

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390438

研究課題名（和文）ゲノム病としての男性不妊症の研究—ゲノム再組換えと精子タイピング—

研究課題名（英文）A study of male infertility as genome diseases—Recombination of genome DNA and sperm typing—

研究代表者

高 栄哲 (KOH EITETSU)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：90283134

研究成果の概要（和文）：精子形成の過程ある減数分裂の機構を単一精子のゲノム解析で分析を試みた。ハプロタイプゲノムの塩基配列を比較すると、Y染色体にはリピート配列が多く、ヒト内在性レトロウイルス（HERV）由来の塩基配列を確認した。霊長類の系統図の分析から Y 特異的パリンδροーム構造の由来を確認した。精子形成領域である、パリンδροーム 1, 2 は比較的早期から存在し、精子形成に関与している可能性を証明した。

研究成果の概要（英文）：We evaluated an analysis of the single sperm DNA in the meiotic system regarding process of spermatogenesis. According to the sequence of the haplotype, much repeat sequence existed in Y chromosome. We confirmed much these repeat sequence involved a human endogenous retrovirus (HERV). The phylogenetic analysis showed a Y-specific palindromic structural existed since old world monkey. This study proved the presence of palindrome 1,2 since an early evolutionary stage was associated with spermatogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2010 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2011 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：精子、ヒトゲノム、ハプロタイプ、再組換え、繰り返し配列、Y染色体、減数分裂

1. 研究開始当初の背景

プレゲノム時代の疾病概念は、エクソンを中心とした遺伝子コード領域である。しかし、この領域はヒトゲノムの約 3% であり、さらにイントロンなどの、いわゆる遺伝子関連

DNA 塩基配列を加えても 30% 程度にすぎない。これに対しポストゲノム時代は、残り約 70% の領域であり、非常に広大である。構造的には極めて単純であるにもかかわらず、機

能解析に苦慮し、その研究は端緒についたばかりといえよう。この領域の主演は、繰り返し配列を中心とした相同性の高いリピート配列である。これは染色体再構成を形成し、染色体やゲノム DNA 間の相同組み換えによるコピー数の異常による疾病や欠失、すなわちここ数年の研究の成果で同定された、「ゲノム病」の概念である。われわれの研究室において、ヒト進化の過程でヒトゲノムに挿入・蓄積されたヒト内在性レトロウイルスゲノム (human endogenous retrovirus; HERV) に注目した。HERV は、その相同性ゆえ再組換えが生じ、その結果ゲノム上に領域欠失が生じ男性不妊症にいたる機序について研究報告してきた。Y 染色体上の微小欠失領域 AZF (Azoospermia factor) は、男性不妊症を惹起することは知られており、その欠失位置から AZFa, b, c の 3 領域に分類されているが、この各領域の欠失機序は未だ不明であった。われわれは、AZFa 領域が HERV によるゲノム病であることを報告し、日本人における再組換えによる欠失位置のホットスポットを証明した。さらに、AZF b 領域の TTY13 (Testis specific transcripts of Y chromosome) 座に同様な再組換えの結果が生じ、不妊症を惹起していることをも証明した。この研究の過程で、生殖細胞の減数分裂期には、父母由来の染色体による対合が行われ、同一染色体内において、頻繁に再組換えが行われていることを明らかにした。一方、染色体上にホットスポットと呼ばれる小さな領域において再組換えが頻繁に行われ、ある種の再組換えの不全によって男性不妊症が惹起されるようである。それは、減数分裂期の再組換えによる、ある種の変異が蓄積すると予想されるので、これを証明するために、今回の研究を発展的に企画した。

2. 研究の目的

精子は、親 DNA ゲノムの半数体であることが特殊である。減数分裂を経たハプロイド (精子 DNA) は、精子ひとつひとつに減数分裂期再組換えのクロスオーバーの結果が反映され産生されている。したがって、次世代に影響を与える再組換え読み間違い率を反映しているとも考えられる。これは変異の生じ易さは再組換え領域の距離を表すともいうことができる。材料としての個々の精子は、あらゆるパターンの再組換えのバリエーションを個々の細胞にもち、射出されている。すなわち、射出精子の個々の精子 DNA を分析すれば、減数分裂の再組換えのさまざまな特徴を反映している。単一精子の DNA 塩基配列を分析し、その構造を分析し、bioinformatics の手法より、Y 染色体のゲノム構造と減数分裂を中心とした精子形成について検討する。

3. 研究の方法

我々の施設では、すでに倫理委員会で承認を得た、男性不妊症約1500例と妊孕性の証明されている健康男性400例ゲノムDNAを持っている。これらのサンプルの染色体型、ホルモン値、Y染色体の微小欠失の有無、Y染色体ハプログループ分析、精液検査値、理学的所見がデータベース化され、保管されている。本研究は患者および正常ボランティアのゲノムDNAを分析するとともに精子DNAの増殖し、ハプロイドゲノムの作成する。

1) バイオインフォマティクス

NCBI に公開されているゲノム塩基配列から Y 染色体に焦点を絞り、Y 染色体上の SNP の解析およびハブマップによるデータの比

較を行う。

2) 単一精子からハプロタイプゲノムの作成
健康成人男性の射出精子から回収する予定である。卵細胞質内精子注入術 (ICSI) 時に使用するマニピュレータにより、精子ひとつを96穴プレートに入れ、精子を溶解したのち、DNAを増幅させる。精子ひとつからハプロイドゲノムを抽出する。

3) ゲノムリピート配列の分析

ゲノムを用いたPCR増幅する。微小欠失およびDNA部分欠失も含め、保存されているのでPCRによって、欠失などを確定できる。特に、PEP (primer extension pre-amplification) 反応を駆使して行う。

4) 精子タイピング

精子タイピング、すなわちハプロタイプマッピングは、前述したようにハブマッププロジェクトが2002年から国際的に進行し、その一部が公開されている。しかし、網羅的であるがゆえ、我々がターゲットにしている機能についてははっきりしない今回の研究では、Y染色体上AZF領域ハプロタイプ分析候補座位を中心に分析した。主に、シーケンサによる塩基配列を分析し、haploid SNPとしてその多型を確認する。射出精子は、数億に及ぶが、分析は統計的に数百程度で十分とされる。さらに、リンパ球から得られたゲノムDNAとの比較を行う。さらに、再組換えにおける変異のリスクも検討する。次頁はY染色体のパリンドローム領域であり、染色体内相同再組換えの可能性と、そのホットスポットを検索した。

4. 研究成果

単一精子の回収をおこなう技術およびハプロイド全ゲノムの増幅をDNAポリメラーゼを用いて完成させた。単一精子ゲノムから、NCBI

データベース (Build 36) などのデータベースからハプロタイプの候補を検索した結果、比較し、Y染色体にはリピート配列が多いことから、RepeatMaskerのソフトウェアを用い、そのリピート配列の由来をスクリーニングした。特に、Y染色体上にある特異的なリピート配列はパリンドローム (回文) 構造をしており、8つのパリンドローム配列 (P1-8) をもっているため、これらの由来を検証した。さらに、これらのパリンドローム構造はY染色体上にある精子形成領域である。

特に、リピート配列の中にヒト内在性レトロウイルス (HERVs) の痕跡が多くあることがわかった。

これから、HERVをマーカーにパリンドローム構造の進化について分析することにした。Y染色体長腕上にある、8つのパリンドローム構造リピート配列が多いため相同再組換えが生じ、ゲノムの欠失が生じやすい。レトロウイルスは、その両端のLTR(long terminal repeat)のペア存在し、進化の過程で再組換えが生じ、欠失が生じると単一LTRになり、後世に伝達される。すなわち、LTRを検索することで、ゲノムの時計にする事が可能である。この機構をマーカーとて、霊長類 (ボノボ、ゴリラ、チンパンジー、日本ザル) のゲノムDNAから、LTRを計算した。その結果、約3000万年前にヒトの共通祖先に感染しゲノムに取り込まれ、HERVの一つであるHERV-K14Cの痕跡を検証することにより、Y染色体パリンドローム構造の生成について検討できることをみいだした。ソフトウェアMEGA4を用いて、The neighbor-joining trees系統図を作成し進化のマーカーにした。旧世界ザル (ゴリラ、チンパンジー) と新世界ザル (ボノボ、日本ザル) のゲノムDNAを用いた。Y染色体上にHERV-K14Cは146存在し29はY染色体に位置した。この29のHERVは各パリンドロームに分散

しており、約810万年前大型類人猿時代に大きくY染色体のパリンドローム構造は分化したと考えられる。系統図の分析からP1.1/2、P3とP4がゴリラ系から出現することから、P1とP3、P4は約1000万年前にduplicationが生じ、パリンドローム構造が完成したと考えられた。精子形成領域である、P1.1/2、P3の安定化に
関与している可能性が考えられた。

Y染色体のP1.1/2が精子形成領域で重要な役割を担っている事を証明した。

今後、パリンドローム間で生じるさまざまな再組換えで生じるパターンを明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Sin HS, Ichijima Y, Koh E, Namiki M, Namekawa SH., Human postmeiotic sex chromatin and its impact on sex chromosome evolution. 査読有, Genome Res. 2012, 22, 827-36
doi: 10.1101/gr.135046.111
2. Sin HS, Koh E, Taya M, Iijima M, Sugimoto K, Maeda Y, Yoshida A, Iwamoto T, Namiki M, A novel Y chromosome microdeletion with the loss of an endogenous retrovirus (ERV)-related testis-specific transcript in AZFb region, 査読有, J Urol, 2011, 186, 1545-52
doi:10.1016/j.juro.2011.05.044
3. Sin HS, Koh E, Kim DS, Murayama M, Sugimoto K, Maeda Y, Yoshida A, Namiki M. Human endogenous retrovirus K14C drove genomic diversification of the Y

chromosome during primate evolution, 査読有, J Hum Genet, 2010, 55, 717-25.
doi:10.1038/jhg.2010

4. Sin HS, Koh E, Shigehara K, Sugimoto K, Maeda Y, Yoshida A, Kyono K, Namiki M. Features of constitutive gr/gr deletion in a Japanese population, 査読有, Hum Reprod, 2010, 25, 2396-403.
doi: 10.1093/humrep/deq191

[学会発表] (計 3 件)

1. Sin, H., Koh E., Shin M., Shigehara K., Sugimoto K., Maeda Y., Namiki, M. HERV-K14C contributees to male speciation and spermatogenesis during primate evolution, 11th International symposium on spermatology 2011年6月29日 Okinawa Convention Center (沖縄県)
 2. Eitetsu Koh, Ho-Su Sin, Kazuyoshi Shigehara, Kazuhiro Sugimoto, Yuji Maeda, and Mikio Namiki, ESTIMATION OF THE EVOLUTIONARY TIMING, ASA 36th annual conference 2011年4月3日 Montreal Hyatt Regency (Canada)
 3. 高 栄哲、並木幹夫、ゲノム病としての男性不妊症 - AZF (Azoospermia factor)精子形成領域の微小欠失機構とヒト内因性レトロウイルスからみたY染色体ゲノム分化 - 日本遺伝学会第82回大会 2010年9月20日 北海道大学高等教育機能開発総合センター (北海道)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
高 栄哲 (KOH EITETSU)
金沢大学・医学系・准教授
研究者番号 : 90283134

(2) 研究分担者

並木 幹夫 (NAMIKI MIKIO)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：70155985

前田 雄司 (MAEDA YUJI)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：20377394

金谷 二郎 (KANAYA JIRO)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：80432128

(H21)