

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	佐藤 恒
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Polymorphic alleles of the human <i>MEI1</i> gene are associated with human azoospermia by meiotic arrest (減数分裂停止によるヒト無精子症におけるヒト<i>MEI1</i>遺伝子に関する研究)</p> <p>共 著 者 名</p> <p>宮本敏伸、Leah Yogev、並木幹夫、高榮哲、林博章、佐々木禎仁、石川睦男、 Dolores J. Lamb、松本直道、Ohad S. Birk、新川詔夫、千石一雄</p> <p>Journal of Human Genetics (in press)</p> <p>研究目的</p> <p>今日までに、ヒト男性不妊の遺伝学的な素因としてY染色体の微小欠失に代表される染色体異常及びY染色体上のAZF (azoospermia factor) 領域に存在するDAZ, RBMY及び USP9Yさらには12番染色体上に局在するSYCP3遺伝子の異常などが報告されているものの、その原因のほとんどは今なお不明である(1)。精子形成過程における減数分裂の異常は無精子症の重要な原因の一つであるが、そのメカニズムはほとんど明らかにされていない。しかしながら、マウスにおいてはいくつかの減数分裂において重要な役割を担う遺伝子 (Dmc1, Fkbp6, Sycp3, Spo11, Msh4, Msh5) が報告されてきた。近年、胚性幹細胞に抗癌剤を投与し生み出された不妊マウスのスクリーニングにより、減数分裂異常に起因する無精子症を呈するmei1 (meiosis defective 1) マウスが同定され、さらにポジショナルクローニング法により、マウスMei1遺伝子のmutationが染色体のシナプスの欠損に起因する減数分裂停止による無精子症を引き起こすことが明らかにされた (2)。今回我々は、マウスMei1 cDNAをもとにヒトMEI1 cDNAを単離し、その組織発現パターンを解析すると共に、ヒトMEI1遺伝子の異常とヒト無精子症の関係を明らかにするため、組織学的に減数分裂停止による無精子症と診断された患者のgenomic DNAを用いて変異解析を行った。</p> <p>材料・方法</p> <p>1. ヒト MEI1 cDNA の単離及びヒト成人組織における発現様式の解析 マウス Mei1 遺伝子のアミノ酸配列およびヒト Genome database を利用して、マウス mei1 遺伝子とアミノ酸レベルで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 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 法を施行し PCR 産物をそれぞれシーケンス解析した。単離された遺伝子のエクソン内にイントロンをはさむ形でプライマーを設定し、15 のヒト成人組織から構成された Clontech 社の Multiple Tissues cDNA Panels を用いて 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°C150 秒後、95°C15 秒 68°C90 秒を First PCR で 32 サイクル、Nested PCR では 20 サイクル施行した。</p>			

2. 患者群と正常コントロール群

対象患者は組織学的に減数分裂停止による無精子症と診断された27名であり、ヨーロッパ系アメリカ人患者13名、イスラエル人13名及び日本人1名である。全ての患者は染色体異常がないこと、またY染色体の微小欠失が存在しないことが確認されている。正常コントロールとしてヨーロッパ系アメリカ人61名及びイスラエル人60名を同様に解析した。全ての患者及びドナーは文章によるインフォームドコンセントを得た後、血液を採取しDNAを抽出した。また本研究はアメリカ、イスラエル及び日本の各大学の倫理委員会の承認を得た後に開始された。

3. ヒト無精子症患者におけるヒトMEI1の遺伝子変異解析

ヒトMEI1遺伝子におけるcoding region内の全てのエクソンに隣接するイントロン部位にプライマーをそれぞれ設定し、組織学的解析で減数分裂停止による無精子症と診断された27名の患者のgenomic DNAを用いてPCR及びダイレクトシーケンス解析を行った。妊孕能が確認されている正常コントロール群のgenomic DNAを用いて同様にPCR及びダイレクトシーケンス解析を施行し、同定された4つのcoding single-nucleotide-polymorphism (cSNP)においてgenotypeおよびアレルの出現頻度を比較検討した。さらにexpectation-maximization (E-M) algorithmをもちいて近似的に頻度を計算してハプロタイプに対しても比較検討を行った。

成績

単離されたfull length cDNAは2つの転写体からなり、ヒトゲノムシーケンスとの比較によりヒトMEI1遺伝子は16個のエクソンから構成され、短いcDNAはalternative splicingによりエクソン7を欠いていた。コードされるアミノ酸はそれぞれ642個及び607個でマウスとの相同性はアミノ酸レベルで77%、核酸レベルで61%であった。発現パターンの解析では、ヒトMEI1は精巣にほぼ特異的に強く発現していたが、脾臓と胸腺にもわずかに発現が検出された。無精子症患者のシーケンス解析によりopen reading frame (ORF) 内に4箇所のsingle nucleotide polymorphism (SNP) が検出された。なお、解析した1名の日本人患者では多型を検出しなかった。残りの26名は全て白人であり、人種を統一するため日本人患者は今回の解析から除外した。白人患者26名についてgenotype、アレル解析を行ったところ、SNP3及びSNP4においてコントロール群に対して有意差が認められた ($p<0.05$)。人種の違いが多型に及ぼす影響を考慮し、さらにアメリカ人とイスラエル人において、それぞれgenotype、アレル解析を同様にを行ったところアメリカ人ではSNP3及びSNP4においては有意差が認められたがイスラエル人では有意差が認められなかった ($p>0.05$)。さらに、ハプロタイプ解析をSNP3-SNP4において行ったところアメリカ人ではC-T, A-C, A-Tの配列に有意差が認められ、イスラエル人にもA-Tの配列に有意差が検出された ($p<0.05$)。

考察

我々はヒトMEI1 cDNAを単離し、単離されたcDNAは2つの転写体を有しており、2つのアミノ酸をコードしていることを明らかにした。これはマウスMei1遺伝子と一致するものであり、その発現はマウス同様ヒト精巣に特異的なものであることから、ヒトMEI1遺伝子が精子形成に関与していることが示唆される。減数分裂異常による無精子症を呈するmei1マウスはマウスMei1遺伝子のエクソン12の部分的欠失もしくは完全欠失によりフレームシフトが起こることにより生じる。近年、マウスにおいてMei1遺伝子とDNA修復遺伝子Dmc1遺伝子の関係が報告されMei1はマウス減数分裂においてDmc1の上流に位置していることが明らかとなった (3)。

今後ヒトMEI1遺伝子とDMC1遺伝子の関係を明らかにするために、さらなる解析が必要とされる。また、本研究においてヒトMEI1のcoding regionにおいて新たに4つのSNPを同定することができた。これらのSNPの解析では、SNP3とSNP4の出現頻度においてアメリカ人患者群ではコントロール群に対して統計学的有意差が認められたことにより、そのメカニズムは不明なものの今回同定されたSNPがヒト精子形成過程、特に減数分裂異常による無精子症に深く関与している可能性が示唆された。

結論

本研究はヒトMEI1遺伝子とヒト精子形成との関係を示した最初の報告である。我々の研究成果は今後のヒト減数分裂および精子形成の分子メカニズムの解明に大いに貢献をするものと考えられる。

引用文献

1. Miyamoto T, Hasuike S, Yogev L, Maduro M, Ishikawa M, Westphal H and Lamb DJ. Azospermia in patients heterozygous for a mutation in SYCP3. Lancet 362:1714-1719, 2003.
2. Libby BJ, Reinholdt LG and Schimenti JC. Positional cloning and characterization of *Meil*, a vertebrate-specific gene required for normal meiotic chromosome synapsis in mice. Proc Natl Acad Sci USA 100:15706-15711,2003.
3. Reinholdt LG and Schimenti JC. *Meil* is epistatic to *Dmcl* during mouse meiosis. Chromosoma 114:127-134,2005.

参考論文

1. Sasaki Y, Miyamoto T, Hidaka Y, Satoh H, Takuma N, Sengoku K, Sugimori H, Inaoka T and Aburano T. Three-dimensional magnetic resonance imaging after ultrasonography for assessment of fetal gastroschisis. Magn Reson Imaging 24:201-203,2006.
2. 宮本敏伸、佐藤恒、千石一雄. 精子形成遺伝子. 産婦人科の実際. 55:159-164, 2006.
3. 根本玲子、杉山祐子、荒井祐司、平井康夫、佐藤恒、楯真一、岡野滋行、都竹正文、荷見勝彦 子宮体部漿液性腺癌と卵巣・卵管原発漿液性腺癌の子宮内膜細胞像の比較検討 日本臨床細胞学会 雑誌 2000、39 : 137-141.
4. 清水かほり、加藤友康、手島英雄、荒井祐司、佐藤恒、平井康夫、都竹正文、山内一弘、荷見勝彦 子宮体部腺癌における放射線治療効果の細胞学的検討 日本臨床細胞学会雑誌 1998、37 : 560-566.

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 藤 恒
<p>審査委員長 柿崎秀宏 ㊟</p> <p>審査委員 藤枝 憲二 ㊟</p> <p>審査委員 千石 一雄 ㊟</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p><i>Polymorphic alleles of the human MEI 1 gene are associated with human azoospermia by meiotic arrest</i></p> <p>(減数分裂停止による無精子症におけるMEI1遺伝子に関する研究)</p>			

学位論文審査結果の要旨

以下に、佐藤 恒氏による学位論文の審査結果の要旨を述べる。

マウスではMei1遺伝子のmutationが減数分裂停止による無精子症を引き起こすことが報告されている。本論文は、マウスMei1 cDNAを基にヒトMEI1 cDNAを単離し、その組織発現パターンを解析するとともに、ヒトMEI1遺伝子異常とヒト無精子症との関係を明らかにするため、組織学的に減数分裂停止による無精子症と診断された患者のgenomic DNAを用いて変異解析を行ったものである。遺伝子の解析はすべて科学的に適切な方法で行われており、また患者と正常コントロール群の比較解析でも、この研究に関連した各研究施設の倫理委員会の承諾を得てから適切な方法を用いて行われている。

得られた結果の主たる点は、単離されたヒトMEI1 cDNAは2つの転写体からなり、ヒトMEI1遺伝子は16個のエクソンから構成されること、ヒトMEI1遺伝子は精巣にほぼ特異的に強発現していること、無精子症患者のシーケンス解析により、open reading frame内に4個のsingle nucleotide polymorphism (SNP)が検出され、SNPのゲノタイプとアレルの発現頻度には無精子症患者とコントロール群の間で有意差があり、またこの遺伝子多型の発現には人種差があることである。

ヒトの精子形成に関与する遺伝子異常については不明な点が多いが、本研究はヒトMEI1遺伝子とヒト精子形成との関係を示した最初の論文であり、学術的価値はきわめて高いと判断される。また、本論文は佐藤 恒氏の十分な学問的知識に裏打ちされたものであり、学位論文としてふさわしい内容であると判断する。