

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 28 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591315

研究課題名（和文）精子形成期精巣特異的発現遺伝子の機能解析と精子形成障害への関与
 研究課題名（英文）Specific gene expression and its functional analysis in the maturing rat testis.

研究代表者

大山 建司 (OHYAMA KENJI)

山梨大学・医学工学総合研究部・医学研究員

研究者番号：80051861

研究成果の概要（和文）：精子形成に特異的に関与している遺伝子の特定と機能解析および精子形成障害の原因遺伝子を発見することを目的とした。3 週齢と 7 週齢のラット精巣発現遺伝子を比較し、7 週齢精巣特異的に発現している遺伝子の中から、1) Ha-ras suppressor family member 5 gene 2) sperm flagellum- movement associated protein gene 3) colon cancer antigen gene 4) *Ttc29* gene の 4 種類の精巣特異的発現遺伝子を選択した。これらの遺伝子の発現時期、発現部位、精子形成への関与を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Spermatogenesis is a complex process, and many genes are systematically expressed. We screened 4 genes in maturing rat testis using differential display method. Hrasls5 gene product might function as a tumor suppressor as well as in spermatogenesis, as deduced from its amino acid sequence. RGD1303144 gene was expressed dominantly in spermatocytes. Colon cancer autoantigen gene, Sdccag8, was also localized to the spermatocytes in 7-week-old rat testis, and its protein was detected in the spermatids. Sdccag8 may have a role in the development from spermatocyte to spermatid. *In situ* hybridization revealed that *Ttc29* was expressed primarily in spermatocytes. *Ttc29* expression was up-regulated by treatment with FSH. *Ttc29* encodes axonemal dynein, which is a component of sperm flagella. These data indicate that axonemal dynein expression starts in spermatocytes and is regulated by FSH

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：Spermatogenesis, Testis, azospermia, sexual maturation, *Ttc29* gene

1. 研究開始当初の背景

精子形成は、胚細胞の発生と移入、胚細胞から精祖細胞・精母細胞への分化、減数分裂による精子細胞の形成と形態変化、精子への成熟という複雑な過程を辿り、その間に多数の遺伝子が関与している。その中で、胚細胞の発生にかかわる遺伝子は個体発生に関連するため単独の障害とはなりにくい。一方、精祖細胞から精子までの分化成熟過程は精巣特異的であり、これにかかわる遺伝子の異常は、奇形症候群などの合併症を伴わない精子形成障害の原因となる可能性が高い。

臨床的な精子形成障害の原因は、精路通過障害による閉塞性無精子症と非閉塞性無精子症に分類される。今回の研究目的は、非閉塞性無精子症と関連する新たな原因遺伝子を明らかにすることである。非閉塞性無精子症の原因としてはクラインフェルター症候群・Y染色体異常などの染色体異常、性腺刺激ホルモン分泌障害、アンドロゲン合成障害、セルトリ細胞機能障害など精巣の分化・成熟に関係する疾患が明らかとなっている。

精子形成に直接関わる研究では、Y染色体の microdeletion に関連する研究、遺伝子多型と無精子症との関連などがあり、遺伝子異常としては *Brek/Lmt2* gene の障害がマウスで無精子症を発症したとの報告がある(1)。しかし、これらを合わせても精子形成障害のごく一部を説明するに過ぎない。従来、精子形成障害の解明には患者の検体組織を用いた原因究明が行われており、基本的な研究手法ではあるが、限界もあると考えている。また、精巣生検は生殖可能な精子が存在する場合、治療機会の損失に繋がるとの意見もあり、診断のための組織採取が困難となっている。

最近、精粗細胞の分化に関わる遺伝子を

網羅的に検出しようとする研究が行われるようになり、microarray 法を用いて 10 個の新規遺伝子が発見されている(2)。我々も 8 年前から SD ラットで精粗細胞が分化し始める 21 日齢と精子形成が完成する 49 日齢の精巣を用いて differential display を行い、精子形成関連遺伝子の検索を進めており、新規遺伝子を含めて 3 種類の遺伝子を報告している(3-5)。Spermatogenesis-related factor 1 (SRF-1) gene は精巣特異的に 5 週齢以降に発現し、202 個のアミノ酸をコードしている。精母細胞に発現し、減数分裂に関与していると推測された(3)。Heat shock protein 20 (Hsp20) gene は心臓で強く発現し、精巣でも発現を認めた。7 週齢から 15 週齢にかけて精巣で発現が増加し、主として精母細胞から円形精子細胞に発現していた。精巣における昨日は不明だが、高濃度 TCDD 投与によっても発現は影響されなかった(4)。Spermatogenesis-related factor 2 (SRF-2) gene は 718 個のアミノ酸をコードし、RabGAP/TBC 蛋白と高い相同性を有しており、減数分裂への関与が推測された。5 週齢以降の精巣に特異的に発現していた。SRF-2 はラット皮下への TCDD 投与により発現が減少した(5)。

このように精子形成に関連する遺伝子を特定し、その機能を解析し、精子形成障害との関連を検討していくことにより、従来の方法では見い出せなかった新たな疾患関連遺伝子を発見できると考えている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、精子形成に特異的に関与している遺伝子の特定と機能解析および精子形成障害の原因遺伝子を発見することである。本研究は前方視的研究で、ラットを用い精巣

特異的に発現し、精子形成開始時期に特異的に発現する遺伝子を網羅的に選択し、精巣内発現部位、発現時期を明らかにする。そして、遺伝子の塩基配列、蛋白構造、発現細胞系の樹立などにより、発現遺伝子の機能を明らかにする。さらにホモロジー検索によりヒト遺伝子を特定する。同時に、精子形成障害患者血液からゲノム DNA を採取し、選択した遺伝子に異常があるかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 精子形成関連遺伝子の網羅的選択

精子形成期に特異的に発現する遺伝子を選択的に採取するため、精巣内に精粗細胞のみ存在する授乳期ラット (21 日齢) と精子形成が開始され精子が認められる 7 週齢ラットの精巣から mRNA を抽出し、ディファレンシャルディスプレイ (DD) を行う。7 週齢特異的に発現している遺伝子断片を PCR 増幅し、シーケンス解析を行い、得られた塩基配列を GenBank データベース、DDBJ の BLAST、FASTA によりホモロジー検索を行う。

これまでに 2 回 DD を行い、3 種類の精巣特異的遺伝子を報告している (3-5)。今回新たに DD を行い、7 週齢特異的に発現している遺伝子断片を 18 個採取した。これらについてシーケンスを行い、遺伝子データベースとの比較により推定機能別に分類し、順次以下の検討を行っている。

特に、*Ttc29* gene は、人とラットで相同性が高く、細胞周期に関連する TPR ドメインを有する事から、この遺伝子に着目して機能解析を進めている。

(2) 遺伝子の発現部位、発現時期の検討

DD の結果から選択した遺伝子の発現はノーザンブロットにより検証する。精巣特異的発現か、多臓器に発現しているかを明らかにし、同時に精巣発現に関しては生後週数別の発現を検討し、精子形成期特異的に発現していることを確認する。mRNA の精巣内発現部位を *in situ hybridization* により明らかにする。

(3) 精巣特異的発現遺伝子の無精子症精巣における検討

ラット精巣特異的発現遺伝子の中から *Ttc29* gene を選択し、ヒトゲノム *Ttc29* のプライマーを作成し健常人血液から採取したゲノム DNA でシーケンスを行い、塩基配列を確認する。精子形成障害患者ゲノム DNA を用いて、全領域のシーケンスを行い、異常の有無を明らかにする。さらに他の新規遺伝子についても同様に遺伝子異常の有無を検討する。

既知の遺伝子に異常を認めない無精子症患者検体はすでに 50 検体収集しており、これらについて検討する。

4. 研究成果

(1) 精子形成期ラット精巣に特異的に発現する遺伝子の検索

3 週齢と 7 週齢ラット精巣の DD からスクリーニングされた遺伝子は 5 群に分類された。すなわち、1) molecular motor proteins 2) cytoplasmic regulators 3) molecular chaperones 4) sperm flagellum-movement associated proteins 5) tumor suppressor gene products の 5 群である。これらの群の中から以下の 4 種類の精巣発現遺伝子について検討を行った。

- ① Ha-ras suppressor family member 5 gene
- ② sperm flagellum-movement associated protein gene
- ③ Serologically defined colon cancer antigen 8
- ④ *Ttc29* gene

① Ha-ras suppressor family member 5 gene (Hras1s5) (文献 6)

この遺伝子は、前述の (5) 群に属する遺伝子である。

Hras1s5 遺伝子は 7 週齢以降の精巣に特異的に発現しており、卵巣等他の臓器では発現していなかった。この遺伝子は RLP-1 gene としてすでに同定されていた。精巣内での発現部位は主として精母細胞と円形精子細胞である。Ras suppressor gene family の中で human A-C1、H-rev107、RLP-1 遺伝子は成人精

巢に強く発現している (7,8,9)。Ras suppressor geneはRas signalingのnegative regulatorと考えられており、精子形成期の減数分裂による細胞増殖を調節している可能性がある。今後、Ha-ras signaling cascadeへの関与の機序を検討していく必要がある。

② sperm flagellum- movement associated protein gene (RGD1301344) (文献10)

この遺伝子は、前述の (4) 群に属する遺伝子である。

RGD1301344は3週齢精巢には発現しておらず、7週齢以降で強く発現していた。精巢特異的で、他の臓器では発現していなかった。精巢内では精母細胞と円形精子細胞に広く発現していた。TCDD投与により精子運動能は低下したがRGD 130134 発現は変化しなかった。同時に測定したouter dense fiber-1 (ODF-1) も変化しなかった。

精子運動能は鞭毛構造とエネルギー供給に依存している。鞭毛構造はProteomic 解析により、axonemeを含む3つの部分からなることが報告されている(11)。ATPエネルギー供給とODF蛋白が鞭毛運動に特に重要である。今回検討したsperm flagellum- movement associated protein geneはadenylate kinase (AK) domainを有しており、鞭毛のエネルギー供給に関与していると推測される。

③ Serologically defined colon cancer antigen 8 (Sdccag8) (文献12)

この遺伝子は、前述の (5) 群に属する遺伝子である。結腸がん患者血中に存在する自己抗原蛋白がSDCCAG8のC端に一致することから癌マーカーとして注目されるようになった。癌抗原の中には精巢に特異的に発現しているものが明らかになり、癌精巢抗原(CT antigen)と総称され現在100種以上が報告されてきている。しかしこれらの蛋白の精巢における役割はほとんど解明されていない。

Sdccag8は精巢特異的に存在し、卵巣、消化管を含めた他臓器には存在しなかった。精巢では3週齢ではほとんど発現せず、7週齢以降

で強く発現していた。精巢組織のin situ hybridizationおよび免疫染色の結果から、mRNAは精母細胞に強く発現し、蛋白は精子細胞に存在していることが明らかになった。

CT antigenの多くは精巢内で生殖細胞にのみ存在していることから、減数分裂、精子形成に関与していると示唆される。Sdccag8はcentrosome componentであり、精母細胞から精子細胞への分化に関わっている可能性が高いと考えている。

④ Tetratricopeptide repeat domain 29 (Ttc29) (文献13)

Ttc29は精子鞭毛運動に重要な軸糸ダイニンのサブユニットで、精子形成に重要な遺伝子と考えられる。Ttc29は精巢特異的に発現し、3週齢では発現せず、7週齢以降に発現を認めた。下垂体摘出ラットを用いて、性腺刺激ホルモン(HCG,FSH)及びtestosteroneがTtc29発現にどのように関与しているかを検討した。Ttc29はFSH刺激で精母細胞に発現が増加することを認めた。hCG刺激には反応しなかった。精子の鞭毛運動に関連する遺伝子がFSHの制御で精母細胞に発現していることは、興味深い。

既知の原因遺伝子に異常を認めない無精子症患者30名の遺伝子で、Ttc29の異常を検索したが、異常は認められなかった。

本研究から得られた成果は、精子形成に関する新たな知見であり、精子形成の複雑な機序の解明に役立つとともに、精子形成障害の原因究明の一助となる可能性がある。現在我々は、新たに数種類の関連遺伝子の機能解析を進めている。さらに、性腺機能に影響することが知られている内分泌攪乱物質の影響でこれらの精巢特異的遺伝子の発現が変動する可能性があり、内分泌攪乱物質の影響を見る指標としてこれらの遺伝子発現が利用できるか、検討している。

文献

1. Kawa S, Toyama Y, et al. PNAS 2006;

- 103:19344-19349
2. Lin YH, Lin YM et al. Fertil Steril 2006; 86: 1650-1658
 3. Yamano Y, Ohyama K, et al. Biochem Biophys Res Commun 2001; 289: 888-893
 4. Yamano Y, Ohyama K, et al. Endocr J 2005; 52: 75-81
 5. Yamano Y, Ohyama K, et al. J Vet Med Sci 2005; 67: 1181-1184
 6. Yamano Y, Ohyama K., et al. Biosci Biotechnol Biochem 2008; 72: 1360-1363
 7. Siegrist S, Feral C, et al. Oncogene 2001; 20: 5155-5163
 8. Ito H, Akiyama H, et al. Cytogenet Cell Genet 2001; 93: 36-39
 9. Jin XH, Okamoto Y, et al. J boill Chem 2007; 282: 3614-3623
 10. Yamano Y, Ohyama K, et al. Biosci Biotechnol Biochem 2009; 73: 946-949
 11. Cao W, Gerton GL, et al. Mol Cell Proteomics 2006; 5:801-810
 12. Kamio T, Ohyama K, Yamano Y, et al. Biosci Biotechnol Biochem 2010; 74: 1466-1469
 13. Ohta M, Ohyama K, Asano A, Yokota S, Khalid AM, Yamano Y. Biosci Biotechnol Biochem 2012 (in press)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計4件)

1. Ohta M, Ohyama K, Asano A, Yokota S, Khalid AM, Yamano Y. Regulation of rat tetra-ricopeptide repeat domain 29 gene expression by follicle stimulating hormone. Biosci Biotechnol Biochem 2012 (in press) (査読有り)
2. Kamio T, Asano A, Hosaka YZ, Khalid A M, Yokota S, Ohta M, Ohyama K, Yamano Y. Expression of the centrosomal colon cancer autoantigen gene during spermatogenesis in the maturing rat testis. Biotechnol Biochem 2010; 74: 1466-1469. (査読有り)
3. Yamano Y, Asano A, Ohta M, Hirata S, Shoda T, Ohyama K. Expression of rat sperm flagellum-movement associated protein genes under 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin treatment. Biotech

hnol Biochem 2009; 73: 946-949.

(査読有り)

4. Yamano Y, Asano A, Ohyama K, Ohta M, Nishio R, Morishima I. Expression of the Ha-ras suppressor family member 5 gene in the maturing rat testis. Biosci Biotechnol Biochem 2008; 72: 1360-1363. (査読有り)

〔学会発表〕 (計7件)

1. 大山建司 日本における性分化疾患の実態 第44回日本小児内分泌学会 2010.10 大阪
2. Ohta M. Expression of TPR domain containing NYD-spl4 gene in the maturing rat testis 14th International Congress of Endocrinology 2010.3 Kyoto
3. 太田正法 精子形成期のラット精巣特異的に発現する結腸癌抗原に関する検討 第15回日本生殖内分泌学会 2010.11 大阪
4. Yamano Y Expression analysis of CT antigen gene in maturing rat testis 第33回日本分子生物学会 2010.12 神戸
5. 太田正法 精子形成に関与する遺伝子発現に対するゴナドトロピンの影響について 第82回日本内分泌学会 2009.4.23 前橋
6. 太田正法 精子形成サイクルにおける鞭毛運動関連遺伝子に関する検討 第43回日本小児内分泌学会 2009.10.3 宇都宮
7. 山野好章、精子形成期ラット精巣における精子鞭毛関連遺伝子の発現解析 日本第32回分子生物学会 2009.11.2 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大山 建司 (OHYAMA KENJI)
山梨大学・医学工学総合研究部・
医学研究員
研究者番号：80061861

(2) 研究分担者

山野 好章 (YAMANO YOSHIAKI)
鳥取大学・農学部・教授
研究者番号：00182593

太田 正法 (OHTA MASANORI)
山梨大学・医学工学総合研究部・
医学研究員
研究者番号：80233146

佐野 友昭 (SANO TOMOAKI)
山梨大学・医学工学総合研究部・
医学研究員
研究者番号：80447705

(3) 連携研究者
なし