

厚生労働科学研究費補助金

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14年度 総括研究報告書

主任研究者 西宗義武

平成15（2003）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 西宗義武	3
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 奥山明彦	1 1
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 野崎正美	1 5
3. ヒト遺伝子のクローニングと遺伝子多型の解析 田中宏光	2 1
4. ノックアウトマウス作成 山田秀一	2 5
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	2 8
IV. 研究成果の刊行物・別刷	3 2

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遺伝子の特定及び、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 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

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

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

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・法則性を十分に理解し、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及び健常者における当該遺伝子の SNPs 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、シグナル伝達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61個の遺伝子の中で22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11個見られた。すなわち調べた限り全体の54%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高い。またエクソン数ばかりでなく、イントロンを含む転写単位のサイズを見るとゲノム上の

すべての遺伝子の平均が約 30kb と予想されているのに対し、10kb 足らずと非常に小さいことがわかった。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た。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 配列とイニシエーターを持つものが多かった。これらは、特徴的な基本転写制御を行っている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、その発現は体細胞ではメチル化されることで完全に抑制され、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にした。

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を確認した。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及び妊孕性確認対照群男性 DNA についての比較解析で Scot-t, Protamine 1, 2 の3遺伝子に不妊症に関連した 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十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ホオリパーゼ阻害剤は、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

Original Paper

1. 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.
2. **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.
3. 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.
4. Tohda, A., Okuno, T., Matsumiya, K., Okabe, M., Kishikawa, H., Dohmae, K., **Okuyama, A.** and **Nishimune, Y.** (2002) Restriction of spermatogenesis and fertility in azoospermic mutant mice by suppression and relevation of testosterone followed by intracytoplasmic sperm injection. *Biol. Reprod.* **66**, 85-90.
5. Miyagawa, Y., **Tanaka, H.**, Iguchi, N., Kitamura, K., Nakamura, Y., Takahashi, T., Matsumiya, K., **Okuyama, A.** and **Nishimune, Y.** (2002) Molecular Cloning and Characterization of the human orthologue of male germ cell-specific actin capping protein $\alpha 3$ (cp $\alpha 3$). *Mol Hum Reprod* **8**, 531-539.
6. Nakamura, Y., **Tanaka, H.**, Koga, M., Miyagawa, Y., Iguchi, N., Carlos Egidio de Carvalho, Yomogida, K., **Nozaki, M.**, Nojima, H., Matsumiya, K., **Okuyama, A.** and **Nishimune, Y.** (2002) Molecular Cloning and Characterization of oppo1: A Haploid Germ Cell-Specific Complementary DNA Encoding Sperm Tail Protein. *Biol Reprod* **67**, 1-7.
7. 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* **3**, 367-372.
8. 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.* **8**, 525-530.
9. Ike, A., Yamada, S., **Tanaka, H.**, **Nishimune, Y.** and **Nozaki, M.** (2002) Structure and promoter activity of the gene encoding ornithine decarboxylase antizyme expressed exclusively in haploid germ cells in testis (OAZt/Oaz3). *Gene* **298**, 183-193.
10. Tachibana, M., Sugimoto, K., **Nozaki, M.**, Ueda, J., Ohta, T., Ohki, M., Fukuda, M., Takeda, N., Niida, H., Kato, H. and Shinkai, Y. (2002) G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes Dev.* **16**, 1779-1791.
11. Tsujimoto, Y., Nonomura, N., Takayama, H., Yomogida, K., Nozawa, M., Nishimura, K., Okuyama, A., **Nozaki, M.** and Aozasa, K. (2002) Utility of immunohistochemical detection of prostate-specific Ets for the diagnosis of benign and malignant prostatic epithelial lesions. *Int. J. Urol.* **9**, 167-172.
12. Kawai, T., Suzuki, Y., Eda, S., Kase, T., Ohtani, K., Sakai, Y., Keshi, H., Fukuoh, A., Sakamoto, T., **Nozaki, M.**, Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Wakamiya, N. (2002) Molecular cloning of mouse collectin liver 1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 2134-2145.

13. Ozaki-Kkuroda, K., Nakanishi, H., Ohta, H., **Tanaka, H.**, Kurihara, H., Mueller, S., Irie, K., Ikeda, W., Sakai, T., Wimmer, E., **Nishimune, Y.** and Takai, Y. (2002) Nectin couples cell-cell adhesion and the actin scaffold at heterotypic testicular junctions. *Curr. Biol.* **12**, 1145-1150.
14. Tanaka, K., Tamura, H., **Tanaka, H.**, Katoh, M., Futamata, Y., Seki, N., **Nishimune, Y.** and Hara, T. (2002) Spermatogonia-dependent expression of testicular genes in mice. *Dev. Biol.* **246**, 466-479.
15. **Tanaka, H.**, **Nozaki, M.**, Yomogida, K. and **Nishimune, Y.** (2002) Testicular Tangram; Cloning and characterization of male germ-cell specific genes, F.F.G. Rommerts, K. J. Teerds, M. Springer-Verlag, 55-73.
16. **Tanaka, H.** and **Nishimune, Y.** (2002) Germ cells and genetic regulation of spermatogenesis. *Asian J. Androl.* **3**, 18-20.
17. Yomogida, K., Yagura, Y. and **Nishimune, Y.** (2002) Electroporated transgene-rescued spermatogenesis in infertile mutant mice with a Sertoli cell defect. *Biol. Reprod.* **67**, 712-717.
18. Sato, K., Yomogida, K., Wada, T., Yorihuzi, T., **Nishimune, Y.**, Hosokawa, N. and Nagata, K. (2002) Type XXVI collagen, a new member of the collagen family, is specifically expressed in the testis and ovary. *J. Biol. Chem.* **277**, 37678-37684.
19. Ventera, S., Ohta, H., Parvinen, M. and **Nishimune, Y.** (2002) Development of the stages of the cycle in mouse seminiferous epithelium after transplantation of green fluorescent protein-labeled spermatogonial stem cells. *Biol. Reprod.* **66**, 1422-1429.
20. Tadokoro, Y., Yomogida, K., Ohta, H., Tohda, A. and **Nishimune, Y.** (2002) Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF/FSH pathway. *Mech. Dev.* **113**, 29-39.
21. **Tanaka, H.**, Miyagawa, Y., Tsujimura, A., Matsumiya, K., **Okuyama, A.** and **Nishimune, Y.** (2003) Single nucleotide polymorphisms in the protamine-1 and -2 genes of fertile and infertile human male populations. *Mol. Hum. Reprod.* **9**, 1-5.
22. Kashiwaba, M., Katsura, K., Ohnishi, M., Sasaki, M., **Tanaka, H.**, **Nishimune, Y.**, Kobayashi, T. and Tamura, S. (2003) A novel protein phosphatase 2C family member (PP2Czeta) is able to associate with ubiquitin conjugating enzyme 9(1). *FEBS Lett* **538**, 197-202.
23. **Tanaka, H.**, Iguchi, N., Miyagawa, Y., Koga, M., Kohroki, J. and **Nishimune, Y.** (2003) Differential expression of succinyl CoA transferase (SCOT) genes in somatic and germ line cells of the mouse testis. *Int. J. Androl.* **26**, 52-56.
24. Tsuchida, J., Dohmae, K., Kitamura, Y. and **Nishimune, Y.** (2003) The role of the c-kit receptor in the regenerative differentiation of rat Leydig cells. *Int. J. Androl.* **26**, 121-125.
25. Ohta, H., Aizawa, S. and **Nishimune, Y.** (2003) Functional analysis of the p53 gene in apoptosis induced by heat stress or loss of stem cell factor signaling in mouse male germ cells. *Biol. Reprod.* In press

2. 学会発表

1. 宮川康、中村吉宏、高橋徹、松宮清美、奥山明彦、田中宏光、井口尚子、西宗義武「ヒト半数体精子細胞特異的 Actin Capping Protein $\alpha 3$ (Cp $\alpha 3$)遺伝子の単離と解析」第90回日本泌尿器科学会総会、2002年4月20日、東京

2. 高橋徹、田中宏光、陳、井口尚子、喜多村晃一、宮川康、野島博、松宮清美、奥山明彦、西宗義武 「マウス半数体精子細胞で特異的に発現する遺伝子 β -20 の解析」 第90回日本泌尿器科学会総会、2002年4月20日、東京

3. 中村吉宏、田中宏光、宮川康、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(β -501)の単離およびその解析2。」第90回日本泌尿器科学会総会、2002年4月20日、東京

4. **Hiromitsu Tanaka**, Naoko Iguchi, Hiroshi Ohta, Yasushi Miyagawa, **Shuichi Yamada**, **Yoshitake Nishimune** 12th European Workshop on Molecular and Cellular Endocrinology of the Testis. "Testicular Tangram". April, 2002 (Doorwerth, Netherlands). Identification and Analysis of Haploid Germ Cell-specific Bidirectional Promoter by Transgenic Mice.

5. 宮川康、田中宏光、井口尚子、喜多村晃一、松岡庸洋、高橋徹、中村吉宏、辻村晃、松宮清美、西宗義武、奥山明彦 「ヒト雄性生殖細胞特異的アクチンキャッピング蛋白アルファ3 : $cp\alpha 3$ 遺伝子の単離と解析」第21回日本アンドロロジー学会、2002年7月19日、高槻、大阪

6. 高橋徹、田中宏光、陳、井口尚子、喜多村晃一、宮川康、野島博、松宮清美、奥山明彦、西宗義武 「マウス半数体精子細胞で特異的に発現する遺伝子 β -20 の解析」 第21回日本アンドロロジー学会、2002年7月19日、高槻、大阪

7. 野崎正美 「精子形成の分子生物学」日本アンドロロジー学会第21回年会教育講演 2002年7月19日 高槻市高槻現代劇場

8. 久野瑞枝、山田秀一、田中宏光、西宗義武、野崎正美 「半数体精子細胞に特異的に発現する Tact 遺伝子の構造と発現制御機構」日本アンドロ

ロジー学会第21回年会 2002年7月19日 高槻市高槻現代劇場

9. 大西正剛、田中宏光、西宗義武、野崎正美 「半数体精子細胞特異的遺伝子 Scot-t のゲノム構造とその進化についての考察」日本アンドロロジー学会第21回年会 2002年7月19日 高槻市高槻現代劇場

10. 池晶子、山田秀一、田中宏光、西宗義武、野崎正美 「マウス半数体特異的 OAZt 遺伝子の構造と発現制御の解析」日本アンドロロジー学会第21回年会 2002年7月19日 高槻市高槻現代劇場

11. 池晶子、山田秀一、田中宏光、西宗義武、野崎正美 「マウス半数体特異的 OAZt 遺伝子の構造と発現制御の解析」日本アンドロロジー学会第21回年会 平成14年7月19日 高槻市高槻現代劇場

12. 田中宏光、井口尚子、大田浩、宮川康、山田秀一、西宗義武 「プロテインカイネース Haspin のプロモーター192bp は、双方向同時に半数体精子細胞特異的転写を誘導する」日本アンドロロジー学会 第21回学術大会 2002年7月

13. 宮川康、田中宏光、井口尚子、喜多村晃一、松岡庸洋、高橋徹、中村吉宏、辻村晃、松宮清美、西宗義武、奥山明彦 「ヒト雄性生殖細胞特異的アクチンキャッピング蛋白アルファ3 : $cp\alpha 3$ 遺伝子の単離と解析」第47回日本不妊学会、2002年10月2-4日、岐阜

14. **M. Nozaki**, M. Hisano, A. Ike, M. Onishi, P. Sombontham, S. Yamada, **H. Tanaka**, H. Ohta, **Y. Nishimune**. Unique structural features and promoter activity of genes exclusively expressed in testicular germ cells. Cold Spring Harbor Meeting, Germ Cells, October 9-13, 2002. Cold Spring Harbor, NY.

15. M. Hisano, H. Ohta, **S. Yamada, H. Tanaka, Y. Nishimune** and **M. Nozaki**. Testis haploid germ cell-specific Tact1 transcription is regulated by CpG methylation of its coding region. Cold Spring Harbor Meeting, Germ Cells, October 9-13, 2002. Cold Spring Harbor, NY.

16. **野崎正美**「生命の設計図を守る～生殖細胞の謎とその病気」大阪大学薬学部公開講座「新時代の薬学」平成14年10月26日 大阪大学コンベンションセンター

17. **野崎正美** 「精子形成調節遺伝子群の包括的解析」生殖内分泌学会 シンポジウム「性腺の自立性」平成14年12月5日 千里ライフサイエンスセンター大阪府吹田市

18. 立花誠、杉本憲治、**野崎正美**、上田潤、福田幹子、太田力、大木操、竹田直樹、丹伊田浩行、加藤宏幸、真貝洋一「哺乳類ヒストンメチル化酵素、G9a 欠損マウスの表現系解析」第25回日本分子生物学会シンポジウム「エピジェネティクスと個体発生」平成14年12月11～14日 パシフィコ横浜

19. 大西正剛、安永照雄、**田中宏光**、**西宗義武**、**野崎正美**「半数体精子細胞特異的遺伝子 Scot-t のゲノム構造とその進化について」第25回日本分子生物学会平成14年12月11～14日 パシフィコ横浜

20. 小南勝也、**野崎正美**、真鍋昇、上野直人、米原伸、酒巻和宏「アフリカツメガエル spase-10' 遺伝子と Bid 遺伝子の単離と機能解析」第25回日本分子生物学会 平成14年12月11～14日 パシフィコ横浜

21. 久野瑞枝、大田浩、**山田秀一**、**田中宏光**、**西宗義武**、**野崎正美**「精巣生殖細胞特異的 Tact1

遺伝子の発現制御機構と CpG メチル化」第25回日本分子生物学会 平成14年12月11～14日 パシフィコ横浜

22. 池晶子、大田浩、**山田秀一**、**田中宏光**、**西宗義武**、**野崎正美**「マウス半数体精子細胞特異的 OAZt 遺伝子の発現制御機構」第25回日本分子生物学会 平成14年12月11～14日 パシフィコ横浜

23. 山崎裕自、久保田広志、**野崎正美**、永田和宏「細胞質シャペロン CCT シータサブユニットをコードする遺伝子 Cctq の Ets ファミリータンパク質 Elk-1, Sap-1a, Net による転写制御」第25回日本分子生物学会 平成14年12月11～14日 パシフィコ横浜

24. 青戸守、佐原節子、**野崎正美**、伊川正人、岡部勝、辻本賀英「Acinus 欠損マウスの解析」第25回日本分子生物学会 平成14年12月11～14日 パシフィコ横浜

25. **野崎正美**、池晶子、大西正剛、久野瑞枝、Pranee Somboontham、**山田秀一**、大田浩、蓬田健太郎、**田中宏光**、**西宗義武**「マウス精子形成関連遺伝子群の構造と発現制御の特徴」第25回日本分子生物学会 平成14年12月11～14日 パシフィコ横浜

26. **田中宏光**、宮川康、辻村晃、松宮清美、**奥山明彦**、**西宗義武** 「ヒト Protaamine-1,-2 遺伝子の SNPs の解析」第25回日本分子生物学会 2002年12月

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定)

特許出願準備中 (1件)

1. 「精子形成遺伝子を用いた診断システム」特願 2002-36649 (出願中)
西宗義武・田中宏光・野崎正美

法」特願2002-381241 (出願中)

2. 「男性不妊関連遺伝子変異と男性不妊の診断方

西宗義武・田中宏光・野崎正美

厚生労働科学研究費補助金（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、本年度は新規の遺伝子につき、さらにこれを進め、またヒトオーソログ遺伝子についても解析を進めている。さらにこれらの遺伝子のゲノムシーケンス解析を男性不妊症の臨床検体にて行った。精子細胞特異的遺伝子 β -20 は核移行シグナルやホメオボックスドメインを有する新規の遺伝子であり、そのタンパク質は円形精子細胞の核に特異的に存在しており、転写調節因子の可能性が考えられた。male germ cell-specific actin capping protein α 3 (CP α 3) は精子構造や精子形成過程に重要な役割を演じているものと考えられ、男性不妊症患者ではその翻訳領域に有為な変異は認められなかった。しかしながら protamine-1, 2 の解析では無精子症の一例に変異を認め、これが男性不妊症を引き起こすことが推測された。今後さらに臨床検体、ヒト男性不妊症での検討を進めることにより、男性不妊症の診断法ならびに治療法に画期的なインパクトを与えようと考えられた。

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) 半数体精細胞特異的 cDNA (β -20)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日齢のマウス精巢 cDNA ライブラリーから半数体精子細胞分化のまだ見られていない17日齢の精巢 mRNA を差し引いたサブトラクテッドライブラリー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 β -20 は、その一次構造解析から、核移行シグナルやホメオボックスドメインを有する新規遺伝子であった。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トイング、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タンパク質を作成し、うさぎに免疫して抗体を作成し、ウエスタンブロットイング、免疫組織染色を行い、 β -20 遺伝子産物の解析を行った。

2) 日本人の男性不妊症患者における半数体特

異的遺伝子のゲノムシーケンス解析

非閉塞性無精子症や高度乏精子症（精子濃度 500 万/ml 以下）の患者約 250 名と妊孕力正常コントロールのボランティア男性約 250 名につき、その全血からフェノール・クロロフォルム法にてゲノム DNA を抽出した。先に我々が初めてクローニングし報告したヒト cp α 3 (hcp α 3) ゲノムのシーケンスからプライマーを設定し Open reading frame (ORF) を PCR で増幅し、これをダイレクトシーケンス法にて塩基配列を決定し、不妊群と正常群で比較検討した。

Protamine は精子核内でヒストンと置換されることにより DNA の濃縮に重要な役割を果たすとされ、不妊患者の一部にはその発現の障害がみられるとの報告もある。すでに報告されているヒト Protamine-1, 2 遺伝子 (Demenjoud et al. 1990) のゲノムシーケンスからプライマーを設定し、同様に不妊群と正常群でシーケンスの比較を行った。

C. 研究成果

1) β -20 cDNA は全長約 3kb で 89kDa のタンパク質をコードし、その発現は精巣特异的であった。また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、タンパク質は円形精子細胞の核に特異的局在することが明らかとなった。

2) ヒト cp α 3 ゲノム遺伝子のシーケンス解析から正常群の一例にサイレント SNP を一カ所認めたものの、不妊群特異的な ORF 内の変異や SNPs は見られなかった。また Protamine-1 遺伝子のコーディング領域には 4

カ所のサイレント SNPs を認めた。また 3' の非翻訳領域に一カ所の SNP を認めた。しかしこれらはいずれもアミノ酸配列を変異させるものではなく、また不妊群と正常群で頻度に差は認められなかった。Protamine-2 遺伝子では不妊群と正常群で頻度に差のないイントロン領域の二カ所の SNPs を認めた。しかし無精子症の一例にコーディング内に translation termination を引き起こすナンセンス変異を認めた。

D. 考察

1) 半数体精子細胞における遺伝子発現の調節機構はいまだ明確となっていない。これを明らかにすることは精子形成の基本メカニズムを解明するのみならず、不妊症の新たな原因の解明につながることは疑いない。実際、半数体精子細胞に特異的に発現する転写因子や poly(A) polymerase のノックアウトマウスの表現型は精子形成障害をきたす雄性不妊である。我々が今回、単離・解析した b-20 は新規の半数体精子細胞特異的転写因子である可能性があり、さらにこのタンパク質の解析を進めることは精子形成機構の根幹の一部を明らかにすることとなると考えられる。今後ノックアウトマウスの作成や不妊患者での変異や発現障害の解析を行っていく予定である。

2) 男性不妊症の主たる原因の一つである特発性精子形成障害は様々な原因が想定され、特に様々な遺伝的因子が報告されているが、その意義についての議論はつきない。今回我々が解析した cp α 3 や protamine 遺伝子

においてもその遺伝子の重要性からか有意と認められる変異はほとんど見られなかった。しかし protamine-2 に変異を認め、これが translational termination を引き起こす可能性のある一例が無精子症患者に見つかったことは、Protamine-2 のノックアウトマウスの表現型との一致をみることから、きわめて興味深いものと考えられた。

我々はさらに数多くの半数体精子細胞の不妊症患者における解析を進めており、ある種の遺伝子では不妊症患者に特異的な変異を見出している。さらに解析を続け不妊症患者の診断治療に応用したい。

E. 結論

新規のマウス精巣特異的遺伝子 β -20 の単離と機能解析を行った。男性不妊症患者における cp α 3 と protamine のゲノムシーケンス解析を行い、これらの遺伝子の変異の少なさからその重要性が確認された。また protamine-2 遺伝子は不妊の原因遺伝子となる可能性が考えられた。

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. Miyagawa, Y., Tanaka, H., Iguchi, N.,

Kitamura, K., Nakamura, Y., Takahashi, T., Matsumiya, K., **Okuyama, A.** and Nishimune, Y. (2002) Molecular cloning and characterization of the human orthologue of male germ cell-specific actin capping protein α 3 (cp α 3). *Mol Hum Reprod* **8**, 531-539.

2. 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. (2002) Molecular cloning and characterization of oppo1: A Haploid Germ Cell-Specific Complementary DNA Encoding Sperm Tail Protein. *Biol Reprod* **67**, 1-7.

3. Tanaka, H., Miyagawa, Y., Tsujimura, A., Matsumiya, K., **Okuyama, A.** and Nishimune, Y. (2003) Single nucleotide polymorphisms in the protamine-1 and -2 genes of fertile and infertile human male populations. *Mol. Hum. Reprod.* **9**, 1-5.

2. 学会発表

1. 宮川康、中村吉宏、高橋徹、松宮清美、奥山明彦、田中宏光、井口尚子、西宗義武、「ヒト半数体精子細胞特異的 Actin Capping Protein α 3 (Cpa3) 遺伝子の単離と解析」 第90回日本泌尿器科学会総会、2002年4月20日、東京

2. 高橋徹、田中宏光、陳、井口尚子、喜多

村晃一、宮川康、野島博、松宮清美、奥山明彦、西宗義武 「マウス半数体精子細胞で特異的に発現する遺伝子β-20の解析」 第90回日本泌尿器科学会総会、2002年4月20日、東京

3. 中村吉宏、田中宏光、宮川康、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(β-501)の単離およびその解析2。」 第90回日本泌尿器科学会総会、2002年4月20日、東京

4. 宮川康、田中宏光、井口尚子、喜多村晃一、松岡庸洋、高橋徹、中村吉宏、辻村晃、松宮清美、西宗義武、奥山明彦 「ヒト雄性生殖細胞特異的アクチンキャッピング蛋白アルファ3 : cpα3 遺伝子の単離と解析」 第21回日本アンドロロジー学会、2002年7月19日、高槻、大阪

5. 高橋徹、田中宏光、陳、井口尚子、喜多村晃一、宮川康、野島博、松宮清美、奥山明彦、西宗義武 「マウス半数体精子細胞で特異的に発現する遺伝子β-20の解析」 第21回日本アンドロロジー学会、2002年7月19日、高槻、大阪

6. 宮川康、田中宏光、井口尚子、喜多村晃一、松岡庸洋、高橋徹、中村吉宏、辻村晃、松宮清美、西宗義武、奥山明彦 「ヒト雄性生殖細胞特異的アクチンキャッピング蛋白アルファ3 : cpα3 遺伝子の単離と解析」 第4

7回日本不妊学会、2002年10月2-4日、岐阜

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14年度は精子形成後期過程で特異的に発現する遺伝子について、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61個の遺伝子について構造を決定したところ、22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ほとんどがヒトにも存在することから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ものがあることを明らかにした。さらに、プロモーター構造に特徴を持ち基本転写自体が、特異的であ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遺伝子の塩基配列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活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 *in 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ーションおよび、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も調べた。

C. 研究結果

平成14年度においては、61個の半数体精細胞特異的発現をする遺伝子の構造を解析した。そのうち22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ー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lementとイニシエーター (Inr) が高頻度で見られた。これらのElementを用いてゲルシフト法により結合タンパク質の解析を行った。その結果、精巣特異的な結合因子が制御に関与する可能性が示された。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。多くのイントロンレス遺伝子はイントロンを持つパラログとアイソフォームの関係にあり、かつ種を越えて、比較的構造が保存されていた。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。半数体精子細胞は2週間かけて精子形態形成を行うが、遺伝子発現は初期にしか起こらない。長期にわたる細胞活性維持には一過的な高レベルの転写が必要である。転写はエネルギーを大量に要求するので、サイズの小さい遺伝子はそれだけ活発に転写できることになる。遺伝子発現の特異性及び、高い活性制御には上流プロモーターが重要であるが、そのために、精巣特異的因子と特異的エレメントの組み合わせの重要性が示唆された。今後、結合因子の同定により、特異的制御機構の全容解明が期待される。イントロンレス遺伝子は、遺伝子内部に CpG を多数持ち、体細胞では DNA の高度メチル化により、ヒストンの修飾が変化して、転写が抑制される。一方、精子形成過程では脱メチル化されて、転写可能な状態になる。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-Azacytidine 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. M. Hisano, S. Yamada, H. Tanaka, Y. Nishimune and **M. Nozaki** (2003) Genomic structure and promoter activity of the testis haploid germ cell-specific intronless genes, Tact1 and Tact2. *Mol. Reprod. Dev.* **In press**
2. A. Ike, S. Yamada, H. Tanaka, Y. Nishimune and **M. Nozaki** (2002) Structure and promoter activity of the gene encoding ornithine decarboxylase antizyme expressed exclusively in haploid germ cells in testis

(OAZt/Oaz3). *Gene* **298**, 183-193.

3. Y. Nakamura, H. Tanaka, M. Koga, Y. Miyagawa, N. Iguchi, C. Carvalho, K. Yomogida, **M. Nozaki**, H. Nojima, K. Matsumiya, A. Okuyama and Y. Nishimune (2002) Molecular cloning and characterization of oppo1: A haploid germ cell-specific complementary DNA encoding sperm tail protein. *Biol. Reprod.* **67**, 1-7.

4. N. Iguchi, H. Tanaka, Y. Nakamura, **M. Nozaki**, T. Fujiwara and Y. Nishimune (2002) Cloning and characterization of the human tektin-t gene. *Mol. Hum. Reprod.* **8**, 525-530.

5. M. Tachibana, K. Sugimoto, **M. Nozaki**, J. Ueda, T. Ohta, M. Ohki, M. Fukuda, N. Takeda, H. Niida, H. Kato and Y. Shinkai (2002) G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes Dev.* **16**, 1779-1791.

6. Y. Tsujimoto, N. Nonomura, H. Takayama, K. Yomogida, M. Nozawa, K. Nishimura, A. Okuyama, **M. Nozaki** and K. Aozasa (2002) Utility of immunohistochemical detection of prostate-specific Ets for the diagnosis of benign and malignant prostatic epithelial lesions. *Int. J. Urol.* **9**, 167-172.

7. T. Kawai, Y. Suzuki, S. Eda, T. Kase, K. Ohtani, Y. Sakai, H. Keshi, A. Fukuoh, T. Sakamoto, **M. Nozaki**, N. G. Copeland, N. A. Jenkins and N. Wakamiya (2002) Molecular cloning of mouse collectin liver 1. *Biosci.*

Biotechnol. Biochem. **66**, 2134-2145.

2.学会発表

1. **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

2. **野崎正美** 「精子形成の分子生物学」日本アンドロロジー学会第21回年会教育講演 平成14年7月19日 高槻市高槻現代劇場

3. 久野瑞枝、山田秀一、田中宏光、西宗義武、**野崎正美** 「半数体精子細胞に特異的に発現する Tact 遺伝子の構造と発現制御機構」日本アンドロロジー学会第21回年会 平成14年7月19日 高槻市高槻現代劇場

4. 大西正剛、田中宏光、西宗義武、**野崎正美** 「半数体精子細胞特異的遺伝子 Scot-t のゲノム構造とその進化についての考察」日本アンドロロジー学会第21回年会 平成14年7月19日 高槻市高槻現代劇場

5. 池晶子、山田秀一、田中宏光、西宗義武、**野崎正美** 「マウス半数体特異的 OAZt 遺伝子の構造と発現制御の解析」日本アンドロロジー学会第21回年会 平成14年7月19日 高槻市高槻現代劇場

6. **M. Nozaki**, M. Hisano, A. Ike, M. Onishi, P. Somboontham, S. Yamada, H. Tanaka, H. Ohta, Y. Nishimune. Unique

structural features and promoter activity of genes exclusively expressed in testicular germ cells. Cold Spring Harbor Meeting, Germ Cells, October 9-13, 2002. Cold Spring Harbor, NY.

7. M. Hisano, H. Ohta, S. Yamada, H. Tanaka, Y. Nishimune and **M. Nozaki**. Testis haploid germ cell-specific Tact1 transcription is regulated by CpG methylation of its coding region. Cold Spring Harbor Meeting, Germ Cells, October 9-13, 2002. Cold Spring Harbor, NY.

8. **野崎正美**「生命の設計図を守る～生殖細胞の謎とその病気」大阪大学薬学部公開講座「新時代の薬学」平成14年10月26日 大阪大学コンベンションセンター

9. **野崎正美**「精子形成調節遺伝子群の包括的解析」生殖内分泌学会 シンポジウム「性腺の自立性」平成14年12月5日 千里ライフサイエンスセンター大阪府吹田市

10. 立花誠、杉本憲治、**野崎正美**、上田潤、福田幹子、太田力、大木操、竹田直樹、丹伊田浩行、加藤宏幸、真貝洋一「哺乳類ヒストンメチル化酵素、G9a 欠損マウスの表現系解析」第25回日本分子生物学会シンポジウム「エピジェネティクスと個体発生」平成14年12月11～14日 パシフィコ横浜

11. 大西正剛、安永照雄、田中宏光、西宗義武、**野崎正美**「半数体精子細胞特

異的遺伝子 Scot-t のゲノム構造とその進化について」第25回日本分子生物学会平成14年12月11～14日 パシフィコ横浜

12. 小南勝也、**野崎正美**、真鍋昇、上野直人、米原伸、酒巻和宏「アフリカツメガエル spase-10' 遺伝子と Bid 遺伝子の単離と機能解析」第25回日本分子生物学会 平成14年12月11～14日 パシフィコ横浜

13. 久野瑞枝、大田浩、山田秀一、田中宏光、西宗義武、**野崎正美**「精巣生殖細胞特異的 Tact1 遺伝子の発現制御機構と CpG メチル化」第25回日本分子生物学会 平成14年12月11～14日 パシフィコ横浜

14. 池晶子、大田浩、山田秀一、田中宏光、西宗義武、**野崎正美**「マウス半数体精子細胞特異的 OAZt 遺伝子の発現制御機構」第25回日本分子生物学会 平成14年12月11～14日 パシフィコ横浜

15. 山崎裕自、久保田広志、**野崎正美**、永田和宏「細胞質シャペロン CCT シータサブユニットをコードする遺伝子 Cctq の Ets ファミリータンパク質 Elk-1, Sap-1a, Net による転写制御」第25回日本分子生物学会 平成14年12月11～14日 パシフィコ横浜

16. 青戸守、佐原節子、**野崎正美**、伊川正人、岡部勝、辻本賀英「Acinus 欠損マウスの解析」第25回日本分子生物学

会 平成14年12月11～14日 パ
シフィコ横浜

17. 野崎正美、池晶子、大西正剛、久
野瑞枝、Pranee Somboontham、山田秀一、
大田浩、蓬田健太郎、田中宏光、西宗義
武「マウス精子形成関連遺伝子群の構造
と発現制御の特徴」第25回日本分子生
物学会 平成14年12月11～14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

「精子形成遺伝子を用いた診断システム」

特願2002-36649 (出願中)

「男性不妊関連遺伝子変異と男性不妊症の
診断方法」

特願2002-381241 (出願中)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし