

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候補として *h-Scot-t*, *Protamine2* を同定し、その原因と考えられる多型、変異を発見した。さらに精子細胞特異的遺伝子群の機能不全が実際雄性不妊を示すことが明かとなった。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イ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かとなった。これら精子細胞特異的遺伝子と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明かとなった。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. **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. Matsuoka, Y., Iguchi, N., Kitamura, K., Nishimura, H., 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.

3. 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.

4. 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 Mouse. *Biol Reprod.* IN PRESS.

5. 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.

6. 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**, 44417-44423.

7. Kitamura, K., Miyagawa, Y., Iguchi, N., Nishimura, H., **Tanaka, H.** and Nishimune, Y. (2003) Molecular cloning and characterization of the human orthologue of the oppo 1 gene encoding a sperm tail protein. *Mol Hum Reprod.* **9**, 237-243.

8. 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.

9. **Tanaka, H.**, Iguchi, N., Egydio de Carvalho C., Tadokoro, Y., Yomogida, K. and Nishimune Y. (2003) Novel actin-like proteins T-ACTIN 1 and T-ACTIN 2 are differentially expressed in the cytoplasm and nucleus of mouse haploid germ cells. *Biol Reprod.* **69**, 475-482.

10. 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. *FEBS Lett.* **538**, 197-202.

11. **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.

12. **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 germline cells of the mouse testis. *Int J Androl.* **26**, 52-56.

## 2. 学会発表

1. 第20回日本疾患モデル学会総会 (大阪) 2003年11月 シンポジウム: 男性不妊の疾患モデルと遺伝子工学的治療法: 「精子形成遺伝子群の単離とその解析」 田中宏光
2. 第20回疾患モデル学会総会第20回日本疾患モデル学会総会 (大阪) 2003年11月 「精子鞭毛蛋白質 Tekin-t ノックアウトマウスの解析」 田中宏光、井口尚子、西宗義武

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 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) 西宗義武、田中宏光、野崎正美
2. 男性不妊症関連遺伝子変異と男性不妊の診断方法 (特願 2002-381241) 西宗義武、田中宏光、野崎正美
3. 精子特異的タンパク質 TISP40 とその用途 (特願 2003-124424) 野島博、藤井孝之、西宗義武、田中宏光
4. マウス精子形成遺伝子とヒト男性不妊症関連遺伝子、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

ノックアウトマウスの作成

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・生化学的解析を行っ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15年度は昨年引き続きHils1（半数体特異的 Histone H1 蛋白質）をコードする遺伝子のノックアウトマウスの表現型の検討を行っている。また Gsg3 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、相同組み換え ES をクローニング中である。

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、生化学的解析を行ったものについて、実際に精子形成あるいは受精におけるこ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、ヒトで共通に保存されていて、これまでに

最も解析が進んでいる Gsg3, Hils1 遺伝子から順次ノックアウトマウス作成を試みる。Gsg3, Hils1 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（ノックアウト ES）を得る。ノックアウト 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成して、その表現型を解析する。

C. 研究結果

Hils1 遺伝子は、半数体精子細胞特異的に発現する Histone H1 に相同性の高い遺伝子である。精子細胞において染色体DNAは精細胞特異的核蛋白質プロタミンと結合し非常にコンパクトに折りたたまれる。Hils1 は、半数体精子細胞の分化の過程で、Histone で構成される染色体からプロタミンに変わる間に染色体DNAのトポロジーを調節するものと考えられる。今回、Hils1 遺伝子の特異的に欠失したヘテロマウスを得ることができた。現在、ホモの

Hils1 遺伝子を欠失したマウスを作成中である。

一方、半数体精子細胞において、Gsg3 遺伝子はアクチンキャッピング蛋白質の精巢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、Gsg3 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。Gsg3 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、ノックアウト 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も進めるべきであろう。

#### E. 結論

半数体精子細胞特異的遺伝子の一つ Hils1 遺伝子ノックアウトマウスを作成した。現在もその表現型の解析を続けている。また Gsg3 のノックアウトコンストラクトを作成し、ノックアウト 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. Iguchi, N., Tanaka, H., **Yamada, S.**, Nishimura, H., and Nishimune, Y. Control of mouse hils1 gene expression during spermatogenesis: Identification of

regulatory element by transgenic mouse. Biol. Reprod. (2003) In press.

2. 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.

3. 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.

##### 2. 学会発表

1. Hisano, M., Ohta, H., Tamada, 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 (Germany)

2. Nozaki, M., Hisano, M., Ike, A., Onishi, M., Somboontham, P., **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 (Germany)

3. 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 AZ1 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

4. 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20回日本疾患モデル学会 2003年11月 大阪

5. 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 2003年11月 大阪

6. 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

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

#### 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
Tanaka, H., Miyagawa, Y., Tsujiura, A., Matsumiya, K., Okuyama, A. and Nishimune, Y.	Single nucleotide polymorphisms in the protamine-1 and -2 genes of fertile and infertile human male populations.	Mol. Hum. Reprod.	9	69-73	2003
Kashiwaba, M., Katsura, K., Ohnishi, M., Sasaki, M., Tanaka, H., Nishimune, Y., Kobayashi, T. and Tamura, S.	A novel protein phosphatase 2C family member (PP2Czeta) is able to associate with ubiquitin conjugating enzyme 9(1).	FEBS Lett.	538	197-202	2003
Tanaka, H., Iguchi, N., Miyagawa, Y., Koga, M., Kohroki, J. and Nishimune, Y.	Differential expression of succinyl CoA transferase (SCOT) gene in somatic and germ line cells of the mouse testis	Int. J. Androl.	26	52-56	2003
Tsuchida, J., Dohmae, K., Kitamura, Y. and Nishimune, Y.	The role of the c-kit receptor in the regenerative differentiation of rat Leydig cells.	Int. J. Androl.	26	121-125	2003
Ohta, H., Aizawa, S. and Nishimune, Y.	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	2003
Tanaka, H., Iguchi, N., Egycio de Carvalho, C., Tadokoro, Y., Yomogida, K. and Nishimune, Y.	Novle 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	2003
Hisano, H., Yamada, S., Tanaka, H., Nishimune, Y. and Nozaki, M.	Genomic structure and promoter activity of the testis haploid germ cell-specific intronless genes, Tact1 and Tact2.	Mol. Reprod. Dev.	65	148-156	2003
Kitamura, K., Miyagawa, Y., Iguchi, N., Nishimura, H., Tanaka, H. and Nishimune, Y.	Molecular cloning and characterization of the human orthologue of the oppo1 gene encoding a sperm tail protein.	Mol. Hum. Reprod.	9	237-243	2003

Sakata, S., Sakamaki, K., Watanabe, K., Nakamura, N., Toyokuni, S., Nishimune, Y., Mori, C. and Yonehara, S.	Involvement of death receptor Fas in germ cell degeneration in gonads of Kit-deficient Wv/Wv mutant mice.	Cell Death Differ.	10	676-686	2003
Tadokoro, K., Yomogida, K., Yagura, Y., Yamada, S., Okabe, M. and Nishimune, Y.	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	2003
Yomogida, K., Yagura, Y., Tadokoro, Y. and Nishimune, Y.	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	2003
Ohta, H., Tohda, A. and Nishimune, Y.	Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells in the W/Wv mutant mouse testis.	Biol. Reprod.	69	1815-1821	2003
Hisano, M., Ohta, H., Nishimune, Y. and Nozaki, M.	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	2003
Kitamura, K., Tanaka, H. and Nishimune, Y.	Haprin, a novel haploid germ cell-specific RING finger protein involved in the acrosome reaction.	J. Biol. Chem.	278	44417-44423	2003
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.	In vitro and in vivo gene delivery by recombinant baculoviruses.	J. Virol.	77	9799-9808	2003

Yamazaki, Y., Kubota, H., Nozaki, M. and Nagata, K.	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	2003
Iguchi, N., Tanaka, H., Yomogida, K. and Nishimune, Y.	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	2003
Ohta, H., Wakayama, T. and Nishimune, Y.	Commitment of fetal male germ cells to spermatogonial stem cells during mouse embryonic development.	Biol. Reprod.			2003
Iguchi, N., Tanaka, H., Yamada, S., Nishimura, H. and Nishimune, Y.	Control of mouse hils1 gene expression during spermatogenesis: Identification of regulatory element by transgenic mouse.	Biol. Reprod.			2003
Takahashi, T., Tanaka, H., Iguchi, N., Kitamura, K., Chen, Y., Maekawa, M., Nishimura, H., Ohta, H., Miyagawa, Y., Matsumiya, Y., Okuyama, A. and Nishimune, Y.	Rosbin: a novel homeobox-like protein gene expressed exclusively in round spermatids.	Biol. Reprod.			2004
Habu, T., Wakabayashi, N., Yoshida, K., Yomogida, K., Nishimune, Y. and Morita, T.	p53 protein interacts specifically with the meiosis-specific mammalian RecA-like protein DMC1 in meiosis.	Carcinogenesis			2004
Ike, A., Ohta, H., Onishi, M., Iguchi, N., Nishimune, Y. and Nozaki, M.	Transient expression analysis of the mouse ornithine decarboxylase antizyme haploid-specific promoter using in vivo electroporation.	FEBS Lett.	559	159-164	2004
Onishi, M., Yasunaga, T., Tanaka, H., Nishimune, Y. and Nozaki, M.	Gene structure and evolution of testicular haploid germ cell-specific genes, Oxct2a and Oxct2b	Genomics			2004



Matsuoka, Y., Iguchi, N., Kitamura, K., Manabe, H., Miyagawa, Y., Koga, M., Matsumiya, K., Okuyama, A., Tanaka, H. and Nishimune, Y.	Cloning and characterization of a mouse spergen-1 localized in sperm mitochondria.	Int. J. Androl.			2004
Tanaka, H., Takahashi, T., Iguchi, N., Kitamura, K., Miyagawa, Y., Tsujimura, A., Matsumiya, K., Okuyama, A. and Nishimune, Y.	Ketone bodies could support hyperactivation motility but not the acrosome reaction of mouse sperm.	Int. J. Androl.			2004

20030369

以降は雑誌/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。