

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02013/122265

発行日 平成27年5月21日 (2015. 5. 21)

(43) 国際公開日 平成25年8月22日 (2013. 8. 22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 H O 4 5
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 77 頁) 最終頁に続く		

出願番号 特願2013-558770 (P2013-558770)	(71) 出願人 301021533 国立研究開発法人産業技術総合研究所 東京都千代田区霞が関1-3-1
(21) 国際出願番号 PCT/JP2013/054425	
(22) 国際出願日 平成25年2月15日 (2013. 2. 15)	
(31) 優先権主張番号 特願2012-33273 (P2012-33273)	(71) 出願人 503359821 国立研究開発法人理化学研究所 埼玉県和光市広沢2番1号
(32) 優先日 平成24年2月17日 (2012. 2. 17)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(74) 代理人 100091096 弁理士 平木 祐輔
	(74) 代理人 100118773 弁理士 藤田 節
	(74) 代理人 100111741 弁理士 田中 夏夫
	(72) 発明者 小倉 淳郎 茨城県つくば市高野台3丁目1番地の1 独立行政法人理化学研究所 筑波研究所内 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 男性不妊症の原因因子検出方法及び男性不妊症モデル動物

(57) 【要約】

G A L N T L 5 遺伝子の変異又は G A L N T L 5 タンパク質の発現異常を指標に男性不妊症を検出する方法の提供、及び G a l n t l 5 遺伝子に変異が導入されたヒト男性不妊症モデル動物の提供。

男性被験体の精子における G A L N T L 5 遺伝子の発現異常を指標に男性不妊症を検出する、男性不妊症の検出方法、及び精子の遺伝子の全部又は一部が欠損され、G A L N T L 5 タンパク質発現が喪失しているか、又は低下している、男性不妊症非ヒトモデル動物

。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

男性被験体の精子における G A L N T L 5 遺伝子の発現異常を指標に男性不妊症を検出する、男性不妊症の検出方法。

【請求項 2】

男性被験体の精子における G A L N T L 5 タンパク質を定量し、G A L N T L 5 タンパク質の発現量を指標に男性不妊症を検出する、請求項 1 に記載の男性不妊症の検出方法。

【請求項 3】

抗 G A L N T L 5 抗体を用いて G A L N T L 5 タンパク質を測定する、請求項 2 記載の男性不妊症の検出方法。

10

【請求項 4】

精子の G A L N T L 5 遺伝子の発現の減少を生じさせる変異の有無を検出することを含む請求項 1 又は 2 に記載の男性不妊症の検出方法。

【請求項 5】

変異が G A L N T L 5 遺伝子の第 3 イントロンと第 4 エクソンの間のスプライシングアクセプター部位 A G の G G への変異である、請求項 4 記載の男性不妊症の検出方法。

【請求項 6】

変異が G A L N T L 5 遺伝子の第 6 エクソンの第 1 0 6 番目の T の欠失である、請求項 4 記載の男性不妊症の検出方法。

【請求項 7】

精子の G A L N T L 5 タンパク質の発現の減少を生じさせる変異がヘテロである、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の男性不妊症の検出方法。

20

【請求項 8】

男性不妊症が、精子無力症である請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の男性不妊症の検出方法。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項の男性不妊症の検出方法において用いる、男性不妊症検出用抗 G A L N T L 5 タンパク質抗体。

【請求項 10】

請求項 7 記載の抗 G A L N T L 5 タンパク質抗体であって、ヒト又はマウス G A L N T L 5 タンパク質の断片ペプチドであって、配列番号 2 のアミノ酸配列からなるヒト G A L N T L 5 タンパク質の 5 4 番目 ~ 7 2 番目のアミノ酸配列 Q Q I I Y G S E Q I P K P H V I V K R (配列番号 8)、配列番号 2 のアミノ酸配列からなるヒト G A L N T L 5 タンパク質の 2 8 2 番目 ~ 2 9 7 番目のアミノ酸配列 F K W D N V F S Y E M D G P E G (配列番号 9)、配列番号 2 のアミノ酸配列からなるヒト G A L N T L 5 タンパク質の 3 6 2 番目 ~ 3 7 7 番目のアミノ酸配列 S K K Q T G K P S T I I S A M T (配列番号 10)、配列番号 4 のアミノ酸配列からなるマウス G A L N T L 5 タンパク質の 4 2 番目 ~ 5 8 番目のアミノ酸配列 L L K K R S L G K N A H Q Q T R H (配列番号 5)、配列番号 4 のアミノ酸配列からなるマウス G A L N T L 5 タンパク質の 2 6 3 番目 ~ 2 7 8 番目のアミノ酸配列 L R W D N V F A Y E L D G P E G (配列番号 6) 又は配列番号 4 のアミノ酸配列からなるマウス G A L N T L 5 タンパク質の 3 4 2 番目 ~ 3 5 8 番目のアミノ酸配列 S K A L S Q H R R A N Q S A L S (配列番号 7) で表される部分が有するエピトープを含む配列からなる断片ペプチドを動物に免疫することにより得られる、該断片ペプチドが有するエピトープを特異的に認識する抗 G A L N T L 5 タンパク質抗体。

30

40

【請求項 11】

Q Q I I Y G S E Q I P K P H V I V K R (配列番号 8)、F K W D N V F S Y E M D G P E G (配列番号 9) 及び S K K Q T G K P S T I I S A M T (配列番号 10)、L L K K R S L G K N A H Q Q T R H (配列番号 5)、L R W D N V F A Y E L D G P E G (配列番号 6) 又は S K A L S Q H R R A N Q S A L S (配列番号 7) で表わされるアミノ酸配列からなる断片ペプチド。

50

【請求項 1 2】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の男性不妊症の検出のための、ヒト G A L N T L 5 遺伝子の D N A 断片ポリヌクレオチド。

【請求項 1 3】

ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) に用いられるプライマーである請求項 1 2 記載のポリヌクレオチド。

【請求項 1 4】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の男性不妊症の検出のための、請求項 7 又は 8 に記載の抗 G A L N T L 5 タンパク質抗体を含む検出キット。

【請求項 1 5】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の男性不妊症の検出のための、請求項 1 2 又は 1 3 に記載のポリヌクレオチドを含む検出キット。

10

【請求項 1 6】

精子の G a l n t l 5 遺伝子の全部又は一部が欠損し、G A L N T L 5 タンパク質発現が喪失しているか、又は低下している、男性不妊症非ヒトモデル動物。

【請求項 1 7】

G a l n t l 5 遺伝子の欠損が、ヘテロ欠損である請求項 1 6 記載の男性不妊症非ヒトモデル動物。

【請求項 1 8】

マウスである、請求項 1 6 又は 1 7 に記載の男性不妊症非ヒトモデル動物。

20

【請求項 1 9】

細胞に相同組換えを行い、相同組換えが起こった組換え細胞をネガティブ選択により選択する方法であって、相同組換えの際に相同組換え領域の外側に G a l n t l 5 遺伝子をネガティブ選択マーカー遺伝子として導入し、相同組換え後に生存した細胞を選択することを含む方法。

【請求項 2 0】

G a l n t l 5 遺伝子からなる、相同組換えが起こった細胞を選択するためのネガティブ選択マーカー。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0 0 0 1】

本発明は男性不妊症の原因因子検出及びヒト男性不妊症モデル非ヒト動物に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

男性不妊の原因は 1) 精巣での精子形成障害、2) 精子輸送路の閉塞、3) 前立腺炎及び 4) 勃起・射精障害に分けられるが、このうち 2) ~ 4) に関しては診断が可能でそれぞれ治療法が確立されている。これに対し、男性不妊症の 9 0 % を占める精子形成障害は、遺伝子異常により引き起こされると考えられているが、その原因因子を特定する手法は全く確立されていない。正確な原因因子検査手法の確立は、今後の生殖医療の発展といったライフイノベーションに繋がると共に、少子化の阻止という意味でも社会に大いに還元

40

生物の精子形成研究の歴史は長く、これまで様々なアプローチで研究が進められてきた。近年、哺乳類では遺伝子改変マウスの作成によって、多くの遺伝子が精子形成に寄与していることが明らかになってきたが、ヒト精子形成障害を引き起こす遺伝子変異を同定した例はほとんど報告されていない。

本発明者らは、ヒトゲノムからタンパク質に糖を付加する糖転移酵素遺伝子の同定を試みてきた。その中で、O - G a l N A c 型 O - 結合型糖鎖の合成をスタートさせる糖転移酵素であるポリペプチド N - アセチルガラクトサミン転移酵素遺伝子 (p p - G a l N A c - T) は、ヒトのゲノム中に 2 0 個存在することが報告されている。この遺伝子ファミリーに分類されるが、他の p p - G a l N A c - T 遺伝子に共通して存在する C 末レクチ

50

ン構造を欠失した特徴を持ち、ヒト精巢特異的に発現する糖転移酵素様の新規遺伝子 G A L N T L 5 を同定することに本発明者らは成功した。その発現様式から G A L N T L 5 が精子形成あるいは精子と卵子との受精機構に寄与する遺伝子と推測されることから、G A L N T L 5 タンパク質、遺伝子の特許申請している（特許文献 1 を参照）。一方、G A L N T L 5 タンパク質の糖転移酵素活性を *in vitro* で再現できないことから、これまでに本遺伝子の精子形成における機能を推測するには至っていなかった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献 1】特開 2008 - 148594 号公報

10

【発明の概要】

【0004】

本発明は G A L N T L 5 遺伝子の変異又は G A L N T L 5 タンパク質の発現異常を指標に男性不妊症を検出する方法の提供、及び G A L N T L 5 遺伝子に変異が導入されたヒト男性不妊症モデル動物の提供を目的とする。

これまでの精子形成障害による男性不妊症診断は、顕微鏡観察下での精液検査で、精子濃度、精子運動性、精子正常形態率のみで診断される。そのための確な臨床的治療法の開発を行うこと無く、顕微授精による不妊治療のみが治療手段として選択されるのが現状であった。

本発明者らは精子形成過程特異的に発現する G A L N T L 5 遺伝子の変異し、正常な G A L N T L 5 タンパク質が形成されなくなることにより、精子の運動性が低下し、男性不妊となることを見出した。その結果、G A L N T L 5 遺伝子の変異を検出し、あるいは G A L N T L 5 タンパク質の発現量を測定することにより、男性不妊症の原因を診断することができることを見出した。

20

さらに、本発明は非ヒト動物において、G a l n t l 5 遺伝子を欠損させることにより、精子の運動性が低下し、ヒト男性不妊症のモデル動物を作出することを見出し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は以下のとおりである。

[1] 男性被験体の精子における G A L N T L 5 遺伝子の発現異常を指標に男性不妊症を検出する、男性不妊症の検出方法。

30

[2] 男性被験体の精子における G A L N T L 5 タンパク質を定量し、G A L N T L 5 タンパク質の発現量を指標に男性不妊症を検出する、[1] の男性不妊症の検出方法。

[3] 抗 G A L N T L 5 抗体を用いて G A L N T L 5 タンパク質を測定する、[2] の男性不妊症の検出方法。

[4] 精子の G A L N T L 5 遺伝子の発現の減少を生じさせる変異の有無を検出することを含む [1] 又は [2] の男性不妊症の検出方法。

[5] 変異が G A L N T L 5 遺伝子の第 3 イントロンと第 4 エクソンの間のスプライシングアクセプター部位 A G の G G への変異である、[4] の男性不妊症の検出方法。

[6] 変異が G A L N T L 5 遺伝子の第 6 エクソンの第 106 番目の T の欠失である、[4] の男性不妊症の検出方法。

40

[7] 精子の G A L N T L 5 タンパク質の発現の減少を生じさせる変異がヘテロである、[1] ~ [6] のいずれかの男性不妊症の検出方法。

[8] 男性不妊症が、精子無力症である [1] ~ [7] のいずれかの男性不妊症の検出方法。

[9] [1] ~ [8] のいずれかの男性不妊症の検出方法において用いる、男性不妊症検出用抗 G A L N T L 5 タンパク質抗体。

[10] [9] の抗 G A L N T L 5 タンパク質抗体であって、ヒト又はマウス G A L N T L 5 タンパク質の断片ペプチドであって、配列番号 2 のアミノ酸配列からなるヒト G A L N T L 5 タンパク質の 54 番目 ~ 72 番目のアミノ酸配列 Q Q I I Y G S E Q I P K P H V I V K R (配列番号 8)、配列番号 2 のアミノ酸配列からなるヒト G A L N T L 5 タ

50

ンパク質の282番目～297番目のアミノ酸配列FKWDNVFSYEMDGP EG (配列番号9)、配列番号2のアミノ酸配列からなるヒトGALNTL5タンパク質の362番目～377番目のアミノ酸配列SKKQTGKPSIIISAMT (配列番号10)、配列番号4のアミノ酸配列からなるマウスGALNTL5タンパク質の42番目～58番目のアミノ酸配列LLKKRSLGKNAHQQRH (配列番号5)、配列番号4のアミノ酸配列からなるマウスGALNTL5タンパク質の263番目～278番目のアミノ酸配列LRWDNVFAYELDGP EG (配列番号6)又は配列番号4のアミノ酸配列からなるマウスGALNTL5タンパク質の342番目～358番目のアミノ酸配列SKALSQHRANQSALS (配列番号7)で表される部分が有するエピトープを含む配列からなる断片ペプチドを動物に免疫することにより得られる、該断片ペプチドが有するエピトープを特異的に認識する抗GALNTL5タンパク質抗体。

10

[11] QQI IYGSEQIPKPHVIVKR (配列番号8)、FKWDNVFSYEMDGP EG (配列番号9)及びSKKQTGKPSIIISAMT (配列番号10)、LLKKRSLGKNAHQQRH (配列番号5)、LRWDNVFAYELDGP EG (配列番号6)又はSKALSQHRANQSALS (配列番号7)で表わされるアミノ酸配列からなる断片ペプチド。

[12] [1]～[8]のいずれかの男性不妊症の検出のための、ヒトGALNTL5遺伝子のDNA断片ポリヌクレオチド。

[13] ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)に用いられるプライマーである[12]のポリヌクレオチド。

20

[14] [1]～[8]のいずれかの男性不妊症の検出のための、[9]又は[10]の抗GALNTL5タンパク質抗体を含む検出キット。

[15] [1]～[8]のいずれかの男性不妊症の検出のための、[12]又は[13]のポリヌクレオチドを含む検出キット。

[16] 精子のGalntl5遺伝子の全部又は一部が欠損し、GALNTL5タンパク質発現が喪失しているか、又は低下している、男性不妊症非ヒトモデル動物。

[17] Galntl5遺伝子の欠損が、ヘテロ欠損である[16]記載の男性不妊症非ヒトモデル動物。

[18] マウスである、[16]又は[17]の男性不妊症非ヒトモデル動物。

[19] 細胞に相同組換えを行い、相同組換えが起こった組換え細胞をネガティブ選択により選択する方法であって、相同組換えの際に相同組換え領域の外側にGalntl5遺伝子をネガティブ選択マーカー遺伝子として導入し、相同組換え後に生存した細胞を選択することを含む方法。

30

[20] Galntl5遺伝子からなる、相同組換えが起こった細胞を選択するためのネガティブ選択マーカー。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2012-033273号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

【図面の簡単な説明】

【0005】

図1-1は、ヒトGALNTL5タンパク質(443アミノ酸)の構造を示す図である。

40

図1-2は、ヒト組織及びヒト細胞株におけるGALNTL5遺伝子転写物のリアルタイムPCRによる定量的解析の結果を示す図である。

図1-3は、マウスGalntl5オーソログ遺伝子のアンチセンスRNAを用いたin situハイブリダイゼーションの結果を示す図である。図1-3aがセンス鎖を用いた結果、図1-3bがアンチセンス鎖を用いた結果を示す。図1-3cはアンチセンス鎖を用いた像の拡大図を示す。

図2は、成体マウス生殖細胞のGALNTL5タンパク質の局在を示す図である。図2a、2b、2cは精子形成過程のそれぞれステージIII、VI及びVIIの結果を示す。図2d、2e、2f、2gは精巣上体精子におけるそれぞれ、抗GALNTL5タンバ

50

ク質抗体染色、PNA染色及びDAPI染色の拡大図を示し、図2gはマージした像を示す。

図3-1は、Galnt15遺伝子改変マウスの作成に用いたベクターの構造を示す図である。

図3-2は、相同組換えにより樹立したGalnt15遺伝子欠損ES細胞のゲノムDNAの遺伝子型をサザンブロットにより調べた結果を示す図である。

図3-3は、相同組換えにより樹立したGalnt15遺伝子欠損ES細胞のゲノムDNAの遺伝子型をPCRにより調べた結果を示す図である。

図3-4は、Wtマウス及びHtマウスのゲノムDNAの遺伝子型をPCRにより調べた結果を示す図である。

図3-5は、Wtマウス及びHtマウスの精巣上体精子のGALNTL5タンパク質量を示す図である。

図4-1は、Galnt15+/+Wtマウス、Galnt15+/-Htオスマウス、及びGalnt15+/-Htメスマウスの妊性を示す図である。

図4-2は、Wtマウス(a)又はHtマウス(b)の精巣上体精子の形態を示す図である。

図4-3は、Wtマウス精子及びHtマウス精子の精子数(a)、異常率(b)、運動性(c)、経路速度(d)及び進行速度(e)を示す図である。

図5は、抗GALNTL5抗体を用いて精巣上体精子におけるGALNTL5タンパク質の発現を検出した結果を示す図である。図5aはWtマウス精子の結果を、図5b、cはHtマウス精子の結果を示す。

図6-1は、Wtマウス及びHtマウスの精巣上体精子に存在する解糖系酵素群(ヘキソキナーゼ(HXK)、ホスホグリセリン酸キナーゼ2(PGK2)及びフルクトース二リン酸アルドラーゼA(ALDOA))の存在を示す図である。

図6-2は、Wtオスマウス(図6-2a)及びHtオスマウス(図6-2b)の精子におけるHXKの局在を示す図である。

図7は、WtオスマウスとHtオスマウスの精巣上体精子が有するタンパク質の比較の結果を示す図である。

図8は、GALNTL5タンパク質を強制発現させたCOS1培養細胞中のCalreticulin、GM130、Golglin-97、ユビキチンの細胞内局在を示す図である。aはCalreticulinを、bはGM130を、cはGolglin-97を、dはユビキチンの染色の結果を示す。

図9-1は、Wtマウス精子とHtマウス精子におけるユビキチンの局在を示す図である。図9-1aがWtマウス精子の結果を、図9-1bがHtマウス精子の結果を示す。

図9-2は、精巣上体精子溶解物をチューブリン、ユビキチン、アクロシン、NSF及びtACEに対する抗体を用いて行ったウエスタンブロッティングで検出したマウス精巣上体精子中の先体タンパク質の発現を示す図である。

図10は、Wtマウス精子とHtマウス精子におけるアクロシンの局在を示す図である。図10a及びbはWtマウス精子の結果を、図10c及びdはHtマウス精子の結果を示す。

図11は、Wtマウス精子とHtマウス精子におけるNSFの局在を示す図である。図11a及びbはWtマウス精子の結果を、図11c及びdはHtマウス精子の結果を示す。

図12は、Wtマウス精子とHtマウス精子におけるtACEの局在を示す図である。図12a及びbはWtマウス精子の結果を、図12c及びdはHtマウス精子の結果を示す。

図13は、Wtマウス精子とHtマウス精子におけるユビキチン及びGALNTL5タンパク質の二重染色並びにユビキチン及びUBC3Bの二重染色の結果を示す図である。図13aはWtマウス精子のユビキチン及びUBC3Bの二重染色の結果であり、図13bはHtマウス精子のユビキチン及びUBC3Bの二重染色の結果であり、図13cはW

10

20

30

40

50

t マウス精子のユビキチン及び G A L N T L 5 タンパク質の二重染色の結果であり、図 1 3 d は W t マウス精子の U B C 3 B 及び G A L N T L 5 タンパク質の二重染色の結果である。

図 1 4 は、W t マウス精子における G A L N T L 5 タンパク質並びに R a b 2 7 a 若しくは M y o s i n V a の共局在を示す図である。図 1 4 a は W t マウス精子における G A L N T L 5 タンパク質及び R a b 2 7 a の局在を示し、図 1 4 b は W t マウス精子における G A L N T L 5 タンパク質及び M y o s i n V a の局在を示し、図 1 4 c は W t マウスの精巣内精子における G A L N T L 5 タンパク質及び R a b 2 7 a の局在を示す。

図 1 5 - 1 は、精子無力症と診断された患者を含む 1 0 個体から採取した精子の構成タンパク質の検出の結果を示す図である。

図 1 5 - 2 は、精子無力症と診断された患者の精子の G A L N T L 5 遺伝子の配列を示す図である。図中星印の部位は変異部位を示す。

図 1 5 - 3 は、9 個のエクソンを有する G A L N T L 5 遺伝子中の変異の位置を示す図である。

図 1 5 - 4 は、精子無力症と診断された患者を含む 6 人の精子 (図 1 5 - 4 a) 及び血液細胞 (図 1 5 - 4 b) の G A L N T L 5 遺伝子の P s t I 制限酵素による消化を行った場合と行わなかった場合の D N A フラグメントを示す図である。

図 1 6 - 1 は、精子無力症と診断された患者を含む 5 個体から採取した精子についての構成タンパク質の検出の結果を示す図である。

図 1 6 - 2 は、G A L N T L 5 タンパク質の減少が観察された患者の精子、血液細胞の G A L N T L 5 遺伝子を P C R によって各エクソンを増幅させ塩基配列決定した結果を示し、第 6 エクソンの一部配列を示すものがある。A は、正常な第 6 エクソンの遺伝子配列を示し、B は欠失がある第 6 エクソンの遺伝子配列を示す。

図 1 6 - 3 は、9 個のエクソンを有する G A L N T L 5 遺伝子中の変異の位置を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0006】

ヒト G A L N T L 5 遺伝子の塩基配列及びヒト G A L N T L 5 タンパク質のアミノ酸配列を配列番号 1 及び 2 に表わす。また、マウス G a l n t l 5 遺伝子の塩基配列及びマウス G A L N T L 5 タンパク質のアミノ酸配列を配列番号 3 及び 4 に表わす。

ヒト男性不妊症の検出

本発明のヒト男性不妊症の検出において対象とする男性不妊症は精子の G A L N T L 5 遺伝子の変異により、G A L N T L 5 遺伝子の発現異常が生じ、正常な G A L N T L 5 タンパク質が発現されなくなることを原因とする男性不妊症であり、このような男性不妊症として精子無力症が挙げられる。すなわち、本発明の方法はヒト男性不妊症の原因因子を検出する方法でもある。本発明において、男性不妊症の検出は男性不妊症の原因因子を特定することを含む。

G A L N T L 5 遺伝子の変異は G A L N T L 5 遺伝子の塩基配列の変化をいい、該変化により G A L N T L 5 タンパク質の発現が低下するか、又は発現したとしても G A L N T L 5 タンパク質が本来有する正常な機能が低下した若しくは正常な機能を喪失した G A L N T L 5 タンパク質が発現されるようになる変異をいう。このような G A L N T L 5 遺伝子の変異として、G A L N T L 5 遺伝子の総てまたは一部の欠失が挙げられる。G A L N T L 5 遺伝子は 9 個のエクソンを有し、例えば、いずれかの 1 以上のエクソンにおける変異、すなわち、一塩基の欠失によりフレームシフトが起こり、正常な G A L N T L 5 タンパク質が発現できなくなるような変異等が挙げられる。また、イントロンとエクソンの境目のスプライシングアクセプター部位又はスプライシングドナー部位における変異が挙げられる。スプライシングドナー部位は、イントロンの上流の末端 (5 ' 末端) にあり、通常 G T 配列からなる。スプライシングアクセプター部位は、イントロンの下流の端 (3 ' 末端) にあり、通常 A G 配列からなる。スプライシングドナー部位又はスプライシングアクセプター部位に変異が生じると、正常なスプライシングが起こらなくなり、G A L N T

10

20

30

40

50

L5タンパク質が発現しなくなるか、あるいは正常なGALNTL5タンパク質が発現しなくなる。例えば、スプライシングアクセプター部位の配列に変異が生じるとエクソスキップが生じる。一例として、第3イントロンと第4エクソンの境目のスプライシングアクセプター部位のAG配列がGG配列に変異した場合、第4エクソンがスキップされ、フレームシフトにより第5エクソン中に新たなストップコドンが出現し、正常なGALNTL5タンパク質が発現されることなく、発現が停止する。具体的には、TGCCCTGCAGGCGTCTTCAAAAACATT(配列番号21)で表される第3イントロンと第4エクソンの境目のスプライシングアクセプター部位のAG配列がGG配列に変異し、TGCCCTGCAGGCGTCTTCAAAAACATT(配列番号22)になった場合である。

10

また、第6エクソンに1塩基の欠失が生じ、ストップコドンが出現した場合も、正常なGALNTL5タンパク質の発現が困難になる。具体的には、GALNTL5遺伝子をコードするDNAの735番目から797番目のCCCAAAATGGTGGTGTGCCCCCTGATAGATGTCATTGATGATAGAACTCTGGAGTA(配列番号23)で表される配列の764番目のT(第6エクソンの第106番目のT、配列番号23の配列の23番目のT)が欠失し、CCCAAAATGGTGGTGTGCCCCCGATAGATGTCATTGATGATAGAACTCTGGAGTA(配列番号24)となり、第6エクソン中にストップコドンが出現し、正常なGALNTL5タンパク質の発現が不可能となる。

上記のGALNTL5遺伝子変異をヘテロで保持しているヒトが精子無力症を発症する。

20

GALNTL5遺伝子は精子形成過程特異的に発現する遺伝子であり、本発明の男性不妊症の検出方法においては、精子におけるGALNTL5遺伝子の変異を検出し、あるいは精子におけるGALNTL5タンパク質の発現異常を検出すればよい。

男性不妊症の検出に利用する変異は、配列番号1に示すGALNTL5遺伝子の塩基配列と男性不妊症患者の精子のGALNTL5遺伝子の塩基配列を比較し、該変異によりGALNTL5タンパク質の発現が異常になる変異を探索することにより、見出すことができる。

GALNTL5遺伝子の変異の検出は、被験体より採取した精子よりDNA又はRNAを抽出し、変異を検出すればよい。DNA又はRNAの検出は公知の方法により行うことができる。得られたDNA又はRNAの変異の検出は、公知の方法で行うことができる。そのような方法としては、遺伝子変異部位に特異的なプライマーを用いる方法、DNAチップ(マイクロアレイ)を用いる方法、制限断片長多型(RFLP)を利用する方法、直接配列決定法、変性勾配ゲル電気泳動法(DGGE)、ミスマッチ部位の化学的切断を利用した方法(CCM)、プライマー伸長法(TaqMan(登録商標)法)、PCR-SSCP法、MADI-TOF/MS法などを用いることができる。例えば、得られた被験体の精子DNAを鋳型として、変異が存在する部位を含む断片をPCRで増幅し、その後配列を決定し、変異の有無を測定することができる。また、例えば、変異部位に特異的なプローブとのハイブリダイゼーションにより変異の検出を行うことができる。この際、プローブの一端を基板に固定してDNAチップ(マイクロアレイ)として使用できる。PCR等には変異部位の3'側および5'側に存在する2種類の配列をプライマー対として用いることができる。また、変異部位に特異的なプローブとのハイブリダイゼーションにより行う方法においては、変異部位を含む連続した塩基配列からなるプローブを用いればよい。変異の検出に用いるプライマーやプローブ等のポリヌクレオチドを構成する塩基の数は5~50、好ましくは10~33、さらに好ましくは10~30、特に好ましくは15~25である。また、上記遺伝子の塩基配列の変異部位を含む連続した塩基配列において、数個、好ましくは1~5個、さらに好ましくは1個又は2個、特に好ましくは1個のミスマッチを有するポリヌクレオチドも用いることができる。ポリヌクレオチドは、蛍光物質、酵素、放射性同位体、化学発光物質等で標識されていても良い。標識に用いる標識物質は、公知のものを用い、公知の方法で標識することができる。蛍光物質としては、例え

30

40

50

ば、Cy3、Cy5、ローダミン、フルオレセイン等が挙げられる。本発明は、男性不妊症検出用のプライマーやプローブ等のポリヌクレオチドも包含する。

被験体の精子のGALNTL5遺伝子にGALNTL5タンパク質の発現異常をもたらす変異が存在する場合に、該被験体はGALNTL5タンパク質の発現異常による男性不妊症、すなわち、精子の運動性の低下又は喪失を原因とする男性不妊症である精子無力症であると判定することができる。

GALNTL5遺伝子に変異を有する精子におけるGALNTL5タンパク質の発現異常には、正常のGALNTL5遺伝子を有する精子と比較した場合の発現量の低下、発現の喪失が含まれる。発現の異常は被験体より採取した精子中のGALNTL5タンパク質の発現量を測定すればよい。すなわち、被験体の精子からタンパク質を抽出しGALNTL5タンパク質を測定すればよい。GALNTL5タンパク質の発現量の測定はGALNTL5タンパク質に対する抗体を用いて行うことができ、ELISA、ウエスタンブロッティング、イムノプロット法、イムノクロマトグラフィー、ラテックス凝集法等の抗原抗体反応を利用した測定法により測定すればよい。

GALNTL5タンパク質の測定に用い得る抗体として、例えば後述の抗GALNTL5タンパク質抗体が挙げられる。

また、GALNTL5タンパク質の発現異常によるGALNTL5タンパク質量の減少に伴い、他の精子タンパク質の減少が認められる。すなわち、正常個体の精子において、GALNTL5タンパク質は成熟精子形成に必須であるタンパク質の精子細胞内の分布を制御する機能を有しており、正常精子において精子アクロゾーム（先体）に共局在すべきタンパク質がGALNTL5が存在しないと精子先体へ輸送されなくなる。このため、精子先体タンパク質量も減少する。GALNTL5タンパク質量の減少に伴い精子タンパク質の減少が現在明らかにされているタンパク質としては、解糖系酵素群（ヘキソキナーゼ（HXK）、ホスホグリセリン酸キナーゼ2（PGK2）及びフルクトース二リン酸アルドラーゼA（ALDOA））、ユビキチン、アクロシン、UBC3B、NSF、tACEが挙げられる。精子におけるGALNTL5タンパク質の検出に加え、これらのタンパク質を同時に検出し、定量することにより、精子の運動性の低下の原因がGALNTL5遺伝子の欠損によるものであるとより正確に判定することができる。これらの他のタンパク質はそれぞれのタンパク質に対する抗体を用いて検出することができる。本発明は、精子におけるGALNTL5タンパク質及び解糖系酵素群（ヘキソキナーゼ（HXK）、ホスホグリセリン酸キナーゼ2（PGK2）、フルクトース二リン酸アルドラーゼA（ALDOA））、ユビキチン、アクロシン、UBC3B、NSF及びtACEからなる群から選択される少なくとも1種、すなわち1、2、3、4、5、6、7又は8種を用いて男性不妊症を検出する方法をも包含する。また、抗GALNTL5抗体と解糖系酵素群（ヘキソキナーゼ（HXK）、ホスホグリセリン酸キナーゼ2（PGK2）、フルクトース二リン酸アルドラーゼA（ALDOA））、ユビキチン、アクロシン、UBC3B、NSF及びtACEからなる群から選択される少なくとも1種のタンパク質に対する抗体を組み合わせる、男性不妊症検出のためのキットも包含する。

被験体から採取した精子に正常GALNTL5タンパク質が存在しないか、又は存在しても正常男性の精子に含まれる正常GALNTL5タンパク質に比較して少ない場合に、該被験体はGALNTL5タンパク質の発現異常による男性不妊症、すなわち、精子の運動性の低下又は喪失を原因とする男性不妊症である精子無力症であると判定することができる。この際、正常男性の精子に含まれるGALNTL5タンパク質量を測定し、該測定値に基づいてカットオフ値を設定し、被験体の精子のGALNTL5タンパク質量がカットオフ値より低い場合に、男性不妊症であると判定することができる。

本発明は、GALNTL5遺伝子の欠損あるいはGALNTL5タンパク質の発現異常を測定し、男性不妊症を検出するためのキットも包含する。該キットは遺伝子を検出する場合は、遺伝子の変異を検出するためのプライマーやプローブを含み、タンパク質を検出する場合は、抗GALNTL5抗体を含む。また、精子からのGALNTL5遺伝子又はGALNTL5タンパク質を抽出するための試薬を含んでいてもよい。

本発明の男性不妊症の検出方法は、男性不妊症の診断のための検査方法ということもできる。また、本発明の方法により、精子のG A L N T L 5 遺伝子の変異又はG A L N T L 5 タンパク質の発現異常を検出することにより、精子の運動性等の精子の能力を予測することができる。

本発明の方法でG A L N T L 5 遺伝子に異常があると判定された男性不妊症患者の精子は運動性が低下しており、該患者は精子無力症であると判断することができる。また、G A L N T L 5 遺伝子に異常がある精子において卵子との試験管内での自然受精の効率を低下させる可能性が考えられるので、顕微授精法の中でも、特に卵細胞質内精子注入法（ICSI）が有効である（表1マウスの実験から）。

G A L N T L 5 タンパク質の断片ポリペプチド及び抗G A L N T L 5 タンパク質抗体

本発明は抗G A L N T L 5 タンパク質抗体を含む。該抗体はG A L N T L 5 タンパク質のエピトープを含む断片ペプチドを用いて作製することができる。該断片ペプチドをマウス、ウサギ、モルモット、ラット、ヤギ、ブタ、ウマ等の動物に免疫することにより作製できる。G A L N T L 5 タンパク質のエピトープを含む断片ペプチドはポリペプチドN - アセチルガラクトサミン転移酵素遺伝子（pp - GalNAc - T）ファミリーに属するGalnt15 遺伝子以外の遺伝子がコードするタンパク質の構造に基づいて予測することができる。すなわち、例えばG A L N T L 10 タンパク質の立体構造を解析し、立体構造上分子の外側に位置しておりエピトープと認識される可能性の高い部位を含む断片を選択すればよい。選択した部位を含む断片とアミノ酸配列相同性の高いG A L N T L 5 タンパク質のアミノ酸配列を含む断片をG A L N T L 5 タンパク質のエピトープを含む断片ペプチドとして用いることができる。マウスG A L N T L 5 タンパク質のエピトープを含む断片ペプチドとして、配列番号4のアミノ酸配列からなるマウスG A L N T L 5 タンパク質の42番目～58番目のアミノ酸配列L L K K R S L G K N A H Q Q T R H（配列番号5）、配列番号4のアミノ酸配列からなるマウスG A L N T L 5 タンパク質の263番目～278番目のアミノ酸配列L R W D N V F A Y E L D G P E G（配列番号6）又は配列番号4のアミノ酸配列からなるマウスG A L N T L 5 タンパク質の342番目～358番目のアミノ酸配列S K A L S Q H R R A N Q S A L S（配列番号7）で表わされるアミノ酸配列からなる断片を挙げることができる。また、ヒトG A L N T L 5 タンパク質のエピトープを含む断片ペプチドとして、配列番号2のアミノ酸配列からなるヒトG A L N T L 5 タンパク質の54番目～72番目のアミノ酸配列Q Q I I Y G S E Q I P K P H V I V K R（配列番号8）、配列番号2のアミノ酸配列からなるヒトG A L N T L 5 タンパク質の282番目～297番目のアミノ酸配列F K W D N V F S Y E M D G P E G（配列番号9）及び配列番号2のアミノ酸配列からなるヒトG A L N T L 5 タンパク質の362番目～377番目のアミノ酸配列S K K Q T G K P S T I I S A M T（配列番号10）で表わされるアミノ酸配列からなる断片を挙げることができる。抗体はポリクローナル抗体もモノクローナル抗体も含む。ポリクローナル抗体は、例えば、配列番号5で表されるアミノ酸配列を含む断片ペプチド、配列番号6で表されるアミノ酸配列を含む断片ペプチド及び配列番号7で表されるアミノ酸配列を含む断片ペプチドを同時に免疫して得た3種類の断片ペプチドに対する抗体が混合した抗体組成物、及び配列番号8で表されるアミノ酸配列を含む断片ペプチド、配列番号9で表されるアミノ酸配列を含む断片ペプチド及び配列番号10で表されるアミノ酸配列を含む断片ペプチドを同時に免疫して得た3種類の断片ペプチドに対する抗体が混合した抗体組成物も含む。

本発明は、(i)配列番号5、6、7、8、9又は10で表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチド、(ii)配列番号5、6、7、8、9又は10で表わされるアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、アミノ酸残基16～30個、好ましくは17～30個、さらに好ましくは19～30個からなるアミノ酸配列からなるポリペプチド、(iii)配列番号5、6、7、8、9又は10で表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチドが有するエピトープを含むG A L N T L 5 タンパク質の断片ポリペプチドを含む。

また、配列番号5、6、7、8、9又は10で表わされるアミノ酸配列において1個又は2個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加された配列でありエピトープを有して

10

20

30

40

50

いるアミノ酸配列からなるポリペプチドも包含する。

上記ペプチドを用いて抗G A L N T L 5抗体であって、上記ペプチドを特異的に認識し、結合する抗体を作製することができる。該抗体はG A L N T L 5の検出に用いることができる。本発明はG A L N T L 5の上記エピトープに対する特異的抗体をも包含する。

本発明の抗体には、望ましい活性（例えば、G A L N T L 5タンパク質を認識して結合する活性）を減少させることなく、そのアミノ酸配列が修飾された抗体が含まれる。本発明の抗体のアミノ酸配列変異体は、本発明の抗体鎖をコードするDNAへの変異導入によって、またはペプチド合成によって作製することができる。そのような修飾には、例えば、本発明の抗体のアミノ酸配列内の残基の置換、欠失、付加及び/又は挿入を含む。抗体のアミノ酸配列が改変される部位は、改変される前の抗体と同等の活性を有する限り、抗体の重鎖または軽鎖の定常領域であってもよく、また、可変領域（フレームワーク領域およびCDR）であってもよい。CDR以外のアミノ酸の改変は、抗原との結合親和性への影響が相対的に少ないと考えられるが、現在では、CDRのアミノ酸を改変して、抗原へのアフィニティーが高められた抗体をスクリーニングする手法が公知である。

改変されるアミノ酸数は、好ましくは、10アミノ酸以内、より好ましくは5アミノ酸以内、最も好ましくは3アミノ酸以内（例えば、2アミノ酸以内、1アミノ酸）である。アミノ酸の改変は、好ましくは、保存的な置換である。本発明において「保存的な置換」とは、化学的に同様な側鎖を有する他のアミノ酸残基で置換することを意味する。化学的に同様なアミノ酸側鎖を有するアミノ酸残基のグループは、本発明の属する技術分野でよく知られている。例えば、酸性アミノ酸（アスパラギン酸およびグルタミン酸）、塩基性アミノ酸（リシン・アルギニン・ヒスチジン）、中性アミノ酸においては、炭化水素鎖を持つアミノ酸（グリシン・アラニン・バリン・ロイシン・イソロイシン・プロリン）、ヒドロキシ基を持つアミノ酸（セリン・トレオニン）、硫黄を含むアミノ酸（システイン・メチオニン）、アミド基を持つアミノ酸（アスパラギン・グルタミン）、イミノ基を持つアミノ酸（プロリン）、芳香族基を持つアミノ酸（フェニルアラニン・チロシン・トリプトファン）で分類することができる。

また、本発明の抗体の改変は、例えば、グリコシル化部位の数、位置、種類を変化させるなどの抗体の翻訳後プロセスの改変であってもよい。抗体のグリコシル化とは、典型的には、N-結合又はO-結合である。抗体のグリコシル化は、抗体を発現するために用いる宿主細胞に大きく依存する。グリコシル化パターンの改変は、糖生産に関わる特定の酵素の導入又は欠失などの公知の方法で行うことができる。さらに、本発明においては、抗体の安定性を増加させる等の目的で脱アミド化されるアミノ酸若しくは脱アミド化されるアミノ酸に隣接するアミノ酸を他のアミノ酸に置換することにより脱アミド化を抑制してもよい。また、グルタミン酸を他のアミノ酸へ置換して、抗体の安定性を増加させることもできる。本発明は、こうして安定化された抗体をも提供するものである。

G a l n t l 5 遺伝子が欠損した、ヒト男性不妊症非ヒトモデル動物

さらに本発明はG a l n t l 5 遺伝子が欠損した、ヒト男性不妊症非ヒトモデル動物を包含する。本発明のヒト男性不妊症非ヒトモデル動物はG a l n t l 5 遺伝子のノックアウト動物である。非ヒト動物は、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、イヌ、ネコ、サル等を含み、好ましくは個体発生までの時間が短く繁殖が容易なマウス又はラット等のげっ歯類動物である。

本発明のヒト男性不妊症非ヒトモデル動物において、精子に特異的に存在するG a l n t l 5 遺伝子に人為的に変異が導入され、G A L N T L 5 タンパク質の発現が異常になる。ここで、G A L N T L 5 タンパク質の発現が異常になるとは、G A L N T L 5 タンパク質が発現しないか、又は発現しても正常なG A L N T L 5 タンパク質の機能を保持していないことをいう。その結果、精子の運動性が低下し、精子の卵への到達が困難になることにより、受精ができなくなり、不妊症となる。G a l n t l 5 遺伝子の欠損とはG a l n t l 5 遺伝子が、正常なG A L N T L 5 タンパク質の発現が抑制されるように変異していることをいう。G a l n t l 5 遺伝子の変異は、G a l n t l 5 遺伝子の全部又は一部を欠失させ、あるいはG a l n t l 5 遺伝子の任意の部位に他の遺伝子が挿入若しくは置換

10

20

30

40

50

し、あるいはGalnt15遺伝子の全部が他の遺伝子で置換することにより導入することができる。変異は、公知の遺伝子工学の手法により、Galnt15遺伝子の塩基配列の全部を欠失させることにより導入することができる。また、Galnt15遺伝子の塩基配列の一部を欠失させたり、あるいはGalnt15遺伝子の塩基配列内に他の遺伝子を挿入したり、あるいはGalnt15遺伝子の塩基配列を部分的に他の遺伝子で置換したり、あるいはGalnt15遺伝子の全部を他の遺伝子で置換したりすることにより導入することができる。Galnt15遺伝子の一部の欠失やGalnt15遺伝子の塩基配列内に他の遺伝子の挿入、Galnt15遺伝子を部分的に他の遺伝子で置換することにより、プロモーターやエクソンが破壊され、GALNTL5タンパク質の発現が異常になる。変異の導入は、例えば、部位特異的変異導入法や相同組換えにより行うことができる。例えば、エクソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子等の薬剤耐性遺伝子やlacZ（ガラクトシダーゼ遺伝子）、CAT（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子等のレポーター遺伝子を挿入することによりエクソンを破壊することができる。また、イントロン部分にpolyA付加配列等の遺伝子の転写を終結させるエレメントを挿入してもよい。例えば、Galnt15遺伝子の第2エクソンをネオマイシン耐性遺伝子で置換すればよい。相同組換えは、上記の他の遺伝子を相同組換えによりGalnt15遺伝子の一部又は全部と置換できるように設計されたターゲティングベクターを用いて公知の方法で行うことができる。

本発明のGalnt15遺伝子に変異を有する、ヒト男性不妊症非ヒト動物モデルを作出するためには、上記ターゲティングベクターを用いて非ヒト動物の胚性幹細胞（ES細胞）のGalnt15遺伝子の少なくとも一方の対立遺伝子を破壊したGalnt15遺伝子欠損ES細胞を樹立する。ターゲティングベクターはエレクトロポレーション、マイクロインジェクション等の公知の方法でES細胞に導入することができる。ES細胞内のGalnt15遺伝子が欠損しているかは相同組換えに用いた薬剤耐性遺伝子やレポーター遺伝子をマーカーとして選択することができる。樹立したES細胞を非ヒト動物の胚に移植する。この際、胚としては胚盤胞が用いられる。移植は例えば胚盤胞マイクロインジェクション法により行うことができる。次いで、胚盤法を非ヒト動物の仮親である偽妊娠メス動物に移植し、キメラ動物を得る。生殖系列キメラ動物と正常動物との交配によりGalnt15遺伝子のヘテロ（Ht）欠損動物を得ることができる。ヘテロ欠損オス動物はGALNTL5タンパク質発現に異常を有するため不妊である。一方、ヘテロ欠損メス動物は妊性を有している。そこで、ヘテロ欠損メス動物と野性型（正常）オス動物を交配することにより、Galnt15遺伝子ヘテロ欠損動物を得ることができる。得られた動物がGalnt15遺伝子のヘテロ欠損動物であるかどうかは、尾を含む体細胞組織及び生殖細胞である精子あるいは卵子からDNAを抽出し、PCRやサザンハイブリット法によって遺伝子型を同定し、判別する。また、得られた動物の精子からRNAを単離して、RT-PCRやウエスタンブロットティング法で、動物の精子のGalnt15遺伝子とGALNTL5タンパク質の発現量を調べる方法等により確認することができる。なお、Galnt15遺伝子ヘテロ欠損マウスは精子の運動性が低下しているために不妊であり、更に精子の自然受精能が保持されていない可能性があるため、体外授精法のうち顕微授精（卵細胞質内精子注入法）（ICSI）によりGalnt15遺伝子ヘテロ欠損オスの精子とGalnt15遺伝子ヘテロ欠損メスの卵を授精させることにより、両方の対立遺伝子のGalnt15遺伝子が欠損したホモ欠損動物を得ることができる。

得られた男性不妊症モデル動物はヒト精子無力症のモデル動物として、治療薬の開発等に用いることができる。

Galnt15遺伝子のネガティブ選択マーカーとしての利用

現在ES細胞などに相同組換えによって遺伝子を組み込む際に、ポジティブ選択マーカーとしてネオマイシン遺伝子を、ネガティブ選択マーカーとして相同組換え領域の外側にチミジンキナーゼ（TK）遺伝子配列を挿入して、薬剤添加によって目的とした遺伝子相同組換え体を得る手法がとられている。Galnt15遺伝子が発現するとゴルジ体の構造、機能に障害が生じ、発現した細胞が細胞死を起こす。従って、Galnt15遺伝子

10

20

30

40

50

をネガティブ選択マーカとして利用することができる。例えば、相同組換えの際に、相同組み換え領域の外側に発現誘導型の Galnt15 遺伝子を導入することで、目的の遺伝子相同組み換えが起きなかった組み換え体の細胞は残された Galnt15 遺伝子の発現によって死滅する。Galnt15 遺伝子を相同組換えの際に用いるターゲティングベクターに組み込めばよい。本発明は、Galnt15 遺伝子をネガティブ選択マーカとして利用する方法、及び Galnt15 遺伝子からなるネガティブ選択マーカを包含する。Galnt15 遺伝子としては、ヒト GALNTL5 遺伝子、マウス Galnt15 遺伝子の他、他種動物由来の Galnt15 遺伝子を用いることができる。マウス Galnt15 遺伝子としては配列番号 3 に表す塩基配列からなる遺伝子を用いることができ、ヒト GALNTL5 遺伝子としては配列番号 1 に表す塩基配列からなる遺伝子を用いることができる。また、配列番号 3 に表す塩基配列において 1 又は複数の塩基が欠失、置換、挿入又は付加された塩基配列であって、該塩基配列がコードするタンパク質が GALNTL5 タンパク質の機能を有する遺伝子、並びに配列番号 1 に表す塩基配列において 1 又は複数の塩基が欠失、置換、挿入又は付加された塩基配列であって、該塩基配列がコードするタンパク質が GALNTL5 タンパク質の機能を有する遺伝子もネガティブ選択マーカ遺伝子として用いることができる。

10

癌治療

培養細胞内での GALNTL5 タンパク質強制発現の結果から、GALNTL5 タンパク質は精子形成過程の細胞以外では、ゴルジ体を消失させ、細胞を死滅させる細胞性毒素となり得る物質であることが示された。実際に様々な癌由来を含む培養細胞で、Galnt15 遺伝子の発現は全く観察されていない。従って、GALNTL5 遺伝子を癌細胞特異的に死滅させるための治療遺伝子として用いることができる。GALNTL5 遺伝子を癌治療に用いるためには、元来ヒトゲノムにコードされている GALNTL5 遺伝子の発現をがん細胞のみに選択的に発現させればよい。例えば、GALNTL5 遺伝子の発現を活性化する薬剤として、ヒストン脱メチル化剤などの使用が有効と考えられる。また、GALNTL5 遺伝子をベクターに導入し、該ベクターを用いて GALNTL5 遺伝子を癌細胞特異的にデリバリーし癌細胞中で特異的に発現させてもよい。遺伝子を被験体へ導入する方法として、ウイルスベクターを用いる方法及び非ウイルスベクターを用いる方法があり、種々の方法が公知である（別冊実験医学、遺伝子治療の基礎技術、羊土社、1996；別冊実験医学、遺伝子導入 & 発現解析実験法、羊土社、1997；日本遺伝子治療学会編、遺伝子治療開発研究ハンドブック、エヌ・ティー・エス、1999）。

20

30

遺伝子導入のためのウイルスベクターとしては、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス等のウイルスベクターを用いた方法が挙げられる。癌細胞への GALNTL5 遺伝子デリバリーは、例えば癌細胞特異的な細胞表面タンパク質に特異的に結合し得る化合物をベクターに結合させることにより達成することができる。本発明は GALNTL5 遺伝子を含む癌治療剤を包含する。該癌治療剤は、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤、賦形剤を含む。たとえば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、ステアリン酸マグネシウムなどが使用される。注射用の水性液としては、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが使用され、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、プロピレングリコールなどのポリアルコール、非イオン界面活性剤などと併用しても良い。油性液としては、ゴマ油、大豆油などが使用され、溶解補助剤としては安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用しても良い。その投与量は、症状、年齢、体重などによって異なるが、数日又は数週間又は数ヶ月おきに 1 回あたり、0.001mg ~ 100mg を皮下注射、筋肉注射、又は静脈注射によって投与すればよい。

40

実施例において、各材料の調製及び分析は以下の方法で行った。

1. GALNTL5 cDNA の同定

ヒト GALNTL5 cDNA (Refseq アクセッション番号: NP_660335) を本発明者がクローニングしたヒト pp-GalNAc-Ts をクエリーとして用い、ヒト expressed sequence tag の BLAST サーチにより同定した。全長マウス Galnt15 cDNA クローンは、マウス精巣 QUICK-Clon

50

e^TM cDNA (クロンテック社) を鋳型に、5' - ATGAAAGTGTCATAA
TTCAGGG - 3' (配列番号11) 及び5' - CTAGAAACGATTTTTTTT
TCCTTTTCCTCTCTGTGTTAAATGG - 3' (配列番号12) のPCR
プライマーを用いて増幅させ、作成した。

2. ヒト GALNTL5 転写産物の定量的分析

定量的リアルタイムPCRはTaqMan Universal PCR Master
Mix及びABI PRISM 7700 Sequence Detection
System (Applied Biosystems Japan Ltd.) を用
いて行った (Iwai, T. et al. J Biol Chem 277, 12802
- 9 (2002); Togayachi, A. et al. J Biol Chem 2
76, 22032 - 40 (2001); Wang, H. et al. Biochem B
iophys Res Commun 300, 738 - 44 (2003))。用いたP
CRプライマーの配列は、5' - GAAGCTTGGGCATCGAAA - 3' (配列番
号13) 及び5' - GCGGGCTGGGTAATGTT - 3' (配列番号14) であつ
た。

10

3. In situハイブリダイゼーション分析

センス及びアンチセンスRNAプローブを直鎖状マウス全長Galntl5 cDNA
から作製し、ジゴキシゲニン-UTP (Roche Molecular Bioche
micals) を用いてpBluescript中にサブクローニングした。成体マウス
精巢の切片のin situハイブリダイゼーションは藤原らの方法 (Fujiwara
, Y. et al. Proc Natl Acad Sci USA 91, 12258
- 62 (1994)) に従って行った。

20

4. 変異マウスの作出

マウスGalntl5遺伝子ゲノムBACクローンRP23 - 229N3はResea
rch Genetics, Inc. より入手した。ターゲティングベクターを構築しG
alntl5遺伝子の第2エクソンをネオマイシン抵抗性遺伝子で置換した。20µgの
プラスミドをネオマイシン抵抗性線維芽細胞中で培養したE14胚性幹細胞中にエレクト
ロポレーションにより導入した。G418 (Gibco) 及びガンシクロビル (WAKO
) を用いた二重薬剤選択後、それぞれのコロニーをサザンプロッティング及びPCRによ
り分析し相同組換えが生じたことを確認した。SpeIによる消化の後、5'プローブに
よりノーマルアレルから19.8kbpフラグメントを検出し、標的アレルから19.8
kbpフラグメント及び14.6kbpフラグメントを検出した。胚性幹細胞及びマウス
の尾について、PCR及びDNeasy Blood & Tissue Kit (QI
AGEN) により抽出したゲノムDNAを用いて遺伝子型を決定した。野性型アレルはマ
ウスGalntl5の第2エクソンに隣接する配列からなるプライマー6605A (5'
- GAGACCTTAGCTTGAACAACAACAC - 3' (配列番号15) 及び
プライマー5970S (5' - GATTTCCAGGTTCACTGCAATCCG -
3' (配列番号16)) を用いて検出した。変異体アレルはneo遺伝子の配列からなる
プライマーNeoLeft25 (5' - TGC GCTGACAGCCGGAACAGGC
GG - 3' (配列番号17)) 及び3.4kbpの相同領域の3'末端の外側の第3イン
ترون中の配列からなるプライマーAvrHind2 - 2 (5' - TATACCAACA
TTGAATGGATATAGA - 3' (配列番号18)) を用いて同定した。

30

40

本発明において、得られたGalntl5遺伝子ヘテロ(Ht)欠損マウスをHtマウスと呼び、野性型マウスをWtマウスと呼ぶ。また、Htマウスの精子をHtマウス精子と呼び、Wtマウスの精子をWtマウス精子と呼ぶ。

5. 円形精子細胞の注入

精子形成細胞をWtオスマウス及びHtオスマウスの精巢から集めた (Ogura, A
. et al. Biol Reprod 48, 219 - 25 (1993))。伸長精子
細胞をHt成熟卵母細胞の卵細胞質中に圧電駆動マイクロマニピュレータを用いて直接注
入した。培養48時間後の4~8細胞の大きさの胚を0.5日目に偽妊娠メスの卵管に移

50

した。

6. 精子運動性アッセイ

精子の運動性を評価するために、精子サンプルをマイクロスライド(0.1×2.0 mm)に載せた。精子運動性パラメータを300以上の精子を含むサンプル中でIVOS TOX自動化システム(Hamilton Throne)を用いて測定した。

7. 抗体

免疫染色等に以下の抗GALNTL5タンパク質抗体を用いた。

マウスGalntl5 mRNA配列から推定されるアミノ酸配列に基づいて3種類のポリペプチド(LLKKRSLGKNAHQQRH(配列番号5)、LRWDNVFAYELDGPEG(配列番号6)、SKALSQHRANQSALS(配列番号7))を合成した。また、ヒトGALNTL5タンパク質のアミノ酸領域に対応した3種類のポリペプチド(QQIIYGSEQIPKPHVIVKR(配列番号8)、FKWDNVFSYEMDGPEG(配列番号9)及びSKKQTGKPSIIISAMT(配列番号10))を合成した。各ポリペプチドのN末端にシステインを付加し、キャリアーとコンジュゲートした。抗マウスGALNTL5タンパク質抗体はモルモットを用いて、抗ヒトGALNTL5タンパク質抗体はラビットを免疫して作製した。得られた抗血清をアフィニティーカラムを用いて精製した。抗ヒトGALNTL5タンパク質抗体は最終的にProtein Aセファロースカラムを用いて精製した。 - チューブリン、ヘキソキナーゼI(HXKI)、フォスフォグリセレートキナーゼ1/2(PGK1/2)、アルドラーゼA、NSF、ACE、ユビキチン、アクロシン、Rab27a、UBC3B及びmyosin Vaに対する抗体は市販の抗体を用いた。

10

20

8. ウエスタンブロッティング

マウス精子を精巣上体尾部(cauda epididymis)から集め、PBS(pH7.4)に懸濁しMakler Counting Chamber(Sefi-Medical Instruments, Ltd.)を用いて計数した。ヒト精子は数回PBSで洗浄した精液から集めた。5×10⁶個の精子からRIPA溶解バッファー(25mM Tris-HCl, pH7.6; 150mM NaCl; 1% NP-40; 1% sodium deoxycholate; 0.1% SDS)を用いてボルテックスによりタンパク質溶解物を得た。精巣は溶解バッファー中でホモジナイズし粗溶解物を得た。得られた溶解物を用いてウエスタンブロッティングを行った。

30

9. 質量分析

5×10⁵個の精子を10% SDS-PAGE変性ゲル上で電気泳動した。タンパク質バンドは銀染色した。ゲルからタンパク質を溶出しトリプシン処理し、質量分析(Ultraflex, Bruker Daltonics, Bremen, Germany)によりペプチドの配列を分析し、MS-Fitサーチプログラムを用いて分析した(<http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>)。

10. 免疫蛍光顕微鏡観察

pAcGFP-C1 GFPレポーターベクター(Clontech)を用いてGFP-mGalntl5構築物を作出した。カバースリップ上で増殖させたCOS1細胞を、リポフェクタミン2000を用いてGFP-mGalntl5プラスミドDNAにより一過性にトランスフェクトした。トランスフェクトの48時間後に細胞をメタノール中で2分間固定し、次いで室温で0.1% Triton X-100処理を1分間行った。最終的に細胞を5%ウシ血清アルブミンを含むPBSでブロックした。一次抗体としてカルレティキュリン(calreticulin)、GM130及びGolgin-97に対する抗体を用い、Alexa594で標識した2次抗体を用いた。上記カバースリップをスライドガラス上に載せVECTASHIELDを用いてDAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)染色し、核を対比染色した。蛍光顕微鏡及びデジタルカメラにより撮像した。

40

11. 免疫細胞化学

50

Miki, K. et al. Dev Biol 248, 331-42 (2002) に記載の方法で、精巢上体尾から集めた精子をカバースリップ上に載せ、PBSで洗浄後、精子をAlex Fluor 488又はAlex Fluor 594とコンジュゲートした二次抗体並びにフルオレセインイソチシアネートとコンジュゲートしたPNAと室温で30分間インキュベートした。蛍光顕微鏡(OLYMPUS)を用いて免疫染色を観察した。

12. ヒト個体の組織のPCR及びDNA配列分析

DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)を用いて、ゲノムDNAを抽出し、得られたゲノムDNA 20ngを第4エクソンのプライマー(5'-ACACAGTCTCAGGAAGAGC-3' (配列番号19及び5'-ATACCTCAAGTGCCATCGGGG-3' (配列番号20)及びTakara Taq (登録商標)(TAKARA BIO INC.)を混合しPCR増幅した。30サイクル(94 で20秒、60 で30秒、72 で1分)の増幅を行い、アガロースゲルから産物を精製し、配列決定し、pGEM(登録商標)-TEasy Vector (Promega)中にサブクローニングした。

【実施例1】

【0007】

Galnt15 遺伝子改変マウスの作成

In silicoスクリーニング(Narimatsu, H. Glycoconj J 21, 17-24 (2004).)により、複数のヒトUDP-GalNAc 遺伝子のクローニングを行い、GANNTL5タンパク質をコードする新規のpp-GalNAc-T 遺伝子を同定した。図1-1にヒトGALNTL5タンパク質(443アミノ酸)の構造を示す。比較のためにファミリータンパク質であるGALNT12(581アミノ酸)の構造も示す。GALNTL5タンパク質はGalNAc-T 遺伝子ファミリーのタンパク質に特有のC末端のレクチンドメインを欠失しているが、pp-GalNAc-T 遺伝子ファミリーのタンパク質が有している典型的な他のモチーフ、すなわち膜貫通ドメイン(TM)、ステム領域(Stem)及びGT1モチーフ及びGal/GalNAc-Tモチーフからなる触媒ユニットを有している。

図1-2に、23種類のヒト組織及び2種類のヒト細胞株におけるGALNTL5 遺伝子転写物の定量的解析の結果を示す。GALNTL5 遺伝子転写物の量はGAPDHでノーマライズし、1µgのトータルRNA中のGAPDHに対するコピー数で示す。図1-2に示すようにGALNTL5 mRNAの発現はヒト精巢に限られていた。

次いで、精子形成等におけるGalnt15 遺伝子の機能を明らかにすることを目的に、マウスゲノムに存在するGalnt15 相同遺伝子に着目し、上記の「7. 抗体」に記載の方法で、マウスGALNTL5タンパク質を特異的に認識する抗体を作成し、GALNTL5タンパク質の局在をマウス精巢切片および精巢上体精子を使って明らかにした。

成体マウスの精巢を材料にし、マウスGalnt15 オーソログ遺伝子のアンチセンスRNAを用いたin situハイブリダイゼーションを行った。図1-3aがセンス鎖を用いた結果、図1-3bがアンチセンス鎖を用いた結果を示す。図1-3cはアンチセンス鎖を用いた像の拡大図を示す。図1-3に示すように、Galnt15 mRNAは主に円形精子細胞及び伸長精子細胞で発現しており、精細管の内被細胞では発現していなかった。

精細管の内被細胞は、精原細胞及び体細胞であるセルトリ細胞を含んでいる。マウス精巢切片の免疫組織化学によりGALNTL5タンパク質の局在を調べた。すなわち、マウス成体の精巢の切片を抗GALNTL5タンパク質抗体で免疫染色し、ヘキスト染色により対比染色した。結果を図2に示す。図2a、2b、2cはそれぞれ精子形成過程のステージIII、VI及びVIIの結果を示す。図2d、2e、2f、2gはそれぞれ、抗GALNTL5タンパク質抗体染色、PNA染色及びDAPI染色の拡大図を示し、図2gはマージした像を示す。PNA染色により先体(アクロソーム)が染色され、DAPI染色により核が染色される。図2に示すように、GALNTL5タンパク質は、主に細胞質

10

20

30

40

50

及び分化精子細胞の先体（アクロソーム）の周囲に局在していた（図2 a - c）。GALNTL5タンパク質はまた精巣上体へ放出直前のstep - 16精子細胞の残渣小体中にも観察された（図2 c）。精巣上体精子中において、GALNTL5タンパク質は尾部中片部（middle-piece）では微量に存在するか、頭部 - 尾部結合部位（head-tail coupling apparatus）周囲の精子頸部に集積していた（図2 d）。これらの図により、GALNTL5タンパク質は減数分裂後の精子形成過程の精子細胞質内に局在し、精巣上体成熟精子においては、精子尾部中間部に弱く点在する一方で、精子頸部に強く蓄積されることが示された（図2）。以上のGALNTL5タンパク質の精子形成過程の精子細胞内局在等から、Galnt15遺伝子が精子形成に寄与している可能性が強く示された。

10

そこで、9個のエクソンから構成されるマウスGalnt15遺伝子の中で、翻訳開始部位がコードされている第2エクソンをネオマイシン耐性遺伝子に変換するベクターを構築した。図3 - 1にベクターの構造を示す。図3 - 1上はマウスGalnt15遺伝子を含む9個のエクソンの最初の3個を有する正常アレルを示す。図3 - 1中央は選択マーカーとしてネオマイシン耐性遺伝子（NEO）及びチミジンキナーゼ遺伝子（TK）を含むターゲティングベクターの構造を示す。相同組換えは第1及び第3エクソンをそれぞれ含む6.0 kbpの領域及び3.4 kbpの領域で行った。図3 - 1下は翻訳開始領域を含む第2エクソンをNeoカセットで置換した標的アレルを示す。図3 - 1において番号を付したボックスはエクソンを、点線は相同DNA領域を、バー及び矢印は、それぞれ5'プロンプ及びPCRプライマー（6605A、5970S、NeoLeft25及びAvrHind2-2）の位置を示す。制限酵素部位はA（Avr I I）、H（Hind I I I）、P（Pml I）及びS（Spe I）で表される。

20

上記のターゲティングベクターを用いて相同組換えによりGalnt15遺伝子欠損ES細胞を樹立し、ゲノムDNAの遺伝子型をサザンプロットにより決定した。Spe Iで消化し、正常アレル及び標的アレルとして19.8 kb及び14.5 kbのフラグメントを検出した（図3 - 2）。方法の欄の「4. 変異マウスの作出」に記載した4つのプライマーを用いたPCRによっても上記ES細胞の遺伝子型を決定した。正常アレルから0.7 kbのDNAフラグメントが増幅され、標的アレルから4.4 kbのDNAフラグメントが増幅された（図3 - 3）。また、マウスの尾からDNAを精製しPCRにより遺伝子型を決定した（図3 - 4）。さらに、Wtマウス及びHtマウスの精巣上体精子のGALNTL5タンパク質量をウエスタンブロッティングにより測定した。図3 - 5に示すように、Htマウス精子のGALNTL5タンパク質の量はWtマウス精子の半分以下であった。

30

方法の欄の「4. 変異マウスの作出」に記載した方法で樹立した遺伝子組み換えES細胞をマウス胚に導入する手法で、Galnt15遺伝子欠損マウスの作成を試み、導入した遺伝子組み換えES細胞が生殖細胞に分化したと推測される7匹のキメラオスマウス個体を獲得することに成功した。しかし、すべてのキメラオスマウスが妊性を示さないことから、遺伝子組み換えマウス系統を確立することは困難を極めた。そこで遺伝子組み換えES細胞が導入されたキメラメスマウスを正常オスマウス（C57BL/6J）と交配しGalnt15遺伝子ヘテロ（Ht）欠損マウスの仔を産出することに成功した。Galnt15遺伝子Htメスマウスは妊性に異常が観察されないことから、以後Galnt15遺伝子Htメスマウスと正常オスマウスとの交配でGalnt15遺伝子欠損Htマウスの系統を維持することとした。図4 - 1にオスマウスの妊性を検討した結果を示す。図4 - 1はGalnt15 + / + Wtマウス、Galnt15 + / - Htオスマウス、及びGalnt15 + / - Htメスマウスの妊性を示す。図に示すように、系統が確立されたGalnt15遺伝子Ht欠損オスマウスはキメラオスマウス同様、妊性を示さなかった。Htマウスが雄性不妊である原因を調べるために、精子観察を試みた結果、頭部形状の異常頻度が高いことがわかった。図4 - 2 a及び4 - 2 bはWtマウス又はHtマウスの精巣上体の精子の形態を示す。図4 - 2 b中の矢はHtオスマウスの変形した精子を示す。また、図4 - 3 a ~ 図4 - 3 eにWtマウス精子及びHtマウス精子の精子数、異常率、運

40

50

c - Tタンパク質と同様にゴルジ体に局在すると予想されたが、実際に抗マウスGALNTL5タンパク質抗体によるマウス精巢切片を用いた免疫染色では、GALNTL5タンパク質が形態形成過程の精子細胞内ゴルジ体に局在する像は観察されなかった。そこで、GALNTL5タンパク質の細胞内局在を確認するために、GFPタンパク質タグを付加したGALNTL5タンパク質をCOS1細胞に強制発現することを試みた。一過性の発現用のプラスミドは以下の方法で作製した。一般に市販されているpAcGFP-C1 GFPレポーターベクター(クローンテック社)にマウスGalntl5のcDNAを導入してGFP-Galntl5遺伝子発現ベクターを構築した。細胞への導入法は方法の欄の「10.免疫蛍光顕微鏡観察」に記載した通りであった。GFP-mGalntl5プラスミドDNAでトランスフェクトしたCOS1細胞を小胞体マーカーであるカルレティキュリン(Calreticulin)、cisゴルジ体マーカーであるGM130、transゴルジ体マーカーであるGolgin-97及びユビキチンに対する抗体を用いて蛍光免疫染色した。図8にGALNTL5タンパク質を強制発現させたCOS1培養細胞中のCalreticulin、GM130、Golgin-97、ユビキチンの細胞内局在を示す。図8a、8b、8c及び8dは、それぞれCalreticulin、GM130、Golgin-97、ユビキチンの染色の結果を示す。

酵素活性が確認され、ゴルジ体での局在が報告されているpp-GalNAc-T遺伝子ファミリーに属するGALNT3タンパク質がゴルジ体に局在することが確認できた。その一方で、GALNTL5タンパク質は小胞体(ER)、ゴルジ体に局在せず、核周辺部の細胞内に留まることが示された(図8)。興味深いことに、GALNTL5タンパク質を強制発現した細胞は、Calreticulin(ERマーカー)は正常であるにもかかわらず、ゴルジ体マーカーの消失が観察された(図8a)。これまで安定したGALNTL5タンパク質発現細胞株の樹立を試みてきたが、成功に至っておらず、本実施例によってGALNTL5タンパク質発現はゴルジ体の構造、機能維持に障害を生じさせ、細胞を死滅させる効果を持つ、細胞にとって毒性を示す物質であることが明らかになった。一方、GALNTL5タンパク質の発現が観察される精子細胞は、精子形成過程でゴルジ体は収縮し、ゴルジ体は最終的に精子細胞から残渣小体によって取り除かれる細胞内器官であることから、GALNTL5タンパク質が精子形成過程の精子細胞内でのゴルジ体収縮、あるいはゴルジ体から精子細胞特有の膜構造体、先体へのタンパク質輸送切り替えを担っている可能性が推測された。実際に、GFPタグ付きGALNTL5タンパク質のシグナルが細胞内小胞あるいは顆粒状の形態で観察され(図8)、興味深いことに、GALNTL5タンパク質によって形成される小胞にユビキチンシグナルが梱包されている像が観察された(図8d)。

以上の培養細胞での結果は、GALNTL5タンパク質が精子形成過程における精子細胞特有の膜構造体である先体へのタンパク質輸送に寄与していることを示唆している。

Galntl5遺伝子のノックダウンはユビキチン化したタンパク質を含む先体の構成タンパク質を損傷することが予測された。そこで、ゴルジ体から精子細胞特有の膜構造体である先体に輸送されるアクロシン(Acrosin)を代表とする先体タンパク質の局在量をWtマウス精子とHtマウス精子間で比較した。

図9~14に結果を示す。

図9-1にはユビキチンの局在を示す。図9-1a及びbは、抗ユビキチン抗体を用いて検出した精巢上体精子のユビキチンの局在を示し、図9-1aがWtマウス精子の結果を、図9-1bがHtマウス精子の結果を示す。図9-2は、精巢上体精子溶解物をチューブリン、ユビキチン、アクロシン、NSF及びtACEに対する抗体を用いて行ったウェスタンブロッティングで検出したマウス精巢上体精子中の先体タンパク質の発現を示す。予測されたとおり、ユビキチンのシグナルはHtマウスの精子の先体では欠失していた。

図10はWtマウス精子とHtマウス精子の抗アクロシン抗体を用いて測定したアクロシンの局在を示す。図10a及びbはWtマウス精子の結果を、図10c及びdはHtマウス精子の結果を示す。アクロシンの発現はHtマウス精子で少なかった。図11はWt

10

20

30

40

50

マウス精子とH tマウス精子の抗N S F抗体を用いて測定したN S Fの局在を示す。図1 1 a及びbはW tマウス精子の結果を、図1 1 c及びdはH tマウス精子の結果を示す。N S FはW tマウス精子の頭部で検出されたが、H tマウス精子の頭部では少なかった。図1 2はW tマウス精子とH tマウス精子の抗t A C E抗体を用いて測定したt A C Eの局在を示す。図1 2 a及びbはW tマウス精子の結果を、図1 2 c及びdはH tマウス精子の結果を示す。W tマウス精子ではアクロゾームの外膜に局在が認められ、尾部の中央部では少なかった。H tマウス精子では頭部及び尾部の細胞膜に多く局在していた。

図1 3はW tマウス精子及びH tマウス精子の精巢上体の精子のユビキチン及びG A L N T L 5タンパク質の二重染色並びにユビキチン及びU B C 3 B (u b i q u i t i n - c o n j u g a t i n g e n z y m e E 2) の二重染色の結果を示す。図1 3 aはW tマウス精子のユビキチン及びU B C 3 Bの二重染色の結果であり、U B C 3 Bが精子頸部のみに局在していた。ユビキチンは先体のみでなく頭部 - 尾部結合部位領域に局在していた。図1 3 bはH tマウス精子のユビキチン及びU B C 3 Bの二重染色の結果であり、尾部でU B C 3 Bの異常な局在が認められた。ユビキチンは頭部 - 尾部結合部位領域においても先体においても局在していなかった。図1 3 cはW tマウス精子のユビキチン及びG A L N T L 5タンパク質の二重染色の結果であり、ユビキチンは先体と頭部 - 尾部結合部位領域の両方で発現しており、ユビキチンとG A L N T L 5タンパク質の強い共局在は頭部 - 尾部結合装置のみで強く認められた。図1 3 dはW tマウス精子のユ B C 3 B及びG A L N T L 5タンパク質の二重染色の結果であり、U B C 3 Bは精子頸部のみに局在していた。この結果はG A L N T L 5タンパクが精子の頭部 - 尾部結合部位領域中でユビキチン及びU B C 3 Bと共に局在していることを示し、G A L N T L 5タンパク質が頭部 - 尾部結合部位領域のユビキチン - プロテアソーム (u b i q u i t i n - p r o t e a s o m e) タンパク質の蓄積に関与していることを示唆する。

図1 4はW tマウス精子におけるG A L N T L 5タンパク質並びにR a b 2 7 a若しくはM y o s i n V aの共局在を示す。図1 4 aはW tマウス精子におけるG A L N T L 5タンパク質及びR a b 2 7 aの局在を示す。核はD A P Iで染色した。図に示すようにG A L N T L 5タンパク質及びR a b 2 7 aは頭部 - 尾部結合部位領域及びm i d d l e - p i e c eの細胞質で共局在していた。図1 4 bはW tマウス精子におけるG A L N T L 5タンパク質及びM y o s i n V aの局在を示す。図に示すようにG A L N T L 5タンパク質及びM y o s i n V aは頭部 - 尾部結合部位領域に共局在していた。図1 4 cはW tマウスの精巢精子におけるG A L N T L 5タンパク質及びR a b 2 7 aの局在を示す。図に示すようにG A L N T L 5タンパク質及びR a b 2 7 aは伸長精子細胞の細胞質で共局在していた。アクチン系v e s i c l e - m o t o rタンパク質複合体はM y o s i n V a及びR a b 2 7 a / bを含む。図1 4に示すように、R a b 2 7 a及びM y o s i n V aとG A L N T L 5タンパク質は主に精子の頭部 - 尾部結合部位領域に共局在していた。また、精巢においてR a b 2 7 aとG A L N T L 5タンパク質は伸長精子細胞の細胞質に共局在していた。

上記のようにH tマウス精子ではアクロゾーム (先体) タンパク質の局在量が顕著に減少していることが明らかになった (図9 - 1 ~ 図1 2) 。更に、機能が未だ明らかになっていない精子細胞特異的な細胞内構造体C h r o m a t o i d b o d y (C B) も膜輸送機構によって、成熟精子頸部に輸送され、C Bに梱包されるu b i q u i t i n - p r o t e a s o m eタンパク質が成熟精子頸部に蓄積されることがラット精子の研究で明らかになっている。マウス精子でも同様にu b i q u i t i n - p r o t e a s o m eタンパク質が精子頸部に蓄積されることが確認されたが、H tマウス精子ではu b i q u i t i n - p r o t e a s o m eタンパク質のシグナルが消失あるいは異所的に局在していることが観察された (図1 3 a - b) 。

ゴルジ体から先体へのタンパク質輸送、C Bの精子頸部への輸送は、M y o s i n V a及びR a b 2 7 a / bを含むアクチン系v e s i c l e - m o t o rタンパク質複合体が寄与していることが報告されている。精巢内精子形成過程、更には成熟精子頸部において内在性G A L N T L 5タンパク質がM y o s i n V a及びR a b 2 7 a / bを含むア

10

20

30

40

50

クチン系 vesicle-motor タンパク質複合体と共局在することが観察されたことから (図 14)、GALNTL5 タンパク質は糖転移酵素として機能するのではなく、vesicle-motor タンパク質複合体の一部として、成熟精子形成に必須であるタンパク質の精子細胞内分布を制御する新規の機能を有していることが強く示唆された。

【実施例 3】

【0009】

ヒト男性不妊症の検査

Galntl5 遺伝子 Ht 欠損マウス精子細胞で、局在量に異常が検出された GALNTL5 タンパク質を含む 5 つの精子タンパク質の抗体を用い、ヒト精子形成障害と診断されたヒト精子でのタンパク質量の変動を検出した。検出は GALNTL5、tACE、NSF 及び HXK に対する抗体を用いたウエスタンブロッティングにより行った。tubulin 量をコントロールとした。

図 15 - 1 に結果を示す。図 15 - 1 は精子無力症と診断された患者を含む 10 個体から採取した精子の構成タンパク質の検出の結果を示す。また、表 2 に精液の臨床分析の結果を示す。

【表 2】

表 2

サンプル No.	精液容積 (ml)	精子濃度 ($\times 10^6/ml$)	精子運動性 (%)	正常形態精子 (%)	正常/異常
1	4.9	86	55.8	23.1	正常
2	4.1	46	56.5	20.9	正常
3	4.1	252	68.3	22.2	正常
4	2.4	148	58.1	20.9	正常
5	3.0	170	5.2	17.9	精子無力症 Asthenozoospermia
6	4.4	14	50.9	13.3	精子減少症 Oligozoospermia Asthenozoospermia/奇形精子症
7	1.9	96	8.3	5.7	Teratozoospermia
8	2.3	15	6.5	2.0	Oligo/Asthenozoospermia/Teratozoospermia
9	3.9	30	16.7	5.8	Asthenozoospermia/Teratozoospermia
10	3.0	212	21.4	9.5	Asthenozoospermia

表 2 に示すように、精子無力症と診断された患者精子の中に、GALNTL5 遺伝子 Ht 欠損マウス精子における減少パターンと酷似した患者を見出すことができた。図 15 - 1 は 10 個体 (レーン 1 ~ 4 : コントロールの正常精子、レーン 5 ~ 10 : 不妊症患者精子) の精子の構成タンパク質を示し、レーン 5 の患者において GALNTL5 タンパク質および関連タンパク質の減少が観察された。更に、「12. ヒト個体の組織の PCR 及び DNA 配列分析」に記載の方法により、GALNTL5 タンパク質の減少が見られた患者精子 (図 15 - 1 のレーン 5 の患者) のゲノム DNA 解析を行った。すなわち、異常精子に対するヒト GALNTL5 遺伝子の変異の影響を評価するために、9 個のエクソンに対するフランキングプライマーを設計し異常精子から DNA フラグメントを増幅し、PCR 産物について直接配列決定を行った。図 15 - 2 に結果を示す。図 15 - 2 は第 3 イントロンと第 4 エクソンの間の部位の DNA 配列クロマトグラムを示す。正常 GALNTL5 遺伝子の第 3 イントロンと第 4 エクソンの間に制限酵素部位 PstI が存在し、レーン 5 の患者の精子から PCR で得られた 56 クローン中 49 クローンは PstI を有していたが、56 クローン中 7 クローンにおいてはスプライシングアクセプター部位に点変異が認められた。図 15 - 3 は 9 個のエクソンを有する GALNTL5 遺伝子中の変異の位置を

示す。図15-2及び図15-3の星印は変異の位置を示す。図15-2及び図15-3に示すように、GALNTL5遺伝子の第3イントロンと第4エクソンのスプライシングアクセプター部位に変異が同定された。該変異により第4エクソンがスキップされフレームシフトにより第5エクソン中に新たなストップコドンが出現する。興味深いことに、同定されたDNA変異は、体細胞由来である血液細胞には存在せず、精子細胞のみに存在していた。図15-4aは精子無力症と診断された患者を含む6人の精子のゲノムDNAの第4エクソン周辺から増幅した790bp領域のDNAのプロットの結果を示す。左図は制限酵素で消化しない場合の結果であり、右図はPstI制限酵素で消化した場合の結果である。図15-4aに示すように上記のレーン5の患者にのみにおいてPstI制限部位の変異が認められた。図15-4bは図15-4aで用いた6人の患者の血液細胞の結果を示す。血液細胞では上記のレーン5の患者においても変異は認められなかった。この結果は、変異が精子幹細胞内で生じたことを示唆する。この結果は、ヒトGALNTL5遺伝子における変異がGALNTL5タンパク質発現量低下による精子無力症の原因であることを示す。

10

【実施例4】

【0010】

ヒト男性不妊症の検査(その2)

精子無力症と診断された患者5個体から採取した精子について、実施例3と同様に構成タンパク質の検出を行った。

結果を図16-1に示す。図16-1に示すように、レーン5の患者においてGALNTL5タンパク質および関連タンパク質の減少が観察された。

20

GALNTL5タンパク質の減少が観察された患者(図1のレーン5の患者)の精子、及び血液細胞を用いて、実施例3と同様の方法で、GALNTL5遺伝子をPCRによって各エクソンを増幅させ、塩基配列を決定した。図16-2に結果を示す。図16-2は第6エクソンの部位のDNA配列クロマトグラムを示す。図16-2に示すように、第6エクソンにおいて、精子においても血液細胞においてもゲノム中に一塩基の欠失を観察することができた。

図16-3は9個のエクソンを有するGALNTL5遺伝子中の変異の位置を示す。図16-3の星印は変異の位置を示す。図16-3に示すように、GALNTL5遺伝子の第6エクソンの変異により第6エクソン中に新たなストップコドンが出現する。

30

これらの結果から、ヒトGALNTL5遺伝子変異をヘテロで保持する患者が精子無力症を発症することが示された。

【産業上の利用可能性】

【0011】

精子形成障害による不妊症と診断された患者精子からタンパク質を抽出し、成熟精子形成に必須である様々なタンパク質量を特異的抗体によるウエスタンブロット法で定量することは、精子形成障害の原因因子を同定する上で、極めて有効な手段であり、特に直接精子の運動性に関与するGALNTL5遺伝子の発現を定量することにより精子無力症を検出することができる。本手法は精子形成障害による男性不妊症の原因因子を的確に同定する、これまでに確立されていない画期的なものであり、男性不妊症治療薬の開発などにおいて有効なバイオマーカーとして利用価値は非常に高いものである。さらに、Galntl5遺伝子を欠損させた非ヒト動物の精子の運動性が喪失あるいは低下しており、該非ヒト動物をヒト精子無力症のモデル動物として利用することができ、該モデル動物を用いて精子無力症の治療薬等を検索することができる。

40

本発明の男性不妊症の検出方法は精子形成障害による男性不妊症の原因因子を的確に同定する、これまでに確立されていない画期的なものであり、男性不妊症治療薬の開発などにおいて有効なバイオマーカーとして利用価値は非常に高いものである。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

[配列表]

50

SEQUENCE LISTING

- <110> National Institute of Advanced Industrial Science and
Technology
RIKEN
- <120> A method of detecting male sterility, and a model animal of the
male sterility 10
- <130> PH-5512-PCT
- <150> JP 2012-033273
<151> 2012-02-17
- <160> 24
- <170> PatentIn version 3.5 20
- <210> 1
<211> 1332
<212> DNA
<213> Homo sapiens
- <220>
<221> CDS 30
<222> (1)..(1332)
- <400> 1
atg aga aat gcc ata att caa ggt tta ttc tat ggg tcc ttg aca ttt 48
Met Arg Asn Ala Ile Ile Gln Gly Leu Phe Tyr Gly Ser Leu Thr Phe
1 5 10 15

ggg atc tgg aca gct ctg tta ttc ata tat ttg cac cat aat cat gtg 96
Gly Ile Trp Thr Ala Leu Leu Phe Ile Tyr Leu His His Asn His Val 40
20 25 30

agc agc tgg cag aag aaa agc cag gag cct ctg tca gct tgg tcc cct 144
Ser Ser Trp Gln Lys Lys Ser Gln Glu Pro Leu Ser Ala Trp Ser Pro
35 40 45

gga aaa aaa gtg cat cag caa att atc tat ggc tca gag caa ata cca 192

Gly Lys Lys Val His Gln Gln Ile Ile Tyr Gly Ser Glu Gln Ile Pro		
50	55	60
aaa cct cat gta ata gtc aaa agg act gat gaa gat aaa gca aag tct		240
Lys Pro His Val Ile Val Lys Arg Thr Asp Glu Asp Lys Ala Lys Ser		
65	70	75 80
atg tta ggt aca gat ttt aac cat aca aac cca gaa ctt cat aaa gaa		288
Met Leu Gly Thr Asp Phe Asn His Thr Asn Pro Glu Leu His Lys Glu		10
	85	90 95
ctt tta aaa tat gga ttt aat gtg att atc agt aga agc ttg ggc atc		336
Leu Leu Lys Tyr Gly Phe Asn Val Ile Ile Ser Arg Ser Leu Gly Ile		
	100	105 110
gaa aga gaa gtg cca gat acc agg agt aaa atg cgt ctt caa aaa cat		384
Glu Arg Glu Val Pro Asp Thr Arg Ser Lys Met Arg Leu Gln Lys His		20
	115	120 125
tac cca gcc cgc ctc ccg act gcc agc att gtc att tgc ttc tat aat		432
Tyr Pro Ala Arg Leu Pro Thr Ala Ser Ile Val Ile Cys Phe Tyr Asn		
	130	135 140
gaa gaa tgt aat gcc ttg ttt cag acc atg tcc agt gtc acg aac ctc		480
Glu Glu Cys Asn Ala Leu Phe Gln Thr Met Ser Ser Val Thr Asn Leu		30
145	150	155 160
acg cca cac tat ttt ctt gaa gaa att att ttg gta gat gac atg agc		528
Thr Pro His Tyr Phe Leu Glu Glu Ile Ile Leu Val Asp Asp Met Ser		
	165	170 175
aaa gtt gat gat ttg aaa gaa aaa cta gac tat cac ctg gaa act ttt		576
Lys Val Asp Asp Leu Lys Glu Lys Leu Asp Tyr His Leu Glu Thr Phe		
	180	185 190
cgg gga aag gtt aaa ata ata aga aac aaa aag aga gag ggg ctg att		624
Arg Gly Lys Val Lys Ile Ile Arg Asn Lys Lys Arg Glu Gly Leu Ile		
	195	200 205
cga gca agg ctg att gga get tct cat get tca ggg gat gtt ctg gtg		672
Arg Ala Arg Leu Ile Gly Ala Ser His Ala Ser Gly Asp Val Leu Val		
	210	215 220

His Val Trp Leu Asp Glu Tyr Lys Glu Gln Phe Phe Leu Arg Lys Pro
 385 390 395 400

ggt ctg aaa tat gtc acc tac gga aat att cgc gag cgt gtt gag tta 1248
 Gly Leu Lys Tyr Val Thr Tyr Gly Asn Ile Arg Glu Arg Val Glu Leu
 405 410 415

agg aaa cga ctg ggt tgc aag tca ttt cag tgg tat ttg gat aat gtc 1296 10
 Arg Lys Arg Leu Gly Cys Lys Ser Phe Gln Trp Tyr Leu Asp Asn Val
 420 425 430

ttc cca gag ttg gag gca tct gtg aac agc ctg tga 1332
 Phe Pro Glu Leu Glu Ala Ser Val Asn Ser Leu
 435 440

<210> 2 20

<211> 443

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Arg Asn Ala Ile Ile Gln Gly Leu Phe Tyr Gly Ser Leu Thr Phe
 1 5 10 15 30

Gly Ile Trp Thr Ala Leu Leu Phe Ile Tyr Leu His His Asn His Val
 20 25 30

Ser Ser Trp Gln Lys Lys Ser Gln Glu Pro Leu Ser Ala Trp Ser Pro
 35 40 45 40

Gly Lys Lys Val His Gln Gln Ile Ile Tyr Gly Ser Glu Gln Ile Pro
 50 55 60

Lys Pro His Val Ile Val Lys Arg Thr Asp Glu Asp Lys Ala Lys Ser
 65 70 75 80

Met Leu Gly Thr Asp Phe Asn His Thr Asn Pro Glu Leu His Lys Glu
 85 90 95

Leu Leu Lys Tyr Gly Phe Asn Val Ile Ile Ser Arg Ser Leu Gly Ile
 100 105 110

Glu Arg Glu Val Pro Asp Thr Arg Ser Lys Met Arg Leu Gln Lys His
 115 120 125

Tyr Pro Ala Arg Leu Pro Thr Ala Ser Ile Val Ile Cys Phe Tyr Asn
 130 135 140

Glu Glu Cys Asn Ala Leu Phe Gln Thr Met Ser Ser Val Thr Asn Leu
 145 150 155 160

Thr Pro His Tyr Phe Leu Glu Glu Ile Ile Leu Val Asp Asp Met Ser
 165 170 175

Lys Val Asp Asp Leu Lys Glu Lys Leu Asp Tyr His Leu Glu Thr Phe
 180 185 190

Arg Gly Lys Val Lys Ile Ile Arg Asn Lys Lys Arg Glu Gly Leu Ile
 195 200 205

Arg Ala Arg Leu Ile Gly Ala Ser His Ala Ser Gly Asp Val Leu Val
 210 215 220

Phe Leu Asp Ser His Cys Glu Val Asn Arg Val Trp Leu Glu Pro Leu
 225 230 235 240

Leu His Ala Ile Ala Lys Asp Pro Lys Met Val Val Cys Pro Leu Ile

10

20

30

40

Arg Lys Arg Leu Gly Cys Lys Ser Phe Gln Trp Tyr Leu Asp Asn Val
 420 425 430

Phe Pro Glu Leu Glu Ala Ser Val Asn Ser Leu
 435 440

10

<210> 3
 <211> 1296
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1296)

20

<400> 3
 atg aaa agt gtc ata att cag ggt tta ttc tgt gga ttc ctg gcc atc 48
 Met Lys Ser Val Ile Ile Gln Gly Leu Phe Cys Gly Phe Leu Ala Ile
 1 5 10 15

ggg ctc tgg gca tct atg tta ctt ttg ttt ttg cac ctt gaa caa gaa 96
 Gly Leu Trp Ala Ser Met Leu Leu Leu Phe Leu His Leu Glu Gln Glu 30
 20 25 30

gac atg ctg gag aat gaa aag gag gaa ctc cta aag aag agg tca ctc 144
 Asp Met Leu Glu Asn Glu Lys Glu Glu Leu Leu Lys Lys Arg Ser Leu
 35 40 45

gga aaa aat gcg cac cag caa acc cgt cac tca gag gac gtc act cat 192
 Gly Lys Asn Ala His Gln Gln Thr Arg His Ser Glu Asp Val Thr His 40
 50 55 60

gat gag gtt aac ttt tca gat cca gaa ctt atc caa gga ttg agg cga 240
 Asp Glu Val Asn Phe Ser Asp Pro Glu Leu Ile Gln Gly Leu Arg Arg
 65 70 75 80

tat gga tta aat gcc atc atg agt aga aga ctg ggc atc gag aga gag 288
 Tyr Gly Leu Asn Ala Ile Met Ser Arg Arg Leu Gly Ile Glu Arg Glu

85	90	95		
gtg cca gat tcc agg gat aaa ata tgt cag cag aaa cac tac cca ttc			336	
Val Pro Asp Ser Arg Asp Lys Ile Cys Gln Gln Lys His Tyr Pro Phe				
100	105	110		
aat cta ccc act gcc agc atc atc ata tgc ttc tat aat gaa gaa ttt			384	
Asn Leu Pro Thr Ala Ser Ile Ile Ile Cys Phe Tyr Asn Glu Glu Phe				10
115	120	125		
aac acc ttg ctc cgg gca gtg tcg agt gtg gtg aac ctc agt ccg cag			432	
Asn Thr Leu Leu Arg Ala Val Ser Ser Val Val Asn Leu Ser Pro Gln				
130	135	140		
cat ctc ctg gag gag atc att ctg gtg gat gac atg agt gaa ttt gat			480	
His Leu Leu Glu Glu Ile Ile Leu Val Asp Asp Met Ser Glu Phe Asp				20
145	150	155	160	
gat ttg aag gac aaa ctg gac tat tat ctg gaa att ttt cgt gga aaa			528	
Asp Leu Lys Asp Lys Leu Asp Tyr Tyr Leu Glu Ile Phe Arg Gly Lys				
165	170	175		
gtt aaa tta ata aga aac aaa aag aga gag ggt ctt atc aga tca aag			576	
Val Lys Leu Ile Arg Asn Lys Lys Arg Glu Gly Leu Ile Arg Ser Lys				30
180	185	190		
atg att ggc gcc tcc cgg gct tca ggg gac atc ctg gtg ttc ttg gat			624	
Met Ile Gly Ala Ser Arg Ala Ser Gly Asp Ile Leu Val Phe Leu Asp				
195	200	205		
agt cac tgt gag gtg aat aga gtc tgg cta gaa ccc ttg ctg cat gcc			672	
Ser His Cys Glu Val Asn Arg Val Trp Leu Glu Pro Leu Leu His Ala				
210	215	220		
att gct aag gat cac aaa atg gtg gta tgc cct att atc gat gtc atc			720	
Ile Ala Lys Asp His Lys Met Val Val Cys Pro Ile Ile Asp Val Ile				40
225	230	235	240	
aat gaa tta acc ttg gat tat atg gcg gca cct att gta agg gga gct			768	
Asn Glu Leu Thr Leu Asp Tyr Met Ala Ala Pro Ile Val Arg Gly Ala				
245	250	255		

ttt gac tgg aat ctg aat etc aga tgg gac aat gtt ttc gca tat gag	816	
Phe Asp Trp Asn Leu Asn Leu Arg Trp Asp Asn Val Phe Ala Tyr Glu		
260 265 270		
ttg gac ggc cca gaa gga cca agt aca cct atc cgg tca cct gca atg	864	
Leu Asp Gly Pro Glu Gly Pro Ser Thr Pro Ile Arg Ser Pro Ala Met		
275 280 285		10
aca gga gga att ttt gct ata aac aga cat tat ttt aat gaa ctt gga	912	
Thr Gly Gly Ile Phe Ala Ile Asn Arg His Tyr Phe Asn Glu Leu Gly		
290 295 300		
caa tat gac aac ggc atg gat att tgt gga gga gaa aat gtg gaa ctt	960	
Gln Tyr Asp Asn Gly Met Asp Ile Cys Gly Gly Glu Asn Val Glu Leu		
305 310 315 320		
tcg cta aga atc tgg atg tgt gga ggc cag etc ttc ata etc cct tgc	1008	20
Ser Leu Arg Ile Trp Met Cys Gly Gly Gln Leu Phe Ile Leu Pro Cys		
325 330 335		
tct cgg gtt gga tat aac agt aag gcg ctg agt caa cac agg cgt gca	1056	
Ser Arg Val Gly Tyr Asn Ser Lys Ala Leu Ser Gln His Arg Arg Ala		
340 345 350		
aac cag agt gcc ttg tca agg aat tta ctg cga gtg gtt cac gtc tgg	1104	
Asn Gln Ser Ala Leu Ser Arg Asn Leu Leu Arg Val Val His Val Trp		30
355 360 365		
cta gat gaa tac aag gga aac ttt ttt ctt caa aga cct tct ttg aca	1152	
Leu Asp Glu Tyr Lys Gly Asn Phe Phe Leu Gln Arg Pro Ser Leu Thr		
370 375 380		
tac gtt tcc tgt gga aat att agt gag cgc gtg gaa tta agg aaa cgc	1200	
Tyr Val Ser Cys Gly Asn Ile Ser Glu Arg Val Glu Leu Arg Lys Arg		
385 390 395 400		40
ctg ggt tgc aag tca ttc cag tgg tat ttg gat aat atc ttt cca gag	1248	
Leu Gly Cys Lys Ser Phe Gln Trp Tyr Leu Asp Asn Ile Phe Pro Glu		
405 410 415		
ttg gag cca ttt aac aca gag agg aaa agg aaa aaa aat cgt ttc tag	1296	
Leu Glu Pro Phe Asn Thr Glu Arg Lys Arg Lys Lys Asn Arg Phe		

420

425

430

<210> 4
 <211> 431
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10

<400> 4

Met Lys Ser Val Ile Ile Gln Gly Leu Phe Cys Gly Phe Leu Ala Ile
 1 5 10 15

Gly Leu Trp Ala Ser Met Leu Leu Leu Phe Leu His Leu Glu Gln Glu
 20 25 30

20

Asp Met Leu Glu Asn Glu Lys Glu Glu Leu Leu Lys Lys Arg Ser Leu
 35 40 45

Gly Lys Asn Ala His Gln Gln Thr Arg His Ser Glu Asp Val Thr His
 50 55 60

30

Asp Glu Val Asn Phe Ser Asp Pro Glu Leu Ile Gln Gly Leu Arg Arg
 65 70 75 80

Tyr Gly Leu Asn Ala Ile Met Ser Arg Arg Leu Gly Ile Glu Arg Glu
 85 90 95

40

Val Pro Asp Ser Arg Asp Lys Ile Cys Gln Gln Lys His Tyr Pro Phe
 100 105 110

Asn Leu Pro Thr Ala Ser Ile Ile Ile Cys Phe Tyr Asn Glu Glu Phe
 115 120 125

Asn Thr Leu Leu Arg Ala Val Ser Ser Val Val Asn Leu Ser Pro Gln
 130 135 140

His Leu Leu Glu Glu Ile Ile Leu Val Asp Asp Met Ser Glu Phe Asp
 145 150 155 160

Asp Leu Lys Asp Lys Leu Asp Tyr Tyr Leu Glu Ile Phe Arg Gly Lys
 165 170 175

Val Lys Leu Ile Arg Asn Lys Lys Arg Glu Gly Leu Ile Arg Ser Lys
 180 185 190

Met Ile Gly Ala Ser Arg Ala Ser Gly Asp Ile Leu Val Phe Leu Asp
 195 200 205

Ser His Cys Glu Val Asn Arg Val Trp Leu Glu Pro Leu Leu His Ala
 210 215 220

Ile Ala Lys Asp His Lys Met Val Val Cys Pro Ile Ile Asp Val Ile
 225 230 235 240

Asn Glu Leu Thr Leu Asp Tyr Met Ala Ala Pro Ile Val Arg Gly Ala
 245 250 255

Phe Asp Trp Asn Leu Asn Leu Arg Trp Asp Asn Val Phe Ala Tyr Glu
 260 265 270

Leu Asp Gly Pro Glu Gly Pro Ser Thr Pro Ile Arg Ser Pro Ala Met
 275 280 285

Thr Gly Gly Ile Phe Ala Ile Asn Arg His Tyr Phe Asn Glu Leu Gly
 290 295 300

10

20

30

40

Gln Tyr Asp Asn Gly Met Asp Ile Cys Gly Gly Glu Asn Val Glu Leu
 305 310 315 320

Ser Leu Arg Ile Trp Met Cys Gly Gly Gln Leu Phe Ile Leu Pro Cys
 325 330 335

Ser Arg Val Gly Tyr Asn Ser Lys Ala Leu Ser Gln His Arg Arg Ala
 340 345 350

Asn Gln Ser Ala Leu Ser Arg Asn Leu Leu Arg Val Val His Val Trp
 355 360 365

Leu Asp Glu Tyr Lys Gly Asn Phe Phe Leu Gln Arg Pro Ser Leu Thr
 370 375 380

Tyr Val Ser Cys Gly Asn Ile Ser Glu Arg Val Glu Leu Arg Lys Arg
 385 390 395 400

Leu Gly Cys Lys Ser Phe Gln Trp Tyr Leu Asp Asn Ile Phe Pro Glu
 405 410 415

Leu Glu Pro Phe Asn Thr Glu Arg Lys Arg Lys Lys Asn Arg Phe
 420 425 430

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic

10

20

30

40

<400> 5

Leu	Leu	Lys	Lys	Arg	Ser	Leu	Gly	Lys	Asn	Ala	His	Gln	Gln	Thr	Arg
1				5					10					15	

His

10

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic

20

<400> 6

Leu	Arg	Trp	Asp	Asn	Val	Phe	Ala	Tyr	Glu	Leu	Asp	Gly	Pro	Glu	Gly
1				5					10					15	

<210> 7

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic

30

<400> 7

Ser	Lys	Ala	Leu	Ser	Gln	His	Arg	Arg	Ala	Asn	Gln	Ser	Ala	Leu	Ser
1				5					10					15	

40

<210> 8

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic

<400> 8

Gln	Gln	Ile	Ile	Tyr	Gly	Ser	Glu	Gln	Ile	Pro	Lys	Pro	His	Val	Ile	10
1			5						10					15		

Val Lys Arg

<210> 9

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic

<400> 9

Phe	Lys	Trp	Asp	Asn	Val	Phe	Ser	Tyr	Glu	Met	Asp	Gly	Pro	Glu	Gly	30
1				5					10					15		

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic

<400> 10

Ser	Lys	Lys	Gln	Thr	Gly	Lys	Pro	Ser	Thr	Ile	Ile	Ser	Ala	Met	Thr	40
1				5					10					15		

<210> 11			
<211> 22			
<212> DNA			
<213> Artificial			
<220>			
<223> Primer			10
<400> 11			
atgaaagtgt cataattcag gg		22	
<210> 12			
<211> 42			
<212> DNA			
<213> Artificial			20
<220>			
<223> Primer			
<400> 12			
ctagaaacga tttttttcc ttttctctc tgtgttaa at gg		42	
<210> 13			30
<211> 18			
<212> DNA			
<213> Artificial			
<220>			
<223> Primer			
<400> 13			
gaagcttggg catcgaaa		18	40
<210> 14			
<211> 17			
<212> DNA			
<213> Artificial			

<220>

<223> Primer

<400> 14

gcgggctggg taatgtt

17

<210> 15

10

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 15

gagaccttag cttgaaacaa aaccac

26

20

<210> 16

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

30

<400> 16

gatttcccag gttcatctgc atccg

25

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

40

<220>

<223> Primer

<400> 17

tgcgctgaca gccggaacag gcgg

24

<210> 18			
<211> 25			
<212> DNA			
<213> Artificial			
<220>			
<223> Primer			10
<400> 18			
tataccacaa ttgaatggat ataga		25	
<210> 19			
<211> 20			
<212> DNA			
<213> Artificial			20
<220>			
<223> Primer			
<400> 19			
acacagtctc aggaaagagc		20	
<210> 20			30
<211> 20			
<212> DNA			
<213> Artificial			
<220>			
<223> Primer			
<400> 20			
atactcaagt gccatcgggg		20	40
<210> 20			
<211> 20			
<212> DNA			
<213> Artificial			

<220>

<223> Primer

<400> 20

atactcaagt gccatcgggg 20

<210> 21

10

<211> 26

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

tgctgcagg cgtttcaaa aacatt 26

<210> 22

20

<211> 26

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22

tgctgcggg cgtttcaaa aacatt 26

<210> 23

30

<211> 56

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23

cccaaatgg tgggtgccc cctgatagat gtcattgatg atagaactct ggagta 56

<210> 24

40

<211> 55

<212> DNA

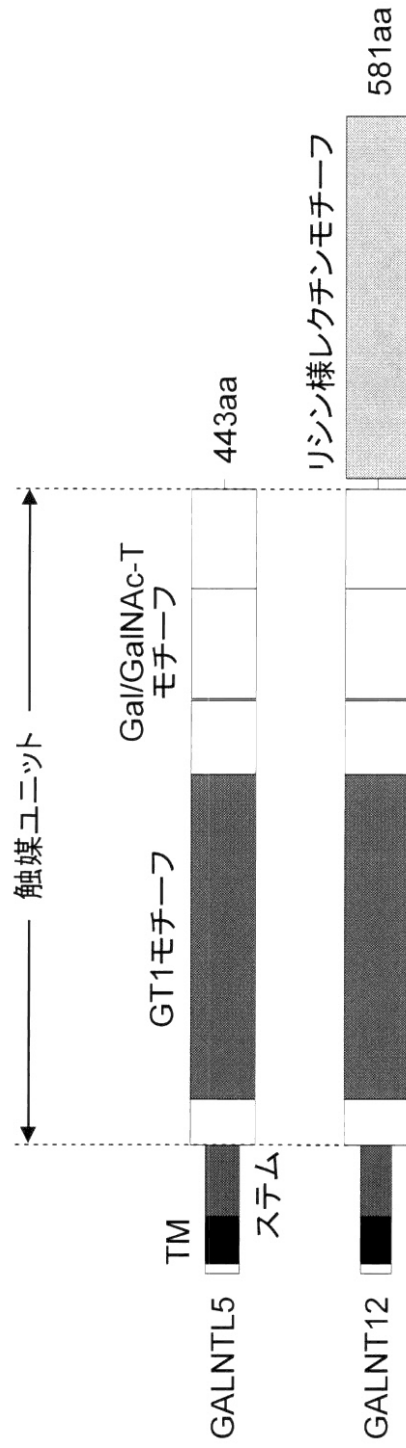
<213> Homo sapiens

<400> 24

cccaaatgg tgggtgccc ccgatagatg tcattgatga tagaactctg gagta 55

【 図 1 - 1 】

図 1 - 1



【 図 1 - 2 】

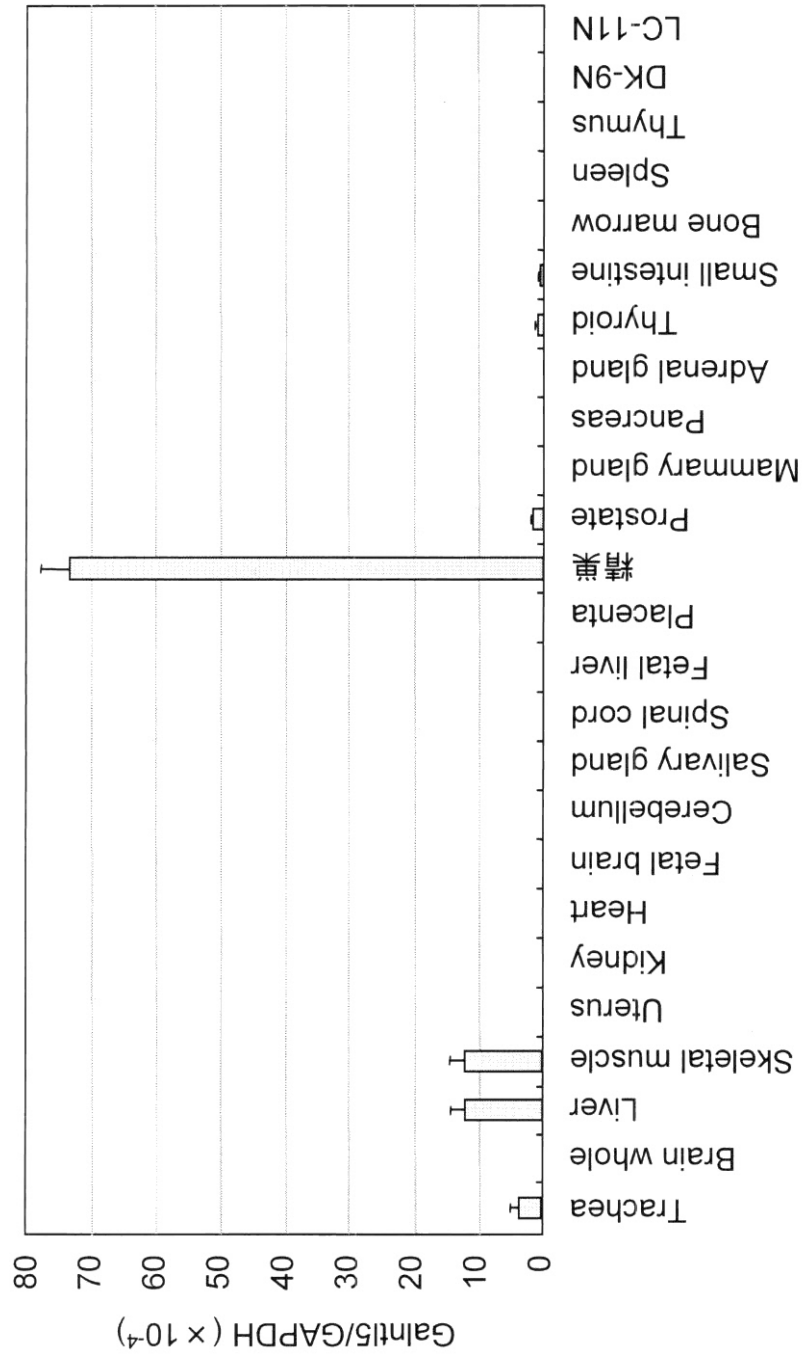
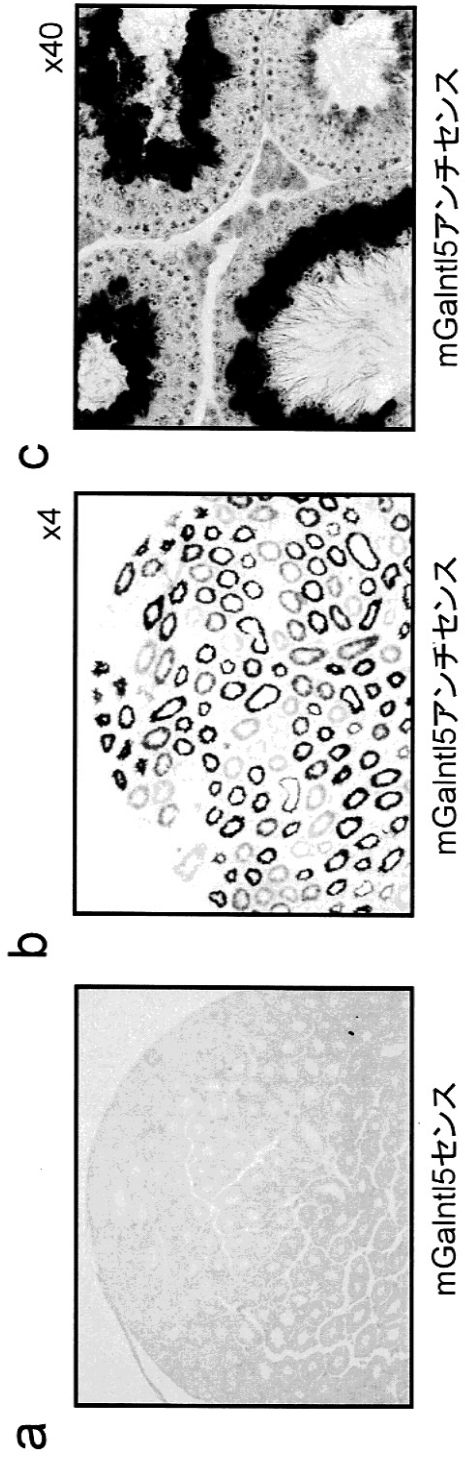


図 1 - 2

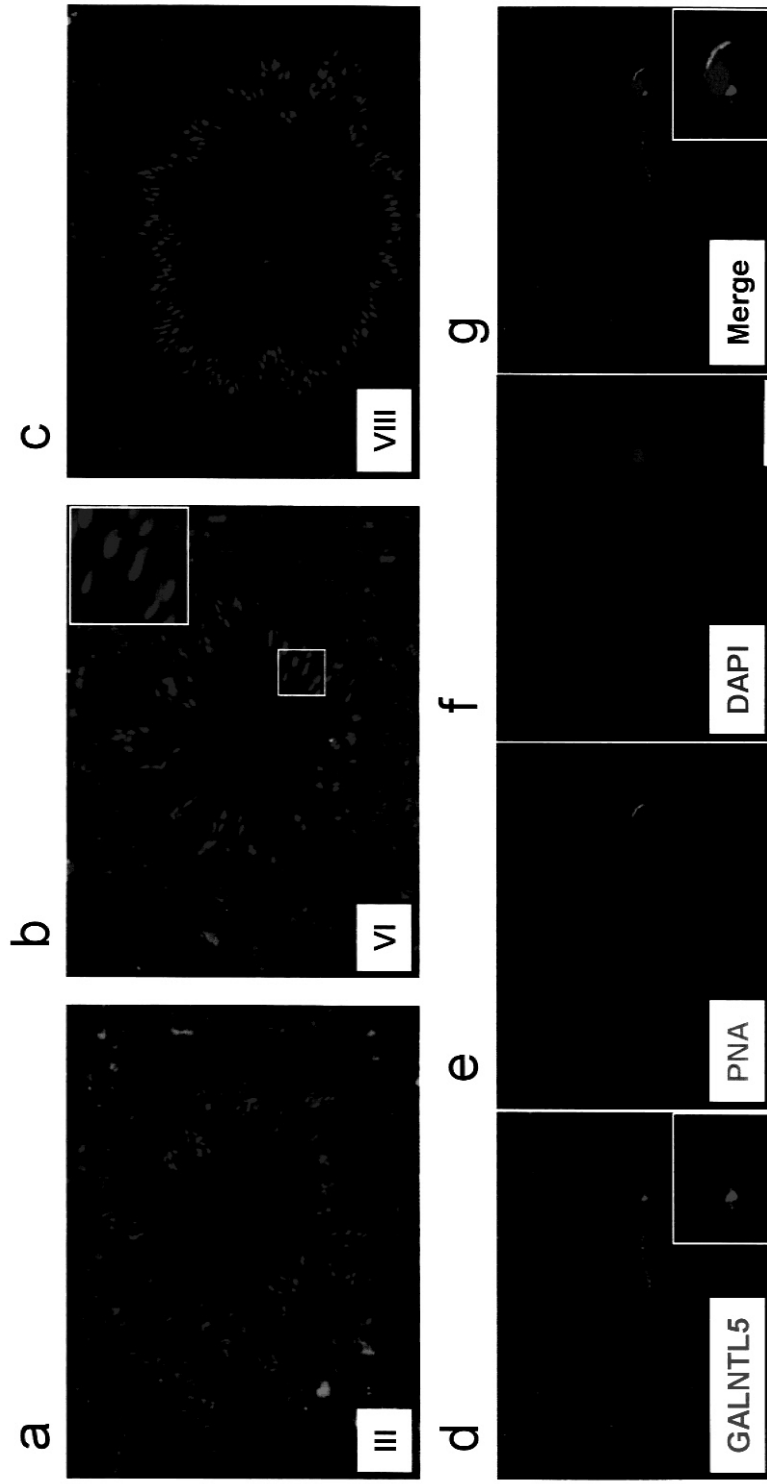
【 図 1 - 3 】

図 1 - 3



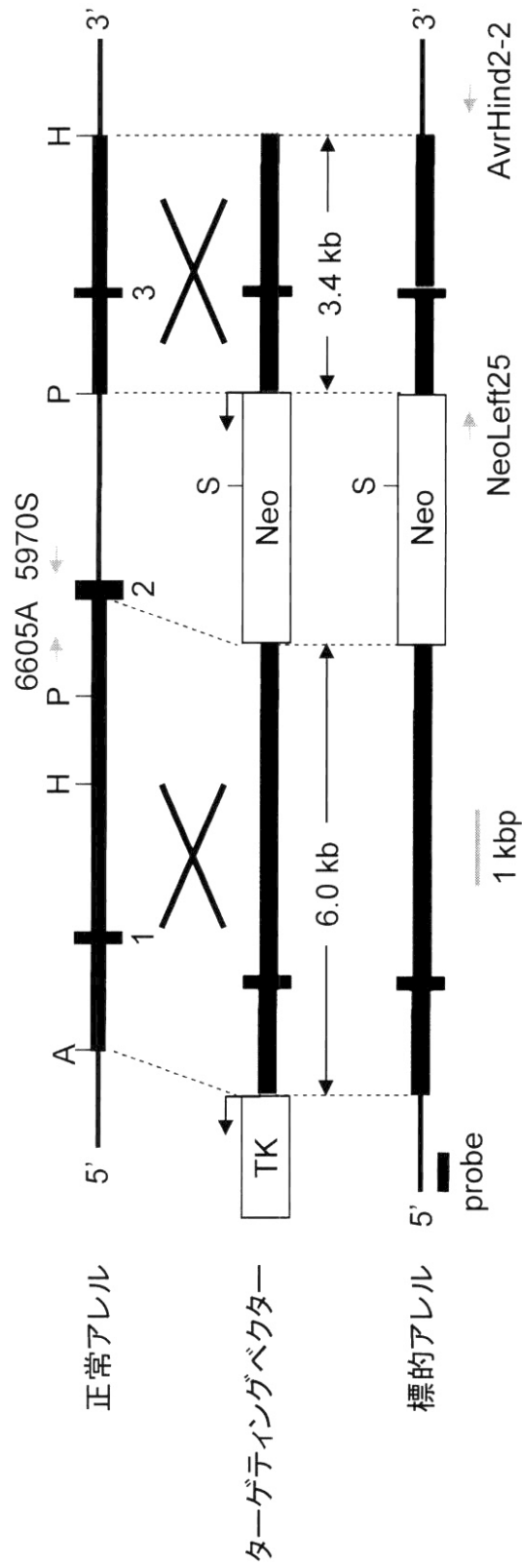
【 図 2 】

図 2



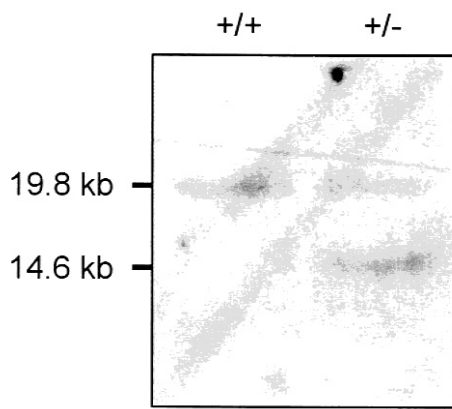
【 図 3 - 1 】

図 3 - 1



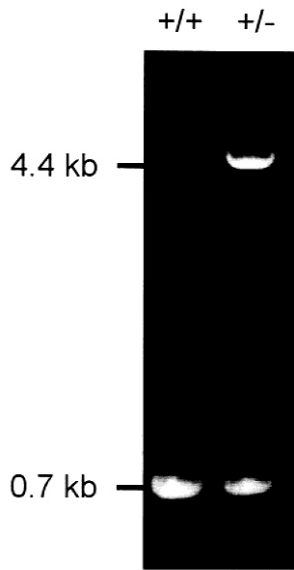
【 図 3 - 2 】

図 3 - 2



【 図 3 - 3 】

図 3 - 3



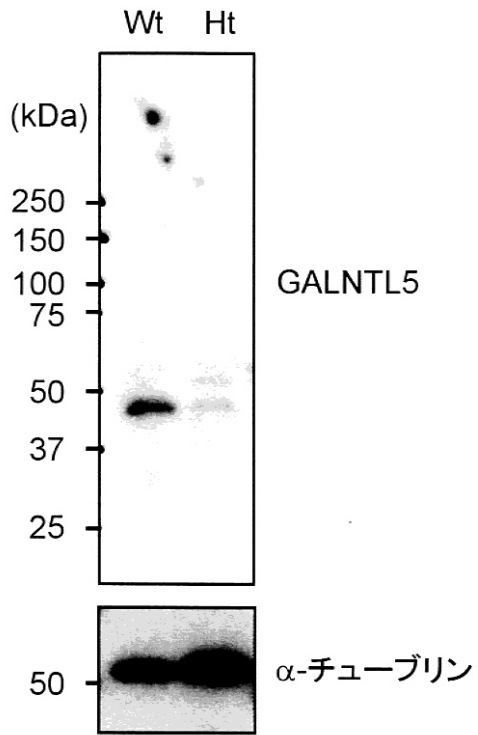
【 図 3 - 4 】

図 3 - 4



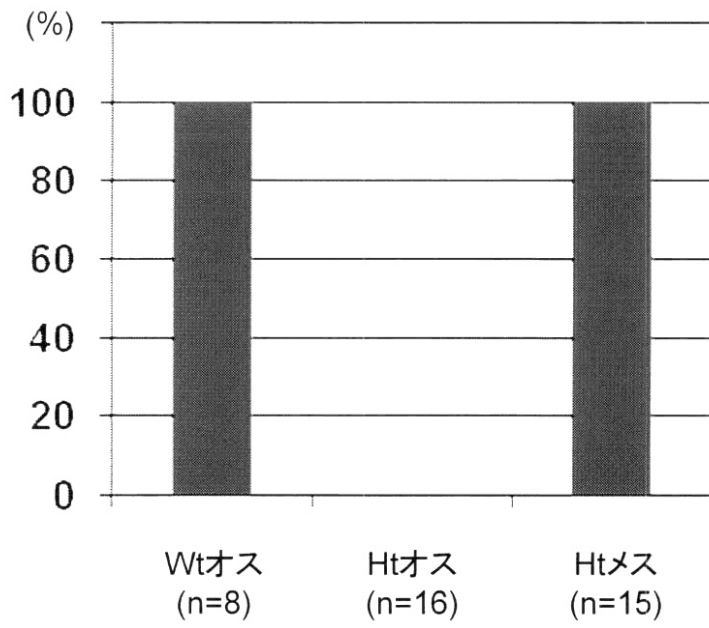
【 図 3 - 5 】

図 3 - 5



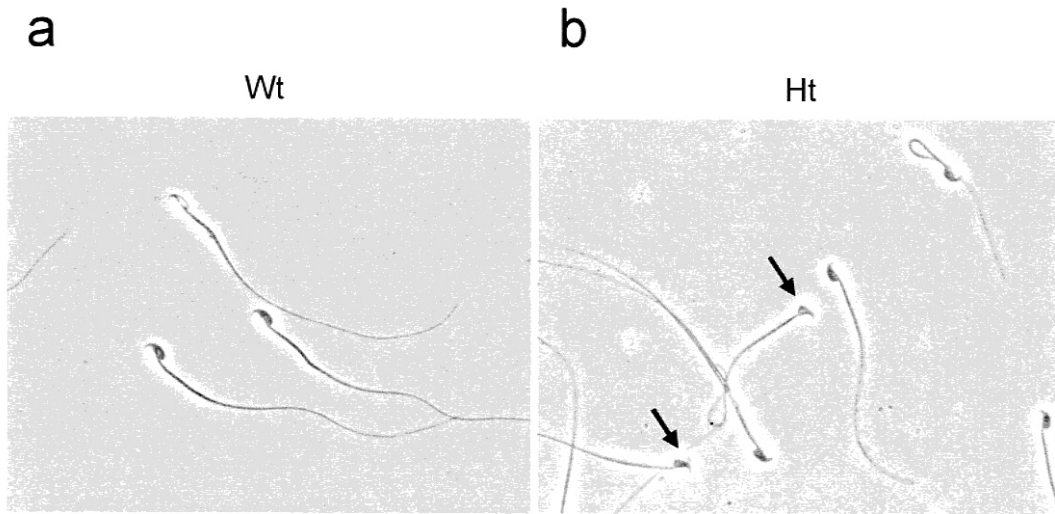
【 図 4 - 1 】

図 4 - 1



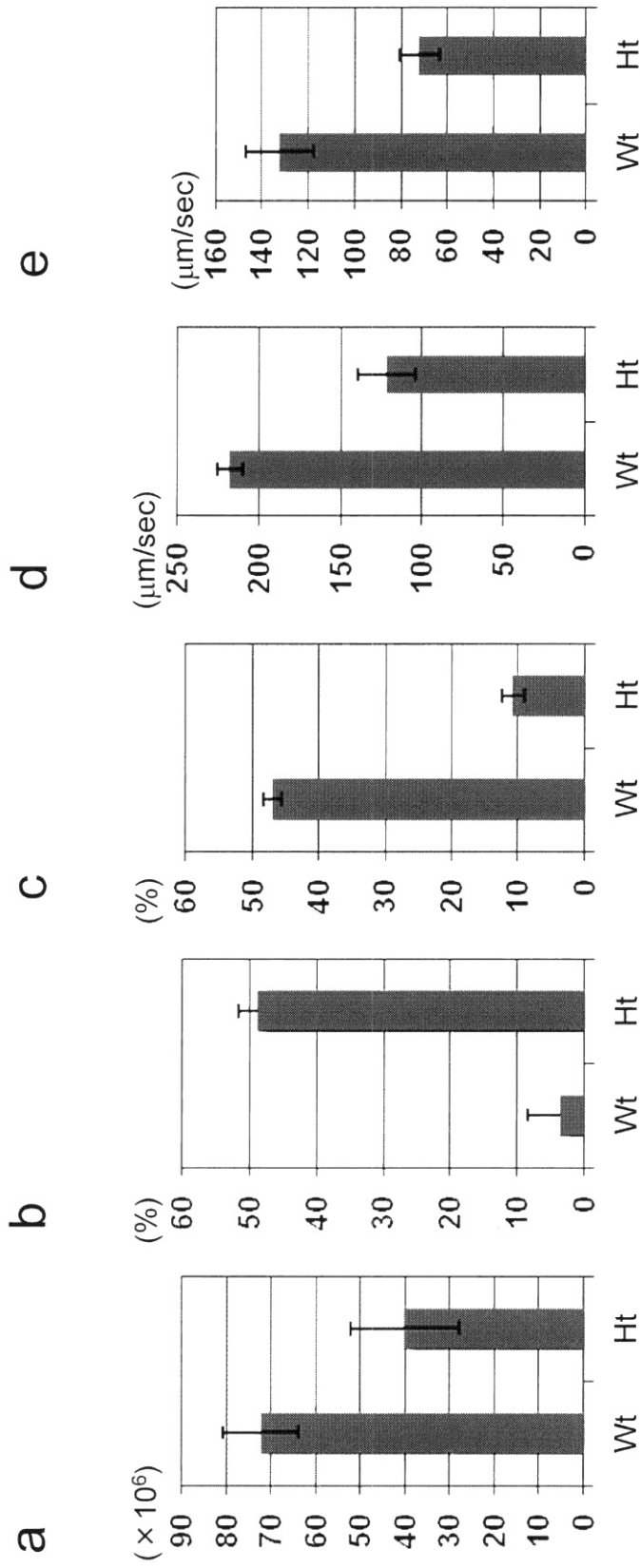
【 図 4 - 2 】

図 4 - 2



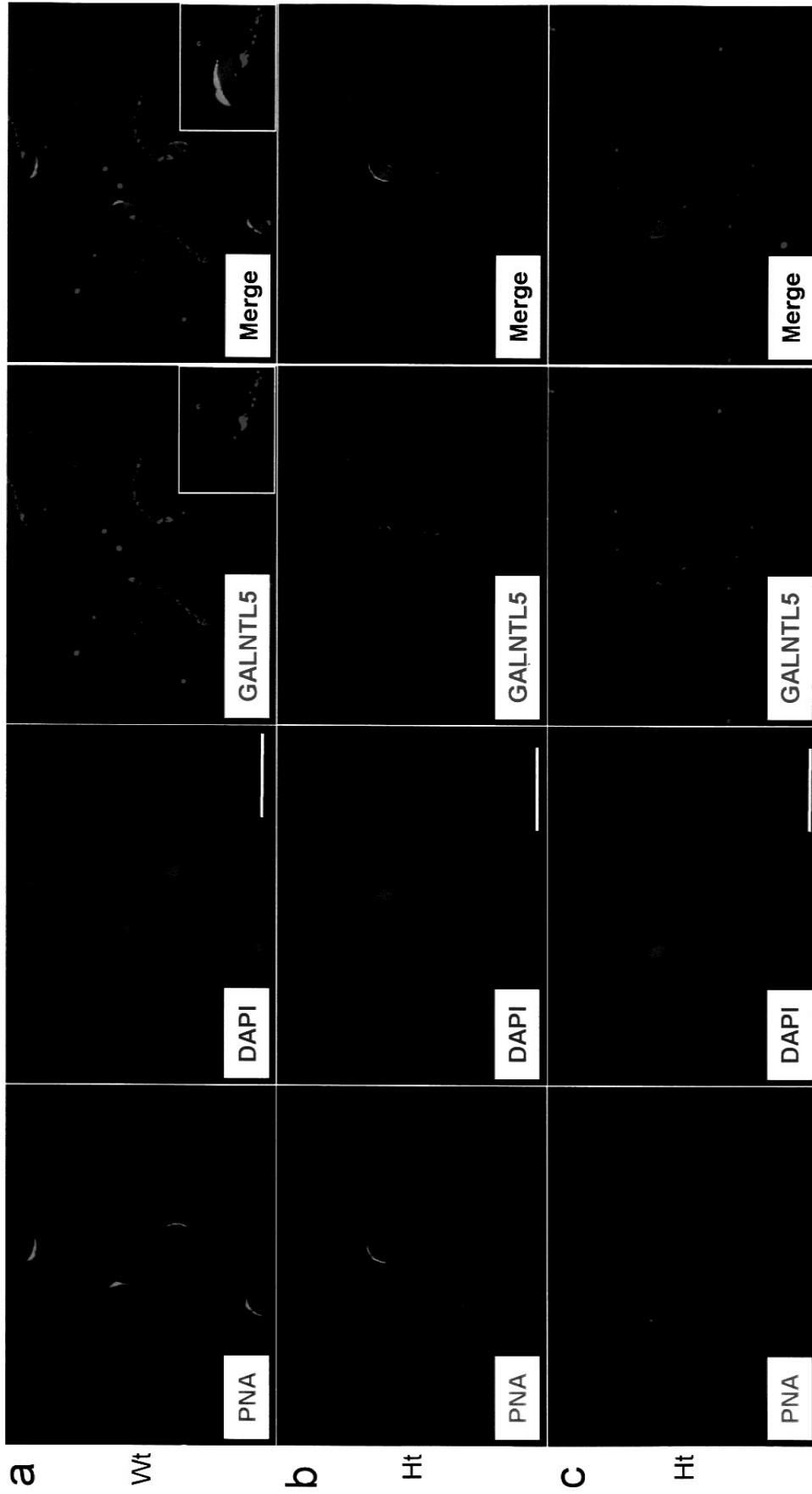
【 図 4 - 3 】

図 4 - 3



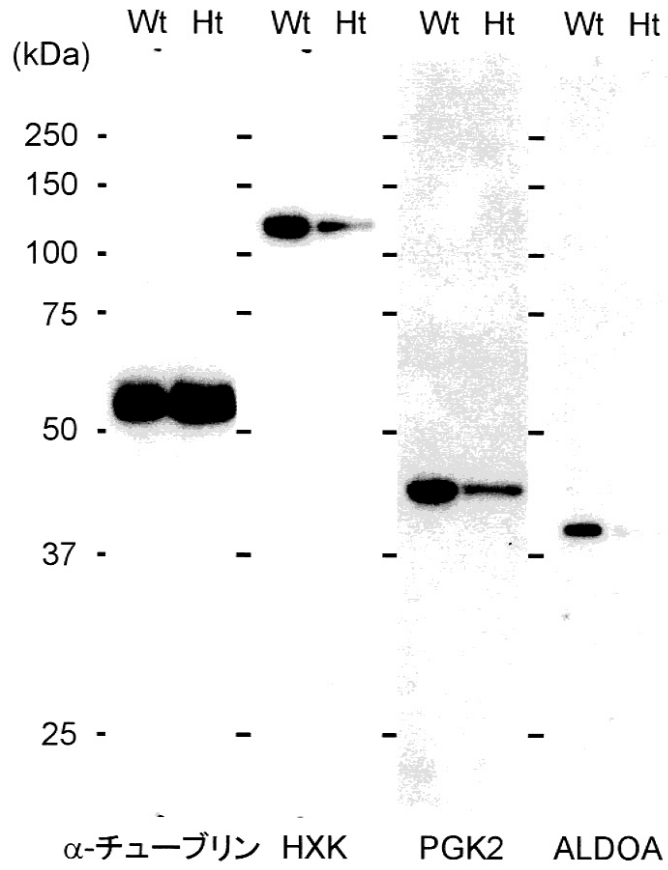
【 図 5 】

図 5



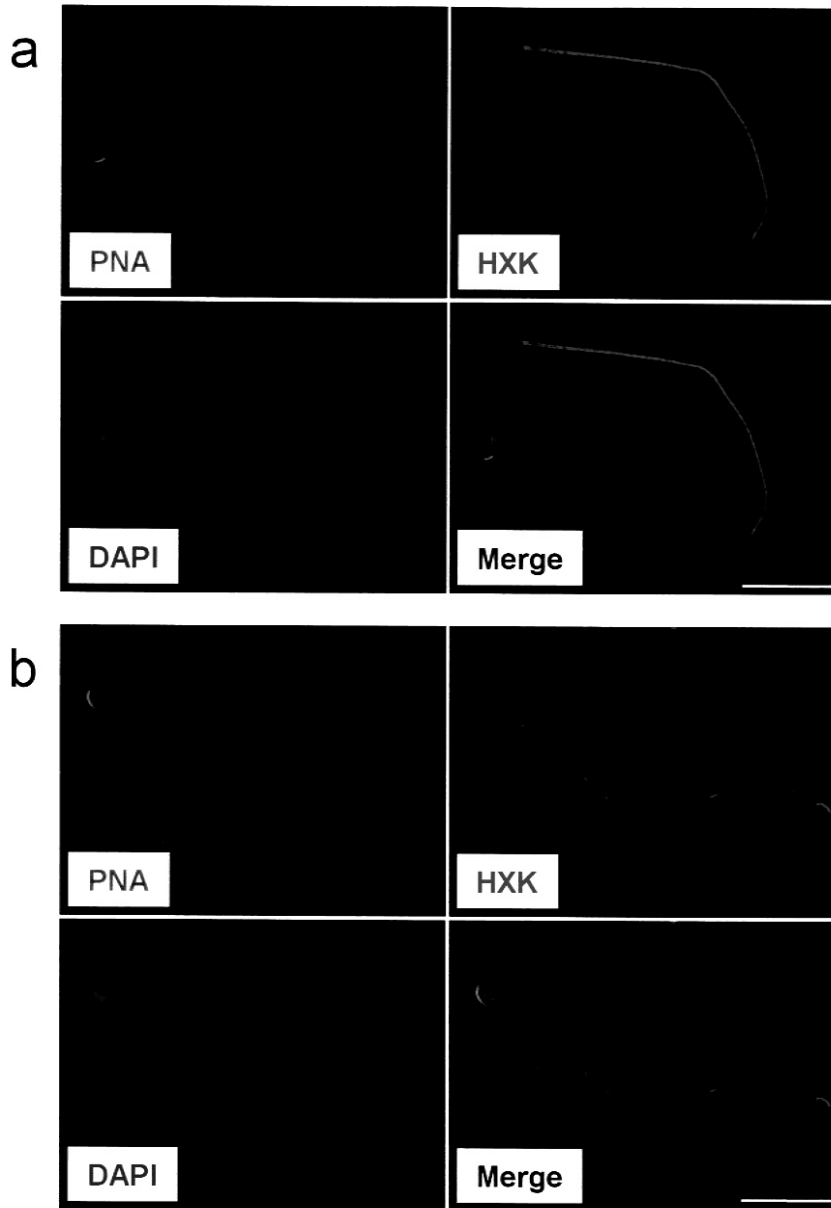
【 図 6 - 1 】

図 6 - 1



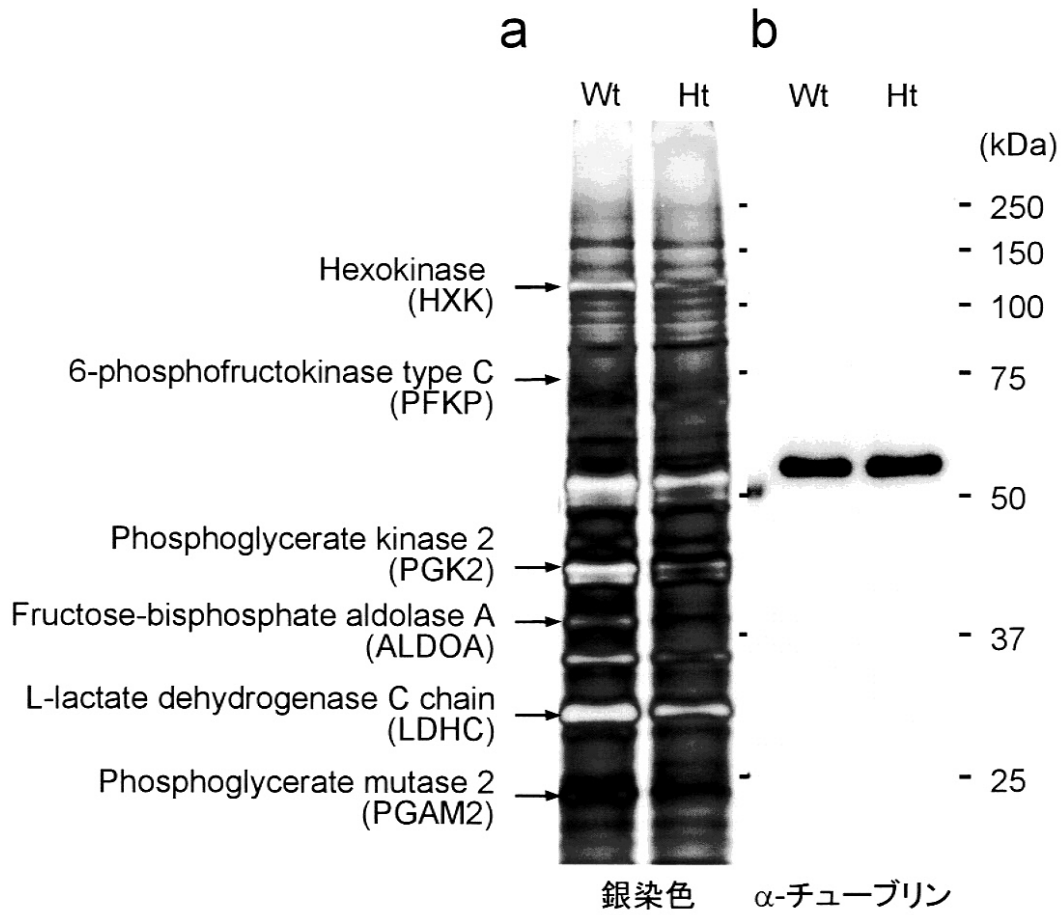
【 図 6 - 2 】

図 6 - 2



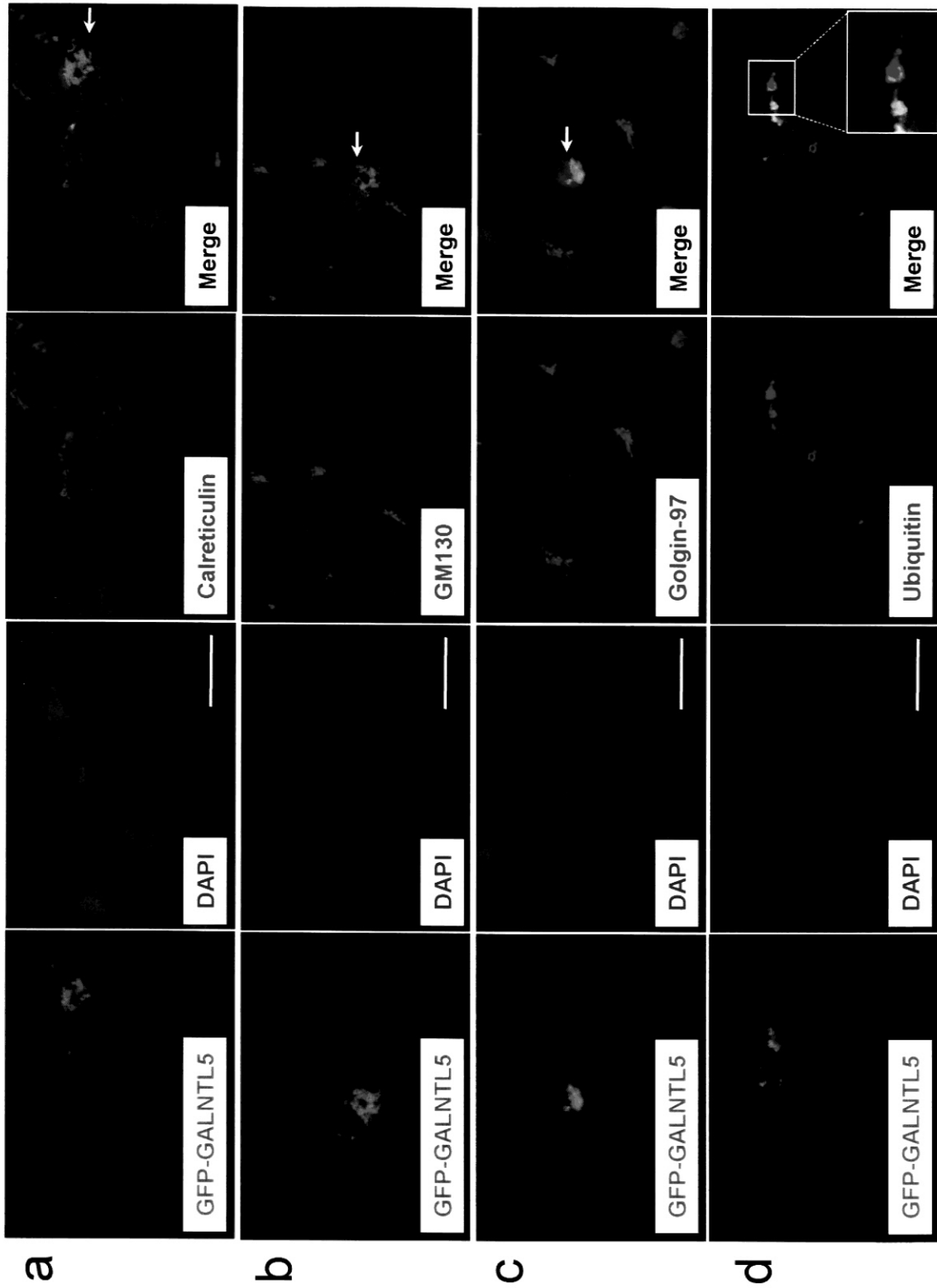
【 図 7 】

図 7



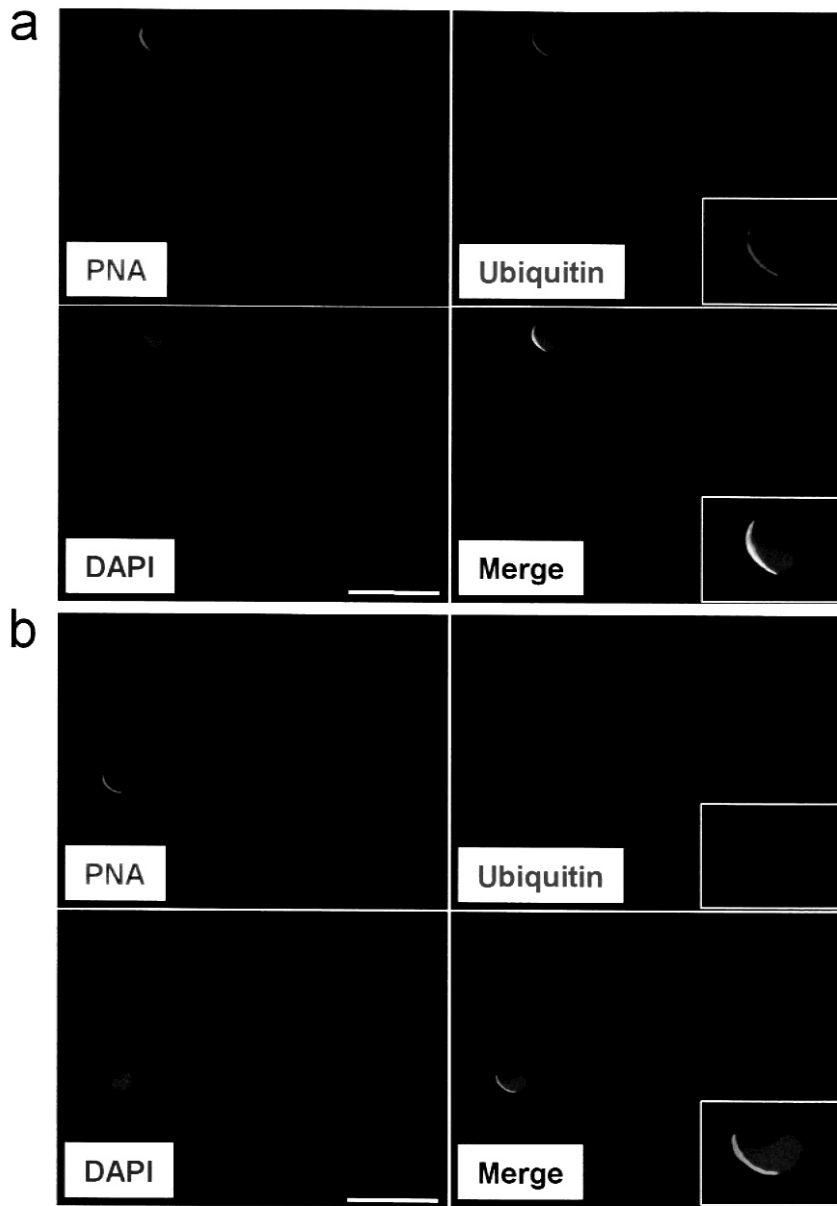
【 8 】

8



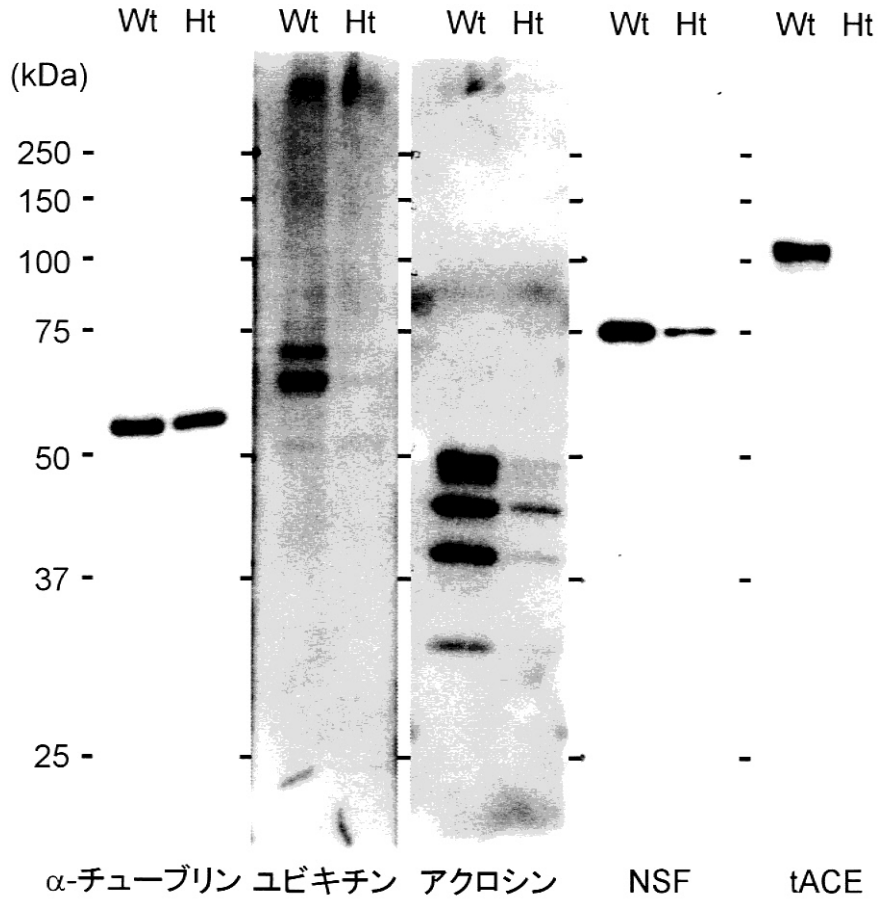
【 図 9 - 1 】

図 9 - 1

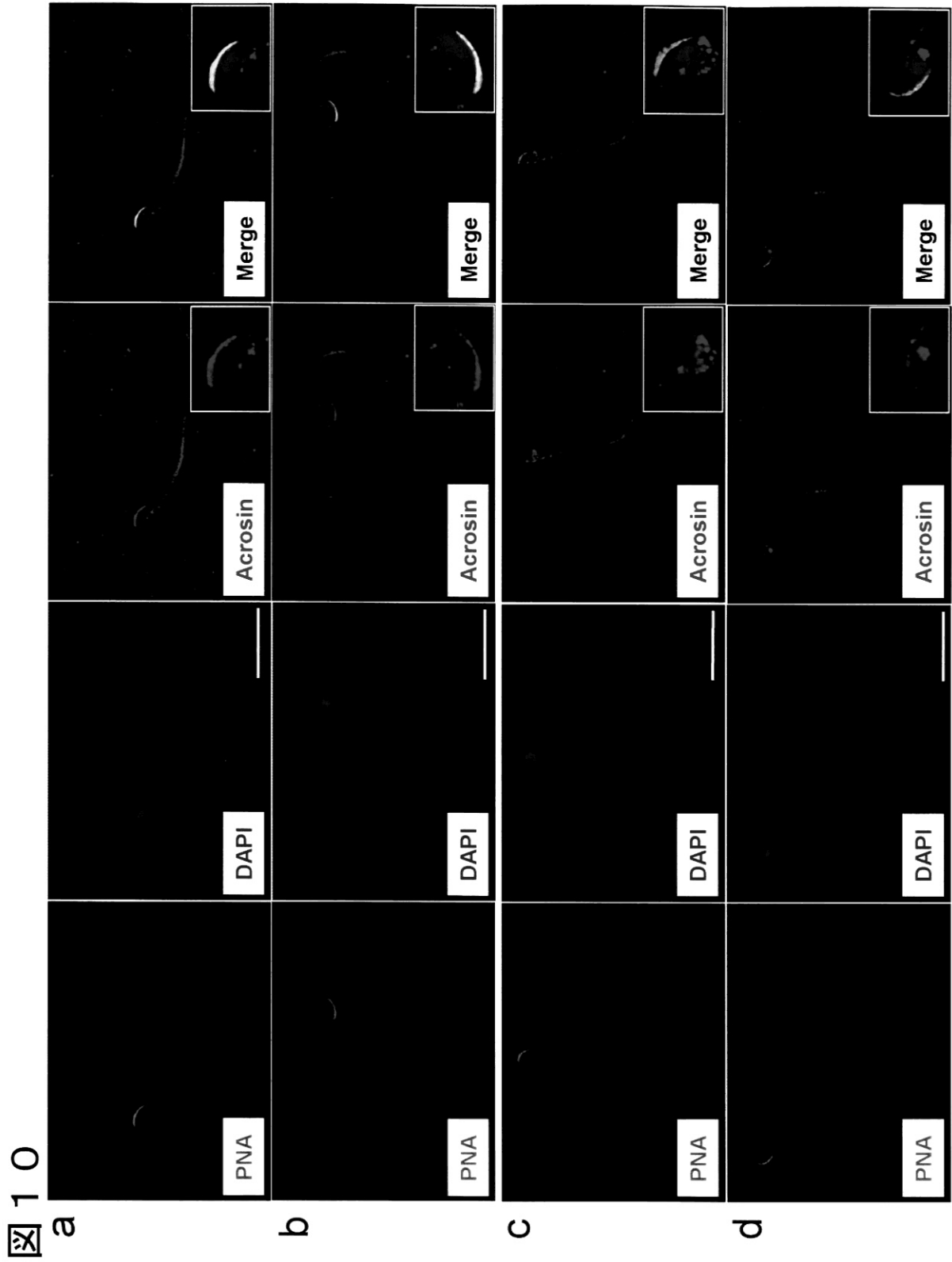


【 図 9 - 2 】

図 9 - 2

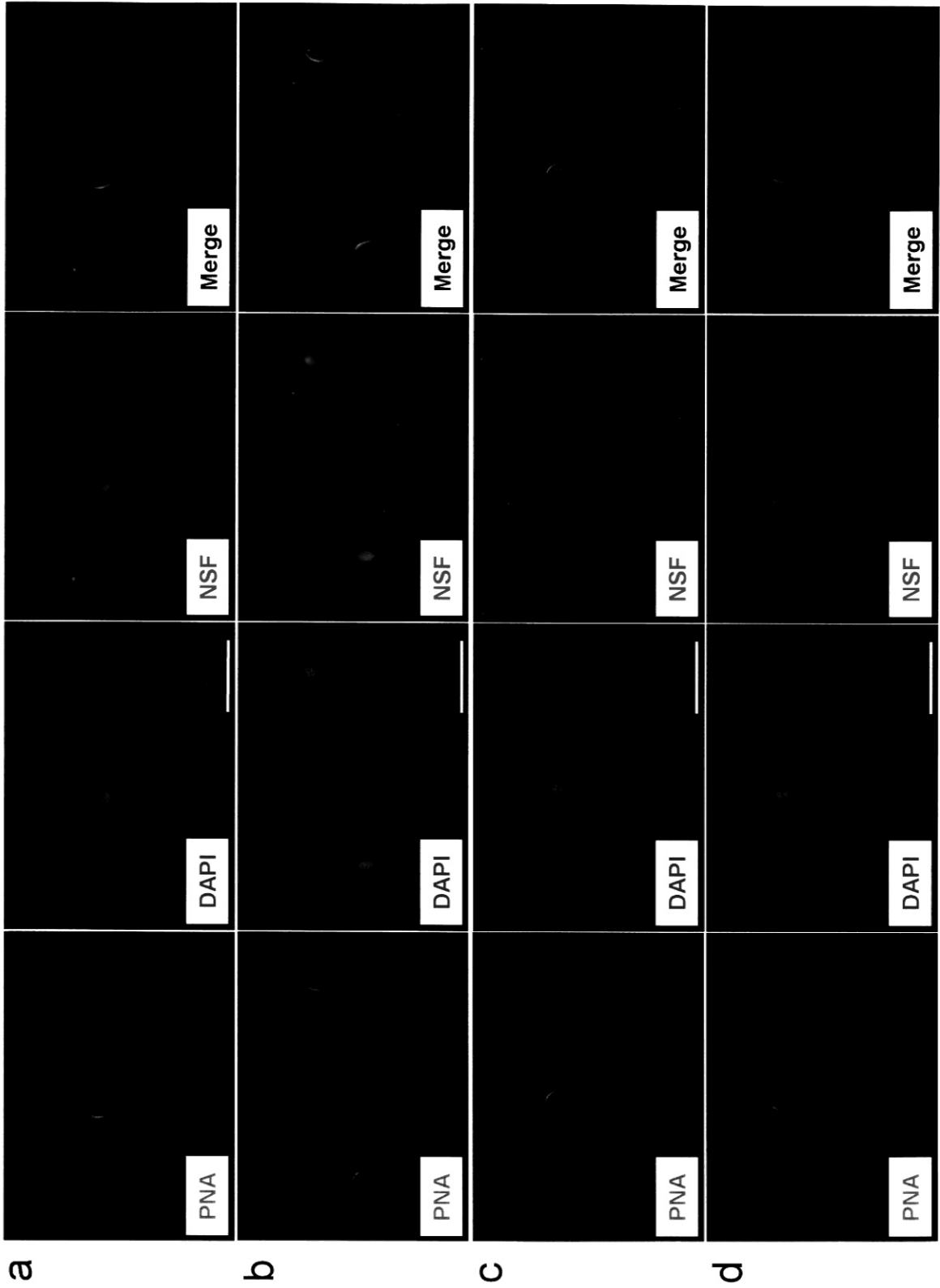


【 図 1 0 】



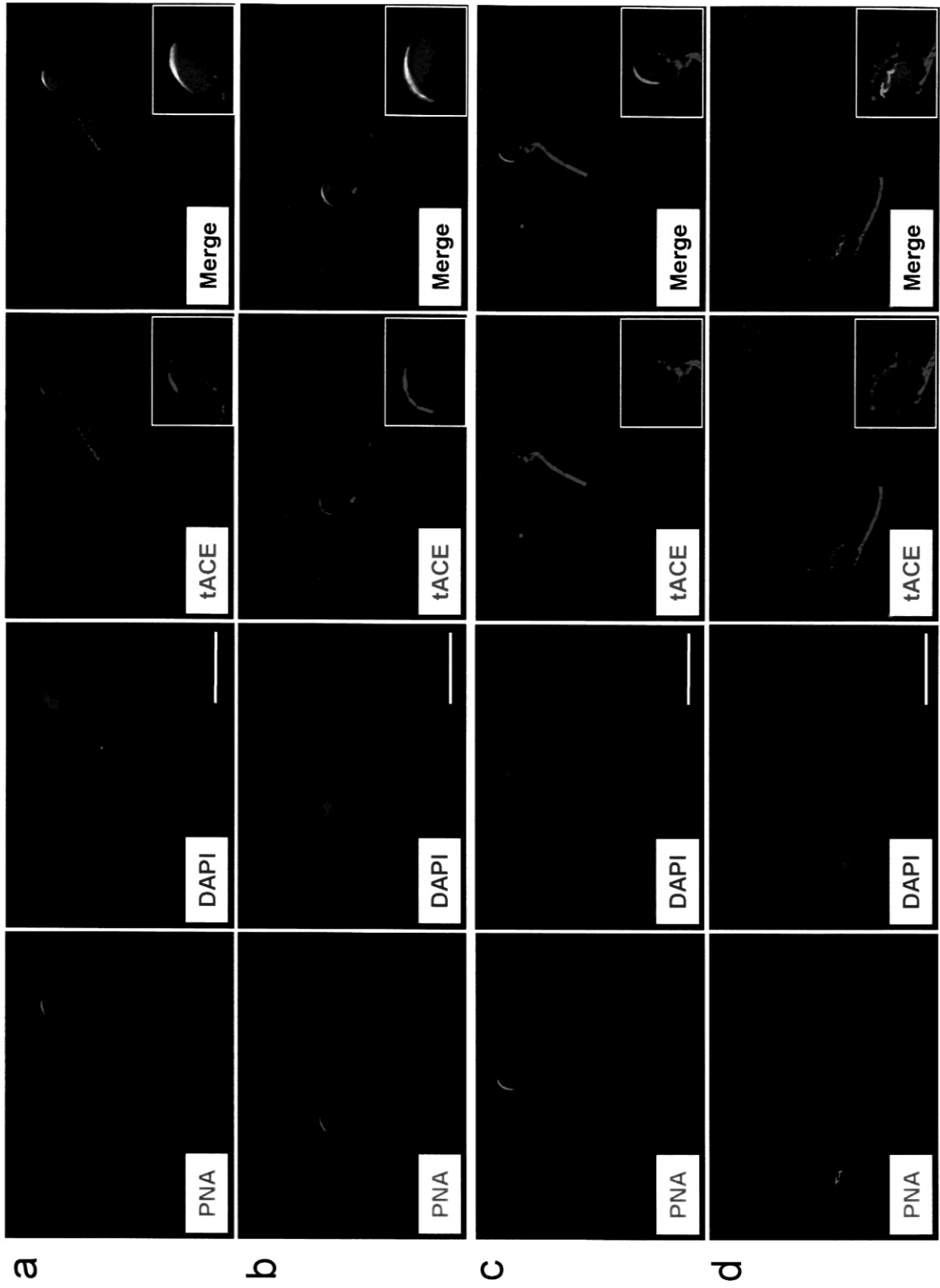
【 1 1 】

1 1



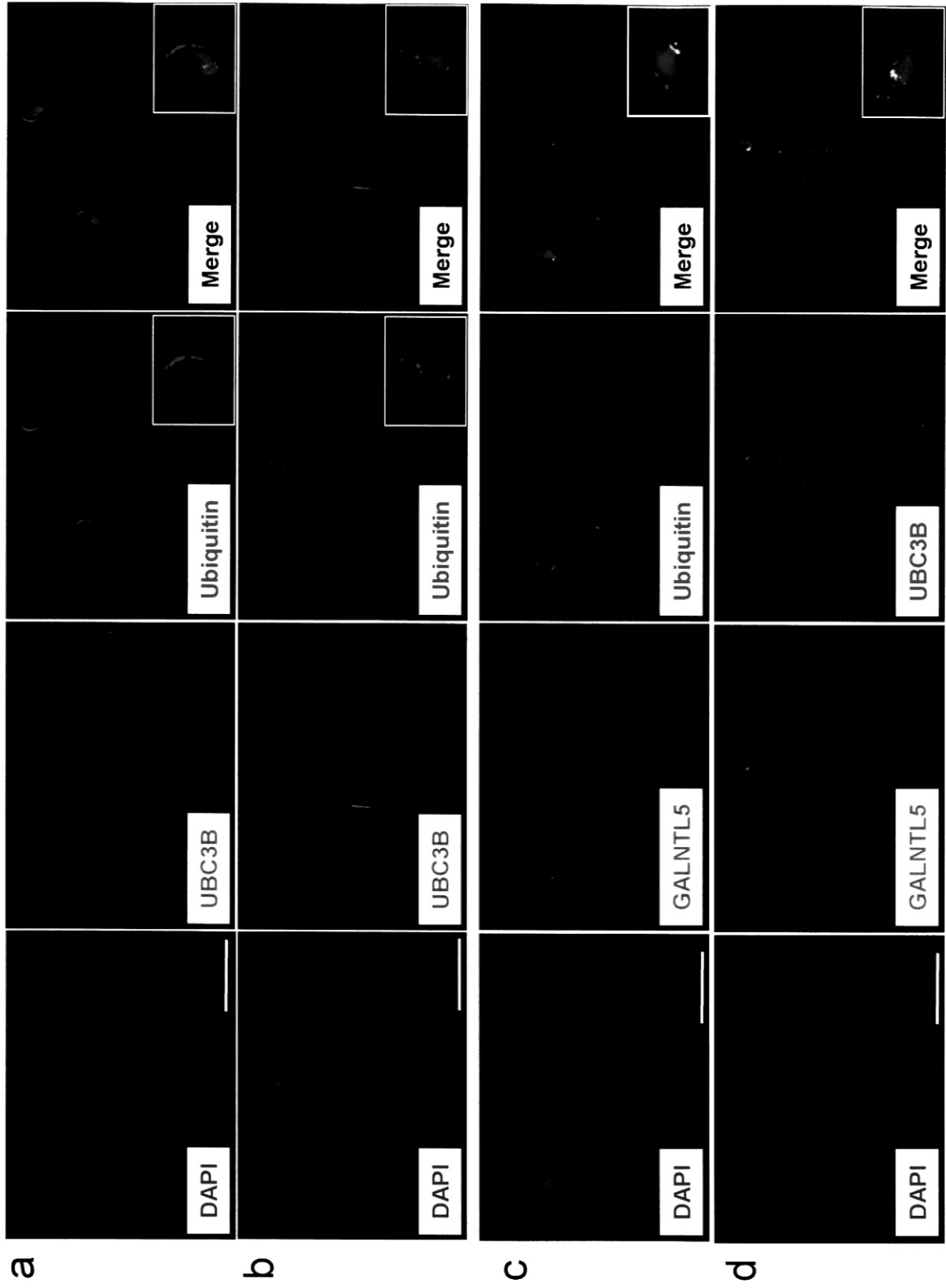
【 図 1 2 】

図 1 2



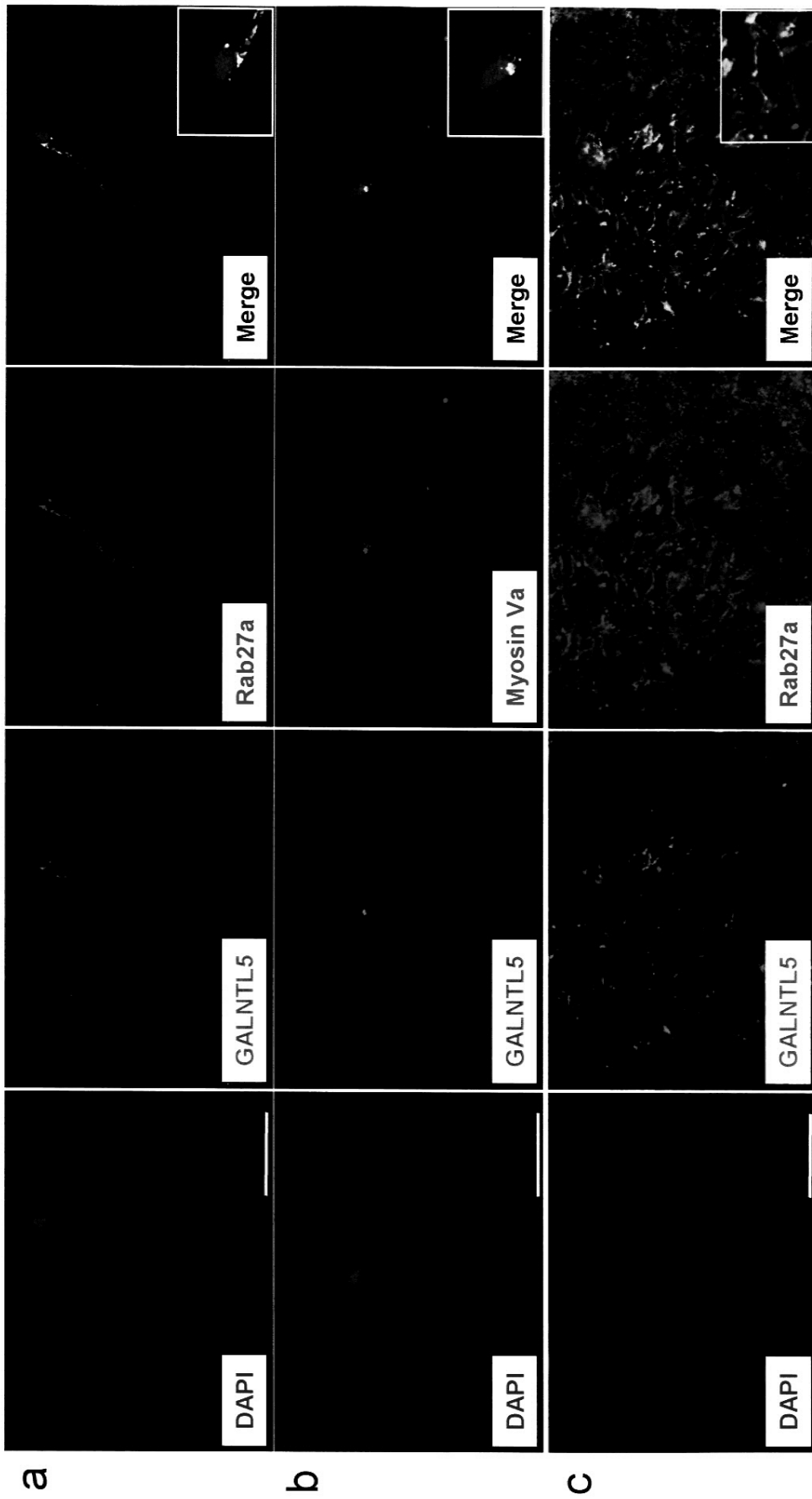
【 図 1 3 】

図 1 3



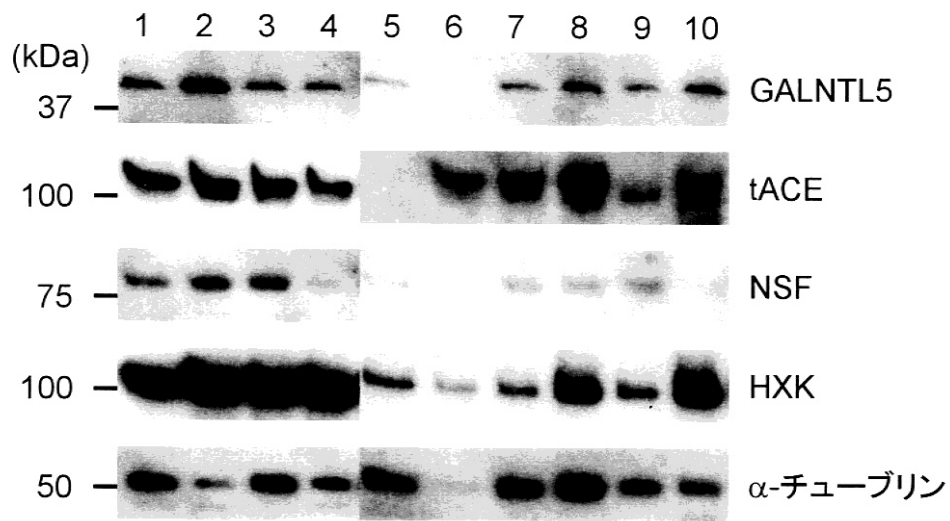
【 図 1 4 】

図 1 4



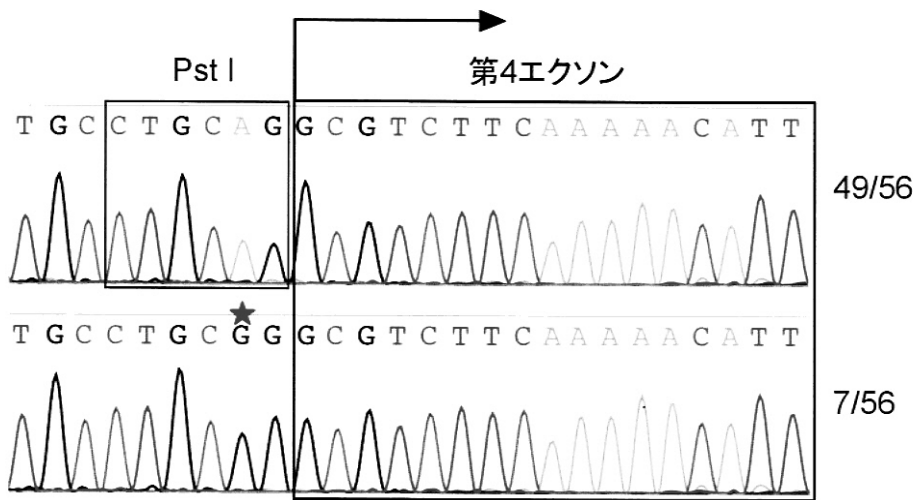
【図 15 - 1】

図 15 - 1



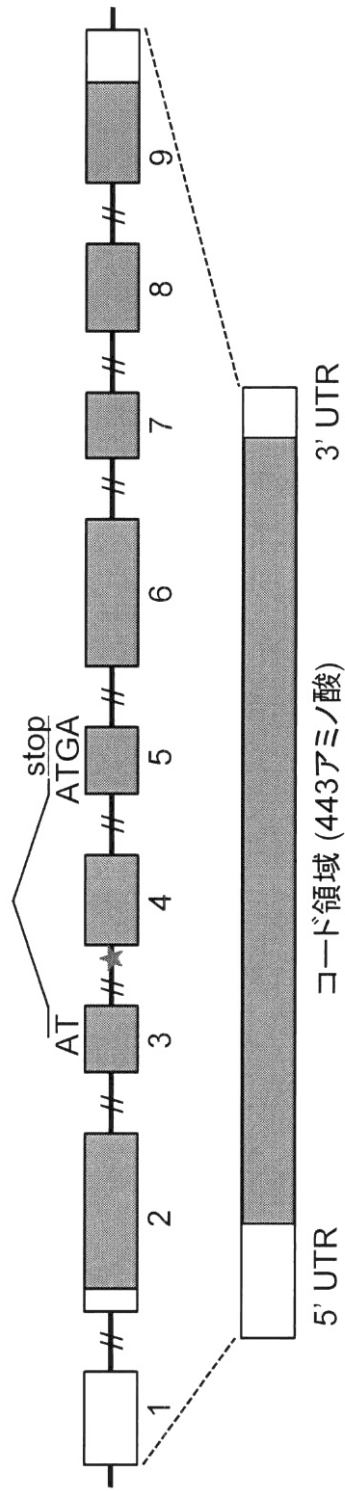
【図 15 - 2】

図 15 - 2



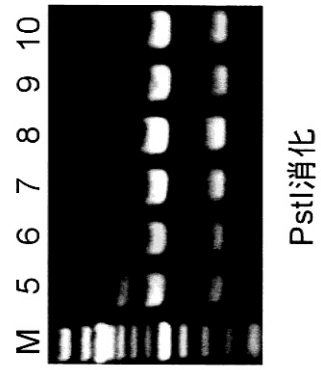
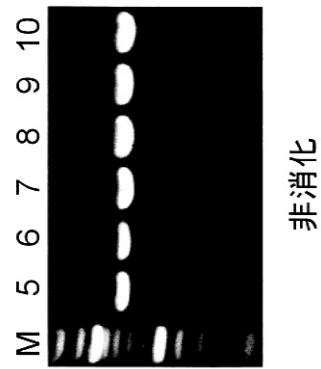
【 図 15 - 3 】

図 15 - 3

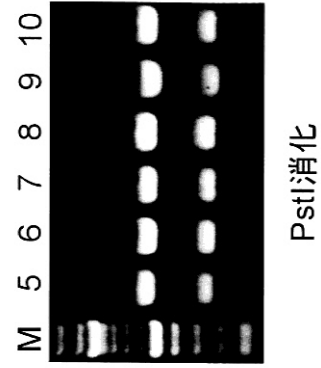
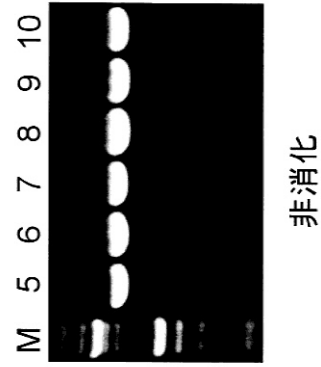


15-4

a



b



【図16-1】

図16-1

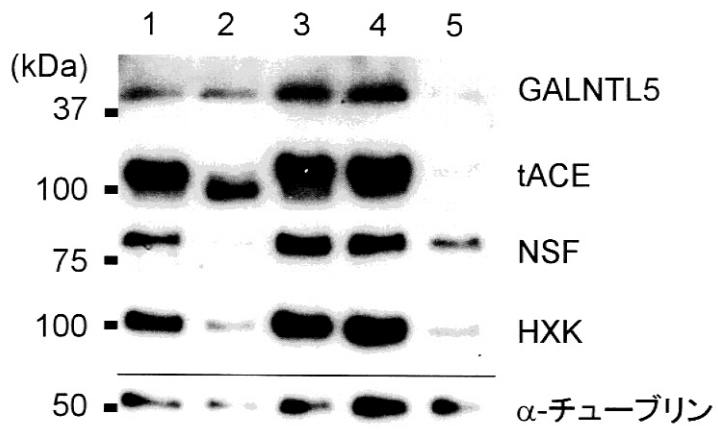
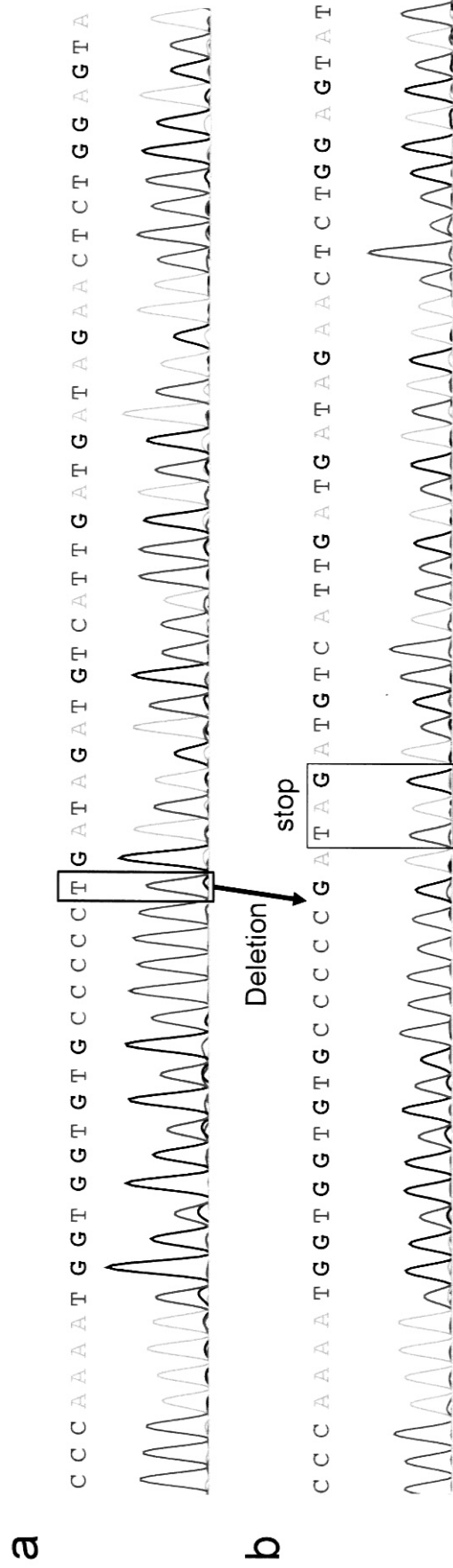
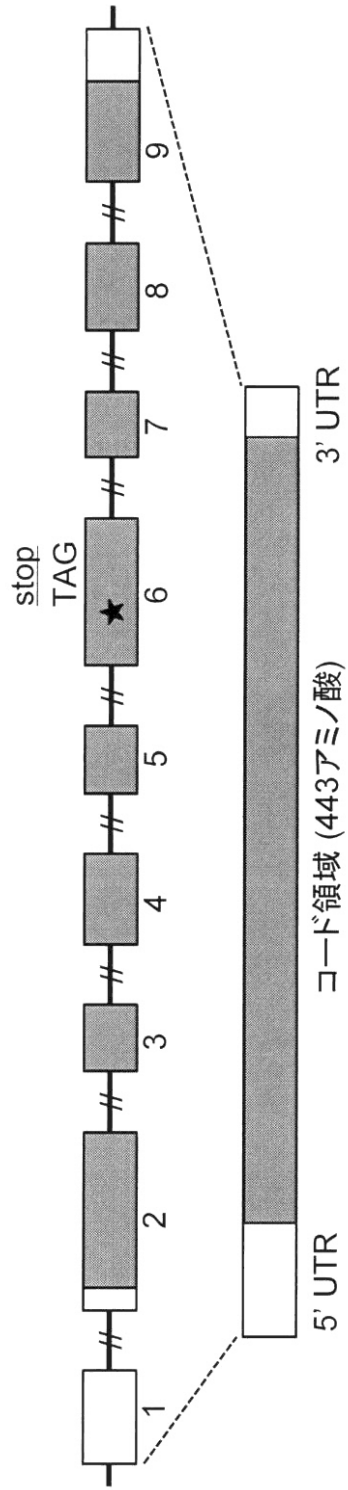


図 1 6 - 2



【 図 1 6 - 3 】

図 1 6 - 3



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/054425

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12N15/09(2006.01)i, A01K67/027(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/68(2006.01)i</i> According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC												
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <i>C12N15/00-15/90, A01K67/027, C07K16/00-16/46, C12Q1/02, C12Q1/68</i> Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched <table border="0"> <tr> <td>Jitsuyo Shinan Koho</td> <td>1922-1996</td> <td>Jitsuyo Shinan Toroku Koho</td> <td>1996-2013</td> </tr> <tr> <td>Kokai Jitsuyo Shinan Koho</td> <td>1971-2013</td> <td>Toroku Jitsuyo Shinan Koho</td> <td>1994-2013</td> </tr> </table> Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) <i>CAPLUS/REGISTRY/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII), G-Search</i>			Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013	Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013		
Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013									
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013									
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
X	JP 2008-148594 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 03 July 2008 (03.07.2008), (Family: none)	9-18										
A	CAPECCHI, M.R. Altering the genome by homologous recombination. Science, 1989, Vol.244, p.1288-1292	16-18										
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.												
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention											
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone											
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family											
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search 22 May, 2013 (22.05.13)		Date of mailing of the international search report 04 June, 2013 (04.06.13)										
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer										
Facsimile No.		Telephone No.										

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/054425

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 1-8
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 1 to 8 pertain to diagnostic method for a human being, and thus relate to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions described in claims 9-18 relate to the detection of male sterility employing the abnormal expression of GALNTL5 as a measure and the production of a model animal associated with male sterility. The inventions described in claims 19-20 relate to a method for selecting a recombinant cell in which homologous recombination occurs by negative selection using Galntl5 gene and a negative selection marker for use in the method.
(Continued to extra sheet)

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
9-18

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/054425

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

Both of the groups of the invention share only such a common technical feature that Galntl5 gene is used. However, the technical feature does not make any contribution over the prior art in light of the contents disclosed in JP 2008-148594 A. Therefore, the technical feature cannot be regarded as a special technical feature.

Further, there is no other same or corresponding special technical feature between these inventions.

Consequently, the inventions of claims 9-18 and the inventions of claims 19-20 cannot be considered to be so linked as to form a single general inventive concept.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 3 / 0 5 4 4 2 5	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A01K67/027(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/68(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/00-15/90, A01K67/027, C07K16/00-16/46, C12Q1/02, C12Q1/68			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2013年 日本国実用新案登録公報 1996-2013年 日本国登録実用新案公報 1994-2013年			
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CPlus/REGISTRY/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), G-Search			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
X	JP 2008-148594 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2008.07.03 (ファミリーなし)	9-18	
A	CAPECCHI, M. R. Altering the genome by homologous recombination. Science, 1989, Vol. 244, p. 1288-1292	16-18	
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。		☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。	
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 22.05.2013		国際調査報告の発送日 04.06.2013	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 三原 健治	4 B 2937
		電話番号 03-3581-1101	内線 3448

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 3 / 0 5 4 4 2 5

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 1-8 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求項 1-8 はヒトの診断方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求項 9-18に係る発明は、GALNTL5の発現異常を指標にして男性不妊症を検出すること、及び男性不妊症に関するモデル動物を作製することに関するものであるのに対して、請求項 19-20に係る発明は、Galnt15遺伝子を用いて相同組換えが起こった組換え細胞をネガティブ選択により選択する方法、及びそのためのネガティブ選択マーカーに関するものである。

そして、両者はGalnt15遺伝子を用いる点において技術的特徴を共有しているに過ぎず、当該技術的特徴はJP 2008-148594 Aの開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、当該技術的特徴は特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明の間には他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

よって、請求項 9-18に係る発明と請求項 19-20に係る発明とは単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

請求項 9-18

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2009年7月)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53 (2006.01)			G 0 1 N	33/53		D
G 0 1 N 33/68 (2006.01)			G 0 1 N	33/68		

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI , NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(出願人による申告)平成22年度、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構「糖鎖機能活用技術開発」事業、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(72)発明者 持田 慶司
茨城県つくば市高野台3丁目1番地の1 独立行政法人理化学研究所 筑波研究所内

(72)発明者 高崎 延佳
茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内

(72)発明者 成松 久
茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内

Fターム(参考) 2G045 AA25 DA14 DA36 FB01 FB03
4B024 AA11 BA10 CA04 CA20 DA02 EA04 GA11
4B063 QA01 QQ26 QQ53 QR08 QR62 QS26
4H045 AA11 AA30 BA10 DA76 DA89 EA50 FA74

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	检测男性不育症和男性不育模型的致病因素的方法		
公开(公告)号	JPWO2013122265A1	公开(公告)日	2015-05-21
申请号	JP2013558770	申请日	2013-02-15
[标]申请(专利权)人(译)	独立行政法人理化学研究所		
申请(专利权)人(译)	国立研究开发法人产业技术総合研究所 国立研究开发法人理化学研究所		
[标]发明人	小倉淳郎 持田慶司 高崎延佳 成松久		
发明人	小倉 淳郎 持田 慶司 高崎 延佳 成松 久		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/18 C12Q1/02 C12Q1/68 A01K67/027 G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	C12Q1/6883 A01K67/0276 A01K2227/105 A01K2267/03 C07K14/47 C07K16/40 C12N15/8509 G01N33/689		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/18 C12Q1/02 C12Q1/68.A A01K67/027 G01N33/53.D G01N33/68		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB03 4B024/AA11 4B024/BA10 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B063/QA01 4B063/QQ26 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR62 4B063/QS26 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/DA76 4H045/DA89 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	2012033273 2012-02-17 JP		
其他公开文献	JP5954800B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)
 本发明提供了一种以GALNTL5基因突变或GALNTL5蛋白表达异常为指标来检测雄性不育的方法，以及将突变引入到Gantl5基因中的人类雄性不育模型动物。以男性受试者精子中GALNTL5基因异常表达为指标的男性不育的检测，检测男性不育的方法，全部或部分精子基因不足或GALNTL5蛋白表达缺失的方法，或具有减少或减少的雄性不育非人类模型动物。

(19) 日本国特許庁(JP)	再公表特許(A1)	(11) 国際公開番号 WO2013/122265
発行日 平成27年5月21日(2015.5.21)	(43) 国際公開日 平成25年8月22日(2013.8.22)	
(51) Int. Cl. C12N 15/09 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01) C12Q 1/02 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01) A01K 67/027 (2006.01)	F I C 1 2 N 15/00 Z N A A C 0 7 K 16/18 C 1 2 Q 1/02 C 1 2 Q 1/68 A O 1 K 67/027	テ-マコード(参考) 2 G 0 4 5 4 B 0 2 4 4 B 0 6 3 4 H 0 4 5
出願番号 特願2013-558770(P2013-558770)	(71) 出願人 301021533	
(21) 国際出願番号 PCT/JP2013/054425	国立研究開発法人産業技術総合研究所	
(22) 国際公開日 平成25年2月15日(2013.2.15)	東京都千代田区麻が関1-3-1	
(31) 優先権主張番号 特願2012-33273(P2012-33273)	(71) 出願人 503358821	
(32) 優先日 平成24年2月17日(2012.2.17)	国立研究開発法人理化学研究所	
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	埼玉県和光市広沢2番1号	
	(74) 代理人 100091086	
	弁理士 平木 裕輔	
	(74) 代理人 100118773	
	弁理士 藤田 節	
	(74) 代理人 100111741	
	弁理士 田中 夏夫	
	(72) 発明者 小倉 淳郎	
	茨城県つくば市高野台3丁目1番地の1	
	独立行政法人理化学研究所 筑波研究所内	
	最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 男性不妊症の原因因子検出方法及び男性不妊症モデル動物		