかった。

DMC1 は減数分裂時に発現する遺伝子であるにも関わらず「精細管無細胞」、「SCO」群において 70-80%発現している。一方、減数分裂を経た「精子細胞分化」群や正常群において、それぞれ 25%、10%の発現を検出できなかった。これらの結果の不均一性は、まさに精巣組織の不均一による。実際の TESE において、組織診断上全く精子が認められないにもかかわらず、精子を採取できる例は少なくない。

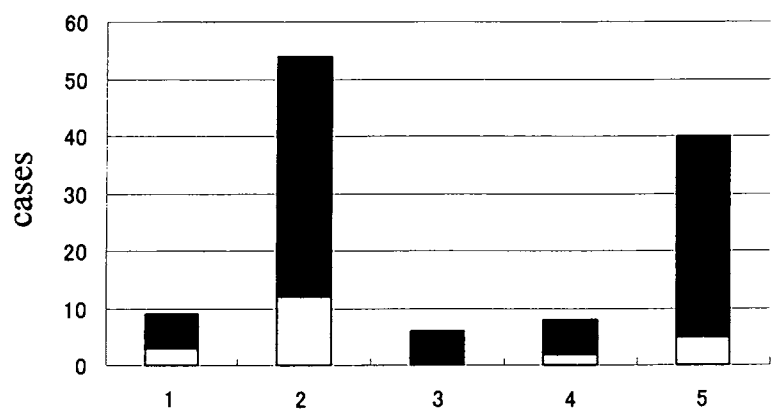


図 9 Expression of *DMC1* genes.

■ :expression □ :nonexpression

1. 精細管内無細胞
2. Sertoli cells only
3. maturation arrest
4. 精子細胞分化
5. 正常

前項において、精巣組織を認めた（JS 7 以下）の症例で *DMC1* の発現群と発現していなかった群との精巣サイズを比較した。この両者間に差はなかった。

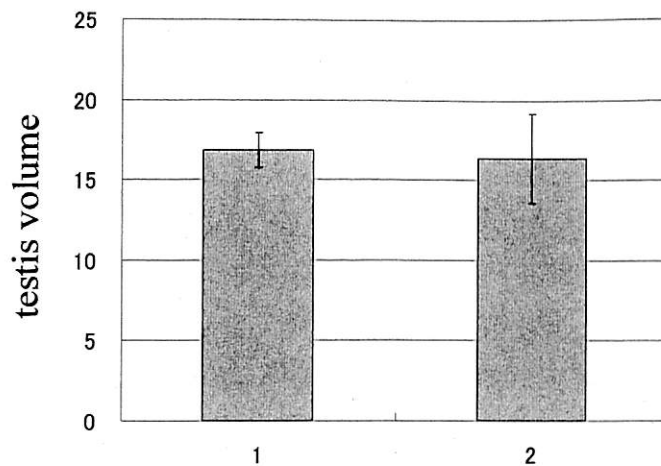


図 10 Comparison of testis-volume.

- 1 Expression group of *DMC1*.
- 2 Nonexpression group of *DMC1*.

DMC1 転写産物パターンの解析

発現の検討には *DMC1* (0630C) を使用している。このプライマーは CDS 全体をカバーし、エクソン 1 からエクソン 14 までを増幅することによって 1220bp の転写産物を得る。

転写産物発現のパターンとして、3 種類を確認することができた。

- a) 1220 bp の転写産物のほかに約 1100 bp と 1055 bp の転写産物を認め、計 3 つの転写産物が認められる。
約 1100 bp の転写産物は第 3 章で述べたように選択的スプライシング産物ではないと考えられる。従って、1220 bp と 1055 bp について分析した。
- b) 1220 bp の転写産物のみが認められる。
- c) 1055 bp の転写産物のみが認められる。

表 2 は①の両者同時に発現するものを a とし、②のパターンを b、③のパターンを c とした。前章の結果から、正常ヒト cDNA ライブラリを用いた RT-PCR において、転写産物両者を持つ a パターンである。

表 2 Expression of *DMC1* genes according to histological pattern.

A

	no cell	SCO	MA	sperm cyte	normal	total
a	5	17	3	6	32	63
b	1	3	2	0	0	6
c	0	22	1	0	3	26
total	6	42	6	6	35	117

B

	no cell	SCO	MA	sperm cyte	normal	total
a	7.9%(5/63)	27%(17/63)	4.8%(3/63)	9.5%(6/63)	51%(32/63)	63
b	17%(1/6)	50%(3/6)	33%(2/6)	-(0/6)	-(0/6)	6
c	-(0/26)	85%(22/26)	3.8%(1/26)	-(0/26)	11.5%(3/26)	26

117 例の *DMC1* の発現様式は a、b、c 様式がそれぞれ 63、6、26 例であった。

選択的スプライシングを受けていない b) 様式は、半数体に分化した「精子細胞分化」、「正常」には全く発現していなかったが、「精細管無細胞」17% (1/6)、「SCO」50% (3/6)、「MA」33% (2/6) の発現を認めた。

選択的スプライシングを受けている c) 様式は、26 例存在していた。「精細管内無細胞」群には発現がなく、「SCO」85% (22/26)、「MA」は 3.8% (1/26)、「正常」群にも 11.5% (3/26) と発現していた。

a) 様式の発現を認めるものは、正常精巣組織型において 51% (32/63) を認め、「SCO」で 27% (17/63)、「精細管内無細胞」でも 7.9% (5/63) を認めた。

2 種の転写産物を認めたものは、正常組織を中心として全組織型に認められた。

DMC1 はマウス組織において in situ hybridization にてレプトテン期からザイゴテン期に特異的に発現するとされている【10】。

本研究においては RT-PCR によって検証しており、わずかな発現も検知するため、他の精巣の体細胞系組織細胞、例えばセルトリ細胞や精細管基底膜、あるいは間質系の細胞成分で発現している可能性が考えられる。

一方、組織系からスプライシングバリエーションの関係を考察すると、「精細管内無細胞」は 83% (5/6) が a) 様式、17% (1/6) が b) 様式、c) 様式は存在しなかった。「SCO」では、40% (17/42) が a) 様式、7% (3/42) が b) 様式、53% (22/42) が c) 様式であった。「MA」では、50% (3/6) が a) 様式、17% (1/6) が b) 様式、33% (2/6) が c) 様式であった。「精子細胞分化」は 100% (6/6) a) 様式であった。「正

常」は 92% (32/35) が a) 様式、9% (3/35) が c) 様式であった。

c) 様式、すなわち選択的スプライシングを受けた転写物のみの発現において、精細胞系は消失する可能性が考えられる。一般に DSB における 2 本鎖 DNA 切断は精細胞をアポトーシスを誘導すると考えられる。

考察

男性不妊症患者の *DMC1* の発現は 2 つの転写産物を示すだけではなく、選択的スプライシングバリエーションを受けた遺伝子、あるいは受けていない単独の遺伝子が発現しているのかを判別可能にすることが明らかとなった。すなわち、*DMC1* の二つの転写産物の共同的作用によって、複雑な減数分裂の制御に参与している可能性が示唆された。

DMC1 遺伝子は減数分裂期に発現し、*recA /Rad51* 遺伝子と相関性が高いと考えられている。

雄マウスでは減数分裂前期（レプトテン期からサイゴテン期）の精母細胞に、雌では胎仔の卵巣で発現していることが確認されている。

ノックアウトマウスでは正常に発生・生育するが、両性とも生殖巣が小さい。雄では精巣内の精細管も野生型より細く、精子が形成されていない。また、減数分裂前期のサイゴテン期までの精母細胞は見られるが、それ以降の細胞はアポトーシスを起こしている【10】。また、雌では生まれたときから卵巣には卵母細胞が存在せず、間質細胞だけであった【4】【5】。従って、両性とも不妊となる。

また欠損マウスで部分的な対合がわずかに見られたことから、相同染色体間の認識に参与し、対合を促進している可能性が考えられた。

さらに、*DMC1* タンパク質は相同染色体が近接した位置に存在し【12】、この領域には *Rad51* タンパク質も存在している。*DMC1* 遺伝子は、単に *Rad51* 遺伝子を補うのではなく、DNA 間の相補性を認識するという機能を利用して相同染色体を認識するという減数分裂に特異的な機能を持っていると考えられている。

総括

無精子症患者 117 例の cDNA を用い、RT-PCR 法による *DMC1* 遺伝子のスプライシングバリエーションの解析を行った。主に、文献的に発表されている様々なバリエーションについて男性不妊患者の組織学的表現型を中心に分析・考察を行った。

1. CDS 全体をカバーし、エクソン 1~14 までを増幅させるプライマーを用いて RT-PCR を行った結果、正常コントロールを含む特発性男性不妊症患者には *DMC1* と *DMC1-D* の同時発現、あるいはそれぞれ単独発現という 3 つの転写物が存在することが明らかとなった。
2. 正常コントロール、および本研究で用いた正常精巣組織を認めた例においても総括 1 で使用したプライマーを用いて RT-PCR を行った結果、三本のバンドが確認された。しかし、真ん中のバンドはサザンブロット法による検討を行った結果、PCR の非特異的増幅産物であることがわかった。
3. (第 4 章の考察から)
4. *DMC1* ノックアウトマウスにおいて精巣の著しい萎縮が認められているが、*DMC1* 発現群と *DMC1* 非発現群における精巣サイズの比較では、有意な差は認められなかった。

(本研究は本間由紀子、高栄哲が主に行った)

参考文献

1. GS.Roeder, Meiotic chromosomes: it takes two to tango., *Genes Dev.*, **11(20)**, 2600-21(1997).
2. T.Morita, T.Habu, K.Yoshida., Recombination of chromosomes, *Tanpakushitsu Kakusan Koso.*, **41(15 Suppl)**, 2386-92(1996).
3. JE.Haber., Meiosis. Searching for a partner., *Science.*, **279(5352)**, 823-4(1998).
4. K.Yoshida, G.Kondoh, Y.Matsuda, T.Habu, Y.Nishimune, T.Morita., The mouse RecA-like gene Dmc1 is required for homologous chromosome synapsis during meiosis., *Mol Cell.* **1(5)**, 707-18(1998)
5. D. L.Pittman, J.Cobb, K. J.Schimenti, L. A.Wilson, D. M.Cooper, E.Brignull, M. A.Handel, J. C.Schimenti, Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for Dmc1, a germline-specific RecA homolog., *Molec Cell.*, **1(5)**, 697-705(1998)
6. DK.Bishop, RecA homologs Dmc1 and Rad51 interact to form multiple nuclear complexes prior to meiotic chromosome synapsis., *Cell.*, **79(6)**, 1081-92(1994)
7. B.Capel, A.Swain, S.Nicolis, A.Hacker, M.Walter, P.Koopman, P.Goodfellow, R.Lovell-Badge., Circular transcripts of the testis-determining gene Sry in adult mouse testis., *Cell.*, **73(5)**, 1019-30(1993)
8. DG.Wilkinson, JA.Bailes, AP.McMahon., Expression of the proto-oncogene int-1 is restricted to specific neural cells in the developing mouse embryo., *Cell.*, **50(1)**, 79-88(1987)
9. NS.Foulkes, B.Mellstrom, E.Benusiglio, P.Sassone-Corsi., Developmental switch of CREM function during spermatogenesis: from antagonist to activator., *Nature.*, **355(6355)**, 80-4(1992)
10. T.Habu, T.Taki, A.West, Y.Nishimune, T.Morita., The mouse and human homologs of DMC1, the yeast meiosis-specific homologous recombination gene, have a common unique form of exon-skipped transcript in meiosis., *Nucleic Acids Res.*, **24(3)**, 470-7(1996)
11. T.Kobayashi, Y.Hotta, S.Tabata., Isolation and characterization of a yeast gene that is homologous with a meiosis-specific cDNA from a plant., *Mol Gen Genet.*, **237(1-2)**, 225-32(1993)
12. M.Tarsounas, T.Morita, RE.Pearlman, PB.Moens., RAD51 and DMC1 form mixed complexes associated with mouse meiotic chromosome cores and synaptonemal complexes., *J Cell Biol.*, **147(2)**, 207-20(1999)