

平成 21年 4月 10日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390412
 研究課題名（和文） ゲノム病としての男性不妊症の研究 - 内在性レトロウイルスエレメントを中心として -
 研究課題名（英文） A study of male infertility regarding as genome disease focusing on function of human retrovirus elements.
 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：

HERV に関する塩基配列から Y 染色体に TTY family に注目した。TTY9, TTY10, TTY13 の 3 種を検索でき、これらの転写物が精子形成に関与しているかを検討した。TTY13 は相同性再組み換えが生じていることを見だし、この再組換えは組織型が悪くなるにつれて、増加することを明らかにした。本研究は Y 染色体長腕上にある精子形成領域 AZFb において、マイクロ染色体内相同再組換えの結果、男性不妊症を惹起していることを証明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2008年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

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：内因性レトロウイルス、男性不妊、トランスポゾン、精巣、再組換え、Y 染色体

1. 研究開始当初の背景

ゲノムプロジェクトがほぼ終了し、その情報を有意に利用できる環境になった。ヒトゲノムの塩基配列は遺伝子に関与しない 98% に及ぶ繰り返し配列から構成されており、さらに、それらの約半分は、転移因子 (transposal element; TE) 由来であると考えられている。これら TE の特徴は、レトロウイルスの基本構成成分の断片をもち、相同性の高い繰り返し配列やポリ A などの遺伝子に関与する可能

性のある塩基配列を内在していることにある。このような塩基配列が集積すると、ゲノムの欠失や重複を生じ、遺伝子発現の多様性に関与することになる。一方、染色体における再組換えも、日常みられる相同染色体間のみならず、同一染色体内、さらに娘染色体内でも生じ得ることが明らかになってきている。すなわち、このような染色体再構成に基づいて、ゲノムの量的変化が生じ、何らかの

異常が惹起され、病的疾患に至ったものを「ゲノム病」ということができる。特発性男性不妊症の一部には、このような機序によって惹起される可能性があり、本研究では「ゲノム病」の視点で、本疾患の機序を解明することにある。

本研究は TE として、長い分散する反復配列 (long interspersed nuclear element ; LINE) と短い分散する反復配列 (short interspersed nuclear element ; SINE) のみならず、長い末端配列 (long terminal repeat ; LTR) をもつ、内在性レトロウイルスゲノム (endogenous retrovirus ; ERV) に注目した。このような ER に由来する塩基配列は、霊長類への進化の過程で爆発的に増加し、ヒトへの進化の過程でレトロウイルスの役割が無視できない存在であることを示唆している。実際、レトロウイルスに感染した痕跡がヒトゲノムに残っており、ERV は LTR をマーカーにすることができるとともに、臨床的に大きな意味をもつことがある。とりわけ、これらのウイルスの断片がヒトゲノムの遺伝子に影響を与えている証拠もある。たとえば、ウイルス断片がプロモーター領域へ挿入され、エクソン化、ポリ A 化などの塩基配列が新たに付加し、その結果、遺伝子の発現に影響を与えている。これらは、必ずしも病的であるのではなく、遺伝子発現の様々なアイソフォームとして存在し、その多様性を保証し、進化によって獲得されたものであると考えられる。被感染者にとって、異常な表現型であれば「ゲノム病」であり、若干の変化なら、淘汰圧にさらされ、進化の原動力であるともいえる。一方、ヒトの ERV である HERV 配列は、霊長類に進化後から比較的最近に至るまで、ヒトゲノムに集積され、現在のわれわれのゲノム内にすでに存在している。何らかの染色体の再構成はウイルスが活性化、否、

HERV によって挿入された相同配列によって再組換えを生じる潜在的な可能性を秘めていることになる。

本研究では、主に Y 染色体に焦点をあてている。Y 染色体の長腕上には精子形成領域があり、AZF (Azoospermia factor) と呼ばれている。AZF の欠失領域は、その精巣の組織表現型から、AZFa, b, c3 領域に分類されている。Y 染色体は全ゲノムの解読によって、構造的な特徴が明らかになっている。それは、8 つの巨大なパリンδροーム回文構造 (P1-P8) をもち、最も遠位側のパリンδροーム 1 (P1) は約 3.5 Mb のサイズであり、さらに細分化された小さなパリンδροーム複合体を形成する。P1 は Y 染色体長腕遠位側にあり、AZFc 領域とほぼ一致していると考えられている。AZFc 欠失はパリンδροーム複合体の一部である b2 と b4 間の相同組み換えによって (言い換えれば b2 と b4 が融合するため) b2 と b4 間で挟まれた領域が欠失する。すなわち、相同再組換えによって、その内部が欠失する、前述した「ゲノム病」と考えることができ、他領域の相同再組換えによるゲノム病の同定が、本研究の主なターゲットになる。

さらに、全ゲノムプロ解読ジェクトの大きな成果として、ノンコーディング RNA の存在を明らかになったことである。すなわち TE 由来の転写物や、意味のないと考えられた転写産物の存在の意味の確認である。本研究のもうひとつのターゲットとして、Y 染色体上の配列から転写されている、転写物 (RNA) に注目している。現在、Y 染色体由来の約 17 種のヒト testis transcript on Y (TTY) と呼ばれる精巣転写物が同定されている。TTY9, 10, 13, 15 などは精巣からの転写物であり、AZFb 領域にある。すなわち、レトロウイルスの挿入とゲノム、それから生じるノンコーディング RNA の関係の解明が本研究のテー

マである。

2 . 研究の目的

男性不妊症をゲノム病と考え、その病因をゲノム再構成と考え、レトロウイルスが再構成の基質であることを証明し、AZF 領域に存在するパリンドローム複合体による、転写産物 (TTY) との関係を実証することにある。

3 . 研究の方法

バイオインフォマティクス手法より、NCBI の GenBank に公開されているヒトゲノム塩基配列から Y 染色体に焦点を絞り、リピート配列を検索した。Y 染色体には、精子形成候補遺伝子が存在しているため、本研究では Y 染色体長腕上のゲノムシーケンスをスクリーニングした。そのメルクマールにするのは、HERV に存在する LTR である。HERV の分析には 1) すでに公開されている HERV ファミリーのゲノム上の位置を同定し、本研究の標的領域に対応させ候補転写物を決定すること 2) レトロウイルスの構成としてレトロウイルスのコンポーネントの発現 (転写産物) から解析する方法 3) Y 染色体遺伝子近傍領域における LTR の分布などをスクリーニングする方法などがあり、これらを方法を組み合わせてアプローチした。

本研究では、LTR を中心にその構成物を挟むように PCR プローブを作成し、分析するとともに、HERV の構造が確定したら、レトロウイルスの構成物の転写物 (transcript) と転写物 (translate) を確認し、不妊患者と妊孕性の証明されているボランティアとの差を確認した。LTR で絞り込んだ候補に対して、ヒトゲノムおよび精巣 cDNA を用いて、PCR を行うことによって、再組換え領域を確定した。さらに、再組換え産物について、臨床的に意味をもつか、とくにノンコーディング

RNA を標的に行った。

本来レトロウイルスは、その構造上 5 と 3 側に LTR を持っているが、これらのシーケンスはほぼ等しいので、進化の過程で再組換えに曝される機会が増し、LTR どうしの相同再組換えが生じ solitary LTR を生じる。この、solitary LTR を各霊長類 (チンパンジー、ゴリラ、オランウータン、日本ザルなど) に対して検証して、その挿入集積時期を明らかにした。

4 . 研究成果

HERV に関与する塩基配列から Y 染色体に TTY family に注目した。Genbank 検索にて、AZFb 領域にある ERV 関連 TTY を検索した。TTY9, TTY10, TTY13 の 3 種を検索でき、これらの転写物が精子形成に関与しているかを検討した。とくに、TTY13 は HERV-K14C が組み込まれ、精巣特異的に発現している事を明らかにし、有力な精子形成候補とした。Normal, hypospermatogenesis, maturation arrest, Sertoli cell only, tubular sclerosis の組織像を呈する患者サンプルを用いて、TTY13 のゲノムおよび転写物を検証した。すると、ゲノム DNA において、PCR においてサイズの大きいバンド、2 本のバンドおよびサイズの小さいバンドを認めた。これらの各バンドの塩基配列を確認すると、内因性レトロウイルス (ERV) の両端にある LTR の約 170bp の相同部分で相同性再組換えが生じていることを見いだした。この再組換えの生じた個体の転写物は発現していないことを確認した。さらに、この再組換えは組織型が正常から、Sertoli-only syndrome にいたるにつれて、増加することを明らかにした。この HERV は HERV-K14C に分類され、エクソン化に関与し、550 万年前、ヒトがチンパンジーであったときに感染したものであることも証明した。本研究は Y 染色体長腕上にある精子形成領域

AZFbにおいて、マイクロ染色体内相同再組換え (intra-homologous recombination) が生じ、男性不妊症の原因になっていることを証明した。さらに、それが人類の進化の過程でレトロウイルスに感染した結果であり、この研究が男性不妊症への新たな機序のひとつを証明し、診断および遺伝子異常カウンセリングに有用であることを示した。

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6件)

- 1) 高栄哲、杉本和宏、成本一隆、泉浩二、並木幹夫 男性不妊症と遺伝子異常 Urology View 77-85 Vol.6 No.5 2008 査読無
- 2) Miyamoto T, Koh E, Sakugawa N, Sato H, Hayashi H, Namiki M, Sengoku K. Two single nucleotide polymorphisms in PRDM9 (MEISETZ) gene may be a genetic risk factor for Japanese patients with azoospermia by meiotic arrest. Assist Reprod Genet. 25, 553-557 2008 査読有
- 3) Tsai-Morris CH, Koh E, Dufau ML. Differences in gonadotropin-regulated testicular helicase (GRTH/DDX25) single nucleotide polymorphism between Japanese and Chinese populations. Hum Reprod 23, 2611-2613. 2008 査読有
- 4) Choi J, Koh E, Matsui F, Sugimoto K, Suzuki H, Maeda Y, Yoshida A, Namiki M 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, 1177-1182. 2008 査読有
- 5) 高栄哲 ゲノム病としての男性不妊症 - Y染色体とAZF(Azoospermia)からさぐる-

金沢大学十全医学会雑誌 116(1), 16-20
2007 査読無

6) 高栄哲, 前田雄司、並木幹夫 男性不妊症における遺伝子検査 モダン フィジシャン 27 (12) 1610-1613 2007 査読無

[学会発表](計10件)

1) Eitetsu Koh Clinical azoospermia; Genomic rearrangement and azoospermia 9th International Congress of Andrology 2009.3. 7-10 (Barcelona), Spain

2) 高栄哲、並木幹夫 Y染色体内再組換えからみるゲノム病としての男性不妊症 第13回日本生殖内分泌学会学術集会 2008.11.29 大阪国際会議場 (大阪府)

3) Eitetsu Koh Male infertility and genomic rearrangement on AZF (azoospermia factor) region in human Y chromosome The 3rd Great Wall International Andrology Forum (GIAF2008), 2008.10.18 Guangxi Guilin (Kei-rin), China

4) 高栄哲 ヒト内因性レトロウイルス (HERV)をマーカーにしたY染色体パリンドローム進化と男性不妊 日本アンドロロジー学会 27回学術大会 2008.7.4 先斗町歌舞練場 (京都市)

5) 申湖水、杉本和宏、下田ちはる、山本健朗、前田雄司、高栄哲、並木幹夫、吉田淳 Y染色体上 AZFb 領域のゲノム不安定はHERV-K14Cの挿入による 第96回日本泌尿器科学会総会 2008.4.25-27 パシフィコ横浜 (横浜市)

6) Eitetsu Koh, Ho-Su Sin, Kazuhiro Sugimoto, Chiharu Shimoda, Yuji Maeda, Mikio Namiki, Two opposite views of HERV-K14C in male spermatogenesis ASA 33rd Annual Conference April 12-15, 2008 Hyatt Regency Albuquerque

(Albuquerque), NM, USA

7) 申湖水、下田ちはる、鈴木ひろみ、杉本和宏、前田雄司、高栄哲、並木幹夫、吉田淳
Y 染色体進化とヒト内因性レトロウイルス
(human endogeneous retrovirus; HERV)
-K14C 第 17 回泌尿器科分・細胞研究会
2008.2.16 大手町サンケイプラザ (東京都)

8) Ho-Su Sin, Eitetsu Koh, Hiromi Suzuki, Kenrou Yamamoto, Chiharu Shimoda, Yuji Maeda, Mikio Namiki, Atsumi Yoshida
Genomic features of ERV-related TTY family in Azoospermia b region (AZFb)
Florence-Utah International Symposium : Genetics of Male Infertility Sep 15 2007 (Florence), Italy

9) 申湖水、下田ちはる、鈴木ひろみ、杉本和宏、前田雄司、高栄哲、並木幹夫、吉田淳
AZFb 領域内 TTY ファミリーに関する内因性レトロウイルスゲノム特性について
第 26 回日本アンドロロジー学会学術大会
2007.7.5-6 ディズニーアンバサダーホテル (浦安市)

10) 下田ちはる、鈴木ひろみ、Ho-su Sin、杉本和宏、前田雄司、高栄哲、並木幹夫 吉田淳
日本人 AZF(Azoospermia factor)a 領域の欠失とヒト内因性レトロウイルス
第 26 回日本アンドロロジー学会学術大会
2007.7.5-6 ディズニーアンバサダーホテル (浦安市) (アンドロロジー学会賞授与)

[図書](計 1 件)

高栄哲、並木幹夫 生殖医療ガイドライン
2007 日本生殖医学会編 染色体検査・Y 染色体微小欠失 (159-160) 金原書店 東京
2007

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

金谷 二郎 (KANAYA JIRO)
金沢大学・附属病院・助教
研究者番号：80432128

前田 雄司 (MAEDA YUJI)
金沢大学・医学系・助教
研究者番号：20377394

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

Heui-Soo Kim
韓国 Pusan 国立大学・生物科学科・教授

木村 春彦 (KIMURA HARUHIKO)
金沢大学・電子情報学系・教授
研究者番号：60141371