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

# 男性不妊症の原因遺伝子の同定と臨床応用

平成１３年度　総括研究報告書

主任研究者　　西宗義武

平成１４（２００２）年4月

目次

I. 総括研究報告
男性不妊症の原因遺伝子の同定と臨床応用 3
西宗義武

II. 分担研究報告
１．ヒト精細胞特異的遺伝子のクローニング 9
奥山明彦

２．マウス精細胞特異的遺伝子群のクローニングと構造解析 １３
野崎正美

３．ヒト遺伝子のクローニングと遺伝子多型の解析 １７
田中宏光

４．ノックアウトマウス作成 ２１
山田秀一

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ２３

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

# 男性不妊症の原因遺伝子の同定と臨床応用

主任研究者　西宗義武　大阪大学微生物病研究所教授

研究要旨

わが国や欧米諸国では、全夫婦の一割以上が不妊に悩まされており、その原因の半分は男性不妊にある。しかし、男性不妊については遺伝的要因、および環境ホルモン等の環境要因等が示唆されているが、大部分が原因不明である。さらに我が国のように高齢少子化社会における不妊問題はそれ自体なおざりにできない拍車要因であるが、さらに高齢化に伴う妊孕性低下の問題も重要課題である。このような生殖にまつわる問題を打開するためには、生殖細胞の基礎的研究を押し進め、生殖のメカニズムを生化学的、細胞生物学的且つ、分子生物学的に理解する必要がある。

申請者は生殖細胞で特異的に発現する遺伝子群の包括的単離と分子生物学的解析を行い、その成果をヒト男性不妊症の理解・診断と治療に還元させることを目標として研究を進めてきた。これまでに、申請者及び分担者の野崎と田中によりマウス精巣生殖細胞で特異的に発現する遺伝子群を網羅的にクローニングし、８５種類の精巣生殖細胞特異的遺伝子を得た。本研究においてはこれらの遺伝子構造と発現機構については主として分担者の野崎が、産物の機能とヒト相同遺伝子のクローニングを分担者の奥山と田中が、ノックアウトマウス作成と解析を分担者の山田が行う。さらに分担者の奥山を中心としてヒト臨床サンプルを用いて男性不妊症の原因及び、そのメカニズムを明らかにする。

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し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　野崎正美　大阪大学微生物病研究所 助教授
分担研究者　田中宏光　大阪大学微生物病研究所 助手
分担研究者　山田秀一　京都大学ウイルス研究所 助手

**A. 研究目的**

我々の個体は目的を異にする２種類の細胞である体細胞と生殖細胞から成り立っている。前者の障害は、さまざまな病気として医学研究や、医療の主たる対象となってきたが、後者の障害による不妊症は、苦痛との直接的関係が低く、必ずしも加療を要する病気との認識が広く行き渡っていないため、これまで比較的看過されてきた。しかし高齢少子化に向かう我が国では、不妊の問題はその根本的解決策にとって大きな障害となる。とりわけ、男性不妊は高頻度に現実に存在するにもかかわらず、大部分が原因不明であるため、解決策がなく今後もっとも重要な研

究課題の一つとして力を入れる必要がある。

さらに、近年、環境ホルモン等の影響により、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。また、ヒト精液中の精子数が減少しているという報告や、我が国や欧米諸国では高頻度（全夫婦の一割以上）に不妊が存在するという事実は、人類の生殖能力にも同様な変化が起こりつつある可能性を示唆している。

この様に人類をはじめとする地球上の動物種に起こりつつあ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は、生殖細胞の基礎的研究を押し進め、生殖のメカニズムを理解し、それを制御することにより早急に解決の糸口を見いださねばならない。

そのためには、生殖細胞の成り立ち・法則性を充分に理解し、それをもとにした不妊症の理解とその解決法の開発が必要である。そこで本研究では、生殖細胞で特異的に発現する遺伝子群の包括的単離と分子生物学的解析を行い、その成果をヒト不妊症の理解とその解析に還元させることを目的とした。具体的にはマウス精巣生殖細胞で特異的に発現する遺伝子群を網羅的にクローニングし、遺伝子機能、構造、発現機構、産物の機能、外来因子による影響等を調べる。さらにヒト相同遺伝子を単離解析し、その機能を明らかにし、それらをもとにして男性不妊症の原因及びそのメカニズムの理解を深めるとともに特異的遺伝子の変異による男性不妊症の可能性について追究する。

## B. 研究方法

サブトラクション法と重差分化法を併用した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。さらに哺乳動物細胞では唯一ともいえる半数体細胞での遺伝子発現がどのような機構によるかをこれら特異的発現遺伝子のプロモーター解析、クロマチン構造解析により調べた。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、あるいはその発現制御機構の特異性についてはノックアウトあるいはトランスジェニックマウスを作成し、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）

ヒト遺伝子を用いた実験についてはヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理規定を遵守し、「大阪大学ヒトゲノム研究実施規定」に従う。また臨床研究は「大阪大学医学部倫理規定」に従い、インフォームドコンセントによるサンプル採取を行い、研究対象者に対する不利益、危険性を排除する。

## C. 研究結果

８５種類の半数体精子細胞特異的遺伝子がクローニングされ、その中からこれまでに５０余りの遺伝子の染色体マッピングを行った結果、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。コードされる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、尾部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５１個の遺伝子の中で２３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４個見られた。すなわち調べた限り全体の５３％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。さらにいく

つかの遺伝子についてその上流を中心に特異的発現制御機構を解析している。トランスジェニックマウスを用いた解析により、特異的発現には上流の非常に短い領域だけで必要十分であり、そのプロモーター配列は通常の遺伝子の多くが持つモチーフ(TATA-box, CAAT-box, GC-rich motif など)を全く持たず、CRE 配列を持つものが多かった。これは、基本的転写制御に特徴を持つ可能性を示唆している。イントロンレス遺伝子については、内部に CpG を高頻度で持つものが多く、体細胞ではメチル化されることで遺伝子発現は完全に抑制されており、精子形成とともに脱メチル化状態になることで、発現可能となることを明らかとした。

またマウス半数体特異的遺伝子の塩基配列を用いてヒトゲノムデータベースの検索を行ったところ、半数体特異的遺伝子群のほとんどはそれらの相同遺伝子がヒトにも存在すること、そして、同様にイントロンレス遺伝子が多いことが確認された。その中から 8 個のヒト半数体特異的遺伝子をクローニングし、これらの遺伝子について男性不妊症患者のゲノムの SNPs を調べ、精子形成不全を伴う男性不妊症と遺伝変異との関連性についての解析を進めた。これまでに、数百例の不妊症患者 DNA についての解析で 3 遺伝子のコーディング領域にアミノ酸置換を起こす SNPs を発見した。解析遺伝子数、及びサンプル数を増やすとともに、変異型蛋白質の機能変調について検討している。

## D. 考察

マウス精巣生殖細胞特異的遺伝子群の網羅的クローニングによって、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すでに二つの遺伝子について機能を明らかにし、さらに 6 個の遺伝子について現在進行中であるが、時間的制約もあり必ずしも充分な成果が得られたとは言えない。精巣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、順調に進んでいる。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。

今後は、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。次に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。さらに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していきたい。

## E. 結論

精子形成過程後期の半数体精子細胞特異的発現をする遺伝子群 cDNA の包括的クローニングを行い、この時期に特異的発現をする遺伝子群の全体像の解析を進めた。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。また、これらの遺伝子はイントロンレス遺伝子が多く、それらの発現にはクロマチン構造変化による制御と特異的転写因子の活性化とが相まっていることが明らかとなりつつある。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フォリパーゼ阻害剤は、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. Ohta, H., Yomogida, K., Tadokoro, Y., Tohda, A., Dohmae, K. and **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.

2. **Tanaka, H.,** Iguchi, N., Nakamura, Y., Kohroki, J., Carvalho, C. E. and **Nishimune, Y.** (2001) Cloning and characterization of human haspin gene encoding haploid germ cell-specific nuclear protein kinase. *Mol. Human Reprod.* **7,** 211-218.

3. Yoshimura, Y., **Tanaka, H., Nozaki, M.,** Yomogida, K., Yasunaga, T. and **Nishimune, Y** (2001) Nested genomic structure of haploid germ cell specific haspin gene. *Gene* **267,** 49-54.

4. Takabayashi, S., **Nozaki, M.,** Ishikawa, K. and Noguchi, M. (2001) The ter/ter gonadal somatic cells cause apoptosis in ter/ter primordial germ cells (PGCs) with normal survival and proliferation ability in the mouse: evidence from PGC-somatic cell "exchange-co-culture". *Zool. Sci.* **18,** 695-704.

5. Ikawa, M., Nakanishi, T., Yamada, S., Wada, I., Kominami, K., **Tanaka, H., Nozaki, M., Nishimune, Y.** and Okabe, M. (2001) Calmegin is required for fertilin alpha/beta heterodimerization and sperm fertility. *Dev. Biol.* **240,** 254-261.

6. Boettger-Tong, H. I., Rohozinski, J., Agoulnik, A. I., Dohmae, K., **Nishimune, Y.,** Levy, N. and Bishop, C. E. (2001) Identification and sequencing the juvenile spermatogonial depletion critical interval on mouse chromosome 1 reveals the presence of eight candidate genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **288,** 1129-1135.

7. Tohda, A., Matsumiya, K., Tadokoro, Y., Yomogida, K., Miyagawa, Y., Dohmae, K., **Okuyama, A.** and **Nishimune, Y.** (2001) Testosterone suppresses spermatogenesis in juvenile spermatogonial depletion (jsd) mice. *Biol. Reprod.* **65,** 532-537.

8. Takabayashi, S. **Nozaki, M.,** Ishikawa, K. and Noguchi, M. (2001) The ter/ter gonadal somatic cells cause apoptosis in ter/ter primordial germ cells (PGCs) with normal survivability and proliferation ability in the mouse: evidence from PGC-somatic cell "exchange-co-culture" *Zool Sci* **18,** 695-704

9. Carvalho, C. E., **Tanaka, H.,** Iguchi, N., Ventela, S., Nojima, H. and **Nishimune, Y.** (2002) Molecular cloning and characterization of a complementary DNA encoding sperm tail protein SHIPPO1. *Biol. Reprod.* **66,** 785-795.

10. **Tanaka, H.,** Kohroki, J., Iguchi, N., Onishi, M. and **Nishimune, Y.** (2002) Cloning and characterization of a human orthologue of testis-specific succinyl CoA: 3-oxo acid CoA transferase (Scot-t) cDNA. *Mol. Human Reprod.* **8,** 16-23.

11. Doi, T., Morita, T., Wakabayashi, N., Sumi, T., Iwai, S., Amekawa, S., Sakuda, M. and **Nishimune, Y.** (2002) Induction of instability of p34 (cdc2) expression by treatment with cisplatin (CDDP) in mouse teratocarcinoma F9 cells. *Cancer Lett.* **176,** 75-80.

12. Tohda, A., Okuno, T., Matsumiya, K., Okabe, M., Kishikawa, H., Dohmae, K., **Okuyama, A.** and **Nishimune, Y.** (2002) Restration of spermratogenesis and fertility in azoospermic mutant mice by suppression and reelevation of testosterone followed by intracytoplasmic sperm injection. *Biol. Reprod.* **66,** 85-90.

13. Yasushi Miyagawa, **Hiromitsu Tanaka**, Naoko Iguchi, Kouichi Kitamura, Yoshihiro Nakamura, Tohru Takahashi, Kiyomi Matsumiya, **Akihiko Okuyama** and **Yoshitake Nishimune** (2002) Molecular Cloning and Characterization of the human orthologue of male germ cell-specific actin capping protein α3 (cpα3). *Mol Hum Reprod* **in press.**

14. Yoshihiro Nakamura, **Hiromitsu Tanaka**, Minoru Koga, Yasushi Miyagawa, Naoko Iguchi, Carlos Egydio de Carvalho, Kentaro Yomogida, **Masami Nozaki**, Hiroshi Nojima, Kiyomi Matsumiya, **Akihiko Okuyama**, and **Yoshitake Nishimune** (2002) Molecular Cloning and Characterization of oppo1: A Haploid Germ Cell-Specific Complementary DNA Encoding Sperm Tail Protein. *Biol Reprod* **in press.**

15. Fujii, T., Tamura, K., Kasai, K., **Tanaka, H.**, **Nishimune, Y.** and Nojima, H. (2002) Use of stepwise subtraction to comprehensively isolate mouse genes whose transcription is upregulated during spermiogenesis. *EMBO Report* **in press.**

16. Iguchi, N., **Tanaka, H.**, Nakamura, Y., **Nozaki, M.**, Fujiwara, T. and **Nishimune, Y.** (2002) Cloning and characterization of the human tektin-t gene. *Mol. Hum. Reprod.* **in press.**

**2. 学会発表**

1. 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「マウス半数体精子細胞に発現する遺伝子の単離およびその解析」 第 89 回日本泌尿器科学会総会、2001 年 4 月 16 日、神戸国際会議場

2. 7th International Congress of Andrology, June 2001 (Montreal, Canada) Characterization of haploid germ cell specific kinase 'Haspin' promoter and activity defined by transgenic mouse experimentation. **Hiromitsu Tanaka, Shuichi Yamada** and **Yoshitake Nishimune**

3. 14th International Congress of Developmental Biology. 8-12 July, 2001 (Kyoto, Japan) Identification of Human haspin gene encoding haploid germ cell-specific nuclear protein kinase. **Hiromitsu Tanaka**, Naoko Iguchi, Yoshihiro Nakamura, Junya Kohroki, Carlos Egydio de Calvalho and **Yoshitake Nishimune**

4. 14th International Congress of Developmental Biology. 8-12 July, 2001 (Kyoto, Japan) Proliferation and differentiation of W/Wv mutant spermatogonial stem cell. Hiroshi Ohta, Kentaro Yomogida, and **Yoshitake Nishimune**

5. 中村吉宏、田中宏光、宮川康、蓬田健太郎、松宮清美、野島博、西宗義武、奥山明彦 第 20 回日本アンドロロジー学会、2001 年 7 月 20-21 日、宇都宮東日本ホテル

6. 野崎正美 「精子形成関連遺伝子群のクローニングと解析 第 20 回日本アンドロロジー学会、2001 年 7 月 20-21 日、宇都宮東日本ホテル

7. **Nozaki, M.** "Unique feature of genes expressing during mammalian spermatogenesis" International Symposium; Developmental and epigenetics of mammalian germ cells and pluripotent stem cells" November 2001 (Kyoto, Japan)

8. Tanaka, H., Iguchi, N., Ohta, H., Miyagawa, Y., Yamada, S. and Nishimune, Y. "Analysis of haploid germ cell specific bidirectioal promoter" International Symposium; Developmental and epigenetics of mammalian germ cells and pluripotent stem cells" November 2001 (Kyoto, Japan)

9. 久野瑞枝、山田秀一、田中宏光、西宗義武、

野崎正美「精巣生殖細胞に特異的に発現する Tact 遺伝子の分子進化と発現制御機構」第 24 回　日本分子生物学会 2001 年 12 月 9 日（横浜）

10．野崎正美、池晶子、大西正剛、久野瑞枝、山田秀一、蓬田健太郎、田中宏光、西宗義武「マウス精巣生殖細胞特異的遺伝子群の構造と発現制御の特徴」第 24 回　日本分子生物学会 2001 年 12 月 9 日（横浜）

11. 田中宏光、井口尚子、大田浩、宮川康、山田秀一、西宗義武「ほ乳類半数体精子細胞特異的核カイネース Haspin プロモーター領域 192bp は、双方向に転写調節をおこなう」第 24 回　日本分子生物学会 2001 年 12 月 9 日（横浜）

12．野崎正美「マウス精子形成関連遺伝子群の構造と発現制御の特徴」日本薬学会第１２２年会シンポジウム　平成１４年３月２６日－２８日（幕張メッセ）

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定）

特許出願準備中（１件）
「精子形成遺伝子を用いた診断システム」特願２００２－３６６４９（出願中）

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

# ヒト精細胞特異的遺伝子のクローニング

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から、男性不妊症の臨床応用を目指すことである。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ヒトにおける結果を報告する。この中で、human orthologue of male germ cell-specific actin capping protein α3 (hCPα3) は精細胞特異的に発現し、精子構造形成蛋白質のみならず、精子形成過程においても重要な役割を演じているものと考えられた。OPPO-1 は精子尾部に特異的に発現する構造蛋白質で、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。今後は臨床献体、ヒト男性不妊症での検討を経ることによって、臨床応用への可能性が示唆された。

## 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。最終的には、これらを基にして、男性不妊症の原因、機構の解明、すなわち、特異的遺伝子の変異による精子形成障害の可能性を追求する。

## B. 研究方法

1）hcpα3 cDNA クローニングと mRNA 発現解析

マウス cpa3 (mcpα3) cDNA シークエンスを用いてデータベースを検索し、ヒトゲノム第 12 染色体上に相同性を示す遺伝子を発見した。予想される Open Reading Frame (ORF) を PCR で増幅し、これをプローブとして精巣 cDNA library をスクリーニングし、hcpα3 cDNA の全長を含むクローンを得た。mcpα3 の ORF 全長を大腸菌に発現させ、精製し、抗原としてウサギに免疫した。この抗体でヒト精巣及び精子を用いて Western blot analysis および免疫染色による解析を行った。

2）精子尾部蛋白質をコードする半数体精子細胞特異的 cDNA (*oppo1*) のクローニングと解析

分化の完了した精子細胞を含む３５日齢のマウス精巣 cDNA library から半数体精子細胞分化のまだ見られていない１７日齢の精巣 mRNA を差し引いた subtracted library から半数体精子細胞特異的遺伝子を単離した。その中の一つである MT62 cDNA Tag は、その一次構造から、バクテリアの鞭毛に局在する蛋白質に弱

い相同性を示す蛋白質をコードすることが確認された。MT62 cDNA Tag をプローブに、マウス精巣の cDNA library から全長 cDNA をクローニングし一次構造を決定した。また、クローニングした全長 cDNA を用いてその mRNA の発現をノーザンブロッティング、*in situ* ハイブリダイゼーションで調べた。さらに大腸菌でレコンビナント蛋白質を作成し、ウサギに免疫して抗体を作成し、ウエスタンブロティング、免疫組織染色を行い、oppo1 遺伝子産物の解析を行った。

**C. 研究成果**

1) hcpα3 cDNA の全長は 1072bp, ORF は 897bp, 299 アミノ酸の蛋白質をコードすると考えられた。マウスとの比較では DNA レベルで 82.1 %, 蛋白質レベルで 91.3 %と高い相同性を示した。特に、アクチン結合に必要とされる C 末端領域は種を越えて、よく保存されていた。Northern blot analysis にてその mRNA 発現はヒトにおいても精巣特異的であることが分かった。また、ヒト精巣・精子にて 33kDa の hCPα3 蛋白質発現が確認された。また CPα3 蛋白質の主な局在は精子の主に中心体が存在する頸部であり、鞭毛や postacrosome にもわずかに存在した。この局在はヒト精子におけるアクチンのそれと一致することが二重染色にて確認された。データベース検索により mcpα3 cDNA と相同性を有するヒトゲノムクローンは 12p12 境域の一カ所のみであった (NCBI accession number: NT 028330)。PCR と Southern blot analysis から hcpα3 が intronless gene であることが判明した。また 5'上流領域には TATA box や GC rich な部分は見られなかったが、cAMP response element (CRE) が 2 カ所存在した。また 3'下流領域には典型的な polyadenylation signal やその variant は存在しなかった。これらの特徴はマウスと同様であった。

2) oppo1 遺伝子 (MT62) は全長 1085bp で、33 kDa の蛋白質をコードし、その発現は精細胞特異的で精母細胞から弱く転写され精子細胞で強く発現することが明らかとなった。また翻訳は、ウエスタンブロッティングおよび免疫組織染色の結果から、精子細胞特異的であり転写後に翻訳調節が行われていることが明らかとなった。さらに OPPO1 蛋白質は、精子に存在していることがウエスタンブロッティングの結果から示された。また、マウス精巣上体精子の免疫組織染色において、精子鞭毛の midpiece から principal piece かけて強いシグナルが認められた。精子の鞭毛は、その運動に関与する 9+2 構造をとる微小管からなり、その周りを取り囲むように outer dense fiber (ODF) が midpiece から principal piece にかけて存在する。そこで、マウス精巣上体精子を Urea にて処理しウエスタンブロッティングを行ったところ、OPPO1 蛋白質は ODF 画分に存在することが示された。次にマウス精巣上体精子を cetyltrimethylammoniumbromide で処理して ODF を露出して免疫組織染色を行ったところ OPPO1 が ODF に局在することが明らかとなった。

**D. 考察**

1）Actin capping protein (CP) はすべての哺乳類細胞に存在し、また進化上、最もよく保存されたアクチン調節蛋白質である。CP はαとβの二つの subunit からなる heterodimer を形成しアクチン繊維と結合しその長さを動的に調節するとされる。ヒトの CPα gene はこれまでに第1および第7染色体上にひとつずつ確認されている (α1, α2)。しかしながら cpβ gene は第1染色体にひとつだけで、二つの alternatively spliced variants (β1, β2)の発現が確認されている。本研究で単離、解析した新規のヒト雄性生殖細胞特異的遺伝子 cpα3 (DDBJ accession number: AB053259) は体細胞型の cpα1, α2 とは蛋白質レベルでの相同性は 34%と低く、またβ subunit との結合は確認されていない。しかしながら種を越えて C 末端領域のアクチン結合部位が極めてよく保存され、ヒト精子ではアクチンと局在が一致したことから、雄性生殖細胞のアクチンを調節する新規の cpα subunit と考えられ、ヒト精子の構造や男性の妊孕性に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

2）半数体精子細胞特異的遺伝子の役割として　分化制御に関与する遺伝子、　精子の形態形成に関与する遺伝子、　精子のエネルギー代謝に関与する遺伝子等が考えられる。ここに報告した oppo1 遺伝子は、精子の鞭毛形成またはその運動性に深い関わりを持つことが推測される。男性不妊症の病因として、精子形成障害、精子輸送路通過障害、副性器感染症、性機能障害等に分けられるが、全体の約半数以上を突発性精子形成障害が占めていることから、精子の形成や運動性を分子レベルで理解することによりこれらの原因を明らかにすることができるものと考えられる。ここに報告した oppo1 遺伝子は、これら男性不妊症の原因遺伝子の一つである可能性が推測される。

## E. 結論

二つのマウス精巣特異的遺伝子の単離と機能解析を行った。cpα3 と OPPO-1 はともに精子運動性に関与する構造形成分子である可能性を明らかにした。精子形成機構における点については、マウスにおいてさらに検討を加えたい。

## 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フォリパーゼ阻害剤は、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 the human orthologue of male germ cell-specific actin capping protein α3 (cpα3). Yasushi Miyagawa, Hiromitsu Tanaka, Naoko Iguchi, Kouichi Kitamura, Yoshihiro Nakamura, Tohru Takahashi, Kiyomi Matsumiya, **Akihiko Okuyama** and Yoshitake Nishimune *Mol Hum Reprod* **in press**, 2002.

2. Molecular Cloning and Characterization of oppo1: A Haploid Germ Cell-Specific Complementary DNA Encoding Sperm Tail Protein. Yoshihiro Nakamura, Hiromitsu Tanaka, Minoru Koga, Yasushi Miyagawa, Naoko Iguchi, Carlos Egydio de Carvalho, Kentaro Yomogida, Masami Nozaki, Hiroshi Nojima, Kiyomi Matsumiya, **Akihiko Okuyama**, and Yoshitake Nishimune *Biol Reprod* **in press**, 2002.

**2. 学会発表**

1. 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「マウス半数体精子細胞に発現する遺伝子の単離およびその解析」 第 89 回日本泌尿器科学会総会、2001 年 4 月 16 日、神戸国際会議場

2. 中村吉宏、田中宏光、宮川康、蓬田健太郎、松宮清美、野島博、西宗義武、奥山明彦 第 20 回日本アンドロロジー学会、2001 年 7 月 20-21 日、宇都宮東日本ホテル

**H. 知的財産権の出願・登録状況**

なし

# 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

# マウス精細胞特異的遺伝子群のクローニングと構造解析

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１３年度は精子形成後期過程である半数体精子細胞特異的に発現する８５種類の遺伝子について、その構造と発現制御機構についての解析を進めた。これまでに５１個の遺伝子について構造を決定したところ、２３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進化上哺乳動物種が拡大する以前にイントロンを持つ遺伝子からレトロポジションによって生じたことが予想された。また、これらは 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ことを明らかにした。さらに、プロモーター構造は通常の遺伝子と異なり、特異的な基本転写によって制御される可能性を示唆した。

### 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。半数体細胞は哺乳動物では配偶子である卵と精子以外ない。さらに卵は受精の瞬間だけ半数体となるが、精子は減数分裂が終わった後、精子完成にいたる2週間にわたり半数体で挙動する唯一の細胞である。このような特殊な状態の細胞で特異的に発現される遺伝子はその発現調節ばかりか、構造における特徴があることが予想される。そこで、これらのことを明らかにすることによって、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。

### A. 研究方法

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い、８５種類の cDNA を得た。

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調べた。この時、ヒト、およびマウスゲノムプロジェクトで得られている情報も参考にした。また、遺伝子上流域に的を絞り、制御領域を特定するために、レポーターにつないだコンストラクトを用いてトランスジェニックマウスを作成し、解析を行った。このようにして狭められた制御領域について、培養細胞を用いて、あるいは vi vivo electroporation 法を用いて詳細な解析を行うとともに、その配列に結合する転写因子の同定を試みた。また、イントロンレス遺伝子については、内部に CpG 配列が多数存在していたので、メチル化感受性制限酵素を用いたサザンハイブリダイゼイションおよび、Bisulfite-PCR-シーケンスにより、各臓器ごとのメチル化パターンを調べた。また、メチル化による転写抑制について調べた。

C. 研究結果

平成１３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５１遺伝子の構造を解析した。そのうち２３遺伝子はイントロンを持たないことを明らかとした。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なものが多かった。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。メチル化せずに用いた場合は、一過性の活性を示したが、メチル化して用いた場合は活性が消失した。同様な結果は in vivo electroporation 法を用いて精巣生殖細胞に導入した時にも見られた。次に半数体特異的遺伝子のプロモータ配列を比較したところ、通常のプロモーターに存在するモチーフ(TATA-box, CAAT-box, GC-rich)が全く存在せず、cyclic AMP response element (CRE)-like エレメントだけが見られた。精巣では CRE モチーフに特異的転写因子である CREM-tau が作用すると予想されていたので、3T3 細胞に半数体遺伝子プロモーター・luciferase と CREM-tau 発現ベクターを同時に発現させたところ、CREM-tau 無しの場合と比較して、強い活性が見られた。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 DNA メチル化によるクロマチン構造変化と、特異的な転写因子との協調作用によって制御され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、身体の中で長期間活動している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、約半数がイントロンを持たず、それ以外はサイズの小

さい遺伝子であることが明らかとなった。哺乳動物遺伝子は基本的にイントロンを有することからこれは半数体特異的遺伝子の特徴であると考えられる。また、多くのイントロンレス遺伝子はイントロンを持つ別の遺伝子とアイソフォームの関係にあり、比較的構造が保存されている。従って、進化の過程で、哺乳動物種が拡大する前に、イントロンを持つ遺伝子からレトロポジションによって生じた可能性が考えられる。これは、生殖細胞の進化上の機能獲得を考える上で興味深い。さらに遺伝子発現制御には上流プロモーターが重要であり、そこに結合する因子として、半数体特異的転写因子 CREM-tau の重要性が示唆された。この因子はユビキタスに発現する CREM の精巣型スプライスバリアントであるため、特異的発現制御が、転写後のスプライシングによりなされている可能性を示す。イントロンレス遺伝子は、遺伝子内部に CpG を多数持ち、発現しない細胞では DNA が高度にメチル化されることにより、ヒストンの修飾が変化することで、転写が抑制され、精子形成とともに脱メチル化されて、転写が出来る状態になる。CpG のメチル化は脊椎動物から頻繁に起こるようになったことを考えると、生殖細胞にとって重要な遺伝子群の発現制御がエピジェネティック変化により影響を受ける事実は、大変興味深い。また、ヒト男性不妊症の原因を探る上で、このような遺伝子発現制御を上位で支配する機構の乱れを考慮する必要があるかもしれない。

**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。さらにプロモーター領域の配列に特徴があり、精巣特異的転写因子である CREM-tau によって発現制御されている可能性が示唆された。今後、すべての半数体特異的遺伝子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. Calmegin is required for fertilin alpha/beta heterodimerization and sperm fertility. *Dev. Biol.* **240,** 254-261 (2001) M. Ikawa, T. Nakanishi, S. Yamada, I. Wada, K. Kominami, H. Tanaka, **M. Nozaki,** Y. Nishimune and M. Okabe

2. Nested genomic structure of haploid germ cell speicific haspin gene. *Gene* **267,** 49-54 (2001) Y. Yoshimura, H. Tanaka, **M. Nozaki,** K. Yomogida, T. Yasunaga and Y. Nishimune

3. The ter/ter gonadal somatic cells cause apoptosis in ter/ter primordial germ cells

(PGCs) with normal survivability and proliferation ability in the mouse: evidence from PGC-somatic cell "exchange-co-culture" *Zool. Sci.* **18,** 695-704 (2001) S. Takabayashi, **M. Nozaki,** K. Ishikawa and M. Noguchi

**2.学会発表**

1．　野崎正美　「マウス精巣生殖細胞特異的遺伝子群の解析」　性分化研究会　平成１３年３月１６日—１７日　岡崎国立共同研究機構

2．　野崎正美　「遺伝子から見た哺乳動物精子形成の特徴」関西実験動物研究会第７０回研究会　平成１３年６月１５日　大阪大学銀杏会館

3．　野崎正美　「精子形成関連遺伝子群のクローニングと解析」第２０回日本アンドロロジー学会シンポジウム　平成１３年７月２０日—２１日　宇都宮東日本ホテル

4．　野崎正美　「精子形成を司る遺伝子群の構造、発現および機能解析について」IVF 研究会　平成１３年１０月５日—７日　淡路夢舞台国際会議場

5．　野崎正美　「遺伝子から見た哺乳動物精子形成の特徴」International symposium; Development and epigenetics of mammalian germ cells and pluripotent stem cells　平成１３年１１月１９日—２１日　京都都ホテル

6．　野崎正美、池晶子、大西正剛、久野瑞枝、山田秀一、蓬田健太郎、田中宏光、西宗義武　「マウス精巣生殖細胞特異的遺伝子群の構造と発現制御の特徴」第２４回日本分子生物学会　平成１３年１２月９日—１２日　パシフィコ横浜

7．　久野瑞枝、山田秀一、田中宏光、西宗義武、野崎正美　「精巣生殖細胞に特異的に発現する Tact 遺伝子の分子進化と発現制御機構」第２４回日本分子生物学会　平成１３年１２月９日—１２日　パシフィコ横浜

8．　野崎正美、大西正剛、池晶子、久野瑞枝、田中宏光、西宗義武　「マウス精巣生殖細胞特異的遺伝子群の構造と発現制御の特徴」トランスポゾンに関するミニ研究会　平成１３年１２月１１日　パシフィコ横浜

9．　野崎正美　「マウス精子形成関連遺伝子群の構造と発現制御の特徴」日本薬学会第１２２年会シンポジウム　平成１４年３月２６日—２８日　幕張メッセ

H. 知的財産権の出願・登録状況
（予定を含む。）

1. 特許取得

「精子形成遺伝子を用いた診断システム」

特願２００２−３６６４９（出願中）

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

# ヒト遺伝子のクローニングと遺伝子多型の解析

分担研究者　田中宏光　大阪大学微生物病研究所　助手

研究要旨

男性不妊症に関与する原因遺伝子群を同定し、その遺伝子診断の系を開発するためには、精子形成過程に関与するさまざまなヒト遺伝子群を単離し、それらの機能を解析する必要がある。また、これら遺伝子群のSNPsと男性不妊症の関係を調べることは、遺伝子診断系の開発に重要である。

今回、新規ヒト精子細胞特異的遺伝子 *Haspin, Scot-t, Tektin-t, Cpα3, Hanp 1, Shippo1, Oppo1* の cDNA と、Genomic DNA の単離、解析を行い、さらに、既知精細胞特異的遺伝子とこれら新規遺伝子について、男性不妊症患者群と妊よう性確認男性対照群の SNPs を比較した。その結果、それら遺伝子群の多型や変異が男性不妊症に関与している可能性が示唆された。

## A. 研究目的

精子形成機構の分子メカニズムを解明するため、マウスを用いて精子細胞特異的遺伝子を包括的に単離、解析してきた。ヒトにおいてもこれら遺伝子が保存されていることを調べ、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との関連性を明らかにする事は、ヒト男性不妊症の特異的治療法開発のためにも重要である。すなわち、これら遺伝子群の SNPs を男性不妊症患者群と妊よう性確認男性群の間で比較することで、原因遺伝子を浮かび上がらせることができるように条件検討を行った。

## B. 研究方法

1）成熟マウス精巣 cDNA から未成熟マウス精巣 cDNA を差し引いたライブラリーを作成し、このライブラリーから精子細胞特異的遺伝子群の単離と解析を行った。これらのうち機能の明らかとなった遺伝子から順次、ヒト相同遺伝子の単離、解析を進め、マウスでの実験系がヒトにも応用可能であるかどうかを検討した。

2）ヒト精子細胞分化で特異的に機能する遺伝子について、その遺伝子多型を調べた。インフォームドコンセントの得られた妊よう性確認男性群と男性不妊症患者群の血液から、それぞれ染色体 DNA を抽出し、PCR 法を用いて遺伝子をコードする領域の染色体 DNA シークエンスを調べ、それらの多型を明らかにした。

**C.　研究結果**

1）　新規ヒト精子細胞特異的遺伝子 h-*Haspin*, h-*Scot-t*, h-*Tektin-t*, h-*Cpα3*, h-*Hanp1*, h-*Shippo1*, h-*Oppo1* の cDNA を明らかにし、さらにその発現様式からそれら遺伝子が精子細胞特異的に機能する事が示唆された。さらに、これら遺伝子群の転写産物は、精子細胞特異的な形態形成、シグナル伝達、エネルギー代謝など、精子細胞分化に重要な機能を担うことを報告した。

2）我々の明らかにした遺伝子群の一部と既知の精細胞特異的遺伝子プロタミン 1,2、*t-actin1,2* について、遺伝子多型を調べた。その結果、これら遺伝子群の一つ h-*Scot-t* の多型の一つが男性不妊症患者に多く存在することが明らかとなった。そこで、h-*Scot-t* に存在する遺伝子多型と、そこから転写後翻訳されるタンパク質の生化学的性質の差異が、男性不妊症とどのように関係するのかを解析している。

**D.　考察**

生殖細胞の特質は、生殖細胞で発現する遺伝子によって支えられている。その中でも、特異的発現を示す遺伝子は、生殖細胞分化に重要であることは言うまでもない。また、これら特異的遺伝子の変異は生殖細胞にだけその形質を示すと考えられる。男性不妊症患者は生殖細胞にのみその病態を現す。これは、生殖細胞特異的遺伝子自体の変異、発現の変化が原因である可能性を示唆している。我々は予想以上の数の遺伝子がヒトにおいても生殖細胞特異的に発現していることを明らかにした。すなわち、これらの遺伝子が多様な臨床像を示す男性不妊症の原因遺伝子である可能性を推測させる。今回、精細胞特異的遺伝子に関して、ヒト血液細胞から得られた染色体 DNA 上の変異を容易に同定する系を確立した。さらに、男性不妊症原因遺伝子の一つの候補として h-*Scot-t* を同定し、その原因と考えられる多型を発見した。さらなる精子細胞特異的遺伝子の解析は、男性不妊症を引き起こすメカニズムを明らかにし、ヒト男性不妊症のテーラーメード治療法の開発につながるものと期待される。

**E.　結論**

マウスとヒトにおいては共通の精子細胞特異的遺伝子が保存され、機能的にも類似していることが明らかとなった。これら精子細胞特異的遺伝子がその分化に重要であり、さらにその変異が男性不妊症と結びつくことが示唆された。また、微量の血液から多数の精子細胞遺伝子群の遺伝子診断を行える系を確立した。

**F.　健康危険情報**

なし

**G.　研究発表**

1. 論文発表

1. Miyagawa Y, **Tanaka H,** Iguchi N, Kitamura K, Nakamura Y. Takahashi T, Matsumiya K, Okuyama A, Nishimune Y. Molecular cloning and characterization of the human orthologue of

male germ cell-specific actin capping protein a3 (*cpa3*). *Mol Hum Reprod* (2002) In press.

2. Fujii T, Tamura K, Masai K, **Tanaka H**, Nishimune Y, Nojima H. Use of stepwise subtraction to comprehensively isolate mouse genes whose transcription is upregulated during spermiogenesis. *EMBO Report* (2002) In press.

3. Nakamura Y, **Tanaka H**, Koga M, Miyagawa Y, Iguchi N, Egydio De Carvalho C, YomogidaK, Nozaki M, Nojima H, Matsumiya K, Okuyama A, Nishimune Y. Molecular Cloning and Characterization of *oppo* 1: a Haploid Germ Cell-Specific cDNA Encoding Sperm Tail Protein. *Biol Reprod* (2002) In press.

4. Iguchi N, **Tanaka H**, Nakamura Y, Nozaki M, Fujiwara T, Nishimune Y. Cloning and characterization of the human tektin-t gene. *Mol Hum Reprod* (2002) In press.

5. Egydio De Carvalho C, **Tanaka H**, Iguchi N, Ventela S, Nojima H, Nishimune Y. Molecular Cloning and Characterization of a Complementary DNA Encoding Sperm Tail Protein SHIPPO 1. *Biol Reprod* **66**:785-795 (2002).

6. **Tanaka H**, Kohroki J, Iguchi N, Onishi M, Nishimune Y. Cloning and characterization of a human orthologue of testis-specific succinyl CoA: 3-oxo acid CoA transferase (Scot-t) cDNA. *Mol Hum Reprod* **8**:16-23 (2002).

7. Ikawa M, Nakanishi T, Yamada S, Wada I, Kominami K, **Tanaka H**, Nozaki M, Nishimune Y, Okabe M. Calmegin is required for fertilin alpha/beta heterodimerization and sperm fertility. *Dev Biol.* **240** :254-261 (2001).

8. **Tanaka H**, Koga M, Yomogida K, Iguchi N, Nozaki M, Onishi M, de Carvalho CE, Nakamura Y, Miyagawa Y, Takeyama M, Matsumiya K, Okuyama A, Nishimune Y. Isolation and Characterization of Haplioid Germ Cell-Specific suuccinyl CoA: 3-oxo Acid CoA Transferase (scot-t1 and scot-t2). Andrology in the 21st Century. Proceeding of VIIth international congress of andrology, 157-161 (2001).

9. Yoshimura Y, **Tanaka H**, Nozaki M, Yomogida K, Yasunaga T, Nishimune Y. Nested genomic structure of haploid germ cell specific haspin gene. *Gene 267*: 49-54 (2001).

10. **Tanaka H**, Iguchi N, Nakamura Y, Kohroki J, de Carvalho CE, Nishimune Y. Cloning and characterization of human haspin gene encoding haploid germ cell-specific nuclear protein kinase. *Mol. Hum. Reprod.* **7**: 211-218 (2001).

11. **Tanaka H**, Koga M, Yomogida K, Iguchi N, Nozaki M, Onishi M, de Carvalho CE, Nakamura Y, Miyagawa Y,

Takeyama M, Matsumiya K, Okuyama A, Nishimune Y. Isolation and Characterization of Haplioid Germ Cell-Specific suuccinyl CoA: 3-oxo Acid CoA Transferase (scot-t1 and scot-t2). Andrology in the 21st Century. Proceeding of VIIth international congress of andrology, 157-161 (2001).

２．学会発表

1. 16th Testis Workshop. Regulatort Mechanisms of Testicular Cell Differentiation. Feb., 2001 (Newport Beach, CA). Cloning and Characterization of Human *haspin* Gene Encoding Haploid Cell-Specific Nuclear Protein Kinase. **Hiromitsu Tanaka**, Naoko Iguchi, Yoshihiro Nakamura, Junya Kohroki, Carlos Egydio de Carvalho, Yoshitake Nishimune.

2. 7th International Congress of Andrology June, 2001 (Montreal, Canada). Characterization of Haploid Germ Cell Specific Kinase 'Haspin' Promoter and Activity Defind by Transgenic Mouse Experimentation. **Hiromitsu Tanaka**, Shyichi Yamada, Yoshitake Nishimune.

3. 14$^{th}$ Internationa Congress of Developmental Biology. July, 2001 (Kyoto, Japan). Identification of Human *haspin* Gene Encoding Haploid Germ Cell-Specific Nuclear Protein Kinase. **Hiromitsu Tanaka**, Naoko Iguchi, Yoshihiro Nakamura, Junya Kohroki, Carlos Egydio de Carvalho, Yoshitake Nishimune.

4. Internationa Symposium. Development and Epigenetics of Mammalian Germ Cells and Pluripotent Stem Cells. Nov., 2001 (Kyoto, Japan). Analysis of Haploid Germ Cell Specific Bidirectional Promoter. **Hiromitsu Tanaka**, Naoko Iguchi, Hiroshi Ohta, Yasushi Miyagawa, Shuichi Yamada, Yoshitake Nishimune.

5. 24 回日本分子生物学会　2001 年１２月 ほ乳類半数体精子細胞特異的核カイネース Haspin のプロモーター領域 192bp は、双方向に転写調節をおこなう。田中宏光、井口尚子、大田浩、宮川康、山田秀一、西宗義武

H. 知的財産権の出願・登録状況

１．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