

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15年度 総括研究報告書

主任研究者 西宗義武

平成16(2004)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	10
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	14
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	19
4. ノックアウトマウス作成 山田秀一	23
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	26
IV. 研究成果の刊行物・別刷	30

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田中と山田が行う。さらに分担者の奥山と田中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長期に渡り機能する唯一の半数体細胞である、精子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、ゲノムメチル化解析により調べた。また、精子形成および受精に関与すると考えられる

遺伝子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指針（平成13年3月29日 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）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をクローニングし、それらにコードされる蛋白質構造や生化学的特徴の解析を行った。今年度、新たに解析を行ったものは、精子核に局在し転写に関与するもの (Rosbin)、核構造に関与するもの (Sprin)、ミトコンドリアに存在し、その形態形成に関与するもの (Spergen-1)、受精時の先体反応に関与するもの (Haprin) などであり、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。次に、Haspin, Tektin-t, Hanp1, Rosbin, Hils1, Gsg3 の6個の遺伝子について、ノックアウトマウスを作成した。表現型の解析の進んだものは、いずれも雄性不妊を示し、雄性生殖細胞に重要な役割を果たすことが明らかとなった。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。次にすべての遺伝子の構造解析を行ったところ、全体の54%がイントロンを持たないかあるいは一個しか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、イントロンを含む

転写単位の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) を持たず、CRE 配列を持つものが多かった。そして CRE 配列には、精巣半数体精子細胞特異的転写因子である CREMtau が結合し、それとともに雄性生殖細胞に特徴的な基本転写制御が関与する可能性が示唆された。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、マウスと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 16 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-1, 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三つの遺伝子について機能を明らかにし、それらを含

み 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全体を網羅するに十分な成果が得られたとは言えない。しかし得られたノックアウトマウスの解析結果はこれらの遺伝子が精子機能に重要な役割を果たすことを示しており、これらは重要な男性不妊症モデルマウスとなるであろう。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. **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**, 69-73.

2. 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.

3. **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.

4. 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.

5. 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.* **68**, 2249-2254.

6. **Tanaka, H.**, Iguchi, N., Egydio de Carvalho, C., Tadokoro, Y., Yomogida, K. and **Nishimune, Y.** (2003)

Novel actin-like proteins T-ACTIN1 and T-ACTIN2 are differentially expressed in the cytoplasm and nucleus of mouse haploid germ cells *Biol. Reprod.* **69**, 475-482.

7. Hisano, M., Yamada, S., **Tanaka, H.**, **Nishimune, Y.** and **Nozaki, M.** (2003) Genomic structure and promoter activity of the testis haploid germ cell-specific intronless genes, Tact1 and Tact2. *Mol. Reprod. Dev.* **65**, 148-156.

8. Kitamura, K., Miyagawa, Y., Iguchi, N., Nishimura, H., **Tanaka, H.** and **Nishimune, Y.** (2003) Molecular cloning and characterization of the human orthologue of the oppo1 gene encoding a sperm tail protein. *Mol. Hum. Reprod.* **9**, 237-243.

9. Sakata, S., Sakamaki, K., Watanabe, K., Nakamura, N., Toyokuni, S., **Nishimune, Y.**, Mori, C. and Yonehara, S. (2003) Involvement of death receptor Fas in germ cell degeneration in gonads of Kit-deficient Wv/Wv mutant mice. *Cell Death Differ.* **10**, 676-686.

10. Tadokoro, Y., Yomogida, K., Yagura, Y., **Yamada, S.**, Okabe, M. and **Nishimune, Y.** (2003) Characterization of histone H2A.X expression in testis and specific labeling of germ cells at the commitment stage of meiosis with histone H2A.X promoter-enhanced green fluorescent protein transgene. *Biol. Reprod.* **69**, 1325-1329.

11. Yomogida, K., Yagura, Y., Tadokoro, Y. and **Nishimune, Y.** (2003) Dramatic expansion of germinal stem cells by ectopically expressed human glial cell line-derived neurotrophic factor in mouse Sertoli cells. *Biol. Reprod.* **69**, 1303-1307.

12. Ohta, H., Tohda, A. and **Nishimune, Y.** (2003) Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells in the W/Wv mutant mouse testis. *Biol. Reprod.* **69**, 1815-1821.

13. Hisano, M., Ohta, H., **Nishimune, Y.** and **Nozaki, M.** (2003) Methylation of CpG dinucleotides in the open reading frame of a testicular germ cell-specific intronless gene, Tact1/Actl7b, represses its expression in somatic cells. *Nucleic Acids Res.* **31**, 4797-4804.
14. Kitamura, K., **Tanaka, H.** and **Nishimune, Y.** (2003) Haprin, a novel haploid germ cell-specific RING finger protein involved in the acrosome reaction. *J. Biol. Chem.* **278**, 4417-4423.
15. Tani, H., Limn, C. K., Yap, C. C., Onishi, M., **Nozaki, M.**, **Nishimune, Y.**, Okahashi, N., Kitagawa, Y., Watanabe, R., Mochizuki, R., Moriishi, K. and Matsuura, Y. (2003) In vitro and in vivo gene delivery by recombinant baculoviruses. *J. Virol.* **77**, 9799-9808.
16. Iguchi, N., **Tanaka, H.**, Yomogida, K. and **Nishimune, Y.** (2003) Isolation and characterization of a novel cDNA encoding a DNA-binding protein (Hils1) specifically expressed in testicular haploid germ cells. *Int. J. Androl.* **26**, 354-365.
17. Yamazaki, Y., Kubota, H., **Nozaki, M.** and Nagata, K. (2003) Transcriptional regulation of the cytosolic chaperonin q subunit gene, Cctq, by Ets domain transcription factors Elk-1, Sap-1a, and Net in the absence of serum response factor. *J. Biol. Chem.* **278**, 30642-30651.
18. Ohta, H., Wakayama, T. and **Nishimune, Y.** (2004) Commitment of fetal male germ cells to spermatogonial stem cells during mouse embryonic development. *Biol. Reprod.* in press.
19. Iguchi, N., **Tanaka, H.**, Yamada, S., Nishimura, H. and **Nishimune, Y.** (2004) Control of mouse hils1 gene expression during spermatogenesis: Identification of regulatory element by transgenic mice. *Biol. Reprod.* in press.
20. Takahashi, T., **Tanaka, H.**, Iguchi, N., Kitamura, K., Chen, Y., Maekawa, M., Nishimura, H., Ohta, H., Miyagawa, Y., Matsumiya, A., **Okuyama, A.** and **Nishimune, Y.** (2004) in press.
21. Hubu, T., Wakabayashi, N., Yoshida, K., Yomogida, K., **Nishimune, Y.** and Morita, T. (2004) p53 protein interacts specifically with the meiosis-specific mammalian RecA-like protein DMC1 in meiosis. *Carcinogenesis.* in press.
22. Ike, A., Ohta, H., Onishi, M., Iguchi, N., **Nishimune, Y.** and **Nozaki, M.** (2004) Transient expression analysis of the mouse ornithine decarboxylase antizyme haploid-specific promoter using in vivo electroporation. *FEBS Lett.* **559**, 159-164.
23. Onishi, M., Yasunaga, T., **Tanaka, H.**, **Nishimune, Y.** and **Nozaki, M.** (2004) Gene structure and evolution of testicular haploid germ cell-specific genes, Oxct2a and Oxct2b. *Genomics*, **83**, 647-657.
24. Matsuoka, Y., Iguchi, N., Kitamura, K., Manabe, H., Miyagawa, Y., Koga, M., Matsumiya, K., **Okuyama, A.**, **Tanaka, H.** and **Nishimune, Y.** (2004) Cloning and characterization of a mouse spergen-1 localized in sperm mitochondria. *Int. J. Androl.* in press
25. **Tanaka, H.**, Takahashi, T., Iguchi, N., Kitamura, K., Miyagawa, Y., Tsujimura, A., Matsumiya, K., **Okuyama, A.** and **Nishimune, Y.** (2004) Ketone bodies could support hyperactivation motility but not the acrosome reaction of mouse sperm. *Int. J. Androl.* in press

## 2. 学会発表

1. 宮川康、松岡庸洋、高橋徹、高尾徹也、古賀実、辻村晃、松宮清美、井口尚子、**田中宏光**、**西宗義武**、**奥山明彦** 「体細胞および精巢生殖細胞におけ

る Succinyl CoA transferase (SCOT) gene の特異的発現」第回日本アンドロロジー学会、2003 年 7 月、広島市

2. 辻村晃、松岡庸洋、高橋徹、高尾徹也、宮川康、松宮清美、田中宏光、西宗義武、奥山明彦 「男性不妊患者における Protamine gene の SNP 解析」第回日本アンドロロジー学会、2003 年 7 月、広島市

3. Hisano, M., Ohta, H., Yamada, S., **Tanaka, H.**, **Nishimune, Y.** and **Nozaki, M.** Testis haploid germ cell-specific Tact1 transcription is regulated by CpG methylation on its coding region. The 5<sup>th</sup> EMBL Mouse Molecular Genetics Meeting 2003 年 9 月 Heiderberg

4. Nozaki, M., Hisano, M., Ike, A., Onishi, M., Pranee, S., Yamada, S., **Tanaka, H.**, Ohta, H. and **Nishimune Y.** Structural feature and promoter activity of genes exclusively expressed in testicular germ cells. The 5<sup>th</sup> EMBL Mouse Molecular Genetics Meeting 2003 年 9 月 Heiderberg

5. Onishi, M., Yasunaga, T., **Tanaka, H.**, **Nishimune, Y.** and **Nozaki, M.** Evolution of testis specific Scot-t genes, functional retrotransposons generated from somatic tissue-type paralog. The 5<sup>th</sup> EMBL Mouse Molecular Genetics Meeting 2003 年 9 月 Heiderberg

6. 田中宏光 「精子形成遺伝子群の単離とその解析」第 20 回日本疾患モデル学会、2003 年 11 月、大阪

7. 池晶子、大田浩、山田秀一、大西正剛、西宗義武、野崎正美 「マウス OAZt 遺伝子における半数体精子細胞特異的発現制御」第 20 回日本疾患モデル学会 2003 年 11 月 大阪

8. Pranee Somboonthum, Hiroshi Ohta, **Shuichi**

**Yamada, Masayoshi Onishi, Akiko Ike, Yoshitake Nishimune and Masami Nozaki** Analysis of molecular mechanism controlling testis-specific transcription of the Scot-t2 gene. 第 20 回日本疾患モデル学会 2003 年 11 月 大阪

9. 久野瑞枝、大田浩、山田秀一、田中宏光、西宗義武、野崎正美 「精巢生殖細胞特異的 Tact 遺伝子の発現制御機構と CpG メチル化」第 20 回日本疾患モデル学会 2003 年 11 月 大阪

10. 前田奈緒子、土田順二、田中宏光、西宗義武 「半数体精子細胞特異的カイネース Haspin の解析」第 20 回日本疾患モデル学会 2003 年 11 月 大阪

11. 喜多村晃一、田中宏光、西宗義武 「新規半数体精子細胞特異的タンパク質 Haprin の先体反応における役割」第 20 回日本疾患モデル学会 2003 年 11 月 大阪

12. 高橋徹、田中宏光、井口尚子、喜多村晃一、宮川康、辻村晃、松宮清美、奥山明彦、西宗義武 「ケトン体による精子機能の活性化」第 20 回日本疾患モデル学会 2003 年 11 月 大阪学会

13. 田中宏光、井口尚子、西宗義武 「精子鞭毛蛋白質 Tektin-t のノックアウトマウスの解析」第 20 回日本疾患モデル学会 2003 年 11 月 大阪

14. 永森一平、藪田紀一、田中宏光、蓬田健太郎、西宗義武、野島博 「半数体精子細胞特異的発現を示す新規 CREM ホモログ TISP40 $\alpha/\beta$  の機能解析」第 26 回日本分子生物学会 2003 年 12 月 神戸

15. 久野瑞枝、大田浩、大西正剛、西宗義武、野崎正美 「精子形成関連遺伝子発現のエピジェネティック制御」第 26 回日本分子生物学会 2003 年 12 月 神戸



16. 前田奈緒子、土田順二、田中宏光、西宗義武「半数体精子細胞特異的カイネース Haspin の解析」第26回日本分子生物学会 2003年12月 神戸

17. Pranee, S., Ohta, H., Yamada, S., Onishi, M., Ike, A., Nishimune, Y. and Nozaki, M. Analysis of molecular mechanism controlling testis-specific transcription of the Scot-t2 gene. 第26回日本分子生物学会 2003年12月 神戸

18. 池晶子、大田浩、山田秀一、大西正剛、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26回日本分子生物学会 2003年12月 神戸

19. 喜多村晃一、田中宏光、西宗義武「新規 RING finger タンパク質 Haprin の先体反応における役割」第26回日本分子生物学会 2003年12月 神戸

20. 田所優子、蘆田健太郎、西宗義武「哺乳類雄性生殖幹細胞による組織再生機構の解析」第26回日本分子生物学会 2003年12月 神戸

21. 曾根岳史、堀田純子、田中宏光、Amy, S. O'Bryan, M., 八幡一英、佐々木ゆかり、吉田尚平、de Kretser, D., 西宗義武、今本文男「複数種 cDNA をもつ msGW タンデム構造クローンを用いた複数種タンパク質の細胞の同時産生」第26回日本分子

22. 日出間志寿、松田崇、野島博、西宗義武、西森克彦「Zyxin family タンパク質 Limd1 とスプライシングバリエント TISP5 の細胞内局在の解析」第26回日本分子生物学会 2003年12月 神戸

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定）

##### 特許出願中（5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

2. 「男性不妊関連遺伝子変異と男性不妊の診断方法」特願2002-381241（出願中）  
西宗義武・田中宏光・野崎正美

3. 「精子特異的蛋白質 TISP40 とその用途」特願2003-124424（出願中）  
野島博・藤井孝之・田中宏光・西宗義武

4. 「マウス精子形成遺伝子とヒト男性不妊関連遺伝子、ならびにこれらを用いた診断システム」PCT/JP03/01572  
西宗義武・田中宏光・野崎正美

5. 「精子活性化剤および精子不活性化剤」特願2004-034808  
西宗義武・田中宏光

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。昨年度に引き続き、新規の半数体精子細胞特異的遺伝子 Rosbin, Spergen-1, Sprin を同定し遺伝子産物の解析を行った。Rosbin タンパク質は核移行シグナルや homeobox domain を有する新規の遺伝子であり、その蛋白質は円形精子細胞の核に特異的に存在していることから、転写調節因子の可能性が考えられた。Spergen-1 は、精子ミトコンドリアに局在する構造タンパク質であること、Sprin タンパク質は精子細胞の Prinnuclear ring に局在することから、どちらも精子運動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た。またこれら遺伝子のヒト orthologue 遺伝子についても解析をすすめ、これら遺伝子がヒトでも保存されていることが明かとなった。さらにこれら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が、その翻訳領域に有意な変異は認めなかった。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 impact を与えると考えられる。

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遺伝子 Rosbin, Spergen-1, Sprin 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、解析を行った。

1-1. Rosbin

Rosbin は、その一次構造解析から、核移行シグナルや homeobox domain 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タンパク質を作成し、ウサギに免疫して抗体を作成し、ウエスタンブロットィング、免疫組織染色を行

い、Rosbin 遺伝子産物の解析を行った。

#### 1-2. Spergen-1

Spergen-1 は、0.7kb の mRNA として転写される新規のタンパク質をコードする遺伝子で、その一次構造の解析からミトコンドリアに局在することが考えられた。全長をクローニングした後、抗体を作成しウエスタンブロット、免疫染色等、解析を進めた。

#### 1-3. Sprin

Sprin 遺伝子は全長約 1.1kb で、その mRNA は精巣特異的に発現していた。ウエスタンブロットティングおよび免疫染色により、蛋白レベルでは伸長過程にある精子細胞の perinuclear ring に局在すると考えられた。

### 2) SNPs の解析

これら遺伝子のヒト orthologue 遺伝子の存在を確認した。そこでこれら遺伝子のゲノム領域について SNPs の解析を行った。

## C. 研究成果

### 1. Rosbin

Rosbin 遺伝子は全長約 3kb で、89kDa のタンパク質をコードし、その発現は精巣特異的であることが明らかとなった。また蛋白質は、ウエスタンブロットティングおよび免疫組織染色の結果から、円形精子細胞の核に特異的に局在していることが明らかとなった。抗体を用い免疫沈殿法で精製し、その生化学的解析を行った結果、Rosbin タンパク質は protein kinase A によってリン酸化されうること、さらに特異的 DNA 配列に結合することが明らかとなった。このことから、半数体精子細胞特

異的な転写因子であることが示唆された。

### 2. Spergen-1

Spergen-1 は、データベース検索により、ラット、ヒトに相同遺伝子を認め、ラットにおいては精子完成期のミトコンドリア凝集や局在に関与することが示されていた。精子完成期におけるミトコンドリアの中片への移動やその時期に特徴的なミトコンドリアの形態変化、精子中片部におけるらせん状の配置、固定に関わっている可能性がある。今後ノックアウトマウスの作成や、精子無力症などの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。

### 3. Sprin

Sprin はデータベース上、ヒトに相同遺伝子を認めた。蛋白発現は形態変化の著しい時期に一致しており、その局在は頭部の形成に関わるといわれている perinuclear ring と考えられたので、本蛋白は精子の形態形成に関与していることが示唆された。今後、ノックアウトマウスの作成や、奇形精子症などの不妊患者での変異や発現障害の解析を行う予定である。

### 4. SNPs の解析

これら遺伝子のヒト orthologue 遺伝子の存在を確認した。そこでこれら遺伝子のゲノム領域について SNPs の解析を行った。その結果、今回は不妊群特異的な ORF 内の変異や SNPs は認められなかった。

## D. 考察

### 1) 半数体特異的遺伝子群

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。新規の半数体精子細胞特異的転写調節因子と考えられる Rosbin の解析は、精子形成の基本的メカニズムを解明することのみならず、不妊症の新たな原因の解明につながることは疑いないことと考えられる。実際、半数体精子細胞に特異的に発現する転写因子や polyA polymerase のノックアウトマウスの表現形は精子形成障害をきたす男性不妊である。さらにこの蛋白の解析を進めるために、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) 男性不妊症と半数体特異的遺伝子群  
男性不妊症の主たる原因の一つである特異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。昨年度我々が明かにしたように protamine-2 の translational termination を引き起こすゲノム遺伝子変異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。今回、我々が解析した Rosbin, Spergen-1, Sprin 遺伝子においてはその遺伝子の重要性からか有意と認められる変異は認められなかった。我々はさらに数多くの半数体精子細胞について不妊症患者における解析を進行しており、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 Rosbin を同定し、protein kinase A のシグナル伝達を介する転写因子であることが示唆された。また、Spergen-1, Sprin 遺伝子の単離と機能解析を行い、精子形成に関与する新規の構造タンパク質であることが示唆された。男性不妊症患者における Rosbin, Spergen-1, Sprin のゲノムシークエンス解析を行い、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。

## 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. Matsuoka, Y., Iguchi, N., Kitamura, K., Manabe, H., Miyagawa, Y., Koga, M., Matsumiya, K., **Okuyama, A.**, Tanaka, H. and Nishimune, Y. (2004) Cloning and characterization of a mouse spergen-1 localized in sperm mitochondria. *Int. J. Androl.* in press.
2. Takahashi, T., Tanaka, H., Iguchi, N., Kitamura, K., Chen, Y., Maekawa, M., Nishimura, H., Ohta, H., Miyagawa, Y., Matsumiya, K., **Okuyama, A.** and Nishimune, Y. (2004) Rosbin: a novel homeobox-like protein gene expressed exclusively in round spermatids. *Biol.*

Reprod. in press.

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**, 69-73.

## 2. 学会発表

1. 高橋徹、田中宏光、陳、井口尚子、喜多村晃一、松岡庸洋、高尾徹也、宮川康、辻村晃、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 b-20 の解析」 第 91 回日本泌尿器科学会総会、2003 年 4 月、徳島

2. 松岡庸洋、宮川康、田中宏光、井口尚子、喜多村晃一、高橋徹、高尾徹也、辻村晃、松宮清美、西宗義武、**奥山明彦** 「半数体精子細胞特異的遺伝子 $\alpha$ 131の単離と解析」 第 91 回日本泌尿器科学会総会、2003 年 4 月、徳島

3. 宮川康、松岡庸洋、高橋徹、高尾徹也、古賀実、辻村晃、松宮清美、井口尚子、田中宏光、西宗義武、**奥山明彦** 「体細胞および精巣生殖細胞における succinyl CoA transferase (SCOT) gene の特異的発現」日本アンドロロジー学会第 22 回学術大会、2003 年 7 月、広島

4. 辻村晃、松岡庸洋、高橋徹、高尾徹也、宮川康、松宮清美、田中宏光、西宗義武、**奥山明彦** 「男性不妊症患者における protamine gene の SNP 解析」日本アンドロロジー学会第 22 回学術大会、2003 年 7 月、広島

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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15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。

B. 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15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25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、精巢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 法を用いて精巢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)-様配列とイニシエーター (Inr) が高頻度で見られた。これらのエレメント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、半数体特異的転写因子 CREMtau を含む精巢特異的な結合因子が制御に関与する可能性が示された。以上の結果は精巢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、CREM-tau を含む精巣特異的転写因子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、さらにメチル化と発現との関連を調べることで、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.* **65**, 148-156.
2. M. Hisano, H. Ohta, Y. Nishimune and **M. Nozaki** (2003) Methylation of CpG dinucleotides in the open reading frame of a testicular germ cell-specific intronless gene,



Tact1/Act17b, represses its expression in somatic cells. *Nucleic Acids Res.* **31**, 4797-4804.

3. H. Tani, C. K. Limn, C. C. Yap, M. Onishi, **M. Nozaki**, Y. Nishimune, N. Okahashi, Y. Kitagawa, R. Watanabe, R. Mochizuki, K. Moriishi and Y. Matsuura (2003) In vitro and in vivo gene delivery by recombinant baculoviruses. *J. Virol.* **77**, 9799-9808.

4. Y. Yamazaki, H. Kubota, **M. Nozaki** and K. Nagata (2003) Transcriptional regulation of the cytosolic chaperonin q subunit gene, *Cctq*, by Ets domain transcription factors Elk-1, Sap-1a, and Net in the absence of serum response factor. *J. Biol. Chem.* **278**, 30642-30651.

5. A. Ike, H. Ohta, M. Onishi, N. Iguchi, Y. Nishimune and **M. Nozaki** (2004) Transient expression analysis of the mouse ornithine decarboxylase antizyme haploid-specific promoter using in vivo electroporation. *FEBS Lett.* **559**, 159-164.

6. M. Onishi, T. Yasunaga, H. Tanaka, Y. Nishimune and **M. Nozaki** (2004) Gene structure and evolution of testicular haploid germ cell-specific genes, *Oxct2a* and *Oxct2b*. *Genomics* **83**, 647-657.

## 2.学会発表

1. 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 on its coding

region」 The 5<sup>th</sup> EMBL Mouse Molecular Genetics Meeting 2003年9月 Heiderberg

2. **M. Nozaki**, M. Hisano, A. Ike, M. Onishi, Pranee, S., Yamada, H. Tanaka, H. Ohta and Y. Nishimune 「Structural feature and promoter activity of genes exclusively expressed in testicular germ cells」 The 5<sup>th</sup> EMBL Mouse Molecular Genetics Meeting 2003年9月 Heiderberg

3. M. Onishi, T. Yasunaga, H. Tanaka, Y. Nishimune and **M. Nozaki** 「Evolution of testis specific Scot-t genes, functional retroposons generated from somatic tissue-type paralog」 The 5<sup>th</sup> EMBL Mouse Molecular Genetics Meeting 2003年9月 Heiderberg

4. 池晶子、大田浩、山田秀一、大西正剛、西宗義武、**野崎正美** 「マウス OAZ1 遺伝子における半数体精子細胞特異的発現制御」第20回日本疾患モデル学会 2004年11月 大阪

5. S. Pranee, H. Ohta, S. Yamada, M. Onishi, A. Ike, Y. Nishimune and **M. Nozaki** 「Analysis of molecular mechanism controlling testis-specific transcription of the Scot-t2 gene」第20回日本疾患モデル学会 平成14年11月 大阪

6. 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 Tact 遺伝子の発現制御機構と CpG メチル化」第20回日本疾患モデル

学会 平成14年11月 大阪

7. 久野瑞枝、大田浩、大西正剛、西宗義武、野崎正美「精子形成関連遺伝子発現のエピジェネティクス制御」第26回日本分子生物学会2003年12月神戸

8. S. Pranee, H. Ohta, S. Yamada, M. Onishi, A. Ike, Y. Nishimune and **M. Nozaki** 「Analysis of molecular mechanism controlling testis-specific transcription of the Scot-t2 gene」第26回日本分子生物学会2003年12月神戸

9. 野崎正美 「個体発生と生殖細胞分化—基礎的知識と分子生物学的知見」大阪医科大学平成15年秋期学術講演会2003年11月12日 大阪医科大学臨床第一講堂

#### 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

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

男性不妊症患者について、分子レベルでそのメカニズムを理解し、より自然で容易かつ安価な治療法を開発することを目的とし、我々は、精子形成過程に特異的に発現する遺伝子群をマウスから網羅的にクローニングし、その遺伝子機能を解析してきた。さらにこれら遺伝子群についてヒト相同遺伝子をクローニングし、その遺伝子の多様性(SNPs)と男性不妊症との関係についても解析を行ってきた。これらの解析から、精子形成過程に特異的に発現する遺伝子群が数多く存在し、男性不妊症の原因遺伝子として関わっていることを明かしてきた。

今回、これらの精子形成過程特異的に発現する遺伝子のノックアウトマウスを作成し、これら遺伝子の機能不全は雄性不妊症になることを明らかにした。その表現型は、ヒトに報告される男性不妊症の症例とも一致することから、ヒトにおいても、我々の明らかにした新規遺伝子が男性不妊症と深くかかわりがあることが明らかとなった。また、これらノックアウトマウスは男性不妊症疾患モデル動物として確立された。

**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の原因との関連性を明かしてきた。今回、我々が単離した半数体精子細胞特異的遺伝子の機能不全が実際のフェノタイプとして雄性不妊を引き起こすことを明かとするため、これら遺伝子のノックアウトマウスの作成を試みた。また、これらノックアウトマウスが雄性不妊を示せば、男性不妊症疾患モデルマウスとして、

確立することができる。

**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 シーケンスを調べ、それらの多型を明らかにした。

3) 半数体精子細胞特異的遺伝子の染色体遺伝子 DNA をクローニング解析し、これを用いて相同組換えによるノックアウトマウスの作成とその解析を行った。

### 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*, *h-Rosbin* 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 *Protamine1*, *Protamine2*, *h-Haspin*, *h-Scot-t*, *h-Tektin-t*, *h-Cpα3*, *h-Hanp1*, *h-Shippo1*, *h-Oppo1*, *h-Rosbin*, *t-actin1*, *t-actin2*, *Tssk1*, *Tssk2*, *TP1*, *TP2* 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。また、男性不妊症患者の中にのみ *Protamine2* 遺伝子の変異を見つけた。*Protamine1*, *2* 遺伝子は、両アレルをあわせて染色体上に2つずつ存在する。Mouse の実験からその一つでも発現がなくなると不妊を起こすことが報告されており、今回見つかったヒト *protamine2* 遺伝子の変異がヒト男性不妊症の原因遺伝子であることが強く示唆された。

3) 我々がクローニング解析を行った遺伝子 *Haspin*, *Tektin-t*, *Hanp1*, *Rosbin* について、ノックアウトマウスの作成を終えた。妊よう性についての解析の結果、いずれのマウスも雄性不妊を示した。このことから、これら遺伝子群は、雄性生殖細胞に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらにその表現型についての詳しい解析を行い、遺伝子レベルで精子細胞の分化の理解を進めたい。確立された雄性不妊マウスは、その解析により、より重要な男性不妊症疾患モデルマウスとなる。

### 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