

男性不妊症に關与する遺伝子群の包括的解析

(H10-ゲノム-012)

平成10年度厚生科学研究費補助金
(ヒトゲノム遺伝子治療研究事業)
研究報告書

平成11年4月

研究代表者 西宗義武

(大阪大学微生物病研究所 教授・所長)

目次

厚生科学研究費補助金総括研究報告書（別添2） 1

厚生科学研究費補助金分担研究報告書（別添3）

分担研究報告書 奥山明彦
大阪大学医学部教授 6

分担研究報告書 岡部勝
大阪大学遺伝情報実験施設教授 9

分担研究報告書 野崎正美
大阪大学微生物病研究所助教授 11

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム遺伝子治療研究事業）

総括研究報告書

男性不妊症に関与する遺伝子群の包括的解析

主任研究者 西宗義武 大阪大学微生物病研究所所長

研究要旨

ヒト男性不妊症の多様な原因を探り、その治療法を開発するために、実験動物マウスで精子形成あるいは受精に係わる多くの遺伝子を包括的に単離、解析し、その結果をヒトゲノム解析に還元することを目的として研究を行った。平成10年度にはサブトラクテッドライブラリーを作製し、重差分化法を用いて精子形成後期過程である半数体特異的遺伝子を85種類単離した。それらの一次構造から1)既に報告されている既知遺伝子、2)既知遺伝子と相同であるが、新規の遺伝子、3)相同性のない新規遺伝子、の3群に大別した。既に報告されている半数体特異的遺伝子の多くが含まれていることから考えて包括的解析が可能な材料の確立に成功したものと考えられる。順次各遺伝子にコードされる蛋白質の解析を進めているが、これまでのところ、その構造から体細胞型に対する生殖細胞型アイソフォームが多数見出された。また、細胞内局在を考え合わせると、核蛋白質、細胞骨格蛋白質、シグナル伝達系蛋白質、代謝系酵素に大別できる。さらにいくつかの遺伝子についてはノックアウトマウスを作製し、生体での機能解析を進めた。その中で小胞体内に存在する分子シャペロン的一种カルメジンは受精に必須の遺伝子であることを証明した。現在、カルメジンのヒトホモログの解析も進行中である。

分担研究者氏名、所属施設名、所属施設における職名

奥山明彦 大阪大学医学部 教授

岡部勝 大阪大学遺伝情報実験施設 教授

野崎正美 大阪大学微生物病研究所 助教授

A. 研究目的

ヒトゲノムプロジェクトの究極の目的は単に遺伝子の塩基配列を知ることではなく、その情報を人類の健康と福祉に役立てることにあ

る。本申請は、ゲノム解析の一方法として、雄性生殖細胞の分化すなわち精子形成過程に焦点を絞り込み、その局面で発現される遺伝子群の包括的解析を行うものである。さらにこれらの遺伝子群を解析することにより発現時期の特異性を明らかにするだけでなく、その機能を解析し、さらにはヒト疾病との関連性の解明を目指す。具体的なターゲットは男性不妊症である。この疾病を解析するためには、精子形成過程に関与する様々な遺伝子群

をそれぞれ単離し、それらの機能を解析し、個体で果たす役割を包括的に解明する必要がある。従って、これらの遺伝子群の働きを解析し、様々な臨床像を示す男性不妊症を引き起こすメカニズムへの理解を深め、ひいてはその治療法の開発に寄与することが本研究の長期的な目的となる。さらに、これらの遺伝子群の発現とその制御機構を解明し、精子形成をコントロールできれば、生殖の制御をより容易で安全な方法によって確実に実行できるようになるであろう。

B. 研究方法

初めにサブトラクション法と重差分化法を組み合わせた cDNA 単離法を用いて精子完成過程すなわち半数体精子細胞特異的遺伝子群の包括的クローニングを行い塩基配列を決定して、ホモロジー検索等により構造上の特徴を調べる。次にこれらの遺伝子がいつどのような分化段階の細胞で発現するのかを調べる。またコードされる蛋白質の局在を調べ、その生理機能を類推する。さらに解析の結果、精子形成あるいは受精に関与すると考えられる遺伝子を操作したマウスを作製し、個体レベルで実際の機能解析を進める。以上、マウスを実験動物として解析した結果、精子形成および受精に重要であることが確認された遺伝子については、そのヒトホモログをクローニングして、不妊患者における当該遺伝子の変異を調べて、様々なヒト男性不妊症の原因遺伝子である可能性を探る。

C. 研究結果

平成10年度においては、最初の目的である精子形成過程に伴って発現される遺伝子の cDNA クローニングとその解析を行った。成熟精子を持つマウス精巣の cDNA から未熟精巣のそれを差し引きすることで精子完成過程すなわち半数体精細胞特異的遺伝子の cDNA を網羅することができた。クローニングされた遺伝子群はすでに報告されている既知遺伝子、既知のものと相同性を持つ新規の遺伝子、さらに相同性を持たない新規遺伝子の3群に大別された。これらの中には体細胞型に対する生殖細胞型の遺伝子いわゆるアイソフォームが多数含まれていた。これらの遺伝子にコードされる蛋白質を構造と細胞内局在とで分類してみると、多くが核蛋白質、細胞骨格蛋白質、シグナル伝達系関連蛋白質、代謝酵素に分けられた。また、生殖細胞の小胞体に局在する蛋白質をコードするカルメジン遺伝子を破壊したノックアウトマウスを解析した結果、この遺伝子が受精能獲得に重要なものであることがわかった。

D. 考察

ゲノムプロジェクトの一環としてヒトおよびマウス精巣の cDNA ライブラリーの一次構造は EST としてデータベースに登録されている。従って、精巣で発現する遺伝子についてのかんりの情報は既に明らかにされているものと考えられた。ところが、我々が今回クローニングした半数体精細胞特異的遺伝子群の多くはこれまでに報告されていない新規の

ものであった。今回用いた方法は通常のサブトラクションだけでなく、重差分化法を組み合わせたものである。この方法によれば理論的には含量の多寡に係わらず、すべてのクローンを解析できるはずである。これまでの報告は発現する遺伝子を何のフィルターもかけずに端から次々に解析したために含量の圧倒的に多いもののみが優先的に取れたのではないかと推測され、その質から有用性について大いに問題があることが明らかとなった。いずれにしても今回の我々の方法を用いることにより半数体精子細胞特異的発現をする遺伝子の包括的解析が可能となった。クローニングした cDNA の一次構造の解析から生殖細胞で特異的に発現するアイソフォームが多数得られた。このことは精子形成過程という特殊な細胞分化、あるいは受精を行う細胞としての特異性を担うためだけに機能する遺伝子は体細胞で機能する遺伝子から進化の過程で分岐、形成され、それがこの時期に一斉に発現し始めることを意味するのではなかろうか。これらの遺伝子にコードされる蛋白質の構造およびその細胞内局在を調べると核蛋白質、細胞骨格蛋白質、シグナル伝達系蛋白質、代謝酵素その他に分類された。精子形成過程では細胞は著しい形態変化を伴い、核内で染色体は非常にコンパクトに凝縮され、さらに高度な運動能を獲得しなければならない。本研究で得られた遺伝子が上記の蛋白質をコードすることは、この精子形成過程での生理的変化を担う多くの遺伝子が含まれていることを強く示唆している。

E. 結論

サブトラクションライブラリー作製と重差分化法を組み合わせた結果、細胞内での発現量の如何にかかわらず、ほぼすべての遺伝子 cDNA をクローニングでき、精子形成過程の半数体精子細胞特異的遺伝子群の全体像を解析できる目処がたった。半数体特異的遺伝子の大半は新規の遺伝子であったが、コードする蛋白質が体細胞型に対する生殖細胞のアイソフォームであるものも多数含まれていた。それらの構造と細胞内局在を調べると、核蛋白質、細胞骨格、シグナル伝達系蛋白質、代謝酵素等に分類できた。これらの結果は今後の研究の展開にその方向性を指し示すものであると考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

Expression of selenoprotein-P messenger ribonucleic acid in the rat testis. Biol. Reprod. 58, 261-265 (1998) M. Koga, H. Tanaka, K. Yomogida, J. Tsuchida, K. Uchida, M. Kitamura, S. Sakoda, K. Matsumiya, A. Okuyama and Y. Nishimune

Characterization and expression of a stage specific antigen by monoclonal antibody TRA54 in testicular germ cells. J. Androl. 21, 34-40 (1998) L. A. V. D. Pereira, H. Tanaka, Y. Nagata, K. Sawada, H. Mori, L. M. C. Chimelli and Y. Nishimune

Molecular cloning and characterization of

meichroacidin (male meiotic metaphase chromosome-associated acidic protein). *Dev. Biol.* 197, 67-76 (1998) J. Tsuchida, Y. Nishina, N. Wakabayashi, M. Nozaki, Y. Sakai and Nishimune

Molecular cloning of a murine homologue of membrane cofactor protein (CD46): preferential expression in testicular germ cells. *Biochem. J.* 330, 163-168 (1998) A. Tsujimura, K. Shida, M. Kitamura, M. Nomura, J. Takeda, H. Tanaka, M. Matsumoto, K. Matsumiya, A. Okuyama, Y. Nishimune, M. Okabe and T. Seya

Acrosin accelerates the dispersal of sperm acrosomal proteins during acrosome reaction. *J. Biol. Chem.* 273, 10470-10474 (1998) K. Yamagata, M. Murayama, M. Okabe, K. Toshimori, Y. Nakanishi, S. Kashiwabara and T. Baba

The mouse RecA-like gene Dmc1 is required for homologous chromosome synapsis during meiosis. *Mol. Cell* 1, 707-718 (1998) K. Yoshida, G. Kondoh, Y. Matsuda, Y. Habu, Y. Nishimune and T. Morita

Identification and characterization of haploid germ cell-specific nuclear protein kinase (Haspin) in spermatid nuclei and its effects on somatic cells. *J. Biol. Chem.* In press (1999) H. Tanaka, Y. Yoshimura, M. Nozaki, K. Yomogida, J. Tsuchida, Y. Tosaka, T. Habu, T. Nakanishi, M. Okada, H. Nojima and Y. Nishimune

Cloning and characterization of genes specifically expressed in germ line cells. pp. 3-10

(1998) In *Germ Cell Development, Division, Disruption and Death* (Springer-Verlag) H. Tanaka and Y. Nishimune

Studies on the mechanism of sperm production. pp. 235-251 (1998) In *From Gene Expression to Genetic Manipulation* (Springer-Verlag) H. Tanaka, M. Okabe, M. Ikawa, J. Tsuchida, Y. Yoshimura, K. Yomogida and Y. Nishimune

精細胞の発生分化と遺伝子発現。ホルモンと臨床 46, 825-836 (1998) 田中宏光、野崎正美、西宗義武

哺乳類精巣と精子形成。蛋白質核酸酵素 43, 511-521 (1998) 蓬田健太郎、西宗義武

光るマウス！？発光オワンクラゲの遺伝子をマウスで発現 広範な応用に期待。化学と生物 36, 140-141 (1998) 伊川正人、岡部勝

2. 学会発表

10 th European Workshop on Molecular and Cellular Endocrinology of the Testis (1998) March 28-April 1, Capri, Italy, Suppression of GATA-1 expression in mouse Sertoli cell by differentiated germ cell. K. Yomogida, Y. Nishimune and M. Yamamoto

10 th European Workshop on Molecular and Cellular Endocrinology of the Testis (1998) March 28-April 1, Capri, Italy, Functional association between p53 and Dmc1, meiosis-specific homologous recombination enzyme. T. Habu, N. Wakabayashi, K. Yomogida, Y.

Nishimune and T. Morita

10 th European Workshop on Molecular and Cellular Endocrinology of the Testis (1998) March 28-April 1, Capri, Italy, Genome analysis of male germ cell specific actin-capping protein.

Y. Yoshimura, H. Tanaka, M. Nozaki, K. Yomogida, T. Yasunaga and Y. Nishimune

第 8 6 回日本泌尿器科学会総会 1 9 9 8 年 4

月 マウス半数体精子細胞特異的に発現する遺伝子 (MT-71) の単離およびその解析 古賀実、田中宏光、岸川英史、坪庭直樹、中山幹基、辻村晃、西村憲二、北村雅哉、野崎正美、松宮清美、野島博、西宗義武、奥山明彦

第二回 RNA 研究若手の会 1 9 9 8 年 7 月 1

0 日 半数体精子細胞における遺伝子発現の特徴 吉村康秀、野崎正美、蓬田健太郎、田中宏光、野島博、西宗義武

SIU (Societe Internationale Ourologie) 24 th Congress September 7-11, 1998 Expression of rat selenoprotein-P mRNA in testis. M. Koga, M.

Uchida, H, Tanaka, K. Yomogida, N. Kondoh, K. Matsumiya, Y. Nishimune and A. Okuyama

日本遺伝学会第 7 0 回大会 1 9 9 8 年 9 月

2 5 日 半数体精子細胞に発現する遺伝子に関する進化的考察 吉村康秀、安永照雄、野崎正美、野島博、西宗義武

第 2 1 回日本分子生物学会 1 9 9 8 年 1 2

月 精子細胞特異的 OAZ(OAZ-t) の cDNA のクローニングとその解析 戸坂康弘、田中宏光、正井久美子、野崎正美、蓬田健太郎、野澤昌弘、野島博、西宗義武

第 2 1 回日本分子生物学会 1 9 9 8 年 1 2

月 マウス半数体精子細胞に特異的に発現する遺伝子 (TISP66) の単離とその解析 井口尚子、正井久美子、田中宏光、野崎正美、古賀実、蓬田健太郎、野澤昌弘、野島博、西宗義武

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム遺伝子治療研究事業）

分担研究報告書

男性不妊症に關与する遺伝子群の包括的解析

分担研究者 奥山明彦 大阪大学医学部教授

研究要旨

ヒト男性不妊症の多様な原因を探り、その治療法を開発するために、実験動物のマウスで精子形成あるいは受精に係わる多くの遺伝子を包括的に単離、解析し、その結果をヒトゲノム解析に還元することが、本研究の究極の目的である。これまでにマウスにおいて精巢生殖細胞特異的遺伝子を多数クローニングし、ノックアウトマウスを作製してその生体での機能解析を行ってきた。中でもカルメジンは精母細胞から発現し、小胞体に局在する分子シャペロン蛋白質をコードする遺伝子であり、受精能の獲得に必須であることを示した。今年度はヒトのカルメジン遺伝子をクローニングして、その構造解析を行った。

A. 研究目的

ヒトゲノムプロジェクトの究極の目的は単に遺伝子の塩基配列を知るのではなく、その情報を人類の健康と福祉に役立てることにある。本申請は、ゲノム解析の一方法として、雄性生殖細胞の分化すなわち精子形成過程に焦点を絞り込み、その局面で発現される遺伝子群の包括的解析を行うものである。まず、実験動物であるマウスを用いて遺伝子を単離、解析して、精子形成あるいは受精に重要なものを同定する。次にその遺伝子のヒトホモログをクローニングして、ヒト男性不妊症との関連性の解明を目指す。マウス精子形成過程の精母細胞から発現するカルメジン遺伝子は小胞体に局在する分子シャペロンをコードする。ノックアウトマウスの解析からカル

メジンは受精能の獲得に必須であることが示された。そこで、ヒトカルメジン遺伝子を単離、解析することで、ヒト男性不妊症との関連を探ることを目的として研究を行った。

B. 研究方法

マウスカルメジン cDNA を用いてヒトカルメジンホモログの cDNA をクローニングする。その 3' 非翻訳領域の配列をもとにプライマーを作製し、PCR により BAC ライブラリーをスクリーニングして、ヒトカルメジン遺伝子をクローニングする。次にエクソン部分の配列をもとにプライマーを作製し、エクソンイントロンの関係を調べ、遺伝子の全体像を把握して、最終的に全体の塩基配列を決定する。さらにヒト不妊症患者における

当該遺伝子の変異を調べて、ヒト男性不妊症の原因遺伝子である可能性を探る。

C. 研究結果

今年度はマウスカルメジン cDNA を用いてヒト BAC ライブラリーからヒトカルメジン遺伝子を含む約 100kb のゲノム DNA がクローニングできた。この PCR 解析により多数のエクソンイントロンからなることが分かった。さらにこの DNA を用いてヒト染色体上のマッピングを行い、第 4 染色体の 4q28.3-q31.1 にマップされることを示した。

D. 考察

カルメジン遺伝子はマウス精巣生殖細胞の分化に伴い発現する。ノックアウトマウスを用いてその遺伝子の機能を解析した結果、カルメジン遺伝子が精子形成ではなく、受精に重要な機能を果たすことが明らかになった。そこでヒトにおいてもカルメジンが同様に受精に重要な役割を果たす可能性が十分考えられるが、ヒトにおけるカルメジン遺伝子の存在は不明であった。今回、マウスカルメジンをもとにそのヒトホモログがクローニングできた。一部の構造を解析した結果、これがヒトカルメジン遺伝子であることが明らかとなった。これにより、ヒト男性不妊症の中で精子形成が正常に進行するが受精できない原因不明の症例についてカルメジン遺伝子の異常である可能性を検討できることとなった。

E. 結論

マウスにおいて受精に必須の遺伝子であるカ

ルメジンのヒトホモログのクローニングに成功した。また、ヒトカルメジン遺伝子は多くのエクソンイントロンに分断されていることと、第 4 染色体の 4q28.3-q31.1 に存在することを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

Expression of selenoprotein-P messenger ribonucleic acid in the rat testis. Biol. Reprod. 58, 261-265 (1998) M. Koga, H. Tanaka, K. Yomogida, J. Tsuchida, K. Uchida, M. Kitamura, S. Sakoda, K. Matsumiya, A. Okuyama and Y. Nishimune

2. 学会発表

第 86 回日本泌尿器科学会総会 1998 年 4 月 マウス半数体精子細胞特異的に発現する遺伝子 (MT-71) の単離およびその解析 古賀実、田中宏光、岸川英史、坪庭直樹、中山幹基、辻村晃、西村憲二、北村雅哉、野崎正美、松宮清美、野島博、西宗義武、奥山明彦
SIU (Societe Internationale Ourologie) 24 th Congress September 7-11, 1998 Expression of rat selenoprotein-P mRNA in testis. M. Koga, M. Uchida, H. Tanaka, K. Yomogida, N. Kondoh, K. Matsumiya, Y. Nishimune and A. Okuyama

第 21 回日本分子生物学会 1998 年 12 月 精子細胞特異的 OAZ(OAZ-t) の cDNA のクローニングとその解析 戸坂康弘、田中宏光、正井久美子、野崎正美、蓬田健太郎、野澤昌弘、野島博、西宗義武

第 21 回日本分子生物学会 1998 年 12

月 マウス半数体精子細胞に特異的に発現する遺伝子 (TISP66) の単離とその解析 井口尚子、正井久美子、田中宏光、野崎正美、古賀実、蓬田健太郎、野澤昌弘、野島博、西宗義武

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
分担研究報告書

男性不妊症に関与する遺伝子群の包括的解析

分担研究者 岡部 勝 大阪大学遺伝情報実験施設教授

研究要旨

環境ホルモンによる不妊が疑われる例として、精巣の萎縮等による妊性不全が動物界において知られている。しかしながら、ヒトにおいても近年不妊の増加が報告され、しかも我が国を含め世界中で全体の 15%が原因不明の不妊として扱われている。これらの中には、精子単独で観察する限りは何ら欠陥が認められず、卵子との相互作用を見た時に不全を示すものも多い。不妊の増加はこのように精巣の萎縮等の症状を示さないまでも、何らかの環境因子の介在に起因する可能性がある。そこでまず基礎的な検討として我々は見かけ上正常に見える精子が何故受精できないのかについて研究することにした。

A. 研究目的

原因不明の男性不妊患者の精子と同様な表現型を示すカルメジンノックアウトマウスの不妊に到る原因を詳細に検討し、受精のメカニズムを明らかにする。

B. 研究方法

①カルメジン遺伝子をノックアウトしたマウスを実験動物化する。そのためには、遺伝的バックグラウンドを近交系にして実験データの解析を容易にする必要がある。我々はカルメジンノックアウトマウスを C57BL/6 系に 10 代以上にわたり戻し交配し、近交系ノックアウトマウスを作製することにした。

②また、受精のメカニズムを詳細に検討するために、カルメジンノックアウトマウスを用いて体外受精を繰り返し、受精できない理由を探った。さらに、ヒトの不妊患者にも用いられている透明帯切開法によるマイクロアシステッド体外受精を行い、不妊の治療効力についても検討した。

③最後に、受精のメカニズムを明らかにするために、哺乳類の精子にとって非常に大切な先体反応に着目し、このステップをこれまでの抗体等を用いる方法では不可能であったリアルタイムでの観察ができるよう、緑色の蛍光蛋白質 GFP を生体内に発現させたトランスジェニックマウスを作製することにした。

C. 研究結果

①カルメジンをノックアウトしたマウスは雄

性不妊であるために実験動物として系統化するには大きな労力が必要である。しかし、平成 10 年度には初代カルメジンノックアウトマウスの遺伝的バックグラウンドである 129 系から、C57BL/6 系マウスに 10 代にわたり継代交配を繰り返し、遺伝的バックグラウンドを C57BL/6 系におきかえることに成功し、実験動物としての系統化を成し遂げた。

②体外受精系におけるカルメジンノックアウトマウスの挙動は精子の卵子透明帯への結合不全であることが判明した。しかし、透明帯を一部切開することによって、不妊を治療できることを見出した。さらに *in vivo* における不妊発生機序を調査するうちに、カルメジンノックアウトマウスからの精子は輸卵管に上行できないことも見出した。

③GFP を先体内に発現させるために、種々の遺伝子の構築を行った。このうちで、*acrosin* のプロモーターに *acrosin* のシグナルペプチドと N 末端部分の配列を含むものが、トランスジーンとして優れていることを見出し、このコンストラクトにより、先体部分が緑色の蛍光をもつトランスジェニックマウスを作製することに成功した。

このマウスの精子を観察することにより、先体反応の様子をこれまでには全く不可能であった非侵襲的な方法で経時的に観察することができた。

D. 考察

①男性不妊を研究する上で優れた性質をもつ

モデルマウスを、広く実験に用いられるように遺伝的バックグラウンドを C57BL/6 にし、実験動物化することに成功した。このことにより、多くの研究者にこのマウスを提供することができると考えられる。

②男性不妊の治療として、最近卵子内直接精子注入法 (ICSI 法) が普及しているが、本来卵子に入ることのない精子成分が入ることや、医療従事者が精子を選び出して注入することなどから、問題を全く含まないわけではない。本研究の結果は一見、受精不可能に見える患者の精子であっても透明帯を切開することによって、十分な受精能を持つことがあることを示しており、臨床的にも意義深い発見であると考えられる。また、輸卵管内へ精子が上行しない症例も数多く報告されており、カルメジンノックアウトマウスの系が広く不妊研究のモデルマウスになりうることを示された。

③先体反応なくしてはいかなる精子も卵子と結合することはできない。しかし、研究が良く行われているマウスやヒトの精子では先体部分はごく小さく、先体反応がおこる様子を直接観察することはできなかった。今回、作製に成功したトランスジェニックマウスは精子に何ら前処置等を加える必要がなく、ただちにその先体部分の様子を蛍光顕微鏡やフローサイトメーターで観察することを可能にするものであり、受精のステップ中で最も重要な先体反応のしくみを研究する上で、きわめて有用な実験モデルマウスを作製することができた。

E. 結論

平成 10 年度においては、原因不明の不妊を検討するためのツールであるノックアウトマウスとトランスジェニックマウスの実験動物化に成功した。また、これらのマウスを用いて、臨床的にも重要な意味を持つと思われる不妊のメカニズムの一端が明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yamagata, K. et al., Acrosin accelerates the dispersal of sperm acrosomal proteins during acrosome reaction, *J. Biol. Chem.*, **273**, 1998, 10470-4

Okabe, M. et al., Male infertility and the genetics of spermatogenesis, *Am J Hum*

Genet., **62**, 1998, 1274-81

Tsujimura, A. et al., Molecular cloning of a murine homologue of membrane cofactor protein (CD46): preferential expression in testicular germ cells, *Biochem J.*, **330**, 1998, 163-168

Okabe, M. et al., Green fluorescent protein and its usage in reproductive biology., *Zygote*, **6**, 1998, 117

Nakanishi, T. et al., Real-Time observation of acrosomal dispersal from mouse sperm using GFP as a marker protein, *FEBS*, 1999, in press

2. 学会発表

伊川 正人: 精巣特異的シャペロン (calmegin) と精子受精能について. 日本哺乳動物卵子学会. 1998 年 5 月 8 日

M. Okabe: The impaired sperm fertilizing ability caused by disruption of testis specific molecular chaperone c. Testis workshop 精子形成・精巣毒性研究会. 1998 年 3 月 14 - 15 日

M. Okabe: The phenotype and rescue of calmegin knockout mouse. International conference on dynamics and regulation of stress response. 1998 年 3 月 9 - 11 日

中西友子, 伊川正人, 山田秀一, 馬場 忠, 西宗義武, 岡部 勝: Green fluorescent protein を用いた精子機能の解析. 日本実験動物学会. 1998 年 5 月 28 - 30 日

岡部 勝: “光るネズミ” と精子機能の解析. 臨床エンブリオロジストの会. 1998 年 2 月 21 日

伊川 正人, 山田秀一, 中西友子, 西宗義武, 岡部 勝: calmegin (精巣特異的シャペロン) ノックアウトマウス精子受精能の解析. 日本実験動物学会. 1998 年 5 月 28 - 30 日

D. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム遺伝子治療研究事業）

分担研究報告書

男性不妊症に關与する遺伝子群の包括的解析

分担研究者 野崎正美 大阪大学微生物病研究所助教授

研究要旨

ヒト男性不妊症の多様な原因を探り、その治療法を開発するために、実験動物マウスで精子形成あるいは受精に係わる多くの遺伝子を包括的に単離、解析し、その結果をヒトゲノム解析に還元することが、本研究の究極の目的である。手始めとして平成10年度にはサブトラクテッドライブラリーを作製し、重差分化法を用いて精子形成後期過程である半数体特異的遺伝子を85個単離した。多細胞動物では半数体細胞は配偶子である卵と精子以外には存在しない、特殊な状態である。このような特殊な細胞における遺伝子発現はどのような特徴を有するのか。その疑問に遺伝子構造の面から答えるのが本分担研究者の目的である。そのため半数体特異的に発現するこれらの遺伝子群の遺伝子構造を順次決定している。これまでにクローニングして構造を決定したのに関して見ると、イントロンが無い、あっても非常に少ないという特徴を有していた。

A. 研究目的

ヒトゲノムプロジェクトの究極の目的は単に遺伝子の塩基配列を知ることではなく、その情報を人類の健康と福祉に役立てることにある。本申請は、ゲノム解析の一方法として、雄性生殖細胞の分化すなわち精子形成過程に焦点を絞り込み、その局面で発現される遺伝子群の包括的解析を行うものである。さらにこれらの遺伝子群の発現制御機構を解析することによりそれらが発現する細胞の特異性を明らかにし、さらにはヒト疾病との関連性の解明を目指す。具体的には精子形成過程の後期である半数体精子細胞特異的遺伝子の構造

を明らかにし、制御領域を特定し、そこに作用する因子の解析を行う。このように精子形成過程特異的な遺伝子発現制御機構を明らかにすることで、様々な臨床像を示す男性不妊症を引き起こすメカニズムへの理解を深め、ひいてはその治療法の開発に寄与することが本研究の長期的な目的となる。さらに、制御機構を解明することで、精子形成がコントロールできるようになり、生殖の制御をより容易で安全な方法によって確実に実行できるようになる。

B. 研究方法

初めにサブトラクション法と重差分法を組み合わせた cDNA 単離法を用いて精子完成過程すなわち半数体精細胞特異的遺伝子群の包括的クローニングを行う。次いですべての全長のクローンを得て、これをプローブとしてゲノム遺伝子のクローニングを行い、その塩基配列を明らかにすることで、半数体特異的遺伝子群の構造の特徴をとらえる。また、遺伝子上流域に的を絞り、制御領域を特定し、その配列に結合する転写因子を同定する。これらの転写因子を解析することで、半数体の遺伝子転写に必須の因子およびそのメカニズムを明らかにする。以上、マウスを実験動物として用いて解析した結果、精子形成過程の遺伝子発現において重要であることが確認された遺伝子についてヒトホモログをクローニングして、不妊患者における当該遺伝子の変異を調べ、ヒト男性不妊症の原因遺伝子である可能性を探る。

C. 研究結果

平成10年度においては、まず半数体精細胞特異的発現をする遺伝子の cDNA を85種類得たので、それらを順次プローブとしてマウスゲノムクローンを単離し、構造解析を行った。コードされる蛋白質の構造をもとに優先順位をつけて解析を進めているが、それに応じてゲノム遺伝子の解析も進行している。既知遺伝子については一部既に遺伝子構造が報告されているものもあるが、解析した28遺伝子の中でイントロンを持たないものが15個存在した。また、イントロンを持つが5'非翻訳領域に一つだけというものが3個見ら

れた。すなわち調べた限り全体の64%がイントロンをほとんど持たない遺伝子であった。次ぎにこれらの中から二つの遺伝子についてプロモーター解析を行った。レポーターとして GFP および luciferase を用いて、その上流にこれらのプロモーターをつなぎ、*in vivo* electroporation により生殖細胞に導入して、プロモーターアッセイを行っている。

D. 考察

マウス精巣生殖細胞の分化に伴い発現される遺伝子のクローニングを試み、半数体特異的遺伝子を85個単離できた。ヒトやマウスの身体を構成する細胞はすべて2倍体のゲノムを持ち、半数体の細胞は受精直前の卵と精子形成後期の精細胞だけである。しかも卵は排卵された後に一過的に半数体になるが、この時期で遺伝子発現は起こらない。従って、身体の中で半数体の細胞は実質精子細胞だけと言える。このように特殊なゲノム状態である細胞の遺伝子発現は何らかの特殊性を持つことが予想される。本研究においてはこれら半数体遺伝子の網羅的解析の一環として遺伝子構造を解析したところ、過半数がイントロンを持たないかあるいは非翻訳領域に一個だけ持っているものであることが明らかとなった。これまでに報告されているマウス遺伝子は基本的にイントロンを有することから無作為にクローニングした遺伝子の過半数がイントロンを持たないというのは半数体特異的遺伝子の特徴であると考えられる。さらに cDNA の一次構造の解析からこれらのイントロンを持たない遺伝子には体細胞に対する生殖細胞

特有のアイソフォームが含まれていた。このことは本来体細胞で機能する遺伝子から進化の過程で半数体特異的遺伝子が分岐、形成され、同時にイントロンを失ったことを意味する。多くのイントロンを持たない遺伝子が半数体細胞で発現することの意味について今後検討したい。

E. 結論

精子形成過程後期の半数体精細胞特異的発現をする cDNA を包括的にクローニングできたためにこの時期に特異的発現をする遺伝子群の全体像を解析できる目処がたった。全体のうちのいくつかについて遺伝子構造を解析したところ、過半数はイントロンをまったく持たないか、あるいはそれが非常に少ないことがわかった。今後、解析サンプル数を増やし、半数体特異的遺伝子群の構造の全体像を明らかにするとともに、発現制御領域を特定し、転写機構の解析を進めたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

Molecular cloning and characterization of meichroacidin (male meiotic metaphase chromosome-associated acidic protein). *Dev. Biol.* 197, 67-76 (1998) J. Tsuchida, Y. Nishina, N. Wakabayashi, M. Nozaki, Y. Sakai and Nishimune

Effects of epidermal growth factor on the invasion activity of the bladder cancer cell line. *J. Urol.* 159, 586-590 (1998) N. Kanno, N.

Nonomura, T. Miki, Y. Kojima, S. Takahara, M. Nozaki and A. Okuyama

Developmental abnormalities of glycosylphosphatidylinositol-anchor-deficient embryos revealed by Cre/loxP system. *Lab. Invest.* 79, 293-299 (1999) M. Nozaki, K. Ohish, N. Yamada, T. Koinoshita, A. Nagy and J. Takeda

Identification and characterization of haploid germ cell-specific nuclear protein kinase (Haspin) in spermatid nuclei and its effects on somatic cells. *J. Biol. Chem.* In press (1999) H. Tanaka, Y. Yoshimura, M. Nozaki, K. Yomogida, J. Tsuchida, Y. Tosaka, T. Habu, T. Nakanishi, M. Okada, H. Nojima and Y. Nishimune

精細胞の発生分化と遺伝子発現。ホルモンと臨床 46, 825-836 (1998) 田中宏光、野崎正美、西宗義武

2. 学会発表

10 th European Workshop on Molecular and Cellular Endocrinology of the Testis (1998) March 28-April 1, Capri, Italy, Genome analysis of male germ cell specific actin-capping protein. Y. Yoshimura, H. Tanaka, M. Nozaki, K. Yomogida, T. Yasunaga and Y. Nishimune

第86回日本泌尿器科学会総会 1998年4月 マウス半数体精子細胞特異的に発現する遺伝子(MT-71)の単離およびその解析 古賀実、田中宏光、岸川英史、坪庭直樹、中山幹基、辻村晃、西村憲二、北村雅哉、野崎正美、松宮清美、野島博、西宗義武、奥山明彦 第二回 RNA 研究若手の会 1998年7月1

0日 半数体精子細胞における遺伝子発現の
特徴 吉村康秀、野崎正美、蓬田健太郎、田
中宏光、野島博、西宗義武

日本遺伝学会第70回大会 1998年9月
25日 半数体精子細胞に発現する遺伝子に
関する進化的考察 吉村康秀、安永照雄、野
崎正美、野島博、西宗義武

第21回日本分子生物学会 1998年12
月 精子細胞特異的 OAZ(OAZ-t) の cDNA
のクローニングとその解析 戸坂康弘、田中
宏光、正井久美子、野崎正美、蓬田健太郎、
野澤昌弘、野島博、西宗義武

第21回日本分子生物学会 1998年12
月 マウス半数体精子細胞に特異的に発現す
る遺伝子 (TISP66) の単離とその解析 井口
尚子、正井久美子、田中宏光、野崎正美、古
賀実、蓬田健太郎、野澤昌弘、野島博、西宗
義武

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし