

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11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12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） 3

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 9

分担研究報告書 近藤玄
大阪大学医学部助教授 13

分担研究報告書 岡部勝
大阪大学遺伝情報実験施設教授 16

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 19

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が、本研究の究極の目的である。平成11年度は平成10年度にサブトラクテッドライブラリーと、重差分化法を用いて得られた精子形成後期過程である半数体特異的遺伝子85個についてさらに解析を進めた。順次、遺伝子構造とコードされる蛋白質の解析を行った。遺伝子構造はサイズがどれも小さく、イントロンを持たないものが非常に多いという特徴を示した。また、それぞれの蛋白質は精子形成および運動能に重要な役割を果たす可能性が示唆された。これらの遺伝子の機能をマウス個体で解析するために効率的なノックアウトマウス作成法の開発を行っている。さらにヒトホモログをクローニングして、男性不妊症の遺伝子診断が可能となりつつある。

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
近藤玄	大阪大学医学部	助教授
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

(1) 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
明らかにするばかりでなく、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、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、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、ひいてはその診断および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。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。更に、これらの成果は、現在問題となっている環境中の内分泌攪乱物質の生殖能におよぼす影響のメカニズム解明に大きな手がかりを与える。

(2) 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 単離法を用いて得られた精子完成過程すなわち半数体精細胞特異的遺伝子群の構造を詳細に明らかにする。次にコードされる蛋白質の局在を調べ、その生理機能を予測する。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进行操作したマウスを作成し、個体レベルで実際の機能解析を進める。また、得られた遺伝子群の構造上の特徴を明らかにし、発現の特異性を支配する情報を得る。以上、マウスを実験動物として解析した結果、その機能的重要性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としての可能性を検証する。

(3) 研究結果

平成 11 年度においては、85 種類の半数体精子細胞特異的発現をする遺伝子群にコードされる蛋白質の生化学的解析を順次行った。ほとんどが新規であったが、既知の遺伝子と相同性を示すものが多く、体細胞型に対する精巢型アイソフォームである可能性がある。それらは、精子の核に局在して、クロマチン構造変化を進めるもの、あるいは細胞周期を止めるもの、ミトコンドリアに存在して、エネルギー供給に働くもの、細胞の形態および運動に関与するものなどが含まれていた。次に cDNA をプローブとしてマウスゲノムクローンを単離し、構造解析を行ったところ、クローニングした 15 個の遺伝子の中で 9 個はイントロンを持たなかった。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 80% がイントロンをほとんど持たない遺伝子であった。これらの結果は半数体精子細胞という特殊な細胞の特徴を反映する可能性がある。これらのクローニングした遺伝子を用いノックアウトマウス作成を行うに当たって、効率を高めるための系の開発を始めている。さらにマウス cDNA をもとにして、ヒト半数体特異的遺伝子のクローニングも行い、男性不妊症患者の遺伝子診断の準備を整えた。

(4) 考察

平成 11 年度は、平成 10 年度に得た 85 個の半数体特異的遺伝子を順次解析した。半数

体精子細胞は精子形成過程の一番最後であり、核の凝縮、先体形成、細胞質の喪失、ミトコンドリアの変形、尾部形成という形態変化を経て完成精子となる。さらに完成した精子は高度の運動能と受精能を獲得する。これらの細胞分化過程は精子特有のものであり、それぞれは特異的遺伝子の関与が必須と考えられる。本研究により逐次得られる、特異的遺伝子機能解析結果の蓄積により、近い将来、精子形成過程のほぼ全容が分子レベルで解明されるものと期待できる。また、半数体精子細胞特異的遺伝子はその構造にも特徴があることが徐々に明らかとなってきた。すなわち、イントロンを持たない遺伝子が極めて多いことと、イントロンを持っていても遺伝子サイズが非常に小さいことが、目に付く。このような特徴が精子生殖細胞の生理的特徴とどのように関係するのか興味を持たれるところであり、更に検討を加えたい。また、クローニングを行った遺伝子については逐次、ノックアウトマウスを作製し、その機能を個体レベルで解析するわけであるが、多数の遺伝子について短時間で解析を行うための、新たな解析系の確立について成果が得られつつある。これらマウスで明らかにした特異的遺伝子のヒト相同遺伝子をクローニングして、ヒト男性不妊症の遺伝子解析を始めた。具体的には男性不妊患者のゲノムの SNPs あるいはその他の変異を同定し、精子形成不全を伴う男性不妊症との関連についての解析を進める。

(5) 結論

サブトラクテッドライブラリー作成と重差分

化法の併用により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、これによりこの時期に特異的発現をする遺伝子群の全体像の解析が可能となった。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含まれていた。それらのコードする蛋白質の局在と生化学的解析により、精子形成と精子機能に重要な遺伝子が多く含まれることがわかってきた。さらにこれらのヒトホモログをクローニングして、男性不妊症との関連を解析できる目処がたった。

(6) 研究発表

(1) 論文発表

(1) Identification and characterization of haploid germ cell-specific nuclear protein kinase (Haspin) in spermatid nuclei and its effects on somatic cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 17049-17057 (1999) H. Tanaka, Y. Yoshimura, M. Nozaki, K. Yomogida, J. Tsuchida, Y. Tosaka, T. Habu, T. Nakanishi, M. Okada, H. Nojima and Y. Nishimune

(2) Real-time observation of acrosomal dispersal from mouse sperm using GFP as a marker protein. *FEBS Lett.* **449**, 277-283 (1999) T. Nakanishi, M. Ikawa, S. Yamada, M. Parvinen, T. Baba, Y. Nishimune and M. Okabe

(3) Arrest of spermatogonial differentiation in jsd/jsd, Sl17H/Sl17H, and cryptorchid mice. *Biol. Reprod.* **61**, 277-283 (1999) D. G. de Rooij, M.

Okabe and Y. Nishimune

(4) Identification of differentiation antigens in mouse testicular germ cells recognized by monoclonal antibody TRA55. *Int. J. Androl.* **23**, 29-35 (1999) X. Ling, H. Tanaka, J. Tsuchida and Y. Nishimune

(5) Progressive impairment of kidney and reproductive organs in mice lacking Rho GDIa. *Oncogene* **18**, 5373-5380 (1999) A. Ogawa, J. Miyoshi, H. Ishizaki, M. Tanaka, A. Takakura, H. Nishioka, H. Yoshida, T. Doi, A. Mizoguchi, N. Matsuura, Y. Niho, Y. Nishimune, S.-I. Nishikawa and T. Takai

(6) Stimulation of spermatogonial differentiation in juvenile spermatogonial depletion (jsd) mutant mice by gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology* **140**, 4912-4915 (1999) K. Matsumiya, M. L. Meistrich, G. Shetty, K. Dohmae, A. Tohda, A. Okuyama and Y. Nishimune

(7) Hepatoma-derived growth factor-related protein (HRP)-1 gene in spermatogenesis in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **262**, 433-437 (1999) T. Kuroda, H. Tanaka, H. Nakajima, Y. Nishimune and T. Kishimoto

(8) Molecular cloning of haploid germ cell-specific tektin cDNA and analysis of the protein in mouse testis. *FEBS Lett.* **456**, 315-321 (1999) N. Iguchi, H. Tanaka, T. Fujii, K. Tamura, Y. Kaneko, H. Nojima and Y. Nishimune

(9) Sperizin is a murine RING zinc-finger protein specifically expressed in haploid germ

cells. *Genomics* **57**, 94-101 (1999) T. Fujii, K. Tamura, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, K. Yomogida, H. Tanaka, Y. Nishimune, H. Nojima and Y. Abiko

(10) Genomic analysis of male germ cell-specific actin capping protein α . *Gene* **237**, 193-199 (1999) Y. Yoshimura, H. Tanaka, M. Nozaki, K. Yomogida, K. Shimamura, T. Yasunaga and Y. Nishimune

(11) Real-time observation of transplanted 'green germ cells': proliferation and differentiation of stem cells. *Develop. Growth Differ.* **42**, 105-112 (2000) H. Ohta, K. Yomogida, S. Yamada, M. Okabe and Y. Nishimune

(12) Structure, expression, and chromosome mapping of LATS2, a mammalian homologue of the Drosophila tumor suppressor gene lats/warts. *Genomics* **63**, 263-270 (2000) N. Yabuta, T. Fujii, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, H. Nishiguchi, Y. Endo, S. Toji, H. Tanaka, Y. Nishimune and H. Nojima

(13) Prostate-specific transcription factor hPSE is translated only in normal prostate epithelial cells. *Cancer Res.* **60**, 1348-1352 (2000) M. Nozaw, K. Yomogid, N. Kanno, N. Nonomura, T. Miki, A. Okuyama, Y. Nishimune and M. Nozaki

(14) Molecular cloning and characterization of phosphatidylcholine transfer protein-like protein gene expression in haploid germ cells. *Biol. Reprod.* **62**, in press (2000) M. Yamanaka, M. Koga, H. Tanaka, Y. Nakamura, H. Ohta, K. Yomogida, J. Tsuchida, N. Iguchi, H. Nojima, M.

Nozaki, K. Matsumiya, A. Okuyama, K. Toshimori and Y. Nishimune

(15) Regulation of proliferation and differentiation in spermatogonial stem cells: the role of c-kit and its ligand SCF. *Development* in press (2000) H. Ohtani K. Yomogida, K. Dohmae and Y. Nishimune

(2) 学会発表

(1) 第87回日本泌尿器科学会総会 1999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 古賀実、中村吉宏、山中幹基、内田欽也、松宮清美、奥山明彦、田中宏光、蓬田健太郎、野崎正美、野島博、西宗義武

(2) 第87回日本泌尿器科学会総会 1999年4月 マウス精細胞特異的発現遺伝子(gsg-8)の単離と解析 内田欽也、土田順司、中村吉宏、山中幹基、古賀実、松宮清美、西宗義武、奥山明彦

(3) 第87回日本泌尿器科学会総会 1999年4月 マウス半数体精子細胞に発現する遺伝子(MT-81)の単離およびその解析 山中幹基、古賀実、中村吉宏、内田欽也、松宮清美、奥山明彦、田中宏光、蓬田健太郎、野崎正美、野島博、西宗義武

(4) 第18回日本アンドロロジー学会1999年7月 精原細胞移植法による生殖細胞の増殖・分化機構の解析 大田浩、蓬田健太郎、山田秀一、岡部勝、西宗義武

(5) 第16回日本疾患モデル学会1999年11月 精子鞭毛に存在する構造蛋白質遺伝

子 Tektin の単離と解析 井口尚子、田中宏光、中村吉宏、蓬田健太郎、金子善興、野崎正美、野島博、西宗義武

(6) 第16回日本疾患モデル学会1999年11月 精子細胞核に局在する新規カイネーシス Haspin のヒトホモログの単離と解析 田中宏光、井口尚子、中村吉宏、野崎正美、蓬田健太郎、西宗義武

(7) 第16回日本疾患モデル学会1999年11月 精細胞移植法による jsd/jsd 変異マウスの解析および生殖幹細胞の特質の解析 大田浩、蓬田健太郎、堂前嘉代子、岡部勝、西宗義武

(8) 第22回日本分子生物学会1999年12月 マウス半数体精子細胞特異的な Tektin の単離と解析 井口尚子、田中宏光、藤井孝之、田村和俊、中村吉宏、野崎正美、野島博、西宗義武

(9) 第22回日本分子生物学会1999年12月 マウス精細胞特異的核抗原(GENA)の解析 土田順司、田中宏光、蓬田健太郎、野崎正美、松居靖久、西宗義武

(10) 第22回日本分子生物学会1999年12月 半数体精子細胞に特異的発現のみられる遺伝子の進化上の特徴 吉村康秀、安永照雄、野崎正美、野島博、西宗義武

(11) 第22回日本分子生物学会1999年12月 マウス半数体精子細胞で特異的に発現している遺伝子(TISP-38)の解析 陳怡莉、田中宏光、野崎正美、西宗義武

(7) 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 奥山明彦 大阪大学大学院医学系研究科教授

研究要旨

原因が多様であるヒト男性不妊症の特異的治療法の開発のためには、精子形成機構の解明が必須である。本研究の究極の目的は、精子形成に関わる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である。これまでも実験動物であるマウスでの精子形成に関わる遺伝子の単離、解析を行ってきたが、本年度に施行された結果を報告する。この中で、Halap-X (Haploid Specific Alanine-rich Acidic Protein Located on Chromosome-X)は精細胞特異的に発現し、その遺伝子座がX染色体上にあることを示した。このことは、母系を介して遺伝する男性不妊症の存在の可能性を示しており、注目に値する。MT-71 と PCTP-L (PCTP (phosphatidylcholine transfer protein) like protein)は精子運動能に密接な関連を有する可能性を示し、ヒト精子無力症あるいは精子寿命の低下に関与する可能性を見出した。

A. 研究目的

本研究の目的とする疾患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さまざま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。これら遺伝子群の作用を解析することによって、多様な臨床像を示す男性不妊症を引き起こすメカニズムの解明が進み、その特異的治療法の開発につなげることが可能になっ

てくる。したがって、単離された遺伝子の詳細な機能解析により、その遺伝子が障害された場合の対応する臨床症例を浮かび上がらせることができるように検討を行った。

B. 研究方法

①マウス精巣より分画した精細胞をウサギに免疫し、マウス精細胞特異的ポリクロナル抗体を作成した。この抗体によって認識される蛋白質をコードする遺伝子をマウス精細胞c

DNA 発現ライブラリから単離した。この中では halap-X (haploid specific alanine-rich acidic protein located on chromosome-X) について分析した。得られた遺伝子の全長塩基配列の決定、推定アミノ酸配列の分析を行った。単離した cDNA をプローブとして、染色体マッピングや様々な組織や各日齢ごとの精巣についてノザンプロット法を行った。さらに特異的に反応する抗体 (抗 Halap-X 抗体) を作成した。この抗体を用いて各日齢の精巣および各組織についてのウエスタンプロット法ならびに免疫組織学的解析を行った。

②成熟マウス精巣 cDNA からマウス精巣 cDNA を差し引いたライブラリを作成し、これに含まれる遺伝子の単離を行った。また、ノザンプロット解析などの分子生物学的を用い、この転写産物の発現や局在を調べた。次に、遺伝子のコードする産物 (蛋白質) の性質、組織及び細胞内での特異的発現を明らかにするため、抗体を作成し、ウエスタンプロット解析や免疫染色などの手法にて生化学的解析を行った。マウスで単離された一部の遺伝子 (Haspin Tektin) については、ヒト精巣 cDNA ライブラリから単離し、その解析を同じくノザンプロットなどを用いて行った。

C. 研究結果

①halap-X は大きさ約 1.1 kb の新規の遺伝子で、X 染色体上に存在し、推定アミノ酸配列では Ala に富むリピート構造を有していた。mRNA レベルでは haploid germ cell 特異的に発現がみられた。蛋白分析でも大きさ約 55 kDa で、精巣特異的に発現していた。二次元電気泳動では pI. 4.3 と強酸性蛋白である事がわかった。免疫組織学的には round spermatid の核内に発現しやがて elongated spermatid へと形態変化するに伴い細胞質内に移行することが判明した。

② MT-71 (全長 1763bp、推定 520 アミノ酸をコードする遺伝子) を単離した。ヒトやブタの心臓から単離されたスクシニル CoA トランスフェラーゼと高い相同性を有していた。ノザンプロットの解析から精巣特異的な発現を示し、生後の各発達段階の精巣を用いたノザンプロットの解析、および in situ hybridization 法より、この遺伝子の転写産物は雄マウス半数体精子細胞特異的に発現していた。次に作成したポリクロナル抗体を用いたウエスタンプロットでは、約 50kDa の分子量をもち、精巣および半数体精子細胞特異的に発現し、精子にもその蛋白質の存在が明らかになった。免疫染色からも同様の結果が確認された。PCTP-L は全

長 1392bp で、推定 281 アミノ酸を含む蛋白質をコードする遺伝子である。ノザンプロット法では精巣に強発現し、精巣においては減数分裂以降の 17 日齢より、精細胞のみに発現を認めた。in situ hybridization では精細管の円形精子細胞より発現がみられた。ウエスタンプロット法では肝、精巣、精子に発現がみられ、免疫組織学的染色では精子の尾部に強発現を認めた。 β -501 は現在ノザンプロット法にて精巣特異的、半数体以降特異的に発現することが確認でき、また蛋白レベルでの発現を確認中である。これらの遺伝子の中でヒト精巣 cDNA ライブラリから Haspin、Tektin の単離に成功した。

D. 考察

Halap-X 蛋白は強酸性蛋白で、最初に円形精子細胞の核内に発現し、やがて核の形態変化に伴い細胞質に移行することなどから、核移行シグナルの存在が示唆され、他の核蛋白と結合しその蛋白を細胞質へと移行させる橋渡しの役割が考えられる。核の形態変化における重要な役割を果たしているものと思われる。スクシニル CoA トランスフェラーゼに相同性を持つ MT-71 は、ケトン体からのエネルギー産生に重要な代謝系酵素であることがこれまでに報告されている。この酵素が半数体精子細胞

特異的に作られ、かつ、精子上に存在することが確認されたことから、この遺伝子が精子の運動能に何らかの重要な役割を演じていることが示唆された。phosphatidylcholine (PC) は生体膜を構成する主要なリン脂質であり、PCTP は PC の mitochondrial outer membrane への import に関わる蛋白である。マウスなどの哺乳類の sperm は精漿中の glucose を外因性基質として利用しているが、精漿を除いた培養では内因性基質の PC を利用していることも示されている。PCTP がこの代謝に関わっていると考えられることと、PCTP と homology を持つ PCTP-L が sperm の tail 部分に発現していることより、PCTP-L が sperm の運動エネルギー代謝において何らかの役割を果たしていることが予想された

E. 結論

いくつかのマウス精巣特異的遺伝子の単離と機能解析を行った。現在機能解析の終わった遺伝子のヒト相同遺伝子の単離を進めている。X 染色体上に存在する Halap-X は遺伝性疾患とされる男性不妊症の X 染色体を介しての遺伝形式の解明につながる可能性を示した。MT-71 と PCTP は精子運動性に関与する分子である可能性を明らかにした。インフォームドコンセントを踏まえた臨床検体

の解析結果が期待される。

学会発表

1. 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

古賀実、中村吉宏、山中幹基、内田欽也、松宮清美、奥山明彦、田中宏光、蓬田健太郎、野崎正美、野島博、西宗義武

第87回日本泌尿器科学会総会、1999年4月13-15日、大阪市

2. マウス精細胞特異的発現遺伝子 (gsg-8) の単離と解析

内田欽也、土田順司、中村吉宏、山中幹基、古賀実、松宮清美、西宗義武、奥山明彦第87回日本泌尿器科学会総会、1999年4月13-15日、大阪市

3. マウス半数体精子細胞に発現する遺伝子 (MT-81) の単離およびその解析

山中幹基、古賀実、中村吉宏、内田欽也、松宮清美、奥山明彦、田中宏光、蓬田健太郎、野崎正美、野島博、西宗義武

第87回日本泌尿器科学会総会、1999年4月13-15日、大阪市

論文発表

1. Molecular Cloning and Characterization of PCTP

(phosphatidylcholinetransfer protein) like protein (PCTP-L) gene expressed in haploid germ cells.

Masaki Yamanaka, Minoru Koga, Hiromitsu Tanaka, Yoshihiro Nakamura Hiroshi Ohta, Kentaro Yomogida, Junji Tsuchida, Naoko Iguchi, Hiroshi Nojima, Masami Nozaki, Kiyomi Matsumiya, Akihiko Okuyama, Kiyotaka Toshimori and Yoshitake Nishimune

Biol Reprod in press.

2. Cloning and Characterization of a Gene Encoding Haploid Specific Alanine-rich Acidic Protein Located on Chromosome-X (Halap-X)

Kinya Uchida, Junji Tsuchida, Hiromitsu Tanaka, Minoru Koga, Yukio Nishina, Masami Nozaki, Kazuya Yoshinaga, Kiyotaka Toshimori, Kiyomi Matsumiya, Akihiko Okuyama, and Yoshitake Nishimune

Biol Reprod 投稿中

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 近藤玄 大阪大学医学部助教授

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しているが、遺伝子の個体レベルの解析にはノックアウトマウスの系が有効である。ところが、本研究においては半数体特異的に発現する85個もの遺伝子の機能解析をめざしているために、個々の遺伝子ノックアウトマウスの解析はその作製段階で大変な労力、時間、コストを要する。そこで、本研究においては、ノックアウトマウス解析系の効率化を目指した。本年度はまず、効率化の障害となる性不一致マウスの除外を目的とし、X-GFP マウスを利用することにより、凝集キメラ作製段階での性を一致させることに成功した。従って、この系は多数の遺伝子ノックアウトマウス解析の効率化の一助となり、今後の網羅的遺伝子解析を支えるものと期待される。

A. 研究目的

ある遺伝子の機能を生体レベルで明らかにするために、哺乳動物においては胚性幹細胞（ES 細胞）を利用したノックアウトマウスの作製と解析が常用されている。しかしながら、その作製プロセスは煩雑なばかりでなく、多くの時間・労力・費用また広大な動物飼育スペースを要する。にもかかわらず、最近のノックアウトマウスが1987年に報告されて以来すでに10年以上たつが、十分な効率化がなされているとは言えない。ノックアウトマウスの作製・解析は、今日のポストゲノムプロジェクト時代にあって、しばらくは、哺乳動物における遺伝子機能解析手段の主軸

であり続けるであろう。通常ノックアウトマウスを作製する場合、ES 細胞でジーンターゲットングを施工し、目的のヘテロ変異導入クローンを得た後、これを用いてキメラマウスを作製する。さらに、このマウスと野生型マウスを交配し、ヘテロ変異マウスを得る。最終的には、このヘテロ変異マウス同士を交配した産仔からホモ変異マウスすなわちノックアウトマウスを選び出すことになる。変異ES 細胞クローンを得るところまでは、細胞レベルですむが、それ以後は、全てマウス個体を用いての作業となる。この段階にいたると、キメラマウス誕生からノックアウトマウス誕生までの最低7ヶ月を要することになる。

1系統のノックアウトマウスを作製するのでさえ、これだけの労力と時間がかかる。時間短縮のため体外受精技術を用いたとしても数ヶ月は要するため、複数個の遺伝子をスクリーニングしたい場合には、明らかに非効率的である。そこで、本研究では、遺伝子機能の類推をキメラマウス一代の段階で行えないかと考え、特に、精巣特異的に発現している遺伝子群をターゲットとして、個体レベルでのマススクリーニング法の開発を目標とした。

B. 研究方法

キメラマウスでの機能解析には、宿主胚として、調べたい細胞系列ですでに表現型がわかっている変異マウスのそれを用いることが肝要である。すなわち、変異宿主の表現型を変異 ES 細胞クローンが相補できるかどうかを指標としてその遺伝子の機能を類推するわけである。このコンセプトを用いた手法としてすでに RAG-1, RAG-2 欠損マウスが知られており、免疫系での遺伝子機能解析で汎用されている。本研究では、生殖細胞系列での解析を目的として、c-kit 遺伝子変異マウス (W 変異群) を宿主胚として用いることとした。同遺伝子の変異では、造血細胞系・表皮色素細胞系・生殖細胞系に以上が見られる。特に、生殖細胞系では、胎生期の始原生殖細胞の段階から異常が見られ、生殖細胞特異的遺伝子群全般を解析するのに有用であると考えられた。ところで、キメラマウス作製に用いる ES 細胞の性は、通常雄である。一方、宿主胚は両性であり、性の不一致 (ES 細胞雄 vs 宿主胚雌の場合) がキメラマウス作製の効率を下

げる可能性が考えられた。そこで、まず X 染色体上に GFP 遺伝子が挿入されたトランスジェニックマウス (X-GFP マウス) を用いて、ES 細胞雄-宿主胚雌キメラマウスの出現効率・ES 細胞の寄与率・生殖能力について検討した。

C. 研究結果

X-GFP 雄マウスと野生雌マウスを交配し、宿主胚を得た。この場合、緑色蛍光を発する胚はすべて雌性である。このような胚と正常 ES 細胞を凝集し、ES 細胞雄-宿主胚雌キメラ胚を作製し偽妊娠マウスに移植した。その結果、ES 細胞雄-宿主胚雌キメラ胚移植群から、9 匹の子マウスを得たが、肉眼的に明らかなキメラマウスは得られなかった。また、これらのマウスの性はすべて雌であり、ES 細胞の寄与による性転換は認められなかった。一方、コントロール群 (ES 細胞雄-宿主胚雄キメラ胚) では、4 匹の子マウスを得、そのうち 2 匹は、ES 細胞の寄与率の高いキメラであった。このことから、キメラ胚の性の不一致は、キメラマウス作製の効率を低下させると考えられた。

D. 考察

今後、c-kit 遺伝子変異マウス (W 変異群) を宿主として用いる場合にも、キメラ胚の性の不一致は問題となろう。これには、c-kit 遺伝子変異マウスに X-GFP を導入し、雄胚を選択することで防止できると考えられる。すなわち、X-GFP:W 雄マウスと W 雌マウスを交配し、緑色蛍光陰性の胚を選択する。こ

のような胚の 1/4 は c-kit 変異雄胚であり、精巢特異的遺伝群のキメラ個体レベルでの解析に供せられると考えている。

E. 結論

ノックアウトマウス作製の効率化のために、ES 細胞と宿主胚との性を一致させることが、肝要であることを示した。さらに性を一致させるために X-GFP トランスジェニック雄マウスと野生型雌マウスを交配して得られた胚は緑色蛍光胚が雌であることに着目し、雄胚を選択的にキメラマウス作製の宿主とすることで、性を一致させることができ、キメラマウス作製段階の効率化に成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Myelin-associated oligodendrocytic basic protein is essential for normal arrangement of the radial component in the central nervous system myelin. *Eur. J. Neurosci.* **11**, 847-855 (1999) Y. Yamamoto, H. Yoshikawa, S. Nagano, G. Kondoh, S. Sadahiro, T. Gotow, T. Yanagihara and S. Sakoda

Easy assessment of ES cell clone potency for chimeric development and germ-line competency by an optimized aggregation method. *J. Biochem. Biophys. Methods* **39** (3), 137-142 (1999) G. Kondoh, Y. Yamamoto, K. Yoshida, Y. Suzuki, S. Osuka, Y. Nakano, T. Morita and J. Takeda

Accumulation of murine amyloid b42 with a gene-dosage dependent manner in PS1 "knock-

in" mice. *Eur. J. Neurosci.* **11** (7), 2577-2581 (1999) Y. Nakano, G. Kondoh, T. Kudo, K. Imaizumi, M. Kato, J.-I. Miyazaki, M. Tohyama, J. Takeda and M. Takeda

Tissue-inherent fate of GPI revealed by GPI-anchored GFP transgenesis. *FEBS Lett.* **458** (3) 299-303 (1999) G. Kondoh, X.-H. Gao, Y. Nakano, Y. Koike, S. Yamada, M. Okabe and J. Takeda

Conditional gene targeting and its application in the skin. *J. Dermatol. Sci.* in press J. Takeda, S. Sano, M. Tarutani, J. Umeda and G. Kondoh

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

ノックアウトマウスの作製と遺伝子の機能解析

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、トランスジェ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思われる。

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、受精不可能にみ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のごく小さく、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 11 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

Koresawa, Y., Miyagawa, S., Ikawa, M., Matsunami, K., Yamada, M., Shirakura, R., and Okabe, M. Synthesis of a New Cre Recombinase Gene Based on Optimal Codon Usage for Mammalian Systems. *J Biochem* (Tokyo). 127(3):367-372, 2000.

Nakanishi, T., Ikawa, M., Yamada, S., Parvinen, M., Baba, T., Nishimune, Y. and Okabe, M. Real-time observation of acrosomal dispersal from mouse sperm using GFP as a marker protein. *FEBS Lett.* 449(2-3):277-83, 1999

Ikawa, M., Yamada, S., Nakanishi, T. and Okabe, M. Green fluorescent protein (GFP) as a vital marker in mammals. *Curr Top Dev Biol.* 44:1-20, 1999.

2. 学会発表

伊川正人、林多門、中西友子、山下敦子、三輪岳志、岡部 勝: Cre リコンビナーゼを介した組み換えにより EGFP を発現するようになるレポーターマウスの開発。日本疾患モデル学会 1999 年 11 月 26 - 27 日

伊川正人、林多門、中西友子、山下敦子、三輪岳志、岡部 勝: Cre/loxP システムを利用した新規ジーントラップ法の開発。日本分子生物学会. 1999 年 12 月 7-10 日

中西友子、伊川 正人、山田秀一、
岡部 勝： Green fluorescent
protein を用いた精子機能の解析．日
本分子生物学会．1999 年 12 月 7-10
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

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。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精子細胞で特異的に発現する85個の遺伝子をクローニングし、平成11年度はさらに解析を進めた。半数体細胞は哺乳動物で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だけで発現する遺伝子はどのような特徴を有するのか。その疑問に遺伝子構造と発現制御機構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きた。これまでに15個の遺伝子をクローニングして構造を決定したところ、9個はイントロンが無く、それ以外はイントロンを持っていても遺伝子自体が非常に小さ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する。

B. 研究方法

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った。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 11 年度においては、85 種類の半数体精細胞特異的発現をする遺伝子の完全長 cDNA を得、それらをプローブとして順次マウスゲノムクローンを単離し、構造解析を進めた。これまでに 15 遺伝子をクローニングし、配列を決定し、cDNA と比較するとイントロンを持たないものが 9 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 80% がイントロンをほとんど

持たない遺伝子であった。それ以外の遺伝子はイントロンを持つが、サイズが極めてコンパクトであった。次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。また、解析した遺伝子は内部に CpG を多数持っており、メチル化と発現との相関について、解析をしている。

D. 考察

哺乳動物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り、それ以外は小さい遺伝子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