

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 含 LRR 及 WD 結構的特定蛋白在造精過程的角色分析 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型  
計畫編號：NSC 95-2320-B-041-006-  
執行期間：95年08月01日至96年07月31日  
執行單位：嘉南藥理科技大學嬰幼兒保育系

計畫主持人：鄧燕妮  
共同主持人：林永明  
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理：林揚斌、蕭聿恬  
臨時工：許沛陽、林士超



處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 96 年 10 月 19 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫  成果報告  
 期中進度報告

含LRR及WD結構的特定蛋白在造精過程的角色分析

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC 95-2320-B-041-006-

執行期間：2006年8月1日至2007年7月31日

計畫主持人：鄧燕妮

共同主持人：林永明

計畫參與人員：林揚斌、蕭聿恬、林士超、許沛陽

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告  完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、  
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年  二年後可公開查詢

執行單位：嘉南藥理科技大學嬰幼兒保育系

中華民國 96年 10月 18日

## 中文摘要

關鍵詞：造精功能障礙患者，BC009436 基因，LRR 及WD 結構

BC009436 特定大量表現於睪丸組織，且在 cDNA 微晶片及同步 PCR (real-time PCR) 分析發現造精功能障礙患者 (MA 及 SCOS) 的 mRNA 表現，與正常生育能力者比較，有統計顯著差異，且由蛋白質序列及結構預測，發現 BC009436 所轉譯的蛋白是一個具有 LRR 及 3 個 WD-40 結構的蛋白，本研究成功的製備完成 BC009436 特定的單株抗體，在西方墨點法分析結果發現 BC009436 表現於老鼠睪丸組織有 2 種特定的蛋白質產物，且其中一種是屬於睪丸組織特有的。在免疫組織染色分析結果發現，BC009436 主要表現於老鼠造精過程的後期階段，包括 spermatocyte, spermatid 及成熟的精蟲。在免疫螢光分析的結果發現此蛋白質產物在精蟲主要表現於頭部與頸部交接的 centriole 位置，centriole 是 centrosome 及纖毛 (cili) 的重要組成，推測 BC009436 基因在造精過程應扮演著重要角色。

## 英文摘要

Key words: spermatogenetic failure, BC009436 gene, LRR & WD domain

A novel gene, NCBI accession number BC009436, is a testis-rich and significant different expression between spermatogenic defect and normal by cDNA microarray and real-time RT-PCR. The BC009436 protein is containing one leucine-rich repeats (LRR) and three WD-40 domain in the protein prediction. The LWD protein are majorly expressed from spermatocyte to mature spermatozoa of spermatogenesis. Under immunofluorescence microscopy study, spermatozoa showed strong homogeneous staining in the centrioles region and less intense signal in the principal piece and tail region of the human spermatozoas by colocalization with centrin. Centrioles are primarily involved in forming two structures—centrosomes and cilia. In the western blotting study, the LWD protein yielded more than two approximately 70 kDa isoforms in testis and semen, but the other organs just only one protein product. A specific isoform is expressed in testis and spermatozoa. The protein localizations of BC009436 gene product in the spermatozoa and testis are identified. This study may help to clarify the role of BC009436 genes in human spermatozoa and reproduction organs and to apply to clinical diagnosis in the future.

## 前言

根據世界衛生組織對於不孕症的定義：夫妻雙方結婚一年，在毫無避孕的狀態下沒有辦法受孕者稱為不孕症，其中 50% 因素來自於男方。造成男性不孕症的原因可分為遺傳性與非遺傳性因素 (Larry et al., 1997)。非遺傳性因素包括環境因素、生活習慣、生理因素等，

其中環境污染等，是影響精蟲品質與活動力的重要因素。在遺傳因素方面，目前已知會影響男性生殖能力的遺傳因素大部分與染色體數目、結構異常或單基因遺傳疾病的問題有關 (Mak and Javi, 1996)。但在不孕症的男性中，約有 40-60%在臨床理學檢查中無法確定其不孕症原因，因此將這些病人歸類為不明原因的不孕症 (idiopathic azoospermia) (De Kretser and Burger, 1997; Tuerlings et al., 1997)。

男性不孕症的病人中約有 10-23%是因為造精功能異常所起 (Larry et al., 1997)，此些患者的精蟲數目低於標準值  $20 \times 10^6/\text{mL}$ ，其男性第二性徵發育與睪丸形成與正常男性無顯著差異。依據精液中精蟲數目的多寡可將造精功能異常分類為四種：Azoospermia 為完全無精蟲者；Oligozoospermia 為精蟲數目少於  $20 \times 10^6/\text{mL}$ ；Polyzoospermia 為精蟲數目大於  $250 \times 10^6/\text{mL}$ ；Teratozoospermia 為 60%以上精蟲不正常但數目正常 (Asano et al., 1997)；至於精蟲活動力不佳者，則稱為 asthenozoospermia，若精蟲數目過少，又伴隨活動力不佳者，則稱為 oligoasthenospermia。

睪丸組織病理切片檢查上，依造精功能受阻礙程度的不同區分為四種類型：(1)、正常造精功能的睪丸組織 (Normal spermatogenesis, NR)：於睪丸組織切片中可見 Sertoli cells (SC)、spermatogonia (Spg)、spermatocyte (Spc) 及 maturing spermatid (Spd) 等分化的生殖細胞型態；(2)、造精功能低下的睪丸組織 (Hypospermatogenesis, HS)：其睪丸組織切片與正常的睪丸組織切片相同，也具有分化的生殖細胞型態，雖有成熟精子產生，但數量稀少；(3)、造精功能停滯的睪丸組織 (Maturation arrest, MA)：其最成熟的細胞型態為 round spermatid，沒有成熟的精子產生；(4)、缺乏生殖細胞的睪丸組織 (Sertoli cell-only syndrome, SCOS)：為最嚴重的睪丸組織病變，完全沒有生殖細胞 (germ cells) 存在 (Damjanov, 1993)。

先前以正常睪丸組織與造精功能障礙患者睪丸組織 (MA或SCOS) 間基因的表現差異分析 (differential gene expression)，利用cDNA微晶片分析的方式 (Duggan et al., 1999)，比較正常睪丸組織 (NR) 與造精功能障礙患者睪丸組織 (MA或SCOS) 間基因的表現差異 (differential gene expression)，幫助我們更了解精子形成過程中基因的調控機制及提供臨床對於不明原因男性不孕症 (idiopathic azoospermia) 的診斷。在cDNA微晶片分析之統計中，造精功能障礙患者睪丸組織 (MA或SCOS) 與正常睪丸組織比對發現BC009436 (accession number) cDNA有統計上顯著意義，其計算結果為 $\log_2\text{MA}/\text{NR}=0.25$ ； $\log_2\text{SCOS}/\text{NR}=0.08$ ，屬於down-regulated基因，因此基因於文獻搜尋中並無相關報導，故將其定義為一新發現而未被了解的基因 (novel gene)。為確認cDNA微晶片分析結果，設計同步RT-PCR (real-time RT-PCR) 進行造精功能障礙的睪丸組織中 (MA、SCOS) 與正常睪丸組織mRNA的表現量 (copy number) 分析，並以Glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 當作參

考基因校正候選基因mRNA的表現。實驗結果無論在正常睪丸組織與SCOS的比對或正常睪丸組織與MA的mRNA的表現比對，經GraphPad Prism Version 2.0軟體作Kruskal-Wallis test統計分析，P值均 $<0.01$ 達統計顯著意義，即BC009436的mRNA表現量在正常睪丸組織及造精功能障礙的睪丸組織（MA、SCOS）是有顯著差異的。以SMART及Pfam（protein families database）軟體預測蛋白質的二級結構，於三種不同物種分析結果其具有Leucine Rich Repeat（LRR） domain及三個WD domain（也稱 G-beta repeat；WD 40）（圖二）。以GCG軟體比對三種不同物種間胺基酸序列的相似度（similarity）及相同性（identity），得到人類AAH09436與小鼠BAC39318.1胺基酸比對結果其相似度及相同性分別為81.4%、78.3%；人類AAH09436與大白鼠XP\_222072.3胺基酸比對結果其相似度及相同性分別為80.9%、78.5%。

核甘酸預測蛋白質序列結果，人類BC009436、小鼠AK084948和大白鼠XM-222072三種不同物種之開啟讀碼框（ORF）其轉譯出的蛋白質序列，其在gene bank的序號（Accession number）分別為AAH09436、BAC39318.1及XP\_222072.3，分別由647、648及648個胺基酸所組成，蛋白質大小預測約70 kDa。以SMART及Pfam（protein families database）軟體預測蛋白質的二級結構，於三種不同物種分析結果其具有Leucine Rich Repeat（LRR） domain及三個WD domain（也稱 G-beta repeat；WD 40）（圖二）。以GCG軟體比對三種不同物種間胺基酸序列的相似度（similarity）及相同性（identity），得到人類AAH09436與小鼠BAC39318.1胺基酸比對結果其相似度及相同性分別為81.4%、78.3%；人類AAH09436與大白鼠XP\_222072.3胺基酸比對結果其相似度及相同性分別為80.9%、78.5%。

具有LRR 結構的蛋白質在細胞中的角色主要是藉由蛋白質與蛋白質間相互作用（protein-protein interactions）或附著於細胞上（cell adhesion）達到作用的目的（Zhang et al.,2005），例如：Ig C2（Williams and Barclay, 1988；Holness and Simmons, 1994）、Trk receptors（Martin-Zanca et al., 1989；Klein et al., 1989；Lamballe et al., 1991）、LIG-1（Suzuki et al.,1996）、ISLR（Nagasawa et al., 1997]等；WD結構蛋白主要在真核（Eukaryote）細胞中被發現，低等的原核（Prokaryote）細胞較少有WD結構蛋白。含WD結構蛋白在細胞中的角色分歧，其中G protein的G $\beta$  subunit是目前被研究最清楚的一種也是唯一有被解出結晶構造蛋白質（Wall et al., 1995；Lambright et al., 1996；Sondek et al., 1996），在哺乳類細胞（in mammals）有六種G $\beta$  subunit含有WD的結構，這些G $\beta$  subunit與signal transduction（Neer et al., 1993）、protein kinase C（Ron et al., 1994）的功能或與snRNP particles（Bjorn et al., 1989）形成有關。除此之外，含有WD結構的蛋白在細胞中還可能擔任其他角色，如有絲分裂的調控蛋白質（checkpoint protein），或在轉錄作用中擔任終止（transcription termination）及組織蛋白甲基化的角色（Irene., 1996；Yoona et al.,2004；Cheng et al., 2004）。

## 材料與方法

### BC009436 蛋白質多株抗體的製備：

比對人類 BC009436 及小鼠 AK084948 蛋白胺基酸序列相同的特定區域，在此相同的特定區域人工合成胺基酸序列 (FLQCHSKNNSPQDLETQLW) (委託勁因公司) 以此胺基酸序列免疫兔子，冀望由兔子獲得此抗體，並運用於人類及老鼠的檢測。兔子每隔一週以人工合成完成的胺基酸序列進行免疫作用，連續 3 次，並採血進行 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 分析，以瞭解是否有免疫成功，並以西方墨點法確認蛋白質位置是否正確。

### 以西方墨點法分析 BC009436 蛋白質表現情形

以製備完成的抗體，以 protein G resin 進行初步純化後，以此抗體進行西方墨點法分析，瞭解此蛋白在組織表現的情形。

### 老鼠睪丸組織免疫化學分析(Immunohistochemistry)

老鼠睪丸組織在石蠟包埋切片後，以自備的抗體進行老鼠睪丸組織的免疫化學分析，瞭解此蛋白質在整個造精過程中表現的情形。

老鼠精蟲經抹片於在玻片上，以自備的抗體進行老鼠睪丸組織的免疫螢光分析，瞭解此蛋白質在整個精蟲中表現的情形與位置。

## 結果

### 人類、小鼠和大白鼠等通用的專一性且特定多株抗體製備完成

由本研究室針對人類AAH09436、小鼠BAC39318.1和大白鼠XP\_222072.3共同且抗原性高的區域，設計多泔汰鏈 (FLQCHSKNNSPQDLETQLW)，並委託生計廠商進行製造 (波士特公司)，進行兔子的免疫，利用兔子產生多株抗體，目前已得到特定專一性的抗體，且已經過Protein G sepharose純化，可成功的運用在老鼠睪丸組織的免疫組織化學染色、精蟲免疫染色分析及蛋白質西方墨點法分析等(圖一、圖二)。

### BC009436的老鼠同源基因 (XM-222072) 在睪丸與精液的表現

由自製人類與老鼠通用的多株抗體以免疫組織染色分析 (immunohistochemistry) 發現此基因屬於老鼠造精過程的後期表現基因 (late stage, post-meiosis stage)，在老鼠精子方面，則主要表現在精蟲的 midpiece 部位；在 Western blot 分析發現，睪丸與精液中具有二種以

上的蛋白質產物（圖二），相對於其他組織僅有一種或沒有蛋白質產物表現，因此本研究將對於此基因在人類及老鼠睪丸及精蟲的表現，作更深入的研究，以釐清此基因在精蟲及造精過程中的角色。

### **BC00943 蛋白質產物是一種中心粒蛋白質（Centriole protein）**

在免疫螢光分析的結果發現此蛋白質產物在精蟲主要表現於頭部與頸部交接的位置，此位置包括 centriole、midopiece 等構造，經過與 centriole 中重要蛋白 centrin 進行比對分析，證實此 BC009436 蛋白質產物表現於 centriole，而其在造精過程的重要功能，未來將繼續作深入探討。

### **討論**

本研究成功的製備完成 BC030547 特定的單株抗體，在西方墨點法分析結果發現 BC009436 表現於老鼠睪丸組織有 2 種特定的蛋白質產物，且其中一種是屬於睪丸組織特有的，睪丸組織的此特定蛋白質產物在生理上應有其重要角色，需進一步分析研究。在免疫組織染色分析結果發現，BC009436 主要表現於老鼠造精過程的後其階段，包括 spermatocyte, spermatid 及成熟的精蟲。在免疫螢光分析的結果發現此蛋白質產物在精蟲主要表現於頭部與頸部交接的位置，此位置包括 centriole、midopiece 等構造，經過與 centriole 中重要蛋白 centrin 進行比對分析，證實此 BC009436 蛋白質產物表現於 centriole，而其在造精過程的重要功能，未來將繼續作深入探討。

### **自評**

1. 本研究成功的製備完成 BC030547 特定的單株抗體，運用此抗體可進行後續的許多有關蛋白質方面的分析，例如：蛋白質表現位置、螢光免疫染色、組織免疫染色、蛋白質定量分析等。
2. BC009436 基因產物與 centrin 進行蛋白位置分析比對，證實 BC009436 蛋白質產物是一種 centriole 蛋白質，因此未來將可針對 BC009436 或 centriole 蛋白質在造精過程的角色作更深入分析。
3. 有關 BC009436 蛋白質作用（interaction proteins）的目標蛋白的尋找，因為進行的不盡理想，因此尚未有重要結果，但這部份研究將持續，以藉作用蛋白質（interaction proteins）幫助釐清此基因的功能角色。

## 參考文獻

- Asano M, Furukawa K, Kido M et al. Growth retardation and early death of beta-1,4-galactosyltransferase knockout mice with augmented proliferation and abnormal differentiation of epithelial cells. *EMBO* 1997;16:1850-1857.
- Bjorn SP, Soltyk A, Beggs JD, Friesen JD. PRP4 (RNA4) from *Saccharomyces cerevisiae*: its gene product is associated with the U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein particle. *Mol Cell Biol* 1989;9:3698-3709.
- Cheng H, He X, Moore C. The Essential WD Repeat Protein Swd2 Has Dual Functions in RNA Polymerase II Transcription Termination and Lysine 4 Methylation of Histone H3. *Mol Cell Biol* 2004;24:2932-2943.
- Damjanov, I. Pathology of infertility. First edition. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis, 1993, p18-21
- De Kretser, D. M., and Burger, H. G. (1997) The Y chromosome and spermatogenesis. *N Engl J Med* 336:576-577.
- Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nature Genet.* 1999;21:10-14.
- Holness, C.L. and Simmons, D.L. Structural motifs for recognition and adhesion in members of the immunoglobulin superfamily. *J. Cell Sci.* 1994;107:2065-2070.
- Irene GH, Jessica F, Ying L, et al. Folding of Proteins with WD-Repeats: Comparison of Six Members of the WD-Repeat Superfamily to the G Protein, Subunit. *Biochemistry* 1996;35:13985-13994.
- Klein, R., Parada, L.F., Coulier, F. and Barbacid, M. trkB, a novel tyrosine protein kinase receptor expressed during mouse neural development. *EMBO J* 1989;8:3701-3709.
- Lamballe F, Klein R, Barbacid M. Brain-derived neurotrophic factor rapidly enhances phosphorylation of the postsynaptic N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1. *Cell* 1991;66:967-979.
- Lambright DG, Sondek J, Bohm A, Skiba NP, Hamm HE, Sigler PB. The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* 1996;379(6563):311-319.
- Larry I, Lipshutz SS. Infertility in the male. Third edition. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis, 1997, p173-174.
- Mak, V., and Jarvi, K. A. The genetics of male infertility. *J Urol* 1996;156:1245-1257.
- Martin-Zanca, D., Oskam, R., Mitra, G., Copeland, T. and Barbacid, M. Molecular and biochemical characterization of the human trk proto-oncogene. *Mol. Cell Biol* 1989;9:24-33.
- Nagasawa, A., Kubota, R., Imamura, Y., Nagamine, K., Wang, Y., Asakawa, S., Kudoh, J., Minoshima, S., Mashima, Y., Oguchi, Y. and Shimizu, N. Cloning of the cDNA for a new member of the immunoglobulin superfamily (ISLR) containing leucine-rich repeat (LRR). *Genomics* 1997;44:273-279.
- Neer EJ, Schmidt CJ, Smith T. LIS is more. *Nat Genet* 1993;5:3-4.
- Sondek J, Bohm A, Lambright DG, Hamm HE, Sigler PB. Crystal structure of a G-protein beta gamma dimer at 2.1 Å resolution. *Nature* 1996;379(6563):369-74. Erratum in: *Nature* 1996;379(6568):847.
- Suzuki, Y., Sato, N., Tohyama, M., Wanaka, A. and Takagi, T. cDNA cloning of a novel



membrane glycoprotein that is expressed specifically in glial cells in the mouse brain. LIG-1, a protein with leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains. *J. Biol. Chem* 1996;271:22522-22527.

Tuerlings, J., Kremer, J., and Meuleman, E. The practical application of genetics in the male infertility clinic. *J Androl* 1997;18:576-581.

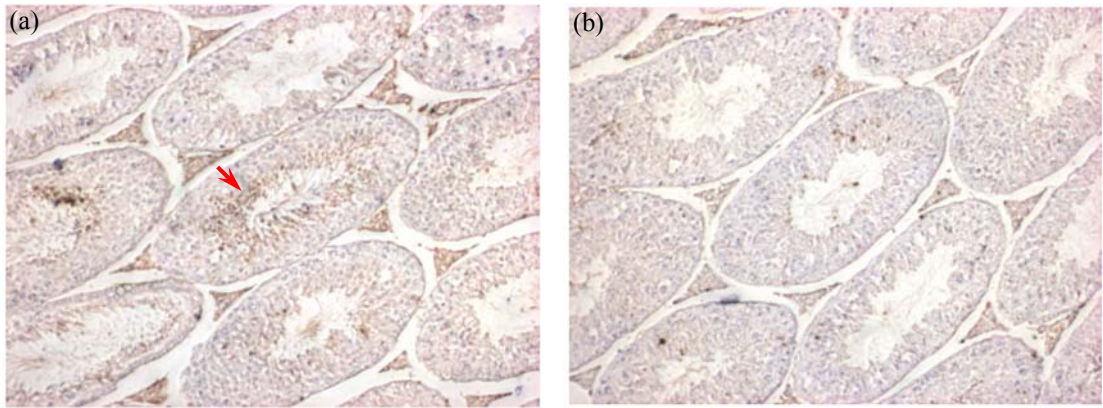
Wall MA, Coleman DE, Lee E, Iniguez-Lluhi JA, Posner BA, Gilman AG, Sprang SR. The structure of the G protein heterotrimer Gi alpha 1 beta 1 gamma 2. *Cell*. 1995;83:1047-1058.

Williams AF, Barclay AN. The immunoglobulin superfamily – domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol* 1988;6:381-405.

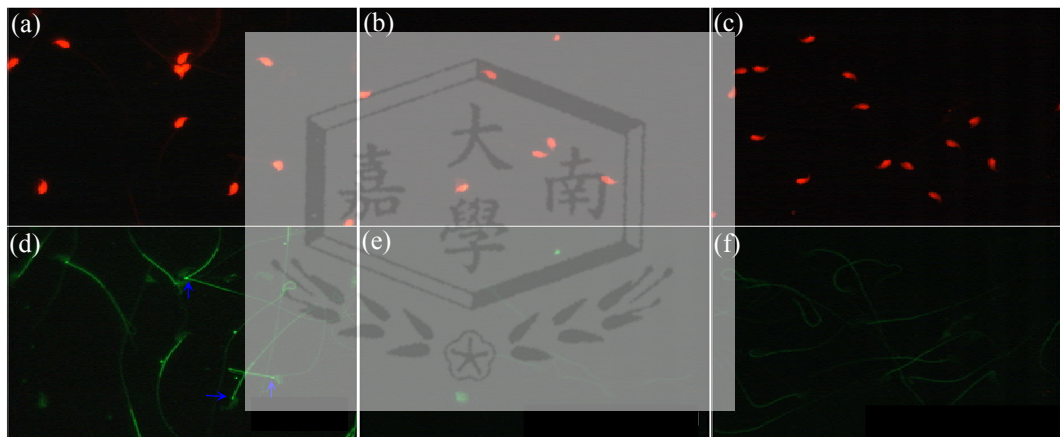
Yoona YM, Baek KH, Jeong SJ, et al. WD repeat-containing mitotic checkpoint proteins act as transcriptional repressors during interphase. *FEBS Letters* 2004;575:23-29



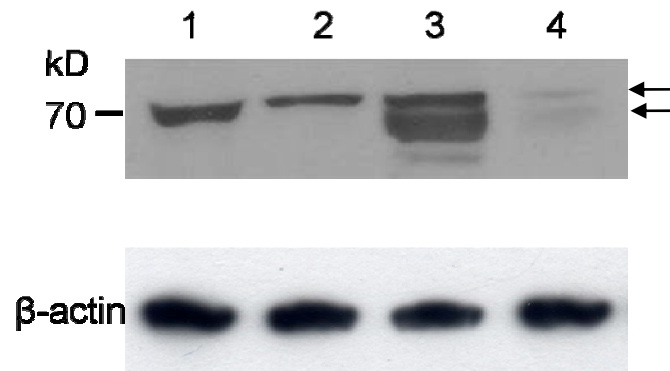
(A)



(B)



圖一、利用自製 anti-AAH09436 抗體，進行老鼠睪丸組織的免疫組織化學分析及精蟲免疫螢光分析：(A) 睪丸組織的免疫組織化學分析的結果，此基因主要表現在趨近成熟的精蟲（紅色箭頭位置），(a)為 anti-AAH09436 IgG, (b)為 pre-immune serum (B) 老鼠精蟲免疫螢光分析的結果，此基因主要表現在精蟲的 midpiece 的位置（藍色箭頭位置），(a)~(c)為 PI 染色, (d)為 anti-AAH09436 IgG, (e)PBS 取代 IgG 的控制組, (f) pre-immune serum 的控制組。



圖二、BC009436 的老鼠同源基因在組織中的表現。以自製的多株抗體進行老鼠組織的西墨點分析，在睪丸及精蟲表現特定的兩種以上的蛋白質產物（箭頭所指的位置，約 70 kDa），而在其他組織則僅有一種蛋白質表現。Land 1：liver；Land 2：kidney；Land 3：testis；Land 4：spermatozoa。

