

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

生殖細胞專一性表達基因 Cphx 及 Gcse 的功能分析 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 100-2320-B-040-012-
執行期間：100年08月01日至101年07月31日
執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系(所)

計畫主持人：王淑紅

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：周晉毅

公開資訊：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 101 年 11 月 01 日

中文摘要：本計畫延續過去研究 14A3 區已知母源性基因 Cphx 基因及下游之新穎的生殖細胞專一性表達基因 Gcse 的功能，分析已建立之 Cphx-dsRNA 基因轉殖鼠發現基因轉殖母鼠有提早不孕的現象，大約六個月後即沒有生育能力，分離出其卵巢組織發現型態異常，且卵細胞數目比未轉殖母鼠少，濾泡型態異常，另外在卵母細胞注射 CphX dsRNA 時，GV 卵母細胞達到第二次減數分裂階段的卵子數與對照組比較顯著下降（3.6 Vs 18.8%），若 Cphx dsRNA 注射入 2PN embryo，胚胎大部份停在 morula 時期，只有少數進入 blastocyst，我們推測 Cphx 對於卵細胞的成熟發育與早期胚胎發育都是必須的調控因子。另外我們也研究新穎生殖細胞專一性表達基因 Gcse 在卵細胞、精細胞成熟所扮演的角色，Gcse 轉錄出兩種主要的 mRNA 剪輯型式：Gcse-1 (1589bp) 與 Gcse-s (906bp)，分別可轉譯出 215 與 152 個胺基酸序列。Gcse-1 與 Gcse-s 蛋白的 N 端 118 個胺基酸組成一致，而 Gcse-s 蛋白的 C 端有 56 個胺基酸與人類 AKT2 (Protein kinase B) 的催化區域高達 50% 的相似度，從 Northern blots 與 RT-PCR 實驗得知，Gcse-1 表現於睪丸與卵巢之中，Gcse-s 專一地存在於睪丸組織。以 RT-PCR、原位雜交與組織化學免疫染色分析不同發育時期的卵巢組織，發現 Gcse-1 專一表現於卵細胞，從進入減數分裂的卵母細胞到成熟卵細胞皆有 Gcse-1 mRNA 表現，而 Gcse-1 蛋白則從初級濾泡時期明顯增加，在受精卵中還是有 Gcse-1 mRNA 的表現但兩個細胞胚胎則沒有 Gcse-1 基因的表現，但成熟卵細胞及受精卵細胞開始有 Gcse-s 基因的表現。在睪丸組織中，Gcse-1 mRNA 訊號從粗絲期晚期精母細胞表現到早期單倍體圓精細胞中，而 Gcse-s 只在早期的單倍體圓精細胞偵測到訊號。然而 Gcse-1 與 Gcse-s 的蛋白除了表現於睪丸外，其蛋白亦表現於副睪組織（成熟精子）中(圖六 B)。藉由分離生殖細胞螢光免疫染色分析，發現 Gcse-1 蛋白存在於精母細胞核內，而在減數分裂完成的單倍體精細胞中，則發現 Gcse 蛋白會轉移頂體構造，與頂體標記蛋白-Lectin-PNA 訊號位置重疊，由目前的研究成果，我們推測 Gcse 基因在生殖細胞進行減數分裂及頂體發育過程扮演重要角色。

中文關鍵詞：母源性基因，同源箱基因，減數分裂，卵細胞生成，精細胞生成，頂體

英文摘要：Gametogenesis is a complicated developmental process of germ cells from primordial diploid cells into haploid gametes. To understand the mechanisms controlling gametogenesis, we characterized the

function of germ cell specific gene, Cphx and Gcse, in mouse chromosome 14A3. Cphx gene is a maternal homeobox gene specifically expressed in oocytes. We generate the Cphx-dsRNAi transgenic mice to study the function of Cphx gene. Both male and female transgenic mice were fertile. However, the female transgenic mice have fewer fetus in the first pregnancy and lost their fertility after 6 month old. The morphology of transgenic ovary and follicule was abnormal and the oocyte numbers in transgenic ovaries were fewer than those in nontransgenic ovary. We suggest that decrease Cphx expression cause premature ovarian failure. On the other hand, we study the function(s) of Cphx in early embryonic development by direct microinjection of Cphx dsRNA in germinal vesicle oocytes and 2 pronucleus embryos. The ratio of GV oocyte progress into meiosis was decrease and 2PN embryo only develop to morula but not blastocyte. On the other hand, we identified a novel germ cell-specific gene, Gcse. Gcse produces two major transcripts with 1589bp (Gcse-1) and 906bp (Gcse-s) in length. Northern blots and RT-PCR analyses of multiple tissues reveal that Gcse-1 is expressed in both testes and ovaries, but Gcse-s only expressed in testes. During female gonad development, Gcse-1 is expressed from embryonic day 13.5 to adult, specific in oocytes, and then maintained in ovulated eggs and fertilized eggs. However, Gcse-s signals were only detected in postmeiosis oocytes, ovulated oocytes and fertilized eggs. During male gonad development, strong Gcse-1 signals are detected in late pachytene spermatocytes and round spermatids. However, Gcse-s transcripts are existed only in round spermatids. Furthermore, GCSE-L proteins' expressions and their subcellular localizations within cells are stage specific. GCSE-L is detected in the nucleus of late pachytene spermatocytes. During meiosis, GCSE-L is translocated to acrosome regions in spermatids and maintained in acrosome of spermatozoa. GCSE-L co-localizes with ACROSIN and Lectin peanut agglutinin in the Golgi apparatus. However, GCSE-S proteins are only expressed in nucleus of spermatid. From these

results, we suggest that GCSE proteins play roles in meiosis and may involve in acrosome biogenesis during spermiogenesis.

英文關鍵詞： maternal gene, homeobox gene, meiosis, oogenesis, spermatogenesis, acrosome

生殖細胞專一性表達基因 Cphx 及 Gcse 的功能分析

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 100-2320-B-040 -012 -

執行期間：100 年 08 月 01 日至 101 年 07 月 31 日

執行機構及系所：中山醫學大學

計畫主持人：王淑紅

共同主持人：

計畫參與人員：周晉毅

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 0____ 份：

移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

國際合作研究計畫國外研究報告

處理方式：除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

中 華 民 國 101 年 10 月 30 日

中文摘要：

本計畫延續過去研究 14A3 區已知母源性基因 *Cphx* 基因及下游之新穎的生殖細胞專一性表達基因 *Gcse* 的功能，分析已建立之 *Cphx*-dsRNA 基因轉殖鼠發現基因轉殖母鼠有提早不孕的現象，大約六個月後即沒有生育能力，分離出其卵巢組織發現型態異常，且卵細胞數目比未轉殖母鼠少，濾泡型態異常，另外在卵母細胞注射 *CphX* dsRNA 時，GV 卵母細胞達到第二次減數分裂階段的卵子數與對照組比較顯著下降 (3.6 Vs 18.8%)，若 *Cphx* dsRNA 注射入 2PN embryo，胚胎大部份停在 morula 時期，只有少數進入 blastocyst，我們推測 *Cphx* 對於卵細胞的成熟發育與早期胚胎發育都是必須的調控因子。另外我們也研究新穎生殖細胞專一性表達基因 *Gcse* 在卵細胞、精細胞成熟所扮演的角色，*Gcse* 轉錄出兩種主要的 mRNA 剪輯型式：*Gcse-l* (1589bp) 與 *Gcse-s* (906bp)，分別可轉譯出 215 與 152 個胺基酸序列。*Gcse-l* 與 *Gcse-s* 蛋白的 N 端 118 個胺基酸組成一致，而 *Gcse-s* 蛋白的 C 端有 56 個胺基酸與人類 AKT2 (Protein kinase B) 的催化區域高達 50% 的相似度，從 Northern blots 與 RT-PCR 實驗得知，*Gcse-l* 表現於睪丸與卵巢之中，*Gcse-s* 專一地存在於睪丸組織。以 RT-PCR、原位雜交與組織化學免疫染色分析不同發育時期的卵巢組織，發現 *Gcse-l* 專一表現於卵細胞，從進入減數分裂的卵母細胞到成熟卵細胞皆有 *Gcse-l* mRNA 表現，而 *Gcse-l* 蛋白則從初級濾泡時期明顯增加，在受精卵中還是有 *Gcse-l* mRNA 的表現但兩個細胞胚胎則沒有 *Gcse-l* 基因的表現，但成熟卵細胞及受精卵細胞開始有 *Gcse-s* 基因的表現。在睪丸組織中，*Gcse-l* mRNA 訊號從粗絲期晚期精母細胞表現到早期單倍體圓精細胞中，而 *Gcse-s* 只在早期的單倍體圓精細胞偵測到訊號。然而 *Gcse-l* 與 *Gcse-s* 的蛋白除了表現於睪丸外，其蛋白亦表現於副睪組織 (成熟精子) 中 (圖六 B)。藉由分離生殖細胞螢光免疫染色分析，發現 *Gcse-l* 蛋白存在於精母細胞核內，而在減數分裂完成的單倍體精細胞中，則發現 *Gcse* 蛋白會轉移頂體構造，與頂體標記蛋白-Lectin-PNA 訊號位置重疊，由目前的研究成果，我們推測 *Gcse* 基因在生殖細胞進行減數分裂及頂體發育過程扮演重要角色。

關鍵字：母源性基因，同源箱基因，減數分裂，卵細胞生成，精細胞生成，頂體

Abstract:

Gametogenesis is a complicated developmental process of germ cells from primordial diploid cells into haploid gametes. To understand the mechanisms controlling gametogenesis, we characterized the function of germ cell specific gene, *Cphx* and *Gcse*, in mouse chromosome 14A3. *Cphx* gene is a maternal homeobox gene specifically expressed in oocytes. We generate the *Cphx*-dsRNAi transgenic mice to study the function of *Cphx* gene. Both male and female transgenic mice were fertile. However, the female transgenic mice have fewer fetus in the first pregnancy and lost their fertility after 6 month old. The morphology of transgenic ovary and follicle was abnormal and the oocyte numbers in transgenic ovaries were fewer than those in nontransgenic ovary. We suggest that decrease *Cphx* expression cause premature ovarian failure. On the other hand, we study the function(s) of *Cphx* in early embryonic development by direct microinjection of *Cphx* dsRNA in germinal vesicle oocytes and 2 pronucleus embryos. The ratio of GV oocyte progress into meiosis was decrease and 2PN embryo only develop to morula but not blastocyte. On the other hand, we identified a novel germ cell-specific gene, *Gcse*. *Gcse* produces two major transcripts with 1589bp (*Gcse-l*) and 906bp (*Gcse-s*) in length. Northern blots and RT-PCR analyses of multiple tissues reveal that *Gcse-l* is expressed in both testes and ovaries, but *Gcse-s* only expressed in testes. During female gonad development, *Gcse-l* is expressed from embryonic day 13.5 to adult, specific in oocytes, and then maintained in ovulated eggs and fertilized eggs. However, *Gcse-s* signals were only detected in postmeiosis oocytes, ovulated oocytes and fertilized eggs. During male gonad development, strong *Gcse-l* signals are detected in late pachytene spermatocytes and round spermatids. However, *Gcse-s* transcripts are existed only in round spermatids. Furthermore, GCSE-L proteins' expressions and their subcellular localizations within cells are stage specific. GCSE-L is detected in the nucleus of late pachytene spermatocytes. During meiosis, GCSE-L is translocated to acrosome regions in spermatids and maintained in acrosome of spermatozoa. GCSE-L co-localizes with ACROSIN and Lectin peanut agglutinin in the Golgi apparatus. However, GCSE-S proteins are only expressed in nucleus of spermatid. From these results, we suggest that GCSE proteins play roles in meiosis and may involve in acrosome biogenesis during spermiogenesis.

Keyword: maternal gene, homeobox gene, meiosis, oogenesis, spermatogenesis, acrosome

前言、

本研究計畫延續過去研究之 14A3 區 *Cphx*, *Duxbl* 及 *Gcse* 基因群之研究，其中 *Cphx* 屬於卵細胞專一表達基因(Li et al., 2006)，而新穎的 *Gcse* 基因則是專一性表達於生殖細胞，其中 *Cphx* 屬於同源箱基因，同源箱基因家族 (homeobox gene families) 是一群轉錄調節因子的基因群組，其蛋白產物可藉由調節下游基因的表現，而調控生物個體之發育過程 (De Rebertis, E.M., 1994)，除了可以影響胚胎時期動物之發育，掌控細胞分化及引導器官之形成。在年幼動物體的第二性徵之產生中，同源箱基因也佔有重要的調控角色 (Gehring, et al., 1994)。根據其同源箱區高度保留之核酸序列的特徵，脊椎動物之同源箱基因可以分成兩大類，第一類是族群性的，稱為 class I，如 Hox 基因群，這些基因位於相同的染色體上形成群落，在動物胚胎的型態形成上扮演很重要的角色。除了 Hox 基因群外，目前已有一群生殖相關的同源箱基因群 Rhox (reproductive homeobox gene) 被發現 (MacLean et al., 2005)，Rhox 基因群位於位於 X 染色體上的 A2 區，Rhox 基因群會選擇性的表達在雄性及雌性生殖組織，這些基因群有些也具有功能上的重複性，當其中一個基因缺失時另外的基因可以取代它的功能，而目前我們研究的 14A3 區的基因: *Cphx*, *Duxbl* (Wu et al., 2010) 及 *Gcse* 同樣的以基因群的方式選擇性的表達在雄性及雌性生殖細胞，三個基因都在卵細胞發育的過程會表現，但在精細胞發育的過程，*Duxbl* 與 *Gcse* 的表現也呈現接力的現象，此種以基因群的方式共同調控生殖系統的方式，對於生殖能力強的齧齒動物而言可能具有演化上的優勢；或者在基因群周圍可能存在著一些特異性的調控序列，負責此複雜又精密的調控，其詳細機制並不清楚。

研究目的:

本研究計畫將延續過去的研究，探討 14A3 區 *Cphx* 及 *Gcse* 基因對於生殖細胞發育與早期胚胎發育所扮演的角色，由過去的研究中我們產製了 *Cphx* dsRNA 基因轉殖鼠，成功的降低了 *Cphx* 基因的表現，同時發現 *Cphx* dsRNA 基因轉殖鼠有提早不孕的現象，又根據基因轉殖鼠的交配分析，沒有 *Cphx* TG/TG 轉殖鼠的存在，暗示了 *Cphx* 除了對於影響卵細胞的發育之外對於早期胚胎的發育也是必須的，本研究的重點在分析造成 *Cphx* 轉殖鼠不孕的原因及探討 *Gcse* 基因在生殖細胞的表現分佈。

文獻探討、

1. 卵細胞專一性表達基因(Cphx)

本研究計畫中的 *Cphx* 同源箱基因屬於卵細胞專一性表達的同源箱基因，過去的研究指出卵細胞專一性表達的同源箱基因 *Nobox* (newborn ovary homeobox-encoding gene) 的缺失會造成小鼠不孕 (Rajkovic et al., 2004)，最近的研究更指出有些卵巢提早退化的病人 (premature ovarian failure; POF)，其 *Nobox* 基因產生同源箱區的突變進而影響其與下游基因結合的能力，因此 *Nobox* 基因的突變對一些 POF 病人而言可能是致病因素之一 (Qin et al., 2007)，由此可見同源箱基因在卵細胞發育上確實扮演重要的角色。除了同源箱基因外，已知調節卵細胞基因表現的轉錄因子，如 *Figla* (Factor In the GermLine, Alpha) 對於生殖也扮演很重要的角色 (Liang, Soyal et al. 1997; Soyal, Amleh et al. 2000)，*Figla* 基因剔除母鼠出生後卵巢組織無法形成 primordial follicle，同時卵細胞在數天之內消失，顯示 *Figla* 對於生殖細胞及 follicle 的發育扮演很重要的角色，同時由 *Figla* 基因

踢除母鼠卵巢 microarray 的分析(Joshi et al., 2006)，發現本研究計畫中的 *Cphx* 表現也下降了，表示 *Figla* 蛋白直接或間接的調控 *Cphx* 基因的表現，因而影響卵細胞的成熟發育。本研究計畫以直接受 *Figla* 蛋白調控的 *Zp3* 基因的 promoter 啟動 *Cphx*-dsRNAi 的表現，分析 *Cphx* 表現下降對卵細胞成熟或早期胚胎發育的影響。

2. 精細胞專一性表達基因(Gcse)

根據 Unigene database 及定量 PCR 的分析，發現小鼠基因體 4% 的基因只表現於單倍體雄性生殖細胞中(Shultz, et al., 2003)，進一步分離 spermatocyte 或 round spermatid 並分析其基因表現，發現其中分別有 11% 或 22% 的基因屬於睪丸專一性的，而這些睪丸專一性的基因，有一半以上其功能未知(Hong et al., 2005; Choi et al., 2007)，因此研究精細胞專一表達基因，將有助於我們瞭解不孕症雄性患者之雄性生殖細胞發育的缺失，對於發展避孕藥也有幫助，由於破壞精細胞專一表達基因尤其是表現於精子發生期 (Spermiogenic phase) 的基因，對體細胞及 spermatogonia 較少副作用。本研究中之 *Gcse* 基因除了表現於卵細胞外，也專一性的表現於雄性生殖細胞，進入減數分裂的 spermatocyte 開始有 *Gcse* 蛋白的表現，減數分裂後 *Gcse* 由細胞核轉運至細胞質，成為頂體蛋白的一部份，頂體異常在人類會造成一種罕見的不孕症稱為 globozoospermia，發生率占不孕症病因之 0.1% (Aitken, et al., 1990)，一些頂體專一性表達基因如 *Acrosin* 突變後導致授精延緩(Adham, et al. 1997)；*Gopc*(Golgi-associated PDZ and coiled-coil motif) 異常表現時，使頂體發育不全，導致 globozoospermia (Yao et al., 2002)，另外也有一些頂體蛋白陸續被發現，如 *Afaf* (Li et al., 2006b); *AEP1*(Luk et al., 2006)及 *VAD1.2/AEP2* (Lee et al., 2008)等，但這些蛋白的功能仍未知，因此研究 *Gcse* 蛋白在雄性生殖細胞包括頂體之表現與功能有助於我們對於雄性生殖細胞減數分裂及頂體發育之了解。

研究方法、結果與討論 (含結論與建議)

(一). *Cphx* gene

(1). 由過去我們對於 *Cphx*-dsRNA 基因轉殖鼠分析結果顯示，減少 *Cphx* 基因的表現量，基因轉殖鼠還是有生殖的能力，但是前幾胎的胎數明顯的減少，同時基因轉殖母鼠六個月以後有提早不孕的現象，取出 *Cphx*-dsRNA 基因轉殖鼠之卵巢後發現卵巢的外型不正常(*Cphx* Fig.1)，切片分析卵細胞數目也比對照組低，同時其濾泡也呈現異常的現象，由目前結果顯示，減少 *Cphx* 基因的表現影響卵細胞的成熟因而造成基因轉殖鼠提早不孕。(Cphx Fig.2)

(2) 在 *Cphx*-dsRNA 基因轉殖鼠分析結果顯示，雄性基因轉殖鼠與雌性基因轉殖鼠交配無法得到 Tg/Tg 小鼠，我們推測 *Cphx* 對於早期胚胎發育可能是必需的，因此我們將 GV oocyte 或 2PN embryo 顯微注射 *CphX* dsRNA 後，GV oocyte 進入第二次檢數分裂的只剩 3.6% (對照組為 18.8%)，而 2PN embryo 只能發育至 morula 時期，只有極少數能夠進入囊胚期，因此我們推測 *Cphx* 基因在卵細胞發育及早期胚胎發育都扮演很重要的角色。最近的研究以生物資訊的方法也發現人類 *Cphx*-like 的基因，將來也可以分析不孕病人或 POF 病人，其是否有 *Cphx*-like 基因異常現象。

(二). *Gcse* gene

(1). *Gcse* 基因結構分析

Gcse 位於小鼠 14 號染色體 A3 區塊，轉錄出兩種主要的 mRNA 剪輯型式：*Gcse-l* (1589bp) 與 *Gcse-s* (906bp)，分別可轉譯出 215 與 152 個胺基酸序列。

(2). *Gcse* 基因表現的模式分析：

從 Northern blots 與 RT-PCR 實驗得知，*Gcse-l* 表現於睪丸與卵巢之中，*Gcse-s* 專一地存在於睪丸組織(*Gcse*-Fig.1)。以 RT-PCR，原位雜交與組織化學免疫染色分析不同發育時期的卵巢組織，發現 *Gcse-l* 專一表現於卵細胞，從進入減數分裂的卵母細胞到成熟卵細胞皆有 *Gcse-l* mRNA 表現，然而在 2 cell embryo 中並未偵測到 *Gcse-l* mRNA 的表現，有趣的是完成第一次減數分裂的成熟卵細胞及受精卵細胞都有 *Gcse-s* mRNA 的表現(*Gcse*-Fig.2)，而 *Gcse-l* 蛋白則從初級濾泡時期明顯增加(*Gcse*-Fig.3)。在睪丸組織中，*Gcse-l* mRNA 訊號從粗絲期晚期精母細胞表現到早期單倍體圓精細胞中，而 *Gcse-s* 只在早期的單倍體圓精細胞偵測到訊號(*Gcse*-Fig.4,5)。然而 *Gcse-l* 與 *Gcse-s* 的蛋白除了表現於睪丸外，其蛋白亦表現於副睪組織（成熟精子）中。藉由分離生殖細胞螢光免疫染色分析，發現 *Gcse-l* 蛋白存在於精母細胞核內，而在減數分裂完成的單倍體精細胞中，則發現 *Gcse* 蛋白會轉移頂體構造，與頂體標記蛋白—Lectin-PNA 訊號位置重疊(*Gcse*-Fig.6)。由 GC2(spd)細胞轉染 *Gcse-l*-EGFP 及 *Gcse-s*-EGFP，觀察到 *Gcse-l*-EGFP 表現於核外的 vesicle(推測為 proacrosome)，而 *Gcse-s*-EGFP 表現於細胞核內(*Gcse*-Fig.7)。

(3).**總結與討論:** *Gcse* gene 屬於生殖細胞專一性表達基因，由目前的研究顯示在生殖細胞進行減數分裂過程中，其在細胞內部的表達部位根據 spermatogenesis 不同時期而改變，減數分裂過程中，*Gcse-l* 由核轉移至 acrosome，另外卵細胞由進入減數分裂開始至卵細胞成熟及受精卵都有 *Gcse-l* 的表現，但 2cell embryo *Gcse-l* 明顯的消失，另外 *Gcse-s* 只表現於單倍體的精細胞與完成減數分裂的成熟卵細胞及受精卵細胞，因此推測 *Gcse* 在生殖細胞減數分裂過程扮演重要的角色，同時對於 acrosome 的形成是必須的。

參考文獻:

黃士玲碩士論文:新穎生殖細胞專一性表達基因(*Gcse*)的表達趨勢與參與精細胞頂體生成過程之探討(2010).

姚俊年碩士論文:小鼠卵細胞特異性表現同源箱基因 *Cphx* 的功能分析(2009)

Chuan-Nien Yao, Ming-Shiun Tsai and **Sue-Hong Wang***. (2008) Functional Analyses of a Oocyte-specific Homeobox Gene, *Cphx*. 第二十三屆 (九十七年度) 生物醫學聯合學術年會 *The Joint Annual Conference of Biomedical Sciences* P544.

Shih-Ling Huang, Ming-Shiun Tsai, Chia-Ying Lin, **Sue-Hong Wang*** (2009) Molecular Cloning and Expression Pattern Analysis of a Novel Germ Cell-Specific Expressed Gene, *Gcse*. 第二十四屆(九十八年度) 生物醫學聯合學術年會 *The Joint Annual Conference of Biomedical Sciences*. P520.

黃士玲*, 藍國蓉, 蔡明勳, 王淑紅#. Identification and Characterization of a Novel Germ Cell Specific Expressed Gene, *Gcse*. 第二十五屆 (九十九年度) 生物醫學聯合學術年會 *The Joint Annual Conference of Biomedical Sciences* (2010) P916.

- Shih-Ling Huang^{*}, Ming-Shiun Tsai, **Sue-Hong Wang[#]**. *Gcse*, a novel germ-cell specific gene, is involved in acrosome biogenesis during mouse spermatogenesis. 2010 Developmental Biology Retreat. P13. Aug. 9~10. 2010. 救國團復興青年活動中心。
- 鄭恩惠、王淑紅、黃俊嘉、黃梨香、陳忠義、李茂盛 (2010) 細胞質多聚腺苷酸化同源基因干擾 RNA 會抑制在小鼠卵母細胞進行減數分裂。台灣婦產科醫學會九十九年度擴大學術研討會。
- Aitken, R. J., Kerr, L., Bolton, V., Hargreave, T., 1990. *Fertil Steril.* 54, 701-7.
- Adham, I. M., K. Nayernia, et al. (1997). *Mol Reprod Dev* 46(3), 370-376.
- Choi, E., Lee, J., Oh, J., Park, I., Han, C., Yi, C., Kim do, H., Cho, B. N., Eddy, E. M., Cho, C., 2007. *BMC Genomics.* 8, 256.
- De Rebertis, E.M. (1994) The hemeobox in cell differentiation and evolution. In : Guidebook to the Homeobox genes, Douboule , D. (Ed) , Oxford University Press, New York , p11-23.
- Gehring, W.J., Qian, Y.Q., Bileter, M., Furukbo-ToKunaga, K., Schier, A.F., Resendez-Perez, D., Affolter, M., Otting, G. and Wuthrich, K. (1994) *Cell* 78, 211-223.
- Hong, S., Choi, I., Woo, J. M., Oh, J., Kim, T., Choi, E., Kim, T. W., Jung, Y. K., Kim, D. H., Sun, C. H., Yi, G. S., Eddy, E. M., Cho, C., 2005. *J Biol Chem.* 280, 7685-93.
- Joshi, S., Davies, H., Sims, L.P., Levy, S.E. and Dean, J. (2006). *BMC Dev Biol* 7: 67-79.
- Lee, K. F., Tam, Y. T., Zuo, Y., Cheong, A. W., Pang, R. T., Lee, N. P., Shum, C. K., Tam, P. C., Cheung, A. N., Yang, Z. M., Yeung, W. S., Luk, J. M., 2008. *Mol Hum Reprod.* 14, 465-74.
- Li, H., Tsai, M. S., Chen, C. Y., Lian, W. C., Chiu, Y. T., Chen, G. D., Wang, S. H., 2006a. *Mol Reprod Dev.* 73, 825-33.
- Li, Y. C., Hu, X. Q., Zhang, K. Y., Guo, J., Hu, Z. Y., Tao, S. X., Xiao, L. J., Wang, Q. Z., Han, C. S., Liu, Y. X., 2006b. *FEBS Lett.* 580, 4266-73.
- Luk, J. M., Lee, N. P., Shum, C. K., Lam, B. Y., Siu, A. F., Che, C. M., Tam, P. C., Cheung, A. N., Yang, Z. M., Lin, Y. N., Matzuk, M. M., Lee, K. F., Yeung, W. S., 2006. *J Cell Physiol.* 209, 755-66.
- Liang L, Soyal SM, and Dean J. (1997) *Development* 124(24):4939-4947.
- MacLean, J.A., Chen, M.A., Wayne, C.M., Bruce, S.R., Rao, M., Meistrich, M., Macleod, C., and Wilkinson, M.F. (2005) *Cell* 120; 369-382.
- Qin, Y., Choi, Y., Zhao, H., Simpson, J. L., Chen, Z. J., and Rajkovic, A. (2007) *Am. J. Hum. Genet* 81: 576-581.
- Rajkovic A, Pangas SA, Ballow D, Suzumori N and Matzuk MM. (2004) *Science* 305(5687):1157-1159.
- Schultz, N., Hamra, F. K., Garbers, D. L., 2003. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 12201-6.
- Soyal SM, Amleh A, and Dean J. (2000) *Development* 127(21):4645-4654.
- Wu, S.L., Tsai, M.S., Wong, S.H., Hsieh-Li, H.M., Tsai, T.S., Chang, W.T., Huang, S. L., Chiu, C.C. and Wang, S.H. * (2010) *Dev. Dyn.* 239, 927-940.
- Yao, R., Ito, C., Natsume, Y., Sugitani, Y., Yamanaka, H., Kuretake, S., Yanagida, K., Sato, A., Toshimori, K., Noda, T., 2002. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 11211-6.

附圖

Cphx-Fig1.

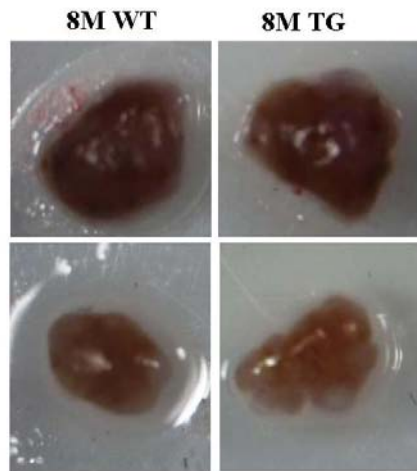
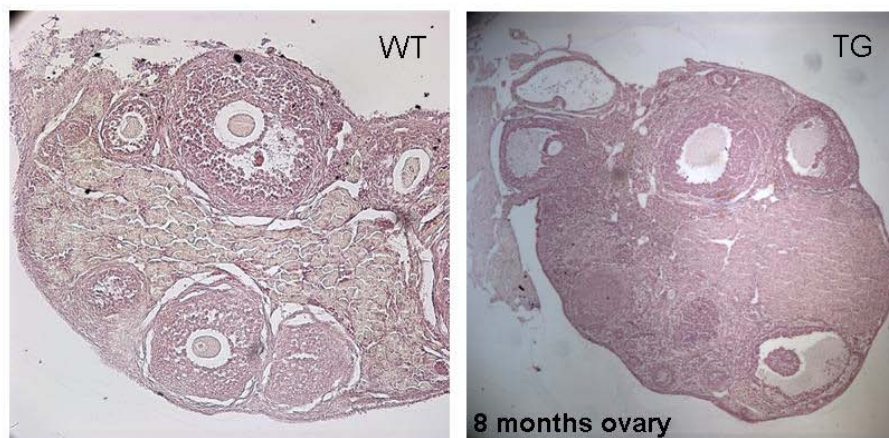


Fig. 1 提早不孕之 TG 鼠之卵巢與仍有生育能力之同齡小鼠卵巢之比較，TG 鼠之卵巢明顯的形狀異常。

Cphx-Fig. 2



	WT 13months	TG 13months	WT 8months	TG 8months
primordial/ primary	226	186	286	232
secondary/ antral	163	150	189	148

Fig. 2 研究發現轉殖鼠大約在八個月後就喪失生育能力，其卵巢很明顯的較 wild type 小，組織切片染色後，發現濾泡的形狀也異常，各時期濾泡數也較 wild type 少，推測 Cphx 表現量減少，可能還是影響了卵細胞或濾泡細胞的發育，使的卵

巢中之卵細胞減少的較快，因此造成提早不孕。

Gcse-Fig.1

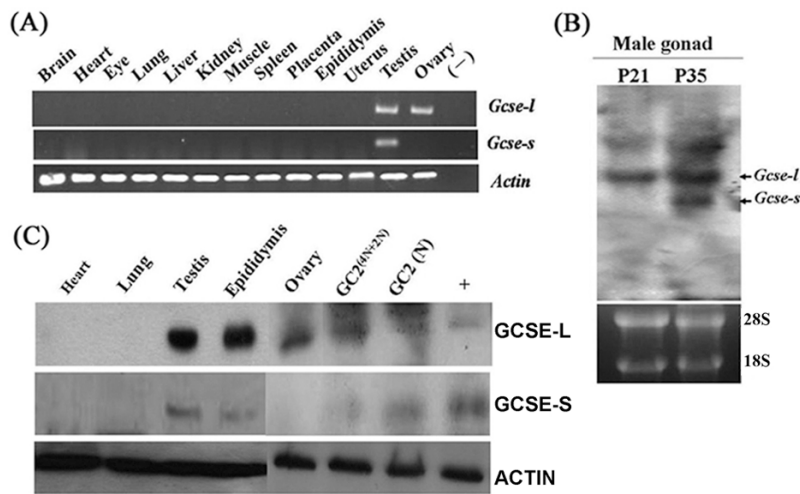


Figure 1 Expression profiles of *Gcse-l* and *Gcse-s* transcripts and proteins. (A) The expression levels of *Gcse-l* and *Gcse-s* transcripts in adult mouse tissues were analyzed by RT-PCRs. Expression level of *Actin* was used as an internal control. (B) Northern blot analysis of *Gcse-l* and *Gcse-s* in testis of postnatal 21 and 35 days. Total RNAs were separated by electrophoresis and 400bp (S214-S614) DNA was used as a probe to detected both *Gcse-l* and *Gcse-s* transcripts. 28S and 18S rRNA was used as loading control. (C) The expressions of GCSE-L and GCSE-S proteins in different tissues were detected by Western blotting. Expression level of *Actin* was used as an internal control. GC2 (4N+2N): spermatocyte; GC2 (1N): spermatid.

Gcse-Fig.2

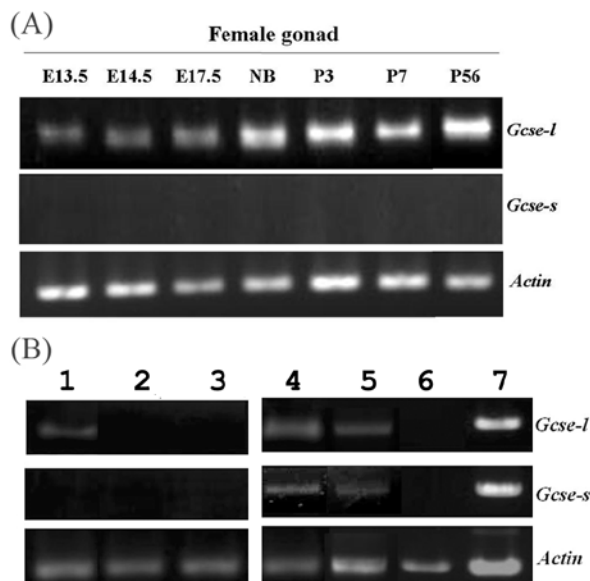


Figure 2 Analysis of expression levels and profiles of *Gcse-l* during female gonad and early embryo developments by RT-PCRs. The expression level and profiles of *Gcse-l* was analyzed by RT-PCRs. (A). Total RNAs were extracted from ovaries from different

embryonic days (E13.5 to E17.5), newborn mice (NB), and mice at different postnatal days (3d to 56d). (B) Total RNAs were extracted from ovaries (1), cumulus cells (2), CHO-K1 cells (3), 100 oocytes (4), 100 zygotes (5), 50 2-cell embryos (6), and testes (7). Expression levels of *Actin* were used as internal controls. The PCRs for oocytes, zygotes and 2-cell embryos were performed 35 cycles, but for other tissues and cells were 30 cycles.

Gcse-Fig.3

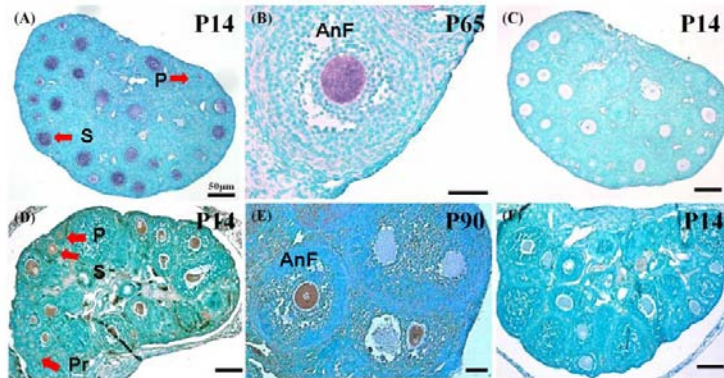


Figure 3 Identifying *Gcse-l* transcripts and GCSE-L proteins in ovaries by *in situ* hybridizations and immunohistochemistry. (A) Localizations of *Gcse-l* transcripts were analyzed in postnatal days 14 and adult ovaries. Adjacent sections were labeled with digoxigenin-labeled anti-sense (A and B) and sense probes (C). (B) GCSE-L proteins in postnatal day 14 and adult ovaries was probed with affinity purified GCSE-polyclonal antibodies (D and E) and normal rabbit IgG (F), respectively. GCSE proteins are barely detectable in oocytes of primordial (Pr) follicles, but specifically expressed in primary (P), secondary (S), and antral follicles (AnF) as indicated.

Gcse-Fig.4

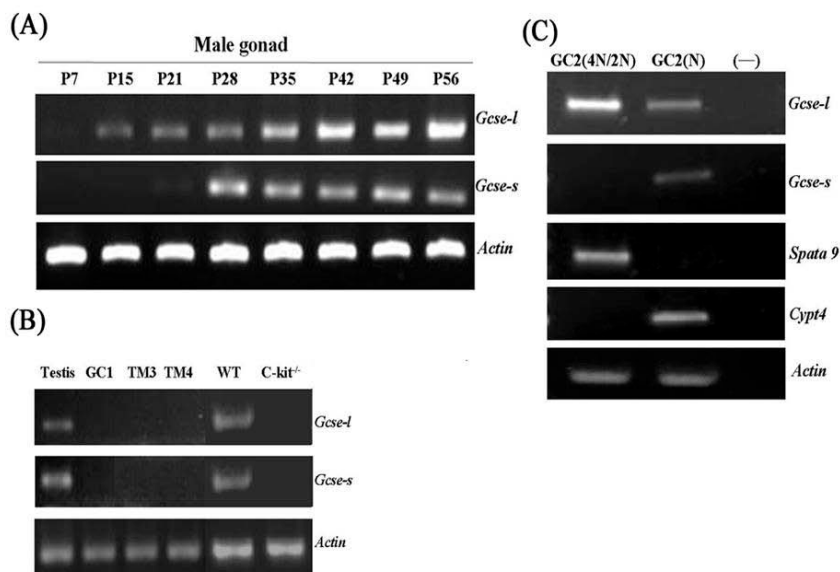


Figure 4 Analysis of expression levels and profiles of *Gcse-l* and *Gcse-s* during male gonad development and testis-related cell lines. The expression levels and profiles of *Gcse-l* and *Gcse-s* were analyzed by RT-PCRs. (A) Total RNAs were extracted from testis from postnatal day (P7 to P56) mice. (B) Total RNAs were extracted from testes of wild type or *C-kit*^{-/-} mice, spermatogonia (GC1), Leydig (TM3) and Sertoli (TM4) cell lines. (C) Total RNAs were extracted from different DNA content GC2 cells collected by flow cytometry. GC2 (4N+2N): spermatocyte; GC2 (1N): spermatid. *Spata9*⁵⁶ and *Cypt4*⁵⁷ are specifically expressed in spermatocyte and spermatid, respectively.

Gcse-Fig.5

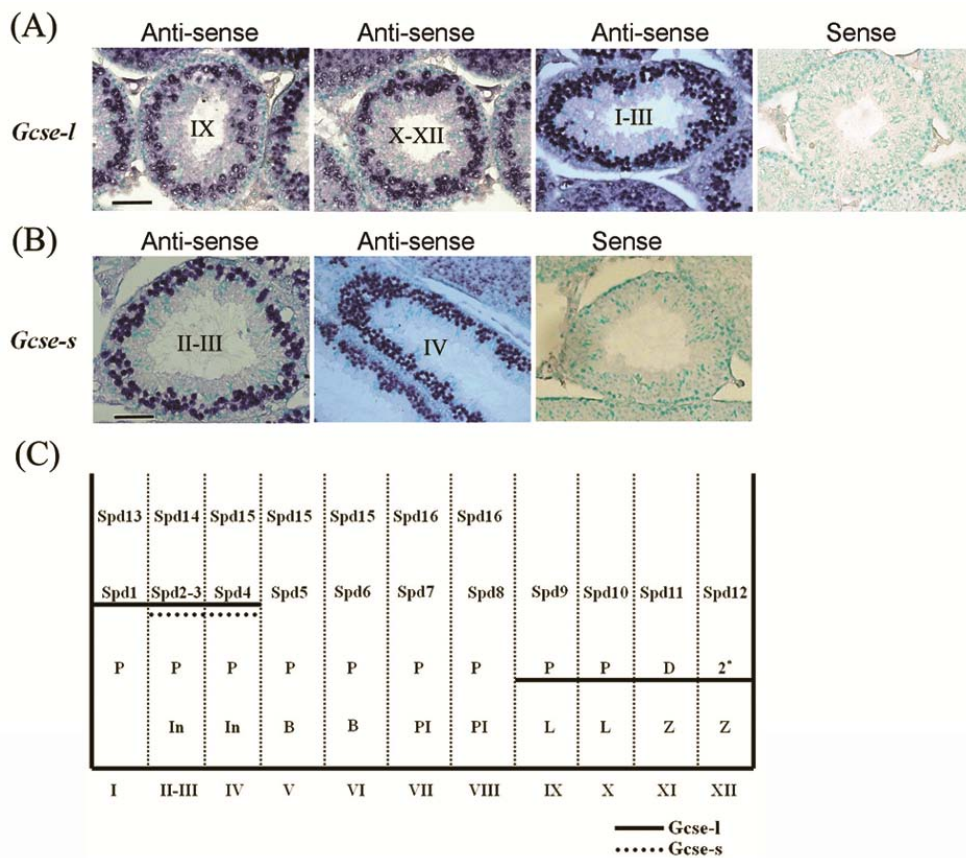
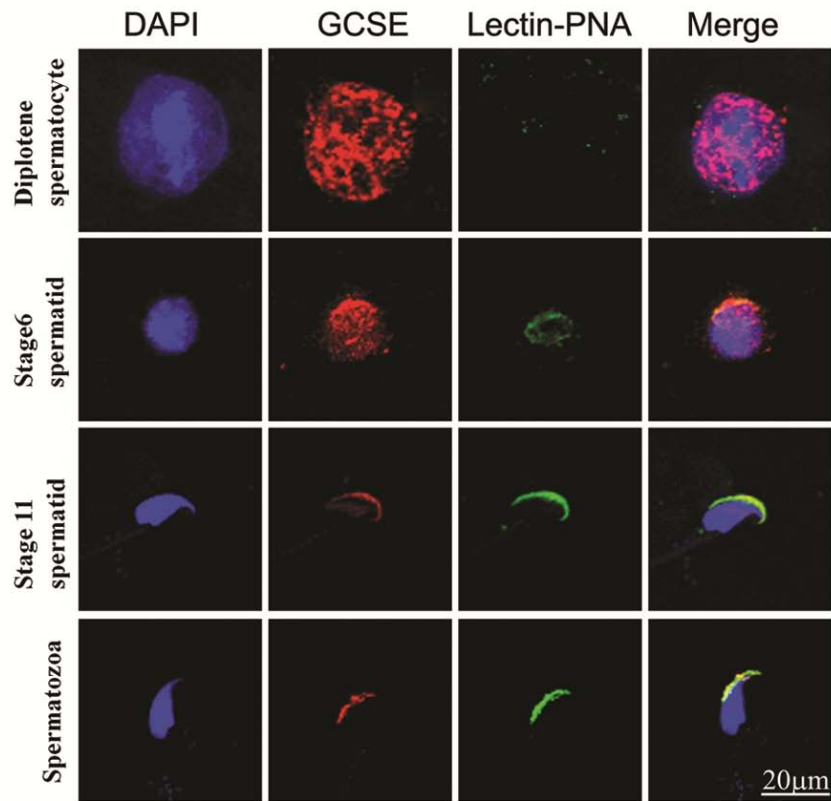


Figure 5 Analyses of *Gcse-l* and *Gcse-s* expressions in adult mouse testes. Adjacent sections of mouse testis were labeled with digoxigenin-labeled anti-sense and sense probes for *Gcse-l* (A) or *Gcse-s* (B). The stage of spermatogenesis is indicated above each seminiferous tubule. (C) Schematic presentation of 12 stages in the mouse seminiferous epithelial cycle⁵⁸. The thick line and dot line underline the cell types indicated the corresponding expression cell type of *Gcse-l* and *Gcse-s*. Abbreviations: In, intermediate spermatogonia; B, type B spermatogonia; PI, preleptotene spermatocytes; L, leptotene spermatocytes; Z, zygotene spermatocytes; P, pachytene spermatocytes; D, diplotene spermatocytes; 2^o, secondary spermatocytes; Spd, spermatid. Scale bar: 50µm.

Gcse-Fig. 6

(A) Germ cells



(B) GC2

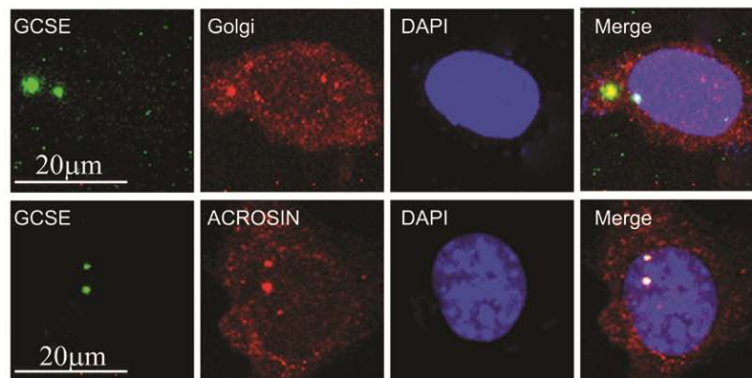


Figure 6 Changes of localizations of GCSE proteins during spermatogenesis by immunofluorescence analysis. Analysis of GCSE expressions in isolated male germ cells (A) and GC2 spermatid cells (B). (A) Dual immunofluorescent microscopy of GCSE and Lectin-PNA in germ cells isolated from testis and epididymis. Cell nuclei were stained with DAPI. Image of three panels were merged. (B) Analysis of GCSE expressions in isolated 1N GC2 cells by confocal microscope. Co-localizations of GCSE and ACROSIN were identified in the Golgi of 1N GC2 cells.

Gcse-Fig. 7

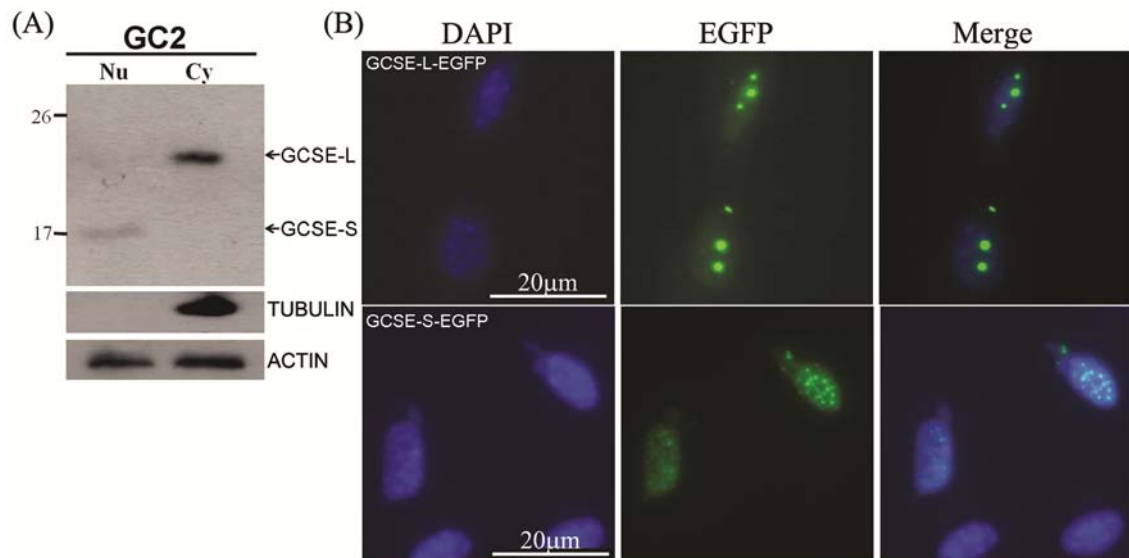


Figure 7 Subcellular localizations of GCSE-L and GCSE-S proteins. (A) GCSE-L and GCSE-S protein expressions in GC2 cells were analyzed by Western blotting of nucleus and cytoplasmic proteins. β -tubulin was used as cytoplasmic marker. (B) GCSE-L-EGFP or GCSE-S-EGFP expression vectors were transfected into GC2 cells and EGFP signals were detected by fluorescence microscope, respectively.

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

有關 Cphx 及 Gcse 之研究成果包括：

兩本碩士論文及 5 篇國內研討會論文

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以500字為限）

學術成就:

根據我們針對 Cphx 基因功能的研究發現，Cphx 表現減少造成小鼠提早不孕，影響整個卵巢組織中卵細胞與濾泡的發育，人類也有所謂的 POF (premature ovary failure) 的病人，其月經週期有提早中止的現象，因此探討小鼠 Cphx 基因在卵細胞成熟過程所扮演的角色將有助於我們了解 POF 的分子機制，為將來的 POF 病人的治療提供一個思考方向。

Gcse 屬於生殖細胞專一性表達基因，根據我們的研究發現，Gcse 在生殖細胞進入減數分裂時期，有不同的表現形式，因此我們推測 Gcse 在生殖細胞減數分裂時扮演一定的角色，又在單倍體的精細胞中，Gcse 累積在頂體，頂體的異常也是造成人類不孕的原因之一，因此對於 Gcse 基因功能的了解也可以協助我們了解頂體的發育，及了解精細胞異常所造成的不孕原因。

不孕症一直是現代競爭繁忙的工商社會的一項議題之一，造成不孕症的原因包括結婚年紀往後延的趨勢，造成生殖細胞的品質不佳，及環境的惡化變遷，影響生殖系統的發育及生殖細胞的發育，因此針對生殖細胞發育機制的探討，將有助於我們了解造成不孕症的原因及將來治療不孕症的藥物設計，甚至生殖控制方面的議題如避孕藥的設計等等提供一些解答。

國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2012/10/30

國科會補助計畫	計畫名稱: 生殖細胞專一性表達基因Cphx及Gcse的功能分析
	計畫主持人: 王淑紅
	計畫編號: 100-2320-B-040-012- 學門領域: 醫學之生化及分子生物
無研發成果推廣資料	

100 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：王淑紅		計畫編號：100-2320-B-040-012-					
計畫名稱：生殖細胞專一性表達基因 Cphx 及 Gcse 的功能分析							
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	5	0	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力 （本國籍）	碩士生	1	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		章/本
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力 （外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p style="text-align: center;">其他成果</p> <p>(無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	無
---	---

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

有關 Cphx 及 Gcse 之研究成果包括：

兩本碩士論文及 5 篇國內研討會論文

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

根據我們針對 Cphx 基因功能的研究發現，Cphx 表現減少造成小鼠提早不孕，影響整個卵巢組織中卵細胞與濾泡的發育，人類也有所謂的 POF (premature ovary failure) 的病人，其月經週期有提早中止的現象，因此探討小鼠 Cphx 基因在卵細胞成熟過程所扮演的角色將有助於我們了解 POF 的分子機制，為將來的 POF 病人的治療提供一個思考方向。

Gcse 屬於生殖細胞專一性表達基因，根據我們的研究發現，Gcse 在生殖細胞進入減數分裂時期，有不同的表現形式，因此我們推測 Gcse 在生殖細胞減數分裂時扮演一定的角色，又在單倍體的精細胞中，Gcse 累積在頂體，

頂體的異常也是造成人類不孕的原因之一，因此對於 Gcse 基因功能的了解也可以協助我們了解頂體的發育，及了解精細胞異常所造成的不孕原因。

不孕症一直是現代競爭繁忙的工商社會的一項議題之一，造成不孕症的原因包括結婚年紀往後延的趨勢，造成生殖細胞的品質不佳，及環境的惡化變遷，影響生殖系統的發育及生殖細胞的發育，因此針對生殖細胞發育機制的探討，將有助於我們了解造成不孕症的原因及將來治療不孕症的藥物設計，甚至生殖控制方面的議題如避孕藥的設計等等提供一些解答。

