

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510242

研究課題名(和文)特発性男性不妊症における精巣モノADPリボシル化システムの役割

研究課題名(英文)The role of testicular mono-ADP-ribosylation in men with idiopathic infertility

研究代表者

田嶋 敦(TAJIMA, Atsushi)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：10396864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：精子形成不全を呈する男性不妊症(非閉塞性無精子症)のリスク遺伝子候補であるART3(ADP-ribosyltransferase 3)につき、(1)網羅的発現解析から、ART3と相互作用するタンパク質を複数見いだした。その中には精巣特異的に発現し、精子形成に関わることが知られている遺伝子が含まれ、機能的に有望な相互作用候補を得た。(2)統計遺伝学的解析から、非閉塞性無精子症に関与する新規リスク遺伝子座を複数見いだした。このうちの1つの遺伝子座に位置する遺伝子ファミリーと、ART3とが分子相互作用することを見いだしており、ART3を介した造精機能制御機構を理解する上での有望な候補遺伝子を得た。

研究成果の概要(英文)：ART3 (ADP-ribosyltransferase 3) have been identified as a susceptibility gene for non-obstructive azoospermia (NOA) in humans. The objective of this study was to reveal a molecular and genetic basis for further understanding of pathophysiological roles of testicular ART3 involved in male infertility. (1) A proteomic analysis indicated that ART3 directly interacted with various proteins, some of which were expressed in human testes, and involved in spermatogenesis. (2) Case-control genetic association studies in Japanese populations demonstrated three NOA susceptibility loci, one of which contained a family gene of the ART3-interacting proteins. Thought the proteomic and genetic analyses, we identified promising candidate genes which might have roles in ART3-dependent regulation of spermatogenesis in humans.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム医科学

キーワード：遺伝子相互作用解析 遺伝リスク 男性不妊症

1. 研究開始当初の背景

無精子症など、男性に起因する特発性不妊症は多因子遺伝性疾患であることが示唆されているものの、Y染色体微小欠失と高度に関連する場合を除き、その要因の多くは明らかではない。他の多因子疾患研究と同様に、ゲノム全域 SNP (single-nucleotide polymorphism) タイピングデータに基づく患者-対照関連解析アプローチからの遺伝的リスク探査が開始されていたものの、研究対象サンプル数が少なく統計学的な検出力が低いことか、真のリスク遺伝子の同定には至っておらず、この分野の更なる研究進展が望まれていた。

研究代表者らは、モノ ADP リボシル化活性を有する *ART3* (ADP-ribosyltransferase 3) が非閉塞性無精子症 (精子形成不全を伴う男性不妊症) に関わることを同定していた。日本人集団内で最も高頻度存在する *ART3* ハプロタイプ (SNP 遺伝子型の組み合わせ) が疾患群で有意に低値を示し、いわゆる「common variant (共通変異)」が疾患発症に対して予防的に寄与する可能性を見だし、*ART3* は無精子症患者の共通要因として有望な遺伝子の1つであると考えられた。そこで、*ART3* による造精機能制御機構を明らかにし、その機構異常が男性不妊症に関与することを遺伝学的に証明することに取り組むこととした。

2. 研究の目的

ART3 は、*ART1-5* 遺伝子からなる *ART* ファミリーに属し、精巣内で精母細胞特異的に発現する mono-ADP-ribosyltransferase

(mART) 酵素 (モノ ADP リボシル化に関わる酵素) である。すなわち、*ART3* 発現は精子形成過程で厳密に制御されており、その mART 活性を介して、造精機能に関与することが期待される。コレラ毒素などの細菌 mART とは基質特異性が異なると考えられているが、基礎研究の立場から未解明のことが非常に多く、その機能理解につながる知見が得られているとはいえない。そこで、本研究の目的は以下のようにした。

- (1) *ART3* 相互作用分子を網羅的に同定するとともに、相互作用に重要な *ART3* ドメインを特定する。プロテオミクス解析から、ヒト精巣において、モノ ADP リボシル化の標的となるタンパク質を同定する。
- (2) 上記(1)の知見に基づき、外部データベースを活用した情報学的分析から、*ART3* を介した分子ネットワーク (*ART3* パスウェイ) を見いだす。同定された *ART3* パスウェイは、精巣におけるモノ ADP リボシル化システムを構成すると考えられる。
- (3) 上記(2)の知見に基づき、*ART3* パスウェイ

に含まれる遺伝子につき、次世代シーケンサーを用いた DNA 変異解析を行い、特発性男性不妊症と *ART3* パスウェイ異常との関わりを遺伝学的に検証する。

3. 研究の方法

(1) *ART3* 相互作用分子の網羅的同定

改良酵母ツーハイブリッド法を用いて *ART3* と相互作用するタンパク質の網羅的同定を試みた。具体的には、2種類の転写因子 (*GAL4*, *Oct1*) 結合ドメイン、1種類の *Prey* ライブラリー (ヒト全 cDNA) を用い、全ての組み合わせでみられる *ART3* 相互作用候補を探索した。先行研究 (Okada and Tajima et al, *PLoS Genet* 2008) で取得したヒト精巣組織における網羅的遺伝子発現データに基づき、候補遺伝子のヒト精巣での発現レベルを分析した。

(2) *ART3* ネットワーク分子の統計遺伝学的解析

ヒト造精機能障害の分子遺伝学的背景を理解するための一助として、男性不妊症の一病型である非閉塞性無精子症 (NOA) の遺伝学的リスクについての研究を行った。具体的には、中国の NOA 患者を対象としたゲノム全域関連解析から報告された4つの疾患感受性遺伝子座 (Hu, Xia & Guo et al, *Nature Genet* 2012) につき、日本人集団における NOA 発症への関与の程度を患者-対照関連メタ解析 (症例 490 検体、対照 1167 検体) により分析した。各 SNP の遺伝子型は、TaqMan PCR 法、あるいは PCR-RFLP 法により決定した。

(3) 一般成人男性の生殖特性との関連分析

研究成果の一般性を評価する目的で、一般成人男性における生殖特性 (精子濃度、血中ホルモン濃度など) との関わりについての遺伝学的分析を行った。具体的には、日本人健常成人男性約 800 名 (セット 1) につき、Illumina 社 HumanCore BeadChip を用いてゲノム全域 SNP タイピングを行い、約 25 万 SNPs の遺伝子型を決定した。SNP 遺伝子型と生殖特性値との関連については、R 統計 (<http://www.r-project.org>)、PLINK (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>) を用いて分析した。年齢、BMI (Body Mass Index) で調整した検定 P 値に基づき、一定基準を満たす SNPs を関連候補遺伝として統計学的に選別し、日本人健常成人男性約 700 名 (セット 2) を用いた関連検証実験に供した。検証実験では、TaqMan PCR 法により候補 SNPs の遺伝子型を決定した。

4. 研究成果

- (1) 改良酵母ツーハイブリッド法により、*ART3* と相互作用するタンパク質の網羅的

同定を試み、ART3 の機能に関わると推定される ART ドメインに相互作用するタンパク質を複数見いだした。これら相互作用分子のなかには、精巣特異的に発現し、精子形成に関わることが知られている遺伝子が含まれることを明らかにした。ART3 は精巣内で精母細胞特異的に発現する遺伝子であることから、機能的に有望な相互作用候補を同定したと考える。

- (2) 中国の NOA 患者を対象としたゲノム全域関連解析から報告された 4 つの疾患感受性遺伝子座のうち、3 つの SNP 遺伝子座 (rs12097821 [1p13.3], rs2477686 [1p36.32], rs10842262 [12p12.1]) は、日本人 NOA 患者に対しても発症リスクを与える可能性を見いだした。このうちの 1 つの遺伝子座に位置する遺伝子ファミリーと、本研究課題の対象遺伝子である ART3 とが分子相互作用することを見いだしており、ART3 を介した分子ネットワーク (ART3 パスウェイ) を理解する上での分子遺伝学的に有望な相互作用候補を同定したと考える。
- (3) 研究成果をさらに発展させるために、一般成人男性の生殖特性 (精子濃度、血中ホルモン濃度など) との関わりについてのゲノム全域 SNP 関連分析を実施し性ホルモン、性腺刺激ホルモン濃度の個人差に関わる遺伝子候補を見いだした。精巣内相互作用のみならず、視床下部-下垂体-性腺軸システムとの連関についても今後明らかにしていく予定である。

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 13 件)

1. Yu W, Zheng H, Lin W, Tajima A, Zhang Y, Zhang X, Zhang H, Wu J, Han D, Rahman NA, Korach KS, Gao GF, Inoue I, Li X. Estrogen promotes Leydig cell engulfment by macrophages in male infertility. *J Clin Invest*, 24:2709-2721, 2014. doi: 10.1172/JCI59901 (査読有り)
2. Nishi A, Numata S, Tajima A, Kinoshita M, Kikuchi K, Shimodera S, Tomotake M, Ohi K, Hashimoto R, Imoto I, Takeda M, Ohmori T. Meta-analyses of blood homocysteine levels for gender and genetic association studies of the MTHFR C677T polymorphism in schizophrenia. *Schizophr Bull*, 2014 (in press). doi: 10.1093/schbul/sbt154 (査読有り)
3. Hata Y, Nakaoka H, Yoshihara K, Adachi S, Haino K, Yamaguchi M, Nishikawa N, Kashima K, Yahata T, Tajima A, Watanabe A, Akira S, Hosomichi K, Inoue I, Tanaka K. A nonsynonymous variant of IL1A is associated with endometriosis in Japanese population. *J Hum Genet*, 58:517-520, 2013. doi: 10.1038/jhg.2013.32 (査読有り)
4. Kinoshita M, Numata S, Tajima A, Shimodera S, Imoto I, Ohmori T. Plasma total homocysteine is associated with DNA methylation in patients with schizophrenia. *Epigenetics*, 8:584-590, 2013. doi: 10.4161/epi.24621 (査読有り)
5. Sato Y, Jinam T, Iwamoto T, Yamauchi A, Imoto I, Inoue I, Tajima A. Replication study and meta-analysis of human nonobstructive azoospermia in Japanese populations. *Biol Reprod*, 88:87, 2013. doi: 10.1095/biolreprod.112.106377 (査読有り)
6. Kinoshita M, Numata S, Tajima A, Ohi K, Hashimoto R, Shimodera S, Imoto I, Itakura M, Takeda M, Ohmori T. Meta-analysis of association studies between DISC1 missense variants and schizophrenia in the Japanese population. *Schizophr Res*, 141:271-273, 2012. doi: 10.1016/j.schres.2012.07.020 (査読有り)
7. Yoshihara K, Tsunoda T, Shigemizu D, Fujiwara H, Hatae M, Masuzaki H, Katabuchi H, Kawakami Y, Okamoto A, Nogawa T, Matsumura N, Udagawa Y, Saito T, Itamochi H, Takano M, Miyagi E, Sudo T, Ushijima K, Iwase H, Seki H, Terao Y, Enomoto T, Mikami M, Akazawa K, Tsuda H, Moriya T, Tajima A, Inoue I, Tanaka K for The Japanese Serous Ovarian Cancer Study Group. High-risk ovarian cancer based on 126-gene expression signature is uniquely characterized by downregulation of antigen presentation pathway. *Clin Cancer Res*, 18:1374-1385, 2012. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2725 (査読有り)
8. Nakabayashi K, Tajima A, Yamamoto K, Takahashi A, Hata K, Takashima Y, Koyanagi M, Nakaoka H, Akamizu T, Ishikawa N, Kubota S, Maeda S, Tsunoda T, Kubo M, Kamatani N, Nakamura Y, Sasazuki T, Shirasawa S. Identification of independent risk loci for Graves' disease within the MHC in the Japanese population. *J Hum Genet*, 56:772-778, 2011. doi: 10.1038/jhg.2011.99 (査読有り)
9. Nakaoka H, Cui T, Tajima A, Oka A, Mitsunaga S, Kashiwase K, Homma Y, Sato S, Suzuki Y, Inoko H, Inoue I. A systems genetics approach provides a bridge from discovered genetic variants to biological pathways in rheumatoid arthritis.

PLoS ONE, 6:e25389, 2011. doi:
10.1371/journal.pone.0025389 (査読有り)

〔学会発表〕 (計 1 1 件)

1. Kinoshita M, Numata S, **Tajima A**, Shimodera S, Imoto I, Ohmori T: Genome-wide association study of plasma homocysteine and DNA methylation in patients with schizophrenia. 11th World Congress of Biological Psychiatry. 2013 年 6 月 23 日～27 日. 国立京都国際会館 (京都府)
2. Nishi A, Numata S, **Tajima A**, Kinoshita M, Shimodera S, Ohi K, Hashimoto R, Imoto I, Takeda M, Ohmori T: Functional variants of the MTHFR gene and schizophrenia in the Japanese population. Neuro2013. 2013 年 6 月 20 日～23 日. 国立京都国際会館 (京都府)
3. 阿部夏季、菅恵梨、**田嶋敦**、井本逸勢: HNF1B、JAZF1 多型の前立腺がん発症リスクに関するメタアナリシス. 日本人類遺伝学会第 57 回大会. 2012 年 10 月 24 日～27 日. 京王プラザホテル (東京都)
4. 渡邊美恵、**田嶋敦**、井本逸勢: 多因子遺伝性疾患における遺伝的リスクの集団間差: 東アジアにおける 2 型糖尿病関連遺伝子多型を例として. 日本人類遺伝学会第 57 回大会. 2012 年 10 月 24 日～27 日. 京王プラザホテル (東京都)
5. 久須美真紀、中林一彦、前原佳代子、**田嶋敦**、副島英伸、吉原一、秦健一郎: 生殖補助医療技術が出生時の DNA メチル化状態に及ぼす影響の検討. 日本人類遺伝学会第 57 回大会. 2012 年 10 月 24 日～27 日. 京王プラザホテル (東京都)
6. **田嶋敦**: マイクロ RNA ネットワークの遺伝的多様性とヒト疾患との関わり. 日本人類遺伝学会第 56 回大会. 2011 年 11 月 9 日～12 日. 幕張メッセ (千葉県)
7. 中岡博史、崔泰林、**田嶋敦**、光永滋樹、猪子英俊、井ノ上逸朗: 関節リウマチにおけるシステムズ・ジェネティクス・アプローチ～感受性遺伝子座から生物学的経路の推定. 日本人類遺伝学会第 56 回大会. 2011 年 11 月 9 日～12 日. 幕張メッセ (千葉県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田嶋 敦 (TAJIMA, Atsushi)
徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究
部・准教授
研究者番号: 10396864