

## 学位論文題目

The human transcript induced in spermatogenesis 50

(ヒトTISP50に関する研究)

共著者名

宮本 敏伸、千石一雄、林博章、田熊直之、石川睦男

Reproductive Medicine and Biology

Volume 3, p237-243, 2004

## 研究目的

ヒト精子形成 (spermatogenesis) 過程は発生学を学ぶ上で極めて有意義なモデルである。マウス及びラットにおいて精巣特異的に発現する遺伝子、精子形成に関与すると推定される遺伝子が多数報告されており、近年、マウスにおいて精巣特異的に発現するとされる80もの遺伝子ファミリー transcript induced in spermatogenesis (TISP) が報告された (1)。このように分子生物学の目覚ましい進歩によりマウスの精子形成過程メカニズムは明らかにされつつある。しかしながら、それらの知見がヒトにおいて還元されているケースはあまりにも少ない現状にある (2)。ヒト不妊症の原因の1つとして、男性不妊が大きな要因を占めるが、ヒトにおいて精子形成に関与する遺伝子、その精子形成過程におけるメカニズムに関する報告はマウスに比して著しく少ない (3)。そこで今回、本研究においてヒト精子形成に関与すると考えられる精巣特異的発現を示す遺伝子の同定を試みた。

## 材料・方法

## 1. ヒトTISP遺伝子ファミリーの発現様式

報告された80個のマウスTisp cDNAの大部分はpartial cDNAであったため、まずGenome databaseを利用して、その相同性からfull length cDNAの同定を試みた。その後マウスTisp遺伝子群とアミノ酸レベルでヒトゲノムシーケンスと相同性を有する部位を検索した。結果、80のTisp cDNAのうちヒトにおいて相同性を有する部位が検出されたものは28個であった。相同部位にプライマーを設定し、ヒト成人15の組織から構成されたcDNAライブラリーを鋳型としてPCRを施行した。本研究において全てのPCRはClontech社のAdvantage 2 PCR Enzyme Systemを使用した。PCR反応は95℃150秒後、95℃15秒68℃90秒を32サイクル施行した。First PCRにて有意なバンドを認めなかったものに対してはNested PCRを施行した。反応はFirst PCRと同様に15サイクル施行した。

## 2. ヒトTISP50, TISP15及びTISP43 cDNAの単離

検討した28個のヒトTISP遺伝子の内TISP50, TISP15, TISP43の3個の遺伝子がヒト精巣特異的発現を示したため、これらのcDNAの単離を試みた。Genome databaseを用いた解析より、マウスTisp50はマウスShippo1遺伝子とTISP15はOaz3とまたTISP43はTesp1とそれぞれ同一のものであり、TISP50, TISP15及びTISP43 cDNAは全てpartial cDNAであることが判明した。ヒトTISP50 cDNAを単離すべくマウスShippo1のアミノ酸配列と相同性を有するヒトゲノムシーケンス領域にプライマーを2組設定し、ヒト精巣cDNAライブラリーを鋳型としてFirst PCR及びNested PCRを施行した。Nested PCR産物をPromega社のT Easy ベクターにサブクローニングしシーケンス解析を行った。その後、full length cDNAを単離すべく5'RACE及び3'RACEを施行しシーケンス解析した。RACE反応は全てClontech社のMarathon Ready cDNAのプロトコールに準じ、同様の方法でヒトTISP15及びTISP43のfull length cDNAの単離を試みた。

### 3. ヒトTISP50, TISP15及びTISP43の発現パターン

ヒトTISP50, TISP15及びTISP43の発現様式を解析するためにそれぞれイントロンを挟む形でプライマーを設定し、Clontech社のMultiple Tissues cDNA Panelsを用いてPCRを施行した。PCR反応は32サイクル行った。

#### 成績

2002年マウスで精巣特異的な発現を示す80ものTISP遺伝子ファミリーが単離された。このうち本研究ではヒトにおいても相同性を有する28のTISP遺伝子を解析したが、このうち5つはヒト精巣に発現を認めなかった。またマウス同様ヒトにおいても精巣特異的な発現を示したのはTISP50, TISP15及びTISP43のわずか3つの遺伝子にすぎず、残り20の遺伝子はヒトでは精巣のみならず様々な組織でも発現が認められた。TISP50, TISP15及びTISP43の3つの遺伝子に関して更なる解析を行った結果、ヒトTISP50は254個のアミノ酸をコードしており、そのOpen Reading Frameは270ntから1034ntまでであり、マウスとはアミノ酸レベルで93%もの相同性を有していることが明らかになった。しかし、6つのPro-Gly-Proリピートを有するものの既知のドメインはコードされていないことが判明した。TISP43及びTISP15に関しては共に5'RACEを施行したもののそのスタートコドンを検出することができなかったことより、今回単離したcDNAはともにpartial cDNAと考えられる。しかしながら、TISP43はtrypsin-like serine proteaseドメインをコードしていること、またTISP43及びTISP15のマウスとのアミノ酸レベルでの相同性はそれぞれ43%及び78%であることが示された。今回単離した3つのcDNAは全て精巣に強く発現しているが、膵臓にもわずかにバンドが認められた。

#### 考察

本研究によりマウス精巣特異的に発現する80個のTisp遺伝子の内、ヒトと相同性を認めるものは28遺伝子であり、このうち5個の遺伝子は精巣に発現を認めないことが明らかとなった。一般的に、機能的に重要な役割を担う遺伝子は種を通じて保存されていることより、これら5つの遺伝子はマウスでも精子形成に関しあまり重要な役割を担っていないことが推定された。また解析した28のヒトTISPにおいて精巣優位な発現パターンを認めたのはわずか3つにすぎない。よってマウスとヒトとの生物学的な不一致が存在することが明らかとなった。マウスTISP43は精子が卵細胞の透明帯を通過するメカニズムに関与していることが知られており、マウス及びヒトTISP43との高い相同性よりヒトでも同様な機能を有するものと推定される。マウスTisp50の蛋白は精子尾部に沿って存在し精子の運動能に関与していることが報告されており、マウスとヒトの93%もの相同性を考慮するとヒトでも同様な機能をもつことが示唆された。さらにヒトTISP50はImprinting領域である11p15.5に存在するためヒトにおいてImprintingを受けているか否か今後解析が必要である。

#### 結論

本研究において我々は3つのヒト精巣特異的な遺伝子を単離した。その発現パターン及びアミノ酸配列から単離した遺伝子がヒト精子形成に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

## 引用文献

1. Use of stepwise subtraction to comprehensively isolate mouse genes whose transcription is up-regulated during spermiogenesis  
Takayuki Fujii, Katsutoshi Tamura, Kumiko Masai, Hiromitsu Tanaka, Yoshiyuki Nishimune, Hiroshi Nojima  
EMBO reports vol.3:p367-372, 2002
2. Genetic Dissection of Mammalian Fertility Pathways  
Matzuk MM and Lamb DJ  
Nauret Medicine vol8 (S1): S41-9.2002
3. Azospermia in patients heterozygous for a mutation in SYCP3  
Toshinobu Miyamoto, Shiga Hasuike, Leah Yogev, Maria Maduro, Mutsuo Ishikawa, Heiner Westphal  
The Lancet Vol362: p1714-1719, 2003

## 参考論文

### 参考論文1

1. 題目 Successful Intrauterine Treatment of Hygroma colli Using OK-432  
千葉善英と共著
2. 印刷公表の方法及び時期 Fetal Diagnosis and Therapy, Volume18: p391-396, 2003

### 参考論文2

1. 題目 Fetal Tachycardia Diagnosed by magnetcardiography and Direct Fetal Electrocardiography.  
石井桂介ほか3名と共著
2. 印刷公表の方法及び時期 Fetal Diagnosis and Therapy, Volume18: p463-466, 2003

### 参考論文3

1. 題目 Molecular cloning and expression analysis of the mouse Spot-2 gene in pituitary development.  
宮本敏伸ほか6名と共著
2. 印刷公表の方法及び時期  
Development Genes and Evolution, Volume 213: p199-202, 2003

### 参考論文4

1. 題目 Prenatal diagnosis and Antenatal History of Persistent Truncus Arteriosus: A case Report.  
Chin-Yuanほか3名と共著
2. 印刷公表の方法及び時期 Journal of Medicine Ultrasonics, Volume29: p113-117, 2002

### 参考論文5

1. 題目 GATM, the human ortholog of the mouse imprinted gatm gene, escapes genomic imprinting in placenta  
宮本敏伸ほか4名と共著
2. 印刷公表の方法及び時期  
Genetics and Molecular Biology, Volume28: p44-45, 2005

## 学位論文の審査結果の要旨

|   |         |     |        |
|---|---------|-----|--------|
| 報告番号  | 第 号     |     |        |
| 学位の種類   | 博士 (医学) | 氏 名 | 佐々木 禎仁 |
| 審査委員長 藤 枝 憲 二 ㊞<br><br>審査委員 千 石 一 雄 ㊞<br><br>審査委員 立 野 正 敏 ㊞<br><br>審査委員 ㊞   |         |     |        |
| 学 位 論 文 題 目<br><br><b>The human transcript induced in spermatogenesis 50</b><br><br>(ヒト TISP50 に関する研究)  |         |     |        |
| <p>ヒト不妊症の原因の1つとして、男性不妊が大きな要因を占めるが、ヒトにおいて精子形成に関与する遺伝子、その精子形成過程におけるメカニズムに関する報告はマウスに比して著しく少ない。論文提出者はマウスにおいて精巣特異的に発現する遺伝子ファミリー(TISP)のヒトにおける発現様式から、いまだ十分に解明されていないヒト精子形成に関与する遺伝子の同定を試みた。</p> <p>まず、すでに報告されている80個のマウス Tisp cDNA の full length cDNA を Genome database を利用して同定し、その後 Tisp 遺伝子群とアミノ酸レベルでヒトゲノムシーケンスと相同性を有する部位を検索して、マウス Tisp cDNA のうちヒトにおいて相同性を有する</p> |         |     |        |

ものを 28 個同定した。この 28 個についてヒト組織での発現を検索したところマウスと同様にヒトにおいて精巣特異的に発現を示したものを 3 個 (TISP50, TISP15 及び TISP43) 同定した。次にこの精巣特異的に発現している 3 個の遺伝子の cDNA の単離を試みた。その結果 TISP50 については full length cDNA で単離した。これは 254 個のアミノ酸をコードし、Open Reading Frame は 270nt から 1034nt までであり、マウスとはアミノ酸レベルで 93%の相同性を有していることが明らかとなった。しかし、6 つの Pro-Gly-Pro リピートを有しているが既知のドメインはコードされていなかった。単離された TISP43, TISP15 は partial cDNA と考えられた。TISP50 は、マウスにおいてその蛋白は精子尾部に沿って存在し精子の運動能に関与していることが報告されている。またマウスとヒトとに 93%の相同性があることからヒトでも同様の機能を持つことが示唆された。

以上の研究成果は、ヒトにおける精子形成過程を理解する上で、重要な意義があり、臨床的に問題となる男性不妊症の原因解明に寄与すること大であると考えられた。また、諮問審査において論文提出者から適切な解答がえられ、この分野において十分な知識を有していると判断され、その結果、本論文の内容は学位論文として価値があるものと判定した。