

- Transgenic mouse の作成、第 47 回日本実験動物学会総会、2000 年 5 月 21-23 日
- 4) 伊川 正人: Cre/loxP システムを利用したジーントラップ法の開発と応用、第 47 回日本実験動物学会総会、2000 年 5 月 21-23 日
- 5) Masaru Okabe: Mechanism of sperm/egg interaction elucidated by gene-manipulated mice、第 3 回 アジアオセアニア国際アンドロロジー学会、2000 年 5 月 24-27 日
- 6) 岡部 勝: 受精機構の分子生物学と遺伝子操作動物、第 18 回日本受精着床学会、2000 年 7 月 6-7 日
- 7) 岡部 勝: 精子形成—イントロダクション—、第 93 回日本繁殖生物学会、2000 年 10 月 2-4 日
- 8) 岡部 勝: Sperm/egg fusion and surface proteins in mouse、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 5-8 日
- 9) 岡部 勝: 遺伝子操作動物を用いた受精メカニズムの研究、(社)日本動物学会近畿支部公開講演会、2000 年 11 月 25 日
- 10) 岡部 勝: ノックアウトマウスを用いた受精機構の解明、第 15 回日本生殖免疫学会総会・学術集会、2000 年 12 月 15-16 日
- 11) 岡部 勝: 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、北海道大学招待講演、2001 年 3 月 13 日

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11年度までに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、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19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。これらのイントロンレス遺伝子は CpG 配列を数多く有し、メチル化によって発現制御されている可能性を見いだした。

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。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。

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子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

的に絞りを、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。また、DNA とヒストンの修飾が遺伝子発現制御にどのような関与をするかを調べる。これらの解析により、半数体の遺伝子転写に必須の因子およびクロマチン構造変化の転写への影響を明らかにする。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12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中から19遺伝子をクローニングし、配列を決定した。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60%以上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。さらに、イントロンレス遺伝子の塩基配列を調べると、非常にCpG配列が多いことという特徴を有していた。そこで、DNAメチル化と発現との相関を調べると、精巣生殖細胞ではまったくメチル化されておらず、体細胞ではすべてがメチル化されていた。これら半数体精子細胞特異的遺伝子のプロモーター領域をGFPおよびluciferaseの上流につなぎ、3T3細胞でプロモーター活性を調べたところ、一過性に強い活性を示し、ゲノムに組み込まれると活性を示さなくなった。以上の結果は精巣半数体精子細胞特異的遺伝子発現制御は特異的な転写因子ばかりでなく、DNAメチル化が関与するクロマチンレベルでの調節が重要である可能性が示唆された。

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。さらに遺伝子発現制御には上流プロモーター領域による制御だけではなく、発現しない細胞内ではDNAが高度にメチル化されることにより、ヒストンの修飾に変化を与える高次の制御が重要と考えられた。

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遺伝子群の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。また、遺伝子内にCpG配列が多く、メチル化の発現制御に及ぼす影響が強いことが示唆された。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、発現制御領域の特定と、さらにメチル化と発現との関連を調べて、男性不妊症の新たな原因の究明に寄与できることが期待される。

F. 健康危険情報

DNAメチル化酵素の阻害剤である5-Aza-cytidineの作用によりゲノムDNAの脱メチル化が促進され、メチル化により本来、発現が抑制されている遺伝子群の発現が促進される可能性が指摘される。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Prostate-specific transcription factor hPSE is translated only in normal prostate epithelial cells. *Cancer Res.* **60**, 1348-1352 (2000) M. Nozawa, K. Yomogida, N. Kanno, N. Nonomura, T. Miki, A. Okuyama, Y. Nishimune and **M. Nozaki**
 2. Cloning and expression of the mouse Pse gene encoding a novel Ets family member. *Gene* **241**, 267-274 (2000) N. Yamada, Y. Tamai, H. Miyamoto and **M. Nozaki**
 3. Cloning and characterization of a complementary deoxyribonucleic acid encoding haploid-specific alanine-rich acidic protein located on chromosome-X. *Biol. Reprod.* **63**, 993-999 (2000) Uchida, K., Tsuchida, J., Tanaka, H., Koga, M., Nishina, Y., **Nozaki, M.**, Yoshinaga, K., Toshimori, K., Matsumiya, K., Okuyama, A.
 4. 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 (2000) Tosaka, Y., Tanaka, H., Yano, Y., Masai, K., **Nozaki, M.**, Yomogida, K., Otani, S., Nojima, H. and Nishimune, Y.
 5. Molecular cloning and characterization of phosphatidylcholine transfer protein gene expressed in murine haploid germ cells. *Biol. Reprod.* **62**, 1694-1701 (2000) 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.
 6. A novel cis-acting element regulates HES-1 gene expression in P19 embryonal carcinoma cells treated with retinoic acid. *J. Biochem.* **128**, 1087-1095 (2000) Wakabayashi, N., Kageyama, R., Habu, T., Doi, T., Morita, T., **Nozaki, M.**, Yamamoto, M. and Nishimune, Y.
 7. Isolation and characterization of a haploid germ cell-specific novel complementary deoxyribonucleic acid; testis-specific homologue of succinyl CoA-oxo acid CoA transferase. *Biol. Reprod.* **63**, 1601-1609 (2000) 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.
 8. Cytokeratin 8 and 19 in mouse placental development. *J. Cell Biol.* **151**, 563-572 (2000) Tamai, Y., Ishikawa, T.-O., Bosl, MR., Mori, M., **Nozaki, M.**, Baribault, H., Oshima, RG., and Taketo, M.
 9. 精子形成に対する分子生物学的アプローチ *Pharma Medica* **18**, 13-18 (2000) 野崎正美、田中宏光、西宗義武
- 2.学会発表**
5. 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.
 6. 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
 7. 第93回日本繁殖生物学会 2000年10月 シンポジウム 哺乳類精子形成の分子生物学 野崎正美
 8. 生理学研究所研究会 2000年11月 得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
10. 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

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ling, X., Tanaka, H., Tsuchida, J. and Nishimune, Y.	Identification of differentiation antigens in mouse testicular germ cells recognized by monoclonal antibody TRA55.	Int. J. Androl.	23	29-35	2000
Ohta, H., Yomogida, K., Yamada, S., Okabe, M. and Nishimune, Y.	Real-time obserbation of transplanted 'green germ cells': proliferation and differentiation of stem cells.	Develop. Growth Differ	42	105-112	2000
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.	Structure, expression, and chromosome mapping of LATS2, a mammalian homologue of the Drosophila tumor suppressor gene lats/warts	Genomics	63	263-270	2000
Nozawa, M., Yomogida, K., Kanno, N., Nonomura, N., Miki, T., Okuyama, A., Nishimune, Y. and Nozaki, M.	Prostate-specific transcription factor hPSE is translated only in normal prostate epithelial cells.	Cancer Res	60	1348-1352	2000
Uchida, K., Tsuchida, J., Tanaka, H., Koga, M., Nishina, Y., Nozaki, M., Yoshinaga, K., Toshimori, K., Matsumiya, K., Okuyama, A. and Nishimune, Y.	Cloning and characterization of a complementary deoxyribonucleic acid encoding haploid-specific alanine-rich acidic protein located on chromosome-X.	Biol. Reprod.	63	993-999	2000
Ohta, H., Yomogida, K., Dohmae, K. and Nishimune, Y.	Regulation of proliferation and differentiation in spermatogonial stem cells: the role of c-kit and its ligand SCF.	Development	127	2125-2131	2000

Tosaka, Y., Tanaka, H., Yano, Y., Masai, K., Nozaki, M., Yomogida, K., Otani, S., Nojima, H. and Nishimune, Y.	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	2000
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.	Molecular cloning and characterization of phosphatidylcholine transfer protein-like protein gene expressed in murine haploid germ cells.	Biol. Reprod.	62	1694-1701	2000
Wakabayashi, N., Kageyama, R., Habu, T., Doi, T., Morita, T., Nozaki, M., Yamamoto, M. and Nishimune, Y.	A novel cis-acting element regulates HES-1 gene expression in P19 embryonal carcinoma cells treated with retinoic acid.	J. Biochem.	128	1087-1095	2000
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.	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	2000
Ando, H., Haruna, Y., Miyazaki, J., Okabe, M. and Nakanishi, Y.	Spermatocyte-specific gene excision by targeted expression of Cre recombinase.	Biochem Biophys Res Commun	272	125-128	2000
Ando, H., Haruna, Y., Suzuki, M., Yamada, S., Okabe, M. and Nakanishi, Y.	Ectopic activation of the transcription promoter for the testis-specific mouse Pgk-2 gene on elimination of a cis-acting upstream DNA region	Dev Growth Differ	42	385-393	2000

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	127	367-372	2000
Miyado K, Yamada G, Yamada S, Hasuwa H, Nakamura Y, Ryu F, Suzuki K, Kosai K, Inoue K, Ogura A, Okabe, M., et al.	Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization.	Science	287	321-324	2000
Yamada, N., Tamai, Y., Miyamoto, H. and Nozaki, M.	Cloning and expression of the mouse Pse gene encoding a novel Ets family member.	Gene	241	267-274	2000
Tamai, Y., Ishikawa, T.-O., Bosl, M. R., Mori, M., Nozaki, M., Baribault, H., Oshima, R. G. and Taketo, M.	Cytokeratins 8 and 19 in mouse placental development.	J Cell Biol.	151	563-572	2000
Kawamoto, S., Niwa, H., Tashiro, F., Sano, S., Kondoh, G., Takeda, J., Tabayashi, K. and Miyazaki, J-I.	A novel reporter mouse strain that expresses enhanced green fluorescent protein upon Cre- mediated recombination.	FEBS Lett.	470	263-268	2000
Takeda, J., Sano, S., Tarutani, M., Umeda, J. and Kondoh, G.	Conditional gene targeting and its application in the skin.	J. Dermatol. Sci.	23	147-154	2000
Ventela S, Okabe M, Tanaka H, Nishimune Y, Toppari J, Parvinen M	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	2000
Kitamura, M., Matsumiya, K., Koga, M., Nishimura, K., Miura, H., Tsuji, T., Matsumoto, M., Okamoto, Y., Okuyama, A.	Ejaculated spermatozoa in patients with non-mosaic klinefelter's syndrome	Int J. Urol.	7	88-92	2000
Ventela S, Mulari M, Okabe M, Tanaka H, Nishimune Y, Toppari J, and Parvinen	Parvinen M. Regulation of acrosome formation in mice expressing green fluorescent protein as a marker.	Tissue & Cell			2000

Taga, M., Shiraiishi, K., Shimura, T., Uematsu, N., Kato, T., Nishimune, Y., Aizawa, S., Oshimura, M., Niwa, O.	The effect of caffeine on p53-dependent radioresponses in undifferentiated mouse embryonal carcinoma cells after X-ra and UV-irradiations	J. Radiat. Res	41	227-241	2000
Koresawa, Y., Miyagawa, S., Ikawa, M., Matsunami, K., Yamada, M., Okabe, M.	A new Cre recombinase gene based on optimal codon usage in powerful material for organ-specific gene targeting	Transplant Proc	32	2516-2517	2000
Ohta, H., Yomogida, K., Tadokoro, Y., Tohda, A., Dohmae, K., Nishimune, Y.	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	2001
Tanaka, H., Iguchi, N., Nakamura, Y., Kohroki, J., Carlos, E. Carvalho, Nishimune, Y.	Cloning and characterization of human haspin gene encoding haploid germ cell-specific nuclear protein kinase	Mol. Hum. Reprod.	7	211-218	2001
Yoshimura, Y., Nishimune, Y.	Nested genomic structure of haploid germ cell specific hasppin gene	Gene	267	49-54	2001
野崎正美、田中宏光、西宗義武	精子形成に対する分子生物学的アプローチ	Pharma Medica	18	13-18	2000

研究成果の刊行物・別刷

以下にこの間発表した原著論文の別刷を添付する。ただし、投稿中のものは含まない。

20000373

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
P22-25の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

