

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590576

研究課題名(和文) 不妊症に関する遺伝子解析法および遺伝的背景の研究

研究課題名(英文) Study of gene analysis method and genetic background on infertility

研究代表者

梅野 真由美 (UMENO MAYUMI)

徳島大学・大学院ヘルパバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：00213497

研究成果の概要(和文):男性不妊症患者のY染色体の微少欠失の解析については、Multiplex PCR法およびマイクロチップ電気泳動法を使用する、簡単で迅速な解析法の開発を行った。さらに、DNA抽出操作が省略できる血液直接PCR法の導入も可能であることがわかった。

性決定因子であるSRYは、proto Y染色体上にあったSOX3(SRY-related HMG-box3)遺伝子の upstream にDGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8)のcDNAが挿入し、誕生したことが明らかとなった。また、Y染色体多型解析の結果、日本人男性はC, DE, O2b*, O2b1, O3のグループに分類され、遺伝的に異なった2つの集団(縄文系、弥生系)から成り立っていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文): We developed a rapid and simple system of detecting deletions on the Y chromosome related with male infertility using multiplex PCR and microchip electrophoresis. Moreover, direct PCR from whole blood was found to be able to use.

The mammalian *SRY* gene emerged by the gain-of-function mechanism; cDNA of the *DGCR8* gene was inserted upstream of an ancestral *SOX3* gene on proto-sex chromosomes. As a result of Y chromosomal polymorphism analysis, the Japanese men were classified in the haplogroup C, DE, O2b*, O2b1 and O3, and two genetic different populations (Jomon and Yayoi) exist in Japan.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：臨床検査学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：不妊症、遺伝子解析

1. 研究開始当初の背景

不妊症は重要な社会問題となっている。こ

のうちの男性不妊症の病因は、精子形成障害、精子輸送路通過障害、副性器感染症および性機能障害に大別される。この中で、精子形成

障害によるものが不妊症原因のほとんどを占め、そのうちの特発性精子形成障害が、男性不妊症の原因の半数以上を占めると言われているが、その病因、病態はほとんどわかっていない。現在、Y染色体上の精子形成にかかわる遺伝子が、一部の無精子症の患者において欠失していることが判明し、Y染色体の長腕に存在する無精子症候補領域 AZF (azoospermic factor) a, AZFb および AZFc の欠失部位と、特発性精子形成障害との関係に関する研究が行われている。しかし、特発性無精子症の原因遺伝子は明らかにされていない。

2. 研究の目的

男性不妊症の、特発性無精子症の一部の患者に、Y染色体微小欠失がみられることが報告されているが、現在、臨床検査の分野では、Y染色体の遺伝子解析はほとんど行われておらず、ルーチン検査として簡単に短時間でできる解析システムの構築を目指したいと考えている。また、特発性無精子症の原因遺伝子は明らかになっておらず、この原因遺伝子を見出し、正確で、効率的な診断方法を確立することは、臨床検査学の分野で極めて重要なことだと考えられる。

すでに、男性不妊症患者のY染色体の微小欠失の解析については、Multiplex PCR法およびマイクロチップ電気泳動法を使用する、簡単に迅速な検査法について開発を進めているが、さらに血液直接PCR法の導入なども含めて、実用化に向けて研究を進展させる予定である。

また、遺伝的背景の研究として、Y染色体の多型解析や、性決定遺伝子であるSRYの成り立ちについても研究を行いたい。

3. 研究の方法

(1) 男性不妊症におけるY染色体の欠失解析法の研究

男性不妊症患者のY染色体の微小欠失の解析法については、Multiplex PCR法およびマイクロチップ電気泳動法を使用する迅速解析法について研究した。

まず、効率的に解析するための新しいプライマーセットを作製した。

Y染色体上の無精子症候補遺伝子 DBY (DEAD/HboxpolypeptideY: AZFa)、RBM1 (RNA-binding motif Y: AZFb)、DAZ (deletion azoospermia: AZFc) および、精巣決定遺伝子 SRY (Sex determining Region Y)、性別 (Y) 判定に頻用される遺伝子 AMELY (amelogenin Y)、さらに PCR 反応増幅の内部標準として X染色体上の遺伝子 AMELX (amelogenin X) を加えた計 6 座位について、Multiplex PCR

法により同時に増幅できるようなプライマーを設計した。検体としては、インフォームドコンセントの得られた男性不妊症患者 (無精子症および乏精子症) と、コントロールとして、女性および子供を持つ男性の末梢血より抽出した DNA を用いた。

まず、Multiplex PCR 法の条件検討を行い、決定した最適条件で PCR 増幅後、アガロースゲル電気泳動を行い、写真撮影して目的バンドを確認した。

さらに、マイクロチップ電気泳動システムを使用した検出法についても研究を行った。日立マイクロチップ電気泳動システム (SV-1210、i-チップ 12 レーン用、i-SDNA12 キット) および、BIO-RAD Experion システム (DNA 1K Analysis Kit) の 2 種類について検討した。

また、さらに迅速に解析が行えるように、DNA 抽出の必要がない血液直接 PCR 法を用いた方法についても検討を行った。通常の PCR buffer の代わりに、Ampdirect Plus (島津製作所) を用いて、サンプル (EDTA 添加血液) を PCR 増幅し、従来の Multiplex PCR 法同様に検出を行って判定した。

(2) Y染色体に関する遺伝的背景の研究

データベース検索を用いて、SRY 近傍のアミノ酸配列の検討から SRY の成り立ちについて仮説設定を行い、モチーフ検索により、転写候補因子を同定した。同定した転写因子が SRY の発現を誘導させるのか調べるために、ルシフェラーゼ解析、ゲルシフトアッセイなどを行った。

また、Y染色体の多型解析は人類の進化、人種・民族などのルーツや移動を調査するのに用いられている。今回、日本人およびベトナム人男性について Y染色体のハプロタイプの解析を行った。Y染色体上に存在する 3 種類の biallelic marker (SRY, DXYS5Y, YAP) を用いて、Y染色体のハプロタイプを分類した。さらに、Y染色体を詳細にタイピングするために、DHPLC を用いて、Y染色体上の SNPs (single nucleotide polymorphism) の解析を行った。

(3) 不妊症に関する関連研究

人工的に卵を活性化する方法として、カルシウムイオノファとロスコピチンを併用し、マウス卵を用いてMPF活性の変化および形態学的変化を経時的に測定・観察し、それぞれの関連性について検討した。

4. 研究成果

(1) 男性不妊症におけるY染色体の欠失解析法の研究

男性不妊症患者のY染色体の欠失解析法に使用するプライマーセットの特徴として、

Y染色体の短腕から長腕にかけて、目的遺伝子座位が順番に整列するように、PCR産物のサイズを段階的に増加させ、検出後直ちに欠失判定ができるように工夫したが、いずれの方法で検出しても、大変良好な結果がた。

日立マイクロチップ電気泳動システム (SV-1210、i-チップ 12 レーン用、i-SDNA12 キット) を使用すると、アガロース電気泳動で得られた結果に相当する位置にピークが認められ、良好に分離できた。泳動は、12 検体同時に 6 分 30 秒で終了し、迅速に解析できた。

BIO-RAD Experion システム (DNA 1K Analysis Kit) を使用したところ、泳動は 11 検体 30 分程度必要であるが、明瞭なピークが確認できた。

男性不妊症患者のY染色体の微少欠失の解析法については、以上のように、Multiplex PCR法およびマイクロチップ電気泳動法を使用する、簡単で迅速な検査法について開発を進めているが、さらに効率的に解析を行うために、DNA抽出操作が省略できる血液直接PCR法の導入を検討した。島津製作所の、Ampdirect Plus を用いると、血液からDNAを抽出することなく、全血0.2 μ lを直接添加してPCRを行うことが可能であり、良好な結果が得られた。さらに、2種類のマイクロチップ電気泳動装置を用いても迅速に解析でき、Y染色体欠失解析への臨床応用が期待できた。

また、20年度、この研究に関する特許を取得することができた。

現在、卵細胞質内精子注入法 (ICSI) などの生殖補助医療技術が、男性不妊症患者に応用されるケースが増加しており、今後ますますY染色体欠失解析の必要性が高まるものと思われる。本研究の成果である、迅速かつ簡便なY染色体欠失解析システムの開発は有意義であると考えられる。

(2) Y染色体に関する遺伝的背景の研究

もともとY染色体はX染色体と相同であり、常染色体としてふるまっていたが、性決定因子である SRY (Sex-determining region Y) が誕生するとY染色体は男性決定だけに特化し、著しく退化して今日の大きさになったといわれている。そこで今回、SRY の成り立ちについて解析を行った。その結果、SRY は proto Y 染色体上にあった SOX3 (SRY-related HMG-box 3) 遺伝子の^{上流に} DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8) が挿入され、誕生したことを明らかとした。

また、Y染色体の多型解析は人類の進化、人種・民族などのルーツや移動を調査するのに用いられている。今回日本人の起源・ルーツ

について知るため、約 3000 人の日本人男性についてY染色体のハプロタイプの解析を行った。その結果、日本人は C, DE, O2b*, O2b1, O3 のグループに分類され、それぞれのグループ頻度は C が 10-15%, DE が 25~30%, O2b* が 10%, O2b1 が 20%, O3 が 20%程度であった。世界の分類からみると C, DE と O2, O3 は離れたところに位置しており、日本人男性集団には遺伝的に異なった 2 つの集団、縄文系、弥生系が存在することがわかった。

さらに、ベトナム人の起源・ルーツについて知るため、約 30 人のベトナム人男性についてY染色体のハプロタイプの解析を行った。その結果、日本人ではあまりみられない O1, O2 が 1 ベトナム人では約 40%の頻度を示し、また日本人でよくみられる O2b*や O2b1 はベトナム人ではみられなかった。従って、日本人とベトナム人では起源・ルーツが異なっていることが示唆された。

これまでの海外で行われた研究から、Y染色体の長腕に存在する無精子症候補領域 AZF (azoospermia factor) c の部分欠失 gr/gr 欠失は男性不妊と関連すると報告されている。そこで、本研究では日本人においても gr/gr 欠失と男性不妊との間に関連性がみられるのか解析することを目的とした。また、gr/gr 欠失とY染色体ハプログループの関連性についても解析を行った。その結果、gr/gr 欠失の検体に男性不妊が多い傾向が見られたものの有意な関連性は認められなかった。また、gr/gr 欠失の検体は全てY染色体ハプログループ D+E に、gr/gr 欠失無しの検体は全てハプログループ 0 に属していることが明らかになった。従って gr/gr 欠失は遺伝子多型であることが示唆された。

(3) 不妊症に関する関連研究

人工的に卵を活性化する方法として、これまでカルシウムイオノファとピューロマイシンの併用が報告されているが、M-phase promoting factor (MPF) の作用を特異的に阻害するロスコビチンは、卵にどのような作用を及ぼすかを検討する目的で、マウス卵を用いて MPF 活性の変化および形態学的変化を経時的に測定・観察し、それぞれの関連性について検討した。その結果、卵の活性化に関して、ロスコビチンはカルシウムイオノファとの併用によりその効果が認められること、その作用は MPF 活性の低下を介していること、また、その効果はピューロマイシンに匹敵することが明らかとなった。

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4件)

- ① Youichi Sato, Shojiro Yano, Ashraf A Ewis and Yutaka Nakahori. SRY interacts with ribosomal proteins S7 and L13a in nuclear speckles. Cell Biology International, 35, 449-452 (2011) (査読有)
- ② Youichi Sato, Tosikatu Shinka, Kozue Sakamoto, Ashraf A. Ewis and Yuataka Nakahori. The male-determining gene SRY is a hybrid of DGCR8 and SOX3, and is regulated by the transcription factor CP2. Mol. Cell. Biochem., 337:267-275 (2010) (査読有)
- ③ 佐藤 陽一, 日本人類学会遺伝分科会平成22年度公開シンポジウム「日本人の成り立ちについての新たな考察—遺伝と形態から—」Y染色体からみた日本人の成り立ち, Anthropological Science (Japanese Series) Vol. 118(2), 115-118, (2010) (査読無)
- ④ Youichi Sato, Tosikatu Shinka, Cang Chen, Hong-Tao Yan, Kozue Sakamoto, Ashraf A. Ewis, Hiroyuki Aburatani and Yuataka Nakahori. Proteomics and transcriptome approaches to investigate the mechanism of human sex determination. Cell Biol. Int. ,33, 839-847(2009) (査読有)

〔学会発表〕(計6件)

- ① 佐藤 陽一, 新家利一, Ashraf A. Ewis, 中堀 豊:性決定因子 SRY の成り立ち, 日本遺伝学会第 82 回大会 ワークショップ, 2010年9月20日, 札幌
- ② 佐藤 陽一:Y染色体からみた日本人の成り立ち, 日本人類学会 遺伝分科会 公開シンポジウム, 2010年9月11日, 東京
- ③ 山田 恵理, 梅野 真由美, 佐藤 陽一 他、マイクロチップ電気泳動法を用いたY染色体欠失解析法の比較検討、第33回徳島県医学検査学会、2009年12月13日、徳島市
- ④ 佐藤 陽一 他、ヒト性決定因子 SRY

と相互作用する因子の同定と性分化に関わるメカニズムの解析、第54回 日本人類遺伝学会、2009年9月24~26日、東京

- ⑤ 射場 智美、梅野 真由美、山野 修司 他。Ca ionophore と roscovitine を併用した卵活性化法における極体放出、前核の形成および活性化率の時間的推移、第32回 徳島県医学検査学会、2008年12月14日、徳島市
- ⑥ 梅野 真由美 他、男性不妊症におけるY染色体欠失解析法の研究—血液直接PCR法およびマイクロチップ電気泳動法を用いた解析法の検討—、第26回 日本染色体遺伝子検査学会総会・学術集会、2008年11月15日、高松市

〔産業財産権〕

○取得状況(計1件)

名称: マルチプレックスPCR用プライマーパネル、それを用いるマルチプレックスPCR法、及び遺伝子解析方法
発明者: 中堀豊、梅野真由美、他
権利者: (株) 島津製作所
種類: 特許権
番号: 特許第4192740号
取得年月日: 平成20年10月3日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅野 真由美 (UMENO MAYUMI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・
准教授
研究者番号: 00213497

(2) 研究分担者

佐藤 陽一 (SATO YOUICHI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・
准教授
研究者番号: 10363160
(平成21年9月9日 追加)

中堀 豊 (NAKAHORI YUTAKA)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・
教授

研究者番号：10172389
(平成21年9月9日 削除：死去のため)

山野 修司 (YAMANO SHUJI)
徳島大学・大学院ヘルスケアサイエンス研究部・
教授
研究者番号：10363160
(平成21年9月9日 削除：死去のため)