

不妊症原因遺伝子の同定を目的とした、減数分裂関連遺伝子の網羅的解析

●倉橋 浩樹¹⁾ ◆戸田 達史²⁾

1) 藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・分子遺伝学研究部門 2) 大阪大学大学院医学系研究科・臨床遺伝学

〈研究の目的と進め方〉

10組に1組のカップルは不妊症に悩んでおり、近年増加しているとの報告もある。また、全妊娠の1-2%は習慣性流産（不育症）をおこしている。少子化の時代において、種々の生活習慣病に匹敵するほど高頻度に発生するこれらの疾患は、社会問題でもある。不妊・不育症の原因は多種多様であるが、その遺伝的要因に関してはいまだほとんど解明されていない。これらの疾患は、子孫を残さないため、遺伝性の要素がマスクされてしまうが、すでに一部の不妊症では遺伝子異常が報告されている。また、減数分裂時の染色体接着、相同組換え、シナプシスに参与する遺伝子のノックアウトマウスの多くは、雄では無精子症、雌では妊娠は可能だが染色体の不分離がおこり、これらはヒトの不妊・不育症に相当する。

本研究は、哺乳類の減数分裂に関わる遺伝子をマイクロアレイを用いて網羅的に同定しようとするものである。減数分裂に関わる新規遺伝子のコードする蛋白の機能を解析し、これら遺伝子の異常によって発症する不妊・不育症を同定する。将来的には、不妊治療や、着床前診断を含めた不育症の予防に役立てることを目的とする。

〈研究開始時の研究計画〉

哺乳類の減数分裂に参与する遺伝子の大部分はいまだ同定されていない。我々は、減数分裂細胞の分化段階特異的遺伝子を網羅的に同定するために、マウスの精祖細胞を分化に従って分画し、マイクロアレイを用いた発現プロファイリングを行うことを計画した。当初は、精祖細胞が分化に従って精細管内腔へと分布していくことを利用して、成熟マウス精巣の凍結切片からレーザーマイクロダイセクションを用いて分化の各段階に分画した細胞サンプルの採取を行ったが、量的に解析には不十分であった。そこで、精祖細胞が第一減数分裂において、分化に従って比重が軽くなることを利用して、密度勾配遠心により分画した細胞の採取をおこない、マイクロアレイの材料とすることとした。

同時に、マウス精巣と、精巣を除去した残りの全組織とからもサンプリングし、それらのマイクロアレイによる発現プロファイリングをも行い、精巣特異的、かつ、第一減数分裂特異的遺伝子を同定することとした。また、雄マウスは生後10数日間で順次性成熟するが、その期間を日齢でいった精巣の発現プロファイリングがすでに公表されている。そのデータをも利用して、第一減数分裂特異的遺伝子の候補を絞り込む。

そして、これらの候補遺伝子に対して、順次、そのコードしている蛋白の機能解析を行う。(1)成熟マウスの精巣と胎児マウスの卵巣とでRT-PCRを行うことにより、減数分裂細胞特異的発現を確認する。(2)精巣でのin situ hybridizationを行い、減数分裂細胞でのステージ特異的発現を確認する。(3)細胞株を用いた発現実験により、細胞内局在、とくに、核内での局在を確認する。

〈研究期間の成果〉

研究は計画通りに順調に進行し、第一減数分裂特異的遺伝子の候補を約800遺伝子に絞り込んだ。これらの候補遺伝子に対して、減数分裂細胞を多く含む、成熟マウスの精巣と胎児マウスの卵巣とで順次RT-PCRを行うと、いまだ減数分裂特異的遺伝子は濃縮されておらず、約1/10程度であった。そこで、成熟マウスの精巣と胎児マウスの卵巣を用いて再度マイクロアレイを行い、減数分裂細胞でのみで発現する遺伝子を選択することとした。この方法により、減数分裂特異的遺伝子の候補は、約100遺伝子に絞り込まれ、これらの候補遺伝子に対して、順次、機能解析を行った。

〈国内外での成果の位置づけ〉

減数分裂に関する遺伝子の解析は精力的に行われているが、国内外を含めて、酵母を用いた研究が主体である。とくに、哺乳類の減数分裂のメカニズムの大部分は未解明のままであり、研究成果の国内外に対するインパクトは大きいと予想される。

不妊・不育症の原因に関しては、全身性疾患によるもの、器質性のも、免疫性のもなどは一部は原因が解明されているものの、多くは原因不明のままである。また、遺伝子異常に関しては、国内外含めて、数個の遺伝子異常が報告されているのみである。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

マイクロアレイ解析で約100遺伝子にまで絞り込めたが、そこからの候補遺伝子の機能解析の途中であるが、このステップを網羅的に行うことは不可能であり、相当の研究期間を要する。

また、細胞株を用いた機能解析は、機能既知の遺伝子でさえ、本来の機能に基づいた結果を示さず、人工的な実験系であることを痛感した。各々の遺伝子の産物に対する抗体を順次作成したり、in vivo electroporationなどの方法により直接、減数分裂細胞での動態を観察する必要がある。

〈今後の課題〉

今後は、これら約100の候補遺伝子のノックアウトマウスを作成し、生殖細胞の発生の停止、細胞死による不妊を確認できた遺伝子に関して、不妊症の患者での遺伝子変異を検討する。その準備として、不妊症患者の末梢血サンプルの収集を行う。可能な限り精巣生検などにより減数分裂の異常を予測させる患者サンプルを収集する。多施設共同研究を予定している。本研究は、藤田保健衛生大学倫理委員会の承認を得ている。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) Kurahashi H, et al. Cruciform DNA structure underlies the etiology for palindrome-mediated human chromosomal translocations. *J Biol Chem* 279 (34), 35377-83, 2004.

登録受付番号0410072128