

厚生科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

男性不妊症に關与する遺伝子群の包括的解析

平成12年度 総括・分担研究報告書

平成13(2001)年4月

主任研究者 西宗義武

厚生科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

男性不妊症に関する遺伝子群の包括的解析

平成12年度 総括・分担研究報告書

平成13(2001)年4月

主任研究者 西宗義武

目次

I. 総括研究報告	
男性不妊症に關与する遺伝子群の包括的解析 西宗義武	1
II. 分担研究報告	
ヒト男性不妊症に關与する遺伝子の解析 奥山明彦	9
精子形成過程におけるグリセロリン脂質代謝に關する研究 近藤玄	13
精子形成および受精に關与する遺伝子の解析 岡部勝	15
男性不妊症に關与する遺伝子群の包括的解析 野崎正美	19
III. 研究成果の刊行に關する一覽表	22
IV. 研究成果の刊行物・別刷	26

厚生省科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

総括研究報告書

男性不妊症に關与する遺伝子群の包括的解析

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

地球規模で見ると発展途上国においては、医療事情の好転等による爆発的な人口増加が副次的な作用として貧困問題や環境の破壊・感染症の発生等を引き起こし、新世紀の人類福祉に大きな影を投げかけている。一方、近年、環境ホルモンなどの影響により、自然界に生息する様々な動物の性の異常や生殖能力の低下が報告され、かなりの動物種が絶滅の危機に瀕している。しかし、このような現象は他の動物ばかりではなく、人類にも広がっている可能性があることに注意しなければならない。わが国や欧米諸国では、全夫婦のうち一割以上が不妊に悩まされており、ヒト精液中の精子数が減少しつつあるという報告もみられ、人類の生殖能力にも変化が起こりつつある可能性が懸念される。この様に見矛盾する人口問題は、静かに、しかし確実に全人類の生活に影響を与える極めて重要な問題である。我々人類をはじめとする地球上の動物種に起こっている生殖の危機および様々な生殖にまつわる問題を打開するために、早急に解決の糸口を見出さねばならない。そのためにはまず、生殖細胞の基礎的研究を押し進め、その成り立ち・法則性を十分に理解しておく必要がある。

本研究においてはモデル動物であるマウスを用いて分子生物学的な解析を行い、その成果をヒトに還元させる事を目標とした。具体的には精巣生殖細胞特異的に発現する遺伝子群を網羅的にクローニングし、それらの遺伝子機能、構造、発現機構、外来因子による影響、さらには男性不妊の原因遺伝子の探索について3年間にわたって、包括的研究を行った。本研究により得られた成果は、これらの遺伝子の精子形成過程における役割を明らかにするとともに、今後ヒトゲノムプロジェクトを通じた具体的な成果として生殖にまつわる様々な問題とりわけ世界の人口問題や、我が国における不妊症の解決に寄与できるものであり、さらにこれらの研究を発展させることが期待される。

分担研究者	奥山明彦	大阪大学医学部	教授
分担研究者	近藤玄	大阪大学医学部	助教授
分担研究者	岡部勝	大阪大学遺伝情報実験施設	教授
分担研究者	野崎正美	大阪大学微生物病研究所	助教授

情の好転等による爆発的な人口増加が副次的な作用として貧困問題や環境の破壊・感染症の発生等を引き起こし、新世紀の人類福祉に大きな影を投げかけている。

一方、近年、環境ホルモンなどの影響により、自然界に生息する様々な動物の性の異常や生殖能力の低下が報告されている。このような現象は動物ばかりか、人類にも広がっている可能性に注意しなければならない。わが国や欧米諸国では、全夫婦の一割

A. 研究目的

地球規模で見ると発展途上国においては、医療事

以上が不妊に悩まされており、ヒト精液中の精子数が減少しつつあるという報告もみられ、人類の生殖能力にも変化が起こりつつある可能性が懸念される。

この様に一見矛盾する人口問題は、静かに、しかし確実に全人類の生活に影響を与える極めて重要な問題である。人類をはじめとする地球上の動物種に起こっている生殖の危機および様々な生殖にまつわる問題を打開するために、早急に解決の糸口を見出さねばならない。そのためにはまず、生殖細胞の基礎的研究を押し進め、その成り立ち・法則性を十分に理解する必要がある。そこで本研究では、モデル動物であるマウスを用いて特異的遺伝子の包括的単離と分子生物学的解析を行い、その成果をヒトに還元させる事を目標とした。具体的には精巣生殖細胞特異的に発現する遺伝子群を網羅的にクローニングし、それらの遺伝子機能、構造、発現機構、外来因子による影響等を調べ、さらにヒト相同遺伝子を単離解析し、それらが男性不妊症の原因遺伝子である可能性について追究した。

B. 研究方法

まず新たに開発したサブトラクション法と重差法を併用した 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を網羅的にクローニングして、その構造上の特徴を明らかにし、次にコードする蛋白質の局在を調べ、その生理機能を考察した。それらの結果、精子形成あるいは受精に関与すると考えられる遺伝子についてはそれを操作したマウスを作成し、個体レベルでの機能解析を進めた。マウスにおける解析の結果、機能的な重要性が確認された遺伝子について、ヒト相同遺伝子をクローニングし、ヒトにおける特異性の解析とともに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としての可能性を検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験は当研究所動物実験施設運営委員会の承認を受けた。またヒト血液からの DNA 採取については臨床現場での十分なインフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

初め 167 種類の候補 cDNA が得られ、発現を調べた結果、85 種類の半数体精子細胞特異的遺伝子がクローニングできた。これまで、精子完成過程である半数体精子細胞では少数の遺伝子以外は転写されないと考えられていたが、今回の結果はその常識を覆すものであり、生殖生物学的に極めて重要な知見である。この中で 30 余りの遺伝子をマッピングした結果、半数体精子細胞特異的遺伝子は偏在することなく、全染色体に分布することを明らかにした。精子形成は、核凝縮、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する。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。これらはいずれも精子特有のものであり、特異的遺伝子の関与が必須と考えられる。今回得られた遺伝子群にコードされる蛋白質は、48% が全くの新規で、13% が既知のもの、39% が既知の遺伝子と相同性を示す新規のものであった。蛋白質構造の特徴や生化学的解析結果からこれらは精子核に局在しクロマチン構造変化を進めるもの、細胞周期を止めるもの、ミトコンドリアに存在し、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、いずれも精子形成あるいは精子機能に重要な働きを持つことが推測された。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。次にそれぞれのゲノム DNA を単離し、構造解析を行ったところ、解析した 19 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、イントロンを一つだけ持つものが 3 個見られた。すなわち調べた限り全体の 63% がイントロンをほとんど持たない遺伝子であった。こ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。さらに遺伝子上流を中心に特異的発現制御領域を解析している。また 8 個のヒト半数体特異的遺伝子をクローニングし、構造解析を行ったところマウスと同様にイントロンレス遺伝子が多いことがわかった。

これらの遺伝子について男性不妊症患者のゲノム

の SNPs 等の変異を同定し、精子形成不全を伴う男性不妊症との関連性についての解析を進め、すでに百数十例の不妊症患者 DNA についての解析で Haspin 遺伝子のコーディング領域に一つのアミノ酸置換を起こす SNP を発見した。

D. 考察

マウス精巢生殖細胞特異的遺伝子群の網羅的クローニングに関しては、ほぼ満足いく結果が得られ、多くの新規な特異的遺伝子を単離しそれらの解析を進めることができた。ノックアウトマウスを用いた個体レベルでの機能解析については二つの遺伝子について機能を明らかにし現在さらに三つの遺伝子について進行中であるが、時間的制約もあり必ずしも十分な成果が得られたとは言えない。精巢生殖細胞分化あるいは精子機能に重要なヒト遺伝子のクローニングに関しては、順調に進めることができた。ヒト男性不妊症患者サンプルを用いた SNPs は、さらに症例を増やし、より多数の特異的遺伝子について調べる必要がある。

哺乳動物精子形成関連遺伝子の研究は世界的にも散発的であり、本研究における包括的解析は学術的・国際的に貢献度は極めて大きい。また不妊症を男性の側から調べるための基盤整備として重要な役割を果たすとともに、環境因子による不妊への影響を調べる時に精子形成関連遺伝子群を解析できるようになったことは社会的にも有意義である。

より多くの遺伝子の解析をノックアウトマウスを用いた個体レベルでの解析まで含めてさらに進める。マウスで機能が明らかとなった新規遺伝子のヒト相同遺伝子の単離解析を進める。男性不妊症患者におけるそれら特異的遺伝子の SNPs その他の変異の検索をさらに進め、ヒト男性不妊症における当該遺伝子群の関与の状況を明らかにする。

E. 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子細胞特異的発現をする大半は新規の 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。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た。さらにこれらのヒト相同遺伝子をクローニングして、男性不妊症患者遺伝子の変異との関連性の解析を始めた。

F. 健康危機管理情報

ヒト精子での先体反応阻害実験から、カルシウム非依存性フォスホオリバーゼ阻害剤は、精子形成に影響をおよぼすと考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Original Paper

1. Ling, X., Tanaka, H., Tsuchida, J. and Nishimune, Y. (2000) Identification of differentiation antigens in mouse testicular germ cells recognized by monoclonal antibody TRA55. *Int. J. Androl.* **23**, 29-35.
2. Ohta, H., Yomogida, K., Yamada, S., Okabe, M. and Nishimune, Y. (2000) Real-time observation of transplanted 'green germ cells': proliferation and differentiation of stem cells. *Develop. Growth Differ.* **42**, 105-112.
3. Yabuta, N., Fujii, T., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Nishiguchi, H., Endo, Y., Toji, S., Tanaka, H., Nishimune, Y. and Nojima, H. (2000) Structure, expression, and chromosome mapping of LATS2, a mammalian homologue of the *Drosophila* tumor suppressor gene *lats/warts*. *Genomics* **63**, 263-270.
4. Nozawa, M., Yomogida, K., Kanno, N., Nonomura, N., Miki, T., Okuyama, A., Nishimune, Y. and Nozaki, M. (2000) Prostate-specific transcription factor hPSE is translated only in normal prostate epithelial cells. *Cancer Res.* **60**, 1348-1352.

5. Uchida, K., Tsuchida, J., Tanaka, H., Koga, M., Nishina, Y., **Nozaki, M.**, Yoshinaga, K., Toshimori, K., Matsumiya, K., **Okuyama, A.** and **Nishimune, Y.** (2000) Cloning and characterization of a complementary deoxyribonucleic acid encoding haploid-specific alanine-rich acidic protein located on chromosome-X. *Biol. Reprod.* **63**, 993-999.
6. Ohta, H., Yomogida, K., Dohmae, K. and **Nishimune, Y.** (2000) Regulation of proliferation and differentiation in spermatogonial stem cells: the role of c-kit and its ligand SCF. *Development* **127**, 2125-2131.
7. Tosaka, Y., Tanaka, H., Yano, Y., Masai, K., **Nozaki, M.**, Yomogida, K., Otani, S., Nojima, H. and **Nishimune, Y.** (2000) Identification and characterization of testis specific ornithine decarboxylase antizyme (OAZ-t) gene: expression in haploid germ cells and polyamine-induced frameshifting. *Gene Cell* **5**, 265-276.
8. Yamanaka, M., Koga, M., Tanaka, H., Nakamura, Y., Ohta, H., Yomogida, K., Tsuchida, J., Iguchi, N., Nojima, H., **Nozaki, M.**, Matsumiya, K., **Okuyama, A.**, Toshimori, K. and **Nishimune, Y.** (2000) Molecular cloning and characterization of phosphatidylcholine transfer protein-like protein gene expressed in murine haploid germ cells. *Biol. Reprod.* **62**, 1694-1701.
9. Wakabayashi, N., Kageyama, R., Habu, T., Doi, T., Morita, T., **Nozaki, M.**, Yamamoto, M. and **Nishimune, Y.** (2000) A novel cis-acting element regulates HES-1 gene expression in P19 embryonal carcinoma cells treated with retinoic acid. *J. Biochem.* **128**, 1087-1095.
10. Koga, M., Tanaka, H., Yomogida, K., **Nozaki, M.**, Tsuchida, J., Ohta, H., Nakamura, Y., Masai, K., Yoshimura, Y., Yamanaka, M., Iguchi, N., Nojima, H., Matsumiya, K., **Okuyama, A.** and **Nishimune, Y.** (2000) Isolation and characterization of a haploid germ cell-specific novel complementary deoxyribonucleic acid; testis-specific homologue of succinyl CoA: 3-oxo acid CoA transferase. *Biol. Reprod.* **63**, 1601-1609.
11. Ando, H., Haruna, Y., Miyazaki, J., **Okabe, M.** and Nakanishi, Y. (2000). Spermatocyte-specific gene excision by targeted expression of Cre recombinase. *Biochem Biophys Res Commun* **272**, 125-128.
12. Ando, H., Haruna, Y., Suzuki, M., Yamada, S., **Okabe, M.** and Nakanishi, Y. (2000). Ectopic activation of the transcription promoter for the testis-specific mouse Pkg-2 gene on elimination of a cis-acting upstream DNA region. *Dev Growth Differ* **42**, 385-393.
13. Koresawa, Y., Miyagawa, S., Ikawa, M., Matsunami, K., Yamada, M., Shirakura, R. and **Okabe, M.** (2000). Synthesis of a New Cre Recombinase Gene Based on Optimal Codon Usage for Mammalian Systems. *J Biochem (Tokyo)* **127**, 367-372.
14. Miyado K, Yamada G, Yamada S, Hasuwa H, Nakamura Y, Ryu F, Suzuki K, Kosai K, Inoue K, Ogura A, **Okabe, M.**, et al. (2000). Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science* **287**, 321-324.
15. Yamada, N., Tamai, Y., Miyamoto, H. and **Nozaki, M.** (2000) Cloning and expression of the mouse Pse gene encoding a novel Ets family member. *Gene* **241**, 267-274.
16. Tamai, Y., Ishikawa, T.-O., Bosl, M. R., Mori, M., **Nozaki, M.**, Baribault, H., Oshima, R. G. and Taketo, M. (2000) Cytokeratins 8 and 19 in mouse placental development. *J Cell Biol.* **151**, 563-572.
17. Kawamoto, S., Niwa, H., Tashiro, F., Sano, S., **Kondoh, G.**, Takeda, J., Tabayashi, K. and Miyazaki, J.-I. (2000) A novel reporter mouse strain that expresses enhanced green fluorescent protein upon Cre-mediated

recombination. *FEBS Lett.* **470**, 263-268 .

18. Takeda, J., Sano, S., Tarutani, M., Umeda, J. and **Kondoh, G.** (2000) Conditional gene targeting and its application in the skin. *J. Dermatol. Sci.* **23**, 147-154 .

19. Ventela S, Okabe M, Tanaka H, **Nishimune Y**, Toppari J, Parvinen M (2000) Expression of green fluorescent protein under beta-actin promoter in living spermatogenic cells of the mouse stage-specific regulation by FSH. *Int. J. Androl.* **23**, 236-242.

20. Ventela S, Mulari M, Okabe M, Tanaka H, **Nishimune Y**, Toppari J, and Parvinen (2000) Parvinen M. Regulation of acrosome formation in mice expressing green fluorescent protein as a marker. *Tissue & Cell.*

21. Ohta, H., Yomogida, K., Tadokoro, Y., Tohda, A., Dohmae, K., **Nishimune, Y.** (2001) Defect in germ cells, not in supporting cells, is the cause of male infertility in the jsd mutant mouse: proliferation of spermatogonial stem cells without differentiation. *Int J. Androl.* **24**, 15-23.

22. Taga, M., Shiraishi, K., Shimura, T., Uematsu, N., Kato, T., **Nishimune, Y.**, Aizawa, S., Oshima, M., Niwa, O. (2000) The effect of caffeine on p53-dependent radioresponses in undifferentiated mouse embryonal carcinoma cells after X-ray and UV-irradiations. *J. Radat. Res* **41**, 227-241.

23. Yoshimura, Y., **Nishimune, Y.** (2001) Nested genomic structure of haploid germ cell specific haspin gene. *Gene* **267**, 49-54.

24. Tanaka, H., Iguchi, N., Nakamura, Y., Kohroki, J., Carlos, D.C., **Nihimune, Y.** (2001) Cloning and characterization of human haspin gene encoding haploid germ cell-specific nuclear protein kinase. *Mol. Hum.*

Reprod. **7**, 211-218.

25. Koresawa, Y., Miyagawa, S., Ikawa, M., Matsunami, K., Yamada, M., **Okabe, M.** (2000) A new Cre recombinase gene based on optimal codon usage in powerful material for organ-specific gene targeting. *Transplant. Proc.* **32**, 2516-2517.

26. Kitamura, M., Matsumiya, K., Koga, M., Nishimura, K., Miura, H., Tsuji, Y., Matsumoto, M., Okamoto, Y., **Okuyama, A.** (2000) Ejaculated spermatozoa in patients with non-mosaic klinefelter's syndrome. *Int. J. Urol.* **7**, 88-92.

Reviews

1. 野崎正美、田中宏光、西宗義武 (2000) 精子形成に対する分子生物学的アプローチ *Pharma Medica* **18**, 13-18.

2. 学会発表

1. 11th European Workshop on Molecular and Cellular Endocrinology of the Testis (France Saint-Malo) (2000) Transplantation of Mouse Spermatogonia: Proliferation and Differentiation of Stem Cells in Seminiferous Tubules. Hiroshi Ohta, Kentaro Yomogida, Shuichi Yamada, **Masaru Okabe**, and **Yoshitake Nishimune**.

2. 11th European Workshop on Molecular and Cellular Endocrinology of the Testis (France Saint-Malo)(2000) Cloning of a Haploid germ Cell-Specific Alanine-rich Acidic Protein Gene Located on Chromosome-X (Halap-X) from Testicular cDNA Library. Junji Tsuchida, Kinya Uchida, Hiromitsu Tanaka, Minoru Koga, Yukio Nishina, **Masami Nozaki**, Kazuya Yoshinaga, Kiyotaka Toshimori, Kiyomi Matsumiya , **Akihiko Okuyama**, and **Yoshitake Nishimune**

3. 11th European Workshop on Molecular and Cellular

Endocrinology of the Testis (France Saint-Malo)(2000)
A Novel Ornithine Decarboxylase Antizyme (OAZ-t)
Expressed in Haploid Germ Cells Is Regulated by
Polyamine-Induced Frameshifting. Hiromitsu Tanaka,
Yasuhiro Tosaka, Yoshihisa Yano, **Masami Nozaki**,
Kentaro Yomogida, Shuzo Otani, Hiroshi Nojima, and
Yoshitake Nishimune.

4. 11th European Workshop on Molecular and Cellular
Endocrinology of the Testis (France Saint-Malo)(2000)
Cloning and Expression of PCIP-L (Phosphatidylcholine
Transfer Protein Like Protein) in Mouse Haploid Germ
Cells. Hiromitsu Tanaka, Masaki Yamanaka, Yoshihiro
Nakamura, Hiroshi Ohta, Naoko Iguchi, Hiroshi Nojima,
Masami Nozaki, and **Yoshitake Nishimune**.

5. 11th European Workshop on Molecular and Cellular
Endocrinology of the Testis (France Saint-Malo)(2000)
Characterization of Haploid Germ Cell Specific TEKIN
in Mouse Testis. Naoko Iguchi, Hiromitsu Tanaka,
Hiroshi Nojima, and **Yoshitake Nishimune**.

6. 第33回日本発生生物学会シンポジウム 2000年5月
精細胞移植法による生殖幹細胞の特質
の解析 蓬田健太郎、大田浩、山田秀一、**岡部勝**、
西宗義武

7. 第33回日本発生生物学会 2000年5月
セルトリ細胞における精子形成周期特異的 GATA-1
の発現調節機構の解析 田所優子、河飯由貴、蓬田
健太郎、山本雅之、**西宗義武**

8. 国際シンポジウム Molecular Biology of
Mammalian Spermatogenesis 2000年2月 大阪
大学微生物病研究所 精子/卵子相互作用にかかわ
る因子と精子の受精能 **岡部勝**

9. 第33回日本発生生物学会2000年5月 ヒ
ストン H2AX のプロモーターを利用した eGFP によ
る精細胞分化段階特異的標識化 檜曜、田所優子、

蓬田健太郎、山田秀一、**岡部勝**、**西宗義武**

10. The third Asian and Oceanic Congress of Andrology,
May, 2000, Restoration of spermatogenesis by
gonadotropin releasing hormone antagonist in juvenile
spermatogonial depletion mice. Tohda, A., Matsumiya,
K., Kishikawa, H., Meistrich, M.L., Dohmae, K.,
Okuyama, A. and **Nishimune, Y.**

11. The third Asian and Oceanic Congress of Andrology,
May, 2000, Testicular germ cell transplantation into
seminiferous tubules. Ohta, H., Yomogida, K., Dohmae,
K., Yamada, S., **Okabe, M.** and **Nishimune, Y.**

12. The third Asian and Oceanic Congress of Andrology,
May, 2000, Cloning and characterization of testis
specific ornithine decarboxylase antizyme (OAZ-t):
haploid germ cell-specific expression and programmed
+1 frameshifting induced with polyamine. Tanaka, H.,
Tosaka, Y., **Nozaki, M.**, Yomogida, K., Nojima, H. and
Nishimune, Y.

13. The third Asian and Oceanic Congress of Andrology,
May, 2000, Mechanism of sperm/egg interaction
elucidated by gene-manipulated mice. **Okabe, M.**, Ikawa,
M., Nakanishi, T., Yamada, S., Mekada, E. and
Nishimune, Y.

14. The third Asian and Oceanic Congress of Andrology,
May, 2000, A novel Ets family member, PSE, is
preferentially expressed in the human prostate epithelium.
Nozaki, M., Kanno, N., Amekawa, S., Yomogida, K.,
Nozawa, M., **Okuyama, A.** and **Nishimune, Y.**

15. 第18回日本受精着床学会 2000年7月 岡
崎市民会館 受精機構の分子生物学と遺伝子操作動
物 **岡部勝**

16. 第2回日本進化学会 2000年10月 雄性
生殖細胞特異的遺伝子群の構造と進化 **野崎正美**、

田中宏光、大西正剛、久野瑞枝、池晶子、**西宗義武**

17. 第2回日本進化学会 2000年10月 雄性生殖細胞特異的アクチン様遺伝子の構造と進化 久野瑞枝、田中宏光、**西宗義武**、**野崎正美**

18. 第93回日本繁殖生物学会 シンポジウム 2000年10月 神戸大学 精子形成-イントロダクション- **岡部勝**

19. 第93回日本繁殖生物学会 シンポジウム 2000年10月 神戸大学 哺乳類精子形成の分子生物学 **野崎正美**

20. 生理研国際シンポジウム「初期発生胚における細胞信号伝達機構」2000年11月 岡崎国立共同研究機構 Sperm/egg fusion and surface proteins in mouse. **Okabe, M.**

21. 第45回日本不妊学会 2000年11月 マウス半数体精子細胞特異的に発現する遺伝子(scot-t)の単離およびその解析 古賀実、木内寛、難波行臣、竹山政美、中村吉宏、山中幹基、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**

22. 第45回日本不妊学会 2000年11月 精子鞭毛に存在する構造蛋白質遺伝子 Tektin の単離および解析と human への応用 中村吉宏、宮川康、松宮清美、**奥山明彦**、田中宏光、井口尚子、**野崎正美**、**西宗義武**

23. (社)日本動物学会近畿支部公開講演会 2000年11月 大阪市立自然史博物館 遺伝子操作動物を用いた受精メカニズムの研究 **岡部勝**

24. 第17回日本疾患モデル学会 2000年11月 c-kit/SCF 系変異マウスを用いた精細胞移植法による生殖幹細胞の増殖・分化機構の解析 大田浩、

蓬田健太郎、堂前嘉代子、**西宗義武**

25. 第17回日本疾患モデル学会 2000年11月 精細胞分化障害変異マウスを用いた生殖幹細胞の増殖・分化機構の解析 田所優子、蓬田健太郎、東田章、**西宗義武**

26. 生理学研究所研究会 生殖細胞の構造と機能発現 2000年11月 特異的発現をする遺伝子から見た精巣生殖細胞の特徴 **野崎正美**

27. 第46回日本不妊学会総会 2000年12月 マウス半数体精子細胞に発現する遺伝子 (TEKTIN) の単離及びその解析 中村吉宏 田中宏光 蓬田健太郎 **野崎正美** 松宮清美 野島博 **西宗義武** **奥山明彦**

28. 第46回日本不妊学会総会 2000年12月 マウス半数体精子細胞に発現する遺伝子(scot-t)の単離及びその解析 古賀実 木内寛 難波行臣 竹山政美 中村吉宏 山中幹基 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**

29. 第23回日本分子生物学会ワークショップ 2000年12月 マウス精巣特異的に転写誘導される TISP 遺伝子群の包括的クローニングと機能解析 藤井孝之、田中宏光、蓬田健太郎、**西宗義武**、野島博

30. 第23回日本分子生物学会ワークショップ 2000年12月 精子細胞核に局在する新規カイネース Haspin の解析 田中宏光、興梠順也、井口尚子、中村吉宏、カルロスカルバルホ、**西宗義武**

31. 第23回日本分子生物学会ワークショップ 2000年12月 哺乳類生殖幹細胞の自己保存・増殖と分化の制御機構 蓬田健太郎、大田浩、田所優子、檜囿、今井智章、**西宗義武**

32. 第23回日本分子生物学会2000年12月
精巢半数体精子細胞特異的に発現する Hanp1 遺伝子のゲノム構造解析 大西正剛、田中宏光、西宗義武、野崎正美

33. 第23回日本分子生物学会2000年12月
精巢・卵巣特異的に発現する新規コラーゲン様タンパク質 COL-TO の解析 佐藤啓二、蓬田健太郎、和田崇之、頼藤徹也、西宗義武、細川暢子、永田和宏

34. 第23回日本分子生物学会2000年12月
半数体精子細胞特異的に発現する DNA 結合タンパク質、Hils1 の単離及び解析 井口尚子、田中宏光、蓬田健太郎、野島博、西宗義武

35. 第23回日本分子生物学会2000年12月
PDA 法と DNA マイクロアレイによる精原細胞特異的遺伝子単離の試み 田中貴代子、岩槻健、中山由紀、田村浩、加藤真樹、田中宏光、関直彦、西宗義武、原孝彦

36. 第23回日本分子生物学会2000年12月
ES 細胞および PGC で高発現を示す新規遺伝子のクローニングと解析 佐藤正岳、木村透、阿部幸一郎、野崎正美、黒川顕、安永照雄、蓬田健太郎、宮川(倉持)さとみ、加藤友紀子、梁明秀、山本三毅夫、仲野徹

37. 第15回日本生殖免疫学会総会・学術集会2000年12月
ノックアウトマウスを用いた受精機構の解明 岡部勝

38. 北海道大学招待講演、2001年3月
GFP 遺伝子導入マウスの作製とその応用研究 ―初期発生や生殖細胞の分化、岡部 勝

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定)

特許出願準備中(2件)

1. マウス精子形成遺伝子とその用途
2. ヒト精子形成遺伝子の変異を検出する方

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

ヒト男性不妊症に関与する遺伝子の解析

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。Scot-t (testis-specific succinyl CoA:3-oxo acid CoA transferase)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

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。ウエスタンブロット法では肝、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 は現在ノザンブ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。Scot-t と PCTP-L 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。

F. 健康危険情報

ヒト精子での先体反応阻害実験から、カルシウム非依存性フォスホリパーゼ阻害剤は、精子形成に影響をおよぼすと考えられる。

G. 研究発表

1. 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 **62** : 1694-1701, 2000.

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* **63** : 993-999, 2000.

3. Isolation and Characterization of a Haploid Germ Cell-Specific Novel Complimentary Deoxyribonucleic Acid; Testis-Specific Homologue of Succinyl CoA: 3-Oxo Acid CoA Transferase. Minoru Koga, Hiromitsu Tanaka, Kentaro Yomogida, Masami Nozaki, Junji Tsuchida, Hiroshi Ohta, Hiroshi Nojima, Kiyomi Matsumiya, **Akihiko Okuyama** and Yoshitake Nishimune. *Biol Reprod* **63** : 1601-1609, 2000.

4. Ejaculated spermatozoa in patients with non-mosaic klinefelter's syndrome. Kitamura, M., Matsumiya, K., Koga, M., Nishimura, K., Miura, H., Tsuji, T., Matsumoto, M.,

Okamoto, Y., **Okuyama, A.** *Int. J. Urol.* **7**: 88-92, 2000

2. 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析 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
4. マウス精細胞特異的発現遺伝子 halap-X の単離と解析 内田欽也、土田順司、松宮清美、西宗義武、**奥山明彦** 第 80 回日本泌尿器学会総会、2000 年 6 月 8-10 日、札幌市
5. マウス半数体精子細胞に発現する遺伝子 (PCTP2) の単離およびその解析 山中幹基、古賀実、田中宏光、中村吉宏、北村雅哉、野崎正美、松宮清美、野島博、西宗義武、**奥山明彦** 第 80 回日本泌尿器学会総会、2000

年6月8-10日、札幌市

日、札幌市

6. 精子鞭毛に存在する構造蛋白質遺伝子

Tektin の単離および解析 中村吉宏、松宮

清美、奥山明彦、田中宏光、井口尚子、蓬

田健太郎、野崎正美、野島博、西宗義武 第

80回日本泌尿器学会総会、2000年6月8-10

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

精子形成過程におけるグリセロリン脂質代謝に関する研究

分担研究者 近藤玄 大阪大学医学部助教授

研究要旨

精子形成過程におけるグリセロリン脂質代謝に関して、1) PLB/ LIP の機能解析、2) GPI アンカー型蛋白質遊離因子の同定、を行った。

A. 研究目的

精子形成過程や先体反応においては、細胞膜が大きく流動化する。ここでは、脂質二重膜の主要な構成脂質であるグリセロリン脂質のリモデリングも活発化すると考えられる。本研究では、1) 精子細胞で発現しているグリセロリン脂質代謝酵素 PLB/ LIP の機能解析、2) 生殖細胞における GPI アンカー型蛋白質遊離因子の同定を通じて、細胞膜可塑性メカニズムの精子形成や受精現象への関与の解明を目的とした。

B. 研究方法

1) マウス精巣での PLB/ LIP の発現を RT-PCR 法にて検出した。

2) ヒト精子をカルシウムイオノフォア処理にて先体反応を誘導し、PLA2 阻害剤 MAFP や抗 PLB 抗体の影響を検討した。

3) マウス精巣より、GPI アンカー型蛋白質の遊離を指標に、GPI アンカー型蛋白質遊離因子を、液体クロマトグラフィーにて、精製を試みた。

(倫理面への配慮)

ヒト検体については、全て提供者の同意を得、実験後は、速やかに処分した。また、全ての動物実験は、大阪大学医学部動物実験委員会の許可及びガイドラインに沿って行った。

C. 研究結果

1) マウス精巣では、減数分裂の開始と一致して mRNA の発現が上昇し、round spermatid 以後でタンパク質の増量が認められた。

2) ヒト精子は、カルシウムイオノフォアで先体反応が誘導されるが、カルシウム非依存性 PLA2 の阻害剤である MAFP や抗 PLB 抗体で、先体反応の進行が有為に阻害された。

3) マウス精巣での GPI アンカー型蛋白質遊離に関わる因子の同定を行い、現在までのところ、①GPI アンカー型蛋白質遊離活性は、生殖細胞の膜分画に局在する、②この活性は、精子形成の開始とともに上昇する等の結果を得た。

D. 考察

マウス精子形成過程での PLB/ LIP の発現上昇及び先体反応に対する特異的阻害剤の効果から、同分子がこれらの過程で重要な機能を担っていることが推察された。今後は、ノックアウトマウスの作製を通じて、さらに詳細な機能解析を行う。2) PH-20 やテストイシン等精子で発現している GPI アンカー型蛋白質は、遊離型で活性化し、受精において重要な機能を担っている。よって、GPI アンカー型蛋白質遊離因子の同定は、これらの分子の活性化機構を解明するうえで、極めて重要であると考えられる。

E. 結論

本研究の結果とさらなる遂行により、精子形成や受精の新たなメカニズムが解明され、惹いては原因不明の男性不妊症の解明につながると考えられる。

F. 健康危険情報

ヒト精子での先体反応阻害実験から、カルシウム非依存性フォスホリパーゼ阻害剤は、精子形成に影響をおよぼすと考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kawamoto, S., H. Niwa, F. Tashiro, S. Sano, **G. Kondoh**, J. Takeda, K. Tabayashi, J-I. Miyazaki: A novel reporter mouse strain that expresses enhanced green fluorescent protein upon *Cre-mediated* recombination. FEBS Lett., 470, **263-268** (2000).

2. Takeda, J., S. Sano, M. Tarutani, J. Umeda, and G. Kondoh: Conditional gene targeting and its application in the skin. J. Dermatol. Sci., 23, 147-154 (2000).

学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許出願

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・再生医療研究事業）

分担研究報告書

精子形成および受精に関する遺伝子の解析

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

遺伝子操作マウスを用いて、精子側の因子としてカルメジン、卵子側の因子として CD9 の重要性を世界に先駆けて発表することができ、受精機構のメカニズムの一端を分子生物学的に明らかにすることができた。また、その過程で作製した遺伝子操作動物である”green sperm”を産生するマウスは、種々の生殖系突然変異マウスと交配することにより、受精研究全般に対して大きく貢献して行くことが期待されている。

I. 研究目的

人類の精液中の精子は過半数が異常であることはかなり以前から指摘されているが、最近では、その精子数の減少を警告する報告が見られ、最近では年間何千人もが体外受精児として生まれており、ヒトの生殖細胞に何かが起こりつつあることを予感させる。

精子形成は生物学・医学の領域で重要な研究課題でありながら、未解明の点が多く、精子形成を分子生物学的に解明することは科学的に重要であるだけでなく社会的な急務でもある。

本研究では精子形成機構の解明のため、分子生物学的な観点から研究し、しかも精子形成のメカニズムを遺伝子のレベルにとどまらず、個体のレベルで明らかにしようとするものである。

B. 研究方法

受精のメカニズムの研究の歴史は種々の抗体や酵素阻害剤を加えたときに受精が阻害されるか否かを見たりすることによって行われてきた。しかし、最近遺伝子をノックアウトするという技術が普及するにつれて、これまで重要であるといわれてきた因子が実は、存在しなくても受精に差し支えがないことが示された。このことから、我々は真の受精機構の解明のためには遺伝子操作動物の利用が不可欠であると判断し、遺伝子操作動物を用いた研究を主な研究手段として実験をおこなうこととした。

C. 研究結果

われわれが報告した *calmegin* 遺伝子を欠損させた不妊モデルマウス (Ikawa et al., *Nature*, 1997 年) についてまず検討を加え、このマウスが不妊になる原因は *calmegin* の

分子シャペロン機能の欠損に由来することを明らかにした。次に calmegin のシャペロン作用を特異的に受ける物質について詳しく検討した結果 calmegin は Adam1 および Adam2 と呼ばれる精子膜上のたんぱく質と特異的に結合しそれらを folding し、さらにヘテロダイマーの形成に働いていることを突き止めた。そして結果として calmegin 遺伝子が欠損すると、これらのたんぱく質が精子の膜表面に出なくなることを証明した（投稿中）。また、calmegin 欠損マウスの精子は卵子との相互作用に問題が出るだけでなく輸卵管内に精子が遡上しなくなるという性質を有することも明らかになった（投稿中）。

また、遺伝子改変動物を利用した受精現象の解明にあたり、われわれは緑色蛍光たんぱく質(GFP)が非常に有効なマーカーとして種々の実験に利用できることを見出し報告した。精子が受精する前に必ず起こす先体反応と呼ばれる形態的な変化は、マウスにおいて光学顕微鏡を用いて観察することが困難であった。しかし、われわれは GFP を精子の先体内部に発現するような遺伝子操作マウスを作製することにより、先体反応の起こる瞬間を生きた精子を用い非侵襲的に観察できる系を作り上げた。このマウスにより先体反応時に先体内部からの因子の放出が 3 秒以内に起こることをはじめて明らかにした (Nakanishi et al, FEBS Lett., 1999)。

一方で、われわれは全身の多くの組織に存在する膜たんぱく質である CD9 を欠損するマウスの雌が不妊になることを見出し、その作用機作を検討した。全身の組織に CD9

欠損の影響を認めることはできなかったが、CD9 は未受精卵の膜表面に存在し卵子が精子を認識した後に融合を起こすメカニズムに組み込まれており、そこで重要な役割を果たしていることを明らかにした。(Miyado et al., Science, 2000 年)

D. 考察

カルメジンノックアウトマウスの研究を通じて受精機構の図式がこれまで報告され広く受け入れられてきたものと大幅に異なっていることが明らかになり、受精現象の理解するための重要な知見を得ることができた。

“green sperm”の作製に成功したが、このマウスを種々の不妊系統のマウスと交配させれば、受精能獲得現象や先体反応の過程を詳細に検討することが可能であることが示唆された。

CD9 を欠損したマウスでの研究は膜融合にかかわる卵子側の因子の報告としては世界ではじめての分子レベルでの報告であり、不妊症に関する遺伝子の解析を進展させるうえで最初の突破口となる重要な発見であったと考える。

E. 結論

遺伝子操作マウスを用いて、精子側の因子としてカルメジンを、卵子側の因子として CD9 の重要性を世界に先駆けて発表することができ、受精機構のメカニズムの一端を分子生物学的に明らかにすることができた。また、その過程で作製した遺伝子操作動物である“green sperm”を産生するマウスは、種々

の生殖系突然変異マウスと交配することにより、受精研究全般に対して大きく貢献して行くことが期待されている。このマウスは現在、使用を希望する研究者に広く配布できるように体制を整えつつある。

本研究によって得られた分子生物化学的な受精機構の解明は今後、臨床的な不妊の治療や診断に対し大きく貢献できるものと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

original paper

Ando, H., Haruna, Y., Miyazaki, J., **Okabe, M.**, and Nakanishi, Y. (2000). Spermatoocyte-specific gene excision by targeted expression of Cre recombinase. *Biochem Biophys Res Commun* **272**, 125-128.

Ando, H., Haruna, Y., Suzuki, M., Yamada, S., **Okabe, M.**, and Nakanishi, Y. (2000). Ectopic activation of the transcription promoter for the testis-specific mouse P_{gk}-2 gene on elimination of a cis-acting upstream DNA region. *Dev Growth Differ* **42**, 385-393.

Koresawa, Y., Miyagawa, S., Ikawa, M., Matsunami, K., Yamada, M., Shirakura, R., and **Okabe, M.** (2000). Synthesis of a New Cre

Recombinase Gene Based on Optimal Codon Usage for Mammalian Systems. *J Biochem* (Tokyo) **127**, 367-372.

Miyado K, Yamada G, Yamada S, Hasuwa H, Nakamura Y, Ryu F, Suzuki K, Kosai K, Inoue K, Ogura A, et al. (2000). Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science* **287**, 321-324.

Koresawa, Y., Miyagawa, S., Ikawa, M., Matsunami, K., Yamada, S., Okabe, M. (2000) A new Cre recombinase gene based on optimal codon usage in powerful material for organ-specific gene targeting. *Transplant Proc* **32**, 2516-2517

2. 学会発表

1) 岡部 勝: 精子/卵子相互作用にかかわる因子と精子の受精能、Molecular Biology of Mammalian Spermatogenesis、2000年2月1日

2) Hiroshi Ohta: Transplantation of Mouse Spermatogonia: Proliferation and Differentiation of Stem Cells in Seminiferous Tubules、11th European Workshop on Molecular and Cellular Endocrinology of the Testis、2000年5月13-17日

3) 山田 秀一: GFP-Coinjection 法による