

# Y染色体ゲノム配列決定後のAZF

## —Y染色体AZFcパンドローム構造を中心として—

高 榮哲<sup>1)</sup>, Choi Jing<sup>1)</sup>, 前田 雄司<sup>1)</sup>, 並木 幹夫<sup>1)</sup>, 吉田 淳<sup>2)</sup>

1) 金沢大学大学院医学系研究科がん医科学専攻がん制御学講座集学的治療分野 (泌尿器科学)

2) 木場公園クリニック

### はじめに

既婚カップルの約10%が不妊症であり、その約半数は男性側に起因している。さらに、男性不妊症の半数以上は特発性であり、組織学的に精子形成障害を認める。精子形成に関与するゲノム領域はY染色体長腕上に存在し、とくに無精子症因子 (Azoospermia factor :AZF) 領域に集中している。

現在、Y染色体を含め全ゲノム塩基配列が確定した。その結果、塩基配列構造から3領域に分類することができる。とくに、ampliconic領域は巨大な同一塩基配列が向き合うような対の回文構造(パンドローム)であり、頻回に遺伝子の組み換えも行われていると報告されている。

本稿では、Y染色体のゲノム塩基配列の確定によって、とくにAZFc領域のパンドローム構造について述べ、その構造から類推される微小欠失の機序について触れる。また、本邦におけるY染色体微小欠失の信頼できるマーカーについて提案した。

### Y染色体の構造解析

常染色体は相同染色体をもち、性染色体はサイズの異なる対染色体をもつ。Y染色体は約50-60Mbであり、X染色体の1/3のサイズをもつ。Y染色体両端には偽常染色体領域 (pseudoautosomal region: PAR) が存在し、サイズの異なる性染色体同士がこの領域で受動的な対合を行う。また、図1に示すように真性クロマチン (euchromatine) 部と異質クロマチン (heterochromatine) 部はPARを除いた部分となる。真性クロマチンは約



PAR, Pseudoautosomal regions (偽常染色体領域)、Yp:Y染色体短腕、Yq:Y染色体長腕

図1 Y染色体の構造

23Mbであり、短腕上に8Mb、長腕上に14.5Mbのサイズをもつ。異質クロマチンはセントロメア部の約1Mbの領域と長腕遠位側にある約40Mb部分である。真性クロマチン長腕遠位側には、精子形成候補遺伝子が存在し、異質クロマチン部と合わせた領域を従来X染色体と対合しない領域、non recombinant region Y (NRY) と呼ばれていたが、後述する理由により、現在Male-specific region of the Y chromosome (MSY) と呼ばれている。

### Y染色体全塩基配列決定

MSYの全物理学的位置が、2003年に確定した [1]。Y染色体の塩基配列は巨大な繰り返し配列のため、一人の微小な塩基配列の違いを目安に、Y染色体正染色体部を220のBACクローンによってカバーされている。

Y染色体の全塩基配列決定によって、さまざまな構造的特徴が明らかとなった。従来、Y染色体は機能的な遺伝子がきわめて少なく、ジャンク遺伝子の集合体と予想されていた。進化の過程で常染色体やX染色体由来の塩基配列が修飾され、逆転写ウイルス配列由来の繰り返し配列も認めている。現在76のタンパクがコードされ、すでに27遺伝子が同定されている。

さて、真性クロマチン遠位側にある巨大な繰り返し配列はきわめて相同性の高い回文構造を示し、実際Y染色体の機能を維持する装置とし、生産的な組み換えが(Y-Y変換など)行われている。それは、ハプログループであるY染色体にも遺伝子を維持するための再組み換

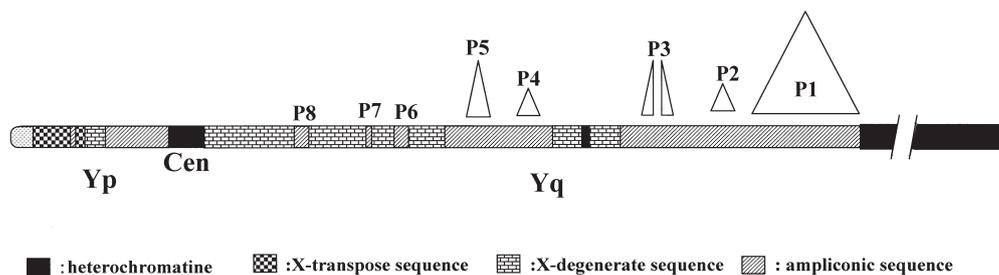
連絡先：高 榮哲，金沢大学大学院医学系研究科がん医科学専攻がん制御学講座集学的治療分野 (泌尿器科学)，

〒920-8641 石川県金沢市宝町13-1

TEL: 076-265-2393

FAX: 076-222-6726

E-mail: kohei@med.kanazawa-u.ac.jp



Skalesky, Nature 2003引用・改変

図2 Y染色体の塩基配列とパンドローム

え機構が存在していることを意味している。かつてX染色体と再組み換えを起こさない領域として、NRY“非組み換え領域”と称されてきたが[2]、実際には染色体内部において対合が可能であり、頻回にY-Y変換機構が存在する(homologous recombination)ことから[3]、現在男性特異領域MSYと称されている[4]。

### 真性クロマチン部の構造 [4]

MSYの真性クロマチン部は、a) X-transpose, b) X-degenerate, c) ampliconicの3領域がモザイク状に配されている(図2)。

#### 1) X-transpose配列

この部はY染色体の短腕上のみにある。塩基配列はX染色体のXq21部と99%以上の相同性を示し、300~400年前にX染色体から転移(transpose)したと考えられている。X染色体ときわめて高い相同性を示すが、X染色体と対合組み換えは行われていない。

#### 2) X-degenerate配列

塩基配列の特徴から古代常染色体の一部が性染色体の役割を担うことになった遺残物であり、それがXとY染色体と共進化(co-evolution)した領域と考えられている。この領域はX染色体の遺伝子と高い相同性を示し、染色体の変質(degenerate)型とされている。したがって、この領域に存在する遺伝子是对染色体上にXホモログをもつものが多い。遺伝子はubiquitousに発現している単一遺伝子が多い。

#### 3) ampliconic配列

99%以上のきわめて高い相同性を示す10~100kbを基本単位とする長い繰り返し配列より構成される。これら

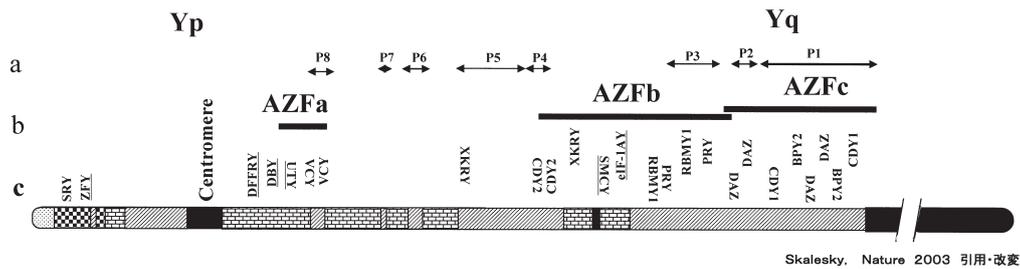
は、7つの領域に8つのパンドローム構造をもつ。そのサイズは、約10.2Mbにも及び、真性クロマチン全体の約半分の領域を占め、Y染色体特異的である。Y染色体上において機能している精子形成候補遺伝子の多くは、この領域にある。

### ampliconic領域のパンドローム構造

真性クロマチン長腕ampliconic領域の8種のパンドローム配列(P1~P8)を示す(図2)。これらのパンドローム配列はきわめて高い対称性を示し、99.94~99.997%に及ぶ塩基相同性を示す[4]。また、そのサイズは9kb~3.5Mbにも及ぶ。Y染色体上に存在する機能的な遺伝子の大部分はampliconic領域にあり、多コピー性であり、もちろんhomologous recombinationの主舞台でもある。とくに精巣特異的に発現している遺伝子が多く、精子形成に関与していると考えられている。

### Y染色体とAZF

1976年Tiepolo[5]らは、Y染色体長腕遠位部の欠失により精子形成障害が高頻度に出現する事実より、この部位に精子形成に関与する領域AZFが存在することを提唱した。一般に、AZFはY染色体長腕部の欠失と考えられている。1996年Vogt[6]らは無・乏精子症患者のY染色体長腕上の微小欠失と精巣の組織表現型を比較した結果、3つの領域に微小欠失の集中を報告し、AZFa,b,cと分類した(図3b)。AZFaの組織型はSertoli cell only(SCO)、AZFb, AZFcはそれぞれmaturation arrestおよびさまざまな組織型の混合であるとされる。



Skalesky, Nature 2003 引用・改変

- a, Y染色体上におけるパンドローム  
 b, Y染色体上におけるAZF領域  
 c, Y染色体上における精巢発現遺伝子

図3 Y染色体ゲノムとAZFとの関係

## AZF欠失とSTS

Y染色体の微小欠失はPCRを基礎としたSTS (sequence tagged site) 法によっている。

STS-PCR法は1992年Vollath [7]らが公表したY染色体特異STSマーカーによる。これ以降、多くの施設でAZFの微小欠失の報告が続いた [8,9,10]。しかし、STSマーカーが施設によって異なり、STSの順序もまちまちであった。ゲノム配列確定後、STSの物理的位置が容易に確定される筈であった。しかし、従来から用いられている多くのSTSは少なからずしもgene bank上で、その物理的位置が公開されていない。筆者らは、UCSC genome browser (<http://www.genome.ucsc.edu/>) のみに公開されているSTSのみを用い、不妊症患者420例の微小欠失を分析した。筆者らの施設での欠失患者は5.0%であった。

1999年Simoniら [9]は文献の集計により、男性不妊症の患者の7.3%がY染色体に微小欠失をもっているとした。これらの内訳は無精子症の66%、精子濃度500万/ml以下の高度乏精子症患者の28%、2000万/ml以下500万/ml以上の乏精子症患者の6%に微小欠失をもつと報告している。当初、男性不妊患者の2~53%にY染色体に微小欠失があるとされたが [10]、最近の報告では約7%前後に落ち着いている。

## 多型性と繰り返し配列におけるSTS

図3 aで示すように、Y染色体はパンドローム構造を示す。本来STSの意味は、ゲノム上において、その位置が一意的に決定される部位と考えられる。しかし、繰り返し配列の多い部位では、同一配列が存在しPCRによって、理論上物理的位置を確定することはできない。

さらに、Y染色体には多型性が多く存在することも知られている [9]。前述したように、従来施行されていたSTS-PCRの報告は、STSの順序が一定でなく、位置も混乱していた [11]。

われわれはgene bank上に公開されている、すなわちこれらのSTSは物理的位置が確定していることを意味するが、AZFc領域にあるSTSのみを選択して無・乏精子症に対してSTS-PCRを行い、その微小欠失を検証した。欠失のない患者において、1-2 STSの飛び石状の欠失は多型性が考えられる。多型性の疑われるすべてのSTSを省くと、比較的是っきりした欠失地図が明らかとなった (図4)。図5は本邦においてもっとも信頼できるマーカーと考えている。しかし、DYS239, HUMUT2378, DYS26は多コピーマーカーであり、P1とP2とを区別できない。

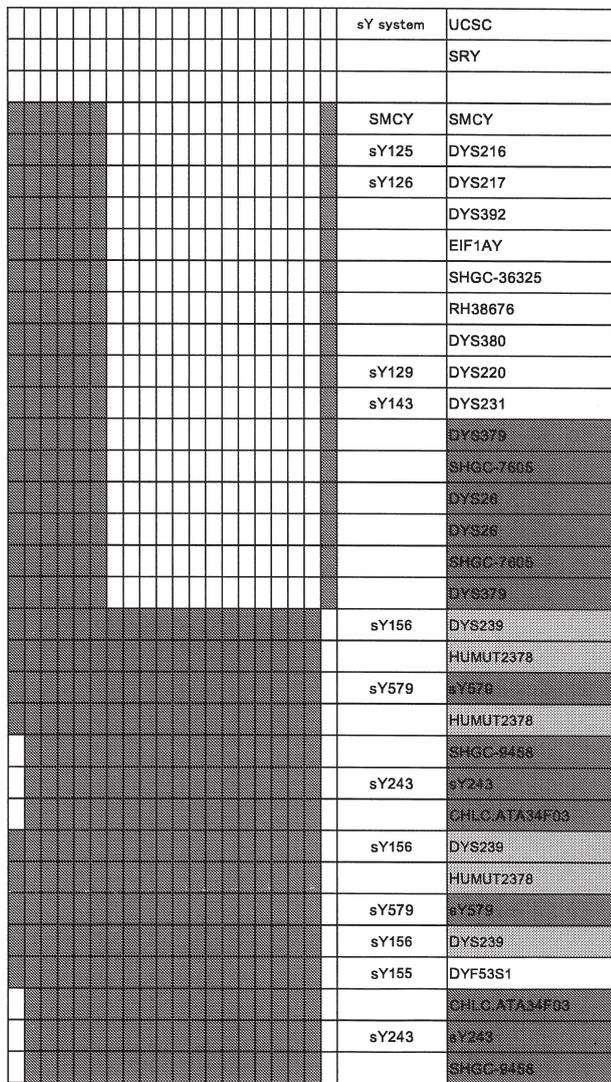
## Y染色体上の精子形成候補遺伝子群

1993年Maら [12]はRBMY (RNA binding motif on Y)、1995年Reijóら [13]はDAZ (deleted in azoospermia) などの精子形成候補遺伝子を同定した。

図3 cは、現在報告されているY染色体上に存在する精子形成候補遺伝子群の一部である [2]。それぞれの遺伝子に対応する、タンパクホモログ、組織発現、コピー数、Xホモログを示した (表1)。X-degenerate領域に存在する遺伝子はubiquitousに発現しており、Xホモログをもつが、唯一SRYは精巢特異的に発現し単一遺伝子である。また、ampliconic regionの遺伝子は精巢特異的に発現しており、精子形成候補遺伝子と考えられている [4]。これらの遺伝子はパンドローム内に存在しているために、表1に示したように多コピー性である。これらの多コピー性はhomologous recombination

表1 Y染色体上に存在する精巢発現遺伝子群

遺伝子表記	遺伝子名	組織発現	遺伝子コピー数 (パリンドローム) Xホモログ	
<b>X-degenerate 領域</b>				
<i>SRY</i>	Sex-determining region	Only testis	1	
<i>ZFY</i>	Zinc-finger on the Y	Multiple	1	<i>ZFX</i>
<i>DFFRY</i>	Drosophila fat facets related Y	Multiple	1	<i>DFFRX</i>
<i>DBY</i>	DEAD Box Y	Multiple	1	<i>DBX</i>
<i>UTY</i>	Ubiquitous transcribed Y	Multiple	1	<i>UTX</i>
<i>SMCY</i>	Selected mouse cDNA Y	Multiple	1	<i>SMCX</i>
<i>EIF1AY</i>	Essential initiation-translation factor 1A Y	Multiple	1	<i>EIF1AX</i>
<b>Ampliconic 領域</b>				
<i>XKRY</i>	XK related Y	Only testis	2 (P5)	—
<i>CDY 2</i>	Chromo domain Y 2	Only testis	2 (P1, P5)	—
<i>PRY</i>	PTP-BL related Y	Only testis	2 (P3)	—
<i>RBMY</i>	RNA binding motif Y 1	Only testis	6 (P3)	—
<i>BPY2</i>	Basic protein Y2	Only testis	3 (P1, P2)	—
<i>DAZ</i>	Deleted in Azoospermia	Only testis	4 (P1, P2)	—



□ 1コピー性STS ■ 2コピー性STS ▒ 3コピー性STS ■ 欠失

図4 多型性を省略したAZFcの微小欠失地図

によって維持されている。

**AZFb, c 欠失の機構**

パリンドローム塩基配列は相互に同一の塩基配列から構成されているので、対称点を中心に大きなループ状構造を形成している可能性が考えられている。巨大パリンドロームは、Y染色体内であたかも常染色体における対立染色体と同様な振る舞いをし、多コピー遺伝子が互いに向き合い、対遺伝子がY-Y変換という機構によって修復あるいは再組み換えを行い (homologous recombination)、これがパリンドローム内の遺伝子を維持する機構であると考えられている[1]。したがって、パリンドロームの欠失は、これらの再組み換え機構の破綻を意味することになる。

**Y染色体長腕部の欠失地図とパリンドローム**

AZFの分類は、当初組織表現型から3重型に分類された(図6)。Reppingら[3]は、従来のPCRでAZFb+c, AZFcの欠失している11例不妊症患者を選び、パリンドローム単位の欠失を検討した。従来のAZFb+cの欠失は、P5からP1.2までの欠失(P5/proximal-P1), P5からP1.1までの欠失(P5/distal-P1), P4からP1.1までの欠失(P4/distal-P1)の3種の欠失型を認め、AZFcの欠失はb2からb4の欠失(b2/b4)と一致しているとし、パリンドローム単位による分類を行った(図6)。

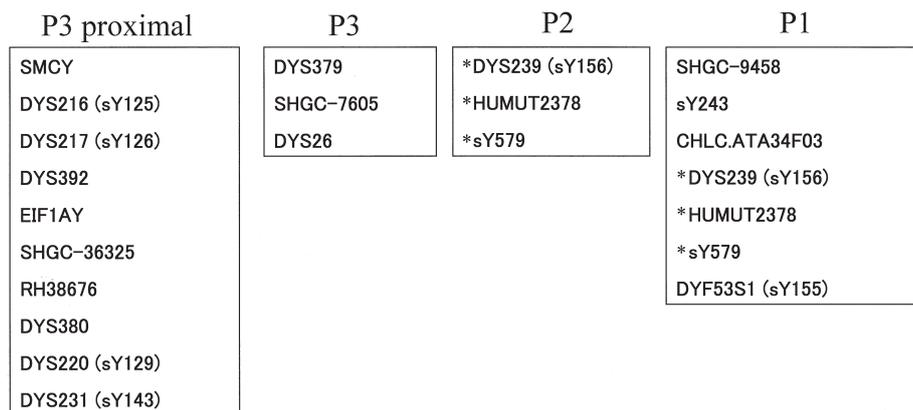


図5 パンドローム毎における多型性のきわめて少ないSTSマーカー

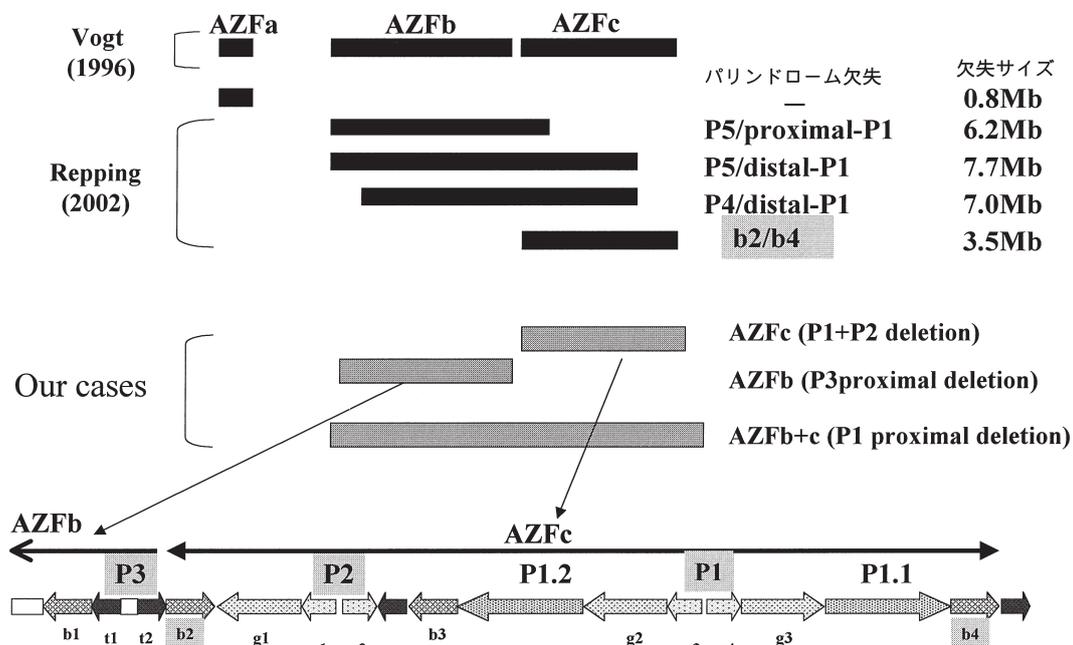


図6 AZF欠失の分類とパンドローム (文献4より一部引用)

われわれの多型性を考慮した分析 (図4) では、図5で示したSTS (図5\*) ではP1とP2とを区別できないので、結果的にVogtの分類に近かった (図6)。

## おわりに

精子形成関連遺伝子群はAZFc領域に存在しているが、未だ精子形成に必須な遺伝子は同定されていない。Y染色体のゲノム塩基配列が確定されると、パンドローム内に含まれる遺伝子クラスターの欠失によって精子形成障害が惹起されている可能性が示唆された。今後、

パンドローム内の部分欠失による精子形成障害の存在について検索し、その組織表現型を比較することによって、精子形成機構を解明する必要がある。

## 文献

1. Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx JP (2003) The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 423, 825-837.
2. Lahn BT, Page DC (1997) Functional coherence on the human Y chromosome. *Science* 278, 675-680.
3. Repping S, Skaletsky H, Lange J (2002) Recombination be-

- tween palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure. *Am J Hum Genet* 71, 906-922.
4. Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky Brown LG (2001) The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nat Genet* 29, 279-286.
  5. Tiepolo L, Zuffardi O (1976) Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the Y chromosome. *Hum Genet* 34, 119-124.
  6. Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S (1996) Human Y chromosome azoospermia factor (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* 5, 933-943.
  7. Vollrath D, Foote S, Hilton A, Brown LG, Beer-Romero P, Bogan JS, Page DC (1992) The human Y chromosome: a 43-interval map based on naturally occurring deletions. *Science* 258, 52-59.
  8. Nakashima M, Koh E, Namiki M (2002) Multiplex sequence-tagged site PCR for efficient screening of microdeletions in Y chromosome in infertile males with azoospermia or severe oligozoospermia. *Arch Androl* 48, 351-358.
  9. Simoni M, Bakker E, Eurlings MC (1999) Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions. *Int J Androl* 22, 292-299.
  10. Foresta C, Moro E, Ferlin A (2001) Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocr Rev* 22, 226-239.
  11. Lin YM, Chen CW, Sun HS, Hsu CC, Chen JM, Lin SJ, Lin JS, Kuo PL (2000) Y-chromosome microdeletion and its effect on reproductive decisions in taiwanese patients presenting with nonobstructive azoospermia. *Urology* 56, 1041-1046.
  12. Ma K, Inglis JD, Sharkey A (1993) A Y chromosome gene family with RNA-binding protein homology: candidates for the azoospermia factor AZF controlling human spermatogenesis. *Cell* 31, 1287-1295.
  13. Reijo R, Lee TY, Salo P (1995) Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat Genet* 10, 383-293.