

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

男性不妊症の原因遺伝子の同定と臨床応用

分担研究者 山田秀一 京都大学ウイルス研究所助手

研究要旨

クローニングしたマウス半数体精子細胞特異的遺伝子の機能を個体レベルで解析するために、ノックアウトマウスを作成し、表現型の解析を行うことを目的として研究を行った。平成13年度は actin capping protein $\alpha 3$ ($cp\alpha 3$) 遺伝子についてノックアウトコンストラクトの作成を完了した。現在、相同組み換え ES をクローニング中である。今後、キメラマウスを作成し遺伝子欠損マウスを作出し、表現型の検討を行う。また、それ以外の遺伝子についても順次ノックアウトマウス作成に取りかかっている。

A. 研究目的

マウス精巣半数体精子細胞特異的に発現する遺伝子を85種類クローニングした。精巣生殖細胞での発現の特異性は確認したので、次には実際に精子形成あるいは受精におけるそれらの遺伝子の個体レベルでの機能解析を、個別に行う必要がある。そこで、ノックアウトマウスの技術を用いて、それぞれの遺伝子に変異を導入したり、遺伝子を欠損させたマウスを作出して、表現型の解析を試みる。その結果、不妊となった場合、その遺伝子が、ヒト男性不妊症の原因遺伝子であることを調べるために、不妊症患者ゲノムの解析を行う。すなわち、原因遺伝子候補が特定できることになる。逆に、男性不妊症患者の遺伝子に変異を同定した場合、それが実際に不妊と関係するかどうかを調べるために、同様な遺伝子変異を導入したマウスを作出して、その表現型への影響を解析する。

B. 研究方法

マウスとヒトの種間で保存されていて、これまでに最も解析が進んでいる $cp\alpha 3$ 遺伝子から順次ノックアウトマウス作成を試みる。 $cp\alpha 3$ 遺伝子はイントロンレス遺伝子であるので遺伝子全体を欠いたコンストラクトを作成し、ES細胞に導入し、相同組み換え体 (KO ES) を得る。KO ES を野生型マウス胚とキメラマウスを作成し、交配によりヘテロ個体を得る。さらに雌雄ヘテロ個体を交配させて、ホモのノックアウト個体を作出して、その表現型を解析する。

C. 研究結果

$cp\alpha 3$ 遺伝子はアクチンキャッピング蛋白質の精巣型アイソフォームをコードしており、半数体精子細胞から転写が始まるが、蛋白質は精子にも存在し、頭部後端に局在することが明らかとなった。この部分にはアクチン蛋白質も局在を示すことから、 $cp\alpha 3$ のノックアウト雄マウス精子は頭部形成に異常が現れる可能性が考えられる。 $cp\alpha 3$ 遺伝子はコーディ

ングが 900 塩基からなるが、全体を欠失したノックアウトコンストラクトの作成が完了した。現在、KO ES のクローニングが進行中である。

D. 考察

半数体特異的遺伝子にはイントロンレスが多く、また、イントロンを持つ遺伝子も全体のサイズが比較的小さい。これらは遺伝子そのものを完全に除いた変異を作ることが容易であることを示している。一方で、ヒトの病気を引き起こす遺伝的変異には圧倒的に点変異が多い。従って、遺伝子全体を除いた欠失変異による解析とともに、ヒトゲノムの SNPs から得られた情報をもとに点変異を導入した、遺伝子改変マウスの解析を進めたい。

E. 結論

半数体精子細胞特異的遺伝子の一つ Gsg3 のノックアウトコンストラクトを作成し、KO ES のスクリーニングを行った。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakanishi, T., Ikawa, M., **Yamada, S.**, Toshimori, K. and Okabe, M. (2001) Alkalinization of acrosome measured by GFP as a pH indicator and its relation to sperm capacitation. *Dev. Biol.* **237**, 222-231.
2. 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.

3. Bessho, Y., Sakata, R., Komatsu, S., Shiota, K., **Yamada, S.** and Kageyama, R. (2001) Dynamic expression and essential functions of Hes7 in somatic segmentation. *Genes Dev.* **15**, 2642-2647.

2. 学会発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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 のプロモーター領域 192bp は、双方向に転写調節を行う」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

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

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
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., Carvalho, C.E. and 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., Tanaka, H., Nozaki, M., Yomogida, K., Yasunaga, T. and Nishimune, Y.	Nested genomic structure of haploid germ cell specific haspin gene	Gene	267	49-54	2001
Takabayashi, S., Nozaki, M., Ishikawa, K. and Noguchi, M.	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	2001
Ikawa, M., Nakanishi, T., Yamada, S., Wada, I., Kominami, K., Tanaka, H., Nozaki, M., Nishimune, Y. and Okabe, M.	Calmegin is required for fertilin alpha/beta heterodimerization and sperm fertility.	Dev. Biol.	240	254-261	2001
Boettger-Tong, H. I., Rohozinski, J., Agoulnik, A. I., Dohmae, K., Nishimune, Y., Levy, N. and Bishop, C. E.	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	2001

Tohda, A., Matsumiya, K., Tadokoro, Y., Yomogida, K., Miyagawa, Y., Dohmae, K., Okuyama, A. and Nishimune, Y.	Testosterone suppresses spermatogenesis in juvenile spermatogonial depletion (jsd) mice.	Biol. Reprod.	65	532-537	2001
Tanaka, H., Koga, M., Yomogida, K., Iguchi, N., Nozaki, M., Nozaki, M., Onishi, M., de Carvalho CE., Nakamura, Y., Miyagawa, Y., Takeyama, M., Matsumiya, K., Okuyama, A. and Nishimune, Y.	Isolation and characterization of haploid germ cell-specific succinyl CoA: 3-oxo acid CoA transferase (scot-t1 and scot-t2).	Ancfology in the 21 st Century. Proc. Of VIth Int. Cong. Of Androl.		157-161	2002
Carvalho, C. E., Tanaka, H., Iguchi, N., Ventela, S., Nojima, H. and Nishimune, Y.	Molecular cloning and characterization of a complementary DNA encoding sperm tail protein SHIPPO1	Biol. Reprod.	66	785-795	2002
Doi, T., Morita, T., Wakabayashi, N., Sumi, T., Iwai, S., Amekawa, S., Sakuda, M. and Nishimune, Y.	Induction of instability of p34 (cdc2) expression by treatment with cisplatin (CDDP) in mouse teratocarcinoma F9 cells	Cancer Lett.	176	75-80	2002
Tohda, A., Okuno, T., Matsumiya, K., Okabe, M., Kishikawa, H., Dohmae, K., Okuyama, A. and Nishimune, Y.	Restration of spermatogenesis and fertilization in azoospermic mutant mice by suppression and relevation of testosterone followed by intracytoplasmic sperm injection	Biol. Reprod.	66	85-90	2002
Tanaka, H., Kohroki, J., Iguchi, N., Onishi, M. and 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
Miyagawa, Y., Tanaka, H., Iguchi, N., Kitamura, K., Nakamura, Y., Takahashi, T., Matsumiya, K., Okuyama, A. and Nishimune, Y.	Molecular cloning and characterization of the human orthologue of male germ cell-specific actin capping protein $\alpha 3$ (cp $\alpha 3$)	Mol. Hum. Reprod.		In press	2002

<p>Nakamura, Y., Tanaka, H., Koga, M., Miyagawa, Y., Iguchi, N., Carlos Egydio de Carvalho, Yomogida, K., Nozaki, M., Nojima, H., Matsumiya, K., Okuyama, A. and Nishimune, Y.</p>	<p>Molecular cloning and characterization of oppo1: A haploid germ cell-specific complementary DNA encoding sperm tail protein.</p>	<p>Biol. Reprod.</p>		<p>In press</p>	<p>2002</p>
<p>Fujii, T., Tamura, K., Kasai, K., Tanaka, H., Nishimune, Y. and Nojima, H.</p>	<p>Use of stepwise subtraction to comprehensively isolate mouse genes whose transcription is upregulated during spermiogenesis</p>	<p>EMBO Report</p>		<p>In press</p>	<p>2002</p>
<p>Iguchi, N., Tanaka, H., Nakamura, Y., Nozaki, M., Fujiwara, T. and Nishimune, Y.</p>	<p>Cloning and characterization of the human tektin-t gene</p>	<p>Mol. Hum. Reprod.</p>		<p>In press</p>	<p>2002</p>

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。

20010424

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