

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670679

研究課題名(和文)非コードDNA-男性不妊症をひき起こすAlu配列に関連した遺伝子異常を検索する-

研究課題名(英文)Exploration of gene impairments associated with non-coding DNA, which involves in an Alu sequences causing male infertility

研究代表者

並木 幹夫(NAMIKI, Mikio)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：70155985

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文): Y染色体遠位側にあるBPY2遺伝子とAlu配列間にRepeatMaskerの分析および患者精巣組織の遺伝子発現実験において関連はなかった。一方、公開されているアレイデータベースを利用して、バイオインフォマティクス手法を用いてリボソーム経路が精子形成に関与している事を明らかにした。リボソームの塩基配列はSINE由来と考えられているので、Y染色体遠位部領域にあるnon-coding RNA配列と各リボソーム配列の関連について分析が必要である事を示唆した。

研究成果の概要(英文): Both BPY2 genes and Alu sequences located in distal of Y chromosome were not correlated with each other using RepeatMasker database or gene expression study in patients' testicular samples. According to technique of the bioinformatics, we demonstrated that ribosomal pathway was involved in spermatogenesis in this study. Because the ribosomal sequences were thought to be SINE origin, we propose to suggest evaluation between non-coding RNA sequences in the distal region of Y chromosome and each ribosomal sequences.

研究分野: 泌尿器科学

キーワード: 男性不妊症 ゲノム Y染色体 AZF Alu配列 SINE バイオインフォマティクス パリンドローム

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムが確定して、数十年になるが、ゲノムの大部分に存在する、非コード DNA の機能や意味については未だ十分に研究されていない。とくに、この領域は繰り返し配列に富み、レトロウイルス感染による痕跡により、レトロエレメントとよばれている。さらに、生物の進化の過程での一気に組み込まれた時期があり、とくに霊長類への進化に大きな影響を与えたと考えられる。レトロウイルスの構造から、両端に存在する LTR (long terminal repeat) の有無によってなされ、ヒト Alu 配列は制限酵素 AluI の認識配列 AGTC が含まれていたところから名付けられ、SINE (short interspersed nuclear element, 短い分散型核内反復配列) に分類されている。ハプロイドあたり 100 万以上のコピーをもつレトロトランスポゾン (retrotransposon; RT) である。本研究を始めるにあたって、これらのレトロエレメントに起因する疾病はゲノム病の一つと呼ばれていた。Alu 配列を原因とする疾患として、ある種の高コレステロール血症や血友病 B、乳がん BMCA2 の異常、デュシャン

ヌ型筋ジストロフィーなどの疾病が報告されていた。本研究のテーマである、男性不妊症も多くは原因不明であり、ゲノム配列の異常による可能性が想定できた。それは、2007 年には Alu 配列について、男性不妊症発症の可能性を報告し 1) 2008 年には日本人のヒト内因性レトロウイルス (human endogenous retrovirus; HERV) による Y 染色体の微小欠失を報告した 2) 。

また、2010 年には Y 染色体の構造的特徴であるパリンδροーム構造の由来を HERV の感染時期で明らかにした 3) 。

2011 年には HERV が不妊発症の原因の一つであることを証明した 4) 。

これらの知見を基礎に、男性不妊症の一部にゲノム病と考えられる病態があると想定した。当初は非 LTR 型 RT である、Alu 配列に焦点を合わせた。

さらに、全ゲノムを対象にするのではなく、男性不妊症の遺伝学的原因として最もよく知られるは Y 染色から分析することにした。

<引用文献)>  
1) Choi, J., Koh, E., Namiki, M et al. Alu sequence variants of the BPY2 gene in proven fertile and infertile men with Sertoli cell-only phenotype Int J urol 14: 431-435 2007

2) Choi J, Koh E, Namiki M, et al. Study of azoospermia factor-a deletion caused by homologous recombination between the human endogenous retroviral elements and population-specific alleles in Japanese infertile males. Fertil Steril 89:1177-82 2008

3) Sin HS, Koh E, Namiki M. et al. Human endogenous retrovirus K14C drove genomic diversification of the Y

chromosome during primate evolution. J Hum Genet 55:717-725 2010

4) Sin HS, Koh E, Namiki M, et al. A novel Y chromosome microdeletion with the loss of an endogenous retrovirus (ERV)-related testis-specific transcript in AZFb region J Urol 186: 1545-52 2011

## 2. 研究の目的

ヒトの非コード DNA は全ゲノム配列の 98% を構成し、その 10 % が Alu 配列である。また、そのコピーはゲノム内に 100 万以上散在している。レトロエレメントはゲノムへの挿入位置によって、エクソンの修飾や相同再組み換えによって遺伝子に変異する可能性がある。本研究はヒトへの進化後、Alu 配列の修飾が男性不妊症の原因となることを仮定している。Y 染色体遠位側にある精子形成領域 (遺伝子 BPY2 近傍など) の非コード DNA を分析し、有意な結果を得られなければ、BIOINFORMATICS の手法により、この領域 (Y 染色体遠位部) の SINE を分析して、ゲノム病としての男性不妊を惹起する機序について解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

当初の研究は主に患者サンプルを中心に有意な結果を得るため実験を行った。Y 染色体パリンδροーム 1,2,3 近傍に焦点を絞って reference sequence における反復配列を RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org/>) を用いて確認した。さらに、これらの実験結果を踏まえて、さらに公開されているさまざまな bioinformatics のデータベースから検索した。とくに、発現実験にはマイクロアレイデータが公開されている Gene Expression Omnibus (GEO) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) を利用した。さらに、これらのアレイデータに対して Differentially Expressed Gens Analysis (DGA) は Benjamin and Hochberg 法によった 5) 。

さらに、遺伝子群に対する用語検索を、Gene Ontology Analysis (GOA) (<http://geneontology.org/page/go-enrichment-analysis>) で、遺伝子群の特徴を検索した。また、連結機能分析を Kyoto Encyclopedia of genes and Genome (KEGG) (<http://www.kegg.jp>) にアクセスし施行した。

## 4. 研究成果

5) Benjamini, Y and Hochberg, Y Controlling the false discovery rate: a practical and powerful 250 approach to multiple testing. Journal of the Royal Statistical Society, Series B (Methodological), 251 1995: p. 289-300.

(1) Y 染色体遠位部には 8 ヶのパリンδροーム構造があり、その最も遠位側パリンδροームを P1 と呼び、精子形成に関わる AZF

(azoospermia factor)領域であり、AZFc領域である。この領域にあるBPY2は3コピーあり各21kbpのサイズである。

RepeatMaskerで検索するところ537のAlu配列が確認された。これらのうちBPY2およびその近傍に存在するAlu配列に限定して調べたところ、3つ存在するBPY2のコピー全てにおいてその領域内にはAlu配列は認めず、その前後約10-20kbpに限定するとそれぞれのコピーの上流、下流において2つずつ計12のAlu配列を認めた。ダイレクトシーケンス法で、まずコントロールとしての130の妊孕性患者の塩基配列に対して、不妊症患者ゲノム400例DNAの解析で意味のあるSINEは確認できなかった。また当初予定していたBPY2の発現もcDNAが得られているものに関して定量RT-PCRを行い確認したが、有意な結果を認めなかった。

(2) AZFc領域であるBPY2は3コピーある。この領域のP3にある単独BPY2付近ゲノムとP1にある対面するBPY2対を分析した。

前者は(chrY:251304410-2515160, 順方向)領域にあり、後者は2ヶ所(Y染色体物理学的位置、chrY:26764151-26785352 順方向とchrY:27177050-27198251 逆方向)のパリンドローム構造をした対領域である。これらの各領域サイズは21202bpであった。さらに、(1)で分析データと比較したが、SINEのみならずLINEおよび繰り返し配列を中心に非コード領域を分析したが、有意な結果を得ることができなかった。

(3) BPY2を含むパリンドローム領域の発現を検証するため bioinformatics の手法を用いた。GEO から高度乏精子症患者アレイデータ8サンプルと13正常精子をコントロールアレイを選択した。これらアレイのプラットフォームはAffymetrix Human Genome U133 Plus 2.0であった。GEO から21サンプルを標準化して、64356 遺伝子を候補としてデータベース化した。DGAはコントロールに対してfold change 値を2.5倍に設定すると、510の候補遺伝子がヒットした。そのうち127はアップレグレートされ、383はダウンレグレートされていた(P値<0.001)。

(4) これらを、さらにGOAを用いて分析した。条件をP<0.05)に設定すると表1のような結果を得た。

これらの一連の遺伝子群は生化学的な過程が有意差を持って確定でき、転写、配偶子産生およびリボソームに参与している事が示唆された。

Terms	Biological Process	P Value
GO:0006414	translational elongation	4.50E-41
GO:0006412	translation	5.11E-27
GO:0019953	sexual reproduction	7.91E-07
GO:0007283	spermatogenesis	2.62E-06
GO:0048232	male gamete generation	2.62E-06
GO:0007276	gamete generation	4.26E-05
GO:0042273	ribosomal large subunit biogenesis	5.16E-05
GO:0048609	reproductive process in a multicellular organism	1.54E-04

(表1)

さらに、これらの遺伝子の生化学的経路はKEGGで分析すると、表2の二つの経路がヒットした。

Terms	Description	Count	Adjusted P Value
hsa03010	Ribosome	39	2.52E-37
hsa03022	Basal transcription factors	4	0.08

(表2)

本分析において、リボソーム経路が精子形成に大きく参与している。リボソームのゲノム配列の由来はSINEと考えられているので、Y染色体遠位部と各々リボソーム配列の関連について分析することが必要である。

## 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4件)

1) Sato Y, Tajima A, Tsunematsu K, Nozawa S, Yoshiike M, Koh E, Kanaya J, Namiki M, Matsumiya K, Tsujimura A, Komatsu K, Itoh N, Eguchi J, Imoto I, Yamauchi A, Iwamoto T. An association study of four candidate loci for human male fertility traits with male infertility. Human reproduction : 30 (6) 1510-1514, 2015. (査読有)

<http://humrep.oxfordjournals.org/content/30/6/1510.long>

2) Sato Y, Tajima A, Tsunematsu K, Nozawa S, Yoshiike M, Koh E, Kanaya J, Namiki M, Matsumiya K, Tsujimura A, Komatsu K, Itoh N, Eguchi J, Imoto I, Yamauchi A, Iwamoto T. Lack of replication of four candidate SNPs implicated in human male fertility traits: a large-scale population-based study. Human reproduction : 30(6)1505-1509, 2015. (査読有)

<http://humrep.oxfordjournals.org/content/30/6/1505.long>

3) Sato Y, Shinka T, Nozawa S, Yoshiike M, Koh E, Kanaya J, Kanaya J, Namiki M, Matsumiya K, Tsujimura A, Komatsu K, Itoh N, Eguchi J, Imoto I, Yamauchi A, Iwamoto T. Y chromosome haplogroup D2a1 is significantly associated with high levels of luteinizing hormone in Japanese men. Andrology : 8 APR 2015. (査読有)

DOI: 10.1111/andr.12026

4) Miyamoto T, Koh E, Tsujimura A, Miyagawa Y, Minase G, Ueda Y, Namiki M, Sengoku K. SIN3A mutations are rare in men with azoospermia. Andrologia : Nov 13 2014. (査読有) doi: 10.1111/and.12379.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

並木 幹夫 (NAMIKI, Mikio)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：70155985

(2) 研究分担者

泉 浩二 (IZUMI, Kouji)

金沢大学・医学系・特任助教

研究者番号：80646787

高 栄哲 (KOH, Eitetsu)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：90283134