

国立遺伝学研究所年報

第 51 号

(平成 12 年)

大学共同利用機関

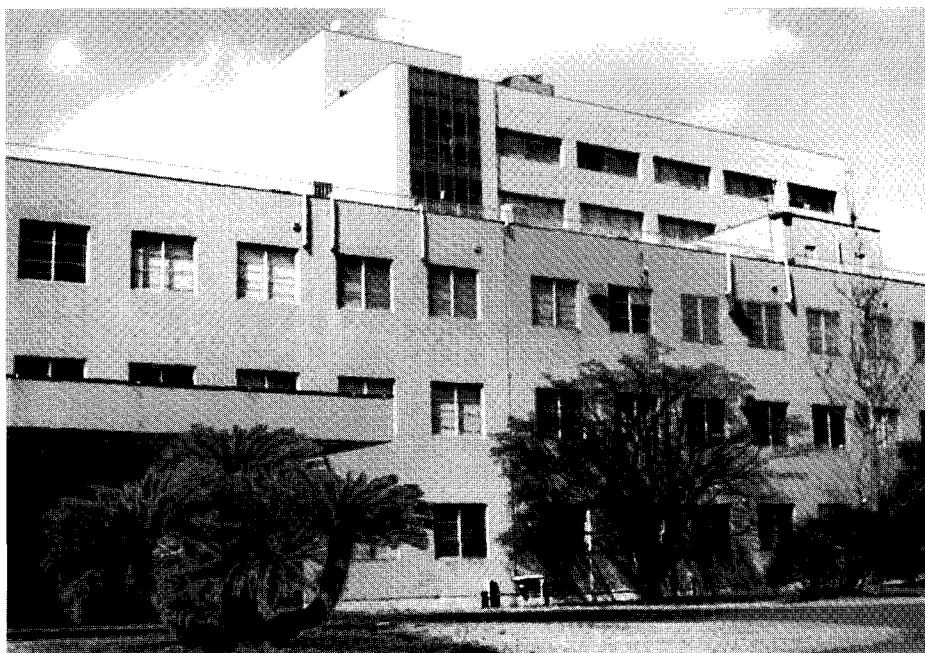
国立遺伝学研究所

目 次

<p>I. 巻 頭 言 1</p> <p>II. 研究室一覧 3</p> <p>III. 研究の概要 5</p> <p> A. 分子遺伝研究系 5</p> <p> A-a. 分子遺伝研究部門 5</p> <p> A-b. 変異遺伝研究部門 20</p> <p> A-c. 核酸化学研究部門 24</p> <p> B. 細胞遺伝研究系 28</p> <p> B-a. 細胞遺伝研究部門 28</p> <p> B-b. 微生物遺伝研究部門 37</p> <p> B-c. 細胞質遺伝客員研究部門 42</p> <p> C. 個体遺伝研究系 44</p> <p> C-a. 発生遺伝研究部門 44</p> <p> C-b. 形質遺伝研究部門 56</p> <p> C-c. 初期発生研究部門 63</p> <p> C-d. 生理遺伝客員研究部門 67</p> <p> D. 集団遺伝研究系 71</p> <p> D-a. 集団遺伝研究部門 71</p> <p> D-b. 進化遺伝研究部門 73</p> <p> D-c. 理論遺伝研究部門 86</p> <p> E. 総合遺伝研究系 87</p> <p> E-a. 人類遺伝研究部門 87</p> <p> E-b. 育種遺伝研究部門 97</p> <p> E-c. 脳機能研究部門 99</p> <p> E-d. 応用遺伝客員研究部門 102</p> <p> F. 系統生物研究センター 105</p> <p> マウス系統研究分野</p> <p> F-a. 哺乳動物遺伝研究室 ... 106</p> <p> F-b. 発生工芸研究室 116</p> <p> イネ系統研究分野</p> <p> F-c. 植物遺伝研究室 119</p> <p> 大腸菌系統研究分野</p> <p> F-d. 原核生物遺伝研究室 ... 130</p> <p> 無脊椎動物系統研究分野</p> <p> F-e. 無脊椎動物遺伝研究室 . 135</p> <p> G. 生物遺伝資源情報総合センター 138</p> <p> G-a. 系統情報研究室 139</p> <p> G-b. 生物遺伝資源情報研究室 142</p>	<p> H. 構造遺伝学研究センター 152</p> <p> H-a. 生体高分子研究室 152</p> <p> H-b. 超分子機能研究室 155</p> <p> H-c. 構造制御研究室 159</p> <p> H-d. 超分子構造研究室 164</p> <p> H-e. 遺伝子回路研究室 169</p> <p> I. 生命情報研究センター 176</p> <p> I-a. 遺伝情報分析研究室 ... 177</p> <p> I-b. 大量遺伝情報研究室 ... 187</p> <p> I-c. 遺伝子機能研究室 192</p> <p> I-d. 分子分類研究室 194</p> <p> J. 放射線・アイソトープセンター 197</p> <p> K. 実験農場 198</p> <p> L. 技術課 200</p> <p>IV. 海外における活動 202</p> <p>V. ほかの機関における講義 211</p> <p>VI. 共同研究事業 212</p> <p>VII. 生物遺伝資源・DNA情報 217</p> <p>VIII. 行 事 242</p> <p>IX. 庶 務 244</p> <p> A. 沿 革 244</p> <p> B. 組織（機構と職員） 245</p> <p> C. 土地及び建物 273</p> <p> D. 予 算 274</p> <p> E. 奨学寄附金・受託研究費 275</p> <p> F. 日 誌 284</p> <p> G. 諸 会 286</p> <p> H. 栄 誉 291</p> <p> I. 図書及び出版 292</p> <p>X. 総合研究大学院大学生命科学 研究科遺伝学専攻の概要 ... 297</p>
---	---

国立遺伝学研究所年報

第51号 平成12年



研究本館

国立遺伝学研究所

I. 巻 頭 言

ここに国立遺伝学研究所年報第51号(平成12年度)をお届けします。今年度も昨年度にひきつづき、政府の行政改革の一環として共同利用研究機関の「独立行政法人化」が国立大学と平行して求められるなかでのあわただしい一年となった。単なる効率化のための行政改革としてではなく、学術研究と高等教育のための改革となるようにひきつづき努力をしていかなければならない。このような時期にこそ研究所のレベルアップをはかり研究成果をあげて、外から見ても明確な研究所の存在意義を確立していくことが必要である。

平成12年1月から12月の期間における教官の人事異動としては、永年研究所の発展に貢献された村上昭雄助教授(個体遺伝研究系)が停年退官された。さらに、相賀裕美子教授(系統生物研究センター)が国立医薬品食品衛生研究所から、角谷徹仁助教授(総合遺伝研究系)が農業生物資源研究所から、今本尚子助教授(構造遺伝学研究センター)が大阪大学から、また仁木宏典助教授(放射線・アイソトープセンター)が熊本大学から着任した。さらに、川上厚志助手(個体遺伝研究系)が名古屋大学から着任した。徳永万喜洋教官(構造遺伝学研究センター)が教授に、上田均教官(個体遺伝研究系)が助教授にそれぞれ昇任し、前仲勝実助手(構造遺伝学研究センター)、十川久美子助手(構造遺伝学研究センター)、椎名伸之助手(構造遺伝学研究センター)、小瀬真吾助手(構造遺伝学研究センター)が採用されてセンターと研究部門の陣容が充実した。なお、天前豊明助手(集団遺伝研究系)はイスラエル国ヘブライ大学での研究のため休職となった。一方、齋藤哲一郎助手(系統生物研究センター)は京都大学再生医科学研究所助教授へ、多田高助手(系統生物研究センター)は京都大学再生医科学研究所助手へ、太田力助手(細胞遺伝研究系)は国立がんセンター研究所病理部第三組織病理研究室長へ(同日付常勤併任)、服田昌之助手(個体遺伝研究系)はお茶の水女子大学理学部助教授へ、とそれぞれ転出した。このように、人事の交流がきわめて活発に行なわれていることは、研究所の活性化のためにもきわめて好ましいことである。

管理部でも、小関賢三会計課長が定年退職され、4月に砂田 箒事務部長が岡崎国立共同研究機構総務部長に転任となり、後任には上隅清孝(岩手大学庶務部長)が、小関会計課長の後任には高橋昭二(東京工業大学施設部企画課長)がそれぞれ着任し、石井百合子技術課植物・微生物班長が、11年3月定年退職された三田晏彦技術課長の後任として昇任し、1年間の所長の技術課長併任は終了した。

総合研究大学院大学生命科学研究科遺伝学専攻については、後期博士課程学生37名(12.3在籍者)の教育指導を行ない、あらたに15名が入学し、8名(12.3修了者)が理学博士の学位を取得した。その他、COE関係では外国人研究員9名、博士研究員15名が研究と教育とを行なった。

この一年間、研究所での研究の発展と機構の充実とは順調に推移したと言える。21世紀に向けて「独立行政法人化」などに対する小手先の対応に追われることなく、ゲノム時代を迎えて新しい遺伝学研究の方向性を示すべく、今後とも努力をしていきたい。本冊子をお読みいただいた方々からも研究所の研究成果および今後の研究方向などについて、ぜひともご批判とご教示をお願いしたいと思う。

堀 田 凱 樹

II. 研究室一覽

(平成12年12月31日現在)

研究系等	研究部門等名	教授	助教授	助手
分子遺伝研究系 研究主幹(併) 石濱 明	分子遺伝研究部門	石濱 明		藤田 信之 光澤 浩 木村 誠
	変異遺伝研究部門		山尾 文明	岸 清 野 浩明
	核酸化学客員研究部門	水本清久(非)	田中 寛	
細胞遺伝研究系 研究主幹(併) 荒木 弘之	細胞遺伝研究部門	小川 智子	今井 弘民	田中 茂生 太田力(併)
	微生物遺伝研究部門	荒木 弘之	安田 成一	上村 陽一郎
	細胞質遺伝客員研究部門	富澤純一(非) 二木宏明(非)		
個体遺伝研究系 研究主幹(併) 廣瀬 進	発生遺伝研究部門	廣海 健	藤澤 敏孝	清水 裕 岡部 正隆 細谷 俊彦
	形質遺伝研究部門	廣瀬 進	上田 均	湊山 清 田 正明
	初期発生研究部門	武田 洋幸		川上 厚志
	生理遺伝客員研究部門	木山亮一(非)	白川 昌宏	
集団遺伝研究系 研究主幹(併) 池村 淑道	集団遺伝研究部門			高野 敏行
	進化遺伝研究部門	池村 淑道	齊藤 成也	天前 豊明 深川 竜郎
	理論遺伝客員研究部門	近藤 滋 北野宏明(非)		
総合遺伝研究系 研究主幹(併) 佐々木 裕之	人類遺伝研究部門	佐々木 裕之	藤山秋佐夫	佐渡 敬
	育種遺伝研究部門		角谷 徹仁	
	脳機能研究部門		平田 かつみ	川崎 能彦
	応用遺伝客員研究部門	長戸 康郎 高木 信夫		

研究室一覽

研究系等		研究部門等名		教授	助教授	助手
研	系統生物 研究センター センター長(併) 城石俊彦	マウス系統 研究分野	哺乳動物 遺伝研究室	城石俊彦		小出剛
			発生工 学研究室	相賀裕美子		
		イネ系統 研究分野	植物遺 伝研究室		倉田のり	伊藤幸博
			大腸菌系統 研究分野	原核生 物学研究室		西村昭子
施	生物遺伝資源情報 総合センター センター長(併) 小原雄治	無脊椎動物 系統研究分野	無脊椎動物 遺伝研究室	林茂生		後藤聡
			系統情報 研究室		山崎由紀子	藤田昌也
設	構造遺伝学 研究センター センター長(併) 桂 勲		生物遺 伝資源情 報研究 研究室	小原雄治		安達佳樹
			生体高 分子研 究室	徳永万喜洋		椎名伸之
			超分子 機能研 究室	嶋本伸雄		十川久美子 (永井宏樹)
			構造制 御研 究室	桂 勲		石原健
			超分子 構造研 究室		白木原康雄	前仲勝実
研	生命情報研究センター センター長(併) 五條堀孝		遺 伝子回 路研 究室		今本尚子	小瀬真吾
			遺 伝情 報分 析研 究室	五條堀孝		池尾一穂 今西規
			大 量遺 伝情 報研 究室	西川建		太田元規
			遺 伝子 機 能 研 究 室	舘野義男		小林薫 (深海)
設	放射線・アイト-プセン ター長(併) 石濱明 実験園 場 園場長(併) 倉田のり		分 子分 類研 究室	菅原秀明		宮崎智
					仁木宏典	
						野々村賢一

※(永井宏樹)は、研究休職中

III. 研究の概要

A. 分子遺伝研究系

A-a. 分子遺伝研究部門

分子遺伝研究部門では、本年も3つの課題、「原核生物における転写装置の機能制御と転写の包括制御機構」、「真核生物の転写装置の分子解剖」及び「ウイルスの転写・複製装置の構造-機能相関」に沿った研究を継続した。これらの研究には、教授・石浜 明、助手・藤田信之、光澤 浩、木村 誠の4名のスタッフに加えて、科学技術振興事業団CREST研究員・本田文江、A. Azam TALUKDER、櫻井仁美、Sujatha SITARAMAN、山本兼由、日本学術振興会・外国人特別研究員・Jung-Shan HWANG(現・遺伝研・生命情報研究センター)、遺伝研COE外国人研究員・Dimtry KOLPASHCHIKOV(ロシア科学アカデミー生物化学研究所)、Olga N. OZOLINE(ロシア科学アカデミー細胞生物物理学研究所)、大学院生・片山 映(総研大・生命科学、現・日本医科大学)、三戸部治郎(総研大・生命科学、現・国立感染症研究所)、野村 扶(総研大・生命科学)、牧野嶋秀樹(総研大・生命科学)、岡本拓人(静岡県立大・薬学)、科学技術振興事業団CREST技術員・鈴木久子、海道雅子、COE研究支援推進員・遠藤静子、神田えみ、小塩悦子、研究補助員・高橋美津恵と、秘書・原 雅子が参加した。加えて、今年も、日印科学協力事業によるDipankar CHATTERJI(インド科学研究所)、J. GOWRISHANKAR(細胞分子生物学センター)など、国内外共同研究グループから、多くの短期滞在研究者を迎えた。

これらの研究には、遺伝研校費、総研大校費に加えて、次の文部省科学研究費補助金の支援を得た。平成12年度文部省科学研究費 重点領域研究・金属センサー蛋白質(代表者・日本医大・西野武士)「転写装置の機能制御の分子基盤」(石浜)、特定領域研究・転写調節機構(代表者・東北大学・藤井義明)「RNAポリメラーゼIIを中心とした蛋白質相互作用による転写調節機構の解析」(木村)、特定領域研究・ゲノム生物学(代表者・奈良先端大学院大学・小笠原直毅)「微生物における転写調節系の比較ゲノミクス・プロテオミクス」(藤田)、特定領域研究・多元的情報伝達(代表者・北海道大学・稲垣彦彦)「大腸菌RNAポリメラーゼの α サブユニットを介した転写活性化のメカニズム」(藤田)、基盤研究(C)「転写開始過程における σ 因子の動態」(藤田)、奨励研究(A)「分裂酵母RNAポリメラーゼIIの遺伝子組換え蛋白質による再構成」(木村)。また、総合研究大学院大学共同研究「極限環境下の生存戦略の機構」(代表者、生命科学研究所・分子生物機構論・村田紀夫)(石浜、藤田)、「人工DNAを用いる遺伝子発現制御と機能分子構築」(代表者、生命科学研究所分子生物機構論・諸橋憲一郎)(石浜)に参加した。遺伝研共同研究について

は、次の申し込みを受け入れ実施した。共同研究(A)「微生物の環境適応の分子機構」(鹿児島大学・前田広人)、共同研究(A)「大腸菌の増殖曲線における相移行のメカニズム」(明治大学・前田理久)、「大腸菌静止期の代謝調節に果たすポリアミンの役割」(千葉大学・五十嵐一衛)、「細菌の環境適応と遺伝子発現制御」(近畿大学・内海龍太郎)、「生物医学情報学のインターネット統合技術に関する共同研究」(京都大学・金子周司)。

科学技術振興事業団・戦略基礎研究CREST「遺伝子発現ヒエラルキー決定機構の解明」(代表者・石浜 明)は、第3/4年度の研究を実施した。

国際共同研究の推進に、石浜は引き続き尽力した。日本学術振興会の日印自然科学協力事業のモダンバイオロジー領域で「飢餓環境における細菌の適応機構」に関する日印共同研究を組織した。

1. 原核生物における転写装置の機能制御

(1) RNAポリメラーゼ α サブユニットのC末端ドメインを介した転写活性化のメカニズム：藤田信之、遠藤静子、石浜 明(遺伝研・分子遺伝)

RNAポリメラーゼ α サブユニットのC末端ドメイン(α CTD)は、cAMP受容蛋白(CRP)をはじめとするクラスI群の転写因子やプロモーター上流に存在するUPエレメントと呼ばれるATリッチなDNA配列との相互作用を介して、転写活性化に重要な役割を果たす。我々は、 α CTD上の機能部位のマッピングや、その作用機構の解析を行ってきたが、最近、 α CTD上に新たなDNAシグナル識別部位を同定し(Ozoline *et al.*, 2000)、また α CTDはUPエレメントDNAのminor grooveを認識することを実証した(Yasuno *et al.*, 2000)。 α CTDは、プロテアーゼに感受性を示す10数アミノ酸からなるリンカーを介してRNAポリメラーゼ本体と結ばれている。DNAフットプリンティング、蛋白表面に導入した鉄-EDTA誘導体によるDNA鎖切断(Ishihama, 2000a)、NMRによる緩和測定などから、ドメイン間リンカーは、構造的に高い自由度を持っていることが示唆されてきた。一方、リンカーへの変異導入実験から、リンカー部分は α ヘリックスやpoly-Prolineヘリックスなどの固い構造を許容しうること、逆に、poly-Glycineのような柔らかい構造は転写活性化を著しく阻害することがわかった(Fujita *et al.*, 2000)。その他の結果もあわせて考えると、 α サブユニットのドメイン間リンカーは従来考えられてきたように完全に無構造なのではなく、 α CTDと転写因子もしくはUPエレメントとの相互作用にともなってリンカー部分に安定な構造が誘導され、これが転写活性化のプロセスにおいて重要な役割を果たしているのではないかと考えられた。

α CTD上のアミノ酸置換変異体(R265A)やC末端ドメイン全体を欠いた変異体(α 235)は、プロモーター上流域DNAとの相互作用ができない。すなわちこれらの変異は転写活性化プロセスの初期段階に影響を与えているものと考えられる。これに対して、 α サブユニットのリンカー領域をpoly-Glycineに置き換えた変異体は、R265Aや α 235と同じくCRP依存の転写およびUPエレメント依存の転写を強く阻害したにもかかわらず、

α CTD とプロモーター上流域 DNA との相互作用および閉鎖複合体の形成にはほとんど影響を与えなかった。このことは、 α CTD は開始複合体形成の段階のみならず、その後安定な伸長複合体に移行するまでの段階でも重要な役割を果たしていること、さらに、後者のプロセスに α サブユニットのリンカー領域の構造が大きく関与していることを示唆している。

(2) 大腸菌クラス 3 及びクラス 4 転写因子の探索：野村 扶，片山 映，藤田信之，石浜明(遺伝研・分子遺伝)

大腸菌ゲノムには約 4,000 遺伝子が同定されているが、その転写パターンを変えることで、大腸菌は様々な環境に適応して生存している。転写パターンの変化は、転写因子との相互作用による RNA ポリメラーゼの特異性変化に依っている (Ishihama, 2000b)。我々は、転写因子を RNA ポリメラーゼとの接点に応じて、4 群への分類を提唱して来た。 α サブユニットと相互作用をするクラス 1 及び σ サブユニットと相互作用をするクラス 2 転写因子についてはすでに多くが知られ、それぞれのサブユニット上での蛋白-蛋白相互作用接点のマッピングが進んでいる (Ishihama, 2000b)。一方、 β 、 β' サブユニットと相互作用をするクラス 3、クラス 4 の転写因子については、殆ど解析がなされていない。 β 、 β' サブユニットは、RNA 合成活性中心を形成することから、 β 、 β' サブユニット結合因子は、転写開始のみならず、伸長過程や転写終結にも影響を及ぼすことが考えられる。先に我々は、 β 、 β' サブユニット上のサブユニット間の接点の系統的マッピングを行った (Nomura *et al.*, 1999; Katayama *et al.*, 2000)。その延長上で、本年度は、両サブユニットと接触する蛋白因子の組織的探索とその機能解析を目指した研究を行った。

β 及び β' サブユニットそれぞれにグルタチオン SH 基転移酵素 (GST) を融合させた蛋白を、大腸菌内で非誘導条件下で低レベルに発現させ、GST 結合支持体を用いて GST- β または β' 融合蛋白を含む複合体を回収した。その結果、 β 結合蛋白としては、RNA ポリメラーゼのコア酵素サブユニット (α 、 β') 及び σ^{70} に加え、HepA/RapA 蛋白質、グリセロールキナーゼ (GlpK)、メチオニンアデノシル転移酵素 (MetK)、*yfhO* 遺伝子産物、リボゾーム蛋白質 L1 (RplA)、L13 (RplM)、S6 (RpsF) などが複合体として同定された。一方、GST- β' サブユニットに結合して精製された蛋白成分については、SDS-PAGE により分離し、N 末端アミノ酸シーケンシングにより同定したところ、現在までに、HepA/RapA、グリセロールキナーゼ (GlpK)、リボゾームタンパク L6 (RplF)、S2 (RpsB)、転写終結因子 ρ (Rho) など、10 種類を越えるクラス 4 転写因子候補が同定された。 β 及び β' サブユニット結合蛋白として同定された成分のそれぞれについて GST との融合体を構築し、RNA ポリメラーゼまたは各サブユニットの結合活性を調べた。

HepA/RapA については、今回、 β 、 β' 両サブユニットへの結合が示唆され、また既に精製 RNA ポリメラーゼ結合蛋白質のひとつとして当研究室で同定されていたし、他の研究室でも確認されている。そこで、HepA/RapA 蛋白質の RNA ポリメラーゼ機能への影

響を、試験管内転写系で解析した。HepA/RapAはコア酵素へは強く結合したが、ホロ酵素へはほとんど結合せず、 σ サブユニットとコア酵素結合で拮抗している可能性が示唆された。一方、細胞内での生理機能を同定する目的で、HepA/RapA蛋白の合成制御、ジーンチップを利用した *hepA/rapA* 遺伝子破壊株での大腸菌全遺伝子の転写パターンの解析を行った。

(3)大腸菌転写因子とRNAポリメラーゼの相互作用: Sujatha S.¹, 山本兼由¹, 谷田勝教², 石浜 明¹ (¹ 遺伝研・分子遺伝, ² 遺伝研・放射線アイソトープセンター)

大腸菌の約230-260種類(研究報告7参照)の転写因子の内、少なくとも100-150種類は、RNAポリメラーゼと直接接触し、その機能に影響を与えると推定されている(Ishihama, 2000b)。これら転写因子群を我々は、接触相手のサブユニット α , σ , β , β' に応じて、クラス1, 2, 3, 4の4群に分類することを提唱した(Ishihama, 2000b)。これまでに、クラス1及びクラス2の転写因子群については、 α 及び σ サブユニット上での接点の分析が進んでいる。接点の同定は、主として、接触不能となるRNAポリメラーゼ変異体の変異部位のマッピングで行われて来たが、こうした遺伝学的実験は労力と時間を必要とする。そこで今回、更に多数の転写因子、特に現在当研究室で分離同定を進めているクラス3及びクラス4の、RNAポリメラーゼ上の接点のマッピングを迅速に行う目的で、精製転写因子表面にFeBABEを結合し鉄-EDTA誘導体による接触相手のRNAポリメラーゼサブユニット蛋白の切断点を分析する(Ishihama, 2000a)ことで、接点を決定する試みを行った。その為に、各サブユニットに、RNAポリメラーゼ機能に影響しない別々のエピトープタグを付加し、タグに対する特異抗体を用いたウエスタンブロット法で、各サブユニット由来の分解産物を同定する、サブユニット分解物同定の新しい方法を確立した。

一方、転写因子と予測されてはいるが実証のないものも含めて、大腸菌転写因子約50種類の大量発現と純化を行った。大腸菌蛋白でありながら時に大量発現が困難な転写因子があったので、各種大腸菌株を準備して、発現を許容する宿主を選択する操作を挿入することで、全ての転写因子の発現精製に成功した。転写因子としてのこれまで同定されていない蛋白、転写活性化または抑制機構の明らかでない蛋白因子については、支配下と推定されているプロモーターを利用して、識別DNAシグナルを同定し、また転写調節機構を試験管内転写系で調べた。その上で、従来開発して各種変異体RNAポリメラーゼを用いた遺伝学的手法(2000b)に加えて、新規に開発した接触依存的サブユニット分解法(Ishihama, 2000a)で、これら転写因子のRNAポリメラーゼ上の接触部位の系統的マッピングを開始した。

(4)大腸菌各種シグマ因子及び各種転写因子の細胞内濃度: 石浜 明¹, 小塩悦子¹, 谷田勝教², 前田広人³, 岩田 晃⁴ (¹ 遺伝研・分子遺伝, ² 遺伝研・放射線アイソトープセンター, ³ 鹿児島大・水産, ⁴ 日本生物科学研究所)

大腸菌では、7種類の σ 因子が同定されているが、実験室培養の増殖期には、 σ^{70} , σ^N ,

σ^F の 3 種類だけが存在しているが、増殖を停止し定常期に入ると、加えて σ^S が出現し、また熱ショックなどのストレスが加わると、 σ^H 、 σ^E 、 σ^{FecI} も出現する (Ishihama, 2000b; Maeda *et al.*, 2000a). 従って、細菌成育の環境に応じて、7 種類の σ 因子が、さまざまな組み合わせで存在し、約 2000 分子と推定される RNA ポリメラーゼコア酵素への結合で競争し拮抗していると推定される。その実態を知る手掛かりとして、試験管内で、純化した σ 因子 7 種類を混合し、コア酵素への結合力の差を比較した (Maeda *et al.*, 2000b). 平行して、全 7 種類のシグマ因子の細胞内濃度の系統的測定を開始した。その為に、全シグマサブユニットに対する特異抗血清を準備して、定量的ウエスタンブロット法を利用して全シグマ蛋白質の定量系を準備した。これまでに、(i)細菌増殖相の変化に伴うシグマ因子濃度の変化 (Maeda *et al.*, 2000a), (ii)細菌培養温度の変化に伴うシグマ因子濃度の変化、および (iii)細菌培養の培地組成の変化に伴うシグマ因子濃度の変化を観測した。いずれの場合も、7 種類それぞれの濃度と量比は、顕著に変動することが判明し、シグマ因子濃度の制御で、発現遺伝子パターンを制御しているとの理論に矛盾しない結果が得られている。

大腸菌 RNA ポリメラーゼは、恒常的に発現している遺伝子を除いて、多くの誘導性の遺伝子発現には、さらに遺伝子あるいは遺伝子群特異的な転写因子を必要とする。多くの転写因子は、RNA ポリメラーゼと直接接触してその機能を制御する。両者の接点の系統的分析に平行して、転写因子の細胞内濃度の制御の実態を解析する研究を開始した。大腸菌には、RNA ポリメラーゼと直接相互作用をすると推定される転写因子が約 100-150 種類存在する (Ishihama, 2000b). その内、これまでに約 50 種類を精製し、それぞれに対して特異抗体を作製した。抗体コレクションを用いて、転写因子濃度を定量的ウエスタン法で定量した。大腸菌 W3110 株を LB 培地で培養した時には、対数増殖期では転写因子 Fis が最も多く、また増殖を停止し定常期に移行する時期に増加する転写因子としては、Dps, IHF, NusA などが同定された。しかし、増殖相に伴う濃度変化の様相は、培養温度でも異なっていた。

(5)大腸菌シグマサブユニットのアンチシグマ因子による機能制御：石浜 明，寺社下美樹，Dipak DASGUPTA，山本兼由 (遺伝研・分子遺伝)

大腸菌 RNA ポリメラーゼのプロモーター認識を担当する σ サブユニットは、大腸菌では 7 種類存在し、それぞれは一群の遺伝子の転写をする。従って、 σ サブユニット 7 種類それぞれの濃度は、遺伝子発現パターンを決定する主要な要因のひとつである。この仮説を実証する目的で我々は、各種培養条件下での細胞内 σ サブユニット濃度の測定を行ってきた (研究報告 4 参照)。定常期大腸菌では、期待通り、定常期発現遺伝子のプロモーターを認識する σ^S は確かに増加することを観察したが、対数増殖期遺伝子の転写を担当する σ^{70} は減少しなかった。そこで、 σ^{70} の機能を制御する調節因子の存在を予想し、アンチシグマ Rsd を発見した。Rsd と σ^{70} 相互作用機構解析の一環として、 σ^{70} 上の Rsd 結合部位のマッピングを行った。Rsd に結合した FeBABE による σ^{70} 切断部位の同定と、

Ala置換 σ^{70} コレクションのRsd結合能の測定実験から、Rsdは、シグマ保存領域4近傍にあることが判明した(Jishage *et al.*, 2001). この領域は、クラス4転写因子群の結合部位でもある(Bown *et al.*, 2000; Ishihama, 2000b; Wigneshweraraj *et al.*, 2000).

アンチシグマ因子は、大腸菌7種 σ サブユニットの内、既に σ^F に対するFlgM, σ^E に対するRseが知られていたが、今回さらに他のシグマサブユニットに対するアンチシグマ因子の探索を行った. 先にRsdの発見に成功した(Jishage and Ishihama, 1999; Jishage *et al.*, 2001)ように、 σ^S をGSTとの融合蛋白として発現し、GST- σ^S 複合体を分離し、そこに結合している蛋白を分析同定した. その結果、定常期特異的DNA結合蛋白Dps(DNA-binding protein for starvation)が見つかった. Dspを発現精製し、試験管内での複合体形成を調べた結果、 σ^S を強く結合することが分かった. Dsp- σ^S 複合体形成に伴って、 σ^S 依存性プロモーターを利用した試験管内転写が強く抑制された. 定常期に大量に発現されるDpsがこのような制御機能を示すことに疑問を抱き、細胞内でのDpsの存在状態を測定した. その結果、定常期初期には新生されたDpsは全てゲノムDNAに結合するが、定常後期で、DNA結合域を超えてDpsが合成されると、遊離のDpsの出現が観測された. この遊離成分が σ^S を結合し、 σ^S の機能抑制に関与すると推定された.

(6) 大腸菌定常期移行の制御機構：牧野嶋秀樹，石浜 明(遺伝研・分子遺伝)

大腸菌が増殖しある細胞濃度に達するとそれ以上の細菌が生存できない限界に到達する. 細菌は生存許容個体数を感知する能力(Quorum Sensing)を備え、その環境に適応し生存を続ける為の遺伝子群を発現すると考えられている. この移行過程の遺伝子発現の包括制御には、RNAポリメラーゼの機能特異性の変化が大きな役割をしてくれ我々は提唱してきた(Ishihama, 2000b). そこで、大腸菌対数増殖期から定常期への移行過程での遺伝子発現包括制御機構を詳細に解析する目的で先ず、大腸菌が定常期への移行過程で出現する分化形質のマーカーを同定し、その変化を定量的に観測する実験系を開発した. そのひとつとして、従来CRESTプロジェクトの一環として行って来た大腸菌プロテオーム分析の中で同定された、定常期各時期特異的に発現する遺伝子のプロモーターに、レポーターとして各種の蛍光発色蛋白遺伝子を融合し、蛍光蛋白の発現でプロモーターの活性を観測定量する系を開発した. その結果、蛍光発現の時期と発光量が、用いるプロモーター種で異なり、細菌分化の段階を示す指標として利用できることが判明した. 今後は、さらに分化形質の探索を継続すると共に、分化機構を解明する為に、分化異常の変異体を単離し、分化に関与する遺伝子群を同定する計画である.

(7) バクテリアにおける転写調節系の比較ゲノミクス：藤田信之，石浜 明(遺伝研・分子遺伝)

微生物において、転写調節系やそれに関連したシグナル伝達系は、生物種間で最も変化が激しいものの一つである. これらを比較ゲノミクスの視点から解析することにより、

ゲノムと調節系の進化、様々な外的要因に対する微生物の適応戦略に迫りたいと考えている。今年度は主要な微生物についてゲノム横断的な転写因子のサーベイと分類を行ない、さらに一次構造に基づく大規模な系統分析を行なった。

まず、大腸菌と枯草菌について、PSI BLASTを中心としたホモロジー検索および文献調査により、DNA結合性の転写因子のリストを作成した。次にこれらの配列をもとにして、全ゲノム配列が明らかとなっている原核微生物のうち代表的なもの14種(上記2種を含む)についてゲノム横断的な転写因子のサーベイと一次構造による分類を行なった。ゲノムサイズが4.6Mの大腸菌K-12株の場合で、230-260種類の転写因子を持つと推定され、そのうち9割以上のものが他の転写因子との間でファミリーを形成していた。ゲノムサイズと転写因子の数との間には明らかな正の相関が見られたものの、ゲノムサイズの減少とともに転写因子の数は急激に減少し、ゲノムサイズが約1.5MのChlamydiaやHelicobacterでは5種類前後であった。またゲノムサイズが0.6MのMycoplasmaは実質的に転写因子を持たないと考えられた。主要な転写因子ファミリーは大腸菌、枯草菌、ラン藻、さらに起源が古いと考えられるThermotogaでも保存されていることから、これらの種が分岐する以前にすでに雛形が存在していたと考えられる。一方、各ファミリーについて一次構造をもとにした系統分析を行なった結果、各ファミリー内で重複によって数を増やしていったのは、主として上記の種が分岐した後、プロテオバクテリア群が分岐をする以前であったと推定された。その後一部のバクテリアは、宿主への依存度が高まるなどの理由で、急速に転写因子を落としていったものと考えられる。

2. 真核生物の転写装置の分子解剖

(1) 分裂酵母RNAポリメラーゼIIサブユニット遺伝子の発現制御：櫻井仁美¹、岩田 晃²、石浜 明¹ (¹ 遺伝研・分子遺伝, ² 日本生物科学研究所)

分裂酵母のRNAポリメラーゼは、出芽酵母と同じく12個のサブユニットから構成されている。我々は先に、各サブユニットに対する抗体を作製し、定量的ウエスタン法で、各サブユニットの細胞内濃度を測定した(Kimura *et al.*, 2001)。完全培地での対数増殖期の分裂酵母JY741株では、細胞当たり換算して、Rpb3は 1.0×10^4 分子ともっとも少なく、RNAポリメラーゼIIに特異的なサブユニットのRpb1、Rpb2およびRpb7はその約1.5倍、Rpb9とRpb11は約4倍存在、Rpb4はRpb3の約10倍過剰に存在することが分かった。蛋白レベルの定量に続いて、本年度は、RNAポリメラーゼ遺伝子の転写地図の解析とmRNAの定量を行った(Sakurai and Ishihama, 2001)。転写開始部位の同定には、主としてcap構造をもつRNAだけを選択して5'端を同定できる、いわゆるオリゴキャップ法を用いた。12種類のサブユニット遺伝子の転写開始部位は、翻訳開始コドンから、18(*rpb3*)-214(*rpb7*)塩基上流ほぼ1ヶ所に、時には短い領域の数ヶ所(*rpb1*, *rpb2*, *rpb8*, *rpb9*, *rpb11*, *rpb12*)に存在した。転写開始部位上流には、既知の転写調節シグナルに加えて、*rpb*遺伝子群にだけ認められる配列が同定され、サブ

ユニット間の同調転写に関与している可能性が示唆された。一方、mRNAの定量には、各サブユニット遺伝子cDNAと同じプライマーで増幅できる既知量のコンペティターDNAと混合して行う、競合PCR法を用いた。その結果、mRNA量は必ずしも蛋白量と比例しないことが判明した。仮にmRNAと蛋白質の量比を翻訳効率とすると、5'非翻訳配列約100塩基のRpb9、Rpb12が最大で、それより短いRpb1、Rpb2、Rpb3、Rpb6、Rpb10、Rpb11では翻訳効率が低く、また5'非翻訳配列がさらに長いRpb4、Rpb5、Rpb7、Rpb8では、効率がまた低下する傾向を示した。RNAポリメラーゼサブユニット遺伝子の転写調節DNAシグナル、翻訳効率の影響するRNAシグナルの同定は、今後の課題である。

完全培地での対数増殖期分裂酵母では、12種類のサブユニット間の合成量に差が認められた。転写制御に係るサブユニットは、細胞培養条件で変動することが期待されたので、各サブユニットの分担機能を推定する研究の一貫として、培養条件を変えてサブユニット蛋白の測定を行った。完全培地培養で増殖相を追って調べた結果、RNAポリメラーゼIIの総量は細胞体積の減少に伴い低下したが、サブユニット間量比では余り変化は認められなかった。更に、培地組成を変え、また培養温度を変化させて、サブユニット量比の分析を継続している。

(2) 分裂酵母RNAポリメラーゼIIと相互作用する蛋白質因子の単離と同定：木村 誠，鈴木久子，石浜 明(遺伝研・分子遺伝)

RNAポリメラーゼIIは、12種類のサブユニットから成る分子量約500kDaの大型複合体である。先に我々は、サブユニット間の接点のマッピングと、サブユニット集合機構の解析を行って来た(Kimura and Ishihama, 2000)。多種類の小型核酸合成酵素が存在することから、RNA合成反応自体にはRNAポリメラーゼII分子内の一部分のみが関与し、他の部分は調節的な機能をもつと考えられる。また、RNAポリメラーゼIIは転写調節に関わる情報伝達の最終到達点であり、その機能の調節には多くの蛋白質因子の直接の相互作用が関与すると考えられる。RNAポリメラーゼIIと相互作用する蛋白質を単離・同定するため、染色体上のRNAポリメラーゼII第3サブユニット(Rpb3)遺伝子にFLAGタグをコードする配列を付加した分裂酵母株を作製し、タグを認識する抗体を利用して、その細胞抽出液からRNAポリメラーゼIIと相互作用蛋白質の複合体を単離した。その際、抽出液の調製方法を検討し、比較的穏やかな条件で抽出され、非リン酸化型RNAポリメラーゼIIを多く含む複合体と、比較的強い条件で抽出され、リン酸化型RNAポリメラーゼIIを多く含む複合体を分離した。RNAポリメラーゼII最大サブユニット(Rpb1)のC末端ドメイン(CTD)は、7アミノ酸残基の繰り返し構造(分裂酵母では29回)で構成され、非リン酸化型CTDをもつRNAポリメラーゼIIが転写開始複合体に集合し、転写開始時にCTDがリン酸化されることが知られている。したがって、上記2種の複合体は、細胞内でDNAから遊離していたRNAポリメラーゼII DNA上で転写途中にあったRNAポリメラーゼII それぞれを含むものであると考えられる。前者の複合体中の蛋白質は、基本転写因子TFIIFと、CTD特異的ホスファターゼとして出芽酵母とヒトで最近報告された分子

Fcp1であった。この複合体画分は、RNAポリメラーゼII/TFIIF/Fcp1複合体とRNAポリメラーゼII/Fcp1複合体の両者を含む。これは、多量のFcp1分子が細胞内でRNAポリメラーゼIIと直接結合した安定な複合体として存在していることを示し、従来の報告と大きく異なる。現在、この複合体の意味と機能について解析を進めている。また、今回単離された分裂酵母TFIIFは、出芽酵母TFIIFと同様に、高等動物と共通の2種類のサブユニットに加え、第3のサブユニットを含んでいる。これは、分裂酵母細胞は多くの点で出芽酵母よりも高等生物に近いという一般的な予想に反するものである。現在、分裂酵母におけるTFIIF第3サブユニットの機能についても解析している。

(3) 分裂酵母RNAポリメラーゼIIのRpb7サブユニットと相互作用する因子の解析：光澤 浩，神田えみ，石浜 明(遺伝研・分子遺伝)

RNAポリメラーゼIIに特異的に作用し、その機能特異性に影響する転写因子群の接触部位を同定するひとつの方法は、サブユニット遺伝子の変異によって生じた変異形質を抑制する変異を単離し変異遺伝子を同定する方法である。先にTF-IISの作用部位のひとつとしてRpb6を同定したのはこうした遺伝学的方法を利用した(Ishiguro *et al.*, 2000)。一方、Rpb3の機能部位のマッピングに関しては、*rpb3*遺伝子特異的に変異を導入して得た、多数の高温または低温感受性を示す分裂酵母株からRNAポリメラーゼIIを単離し、その異常機能を試験管内転写系で分析して行った(Mitobe *et al.*, 2001)。今回更に、two-hybrid法を利用して接触因子を直接同定する方法を導入した。

RNAポリメラーゼIIに特異的なサブユニットのひとつであるRpb7蛋白質は、他のサブユニットから解離可能な複合体をRpb4蛋白質と形成することが知られている。また、Rpb7はプロモーターからの正確な転写開始には必要であるが、DNAを鋳型としたRNA合成そのものには必要ないことが示されている。これらの事実は、Rpb7が遺伝子発現において何らかの調節的な役割をもつ可能性を示唆している。そこで、RNAポリメラーゼIIによる転写におけるRpb7の機能を明らかにするために、two-hybrid法を用いて、分裂酵母のRpb7蛋白質と相互作用する因子の単離を試みた。その結果、出芽酵母の*NRD1*遺伝子と相同性を示す新しい遺伝子を得た。出芽酵母Nrd1蛋白質は、RNAポリメラーゼIIの最大サブユニットRpb1のCTDと相互作用し、また、RNA結合配列をもつことから、pre-mRNAのプロセッシングに関与すると考えられている因子である。Two-hybrid法で検出された分裂酵母のRpb7とNrd1相同蛋白質との相互作用が、生体内で意味のある結合であるかどうかに関する手がかりを得るために、出芽酵母のRpb7とNrd1が相互作用するかどうか調べたところ、相互作用することがわかった。Rpb7蛋白質とNrd1(相同)蛋白質の相互作用は、Rpb7が転写開始だけでなく、pre-mRNAのプロセッシングにも関わっている可能性を示しており興味深い。

(4) 分裂酵母の基本転写因子TFIIDの解析：光澤 浩，石浜 明(遺伝研・分子遺伝)

基本転写因子TFIIDは、TATA結合蛋白質とTAFとよばれる蛋白質群からなる複合体で、RNAポリメラーゼIIによる転写開始に中心的な役割をはたしている。ヒト、ショウジョ

ウバエ、出芽酵母のTFIIDには、WDリピートをもつTAFは1種類しかない。これに対し、分裂酵母のTFIIDは、WDリピートをもつ2種類のTAF(TAF72およびTAF73)を含んでいることを共免疫沈降実験で証明した(Mitsuzawa *et al.*, 2001)。興味深いことに、これらのTAFを高発現すると、細胞周期のM期に特異的なユビキチン依存蛋白質分解に欠損をもつ変異株の細胞周期停止が回復する。このことは、TAF72およびTAF73が細胞周期のM期の進行に関与する遺伝子群の発現を制御している可能性を示している。

出芽酵母のWDリピートをもつTAFは、TFIIDだけでなく、ヒストンアセチル化酵素Gcn5を含むSAGA複合体の構成要素であることが知られている。そこで、分裂酵母のTAF72およびTAF73が、TFIID以外の転写複合体中にも含まれているかどうかを共免疫沈降実験により調べた。その結果、TAF72はGcn5相同蛋白質と同じ複合体中に存在するのに対して、TAF73は同じ複合体中にはないことが明らかになった。したがって、分裂酵母のTAF72は、TFIIDとSAGAの両方に含まれ、TAF73は、TFIIDだけに存在すると考えられる。これまでTAFの生体内での機能は、主として出芽酵母の変異株を用いておこなわれてきたが、WDリピートをもつTAFの「TFIID複合体中における」機能の解析のためのモデルとして、分裂酵母のTAF73は有用であると思われる。

3. ウイルスの転写・複製装置の構造-機能相関

(1)インフルエンザウイルスRNAポリメラーゼサブユニットの構造-機能相関の解析：本田文江¹、岡本拓人²、海道雅子¹、Dimitry KOLPASHCHIKOV¹、石浜 明¹（¹遺伝研・分子遺伝、²静岡県立大・薬）

インフルエンザウイルスRNAポリメラーゼは、ゲノムRNAの転写によるウイルスmRNA合成、複製による子孫ウイルスRNA合成のいずれにも関与している。ウイルスRNAポリメラーゼは、3種類のウイルスP蛋白質サブユニット(PB1, PB2, PA)から成り、cap-1 RNAエンドヌクレアーゼ活性、切断cap-1 RNA断片をプライマーとしたRNA合成活性(転写)、プライマーを必要としないRNA合成活性(複製)をもつことが示唆されている。バキュロウイルスに各サブユニットcDNAを挿入した組換え体ウイルス3種を、様々の組み合わせで昆虫細胞に感染し、3種P蛋白質を含む各種のP蛋白複合体の精製に成功した。精製P蛋白複合体を用いて、試験管内でのApGやグロビンmRNAをプライマーとしたRNA合成、cap-1 RNA切断、RNAキャップ結合、ポリA合成、ウイルスRNA結合などの活性を調べた。3P複合体はこれらの全ての活性を示したので、機能形態のインフルエンザウイルスRNAポリメラーゼが昆虫細胞内で形成されたと結論した。2種類のP蛋白複合体でも、幾つかの活性が検出されるので、各P蛋白の素機能を同定することが可能となった。

RNAウイルス感染細胞で多種類・高濃度の細胞RNAが存在する中、ウイルスRNAポリメラーゼがウイルスRNAだけを認識し増殖させるかは、RNAウイルス増殖機構の謎のひとつである。今回、ウイルスRNAを含まないウイルスRNAポリメラーゼが大量に得られ

たことで可能となった研究のひとつは、RNA ポリメラーゼが識別する RNA シグナルの分析である。様々の人工ウイルス RNA を作製し、RNA 合成の鋳型活性、cap-RNA エンドヌクレアーゼ促進活性を調べ、それぞれに必要な RNA シグナルを極限することに成功した。また、各種ヌクレオチド類似体を利用し、基質結合部位、鋳型結合部位、新生 RNA 結合部位などに取り込ませた後で、蛋白質とクロスリンクすることで、それぞれの活性部位を同定する系統的研究を開始した。ウイルス RNA を含まない RNA ポリメラーゼと人工ウイルス RNA 鋳型を用いた、再構成転写・複製系は、今後宿主因子のウイルス RNA ポリメラーゼへの影響を調べていく上でも重要な素材である。

(2) インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼの機能変換に関与する感染宿主因子の同定：本田文江¹、岡本拓人²、海道雅子¹、石浜 明¹（¹ 遺伝研・分子遺伝、² 静岡県立大・薬）

インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼは、ウイルスゲノム RNA の転写と複製の両方に関与する多機能酵素である。mRNA 合成は、宿主細胞の cap-1 構造をもつ mRNA を認識し切断後 cap-RNA 断片をプライマーとして開始され、ゲノム RNA 上の 5' 端近くの U クラスタで終結しポリ A が付加される。一方、複製の 2 段階反応、cRNA と vRNA 合成は、プライマーを使わず、*de novo* 合成として開始される。従って、ウイルス粒子中の vRNA の 5' 端には、三リン酸が残っている (Honda *et al.*, 1999)。転写酵素から複製酵素への変換は、ウイルス感染細胞中でだけ認められることから、機能変換には宿主因子が関わっていることが示唆されている。そこで我々は出芽酵母の two-hybrid スクリーニング法を用いて、HeLa 細胞 cDNA ライブラリーから出発し、各 P 蛋白と相互作用をする宿主細胞因子を検索してきた。現在までに、各 P 蛋白と相互作用をする宿主蛋白がいくつか単離された。得られた P 蛋白結合宿主因子 cDNA を、大腸菌で発現させ、得られた蛋白を試験管内ウイルス RNA 合成系に入れ RNA 合成への影響をみることで、ウイルス RNA 合成に影響する因子がいくつか同定された。そのひとつ PB1c54 については、大腸菌で発現させた蛋白を用いて抗体を作製し、ウイルス感染細胞抽出液を共免疫沈降法で調べたところ、PB1 サブユニットと共沈したので、感染細胞内でも相互作用をしていることが示唆された。

宿主因子候補の生理機能同定の一貫として、ウイルス感染細胞を、ウイルス P 蛋白抗体と宿主因子抗体を用いて、間接蛍光抗体染色で観察した処、ウイルス感染細胞では、PB1c54 蛋白はウイルス PB1 蛋白と同じ場所に局在することが判明した。

研究業績

(1) 原著論文

1. Bown, J.A., Kolb, A., Meares, C., Ishihama, A., Minchin, S.D. and Busby, S.J.W.: Positioning of region 4 of the *Escherichia coli* RNA polymerase σ^{70} subunit by a transcription activator. *J. Bacteriol.* **182**, 2982-2984, 2000.

2. Fujita, N., Endo, S. and Ishihama, A.: Structural requirements for the interdomain linker of α subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Biochemistry* **39**, 6243-6249, 2000.
3. Hatta, M., Asano, Y., Masunaga, K., Ito, T., Okazaki, T., Toyoda, T., Kawaoka, Y., Ishihama, A. and Kida, H.: Epitope mapping of the influenza A virus polymerase PA using monoclonal antibodies. *Arch. Virol.* **145**, 957-964, 2000.
4. Hwang, J.-S., Yamada, K., Honda, A., Nakade, K. and Ishihama, A.: Expression of functional influenza virus RNA polymerase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J. Virol.* **74**, 4074-4084, 2000.
5. Ishiguro, A., Nogi, Y., Hisatake, K., Muramatsu, M. and Ishihama, A.: The Rpb6 subunit of fission yeast RNA polymerase II is a contact target of the transcription elongation factor TFIIS. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1263-1270, 2000.
6. Ishihama, A.: Molecular anatomy of RNA polymerase using protein-conjugated metal probes with nuclease and protease activities. *Chem. Commun.* **2000**, 1091-1094, 2000a.
7. Ishihama, A.: Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 499-518, 2000b.
8. Ishihama, A., Zou, C., Kobayashi, M., Kumar, A., Fujita, N., Sakurai, H. and Hayward, R.S.: Molecular recognition in gene transcription. In: *Biomolecular Interactions in DNA and Proteins* (Buckin, V. and Funck, T., eds.), Nov. Sci. Publ., in press.
9. Jishage, M., Dasgupta, D. and Ishihama, A.: Mapping of the Rsd contact site on the sigma-70 of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Bacteriol.* **183**, 2952-2956, 2001.
10. Katayama, A., Fujita, N. and Ishihama, A.: Mapping of subunit-subunit contact surfaces on the β' subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **275**, 3583-3592, 2000.
11. Kimura, M. and Ishihama, A.: Involvement of multiple subunit-subunit contacts in the assembly of RNA polymerase II. *Nucleic Acids Res.* **28**, 952-959, 2000.
12. Kimura, M., Sakurai, H. and Ishihama, A.: Intracellular contents and assembly states of all twelve subunits of the RNA polymerase II in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur. J. Biochem.* **268**, 612-619, 2001.
13. Maeda, H., Jishage, M., Nomura, T., Fujita, N. and Ishihama, A.: Two extracytoplasmic function sigma subunits, σ^E and σ^{FecI} , of *Escherichia coli*: Promoter selectivity and intracellular levels. *J. Bacteriol.* **182**, 1181-1184, 2000a.
14. Maeda, H., Fujita, N. and Ishihama, A.: Competition among seven *Escherichia coli* σ subunits: relative binding affinities to the core RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* **28**, 3497-3503, 2000b.

15. Mitobe, J., Mitsuzawa, H. and Ishihama, A.: Functional analysis of RNA polymerase Rpb3 mutants of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Genet.* **39**, 210-221, 2001.
16. Ohnuma, M., Fujita, N., Ishihama, A., Tanaka, K. and Takahashi, H.: A carboxy-terminal 16-amino-acid region of σ^{38} of *Escherichia coli* is important for transcription under high-salt conditions and sigma activities in vivo. *J. Bacteriol.* **182**, 4628-4631, 2000.
17. Otomo, T., Yamazaki, T., Murakami, K., Ishihama, A. and Kyogoku, Y.: Structural study of the N-terminal domain of the alpha subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase solubilized with non-denaturing detergents. *J. Biochem.* **128**, 337-344, 2000.
18. Ozoline, O.N., Fujita, N. and Ishihama, A.: Transcription activation mediated by the carboxyl-terminal domain of the RNA polymerase α -subunit. Multipoint monitoring using a fluorescent probe. *J. Biol. Chem.* **275**, 1119-1127, 2000.
19. Sakurai, H. and Ishihama, A.: Transcription organization and mRNA levels of the genes for all twelve subunits of the fission yeast RNA polymerase II. *Genes Cells* **6**, 12-24, 2001.
20. Shpakovski, G.V., Gadal, O., Labarre-Mariotte, S., Lebedenko, E.N., Miklos, I., Sakurai, H., Proshkin, S.A., Van Mullem, V., Ishihama, A. and Thuriaux, P.: Functional conservation of RNA polymerase II in fission and budding yeasts. *J. Mol. Biol.* **295**, 1119-1127, 2000.
21. Sitaraman, S., Ishihama, A. and Chatterji, D.: Functional complementation between two distant positions in *E. coli* RNA polymerase as analyzed through second site reversion. *Mol. Gen. Genet.* **264**, 531-538, 2001.
22. Talukder, A.A., Hiraga, S. and Ishihama, A.: Two types of localization of the DNA-binding proteins within the *Escherichia coli* nucleoid. *Genes Cells* **5**, 613-626, 2000.
23. Wada, A., Mikkola, R., Kurland, C.G. and Ishihama, A.: Growth phase-coupled changes of the ribosome profile in natural isolates and laboratory strains of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **182**, 2893-2899, 2000.
24. Wigneshweraraj, S.R., Chaney, M.K., Ishihama, A. and Buck, M.: Regulatory sequences in sigma 54 localise near the start of DNA melting. *J. Mol. Biol.* **306**, 681-701, 2001a.
25. Wigneshweraraj, S.R., Fujita, N., Ishihama, A. and Buck, M.: Conservation of sigma-core RNA polymerase proximity relationships between the enhancer-independent and enhancer-dependent sigma classes. *EMBO J.* **19**, 3038-3048, 2000.
26. Wigneshweraraj, S.R., Ishihama, A. and Buck, M.: *In vitro* roles of invariant

residue R383 in sigma 54 (sigma N) function. *Nucleic Acids Res.* **29**, 1163-1174, 2001b.

27. Yamamoto, K., Nagura, R., Tanabe, H., Fujita, N., Ishihama, A. and Utsumi, R.: Negative regulation of the *bolA*p of *Escherichia coli* K-12 by the transcription factor OmpR for osmolarity response genes. *FEMS Microbiol. Lett.* **186**, 257-262, 2000.
28. Yasuno, K., Yamazaki, T., Tanaka, Y., Kodama, T., Ishihama, A. and Kyogoku, Y.: Interaction of the C-terminal domain of *E. coli* RNA polymerase α subunit with the UP element: Recognizing the backbone structure in the major groove surface. *J. Mol. Biol.* **306**, 213-225, 2001.
29. Yoshida, M., Kashiwagi, K., Ishihama, A. and Igarashi, K.: Polyamine enhancement of the synthesis of adenylate cyclase at the translation level and the consequential stimulation of the synthesis of RNA polymerase σ^{38} subunit. *J. Biol. Chem.*, in press.

(2) その他

1. 石浜 明: 蛋白-核酸・蛋白-蛋白相互作用接点同定の革新的方法-FeBABE (Fe-p-bromoacetamidobenzyl EDTA) の利用. *Dojin News* **94**, 1-4, 2000.
2. 石浜 明: 動物ウイルス。「ライフサイエンスのための系統保存とデータバンク」
3. 藤田信之: バクテリアにおける転写開始反応の調節. 実験科学およびゲノム情報科学からのアプローチ, ワークショップ「バクテリアからオルガネラへ. 遺伝子発現制御システムの進化」, 京都, 2月, 2001. (中辻憲夫編), 125-129, 共立出版, 東京, 2000.

(3) 発表講演

1. 藤田信之: 転写因子からみた微生物の比較ゲノミックス. ワークショップ「ラン藻ゲノム学におけるバイオインフォマティクス」, かずさ, 11月, 2000.
2. 藤田信之: バクテリアにおける転写開始反応の調節. 実験科学およびゲノム情報科学からのアプローチ, ワークショップ「バクテリアからオルガネラへ. 遺伝子発現制御システムの進化」, 京都, 2月, 2001.
3. Honda, A., Endo, A. and Ishihama, A.: Functional modulation of influenza virus RNA polymerase by viral RNA: Differential roles of vRNA and cRNA. 第15回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム, 三島, 4月, 2000.
4. Honda, A., Endo, A. and Ishihama, A.: Functional modulation of influenza virus RNA polymerase purified from recombinant baculovirus-infected insect cells. 11th Internat. Conf. Negative Strand Viruses, Quebec, Canada, June, 2000.
5. Ishihama, A.: Control of the transcription apparatus and the translation machinery. The 2nd ORCS International Symposium Ribosome Engineering, To-

- kyo, January, 2000.
6. Ishihama, A.: Prokaryotic and eukaryotic RNA polymerases: Molecular architectures and physiological responses. 17th Annual Meeting (Societe Francaise de Biophysique) on "Nucleic Acid Recongnition by Enzymes. The Case of DNA-dependent Polymerases", Nouan-le-Fuzelier, France, September, 2000.
 7. 石浜 明: 金属で遺伝子転写装置の構造を見る. 第15回「大学と科学」公開シンポジウム, 東京, 10月, 2000.
 8. 石浜 明: 大腸菌の環境応答の分子機構, 第4回NVC研究会, 東京, 11月, 2000.
 9. Ishihama, A., Fujita, N., Kimura, M., Sakurai, H., Katayama, A., Nomura, T., Mitobe, J., Mitsuzawa, H., Sitaraman, S., Talukder, A.A., Jishage, M., Maeda, H. and Ishiguro, A.: Functional differentiation of prokaryotic and eukaryotic RNA polymerases. The Sixth Asian Conf. Transcription (ACT-VI), Beijing, China, October, 2000.
 10. Ishihama, A., Fujita, N., Nomura, T., Katayama, A., Maeda, H., Jishage, M., Dasgupta, D., Sitaraman, A. and Talukder, A.A.: Global regulation of gene expression in *Escherichia coli*. 21st Annual Conference "The Organization and Expression of the Genome", Erskine House, Lorne, Australia, February, 2000.
 11. 石浜 明, 藤田信之, 野村 扶, 片山 映, Ozoline, O.N., Owens, J., Colland, F., Wigneshweraraj, A.R., Sitraman, S., Talukder, A.A., 前田広人, 遠藤静子, 谷田勝教, Chatterji, D., 田中 寛, 寺社下美樹, 村上勝彦, Dasgupta, D.: 転写装置の分子解剖から転写制御の本質に迫る. 蛋白合同年会・東京2000, 東京, 6月, 2000.
 12. Ishihama, A., Hwang, J.-S., Honda, A., Yamada, K. and Nakade, K.: Expression of functional influenza viral RNA polymerase in methylotrophic yeast. 11th Internat. Conf. Negative Strand Viruses, Quebec, Canada, June, 2000.
 13. 増田裕幸, 鈴木 隆, 杉山佳邦, 堀池 剛, 宮本大誠, 左 一八, 伊藤壽啓, 喜田宏, 木曾 真, 福永恭子, 大内正信, 豊田哲也, 石浜 明, 河岡義裕, 鈴木康夫: インフルエンザA型ウイルスのシアル酸分子種認識機構の解析. 日本薬学会第120回年会, 岐阜市, 3月, 2000.
 14. Nomura, T., Katayama, A., Fujita, N. and Ishihama, A.: Mapping of protein-protein contact surfaces on the β and β' subunits of *Escherichia coli* RNA polymerase. 2000 Meeting on "Molecular Genetics of Bacteria & Phages", Cold Spring Harbor, USA, August, 2000.
 15. 小笠原寛, 加藤名宣, 中村浩士, 石浜 明, 内海龍太郎: 2成分制御系 PhoP/Pho0 による *mgtA*(Mg^{2+} イオン輸送蛋白質) 遺伝子の転写制御. 第23回日本分子生物学会年会, 神戸市, 12月, 2000.
 16. 岡本拓人, 本田文江, 岩田 晃, 鈴木康夫, 石浜 明: インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼの PBI サブユニットと相互作用する宿主因子. 第23回日本分子

- 生物学会年会，神戸市，12月，2000.
17. 櫻井仁美, 石浜 明: 分裂酵母 RNA ポリメラーゼ II の全 12 種サブユニット蛋白と mRNA の細胞内レベル. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸市, 12月, 2000.
 18. 正村祐介, Talukder, A.A., 石浜 明, 竹安邦夫: 原子間顕微鏡による大腸菌ゲノム観察. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸市, 12月, 2000.
 19. Talukder, A.A. and Ishihama, A.: Growth-coupled changes in the protein composition of *Escherichia coli* nucleoid. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸市, 12月, 2000.
 20. Talukder, A.A., Maeda, H. and Ishihama, A.: Growth-coupled variations in the molecular compositions of transcription apparatus and nucleoid in *Escherichia coli*. 2000 Meeting on "Molecular Genetics of Bacteria & Phages", Cold Spring Harbor, USA, August, 2000.
 21. 渡邊崇史, 山本兼由, 皆川 周, 橋本佳季, 田辺寛之, 内海龍太郎: 枯草菌のレギュレーター蛋白質 YycF の温度感受性変異株の単離と解析. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸市, 12月, 2000.
 22. Wigneshweraraj, S.R., Ishihama, A. and Buck, M.: Regulatory sequences in sigma 54 localise near the catalytic centre of the core RNA polymerase and start of DNA melting. 17th Annual Meeting (Societe Francaise de Biophysique) on "Nucleic Acid Recognition by enzymes. The Case of DNA-dependent Polymerases", Nouan-le-Fuzelier, France, September, 2000.

A-b. 変異遺伝研究部門

ユビキチン/プロテアソームによるタンパク質分解系が細胞の増殖，周期や染色体の機能構造にいかに関わるかを中心課題として，とくに酵母を用いた分子生物学的研究を行っている。

研究活動は助教授・山尾文明，助手・岸 努，清野浩明，総合研究大学院大学院生・只木敏雅(弘前大学で指導委託)，Park Joon-Hyun が行い，研究補助員として小田川恵美が参加した。

当部門の関係する研究所共同研究は，「分裂酵母におけるユビキチン系を介した DNA ポリメラーゼのスイッチのメカニズム」(大森治夫・京都大学ウイルス研究所)，「DNA 複製期細胞核微細構造形成に関与するタンパク質の研究」(矢倉達夫・関西学院大学理学部)，「出芽酵母の細胞周期関連遺伝子の解析」(河野享子・京都薬科大学)であった。

研究費は，通常経費に加え，文部省科学研究費補助金，特定領域研究(C)「分裂酵母のユビキチン経路全体像の把握とプロテオーム構築」(代表・山尾文明)，特定領域研究(B)「受精機構におけるユビキチン・プロテアソームシステム」(代表・横沢英良，分担・山尾文明)，三菱財団学術研究助成「ユビキチン系における分子識別と細胞機能制御」(代表・

山尾文明)によった。

昨今、蛋白質分解の研究は積極的な細胞機能調節機構として見直され、分子生物学や細胞生物学の様々な分野から多大の興味を集めている。特定の機能蛋白質をターゲットとした特異的な蛋白質分解系の発現を分子レベルで同定し、それが他の増殖調節系といかに相互に関連しあっているかを解析することは焦眉の課題となっている。

核や染色体は細胞周期の進行にともなって幾多の劇的な動態変化を繰り返すが、そこで種々のキーとなる蛋白質の消長が観察されることは蛋白質の機能修飾や量的調節の制御機構が核や染色体の動態にとっても重要な役割を担っていることを示している。細胞周期制御の視点からみると、サイクリンとCdc2がMPF(M期促進因子)を構成するというドグマの確立以後、CDK(サイクリン依存性キナーゼ)の多様性の発見、CDK阻害因子(CKI)の発見、と蛋白質のリン酸化による機能の制御が周期制御の基盤をなす一方、細胞周期制御における蛋白質分解の役割もそれに匹敵するだけのものを形成してきた。それは選択性、迅速性、不可逆性という蛋白質分解の持つ特性が一連の順序だった周期機能の制御に合致するものとして個々の細胞周期の現象の中で理解され証明されてきたからである。

真核生物において特異的な蛋白質分解系として中心的な役割を担っているものの一つはユビキチン系による選択的蛋白分解機構である。ユビキチン系における蛋白分解の選択性は、ファミリーを形成し、それぞれに異なる基質(ユビキチン化の標的蛋白質)特異性を持つユビキチン結合酵素(E2)とユビキチンリガーゼ(E3)酵素群の分子的多様性に依拠すると考えられる。細胞周期の進行とその間の細胞核での機能の制御に着目し、そこで働くキーとなっている蛋白質の分解とそのためのユビキチン経路を同定し、この経路に働く酵素、因子群を細胞周期制御のネットワークの中に位置付けるのを目的とした。

(1) 分裂酵母のE2経路の全体像の把握: Park Joon-Hyun, 山尾文明, 清野浩明

分裂酵母はさまざまな遺伝学的解析が可能であり、細胞周期、特に分裂期の進行制御が高等真核生物に類似していることから、細胞周期制御などの解析のモデル系のひとつとして有効である。分裂酵母を用いて、ユビキチン転移酵素の機能に焦点を当て細胞内で機能する全てのユビキチン経路についてその分子レベルでの機能を明らかにすることを目的としたプロジェクトを進めている。当研究室で単離したubcP1, ubcP4変異株は細胞周期特異的な表現型を示し、両E2は分裂期に機能するユビキチンリガーゼであるAPC(anaphase promoting complex)と同一経路で分裂期サイクリンCdc13の分解制御にかかわっている(次項参照)。このことは出芽酵母においてその相同遺伝子破壊株が特徴的な表現型を示さず致死ではなかったことと対照的であり、このプロジェクトが有効であることを強く支持するものである。

分裂酵母全ゲノム配列データベースから十数個のユビキチン転移酵素をコードする遺伝子を同定し、遺伝子破壊株の表現型を観察した。

DNA複製後損傷修復にかかわる出芽酵母RAD6/UBC2およびUBC13の分裂酵母における

相同遺伝子 *ubcp2/rph6/ubc2* および *ubcP7/ubc13* の遺伝子破壊株はやはり DNA 損傷高感受性を示し、出芽酵母相同遺伝子によってその表現型は相補された。 *ubcP2*, *ubcP7* 経路の作用機作を分子レベルで理解する目的でこれらの遺伝子を用いて two-hybrid スクリーニングをおこなった結果、特異的に結合する蛋白質をコードする遺伝子を単離した。この遺伝子破壊株は *ubcP2*, *ubcP7* と同様に DNA 損傷高感受性を示した。

出芽酵母 UBC7 のホモログと考えられる *ubcP3* 破壊株では、分裂酵母一倍体 *h⁺* 株でのヘテロリズムに異常が生じ、接合体形成と胞子形成が促進されることが観察された。 *mating type locus* での接合型変換の亢進と胞子形成の誘導の双方に *ubcP3* 経路によるタンパク質分解がかかわる可能性が示唆された。

(2) 分裂酵母 M 期サイクリンのユビキチン化経路：清野浩明，山尾文明

ユビキチン経路による分裂期サイクリンおよび染色体分配を制御する securin 蛋白質の分解による分裂期の進行制御は重要な細胞周期進行制御のひとつである。アフリカツメガエル卵抽出液を用いた生化学的解析により M 期サイクリンの分解に関わる E2 は *Ubc4* と *Ubcx* の 2 種であることが報告されてきたがその機能的関係については明らかになっていない。また、*Ubc4* は試験管内では非特異的に多くの蛋白質をユビキチン化することが明らかになっているが生体内でその特異性を規定する分子機構については明らかになっていない。これらのことを明らかにする目的で分裂酵母を用いて *Ubc4*, *Ubcx* の各々の相同蛋白質をコードする *ubcP1* および *ubcP4* 遺伝子について機能解析を進めている。

ubcP1, *ubcP4* の両遺伝子は細胞の増殖に必須であり、変異株は分裂期の進行に異常を示した。*ubcP4* については分裂期に機能する E3, APC (anaphase promoting complex) の構成因子と遺伝的相互作用を示した。両遺伝子産物は直接分裂酵母 M 期サイクリン *Cdc13* の分解に共通の E3 である APC の上流で関与し、しかも機能的に重複していない。また、*ubcP1* 変異株においては多岐にわたるポリユビキチン化蛋白質が減少し、DNA 複製期に機能する E3, SCF (Skp-cullin-F-box) の基質である *Cdc18*, *Rum1* が安定化していた。このことから *UbcP1* は多くの蛋白質のユビキチン化に関わることを示唆される。*UbcP1* が多くの蛋白質の非特異的なユビキチン化の基本構成因子として機能し、*UbcP4* は M 期サイクリン等のユビキチン化に関わる E3, APC (anaphase promoting complex) と共にその基質特異性を規定するものとして機能していることを一つの作業仮説として考えている。SCF についても *UbcP1* が出芽酵母において SCF と共に機能している E2 である *Cdc34* の相同蛋白質と協調的に機能してその基質群をユビキチン化するのではないかと考えている。

(3) ユビキチンリガーゼ SCF 複合体の解析：岸 努，山尾文明

細胞周期 G1/S 期では、ユビキチンリガーゼ SCF による制御蛋白質のユビキチン化が必須である。この SCF ユビキチンリガーゼは、*Skp1*, *Cdc53*, F-box 蛋白質などからなる複合体である。またユビキチン化される蛋白質はすべてリン酸化を受け、そのリン酸化に依存して SCF ユビキチンリガーゼ複合体中の F-box 蛋白質と結合し、その結果、ユビ

キチン化されることが明らかになっている。出芽酵母のG1サイクリンCln2もSCFユビキチンリガーゼによってユビキチン化される制御蛋白質である。

これまでに私はCln2を安定化する変異株を分離してきた。特に、これらの変異株がSCFユビキチンリガーゼの活性にどのように関与しているのか興味を持って解析してきた。本年度は、このうち、#75変異株を中心に解析した。#75変異株では、Cln2のユビキチン化が低下していることを明らかにした。次に、原因遺伝子をクローン化した。その結果、得られた遺伝子のコードする蛋白質は、既存のSCFユビキチンリガーゼ遺伝子とは異なっていた。また、蛋白質リン酸化酵素にホモロジーがあることが明らかとなった。この蛋白質がCln2のユビキチン化に関わるメカニズムとして、(I)SCFユビキチンリガーゼの構成因子である、(II)SCFユビキチンリガーゼの複合体形成に関与する、(III)SCFユビキチンリガーゼの構成因子をリン酸化によって活性化する、あるいは、(IV)G1サイクリンのリン酸化を促進する、という可能性が考えられるので、検討を進めている。

研究業績

(1)原著論文

1. Mitsuzawa, H., Seino, H., Yamao, F. and Ishihama A.: Two WD repeat containing TAFs in fission yeast that suppress cell cycle arrest at mitosis. *J. Biol. Chem.* In press, 2001.

(2)その他

1. 山尾文明：「蛋白質分解と細胞周期・細胞分裂」蛋白質分解—分子機構と細胞機能（鈴木紘一、木南英紀、田中啓二編集）シュプリンガー・フェアラーク東京、2000。
2. 山尾文明：「ユビキチンと細胞周期」蛋白質核酸酵素「新世紀におけるタンパク質科学の進展」印刷中、2001。

(3)発表講演

1. 清野浩明，山尾文明：シンポジウム（蛋白質分解制御による細胞分裂周期の調節）「分裂酵母ユビキチン転移酵素UbcP1/Ubc4はM期サイクリンCdc13の分解に関与する」。日本生化学会大会，横浜，9月。
2. 土井康平，松尾 聡，山尾文明，矢倉達夫：「ゴルジ体膜タンパク質p138の細胞周期における発現時期の解析」。日本生化学会大会，横浜，9月。
3. 野間将平，土井康平，松尾 聡，山尾文明，後神秀基，矢倉達夫：「G2/M期に停止したHeLa細胞におけるゴルジ体過剰複製」。日本細胞生物学会大会，福岡，10月。
4. P. J-H., 清野浩明，山尾文明：「分裂酵母ユビキチン経路全体像の把握」。日本遺伝学会大会，京都，11月。
5. 清野浩明，山尾文明：「分裂酵母ユビキチン転移酵素UbcP1/Ubc4はM期サイクリン

- ンCdc13の分解に関与する」。日本分子生物学会年会，神戸，12月。
6. 岸 努，山尾文明：「出芽酵母G1サイクリンCln2を安定化する変異株のスクリーニング-mpk1変異株でG1サイクリンCln2は安定化する」。日本分子生物学会年会，神戸，12月。

A-c. 核酸化学研究部門

(1) センダイウイルスゲノムの転写・複製機構：水本清久

センダイウイルス(SeV)はパラミクソウイルス科に属し，そのゲノムは約15kbの非分節マイナス鎖RNAからなる。ウイルスゲノムの転写・複製はウイルスゲノムでコードされるRNA依存RNAポリメラーゼ(LおよびPタンパク質)によって触媒される。我々は，SeVゲノムの転写・複製の分子機構を明らかにすることを目的に，ウイルスRNAポリメラーゼの活性発現に必須な宿主タンパク質(宿主因子)の精製とその機能解析を行っている。これまでに，精製ウイルス粒子を用いた*in vitro*転写反応系による解析から，SeV mRNAの生合成には少なくとも3つの宿主因子の存在が必要であり，その内の2つが細胞骨格系タンパク質のチューブリンおよび解糖系酵素のホスホグリセリン酸キナーゼ(PGK)であることを明らかにした(Mizumoto *et al.*, *J. Biochem.* 117, 527, 1995, Ogino *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274, 35999, 1999)。今年度は，第3の宿主因子の精製とその機能解析を行い，以下の結果を得た。十分量のチューブリンとPGK存在下にウシ脳抽出液よりSeVの*in vitro* mRNA合成を促進する活性を指標として第3の因子を精製したところ，因子はさらに2つの相補的な分画に分離され，その内の一方は分子量52,000(p52)の単一タンパク質として精製された(Ogino *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 285, 447, 2001)。興味あることに，p52はその酵素活性ならびに免疫学的な性質から解糖系酵素の一つであるエノラーゼであると同定された。このことは，組換えヒト α -エノラーゼもp52と同様の活性を示すことから裏付けられた。これら4つの宿主因子の機能に関しては，チューブリンが転写開始に関与し転写開始複体に組み込まれて機能する(Takagi *et al.*, *J. Biochem.* 118, 390 1995)のに対して，PGK，エノラーゼ，及び未知の第4因子の3者はRNA鎖の伸長段階を促進することが明らかとなった。さらに，west-westernプロット分析からPGKとエノラーゼはチューブリンと特異的に結合することが示された。すなわち，これら2つの解糖系酵素は，転写開始複体に組み込まれたチューブリンと相互作用することにより転写の伸長段階を促進するものと推定される。

(2) 大腸菌増殖定常期における転写制御システム：田中 寛

1) シグマ因子RpoS(σ^{38} , σ^S)の構造・活性解析

大腸菌はグルコースのような有機炭素源，および窒素，硫黄，リンなどの栄養源の存在下で増殖することができる。しかし，自然環境中でこれらの条件が満たされることは

少なく、殆どの局面で細胞は増殖していない。従って、非増殖状態における生存戦略は、大腸菌の進化の上で極めて重要であったと考えることができる。しかし、この状態の細胞における転写装置の性質については、まだ未知の部分が多い。

大腸菌の RNA ポリメラーゼは唯一種類であるが、7種のシグマ因子の置換により、プロモーター認識特異性を変化させ、様々な調節や制御を行っている。対数増殖期に機能するプロモーターの多くは、主要シグマ因子(σ^{70})を含む RNA ポリメラーゼ($E \sigma^{70}$)で認識され、基本的には TATAAT(-10 領域)、TTGACA(-35 領域)のコンセンサス配列を持っている。増殖定常期においては、 σ^{70} に加えて σ^{38} の発現が誘導され、数多くの定常期特異的な遺伝子群の発現を引き起こす。しかし、*in vitro* 転写系を用いた解析によれば、 σ^{38} は σ^{70} と類似の特異性を持つシグマ因子であり、明確な認識特異性の違いは観察しにくい。

対数増殖期と比較すると、増殖定常期には大腸菌細胞は球菌状に小型化し、細胞壁の肥厚など、様々な生理的な変化が起こる。これに伴い、細胞内の溶液の状態も大きく変化し、とくに K^+ や glutamate などのイオン濃度が顕著に上昇すると考えられている。そこで、このような細胞内環境の変化に対する、2種のシグマ因子を含む RNA ポリメラーゼの挙動(感受性)の違いが、*in vivo* の転写特異性の違いである可能性を検討している。*in vitro* 系を用いた解析では、 σ^{38} を含む RNA ポリメラーゼ($E \sigma^{38}$)の活性は、反応液中の K -glutamate 濃度に依存して上昇する。これに対し、 $E \sigma^{70}$ 活性は 150mM 以上の K -glutamate で抑制される。従って、 σ^{38} には σ^{70} よりも高イオン強度における転写に向けた性質があると考えられた。 σ^{38} と σ^{70} の構造比較の結果、 σ^{38} のC末端領域に、種を越えて σ^{38} 特異的に保存された16アミノ酸からなる領域を見いだした。この配列を欠失した σ^{38} は、低塩濃度における*in vitro* 転写系においては野生型と変わらない活性を持つが、高塩濃度においては全く活性を示さなかった。細胞内でこの欠失体は全く活性を示さず、これは逆に細胞内の塩濃度が比較的高いことを示すと考えることができる。要するに、 σ^{38} のC末端領域の機能を介して、 $E \sigma^{38}$ は高塩濃度下で転写活性を維持していると考えられた(Ohnuma *et al.*, *J. Bacteriol.* **182**, 4628-4631, 2000)。

2) 増殖定常期における転写抑制メカニズム

増殖定常期においては、増殖期に活発に転写されていた多くのプロモーターの転写抑制が急激に起こる。これは、リボソーム RNA 遺伝子(*rrnB*)プロモーターについては、よく研究されている現象であり、ppGpp や H-NS、細胞中の NTP 濃度の影響が知られている。我々は、*rrn* 遺伝子以外のコンセンサスプロモーターの例として *lacUV5* プロモーター(*PlacUV5*)を用い、増殖の停止に伴う活性の変化を調べた。その結果、*PlacUV5* 活性が増殖の停止に伴って急激に低下すること。さらに、この低下が H-NS 機能に依存していることを見いだした。*PlacUV5* 以外のコンセンサスプロモーターについても同様な現象がみられることから、定常期における H-NS による転写抑制は極めて Global な転写抑制現象である可能性がある。

研究業績

(1) 原著論文

1. Yokosuka, J., Tsukamoto, T., Miura, K., Shiokawa, K. and Mizumoto, K.: Cloning and characterization of mRNA capping enzyme and mRNA (guanine-7-) methyltransferase cDNAs from *Xenopus laevis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **268**, 617-624, 2000.
2. Kajita, E., Wakiyama, M., Miura, K., Mizumoto, K., Oka, T., Komuro, I., Miyata, T., Yatsuki, H., Hori, K. and Shiokawa, K.: Isolation and characterization of *Xenopus laevis* aldolase B cDNA and expression pattern of aldolase A, B and C genes in adult tissues, oocytes and embryos of *X. laevis*. *Biochim. Biophys. Acta* **1493**, 101-118, 2000.
3. Chiba, H., Inokoshi, J., Okamoto, M., Asanuma, S., Matsuzaki, K., Iwama, M., Mizumoto, K., Tanaka, H., Oheda, H., Fujita, K., Nakashima, H., Shionose, M. and Omura, S.: Actinohivin, a novel anti-HIV protein from an actinomycetes that inhibits syncytium formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **282**, 595-610, 2001.
4. Ogino, T., Yamadera, T., Imajoh-Ohmi, S. and Mizumoto, K.: Enolase, a cellular glycolytic enzyme, is required for efficient transcription of Sendai virus genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**, 447-455, 2001.
5. Ohnuma, M., Fujita, N., Ishihama, A., Tanaka, K., and Takahashi, H.: A Carboxy-Terminal 16-Amino-Acid Region of σ^{38} of *Escherichia coli* is Important for Transcription under High-Salt Conditions and Sigma Activities In Vivo. *J. Bacteriol.* **182**:4628-4631, 2000.
6. Oikawa, K., Fujiwara, M., Nakazato, E., Tanaka, K. and Takahashi, H.: Characterization of two plastid σ factors, SigA1 and SigA2, that mainly function in matured chloroplasts in *Nicotiana tabacum*. *Gene* **261**, 221-228, 2000.
7. Shirano, Y., Shimada, H., Kanamaru, K., Fujiwara, M., Tanaka, K., Takahashi, H., Unno, K., Sato, S., Tabata, S., Hayashi, H., Miyake, C., Yokoto, A. and Shibata, D.: Chloroplast development in *Arabidopsis thaliana* requires the nuclear-encoded transcription factor Sigma B. *FEBS Lett.* **485**, 178-182, 2000.
8. Kanamaru, K., Fujiwara, M., Kim, M., Nagashima, A., Nakazato, E., Tanaka, K. and Takahashi, H.: Chloroplast targeting, distribution and transcriptional fluctuation of AtMinD1, a eubacteria-type factor critical for chloroplast division. *Plant Cell Physiol.* **41**, 1119-1128, 2000.
9. Fujiwara, M., Nagashima, A., Kanamaru, K., Tanaka, K. and Takahashi, H.: Three new nuclear genes, sigD, sigE and sigF, encoding putative plastid RNA polymerase sigma factors in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **481**, 47-52, 2000.

(2) 発表講演

1. 岩間美奈子, 水本清久: センダイウイルスゲノムのリーダーおよびトレイラー配列を含む2本鎖RNAに結合する宿主因子の解析. 日本薬学会第120年会, 岐阜, 3月.
2. 山寺忠之, 荻野朝朗, 水本清久: センダイウイルスのmRNA合成に必要な宿主因子の機能解析. 日本薬学会第120年会, 岐阜, 3月.
3. 大澤優紀, 荻野朝朗, 水本清久: センダイウイルスマトリックス(M9)タンパク質とチュープリンの相互作用の解析. 日本薬学会第120年会, 岐阜, 3月.
4. 大澤優紀, 荻野朝朗, 水本清久: センダイウイルスタンパク質とチュープリンの相互作用の解析. 第73回日本生化学会大会, 横浜, 10月.
5. 岩間美奈子, 水本清久: センダイウイルスゲノムのリーダー配列を含むdsRNAに結合する宿主因子の解析. 第73回日本生化学会大会, 横浜, 10月.
6. 岩間美奈子, 水本清久: センダイウイルスゲノムのリーダー配列を含む2本鎖RNAに結合する宿主因子の解析. 日本ウイルス学会, 第48回学術集会, 津, 10月.
7. 荻野朝朗, 大澤優紀, 山寺忠之, 相澤主税, 水本清久: センダイウイルスゲノムの転写に關与する宿主因子とウイルスタンパク質の相互作用. 日本ウイルス学会, 第48回学術集会, 津, 10月.
8. 小林正樹, 荻野朝朗, 岩間美奈子, 相澤主税, 水本清久: センダイウイルスのmRNAキャッピング機構の解析. 第23回日本分子生物学会年会神戸, 12月.
9. 山寺忠之, 荻野朝朗, 水本清久: センダイウイルスのmRNA合成に關与する4種類の宿主因子の機能解析. 第23回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月.
10. 大澤優紀, 荻野朝朗, 水本清久: センダイウイルスマトリックス(M)タンパク質とチュープリンの相互作用の解析. 第23回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月.
11. 岩間美奈子, 荻野朝朗, 水本清久: センダイウイルスゲノムリーダー配列とその相補鎖から成るdsRNAに結合する宿主因子の解析. 第23回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月.
12. 大沼みお, 藤田信之, 石浜 明, 田中 寛, 高橋秀夫: 大腸菌RNAポリメラーゼ主要型シグマ因子 σ^{38} (*rpoS*遺伝子産物)のC末端領域(σ^{38} -CTE)の機能解析, 日本農芸化学会ワークショップ, 東京, 4月.
13. 金丸研吾, 藤原 誠, 白野由美子, 柴田大輔, 島田裕士, 田中 寛, 高橋秀夫: 高等植物葉緑体の転写機構とシグマ因子(I) *sigB*: T-DNA挿入ラインの解析, 日本農芸化学会, 東京, 4月.
14. 藤原 誠, 永島明知, 中里恵美, 金丸研吾, 田中 寛, 高橋秀夫: 高等植物葉緑体の転写機構とシグマ因子(II) *sigD*, *sigE*, *sigF* 遺伝子の解析, 日本農芸化学会, 東京, 4月.
15. 永島明知, 金丸研吾, 田中 寛, 高橋秀夫: 高等植物葉緑体の転写機構とシグマ因子(III)~葉緑体関連遺伝子の体系的転写解析, 日本農芸化学会, 東京, 4月.
16. 金丸研吾, 藤原 誠, 金 美順, 白野由美子, 柴田大輔, 島田裕士, 田中 寛, 高橋秀夫: シロイヌナズナ葉緑体の分裂, 分化過程における *mind* と *sigB* 遺伝子の役

- 割, 日本植物生理学会, 名古屋, 3月.
17. 藤原 誠, 永島明知, 中里恵美, 金丸研吾, 田中 寛, 高橋秀夫: シロイヌナズナの色素体 RNA ポリメラーゼシグマ因子の解析, 日本植物生理学会, 名古屋, 3月.
 18. Kanamaru, K., Fujiwara, M., Meesoon, K., Shirano, Y., Shimada, H., Shibata, D., Tanaka, K. and Takahashi, H.: Nuclear-encoded eubacteria-type factors critical for chloroplast division and development in Arabidopsis, International Symposia on Plant Molecular Biology (ISPMB), Quebec, Canada, June.
 19. Fujiwara, M., Nagashima, A., Nakazato, E., Kanamaru, K., Tanaka, K. and Takahashi, H.: Characterization of nuclear-encoded plastid RNA polymerase sigma factors in Arabidopsis thaliana, Plant Biology 2000, San Diego, USA, July.
 20. 中里恵美, 福沢秀哉, 田畑哲之, 田中 寛, 高橋秀夫: 単細胞緑藻クラミドモナスにおける葉緑体 recA 相同遺伝子の解析, 日本分子生物学会, 神戸, 12月.

B. 細胞遺伝研究系

B-a. 細胞遺伝研究部門

生物は配偶子を形成する際に、両親由来のゲノムを混ぜ合わせて新しいゲノムを創り出して、多様性を生み出す。一方、DNA が電離放射線の照射や薬剤によって受ける傷害に対応して、様々な修復機能を備えて、遺伝情報の安定な維持を行う。組換え反応はこの対照的な二つの機能の中心を担っている。

出芽酵母では、減数分裂期に起こる相同組換えと、体細胞分裂の G1 期に、母細胞で起こる接合型変換の際の組換えが、決まった時期に染色体の決まった位置に、二重鎖切断を入れることによって始まる。その後、その切断末端の片方の鎖が削られて、できた一本鎖 DNA の塩基配列と相補的な配列を持つ分子を探し、対合する。その後、削られた DNA 部分は修復合成され、組換え中間体であるホリデー構造を形成する。この中間体は二通りの方法で解離し、その解離の仕方によって、組換え体が、交叉型になるか、非交叉型(遺伝子変換型)になるかが決まる。一方、DNA 傷害で生じた、二重鎖切断も同じ相同組換え反応で修復されるが、中には末端同士の再結合反応で起こられる場合がある。その結合が別の二重鎖切断の末端との間で行なわれたものを非相同組換え反応、あるいは、末端再結合反応と呼ぶ。

組換え反応は、さらに、染色体の広範な領域の変化にも関わっている。例えば、染色体の末端にあって、細胞の寿命の維持に関与しているテロメアなどの繰り返し配列の適正な数の維持や、多種多様な抗原に対する抗体を作る遺伝子を作り出す過程でも働き、生体機能の維持にとって重要な役割を担っている。

我々の遺伝的組換え機構の研究は、組換えの中間体の構造解析から始まった。そして、組換えの最初の反応である相同分子の検索と対合に関与する蛋白質の同定へと進み、組換え反応で中心的な働きをする大腸菌の *recA* 遺伝子、真核生物のそのホモログ *RAD51* 遺伝子、そして、さらに組換え開始でその主役を担う *MRE11* 遺伝子の発見へと繋がった。これら二つの遺伝子が、酵母からマウス、ヒト、ユリなど生物全般に共通に存在することを示したことで、組換え反応の過程が、殆どの生物に共通であることがわかった。しかし、一方で、これら同じ遺伝子の活性を調べてみると、同じ遺伝子の機能が種や細胞によって、その働き方を変えていることがわかってきた。そればかりでなく、同じ組換え過程の中でも、これらの遺伝子機能は、他の蛋白質との共同作業によって働き方を変えていた。これらの結果は、組換え蛋白質の機能が、そこで働く他の蛋白質との共同作業によって、厳密に制御されていることを示唆した。

このような観点から、本年度は、DNA 傷害で生じる二重鎖切断の修復反応機構とテロメア長の維持で働く *Mre11* の機能を、そこで共同で働く *Rad50* 蛋白質機能との関連で研究を行った。

当部門の本年度のスタッフは、教授：小川智子、助教授：今井弘民、助手：田中茂生、太田 力(7/1より併任)、学術振興会外国人研究員：Andrei Alexeev、非常勤研究員：渡辺光一、総合研究大学院大学：立田大輔、遺伝研特別研究生：押海裕之、COE 研究促進技術補佐員：池谷優子、ヒューマンフロンティア・サイエンスプログラム技術補佐員：青木文子、高杉知子、片野博一と、研究補佐員：高田恭子であった。

本年度の研究費は、文部省科学研究費補助金、特別推進研究(1)「蛋白質の共同作業による多様な遺伝情報創出の仕組みとその制御」(代表・小川智子)と、その分担課題研究「組換え蛋白質複合体の機能解析と相互作用による機能制御」(太田)、「DNA 修復反応とテロメア長維持に関与する組換え機能」(田中)、ヒューマンフロンティア・サイエンスプログラム研究助成「組換え、複製、修復反応で働く DNA-蛋白質複合体の研究」(小川)、公益信託林女性自然科学者研究助成基金「遺伝的組換え機構の解析」(小川)、ヒューマンフロンティア・サイエンスプログラム研究助成「真核生物における DNA 傷害の組換え修復の研究」(太田)、日本学術振興会未来開拓学術研究「遺伝子複合体の高次構造と転写因子」(代表：萩原)「クロマチン構造を介した転写-組換え制御機構の解明」(太田)などの支援を受けた。

特別推進研究の分担研究として、「組換え反応で誘導される細胞周期チェック・ポイント機構の解析」を岩手看護短大・小川英行教授と「DNA 複製に関する相同組換えの機能」を大阪大学理学研究科・篠原彰助教授と行った。

研究所共同研究としては、「真核細胞遺伝子の転写制御領域に存在するベント DNA 構造の機能解析」を甲南大学理学部・大山 隆教授と行った。

減数分裂期組換えは、遺伝子のプロモーター領域にある組換えのホット・スポットに *Mre11* 蛋白質が結合して開始する。これは、*Mre11* と転写開始に関与する蛋白質や、染

色体構造構成蛋白質，あるいは，染色体構造そのものとの相互作用が，組換え開始に主要な役割を果たしていることを示唆している．次に，Mre11は組換えの開始に必要な二重鎖切断を行い，引き続き起こるRad51の相同検索に必要なssDNAを，その切断末端に形成する．この2つの反応で，Mre11は別の蛋白質と複合体を形成する．また，体細胞で電離放射線などで生じた二重鎖切断の修復時に起こる末端の消化や，消化を伴わない末端の結合にもMre11の機能が必要である．

相同染色体の対合からその解離の一連の反応では，Rad51が主役を担うが，これもまた，RPA，Rad52，Rad55，Rad57の蛋白質との共同作業で組換え反応を進行する．昨年度に引き続き本年度の主な研究は下記の4プロジェクトであった．

- (1) DNA 傷害の修復反応に於けるMre11蛋白質の役割
 - (2) テロメア長維持で働くMre11蛋白質機能の解析
 - (3) *RAD51* 遺伝子発現制御に関与する因子の同定と，その役割の解析
 - (4) Mre11蛋白質のリン酸化と，リン酸化に関与する遺伝子の同定
- 得られた成果は下記の様なものである．

(1) DNA 傷害の修復反応に於けるMre11蛋白質の役割：立田大輔，押海弘之，太田 力，小川智子

DNA 傷害で生じた二重鎖切断は，相同組換え反応と非相同組換え反応によって修復される．これらの修復反応でのMre11の役割を解析した．非相同組換え反応には，主に2つの反応が知られている．その1つはIllegitimate Recombinationと呼ばれるもので，DSBsの末端に生じたssDNAのtailの中の数塩基からなる相同配列が，Rad52によって，アニールされ，非相同な塩基が削られ，さらに，そのギャップがポリメラーゼで埋められ，ライゲースにより結合して行われる．もう一方は，DSBsの末端がそのまま結合するか，平滑末端を作る様にヌクレアーゼで削られてからライゲースにより結合する非相同塩基配列を持つ分子の末端結合反応である．この反応にMre11がどのように関与するかを調べるために，線状プラスミドにT4ライゲースを加えて末端結合反応を試みた．その結果，Mre11は二種類の末端結合反応を行うことがわかった．

1) DNA 塩基配列の相同性に依存した末端の結合反応

Mre11蛋白質自身が行うこの末端結合反応はMnイオンを要求し，ATPを必要としない．相同配列を要求する末端の結合は，線状プラスミドDNAの末端が，巻き戻され，相手の分子の巻き戻された相補鎖と水素結合によって形成され，Holliday junction様の構造を作る．この結果はMre11蛋白質が，二重鎖DNAの末端を巻き戻す活性(Unwinding activity)とアニールするannealing activityを持つ事を示唆した．さらに，この末端結合反応は3' over hangを持った線状DNAでは起こらない．

2) Mre11の巻き戻し活性(Unwinding activity)

[32 P]で5'末端を標識した5種類のオリゴヌクレオチドを，それぞれM13のウイルスDNAとアニールして5種類の基質を作った．それぞれの基質にMre11を加え，オリゴヌ

クレオチド断片が、基質から解離するかどうかで、活性を測定した。

両末端が平滑末端である線状の基質から Mre11 はオリゴヌクレオチドを解離する活性を持っていた。また、オリゴヌクレオチドを環状の M13 にアニールした基質からも高い活性が得られた。しかし、両末端に overhang があるものは基質とならなかった。そこで、それぞれの末端に overhang を持つ基質を作り、調べたところ、5' に overhang を持つものは基質となるが、3' に overhang を持つものは基質とならない事がわかった。これらの結果は、Mre11 が overhang を持たない 3' end から巻き戻すことを示唆している。

さらに、種々の変異蛋白質の巻き戻し活性を調べたところ、Mre11-NQ と Mre11-8 変異蛋白質は巻き戻し活性を失っていた。しかし、これらの変異蛋白質に Rad50 蛋白質を加えると、巻き戻し活性が回復した。これらの結果は、巻き戻し活性は、Mre11 のいずれの DNA 結合部位も使用できるが、両結合部位が欠失したときには、Rad50 蛋白質の DNA 結合活性を使って DNA の末端を巻き戻す事ができることを示した。

3) Mre11 のアニーリング活性

Mre11 のアニーリング活性には、DNA 結合部位として site-B を必要とし、Rad50 による活性の促進は観察されなかった。活性の強さは、ほぼ Rad52 のアニーリング活性と同程度であった。

4) Mre11 は非相同な塩基配列を持つ末端をライゲースが繋ぐ反応を促進する。

線状プラスミド DNA の末端結合が検出できない程の少量のライゲースが存在する反応液に Mre11 蛋白質を加えると、環状 DNA と同時に、線状 DNA の多量体が形成された。これは、Mre11 蛋白質が末端同士を近づける働きを持つことを示している。この末端結合反応には site-B が必要であるが、その欠失を Rad50 蛋白質が補う。

5) DNA 二重鎖切断の修復反応に関与する Mre11 の活性とその反応に必要な DNA 結合部位

DNA 傷害で生じた二重鎖切断末端に Mre11 が結合すると、その末端は巻き戻される。この場合、Mre11 の DNA 結合部位は site-A、あるいは、site-B が使用できる。Mre11 が site-A で結合すると、巻き戻された一方の鎖は Mre11 ヌクレアーゼによって削られ、ssDNA の tail ができる。この ssDNA 部分は、Rad51 蛋白質による相同組換え反応に使用されるか、Rad52 による非相同組換え反応 (Illegitimate recombination) に使用される。一方、巻き戻し反応が site-B で起こると、その末端は再びアニールして、末端再結合反応に使用できる。あるいは、巻き戻された相同配列を末端に持った分子があれば、相同性依存の末端結合反応を行う事もできる。

6) Mre11 が持つ 2 箇所の Rad50 蛋白質の使い分けによる DNA 修復反応

Rad50 によって回復できる Mre11 の素活性を統一的に解析すると、それぞれの反応に於ける Rad50 の結合部位が推定できる。

(i) Mre11-NQ と Mre11-58 は巻き戻し活性とヌクレアーゼ活性がないことで共通であるが、Rad50 と Xrs2 との結合能に関しては全く異なっている。前者は、結合できるが、後

者は結合できない。DNA 傷害の修復能は前者変異株は持っているが、後者は殆ど *mre11* 欠失株と同じで、DNA 傷害を修復できない。これらの結果は、DNA 傷害の修復には *Mre11* が *Rad50* と *Xrs2* と結合することが必須であることを示唆している。

(ii) *Mre11-8* は両方の DNA 結合部位を欠失しているが、MMS による DNA 傷害を部分的に修復できる。この変異蛋白質は N 末端領域に *Rad50* を結合することにより巻き戻し活性が回復できるので、修復能はこの巻き戻し活性に依存した反応で起こると考えられる。一方、*Mre11-8* の末端結合反応は *Rad50* との結合によって回復できないので、末端結合反応では *Rad50* の結合が中央の結合部位で起こる事が必要であると考えられる。

(iii) *Mre11-7* のヌクレアーゼ活性と巻き戻し活性、さらに *Rad50* との結合活性は、野生型のそれらと同じである。しかし、この変異蛋白質は末端結合反応ができない。この欠損は *Rad50* と結合することにより回復するので、*Mre11* の DNA 結合部位 site-B は DNA 修復反応に必要でない。

(iv) *Mre11-6* は MMS 処理により生じた DNA 傷害を部分的に修復できるが、完全な修復ができないのはヌクレアーゼ活性の欠損によると考えられる。*Mre11-6* 蛋白質は N-末端領域にのみ *Rad50* を結合することができるが、*mre11-6* と *rad50S* (ATP 依存の DNA 結合活性の欠損した変異株と考えられている) の二重変異株では全く修復能が失われるので、*Rad50S* 蛋白質が *Mre11-6* の N-末端に結合した複合体では、*Mre11-6* にある DNA 結合部位 site-B が不活性になることを示唆している。

(2) テロメア長維持における *Mre11* 機能の解析：太田 力，田中茂生，押海弘之，立田大輔，小川智子

出芽酵母では、*MRE11*、*RAD50*、*XRS2* 遺伝子のいずれかが欠失するとテロメア長の短縮が起こるので、これらの遺伝子はテロメア長の維持に必要である。そこで、*MRE11* 遺伝子に変異を持つ数種類の変異株でのテロメア長を解析した。その結果、*mre11-58* と *mre11-6* 変異株のテロメアの長さは、*mre11* Δ 変異株と同じであった。この結果は、先ずテロメア長の維持には、*Mre11* 蛋白質が *Rad50* と *Xrs2* と結合する必要があることを示した。

次に、*Mre11* ヌクレアーゼを欠損した、*Mre11-NQ* と *Mre11-6* を *mre11* Δ 変異株で発現し、テロメア長の回復について調べた。短くなったテロメアは *Mre11-NQ* の発現により、その長さの伸長が観察されたが、*Mre11-6* の発現では観察されなかった。*Mre11-NQ* の巻き戻し活性は *Rad50* の添加により回復するので、このテロメア長の回復には *Mre11* の巻き戻し活性が関与していると考えられた。一方、*Mre11-6* は巻き戻し活性を持っているのにも関わらず、その回復ができなかったことは、site-A の欠損による DNA 結合に起因していると考えられた。

そこで、出芽酵母のテロメア配列 (TG1GTGGG) を 2 回繰り返して持っている DNA 断片とその相補鎖を持っている二重鎖 DNA 断片を用いて *Mre11-7* (site-A を欠失している) と *Mre11-8* (両 DNA 結合部位を欠失している) の DNA 結合活性を調べた。*Mre11-7* は ssDNA

断片に結合できるが、その dsDNA には結合できなかった。また、Mre11-8 はどちらの DNA にも結合できなかった。また、ランダム配列を持つ DNA では単鎖 DNA でも、二重鎖 DNA にも結合出来なかった。これらの結果は、Mre11 の DNA 結合部位 site-A がテロメア配列の認識に必要であることを示唆した。興味深いことに、単鎖テロメア配列を持つこのオリゴヌクレオチドを熱処理したとき、Mre11-7 は結合できなくなった。

テロメア配列はグアニン塩基に富んでいるために、グアニンの水素結合により、G-DNA 構造を形成することが知られている。そこで、テロメア配列を持つオリゴヌクレオチドを 1MNaCl 中で保存して G-DNA 構造を作り、それに対する結合を調べたところ、Mre11-7 は G-DNA 構造のみと結合した。この結果は、Mre11 の site-A は G-DNA 構造を特異的に認識する事を示している。

次に、Mre11 がこの G-DNA 構造を解消できるかどうかを調べた。Mre11-7 は G-DNA 構造を解消してモノマー DNA にできるが、Mre11-8 はできないことがわかった。

テロメアは、細胞周期の S 期の後期に ssDNA を形成することが示されている。そこで、*mre11-6* と *mre11-7* 変異株での ssDNA 形成を調べた。その結果、*mre11-7* 細胞では野生型と同じよう S- 期特異的に ssDNA が検出されたが、*mre11-6* 細胞ではその検出ができなかった。この結果は、テロメアの末端に形成される ssDNA は、site-A による Mre11 蛋白質の結合により保護されることを示唆した。そこで、各々の変異株の Mre11 蛋白質が細胞周期特異的に結合するかどうかを調べた。その結果 *mre11-7* 変異株と野生型では Mre11 が S- 期特異的にテロメア DNA に結合し、*mre11-6* と *mre11-8* 変異株ではその結合が検出できなかった。さらに、*ku70* 欠損株はテロメア長の維持ができないが、細胞周期を通して末端に ssDNA を形成することが報告されていたので、この変異株での Mre11 のテロメアへの結合を調べた。その結果この変異株では、Mre11 蛋白質が細胞周期を通してテロメアに結合する事が観察された。これらの結果は、テロメア末端に ssDNA の形成と Mre11 のテロメアへの結合には相関があることが示している。また、Mre11 のテロメアへの結合は、ssDNA をヌクレアーゼの攻撃から守っていることを示唆した。

テロメアの ssDNA に G-DNA 構造ができ、そこへ Mre11 蛋白質が結合し、さらに、G-DNA 構造が解消されることを考えると、Mre11 は、テロメラーゼによるテロメア配列の合成に必要なテロメア配列の末端の保護に重要な働きをしていると考えられる。Ku 蛋白質はその Lagging 鎖の合成に必要であると考えられる。

(3) *RAD51* 遺伝子発現制御因子：特に G2/M 期の制御に関与する因子：Alexeev Andrei, 小川智子

RAD51 遺伝子上流のオペレーター・プロモーター領域には多くの制御因子が結合する配列がある。例えば、DNA 傷害を受けた時に *RAD51* 遺伝子の発現を誘導する DNA damage repair elements と呼ばれる DRE1 や DRE2 が存在する。また、細胞周期 G1/S では、*RAD51* 遺伝子の発現が誘導されるが、その時に働く、Mull cell cycle box と呼ばれる MCB

box, 減数分裂期での誘導に関与すると考えられている URS などである。我々が *RAD51* 遺伝子の塩基配列を決定した時に、更に、*RAD52* と *RAD54* 遺伝子の上流と共通な配列のあることを見出した。その配列の機能を知るために、*RAD51* 遺伝子上流のヌクレオソームの位置を決定し、DNaseI foot-printing を行って、その配列に結合する蛋白分子があるかどうかを調べた。そして、さらにそれらが、MMS 処理によりどのように変化するかを観察した。

その結果 *RAD51* 遺伝子上流には 3 個のヌクレオソームが存在し、その一つは TATA box と翻訳開始コドン ATG の上に位置していた。そして、そのヌクレオソームは MMS 処理と同時に位置を変えた。他の因子の配列はヌクレオソームとヌクレオソームの間に位置し DNaseI による Foot-print が観察された。

我々の発見した因子の Foot-print は *RAD51* 遺伝子の発現誘導時には消失しなかったが、MMS 処理後培養を続けると消失することがわかった。

そこで、この配列に結合する蛋白質を精製し、そのアミノ酸組成を調べると、その蛋白質がセントロメア結合蛋白質 Cbf-1 であることがわかった。次に、この遺伝子の欠失変異株 *cbf-1* を作成、*RAD51* 遺伝子の発現誘導を mRNA の量で調べると、*cbf-1* 変異株では、MMS 処理による発現誘導が、野生型のそれと同じ様に生じるが、発現した mRNA の低下が、時間を経過しても観察されなかった。そして、細胞増殖が G2/M 期で止まっていた。

そこで、野生型を G1 期に同調し、さらに MMS で処理し、MMS を除いた後で Cbf-1 蛋白質が *RAD51* 遺伝子上流とセントロメア領域へ結合するかどうかを細胞周期を追って調べた。Cbf-1 のこれらの領域への結合が G2/M 期で検出できなくなった。これらの結果は、Cbf-1 の結合が G2/M 期の通過に必要であることを示している。野生型と *cbf-1* 変異株を MMS 処理しないときには、*RAD51* 遺伝子の発現は G2/M 期で低下することから、DNA 損傷時に特異的に働く *RAD51* や *RAD52*, *RAD54* 遺伝子などの、G2/M 期のリプレッサーであると考えられる

(4) Mre11 蛋白質のリン酸化に依る組換え反応の制御：小川英行，小川智子

Mre11 蛋白質は、減数分裂期の組換えの開始である DNA 二重鎖切断の導入と、それ以降の切断端に一本鎖部分を形成する過程(プロセッシング)に必須である。そして Mre11 蛋白質は二重鎖切断導入後にリン酸化を受ける。そのリン酸化の役割を明らかにする目的で、Mre11 がリン酸化される条件と、Mre11 をリン酸化する蛋白質の解析を行った。

(i) DNA 二重鎖切断が蓄積し細胞周期が停止する変異株 *rad50S* では、リン酸化を受けた Mre11 が蓄積し、全 Mre11 の約 50% になる。この変異株で Mre11 蛋白質の存在場所を蛍光抗体法で観察すると、Rad50 と Xrs2 と複合体(Mre11 複合体)を作り核内に数十個の focus を作って局在することが分かった。

(ii) *rad50S* と同様に二重鎖切断を蓄積するが、細胞周期は停止させない変異株 *mre11-58* では、そのリン酸化は全く起こらない。またこの蛋白質は Mre11 複合体を作らず、fo-

cus の形成もない。

(iii) 野生型株では、生じた二重鎖切断は、減数分裂期の進行につれて蓄積せずに消滅するが、それに呼応して Mre11 のリン酸化も一過的に観察できる。しかし Mre11 の focus 状の局在は観察されない。

以上のことから、*rad50S* 変異株では Mre11 のリン酸化は細胞周期の停止に関与すること、そのリン酸化と Mre11 の focus 状の核内の局在には、Mre11 複合体を形成することが必要なことが明らかになった。

(iv) 次に Mre11 のリン酸化に関与する遺伝子産物の探索を行った。先に *rad50S* の細胞周期停止が *mre4/mek1* に変異の導入によって、停止が回避されることが報告されていた。*mre4/mek1* は我々の分離した、組換えに関与して、減数分裂期特異的に発現し、プロテインキナーゼの機能を持つ遺伝子である。従って *rad50S* 変異の細胞周期停止を回避した時に Mre11 のリン酸化が起きなくなっているかどうかを調べた。しかし、*rad50S mre4/mek1* でも、Mre11 のリン酸化は観察された。

(v) DNA 複製、DNA 傷害のチェックポイントに関与する酵母の遺伝子で、ヒトの *ATM* ホモログの一つ、*TEL1* が *rad50S* で欠損すると細胞周期停止が回避されることを発見した。この時も Mre11 のリン酸化は起きていた。ところが、*mre4/mek1* と *tel1* を同時に欠損した *rad50S* 変異株では、Mre11 のリン酸化は全く起きなかった。またこの条件下でも Mre11 の focus 状の局在は観察された。

すなわち *rad50S* で観察される Mre11 のリン酸化は、*MRE4/MEK1* と *TEL1* によって行われ、Mre11 複合体の focus 状の局在には Mre11 のリン酸化は必要無いことが分かった。Mre11 のリン酸化は、Mre11 複合体の DNA 二重鎖切断端への結合の後に行われると考えられる。

(vi) 野生型株で観察される Mre11 のリン酸化は、Tell のみによって行われる。

このことは野生型の減数分裂時には、細胞周期の停止が起こらないことから、Tell に依るリン酸化は、Mre11 がプロセシングの過程に入る際に関与するものと考えられ、細胞周期の停止は、*MRE4/MEK1* によって更にリン酸化を受けて起こると考えられる。

細胞周期停止の信号となる Mre11 のリン酸化は、二重鎖切断導入後、プロセシングの過程に入れない時に *MRE4/MEK1* によって行われるが、それはどのような仕組みで行われるのだろうか。*MRE4/MEK1* が作る蛋白質 (Mre4/Mek1 キナーゼ) が、*in vitro* で自己リン酸化することを利用して、細胞周期停止が起る条件 (*rad50S*) と起らない条件 (*mre11-58*) で、Mre4/Mek1 キナーゼの活性を測定した。その結果、細胞周期が停止しない条件下では Mre4/Mek1 キナーゼの活性は低下していた。

これらの結果は、DNA 二重鎖切断端に結合した Mre11 複合体中の Mre11 が、Tell によってリン酸化されてもプロセシングできない場合には、その複合体が Mre4/Mek1 キナーゼの活性を高くして Mre11 複合体中の Mre11 を更にリン酸化して、細胞周期を停止させることを示唆している。

研究業績

(1) 原著論文

1. Shinohara, A. and Ogawa, T.: Rad51/RecA protein families and the associated proteins in eukaryotes. *Mutation Res.*, **435**, 13-21, 1999 .
2. Bakhlanova, I.V., Ogawa, T. and Lanzov, V.A.: Recombinogenic activity of chimeric *recA* genes (*P. aeruginosa* / *E. coli*): RecA protein regions responsible for this activity. in press *Genetics*,
3. Yu, X. Jacobs, S.A., West, S.C., Ogawa, T. and Edward, H.: Egelman1, Domain Structure and Dynamics in the Helical Filaments Formed by RecA and Rad51 on DNA in press *Proc.Natl. Acad. Sci., USA*.
4. Ohta, T., Tanaka, S., Tatsuda, D., Oshiumi, H. and Ogawa, T.: Recognition of G-structure at Telomere Ends and its Dissolution by Yeast Mre 11 in press *Nature Genetics*.

(2) その他

1. 白井雄彦, 小川智子, 小川英行: DNA 二重鎖切断を伴う多様な生理機構における Mre11/Rad50/Xrs2 蛋白質複合体の役割, 蛋白質 核酸 酵素(共立出版), 印刷中.
2. 押海裕之, 小川智子: 出芽酵母 Mre11 蛋白質の遺伝的組換えと DNA 傷害の修復過程における機能, 遺伝子医学 メディカルドゥー **4**, 631-635, 2000.
3. 小川智子: 生殖細胞—その誕生と振る舞い(「大学と科学」公開シンポジウム組織委員会)個性を生み出す遺伝的組み換えの仕組み pp85-97, 2000. クバプロ.
4. 押海裕之, 小川智子: 組換えに関与する Mre11 機能の多様性の出現のしくみ, 実験医学「トピックス」(羊土社), **17**, No6, 757-760, 1999.
5. 坪内英生, 小川智子: 切断された DNA 二重鎖の修復反応の分子機構, 細胞工学(秀潤社)特集ゲノム・オペレーティングシステム: 核内生命現象を操る原理, **18** No. 7, 976-983, 1999.
6. 太田 力, 小川智子: 真核生物の組換え反応の多様性, 核酸 蛋白質 酵素(共立出版), **44**, No. 2, 1830-1837, 1999.

(3) 招待講演

1. Ogawa, T.: Roles of Mre11 of *S. cerevisiae* in meiotic recombination and mitotic repair reactions. The Gordon Research Conference on Meiosis, June 18-23, New London, USA, 2000.
2. Ogawa, T.: Roles of Mre11 of *S. cerevisiae* in meiotic recombination and mitotic repair reactions EMBO workshop Seiillac, France, May, 2000.
3. Ogawa, T.: MRE11 and double strand brake repair, A Colloquium by the National Academy of sciences, California, November, 2000.
4. 小川智子, 立田大輔, 太田 力: 真核生物の組換え機構とその特性—Homology-

dependent and -independent end-joining reactions by Mre11. 公開シンポジウム「細胞複製装置とDNA修復の共役」大阪, 1月.

5. 小川智子: Mre11蛋白質のDNA二重鎖切断の修復機能, ワークショップ「放射線損傷の修復機構—放射線損傷の可視化を目指して—」東京, 3月
6. 小川智子: DNA2重鎖切断の修復反応におけるMre11の役割. ワークショップDNA Repair and Mutagenesis 2000, 仙台, 9月.
7. 小川智子: DNA組換えの分子機構と細胞にとっての役割. 第73回日本生化学会大会, 横浜, 10月.

(4) 発表講演

1. Tanaka, S. and Ogawa, T.: Functional analysis of MRE11 on the maintenance of telomere of *Saccharomyces cerevisiae*, 国際ワークショップ「染色体機能装置のダイナミクスとアルゴリズム」, 広島, 11月.
2. 押海裕之: 個々の機能に欠損を持つmre11変異株の解析, 第23回分子生物学会サテライトシンポジウム「遺伝的組換えとその制御」, 神戸, 12月.
3. 立田大輔: 二重鎖切断修復におけるMre11の機能解析, 第23回分子生物学会サテライトシンポジウム「遺伝的組換えとその制御」, 神戸, 12月.
4. 太田 力: 酵母Mre11のテロメア長維持機構の解析, 第23回分子生物学会サテライトシンポジウム「遺伝的組換えとその制御」, 神戸, 12月.
5. 太田 力: SNP解析最前線, 国立がんセンター疾病ゲノムセンターでの取り組み, 第23回分子生物学会年会, 神戸, 12月.
6. 立田大輔, 川根健司, 押海裕之, 松田志麻子, 太田 力, 小川英行, 小川智子: 二重鎖切断修復におけるMre11の機能解析, 第23回分子生物学会年会, 神戸, 12月.
7. 田中茂生, 小川智子: 出芽酵母Mre11蛋白質のテロメアへの結合能の解析, 第23回分子生物学会年会, 神戸, 12月.
8. 押海裕之, 立田大輔, 小川英行, 小川智子: 個々の機能に欠損を持つmre11変異株の解析, 第23回分子生物学会, 神戸, 12月.
9. 太田 力, 立田大輔, 田中茂生, 小川智子: 出芽酵母Mre11蛋白質の機能解析. 第23回分子生物学会年会, 神戸, 12月.
10. 木村純子, 佐々木博己, 崎山徳起, 大木 操, 太田 力: 大規模遺伝子解析に向けたゲノムの新しい増幅方法についての検討. 第23回分子生物学会年会, 神戸, 12月.

B-b. 微生物遺伝研究部門

微生物遺伝研究部門では, 本年は酵母をモデルとした真核生物染色体複製機構の研究, 染色体複製の細胞周期による制御及びチェックポイントの研究, 大腸菌のDNA複製に関する研究を行った.

本年の研究は、教授荒木弘之、助教授安田成一、助手上村陽一郎、COE 非常勤研究員増本博司、総研大大学院生高山優子・飯田哲史・卓妍秀と技術課職員村松佐知子が行った。

本年度の研究は、文部省科学研究費特定領域研究B”染色体複製をモニターする分子機構”(荒木)、基盤研究”真核生物 DNA ポリメラーゼの複製開始領域へのローディング機構の研究”(荒木)、奨励研究”染色体の複製開始を制御する新たな分子機構”(上村)の支援を受けた。また、荒木は科学技術振興事業団個人研究振興事業の研究員としての支援も受けている。

(1) 出芽酵母 Dpb11 と相互作用する Sld3, Sld4 の解析: 上村陽一郎, 荒木弘之

出芽酵母の Dpb11 は、染色体 DNA の複製と S 期での細胞周期チェックポイントに関与している。昨年、Dpb11 が染色体複製開始に必要な DNA ポリメラーゼの複製開始領域へのローディングに関与していることを示した(原著論文1)。

Dpb11 の機能をより詳細に解析するために、Dpb11 と相互作用する因子を遺伝学的に同定し、その機能の解明を試みた。Dpb11 と相互作用する因子は、*sld* 変異 (synthetic lethality with *dpb11-1*) として分離した。現在までに、*sld1* ~ *6* を分離し、その変異を相補する遺伝子をクローニングした。*SLD1* は DNA ポリメラーゼ ϵ (Pol ϵ) の三番目のサブユニットをコードする *DPB3* と、*SLD4* は染色体 DNA 複製の開始と伸長反応に関与する *CDC45* と同一であった。また、*SLD6* は細胞周期チェックポイントに関わる *RAD53* であった。*SLD2, 3, 5* は全て細胞増殖に必要な新規の遺伝子であった (Kamimura et al., Mol. Cell. Biol. 18, 6102-6109, 1998)。

本年度は、昨年に引き続き Sld3 と Cdc45 の機能解析を行った。*CDC45* と *SLD3* は各々の温度感受性変異を多コピーでサプレスした (*cdc45* 変異は、新たに我々が分離したものを用いた。次項参照)。また、両者の間には物理的相互作用が観察された。更に、2-ハイブリッド法から *SLD3* の温度感受性変異を含む蛋白質は Cdc45 との相互作用が低下していることが示唆された。*SLD3* の温度感受性変異を用いた解析から、この因子が Dpb11 や他の Sld 同様、染色体 DNA 複製の初期に機能していることが示された。CHIP (Chromatin Immunoprecipitation) 法を用いて Sld3 と複製開始領域との結合を調べた結果、Cdc45 と同様、S 期初期に使用される複製開始領域には G1 期から、S 期後期に使用される複製開始点には S 期に入ってから結合することが明らかになった。また、*SLD3* 温度感受性変異産物では複製開始領域との結合が低下しており、この結合が Sld3 の機能にとって重要であることが示された。次に、Sld3, Cdc45 の機能と各々の因子の複製開始領域との結合について調べた結果、Sld3, Cdc45 はお互いの機能に依存して複製開始領域に結合していた。これらのことから、Sld3 と Cdc45 は複合体を形成し、この複合体形成が複製開始領域との結合に必要であることが示された。最後に、Sld3-Cdc45 の複合体が染色体 DNA 複製にどのような機能を果たすのかを調べた。染色体 DNA 複製が開始する際には、複製開始領域の二本鎖 DNA が一本鎖に解離しなければならず、これは、複製開始領域と RP-A (一本鎖結合蛋白質) との結合によって調べることが可能である、RP-A と複製開始領域

の結合は *SLD3* の温度感受性変異株では観察されず, *Sld3*-*Cdc45* の複合体が複製開始領域の一本鎖解離反応に必要であることが示唆された. 詳細は原著論文 2 に報告した.

(2) 出芽酵母 *CDC45* 遺伝子の新たな変異の分離とその解析: 卓妍秀, 上村陽一郎, 荒木弘之

Cdc45 は, 染色体 DNA 複製の開始と DNA 鎖伸長の両過程に関与することが示されている. しかしながら, *CDC45* 遺伝子の点突然変異は低温感受性変異の 1 つしかなく, *Cdc45* の細胞内での詳細な解析が行われていない. そこで, 新たな *cdc45* 変異を, プラスミドシャッフリング法により分離した. 変異は, *CDC45* 遺伝子の N 末半分に主として起こっていた. これら変異は, 多コピーの *SLD3* によってサプレスされるものと, そうでないものに分類されたが, 変異領域と *SLD3* によるサプレスとの間には関連は見いだされなかった. C 末半分に起こった変異も 1 つ分離され, 現在解析中である.

(3) 出芽酵母 *Dpb11* と複合体を形成する *Sld2* のリン酸化に関する解析: 増本博司, 荒木弘之

Dpb11 は *Sld2* と複合体を形成し, この複合体の形成が染色体 DNA 複製に必須である (Kamimura et al., Mol. Cell. Biol. 18, 6102-6109, 1998). そこで, *Sld2* にエピトープタグを付加し, 細胞周期における *Sld2*-*Dpb11* 複合体の有無を調べたところ, 複合体形成は S 期にのみ観察された. そして, この複合体形成に欠損を示す *sld2* 変異では, *Pol ε* は複製開始起点に結合することができなかった. 従って, *Sld2*-*Dpb11* 複合体形成が *Pol ε* の複製開始起点への結合に必要であると結論できる. また, *Sld2* の SDS-PAGE での移動度は G1/S 期に遅くなり, 移動度の遅くなった *Sld2* は G2 期から M 期にかけて分解もしく移動度の早い分子種に移行することが分かった. この移動度の変化は, フォスファターゼ処理により解消するため, *Sld2* がリン酸化されていることが分かった. 次に, *Sld2* はそのアミノ酸配列中に CDK (Cyclin Dependent Protein Kinase) によりリン酸化可能な部位を 6 つ持つため, すべての CDK 部位のセリン, スレオニン残基をアラニン残基に置換した変異遺伝子を作成した. この変異遺伝子は, *Sld2* 欠損株の増殖を相補することができない. さらに, この変異 *Sld2* は *Dpb11* と複合体と作ることができない. これらのことから, *Sld2* が S-CDK によりリン酸化されることにより *Dpb11* と複合体を作り, この複合体が DNA ポリメラーゼの複製開始領域へのローディングに必須であると考えられる.

(4) 出芽酵母 *Dpb11* と相互作用する *Sld5*, *Psfl* の解析: 高山優子, 荒木弘之

Dpb11 と相互作用する因子として単離された *SLD5* 遺伝子は約 34kDa の蛋白質をコードしており, 細胞増殖に必須である. *SLD5* の温度感受性株 *sld5-12* の多コピーサプレッサーとして単離された新規の遺伝子 *PSF* (Partner of *SLD five*) 1 遺伝子も細胞増殖に必須な約 24kDa の蛋白質をコードしている. 両者は, お互いの抗体を用いた免疫沈降実験において共沈殿することから, 複合体を形成していることが示唆されている. また, この複合体は細胞周期を通じて検出される. さらに我々は, *sld5*, *psfl* 温度感受性変異株の解析から, これら遺伝子が複製に関与することを示している.

本年度は、CHIP 法により、Psf1, Sld5 と複製開始領域との結合を調べた。その結果、両者とも S 期に複製開始領域に結合することが分かった。また、Psf1 は S 期初期に使われる複製開始領域には S 期初期に、また S 期後期に使われる複製開始領域には S 期後期に結合する。これは、DNA ポリメラーゼの複製開始領域への結合様式と同じである。さらに、*psf1-1* 温度感受性変異では、Pol ϵ の複製開始領域への結合が起こらないが、Sld3 は結合している。このことは、Psf1, Sld5 を含む複合体が Sld3 の後に複製開始領域に結合し、この結合が DNA ポリメラーゼの複製開始領域への結合に必須であることを示している。*psf1-1* 変異では、DNA ポリメラーゼの複製開始領域への結合がまったく起こらないため、DNA 複製が開始しないと考えられる。

(5) Dpb11 の新規変異の取得による機能解析：村松佐知子，荒木弘之

Dpb11 は 764 アミノ酸からなる塩基性蛋白質であるが、BRCT (BRCA1 C-terminus) と呼ばれるリピート構造の 4 回の繰返しによってその 2/3 を占められている。この BRCT は多くの細胞周期チェックポイントに関連する蛋白質に存在し、蛋白質間の相互作用に関与していると考えられている。我々が分離した *dpb11-1* 変異は、4 つめの BRCT リピートの末端に起こったナンセンス変異であった。そこで、Dpb11 機能の詳細な解析をするため、我々は、新たに *DPB11* の温度感受性変異を 10 個、薬剤感受性変異を 3 個分離し解析を進めている。

この解析の一環として、Rad53 プロテインキナーゼのリン酸化を調べた。Rad53 は、細胞周期チェックポイントには必須な遺伝子であり、DNA にダメージが入ったりヒドロキシ尿素により細胞周期が S 期で止まると、チェックポイントが働くとリン酸化される。*dpb11* 変異では、許容温度では Rad53 のリン酸化レベルがヒドロキシ尿素処理でも野生株ほど上がらない。さらに、非許容温度では Rad53 のリン酸化はまったく起こらない。このことは、非許容温度の *dpb11* 変異では DNA 複製が全く起こらず、チェックポイント系ヘシグナルを送っていないためであろうと考えられる。

(6) 大腸菌 DnaA 蛋白質の機能：安田成一

大腸菌の DnaA 蛋白質は、染色体複製開始点 (*oriC*) に結合することで染色体複製の一連の反応の最初のステップを担うが、この蛋白質は適正な複製開始頻度の調節のために何らかの機構による制御を受けていると考えられる。DNA ポリメラーゼ III の β サブユニットや、*seqA*, *iciA*, などいくつかの蛋白質因子が *dnaA* の *oriC* への働きを阻害することが知られているが、これらによって細胞周期に同調した複製開始の制御を説明することは困難なので、これらの既知の因子以外に別の調節機構が存在すると想像される。それを明らかにするためにいくつかの方法を試みているが、技術的な問題もあって現在までのところ成功していない。これに関係して、DnaA 蛋白質の活性の簡単に正確な測定のために必要な HU 蛋白質を、大量生産株から精製した。また、既知の *dnaA* 変異株から変異 *dnaA* 遺伝子をクローン化する方法によって *dnaA5* および *dnaA46* 変異蛋白質の大量発現系を作成し、そのうち *dnaA5* 蛋白質について部分精製を行った。すでに精製してある一部を欠失し

た dnaA の変異蛋白との比較や相補性試験によって dnaA 蛋白の各領域の機能を明らかにしてゆく予定である。

研究業績

(1) 原著論文

1. Masumoto, H., Sugino, A. and Araki, H.: Dpb11 controls the association between DNA polymerase α and ϵ , and the ARS region of budding yeast. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 2809-2817, 2000.
2. Kamimura, Y., Tak, Y.-S., Sugino, A. and Araki, H.: Sld3, which interacts with Cdc45(Sld4), functions for chromosomal DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* in press.

(2) その他

1. 上村陽一郎, 荒木弘之: 複製複合体の構築. *実験医学*, **18**, 949-956, 2000. 羊土社.

(3) 発表講演

1. 村松佐知子, 荒木弘之: 出芽酵母 *DPB11* の機能領域の解析, 第 33 回酵母遺伝学フォーラム, 東京, 8 月.
2. Araki, H., Kamimura, Y. and Masumoto, H.: Transition from the initiation to elongation steps in DNA replication of budding yeast. The 4th UK-Japan Cell Cycle Workshop, Cambridge, UK, September.
3. Araki, H., Kamimura, Y. and Masumoto, H.: Transition from the initiation to elongation steps in DNA replication of budding yeast. Weimar Conference of Genetics, Weimar, Germany, September.
4. 荒木弘之, 上村陽一郎, 増本博司, 高山優子, 村松佐知子: DNA 複製をモニターする分子機構. 第 73 回日本生化学会大会, 横浜, 10 月.
5. 上村陽一郎, 荒木弘之: 出芽酵母 *SLD3* 遺伝子の機能解析. 第 23 回日本分子生物学会, 神戸, 12 月.
6. 増本博司, 荒木弘之: 出芽酵母 *Sld2* の機能と S 期特異的リン酸化. 第 23 回日本分子生物学会, 神戸, 12 月.
7. 小森康則, 高山優子, 荒木弘之, 滝澤温彦: アフリカツメガエル *Psfl* のクローニングと機能解析. 第 23 回日本分子生物学会, 神戸, 12 月.
8. 中島玲子, 荒木弘之, 升方久夫: 分裂酵母新規複製因子 *Ps13* の解析. 第 23 回日本分子生物学会, 神戸, 12 月.

B-c. 細胞質遺伝客員研究部門

(1) 中立変異の頻度とその固定の確率の関係は中立性の定義だけから求めることができる：富澤純一

分子進化の中立説でもっとも基本となる関係は変異の頻度 p が、その変異が最終的に集団として固定する確率 u に等しい。すなわち、 $u=p$ である。

1968年木村資生はこの関係を変異が固定する過程の数学的解析から誘導した。私はこの関係が中立性の定義だけから論理だけで導くことができることを示すとともに、木村の数学理論のなかに同義語反復(トートロジー)のあることを示した。

(2) ミュータントマウスの行動異常の解析：二木宏明

オピオイドによる鎮痛の分子メカニズムを明らかにするため、2000年度はG蛋白質活性化型内向き整流性カリウムチャネル(GIRKチャネル)に異常のあるウィーバーミュータントマウスを用いて、薬理学的実験を行った。ミューオピオイド作動薬(モルヒネ)およびカッパオピオイド受容体作動薬(U50488)の鎮痛効果は、ウィーバーミュータントマウスにおいて有意に減弱していることが明らかになった。この知見は、オピオイド鎮痛においては、GIRKチャネルを介した細胞内情報伝達経路が重要であることを示している。

また、本年度はモルヒネ鎮痛効果が減弱していることで知られるCXBKマウスの遺伝的原因を明らかにした。CXBKマウスのミューオピオイド受容体メッセンジャーRNAは、正常な翻訳領域を有するが、非翻訳領域が異常に長く、発現量が減少していることが明らかになった。さらに、このメッセンジャーRNAの異常が、ミューオピオイド受容体遺伝子の異常に由来すること、およびCXBKマウスでの減弱したモルヒネ鎮痛の原因となることを明らかにした。

脳内報酬系がどのような分子機序で機能しているのかを明らかにするため、モルヒネの脳内標的であるミューオピオイド受容体およびコカインの脳内標的であるドパミン輸送体のそれぞれの遺伝子欠損マウスを用いて、脳内自己刺激反応テストを行っている。本年度は、ヘッドディッピング方式と滞在方式の2種の異なるテスト法でマウスの脳内自己刺激行動を総合的に解析するシステムを確立した。また、それぞれの遺伝子欠損マウスが野生型のマウスとは異なる脳内自己刺激反応を示すという予備的な結果を得ている。

研究業績

(1) 原著論文

1. Tomizawa, J.: Derivation of the relationship between neutral mutation and fixation solely from the definition of selective neutrality. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **97**, 7372-7375, June, 2000.
2. Hironaka, N. and Niki, H.: Effects of N-methyl-D-aspartate receptor subunit

antagonists on regulation of susceptibility to audiogenic seizures in rats, *Neurosci. Lett.* **288**, 139-142, 2000.

3. Ikeda, K., Kobayashi, T., Kumanishi, T., Niki, H. and Yano, R.: Involvement of G⁻ protein-activated inwardly rectifying K⁺(GIRK)channels in opioid-induced analgesia, *Neurosci. Res.* **38**, 113-116, 2000.
4. Ikeda, K., Kobayashi, T., Ichikawa, T., Kumanishi, T., Niki, H. and Yano, R.: The untranslated region of mu-opioid-receptor mRNA contributes to reduced opioid sensitivity in CXBK mice, *J. Neurosci.* (in press).

(2) 発表講演

1. Hironaka, N., Niki, H.: "Differential role of NMDA receptor 2A and 2B subunits in audiogenic seizure in rats", XXVII International Congress Psychology, Stockholm, Sweden, Jul., 2000.
2. Ikeda, K., Ichikawa, T., Kobayashi, T., Kumanishi, T., Niki, H. and Yano, R.: "The untranslated region of MU-opioid-receptor mRNA contributes to reduced opioid sensitivity in CXBK mice", 30th Ann. Meet. of Society for Neuroscience, New Orleans, USA, Nov., 2000.
3. 池田和隆, 小林 徹, 市川富夫, 熊西敏郎, 谷野良治, 二木宏明: "鎮痛における GIRK チャネルの役割", 第 23 回日本神経科学大会 第 10 回日本神経回路学会合同大会, 横浜, 9 月, 2000.

C. 個体遺伝研究系

C-a. 発生遺伝研究部門

当研究部門はショウジョウバエを用い、神経系の発生機構を研究しているショウジョウバエグループが二つと、ヒドラを使って形態形成機構を研究しているヒドラグループからなる。

1. ショウジョウバエグループ

本年度の教官メンバーは、教授；広海 健，助手；岡部正隆の2名である。その他、リサーチアソシエートの丹羽 尚，総合研究大学院大学学生：松野元美，特別共同利用研究員：岩波将輝，遺伝学普及会研究員：湯浅義博が研究に参加し，研究補佐員：鈴木恵美子，研究補助員：増島育子が協力した。当グループの研究は遺伝研校費・総研大校費に加えて，文部省科学研究費補助金・基盤研究：「神経細胞運命決定の核内機構」，特定領域研究：「神経細胞特異化の分子機構」，「体節内のボディープランと感覚器特異化の遺伝解析」および「感覚器特異化における転写因子ネットワークの遺伝解析」，学術振興会未来開拓事業：「発生におけるパターン形成機構」(プロジェクトリーダー・林 茂生)，学術振興会日欧共同研究：「ショウジョウバエ *eyeless* 遺伝子による器官決定の発生遺伝学的研究」，の支援を受けた。

ショウジョウバエグループ1は胚中樞・末梢神経系及び成虫複眼をモデル系として用いて，神経系発生過程におけるニューロン運命決定機構・神経回路形成機構の研究を行っている。

(1) 感覚器特異化における転写因子ネットワークの遺伝解析：岡部正隆，広海 健

我々はショウジョウバエ胚における各種感覚器の個性獲得の分子基盤を明らかにしようとしている。このような研究により，細胞または器官の多様性を生む転写因子ネットワークが明らかとなり，個体発生におけるゲノムの機能的側面を理解することが可能となる。ショウジョウバエ胚の末梢神経系の感覚器には，機械刺激受容器，化学刺激受容器と伸展受容器の3種類があり，各体節に存在する。homeobox型転写因子をコードする *cut* 遺伝子は機械刺激受容器および化学刺激受容器の個性獲得に必要な十分な活性を持ち，Pax型転写因子をコードする *pox-neuro* 遺伝子は化学刺激受容器の個性獲得に必要な十分である。体節内の特定の位置に正確に発現するようにプログラムされているこの2つの遺伝子が，どのような転写因子の組み合わせによって発現調節を受けているかを解析し，感覚器の個性の獲得機構を成す転写因子ネットワークを明らかにしようとしている。本年は，*cut* 遺伝子の発現に必要な十分なゲノム領域として転写開始点の上流30kbに存在する120bpの領域を明らかにし，*pox-neuro* 遺伝子に関しては転写開始点から上流

4. 2kbp 以内に必要十分な制御領域が存在していることを明らかとした。

(2) 器官形成と位置情報の関係：丹羽 尚，岡部正隆，広海 健

生物を構成する様々な器官は、それぞれが体の特定の位置にのみ形成される。このことは、それぞれの器官形成の誘導には特定の位置情報が必要であることを示唆している。しかし特定の位置に器官形成を誘導するために必要な分子的基盤、さらに器官特異化の分子機構との関係については解明されていない。我々はショウジョウバエにおける複眼や伸展受容器などの各体節における種々の感覚器官を研究対象とし、それぞれの形成誘導に必要な分子的基盤を比較解析することで、器官特異化の分子機構の解明を行っている。これまでの *eyeless* 遺伝子による異所性複眼形成をモデルとした解析、さらに本来の複眼や他の感覚器官形成(耳、伸展受容器)との比較解析の結果、これらの感覚器官形成には、器官のタイプに関わらず「産卵後約 80 時間」という時間的条件と「*decapentaplegic* (*dpp*) 遺伝子の発現領域」という位置的条件が共通していることを見出している。

そこで、まずこれらの感覚器官形成における Dpp シグナルの要求性を明らかにするために、*Daughters against dpp* 遺伝子の過剰発現による Dpp シグナルの抑制を行った。その結果、各感覚器官形成の初期に働く *proneural* 遺伝子である *atonal* 遺伝子の発現がみられなくなり、感覚器官形成が阻害された。さらに我々は *atonal* 遺伝子の 3' enhancer 領域の解析より、Dpp シグナルが *atonal* 遺伝子発現を直接誘導していることを見出した。これらの結果から、各感覚器官形成の位置的条件を担う *dpp* 遺伝子は、その発現領域において神経分化をもたらす *atonal* 遺伝子の発現を誘導し、各体節に「神経分化可能領域」を共通して規定していると考えられた。我々は、進化の過程でこの「神経分化可能領域」に *eyeless* 遺伝子のような体節の個性を決める情報が付加し修飾することで、体節特異的な感覚器官が生じるようになったとの仮説を立てている。現在、この「神経分化可能領域」の時間的規定に関与する因子の解明と *atonal* 遺伝子発現との関係を解析している。

(3) 非対称分裂における転写後遺伝子発現制御：岡部正隆，広海 健

非対称分裂は、発生過程における細胞の多様性を生む基本的なメカニズムである。細胞分裂によって生じた 2 つの娘細胞にはお互いに異なる遺伝子発現が生じて非対称な細胞の運命決定が達成される。この過程における転写調節による遺伝子発現制御の研究は多く存在するが、翻訳調節の役割に関してはあまり研究がなされていない。ショウジョウバエ成虫の機械刺激受容器は 5 種類の細胞(神経細胞, グリア細胞, sheath 細胞, shaft 細胞, socket 細胞)から構成され、それらは 1 つの感覚母細胞が 4 回の非対称性分裂を行うことにより産生される。BTB-Zn-finger 型転写因子をコードする *tramtrack* 遺伝子は shaft 細胞と socket 細胞の前駆細胞の運命決定に必要な十分な遺伝子であり、Notch シグナルによってその蛋白質の発現が制御される。我々はこの *Tramtrack* 蛋白質の発現調節が転写後調節によって行われている事を見出し、それが *Seven in absentia* 蛋白質を介した蛋白質分解経路と RNA 結合蛋白質 *Musashi* による翻訳制御によって 2 重

に制御されていることを明らかにした。

(4) 核内レセプター Seven-up による転写制御機構の解析：松野元美，小瀬博之¹，広海 健¹ (徳島大学医学部動物実験施設)

ショウジョウバエ核内レセプター Seven-up は個眼の光受容ニューロンのニューロン種を決定する遺伝的スイッチとして機能する。我々は Seven-up がどのようにして標的遺伝子を転写制御し、どのような下流因子を動かすことで特定のニューロンとしての分化を引き起こすことができるのかについて調べている。

Seven-up のリガンド結合ドメインとの結合により酵母の 2 ハイブリッド法で同定された TFIIH の p52 サブユニットと新規 SAM ドメイン蛋白質 Samuel について、機能解析を開始した。まず機能欠失系統を作製したところ、TFIIHp52 サブユニットと Samuel の変異系統はともに劣性致死であった。p52 サブユニットを過剰発現しても顕著な症状は現れなかったが、Samuel の強制発現は光受容ニューロンの分化を阻害した。現在これらの蛋白質が Seven-up による転写調節において果たす役割を検討している。また、今年度から Seven-up の下流因子の探索を開始した。Seven-up のリガンド結合ドメインは転写抑制活性を持つことが知られているため、Differential Display 法を用いて *seven-up* 遺伝子の機能欠失時に発現量が上昇する遺伝子を探索した。現在候補遺伝子について、遺伝子産物の同定と発現解析を行っている。

(5) グリア細胞の分化成熟機構：湯浅喜博，岡部正隆，広海 健

ショウジョウバエの神経系では、*glial cells missing (gcm)* 遺伝子がニューロン vs. グリアの運命分岐決定を担っている。しかし、このようにして生じたグリア細胞がどのような過程で分化していくのかは不明な点が多い。転写因子 GCM の働きにより、3 つの転写制御因子 (Reversed polarity (REPO), PointedP1, Tramtrackp69) の発現が誘導される。その中の 1 つ REPO は唯一、グリア細胞で特異的に発現している蛋白質である。*repo* 機能欠失型突然変異体ではグリア細胞の特異化は起こるがグリア細胞の終分化に異常が起こる。我々は REPO の機能解析を行うことにより、グリア細胞の分化成熟機構の解明を目指した。

REPO の下流因子として、subperineural glia などで発現するエンハンサー・トラップ系統 (M84 系統) と longitudinal glia で発現している *loco* 遺伝子を同定した。*repo* 突然変異系統ではこれらの遺伝子の発現がともに減少するが、REPO の強制発現による下流遺伝子の活性化は GCM の効果に比べてきわめて弱い。M84 と *loco* 遺伝子の発現制御機構を解析した結果、REPO は、M84 では Tramtrackp69 と、*loco* 遺伝子では PointedP1 とそれぞれ協調して働くことがわかった。このような転写因子の組み合わせが、グリアの多様性生成に寄与している可能性が高い。一方、GCM はグリア分化を促進するだけでなく、ニューロンの分化を抑制する。GCM 強制発現によるニューロン分化抑制にも REPO の働きは必須であり、REPO と Tramtrackp69 の共発現は神経細胞分化マーカーの発現を著しく減少させた。従って、REPO は他の転写因子と協調してグリア細胞への分化促進

と神経細胞への分化抑制を行うグリア細胞分化の主要な転写制御因子であることが明らかになった。

(6) ショウジョウバエ ras/MAPK 伝達経路の抑制因子による神経誘導の制御：岩波将輝，岡部正隆，広海 健

ショウジョウバエ複眼の光受容ニューロンの分化・誘導は EGF-ras/MAPK 伝達経路によって制御されている。最近この経路に多くの抑制因子が発見され、その多階層の抑制機構が明らかとなってきた。このうち、細胞内で ras シグナルを抑制する Sprouty は、その機能喪失変異体で過剰な光受容ニューロンが形成されることから、「本来ニューロンに分化しない細胞の分化を細胞自立的に抑制する」ことによって働くと考えられてきた。ところが、Sprouty は本来ニューロンに分化する細胞でも発現し、しかもその発現レベルは 8 個の光受容ニューロン (R1-R8) の中の特定の細胞 (R2/R5/R7) で特に高い。この細胞種特異的発現には核内リセプター Seven-up が関与している。Seven-up は転写抑制活性を持ち、R3/R4/R1/R6 で特異的に発現しているため、Seven-up を発現しない細胞 (R2/R5/R7) でのみ Sprouty が高レベルで発現できると考えられる。R2/R5/R7 における Sprouty による ras シグナル抑制の意義を解析するため、ras シグナルによって転写が活性化される *argos* 遺伝子の発現を調べた。*argos* はニューロン分化に伴って発現するが、R2/R5 での発現レベルは他のニューロンより低い。*sprouty* 変異では R2/R5 においても *argos* の強い発現が持続することがわかった。*argos* は EGF アンタゴニストとして働く分泌蛋白質をコードするので、Sprouty による *argos* 遺伝子の転写抑制は、細胞非自立的因子を介して他の細胞 (R3/R4/R1/R6) の分化・誘導に寄与していると考えられる。このような ras シグナル抑制因子のネットワークは、分泌因子による誘導現象の恒常性に貢献している可能性が高い。

(7) ショウジョウバエ FGF シグナルの機能解析：岩波将輝，広海 健

受容体型チロシキナーゼは発生過程における運命決定・細胞増殖・細胞移動などの様々な過程で中心的な役割を果たしている。我々は受容体型チロシキナーゼのリガンドの 1 つである FGF (fibroblast growth factor) に着目し、ショウジョウバエを用いた遺伝学的解析を行っている。FGF は脊椎動物では 18 種以上存在するが、最近ゲノムプロジェクトの終了したショウジョウバエでは、*branchless* 遺伝子によってコードされるもの 1 つしか見つかっていない。また、Branchless の機能も、気管誘導と気管支伸展制御以外には知られていない。そこで、まず既存の *branchless* 遺伝子変異体を用いて EMS による変異体スクリーニングを行うことで、新たに 1 系統の *branchless* 変異体を得た。これらの系統を用いた機能解析から、*branchless* 遺伝子は複眼における神経細胞 (光受容ニューロン) の正常な発生に必要であり、特に、神経細胞の生存維持において細胞自立的に必要とされることを示唆する結果が得られた。興味深いことに、*branchless* 変異系統の複眼神経細胞における症状は、ショウジョウバエ FGF 受容体として知られる Heartless, Breathless の機能とは異なる新たな側面をもつ。また、*branchless*

遺伝子は成虫原基の発生過程を通して発現していることから、成虫原基発生における機能解析および分子機構についても解析を進めている。

2. ショウジョウバエグループ2

本年度ショウジョウバエグループ2は、神経細胞とグリアの分化機構、受容体の新しい機能に基づくパターンニング機構、および神経系と血球系で保存された分化決定機構の研究を行った。

本年度の教官メンバーは、所長；堀田凱樹，助手；細谷俊彦の2名である。この他に科学技術振興事業団戦略的基礎研究ポスドク；梅園良彦，滝沢一永，笹村剛司，科学技術振興事業団さきがけ21 研究員；平本正輝が研究を行った。さらに技術科職員；境雅子，技術補佐員；浅賀千枝子，青野真由美が研究を補助した。

本年度の研究は国立遺伝学研究所校費，科学技術振興事業団戦略的基礎研究「脳を知る」，同さきがけ21「認識と形成」，科学技術研究費補助金特定領域研究(A)，同奨励(A)の支援を受けた。

(1) 神経細胞とグリアの分化機構：梅園良彦，滝沢一永，笹村剛司，堀田凱樹

ショウジョウバエ神経系では少数個の神経幹細胞が神経細胞とグリアを遺伝的に定まったパターンで生み出す。神経細胞とグリアの間の分岐は、GCM モチーフ転写調節因子である Glial Cells Missing (GCM) タンパクがグリア決定因子として働くことにより決定することが分かっている。非対称分裂における神経細胞とグリアの分化決定機構および神経細胞・グリアそれぞれの分化に関与する分子の機能解析を行った。

末梢神経系の dorsal bipolar dendritic の細胞系譜では1個の前駆細胞が分裂して1個のグリアと1個のニューロンを生じることが知られている。この系譜における細胞運命の決定は、転写因子である gcm 遺伝子に依存しており、gcm 遺伝子を発現した細胞はグリアとなり、gcm を発現しなかった細胞はニューロンとなる。我々は、ニューロン特異的に発現している POU 型転写因子である pdm-1 および pdm-2 遺伝子の両方を欠失する系統において、予定神経細胞が gcm 遺伝子を異所的に発現することによって、グリアに運命転換してしまうことを新たに見出した。さらに gcm 遺伝子の発現過程にともなう pdm-1 遺伝子の発現を詳細に調べた結果、興味深いことに gcm 予定発現娘細胞においてのみ一過的な pdm-1 遺伝子の発現消失が観察された。これらの結果は、pdm 遺伝子は gcm 遺伝子の発現に対して抑制的に作用しており、その発現を厳密に調節することによってグリア・ニューロンという非対称性を作り出すことに寄与していると予想された(梅園・堀田)。

Longitudinal Glial Cells とよばれるグリア細胞の細胞系譜では、片体節で1つの前駆細胞に由来し、分裂後正中線側に移動し、6-8 個の細胞が、軸索束の上に規則正しく配列して、最終的に軸索束を覆う性質から、細胞分裂や移動、軸索とのクロストークおよび軸索の ensheathment を解析する有用な系である。この細胞系譜で発現する遺

伝子はいくつか知られているが、それぞれの遺伝子が細胞の形態形成においてどのような機能をになっているか、不明である。この研究では、*gcm¹* という系統を用いて、抗 β -gal 抗体を用いてグリア細胞の形態を可視化し、*pros*, *pnt*, *repo*, の各突然変異体においてグリア細胞の形態を観察して、それぞれの遺伝子産物の役割を推定した。その結果、*repo* 突然変異体ではグリア細胞の移動は正常であったが軸索束に会合が異常であること、*pnt* 突然変異体では、軸索束との会合の後の軸索束が異常であること、*pros* 突然変異体では、個体によって、*repo* あるいは *pnt* 突然変異体に似た表現型を示すことが明らかとなった(滝沢, 堀田)。

一方我々はまた、神経細胞の分化の機構を解析するために、神経細胞の分化にかかわる新規遺伝子 *solo* の機能解析を進めた。まず *solo* の Null 突然変異体の単離を行ない、5 系統の対立遺伝子を得た。突然変異は、2 系統が zinc finger 領域に、3 系統が BTB/POZ 領域に入っており、*solo* の機能には DNA の結合およびタンパク質との相互作用が必須であることが明らかになった。*solo* の表現型を解析したところ、胚の腹部神経節の FasII 陽性の軸索束が、正常に形成されず、切断されていたり、正常とは異なる領域を走行したりしていることが明らかになった。また、別の一部の軸索束、Connectin 陽性の軸索束でも同様の異常が観察された。以上のことから、*solo* は、軸索の正確な走行に関与していると考えられる(笹村・堀田)。

(2) 受容体によるリガンド提示に基づくパターンニング機構：平本正輝, 広海 健¹, Edward Giniger², 堀田凱樹¹ (¹国立遺伝学研究所, ²Fred Hutchinson Cancer Research Center)

神経軸索や細胞を配置する際に、分泌性シグナル分子とその受容体は位置情報の形成と認識に寄与している。しかしこれらの分子がいかにして位置情報を形成するか、また細胞は何を読み取って自分の居場所を認識するかについては未だ謎である。軸索や細胞の運動を制御する分泌タンパク質として、Netrin, Slit, Semaphorin などが知られている。これらは分泌タンパク質であり、人工的に濃度勾配を形成させると軸索に対して化学走性の作用を持つ。このことから、これらのタンパク質は分泌源に近いところほど濃度が高い分布をつくり、受容体はこれらと結合して認識すると考えられている。これに対して我々は、Netrin と DCC においても受容体が発見してリガンド分布を「再配置」し、他の受容体への位置情報を作るメカニズムを発見した(Nature, 2000)。また Slit と Robo は正中線から側方への軸において精密な位置情報を作るが、このパターンニングに関してもリガンドの濃度勾配ではなく受容体の提示機能で説明しうる事を見出し現在解析を行っている。

(3) 神経系と血球系で保存された分化決定機構：細谷俊彦, 堀田凱樹

神経系と血球系の多様な細胞を形成するための分化決定機構は多くの重要な点が明らかでない。ショウジョウバエの神経系と血球系はそれぞれ 2 種類の細胞からなる。すなわち神経系ではニューロンとグリア、血球系ではクリスタル細胞とマクロファージで

ある。我々は、この二つの系で細胞種間の分化決定機構の主要部分が共通であることを見出した。いずれの系においても、個々の細胞は2種類の細胞のどちらにもなりうる能力を持って産み出される。分化を制御する様々なシグナルはGcm-motif 転写因子のOn/Offに集約し、このOn/Offによって分化決定がなされるというモデルではほぼ現象を説明できることが分かった。従って、Gcm-motif 転写因子はこれら二つの系に共通な細胞種決定スイッチとして機能していると言うことができる。Gcm-motif 転写因子によって制御される下流因子には二つの系で共通なものが存在するため、これら二つの系の細胞種決定では共通な分子ネットワークが機能していると思われる。Gcm-motif 転写因子の血球系での役割は哺乳類でもある程度保存していることを示すデータが得られてきており、哺乳類においてもさまざまな幹細胞システムに共通な細胞種決定機構が存在する可能性がある。

3. ヒドラグループ

(1) ヒドラのペプチド性シグナル分子の組織的同定：藤澤敏孝，服田昌之，清水 裕，藤勝植，服藤尚恵，小泉 修¹，小早川義尚²，森下文浩³，松島 治³（¹福岡女子大学人間環境学部，²九州大学理学部，³広島大学理学部）

我々はヒドラからペプチド性のシグナル分子を組織的に分離し、その構造と機能を解析するプロジェクトを推進している。本年度は新たに約100のペプチドを単離し、約50種についてアミノ酸配列を決定した。これまで同定したペプチドのうち次の2ペプチドについて詳細な解析をおこなった。

(2) ヒドラの足部形成を促進する形態形成分子，Hym-323とHym-346（服藤尚恵，高橋俊雄，清水 裕，服田昌之，藤澤敏孝）

ヒドラの形態形成は拡散性の小分子，モルフォジェンが一義的に制御すると考えられている。我々はヒドラ足部形成のモルフォジェン候補分子Hym-323とHym-346を既に見だし解析を進めている。両者とも、外からヒドラに加えると、ヒドラ体軸の位置情報を変化させ、足部域を広げる働きを持つ。このうち、Hym-323について、正常ヒドラ、再生ヒドラにおけるHym-323遺伝子およびペプチドの振る舞いをin situハイブリダイゼーションあるいは抗Hym-323抗体を用いた免疫組織染色法で解析した。まず、Hym-323 mRNAは触手と足部を除く全域の両胚葉上皮、ペプチドは足部を除くほぼ全域の両胚葉上皮で検出された。従って、Hym-323は上皮由来のペプチド（上皮ペプチド）である。また、再生過程の発現パターンからHym-323は足部形成時に必要で、正常な足部ができあがると必要とされなくなると考えられる。これは、再生途中から発現が始まり、足部形成が完了しても発現しているHym-346遺伝子とは異なる。

(3) 多細胞動物にあまねく存在する *vasa* 関連遺伝子とそのヒドラでの発現解析：望月一史，藤澤千笑，藤澤敏孝

vasa 関連遺伝子はDEAD boxタンパク族に属し、高等動物では生殖細胞形成に関わる。

我々は、下等無脊椎動物のカイメン、ヒドラ、プラナリアから *vasa* 関連遺伝子および同じく DEAD box タンパク族に属す *PL10* 関連遺伝子を単離し塩基配列を決定した。系統進化的解析から *vasa* 関連遺伝子は菌類・植物が分岐した後、カイメンが生じる以前に *PL10* 関連遺伝子から遺伝子重複更により生じたと考えられた。一方、ヒドラにおけるこれらの遺伝子の発現解析を行った。ヒドラ成体中には、多能性間幹細胞が存在し、数種の体細胞と生殖幹細胞を産生する。生殖幹細胞はさらに雄では精子へ雌では卵へと分化する。ヒドラには2種の *vasa* 関連遺伝子が存在しそれぞれ *Cnvas1* と *Cnvas2* と呼ぶ。両者とも生殖細胞で強く発現し、多能性幹細胞と上皮細胞で発現していた。一方、*PL10* 関連遺伝子は上記細胞以外にも刺細胞系列で発現しておりより幅広く働く遺伝子である。本研究の結果から、*vasa* 関連遺伝子は多細胞動物にあまねく存在し、その生殖細胞での発現は腔腸動物出現以前に獲得されたと考えられた。

(4) 造礁サンゴの進化：服田昌之

太平洋のサンゴ礁に優占するミドリイシ属サンゴが、一斉産卵によって交雑と遺伝子移入を繰り返していることを、体系的な交配実験と分子系統解析によって示した。これにより、種の分岐と融合を繰り返す網目状進化の仮説を支持し、また、既存の種概念を覆す「種複合体」の存在を示唆した。また、ミトコンドリア遺伝子を指標にした分子系統解析から、ミドリイシ科各属の遺伝的系統関係を明らかにすると共に、地史的気候変動に伴って絶滅と放散を繰り返した歴史を海洋生物では初めて遺伝的な側面から推定した。

(5) ヒドラのぜん動運動と散在神経系の役割：清水 裕

ヒドラの体幹はそのまま消化管でもある。その構造は子細に見るとほ乳類の小腸との類似点が認められる。それは、外側に縦走筋繊維が走り、内側に輪走筋繊維が走り、その間に網目状の神経が走るという類似性である。しかし、ほ乳類の小腸がぜん動をはじめとする多彩な動的な運動をするのに対し、ヒドラの消化過程は静的なもので、単に細胞内消化の前段階と考えられてきた。本研究では給餌後の体幹の動きを8時間以上にわたって観察した。その結果、体幹は非常にゆっくりではあるがぜん動運動を行うこと、さらに脱糞時には、ほ乳類の脱糞の直前に大腸に見られる大ぜん動を行うことを明らかにした。ぜん動は頭部から足部方向に収縮波の進行という形で起こり、内容物を移動させた。しかし、体腔が閉じているため内容物はまた頭部に逆戻りした。一方、大ぜん動は足部から頭部方向に起こった。通常は、体幹部組織は縦走筋の収縮と輪走筋の収縮が交互に起こるが、大ぜん動では両方の筋収縮が同時に起こった。このため結果的に体腔の内容積は外見上からも明白に減少し、内容物は口から放出された。この2運動は、個体から体幹部だけを取り除いた純粋な体幹部組織だけでも認められた。この事実は、体幹部組織にはこれらの運動(ぜん動反射)を起こす内在的な能力があることを示している。神経細胞を完全に除去した無神経ヒドラでも非常に弱いながらぜん動の活性が認められた。従来、ぜん動は完全に神経支配の現象だと考えられており、本実験結果は新し

い知見である。一方で、大ぜん動は無神経ヒドラでは全く認められなかった。これらの事実は、体幹部の神経系がぜん動の少なくとも一部、そして大ぜん動の全部を制御することを示している。ヒドラ体幹部の神経網はこれまで、進化上最も原始的で機能的に未発達な神経系の名残と考えられてきた。本実験結果はこの神経網が高等動物の腸管に分布しぜん動を制御する腸管神経系を形作る神経集網(神経叢)と同様の機能を持つ可能性を強く示唆しており、従来の概念を根本からくつがえすものである。

研究業績

(1) 原著論文

1. Hiramoto, M., Hiromi, Y., Giniger, E. and Hotta, Y.: A *Drosophila* Netrin receptor, Frazzled, guides axons by controlling Netrin distribution. *Nature* **406**, 886-889, 2000.
2. 平本正輝: ネットリン受容体フラズルドはネットリンの局在制御を介し軸索ガイダンスを行う, 博士論文(東京大学大学院理学系研究科)
3. Akiyama-Oda, Y., Hotta, Y., Tsukita, S. and Oda, H.: Distinct mechanisms of triggering glial differentiation in *Drosophila* thoracic and abdominal neuroblast 6-4, *Dev. Biol.* **222**, 429-439, 2000.
4. Akiyama-Oda, Y., Hotta, Y., Tsukita, S. and Oda, H.: Mechanism glia-neuron cell fate switch in the *Drosophila* thoracic and neuroblast 6-4, *Development* **127**, 3513-3522, 2000.
5. Takizawa, K. and Hotta, Y.: Pathfinding analysis in a glia-less mutant in *Drosophila*, *Dev. Genes Evol.* **211**, 30-36, 2001.
6. Takasu-Ishikawa, E., Yoshihara, M., Ueda, A., Reuben, M. R., Hotta, Y. and Kidokoro, Y.: Screening for synaptic defects revealed a locus involved in pre- and postsynaptic functions in *Drosophila* embryos, *J. of Neurobiol.*, in press, 2001.
7. Ohashi, K., Hosoya, T., Takahashi, K., Hing, H. and Mizuno, K.: A *Drosophila* homolog of LIM-kinase phosphorylates cofilin and induces actin cytoskeletal reorganization, *Biochem. and Biophys. Res Comm.* **276**, 1178-1185, 2000.
8. Mochizuki, K., Nishimiya-Fujisawa, C. and Fujisawa, T.: Universal occurrence of the *vasa*-related genes among metazoans and their germline expression in *Hydra*. *Development, Genes and Evolution* in press.
9. Bosch, T.C.G. and Fujisawa, T.: Polyps, peptides and patterning. *Bioessays* in press.
10. Takahashi, T., Kobayakawa, Y., Muneoka, Y., Fujisawa, Y., Mohri, S., Hatta, M., Shimizu, H., Fujisawa, T. Sugiyama, T., Takahara, M. and Koizumi, O.: Identification of a new member of the LWamide peptide family: Physiological activity and cellular localization in Cnidarian polyps. *Biological Bulletin* in press.

11. Harafuji, N., Takahashi, T., Hatta, M., Tezuka, H., Morishita, F., Matsushima, O. and Fujisawa, T.: Enhancement of foot formation in *Hydra* by a novel epithelipeptide, Hym-323. *Development* **128**, 437-446, 2001.
12. Mochizuki, K., Sano, H., Kobayashi, S., Nishimiya-Fujisawa, C. and Fujisawa, T.: Expression and evolutionary conservation of *nanos*-related genes in *Hydra*. *Development, Genes and Evolution* **210**, 591-602, 2000.
13. Cardenas, M., Fabila, Y.V., Yum, S., Cerbon, J., Boehmer, F., Wetzker, R., Fujisawa, T., Bosch T.C.G. and Salgado, L. M.: Selective protein kinase inhibitors block head specific differentiation in hydra. *Cell. Signal.* **12**(9-10), 649-658, 2000.
14. Takahashi, T., Koizumi, O., Ariura, Y., Romanovitch, A., Bosch, T.C.G., Kobayakawa, Y., Mohri, S. Bode, H., Yum, S., Hatta, M. and Fujisawa, T.: A novel neuropeptide, Hym-355, positively regulates neuron differentiation in *Hydra*. *Development* **127**, 997-1005, 2000.

(2) その他

1. 細谷俊彦, 藤岡美輝, Janes, J.B., 広海 健: ショウジョウバエの Runt, Lozenge による分化制御. *蛋白質核酸酵素* **45**, 7-12, 2000.

(3) 発表講演

1. Niwa, N., Okabe, M. and Hiromi, Y.: Relationships between sensory organ formation and positional information in *Drosophila* imaginal discs. International Symposium "Evolution 2000", Biodiversity in Network of Bioinformation from standpoint of Devo-Evo View, Tokyo, 3月.
2. Yamada, T., Okabe, M. and Hiromi, Y.: Regulation of neural inducing ability by a novel *Drosophila* cofactor EDL. 41th Annual *Drosophila* Research Conference. Pittsburgh, 3月.
3. Niwa, N., Okabe, M. and Hiromi, Y.: Relationships between organogenesis and positional information in *Drosophila* imaginal discs. Swiss-Japanese Scientific Seminar., Progress in developmental biology; Development of the nervous system and pattern formation, Ascona, 3月.
4. Hiromi, Y.: Regulation of homeogenetic induction by Sprouty and EDL. Swiss-Japanese Scientific Seminar., Progress in developmental biology; Development of the nervous system and pattern formation, Ascona, 3月.
5. Okabe, M.: The relationship between sensory organ identity and positional information. EMBO Workshop "Master Control Genes in Development and Evolution", Ascona, 3月.
6. 丹羽 尚, 岡部正隆, 広海 健: ショウジョウバエ感覚器官形成の分子基盤におけ

- る部位・時期特異性。第33回日本発生物学会。高知，5月。
7. 岡部正隆：ショウジョウバエ外感覚器の発生過程における非対称性分裂と局所的翻訳調節機構。第33回日本発生物学会。高知，5月。
 8. 岡部正隆，広海 健：セグメント内ボディープランの遺伝解析。第33回日本発生物学会。高知，5月。
 9. 湯浅喜博，岡部正隆，吉川真悟，広海 健，岡野栄之：ショウジョウバエにおけるグリア細胞の分化機構。第33回日本発生物学会。高知，5月。
 10. 岩波将輝，広海 健：ショウジョウバエFGFの複眼神経形成における機能解析。第33回日本発生物学会。高知，5月。
 11. 丹羽 尚，岡部正隆，広海 健：ショウジョウバエ感覚器官形成の分子的基盤。第36回日本節足動物発生物学会。青梅，6月。
 12. Hiromi, Y.: Mechanism of action of a nuclear receptor, Seven-up. The 12th International Workshop on the Molecular and Developmental Biology of *Drosophila*. Kolymbari, 6月。
 13. Hosoya, T., Hiromi, Y.: GCM-motif transcription factors and Runt-domain transcription factors in cell-fate determination in the *Drosophila* blood system. International Workshop on the Runt-domain Transcription Factors. Kyoto, 7月。
 14. 丹羽 尚，岡部正隆，広海 健：感覚器官形成の共通分子基盤。第60回日本昆虫学会。名古屋，9月。
 15. Hiromi, Y.: Neuronal specification in *Drosophila*: it's good to be inhibited. The 16th International Symposium in Conjunction with Award of the International Prize for Biology. Tokyo, 11月。
 16. 丹羽 尚，岡部正隆，広海 健：ショウジョウバエ感覚器官形成の共通分子基盤。第23回日本分子生物学会。神戸，12月。
 17. 金井 誠，岡部正隆，広海 健：ショウジョウバエ seven-up 遺伝子の中樞神経系形成における機能解析。第23回日本分子生物学会。神戸，12月。
 18. 松野元美，小瀬博之，West, S., 広海 健：核内レセプター Seven-up による転写制御機構の解析。第23回日本分子生物学会。神戸，12月。
 19. 小瀬博之，West, S., 鈴木恵美子，松本耕三，広海 健：ショウジョウバエ新規ポリコーム群遺伝子用蛋白質の機能解析。第23回日本分子生物学会。神戸，12月。
 20. 岩波将輝，広海 健：ショウジョウバエFGFの複眼神経形成における機能解析。第23回日本分子生物学会。神戸，12月。
 21. 来栖光彦，岡部正隆，古久保-徳永克男：核内レセプター型転写因子 *tailless* のショウジョウバエキノコ体形成における機能解析。第23回日本分子生物学会。神戸，12月。
 22. 笹村剛司，滝沢一永，堀田凱樹：ショウジョウバエ神経系の形成にかかわる遺伝子

- solo*の同定と機能解析. 発生生物学会第33回大会(高知, 2000年5月25日~27日)
23. 平本正輝, 堀田凱樹:「ネトリン受容体フラズルドはネトリンの局在パターンへの制御を介し軸索ガイダンスを行う」日本発生生物学会第33回大会, 高知, 5月.
 24. 平本正輝, 広海 健, 堀田凱樹:受容体による位置情報の提示機構. 日本分子生物学会第23回大会, 神戸, 12月.
 25. 梅園良彦, 堀田凱樹:ショウジョウバエ末梢神経系におけるgcm遺伝子依存的なグリア・ニューロンを作り出す非対称性の分子機構, 日本発生生物学会第33回大会, 高知, 5月.
 26. 細谷俊彦:Runtドメイン転写因子とgcmモチーフ転写因子のショウジョウバエ血球分化における機能, 特定領域研究(A)公開班会議「造血システムにおける自己複製と分化機構の解析」, 東京, 11月.
 27. 細谷俊彦, 広海 健:GCM-motif transcription factors and Runt-domain transcription factors in cell-fate determination in the Drosophila blood system, International Workshop on the Runt-Domain Transcription Factors, 東京, 7月.
 28. 細谷俊彦:神経系と血球系におけるgcm型転写調節因子の機能, 日本発生生物学会第33回大会, 高知, 5月.
 29. Hotta, Y.:Monitoring Cell Fate Decision at a Stem Cell Division:Glia vs. Neuronal Pathway in Drosophila, The 8th International Conference "Peace through Mind/Brain Science & Photonics in the Imaging of Gene Expression" (Feb. 2-4, 2000, Hamamatsu)
 30. 堀田凱樹:幹細胞分裂における細胞運命決定と遺伝子, JST異分野研究者交流フォーラム「幹細胞の生物学と医学」(2000年2月11-14日, 大磯)
 31. Hotta, Y.:Cell fate decision between glia and neuron in Drosophila, The 43rd NIBB International COE Symposium "Mechanisms of Neural Network Formation"(March 15-17, 2000, Okazaki)
 32. 堀田凱樹:細胞運命決定の瞬間を見る-ショウジョウバエのニューロンとグリアの分化, 東京薬科大学生命科学部, 同生命科学研究所設置完成記念国際シンポジウム招待講演(2000年4月12日, 東京)
 33. 堀田凱樹:モデル生物を用いた複雑な生命現象の遺伝解析, フルブライト委員会総会講演(2000年4月21日, 東京)
 34. 堀田凱樹:ショウジョウバエ神経発生における不均等分裂とニューロン・グリア分化, 熊本大学発生医学研究センター設立記念講演会(2000年5月19日, 熊本)
 35. 堀田凱樹:遺伝子はいかにして身体をつくるのか?-脳と神経回路を中心に-核融合科学研究会特別講演会(2000年6月8日, 名古屋)
 36. 堀田凱樹:ショウジョウバエ研究の意義-Comparative Genomicsの幕開け, CBI学会・CBIミレニアムシンポジウム招待講演(2000年7月26-28日, 東京)
 37. 堀田凱樹:ショウジョウバエ神経幹細胞の非対称分裂とグリア・ニューロン分化, 第117回日本医学会シンポジウム「幹細胞と細胞療法」(2000年8月4-6日, 箱根)

38. 堀田凱樹：遺伝子を使って生命過程をみる，医療フォーラム講演会(2000年9月18日，東京)
39. 堀田凱樹：細胞の個性と遺伝子，学士会10月夕食会(2000年10月10日，東京)
40. 堀田凱樹：細胞運命の決定と遺伝子，日本人類遺伝学会シンポジウムII「生命高次複雑系の遺伝学」講演(2000年10月25-27日，福岡)
41. 高橋俊雄，服田昌之，廉 勝植，藤澤敏孝：ヒドラ上皮ペプチド，Hym-301は触手形成をコントロールする．第33回日本発生生物学学会，高知，5月．
42. 藤澤敏孝：ヒドラの発生・再生を司るペプチド性シグナル分子．第33回日本発生生物学学会シンポジウム，高知，5月．
43. 廉 勝植，藤澤敏孝：ヒドラ神経ペプチド，Hym-176発現ニューロンの足部特異的分化の制御．第33回日本発生生物学学会，高知，5月．
44. 望月一史，佐野浩子，小林 悟，藤澤千笑，藤澤敏孝：ヒドラの *nanos* 類縁遺伝子の発現と進化的な保存性．第33回日本発生生物学学会シンポジウム，高知，5月．
45. 藤澤敏孝，服田昌之，清水 裕，廉 勝植，服藤尚恵，高橋俊雄，森下文浩，松島治，小早川義尚，小泉 修：「ヒドラペプチドプロジェクト」現状と展望．日本動物学会第71回大会，東京，9月．
46. 服田昌之，木村純子，高橋俊雄，藤澤敏孝：ヒドラThymosin-beta/Hym342 遺伝子の発現解析．日本動物学会第71回大会，東京，9月．
47. 望月一史，藤澤千笑，藤澤敏孝：*vasa (vas)* 類縁遺伝子は多細胞動物に普遍的に存在する．日本動物学会第71回大会，東京，9月．
48. 藤澤敏孝：ヒドラの形態形成を制御する上皮ペプチド．大阪大学タンパク研究所シンポジウム，大阪，3月．
49. 清水 裕：Evolutionary Origin of Central Nervous System．日本神経生物学学会，横浜，9月．
50. 清水 裕：Evolutionary Origin of Central Nervous System．International Conference on Dynamical Aspects of Complex Systems from Cells to Brain．仙台，11月．

C-b. 形質遺伝研究部門

当研究部門では，主としてショウジョウバエを用いて発生における遺伝子発現制御に関する研究を行っている．3月に助教授・村上昭雄が定年退官し，7月に助手・上田 均が助教授に昇任した．本年度の研究には，教授・広瀬 進，助教授・上田 均，助手・山田正明，湊 清，COE外国人研究員・劉 慶信，COE非常勤研究員・中島尚美，霜島 司，博士研究員・藤田雅文，総合研究大学院大学生命科学研究科遺伝学専攻大学院生・中山貴博，阿川泰夫，萱嶋泰成，岩手大学大学院生・川崎陽久，国立遺伝学研究所構造遺伝学研究センター教授・桂 勲，石原 健，同生物遺伝資源情報総合センター教授・小原雄治，

カナダ Simon Fraser 大学大学院生・Ho-Chun Wei, 奈良先端科学技術大学院大学助教授(国立遺伝学研究所生理遺伝研究部門客員助教授)・白川昌宏, 東京工業大学フロンティア創造共同研究センター教授・半田 宏, 広島大学理学部助教授・赤坂甲治, New York State Dept. of Health・Guan Zhu, Michael J. LaGier, Janet S. Keithly, Czech Academy of Science・Masako Asahina, Marek Jindraが参加した。また, 技術補佐員として高田佑子, 研究支援推進員として植松こづえ, 研究補佐員として渡辺たつのが研究を支援した。

広瀬は「真核生物におけるクロマチンレベルでの遺伝子発現制御」(代表者: 東京工業大学フロンティア創造共同研究センター・半田 宏), 「GSBP(G-stretch 結合因子)の機能解析」(代表者: 広島大学理学部・赤坂甲治), 「核内酵素複合体によるクロマチンを介した転写の活性化機構の解明」(代表者: 筑波大学応用生物化学系講師・中島利博), 「扁平上皮癌組織特異的転写因子の同定」(代表者: 愛媛大学医学部講師・濱田雄行)を組織し, 共同研究を行った。

本年度の研究は, 文部省科学研究費基盤研究(B)「GAGA 因子に依存したクロマチンリモデリングのメカニズム」(広瀬), 同特別研究員奨励費「ショウジョウバエの転写コアクチベーター MBF2」(広瀬), 同特定領域研究“転写調節機構から挑む高次生命現象の解析”(1)「転写因子間の相互作用と機能発現の分子機構」(上田), 同特定領域研究“多次元情報伝達とその制御における蛋白質間相互作用の役割”(2)「転写コアクチベーター MBF1 による転写活性化」(上田)の支援を受けた。

広瀬と劉は第6回 Asian Conference on Transcription(10月, 中国, 北京), 上田と劉は第41回 Drosophila Research Conference(3月, アメリカ合衆国, ペンシルバニア)に参加し, 発表した。また, 広瀬は本年より山東農業大学(中国, 泰安)の客員教授となり, 10月に同大学を訪問して招待講演を行った。

(1)DNA 超らせん化因子に関する研究: Ho-Chun Wei¹, 広瀬 進¹(カナダ Simon Fraser 大学)

超らせん化因子(SCF)はDNAトポイソメラーゼIIと協調してDNAに負の超らせんを導入するタンパク質である。分子内にEFハンドドメインをもつCa²⁺結合タンパク質で, C末端にはHDEFという配列が存在する。EFハンドドメインとHDEFはそれぞれ, Ca²⁺結合とトポイソメラーゼIIとの結合を介して超らせん導入活性に必須の役割を果す。

ショウジョウバエのSCFは唾腺の多糸染色体上でパフに局在するため, 活性クロマチンの形成に関わると考えられる。SCFの個体レベルでの機能を明らかにする目的で, ショウジョウバエをEMSで変異誘起後, *scf*遺伝子座が存在する第3染色体61F4-8領域の劣性致死変異株を多数分離し, それらの中からSCFのエクトピックな発現でレスキューされる変異株をスクリーニングしている。

(2)クロマチン構造を介した遺伝子発現調節: 霜島 司, 中山貴博, 上田 均, 半田 宏¹, 赤坂甲治², 広瀬 進¹(東京工業大学フロンティア創造共同研究センター, ²広島大学理学部)

ショウジョウバエ *fushi tarazu* 遺伝子のプロモーター領域を含むプラスミド DNA 上にクロマチンを再構成して転写不活性な状態にした後、GAGA 因子と初期胚抽出液を作用させると、GAGA 因子結合配列近傍で特異的にクロマチンのリモデリングが起き、転写が活性化される。部位特異的なクロマチンリモデリングのメカニズムを解明するため、初期胚の核の中で GAGA 因子と結合している 2 つのタンパク質 p93 と p130 を同定した。P93 と p130 の cDNA をクローニングし、大腸菌で発現して精製したタンパク質を用いて以下のことを明らかにした。1) p93 と p130 は酵母からヒトまで広く真核生物に保存されており、ヘテロダイマーとして存在する。2) GAGA 因子と直接結合するのは、p93-p130 複合体のうち p93 である。3) p93-p130 複合体はヌクレオソームに結合し、クロマチンリモデリング因子の活性を顕著に促進する(その他論文 1-3, 発表講演 3, 5-12, 16, 17)。

また、広島大学・赤坂助教授との共同研究により、ウニの G-stretch 結合タンパク質のオルソログがショウジョウバエに存在することが判明し、その機能解析を開始した。(3) 転写コアクチベーター MBF1 に関する研究: 劉 慶信, 中島尚美, 藤田雅文, 上田 均, 白川昌宏, Guan Zhu², Michael J. LaGier², Janet S. Keithly², Marek Jindra³, 広瀬進(¹ 奈良先端科学技術大学院大学, ² New York State Dept. of Health, ³ Czech Academy of Science)

in vitro 転写系を用いた解析から、ショウジョウバエの転写制御因子 FTZ-F1 やカイコの相当する因子 BmFTZ-F1 による転写活性化には 2 つのコアクチベーター MBF1 と MBF2 が必要なが知られている。MBF1 は転写制御因子と TBP の間をかけ橋するタンパク質で、酵母からヒトまで保存されている。出芽酵母の MBF1 は bZIP 型転写制御因子 GCN4 による *his3* 遺伝子の転写活性化を仲介するため、*mbf1* 破壊株は *his3* 遺伝子産物の阻害剤であるアミノドリアゾールに感受性となる。PCR で変異誘起した *tbp* プラスミドライブラリーを出芽酵母に導入し、元から存在していた野生型 *tbp* プラスミドを落としたときに、アミノドリアゾール感受性となるが、GAL4 や CUP1 による転写活性化は影響を受けない 3 種の *tbp* 変異株を分離した。GST pull down assay により、それらのうちひとつの変異型 TBP では野生型 TBP に比べて MBF1 の結合が弱いことが判明した(発表講演 15)。また、出芽酵母と分裂酵母の *mbf1* 破壊株に共通な性質として、シクロヘキシミド感受性であることが明らかとなった。現在、そのメカニズムを解明する端緒として、感受性を抑圧する多コピーサプレッサーを分離している(発表講演 19)。

ショウジョウバエ初期胚の核の中で、bZIP タンパク質 APT(Apontic)/TDF(Trachea defective)は MBF1 と相互作用している。*tdf* 変異株では胚の中樞神経系と気管の形成に異常がみられる。これらの表現型に関して *mbf1* と *tdf* 遺伝子の間に遺伝学的相互作用を見出した。これらの結果は、MBF1 が APT/TDF による転写活性化を仲介していることを示している(発表講演 1, 4, 14)。

カイコの発生を通してコアクチベーター MBF2 の mRNA とタンパク質の発現を解析し、MBF2 の発現が翻訳段階で制御されていること、さらに MBF1 と MBF2 のコアクチベーター

としての機能が核移行によって制御されていることを明らかにした(発表論文1)。

抵抗力の落ちた老人やエイズ患者への日和見感染で知られている病原性原虫 *Cryptosporidium parvum* は培養系が確立されていず、患者から採取するしか材料が得られないため、その研究はほとんど進んでいない。 *C. parvum* の MBF1 cDNA を出芽酵母の *mbf1* 破壊株で発現したところ、そのアミノトリアゾール感受性を抑圧することが明らかとなった。この系は *C. parvum* を駆除する薬剤の開発につながる事が期待される(発表論文4)。

(4) 線虫 FTZ-F1 の機能解析: Masako Asahina¹, Marek Jindra¹, 石原 健², 桂 勲², 小原雄治³, 広瀬 進¹(Czech Academy of Science, ²構造遺伝学研究中心, ³生物遺伝資源情報総合センター)

線虫 *Caenorhabditis elegans* にはショウジョウバエ FTZ-F1 のオルソログとして NHR-25 が存在する。トリメチルソラレンによる変異誘起後、PCR スクリーニングにより、*nhr-25* 遺伝子の大部分の coding region を欠いた変異株を分離した。発生に伴う *nhr-25* の発現パターン、変異株と RNAi を用いた表現型の解析から、線虫の FTZ-F1 (NHR-25) は胚発生、脱皮と生殖に必須であることを明らかにした。これら FTZ-F1 の機能のうち、脱皮が線虫と昆虫で保存されており、脱皮の monophyletic origin を支持している(発表論文2)。

(5) ショウジョウバエ FTZ-F1 遺伝子の時期特異的発現制御機構の解析: 阿川泰夫, 広瀬 進, 上田 均

FTZ-F1 は、エクジソンのパルスによって誘導され、後期胚、幼虫脱皮と蛹化の直前に一過的に発現することが重要な転写因子である。FTZ-F1 遺伝子の時期特異的な発現制御機構を明らかにするため、FTZ-F1 遺伝子の転写制御にかかわる制御領域の解析および制御領域に作用する転写因子の解析を進めている。本年度は、制御領域に結合することが判明していた転写因子 I-4 の解析を進めた。まず、結合様式を調べたところ、この因子は、二量体になることにより、より強固に DNA に結合すると考えられた。また、核抽出液から認識配列 DNA アフィニティーカラムを用いた方法である程度精製できることが判明し、今後精製するにあたり強力な手段になると考えられた。

(6) ショウジョウバエ FTZ-F1 遺伝子の唾腺のヒストリシス機構の解析: 山田正明, 広瀬 進, 上田 均

ftz-f1 変異株では、変態初期に唾腺のヒストリシス過程が途中で停止することから、FTZ-F1 は、唾腺のヒストリシスにかかわると考えられた。変態初期に FTZ-F1 によって制御されて発現する BR-C も唾腺のヒストリシスに関与することが知られており、唾腺のヒストリシス過程における遺伝子制御機構を解析した。FTZ-F1 変異株で BR-C を熱ショックプロモーター制御下で発現させたところ、唾腺のヒストリシスが観察され、唾腺のヒストリシス過程において FTZ-F1 の下流で BR-C が作用すると考えられた。また、BR-C の 4 つのアイソフォームのうち唾腺で特異的に発現する Z2 アイソフォームを発現

させた場合、効率よく唾腺のヒストリシスが観察され、唾腺でのBR-Cのアイソフォーム特異的な発現が重要であることを示した(発表論文3)。

(7)FTZ-F1の標的遺伝子*EDG84A*の発現制御機構の解析：萱嶋泰成，広瀬 進，上田 均
シヨウジヨウバエの*EDG84A*遺伝子は、クチクラタンパクをコードすると考えられ、前蛹期の中期から後期にかけて成虫原基由来の細胞で特異的に発現する。昨年までの解析により、この遺伝子の時期特異的な発現は約-100bp(転写開始点を+1として)に結合するFTZ-F1によって制御され、組織特異的な発現は少なくとも-175bpから-145bpの領域に作用する因子によって制御されることを示す結果が得られていた。本年は、組織特異的な発現にかかわる因子を明らかにすることを目的として、-175bpから-145bpの領域に6塩基づつ順に変異を導入したプロモーターの活性を調べ、組織特異的な発現にかかわる因子が作用する領域をさらに特定することを試みた。その結果、168bpから-145bp領域に活性化因子が作用すること、-162bpから-157bpと-150bpから-145bpの領域に抑制因子が作用すること、さらに、羽と足に関しては-175bpより上流域によっても活性化されることが示唆され、*EDG84A*遺伝子の組織特異的な発現制御は単純でないことが判明した(発表講演13)。

(8)FTZ-F1とFTZの相互作用機構：鈴木大河，梅園和彦，上田 均

初期胚において、体節形成にかかわるホメオドメインタンパクFushi tarazu(FTZ)は、核内レセプターFTZ-F1と相互作用して*engrailed*や*wingless*の発現制御を行なうことが明らかになっている。昨年度、このFTZ-F1とFTZの相互作用の様式は、哺乳動物で知られているリガンド結合型の核内レセプターがそのコアクチベーターであるp160ファミリー因子と結合する様式と類似していることを明らかにした。本年度さらにその結合様式を詳しく調べたところ、p160ファミリー因子は、リガンド結合型の核内レセプターと比較的特異性無しに結合するのに対して、FTZ-F1とFTZの相互作用は、特異的であることが判明した。この特異性を生み出す機構を解析したところ、LXXLLモチーフを含む25アミノ酸の領域だけで、ある程度特異的に結合することが判明した。また、FTZのN末端領域がさらに特異的かつ強固に相互作用するために決定的な役割をはたしていることが明らかとなった。この結果からFTZは、LXXLLモチーフ領域以外でも核内レセプターと相互作用することによって、FTZ-F1特異的に働くコアクチベーターであると考えられた。(発表講演2)

(9)FTZ蛋白質の細胞内極におけるFTZ-F1の影響：川崎陽久，広瀬 進，上田 均

初期胚におけるFTZ-F1の機能を調べるため、*ftz-fl*変異株の解析を行なった。その結果、野生型胚でFTZが核で見られるのに対し、*ftz-fl*変異株ではFTZは主に細胞質に存在した。この結果から、FTZ-F1は、*ftz*の転写制御、直接の相互作用による転写調節に加えて、FTZの核局在にも関与し*ftz*の機能発現にかかわると考えられた(発表講演18)。

(10)動物界における昆虫綱の繁栄理由：湊 清

前年度に引き続き昆虫綱が動物界の中で圧倒的な種類数を誇っている理由について考

察を加えた一つに、無脊椎動物の内で昆虫綱とその周辺群を含む節足動物門全体について比較検討を加えた。次に、昆虫綱繁栄の原因の内大きな理由を占める「完全変態機構」の進化について、完全変態類(内翅類)昆虫、特にその幼虫型の進化についての、Truman, J. W. & L. M. Riddiford ('99)の最近の論文にある「完全変態類昆虫の幼虫型が、不完全変態類昆虫の胚の早熟的な孵化に由来する「前若虫(pro-nymph)期」から生まれたとする」ユニークで優れた説について考察と検討を加えた。

また、その上に立って、それらの幼虫型が完全変態類昆虫の種類数の繁栄に寄与する理由について考察を加えた。特に、その中でも、完全変態類昆虫9目の内、1つの目だけで完全変態類昆虫の全種類数約74万種の半分近い35万種を占める、コウチュウ目のそれに注目し、その理由について前年度に引き続き調査と検討を加えた。

特に、非常に複雑で多様な生活型とそれに伴う幼虫型を示すハムシ科(35,000種)について、それぞれのタイプに属する種の量的な割合を詳しく調査した。その他に、コウチュウ目全般にわたって、比較的科に固有な生活型を示すその他の科のそれについても分析した結果、カミキリムシ科(35,000種)、ゾウムシ科(50,000種)、タマムシ科(15,000種)、その他の科を含め、約170,000種(コウチュウ目全体の約45%)が、円筒型で無脚の幼虫型を示すことが分かった。これは、幼虫の生活型としては、材木や果実・キノコ等の立体的な構造中への潜行に最も適した形であり、他の目の場合にはほとんど見られない生活型である。この他に、樹皮下への潜行に適した扁平な形をとったヒラタムシ上科に属する各科(55,000種)やハネカクシ科(30,000種)や、また、体が内側に曲ったジムシ型の体型をとり地中や軟らかい朽木中等で生活するコガネムシ上科に属する各科(28,000種)等を加えると、何らかの形で潜行型の生活型をとるものは、少なく見積もっても80%以上になるものと思われる。言いかえると、水中生活者を除くと、純然と葉上、または、樹木上の露出した部分で摂食活動を行う種は、ハムシ科の一部(20,000種)と、テントウムシ科のそれ(4,500種)ぐらいに過ぎないことが分かった。

それ故、コウチュウ目の種類数の繁栄は、その目の進化上の出現時期が比較的早いこともあって、その頃新たに出現してきた樹木や果実、樹皮下等々の立体的な構造の内部という「新しいNiche(生態的地位)」を、いち早く占有することが出来たのが大きな理由の一つらしいことが分かった。

研究業績

(1) 原著論文

1. Liu, Q.-X., Ueda, H. and Hirose, S.: MBF2 is a tissue- and stage-specific coactivator that is regulated at the step of nuclear transport in the silkworm *Bombyx mori*. *Dev. Biol.* **225**: 437-446, 2000.
2. Asahina, M., Ishihara, T., Jindra, M., Kohara, Y., Katsura, I. and Hirose, S.: The conserved nuclear receptor FTZ-F1 is required for embryogenesis, moulting

and reproduction in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Cells*. 5:711-723, 2000.

3. Yamada, M., Murata, T., Hirose, S., Lavorgna, G., Suzuki, E. and Ueda, H.: Temporally restricted expression of FTZ-F1 transcription factor-Significance for embryogenesis, molting and metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Development* 127:5083-5092, 2000.
4. Zhu, G., LaGier, M. J., Hirose, S. and Keithly, J.S.: *Cryptosporidium parvum* :Functional complementation of a parasite transcriptional coactivator CpMBF1 in yeast. *Exp. Parasitol.* 96:195-201, 2000.

(2) その他

1. 広瀬 進：クロマチンの修飾と動的変動．*実験医学* 18, 1050-1053, 2000.
2. 広瀬 進：クロマチンのリモデリングと転写制御 *遺伝子医学* 4, 291-295, 2000.
3. 広瀬 進：クロマチンと転写因子．*現代医療* 32, 365-370, 2000.
4. 上田 均：ショウジョウバエ核内レセプターの発生における役割と転写制御，*実験医学*，細胞膜・核内レセプターと脂溶性シグナル分子，18, 268-275, 2000.
5. 上田 均：ホルモン応答遺伝子の解析，*生化学実験法* 43, *遺伝子発現研究法*(江尻慎一郎・平 秀晴・堤 賢一・志村憲助編著)学会出版センター pp77-94, 2000.

(3) 発表講演

1. Liu, Q.-X., Jindra, M., Ueda, H. and Hirose, S.:Trachea defective is a new partner of MBF1. 41st Annual *Drosophila* Research Conference, Pittsburgh, Pennsylvania, March, 2000.
2. Ueda H., Suzuki, T., Kawasaki, H. and Umesono, K.:FTZ-F1 and FTZ interaction:its mode of interaction and function *in vivo*. 41st Annual *Drosophila* Research Conference, Pittsburgh, Pennsylvania, March, 2000.
3. Hirose, H., Shimojima, T., Okada, M., Nakayama, T. and Ueda, H.: Mechanism of GAGA factor-dependent chromatin remodeling. 6th Asian Conference on Transcription, Beijing, China, October, 2000.
4. Liu, Q. -X., Jindra, M., Ueda, H. and Hirose, S.:Drosophila coactivator MBF1 mediates Trachea defective-dependent activation, 6th Asian Conference on Transcription, Beijing, China, October, 2000.
5. 広瀬 進，霜島 司，岡田聖裕，中山貴博：GAGA 因子によるクロマチンリモデリングの制御．第17回染色体ワークショップ，神戸，1月．
6. 広瀬 進：クロマチンのリモデリングとエピジェネティクス．新潟大学遺伝子実験施設セミナー，新潟，2月．
7. 広瀬 進：クロマチン・リモデリングによる転写活性化，大阪大学蛋白質研究所セミナー「クロマチンの高次構造と遺伝情報発現」，大阪，3月．
8. 広瀬 進：クロマチンのリモデリングとエピジェネティクス．横浜市立大学木原

- 研究所セミナー「クロマチン構造と細胞機能」, 横浜, 3月.
9. 広瀬 進: クロマチンのリモデリングとエピジェネティクス. 第73回日本生化学会大会シンポジウム「クロマチンと転写制御」, 横浜, 10月.
 10. 広瀬 進: クロマチンの動的変動とエピジェネティクス. 第72回日本遺伝学会大会シンポジウム「核内染色体間相互作用の統合的理解」, 京都, 11月.
 11. 広瀬 進: クロマチンのリモデリングと転写. 京都大学ウイルス研究所セミナー, 京都, 12月.
 12. 広瀬 進: クロマチン構造変換と転写活性化. 第23回日本分子生物学会年会ワークショップ「染色体機能の変動とクロマチン構造変換」, 神戸, 12月.
 13. 萱島泰成, 広瀬 進, 上田 均: ショウジョウバエ転写制御因子FTZ-F1の標的遺伝子EDG84Aの組織特異的発現を決定する機構. 第23回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月.
 14. 劉 慶信, 上田 均, 広瀬 進: ショウジョウバエのコアクチベーターMBF1はTDF (Trachea defective)による転写活性化を仲介する. 第23回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月.
 15. 中島尚美, 上田 均, 広瀬 進: 出芽酵母コアクチベーターMBF1と相互作用するTBPの機能ドメイン. 第23回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月.
 16. 中山貴博, 霜島 司, 広瀬 進: ショウジョウバエGAGA因子とp93-p130複合体の相互作用. 第23回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月.
 17. 霜島 司, 中山貴博, 半田 宏, 広瀬 進: GAGA因子と相互作用p93-p130複合体の機能解析. 第23回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月.
 18. 川崎陽久, 上田 均, 広瀬 進: FTZ-F1はFushi tarazu蛋白質の核局在に必要である. 第23回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月.
 19. 藤田雅文, 中島尚美, 広瀬 進: 第33回酵母遺伝学フォーラム研究報告会, 東京, 8月.

C-c. 初期発生研究部門

初期発生研究部門では、小型熱帯魚類ゼブラフィッシュ(*Danio rerio*)及びメダカ(*Oryzias latipes*)を用いて脊椎動物初期発生過程における体軸形成および器官形成の機構を研究しています。特にこの実験系の特徴である胚操作技術(細胞移植やマイクロインジェクションによる遺伝子過剰発現)と遺伝学的手法(突然変異体など)を組み合わせた実験を行って、脊椎動物の普遍的な発生機構の解明を目指しています。

当研究部門は、6月に川上厚志が助手として着任し、坂口拓哉(総合大学院大学大学院生)、新屋みのり(名古屋大学大学院生)、澤田篤志(名古屋大学大学院生)、神藤智子(名古屋大学大学院生)、木村哲晃(派遣研究員)、成田貴則(派遣研究員)とともに研究をおこなっています。

本年度の研究は以下の支援を受けて実施されている。文部省科学研究費特定領域研究(C)統合ゲノム「脊椎動物モデルとしての小型魚類の発生の遺伝子システムの解明」、文部省科学研究費特定領域研究(B)「脳のパターン形成」(2)「中枢神経系の前後軸・背腹軸の成立機構」、文部省科学研究費特定領域研究(B)「脊椎動物の分節」(2)「体節形成プログラムの進化-魚類を用いた発生遺伝学的解析」、農林水産省委託研究「魚類中枢神経系の発達における繊維芽細胞増殖因子(FGF)の役割」、養殖研究所委託研究「魚類における中胚葉誘導と体節の形成・分化の分子機構の解明」、科学技術庁振興調整費「オーガニソースとしての中胚葉と器官形成クロックの研究」、東し科学振興会研究助成「ゼブラフィッシュを用いた中枢神経系の発生機構の研究」、日産学術助成「ゼブラフィッシュ胚を用いた脊椎動物中枢神経の発生機構の解明」。

(1) 中胚葉誘導に関与する新規遺伝子の単離：坂口拓哉，武田洋幸

脊椎動物の初期発生において，中胚葉誘導およびオーガナイザー誘導はその後の体軸形成の最も基礎となる重要な過程である。これまでに当研究室では，ゼブラフィッシュにおいては，中胚葉とオーガナイザーが卵黄細胞からのそれぞれ独立したシグナルによって誘導されることを明らかにしてきた。しかしその分子的機構については不明な点が多く，特に中胚葉誘導に関与する卵黄細胞側の機構については分かっていない。

そこで，我々は卵黄細胞に特異的に発現する遺伝子を網羅的に単離し，その機能解析を通して卵黄細胞の誘導能の分子機構を明らかにすることにした。そのためにまず，独自の *in situ* hybridization screening 法を開発し，効率よく卵黄細胞に発現する遺伝子を単離するために卵黄細胞サブトラクションライブラリを作成した。スクリーニングの結果，独立した10以上(>5%)の卵黄細胞で発現するクローンを単離する事に成功した。シーケンス解析の結果，それらのクローンには，特定の酵素，アミノ酸輸送タンパク質，細胞膜結合タンパク質，転写因子，RNA結合タンパク質などが含まれていた。

(2) Fgf シグナルの中枢神経系パターン形成における役割：新屋みのり，武田洋幸

本研究では，終脳の発生におけるFGFシグナルの役割を調べるために，ゼブラフィッシュ初期胚におけるRas/MAPKカスケードの活性化領域を活性化型MAPKに対する特異抗体で調べた。さらに，種々の方法でRas/MAPKカスケードを抑制して，終脳での影響を詳細に調べた。その結果以下の点が明らかとなった。

- 1) 抗体染色により，体節期の中枢神経系では終脳先端部位，中脳・後脳境界でRas/MAPKカスケードが活性化していることが判明した。
- 2) 阻害剤を用いた実験から，体節期の中枢神経系のRas/MAPKカスケードの活性化はFGFシグナルに依存していることが判明した。
- 3) Ras/MAPKカスケードが抑制された胚では，終脳の腹側の形成と中脳・後脳境界の形成が特異的に抑制されていた。Ras/MAPKカスケードが抑制された胚でも，早い時期で観察した胚では終脳全体のマーカーの発現は変わらず，初期の終脳領域の確立は，Ras/MAPKカスケードに依存しないことが判明した。
- 4) 終脳先端部位と中脳・後脳境界では，2種の *fgf8* と *fgf3* が発現していた。
- 5) アンチセンス技術を用いて *Fgf8* と *Fgf3* の発現

抑制を行った結果、終脳腹側の形成にはFgf3とFgf8とが協調的に働いていること、また、中脳・後脳境界ではFgf8が主に機能していることが判明した。

(3) 体節の形成と分子時計：澤田篤志，武田洋幸

脊椎動物の体節は体幹部の分節性を規定する組織であり、発生の初期に未分節中胚葉から一定間隔で頭側よりくびれきれることで形成される。周期的体節形成には*c-hairy1*や*lunatic fringe*が重要な機能を持つと考えられている。羊膜類の未分節中胚葉において、これらの遺伝子は、分節周期と同調して発現のON/OFFを繰り返し、その発現領域が波状に移動することが分かっている。従って、これらの遺伝子は未分節中胚葉の細胞が体節を形成するタイミングを決めるための分子時計の下流にあると考えられている。我々は、ゼブラフィッシュ胚において*hairy*関連遺伝子である*her1*の発現パターンを詳細に調べた。その結果、*her1*の発現はゼブラフィッシュの分節周期である30分に一回、尾芽付近の未分節中胚葉で出現し、*c-hairy1*と同様に尾芽領域から頭部側へ波状に移動することを見出した(Sawada *et al.*, 2000)。さらに最近、FGFシグナルを胚体内で制御する実験から、Fgfシグナルは未分節中胚葉内で体節の分節ポイントを決める重要な位置情報を提供していることが示された。

(4) ゼブラフィッシュミュータントを用いたミッドラインシグナルの発生遺伝学的解析：川上厚志，武田洋幸，William S. Talbot, Alexander F. Schier

脊椎動物のミッドライン(脊索，フロアプレート)からの誘導シグナルは、中枢神経系および体節のパターン形成に重要な役割を果たしている。そのシグナルのひとつは、分泌因子ソニックヘッジホッグであることが明らかにされてきた。しかし、シグナルがいかに伝達され、どのような調節を経てパターン形成に至るのかは、まだ明らかではない。ゼブラフィッシュで作製されてきたミュータントの一群には、ミッドラインでのシグナル伝達の異常によると思われるものが多数ある。

我々は、ミッドラインミュータントのひとつ、*chameleon(con)*について解析を進めてきた。このミュータントでは、ミッドラインは形態も、遺伝子発現も正常であったが、それらに隣接する神経管や体節の領域でのパターン形成、細胞分化に欠損があることが明らかになった。ソニックヘッジホッグの強制発現によって*con*ミュータントはレスキューされたことから、ヘッジホッグと同列か上流に作用点があると考えられるが、原因遺伝子の同定が必須である。現在、ポジショナルクローニングによって、*con*遺伝子の同定を進めている。

(5) メダカ胚で発現する遺伝子の網羅的単離：木村哲晃，成田貴則，澤田篤志，武田洋幸

脊椎動物の基本的体制を備えた最も古い動物群である魚類は脊椎動物の進化を考える上で重要な存在である。脊椎動物の発生の進化過程を明らかにすることを目的として、我々はメダカを用いてその発生過程で発現する遺伝子の単離と発現パターンの解析を行っている。器官形成がダイナミックに進行する体節形成期胚のライブラリーからクローンをランダムにとり、シークエンスを進めている。また、配列が判明した大量の

cDNA 断片から DIG-RNA プローブを作製して、体節形成期における発現パターンを個別に調べている。

研究業績

(1) 原著論文

1. Amanuma, K., Takeda, H., Amanuma, H. and Aoki, Y.: Transgenic zebrafish for the detection of mutations caused by compounds in aquatic environments. *Nature Biotechnology* **18**:62-65, 2000.
2. Sawada, A., Fritz, A., Jiang, Y.-J., Yamamoto, A., Yamasu, K., Kuroiwa, A., Saga, Y. and Takeda, H.: Zebrafish Mesp family genes, *mesp-a* and *mesp-b* are segmentally expressed in the presomitic mesoderm, and *Mesp-b* confers the anterior identity to the developing somites. *Development* **128**:1691-1702, 2000.
3. Kondoh, H., Uchikawa M., Yoda, H., Takeda, H., Furutani-Seiki, M. and Karlstrom, R.O.: Zebrafish mutations in Gli mediated hedgehog signaling lead to lens transdifferentiation from the adenohipophysis anlagen. *Mechanisms of Development* **96**:165-174., 2000.

(2) その他

1. 澤田篤志, 相賀裕美子, 武田洋幸: “体節の形成と分化” 蛋白質核酸酵素 **45**(17), 2766-2773, 2000.
2. 新屋みのり, 武田洋幸, 弥益 恭: “神経誘導と神経組織の体軸に沿ったパターンニング” 蛋白質核酸酵素 **45**(17), 2738-2744, 2000.
3. 川上厚志: “ゼブラフィッシュのジェネティクスとジェノミクス” 蛋白質核酸酵素 **45**(17), 2853-2763, 2000.

(3) 発表講演

1. Koshida, S., Shinya, M. and Takeda, H.: "Antagonistic interaction between FGF and BMP signaling pathways in zebrafish posterior neural development" Cold Spring Harbor, April, 2000.
2. Shinya, M., Koshida, S., Kuroiwa, A. and Takeda, H.: "Role of Ras signaling in the developing telencephalon of the zebrafish embryo" Cold Spring Harbor, April, 2000.
3. Sawada, A., Fritz, A., Jiang, Y.-J., Yamamoto, A., Yamasu, K., Kuroiwa, A., Saga, Y. and Takeda, H.: "Zebrafish Mesp family genes, *mesp-a* and *mesp-b* are segmentally expressed in the presomitic mesoderm, and *Mesp-b* confers the anterior identity to the developing somites" Cold Spring Harbor, April, 2000.
4. Sakaguchi, T., Kuroiwa, A. and Takeda, H.: "In situ screen for novel genes expressed in the yolk syncytial layer" Cold Spring Harbor, April, 2000.

5. Kawakami, A., Talbot, W. S. and Schier, A. F. "Roles of *chameleon* in midline signaling" Cold Spring Harbor, April, 2000.
6. 新屋みのり, 越田澄人, 藤井律子, 日比正彦, 平野俊夫, 黒岩 厚, 武田洋幸:ゼブラフィッシュ終脳形成におけるFGF/Ras シグナル伝達の役割. 第33回日本発牛生物学学会大会, 高知, 5月.
7. 澤田篤志, 黒岩 厚, 相賀裕美子, 武田洋幸:ゼブラフィッシュ体節形成における*her1*の周期的な発現. 第33回日本発牛生物学学会大会, 高知, 5月.
8. 坂口拓哉, 黒岩 厚, 武田洋幸:*In situ* hybridization screening 法によるゼブラフィッシュ初期胚の卵黄細胞特異的に発現する遺伝子群の単離. 第33回日本発牛生物学学会大会, 高知, 5月.
9. Kawakami, A., Talbot, W.S. and Schier, A.F.: "Roles of *chameleon* in midline signaling" Society for Developmental Biology 59th Annual Meeting, Boulder(Colorado), June, 2000.
10. Kawakami, A., Talbot, W.S. and Schier, A.F.: "Genetic dissection of midline signaling using zebrafish *chameleon(con)*mutant" 第23回日本神経科学大会・第10回日本神経回路学会合同大会, 横浜, 9月.
11. 武田洋幸:ゼブラフィッシュ終脳の領域特異性の獲得とFGFシグナル. 第23回日本神経科学大会・第10回日本神経回路学会合同大会, 横浜, 9月.
12. 武田洋幸:分節時計を示す遺伝子発現. 第53回日本細胞生物学学会, 福岡, 10月.
13. 川上厚志, 武田洋幸, William Talbot, Alexander Schier:ゼブラフィッシュミュータントを用いたミッドラインシグナルの発生遺伝学的解析. 第23回日本分子生物学学会年会, 神戸, 12月.
14. 新屋みのり, 黒岩 厚, 武田洋幸:ゼブラフィッシュを用いた頭部神経領域先端の形成に関与する組織の同定. 第23回日本分子生物学学会年会, 神戸, 12月.
15. 澤田篤志, 黒岩 厚, 川上厚志, 武田洋幸:ゼブラフィッシュ体節形成における*her1*の周期的な発現とFGFによる制御. 第23回日本分子生物学学会年会, 神戸, 12月.
16. 坂口拓哉, 武田洋幸:*in situ* hybridization screening 法による卵黄細胞特異的遺伝子群の単離. 第23回日本分子生物学学会年会, 神戸, 12月.

C-d. 生理遺伝客員研究部門

(1)ヌクレオソーム位相を決定するDNA構造と転写制御機構: 木山亮一(経済産業省産総研)

1)ゲノム上で周期性を示すベントDNA構造の生物学的意義

我々はすでに, ある種のベントDNAが多くの遺伝子座において高頻度に現れ, 平均すると680塩基対(4ヌクレオソームの長さに対応)の周期性を示すことを報告してきた. この種のベントDNAは, その位置が相同な遺伝子群の間で進化上良く保存されており, コアヒストンに対する高い親和性とヌクレオソームの並進位相(translational positioning)に大きな影響を与えることから, 生物学的に重要な意義を有すると考えられる. ヒ

トの β -グロビン遺伝子座においても周期性を示すベントDNAが存在しており、 β -グロビン遺伝子群のプロモーター領域に存在するサイレンサーとその上流のLCR (Locus Control Region) のHS2領域におけるエンハンサーはそれぞれベントDNAの近傍に位置しているが、その遺伝子発現に対する影響は異なった様式を示す。サイレンサーはベントDNAの位置とほぼ重なって存在し、サイレンサー部位のヌクレオソーム位相を直接決定しているが、エンハンサーでは、2ヌクレオソーム離れた位置のベントDNAによりそのヌクレオソーム位相が決定され、その結果エンハンサー機能についても影響を受ける。これらの結果は、高次のクロマチン構造形成にとって重要な遺伝子の収納のメカニズムと遺伝子の発現制御のメカニズムが密接な関係を有することを示唆する。したがって、遺伝子の発現メカニズムは、個々の転写因子などの作用だけでなく、遺伝子の置かれる環境も視野に入れた研究が必要と考えられる(Wanapirak *et al.*, 2000)。

2) 遺伝子発現のProfilingによるゲノム機能情報の取得

我々は、環境ホルモンの作用機構の解明とその評価系を構築するために、環境ホルモンとして大きな問題となっているヒトの性ホルモンのひとつであるエストロゲンに類似の活性を有する物質の影響を検定するシステムを作っている。具体的には、まず、マイクロアレイ解析により、ヒトの乳がん由来の細胞株MCF-7を用いてエストロゲン応答遺伝子群についての情報を取得し、その遺伝子群より、エストロゲン応答性を有する約150の遺伝子を選び、カスタムマイクロアレイを作成した。約一万の遺伝子、ESTの内、エストロゲンに対して応答性を示したものは全部で数百であり、それを集めたマイクロアレイを作成することにより、より簡便で、安価な評価系を作ることが可能になる。このカスタムマイクロアレイを用いてエストロゲンレセプターの発現を示す株化がん細胞のエストロゲンに対する応答性を調べたところ、共通に応答を示す遺伝子や、異なる応答を示すものなど様々な応答性を示し、その応答性を用いることにより、がん細胞の分類やエストロゲンの影響の評価などが可能であることが判った。また、現在利用できるヒトの遺伝子は約1万であり、それ以外はほとんど機能のわからないESTである。環境ホルモンに対する応答性について調べることにより、遺伝子や特に機能の不明なESTの、ホルモン/ストレス応答や、細胞の増殖、がん化との関係など、組織特異的な機能を知る事が可能になる。

3) ゲノム変異情報を利用したGenotypingとその利用

我々は、ゲノムの変異情報を利用して遺伝子座のスクリーニングを行うことによりより効率良くGenotypingを行う手法を開発している。まず、ゲノムの変異情報を得るためにゲノムサブトラクション法を用いて直接ゲノムDNA間の相違を検出しクローニングを行った。この方法は、塩基置換以外の塩基の挿入、欠失、転位をプローブ無しに包括的に検出・クローニングできるという長所を持つ。我々は、この手法を腎がんに応用し、変異部位(LOH: Loss of Heterozygosity)のクローニングを行った。その内187個のクローンについて染色体上の位置をマップしたところ、クローンが集中する部位

(cluster)が44箇所あった。これらのclusterの変異情報を約50人の腎がん(mixed cell typeとclear cell type)患者について調べたところ、高頻度でLOHを示すものが明らかになった。その頻度はclusterにより、10%から90%以上を示し、特に腎がんのがん抑制遺伝子が存在しているVHL遺伝子座では94%の頻度でLOHを示した。それ以外にも、APCやIRF-1などの遺伝子座が高い頻度を示した。我々はそれらの遺伝子座以外にも、5q32-q34, 6q21-q22, 8p12などの部位が20~40%の頻度を示すことを新たに見だし、その内の4箇所については共通にLOHを示す領域を10メガ塩基対(Mb)以内にマップすることに成功した。我々は、これらの変異部位をさらに詳しく解析することにより、現在、がん関連遺伝子の同定を行っている。

研究業績

(1) 原著論文

1. Wanapirak, C., Onishi, Y., Wada-Kiyama, Y., Ohyama T. and Kiyama, R.: Conservation of DNA Bend Sites with Identical Superhelical Twists among the Human, Mouse, Bovine, Rabbit and Chicken β -Globin Genes. *DNA Res.*7, 253-259, 2000.

(2) その他

1. 木山亮一：高等動物における周期性ベントDNAの構造。生物物理 **229**, 173-178, 2000.

(3) 発表講演

1. 木山亮一：周期性ベントDNAによるヌクレオソームの整列化と転写制御。木原研セミナー「クロマチン構造と細胞機能」, 2000年3月, 横浜。
2. 木山亮一：DNA構造から見たゲノムの構造と機能：遺伝子収納と発現のメカニズムについて。第66回生化学会東北支部シンポジウム, 2000年6月, 盛岡。
3. 波多野直哉, 西川直子, 郷司和男, 木山亮一：IGCR法を用いた腎がんにおける染色体共通欠失領域のクローニングと解析。第59回日本癌学会総会, 2000年10月, 横浜。
4. 西川直子, 波多野直哉, 郷司和男, 木山亮一：IGCR法により得られた腎がんでの9p24共通欠失領域におけるがん関連遺伝子の解析。第59回日本癌学会総会, 2000年10月, 横浜。
5. 木山亮一：DNA構造から見たゲノムの構造と機能：遺伝子収納と発現のメカニズムについて。第73回日本生化学会大会シンポジウム「遺伝子の収納と発現の基本メカニズム」, 2000年10月, 横浜。
6. 大西芳秋, 木山裕子, 木山亮一：ヒト β -グロビン遺伝子LCRのHS2領域における周期性bent DNAによるヌクレオソーム位相を介した転写調節機構。第73回日本

- 生化学会大会, 2000年10月, 横浜.
7. 加藤 愛, チャナーン ワナピラック, 大西芳秋, 木山裕子, 木山亮一: グロビン遺伝子における bent DNA と silencer 活性の関係. 第73回日本生化学会大会, 2000年10月, 横浜.
 8. Li, X.-M., Wada-Kiyama, Y., Kuwabara, K., Sakuma, Y., Kiyama, R.: Modulation of human ER alpha gene expression by DNA curvature. 第73回日本生化学会大会, 2000年10月, 横浜.
 9. 木山亮一, 大西芳秋, 木山裕子: ベントDNAはヌクレオソーム整列化の主要因子であり, β -LCRのエンハンサー活性を調節する. 米国血液学会第42回年会, 2000年12月, 米国シアトル.
 10. 木山亮一: ゲノム上で周期性を示すベントDNA構造の生物学的意義. 第23回分子生物学会年会, 2000年12月, 横浜.
 11. 西川直子, 波多野直也, 郷司和男, 木山亮一: 腎細胞がんにおいてLOHを示す染色体共通欠失領域の解析. 第23回分子生物学会年会, 2000年12月, 横浜.
 12. Sarkar, S., Hatano, N., McElgunn, C. J., Nishikawa, N.S., Ozawa, K., Shibana, Y., Nakajima, M., Kiyama, R.: Analysis of Loss of Heterozygosity in Chromosome 9 in Renal Cell Carcinoma Using In-Gel Competitive Reassociation Library. 第23回分子生物学会年会, 2000年12月, 横浜.
 13. Ebrahim, A.S., Rodley, P., Kanda, H., Kitagawa, T., Kiyama, R.: Allelotype analysis in mouse hepatocellular carcinomas by in-gel competitive reassociation (IGCR). 第23回分子生物学会年会, 2000年12月, 横浜.
 14. 大西芳秋, 木山裕子, 木山亮一: ヒト β -グロビン遺伝子LCRのHS2におけるヌクレオソーム位相とエンハンサー機能. 第23回分子生物学会年会, 2000年12月, 横浜.
 15. 加藤 愛, チャナーン ワナピラック, 大西芳秋, 木山裕子, 木山亮一: グロビン遺伝子における bent DNA と silencer 活性の関係. 第23回分子生物学会年会, 2000年12月, 横浜.
 16. 木山裕子, 大西芳秋, 木山亮一: ヒト β -グロビン遺伝子LCRのHS2領域における周期性ベントDNAの転写調節機能. 第23回分子生物学会年会, 2000年12月, 横浜.
 17. 李 曉曼, 木山裕子, 佐久間康夫, 木山亮一: ヒトエストロゲンレセプター α 遺伝子におけるベントDNAによる転写調節. 第23回分子生物学会年会, 2000年12月, 横浜.
 18. 吉田敦行, 林 慎一, 小口のぶ, 木山亮一: マイクロアレイを用いたエストロゲン応答遺伝子のプロファイリング. 第23回分子生物学会年会, 2000年12月, 横浜.
 19. 木山亮一: 次世代ゲノム研究: ProfilingとGenotyping. 平成12年度生命工学工業技術研究所講演会, 2000年11月, 東京.
 20. 木山亮一: Transcriptional Modulation by Periodic Bent DNA through Chromatin Structure. 第6回総研大国際シンポジウム「21世紀の総合ゲノム科学: 一次配列情報から高次構造情報へ」, 2001年3月, 神奈川.
 21. 大西芳秋, 木山亮一: Periodic bent DNA is a key element for nucleosome

alignment and modulates enhancer activity of the human beta-LCR」第6回総研大国際シンポジウム。21世紀の総合ゲノム科学：一次配列情報から高次構造情報へ」, 2001年3月, 神奈川。

22. 加藤愛, Chanane WANAPIRAK, 大西芳秋, 木山裕子, 木山亮一: Functional relationship of bent DNA with silencer activity in the promoter region of the globin genes. 第6回総研大国際シンポジウム「21世紀の総合ゲノム科学：一次配列情報から高次構造情報へ」, 2001年3月, 神奈川。

D. 集団遺伝研究系

D-a. 集団遺伝研究部門

集団遺伝研究部門では、生物集団の遺伝的構造とその進化的変化を支配する法則の理解を目指して研究を行っている。当部門の研究は助手・高野敏行によって行われ、技術課職員・石井百合子が一部これを支援した。本年度は遺伝研共同研究で共同研究(A)「アミラーゼ重複遺伝子間の機能分化の解析」(九州大学・猪俣伸幸)の申し込みを受け入れ実施した。また、カリフォルニア大学デービス校でセミナーを行い、C. Langley 博士, J. Gillespie 博士等と、また北海道大学・農学部でも講演を行うとともに、佐野芳雄博士, 貴島祐治博士等と意見交換を行った。

(1) エピソード(不規則)な分子進化を支配する要因: 高野敏行

分子進化における自然淘汰等の働きを明らかにする目的で、キイロショウジョウバエ(*D. melanogaster*) 近縁種間の進化速度の一定性について解析を行った。その結果、同義座位における置換数に系統と遺伝子との相互作用の効果、すなわちエピソード(不規則)な進化パターンが観察された。この原因として、次の3つの要因を明らかにした。

① 集団の有効な大きさの変動。通常、集団の大きさの影響はゲノム全体に均一に及ぼすものと考えられている。しかし、染色体上の領域間での組換え率の違いの影響と相まって、領域に依存した効果があることを明らかにした。② 局所的な組換え率の変化。実際の自然淘汰圧は淘汰係数や集団の有効な大きさだけでなく、組換え率も近傍での有利な突然変異の固定や有害突然変異の効果を通して淘汰圧に影響を与えることが理論的に明らかにされている。実際にX染色体のテロメア末端領域において *D. yakuba* の組換え率が *D. melanogaster* よりも約20倍高いことを明らかにし、この領域で *D. simulans* を含めた *D. melanogaster* の系統で特異的に組換え率の低下による自然淘汰の弛緩が起こったことを強く支持する証拠を得た。③ 局所的な突然変異圧の変化。 *D. yakuba*, *D. oreana* において独立に100kb以上の限定された領域で極端にGCに偏った塩基置換(104のG/C → A/T に対しわずか4つのA/T → G/C置換)を観察した。この置換パターンは翻訳領域だけでなく、非翻訳領域でも見られ、自然淘汰によるのではなく突然変異の歪みによるも

のと考えられる。以上、ショウジョウバエゲノムにおけるエピソーディックな進化パターンの原因として、集団の大きさ、組換え率、突然変異圧の3つの要因の影響を明らかにした。

これらの知見から、ショウジョウバエ染色体は突然変異と組換えの制御に関して独立なドメイン構造から成っており、進化速度の大きく異なる領域が混在していることが示唆される。本研究の詳細については、文献(2)を参照。

(2) 剛毛形成を指標とした遺伝子機能進化の解析：高野敏行

ショウジョウバエの剛毛形成を指標として、近縁種間で進む遺伝子変化を種間雑種の形態異常として検出する系を用いて解析を行った。モデル生物であるキイロショウジョウバエとその近縁3種では全く同じパターンで胸部の剛毛(Macrochaetae)が観察される。ところが、キイロショウジョウバエ(*D. melanogaster*)と*D. simulans*との雑種ではこれらの胸部剛毛が失われる傾向がある。一方で、*D. simulans*により近縁な*D. mauritiana*や*D. sechellia*とキイロショウジョウバエとの雑種では剛毛は失われない。また、*D. simulans*も系統によってはほとんど剛毛を失わないものから多くの剛毛を失うものまで、大きな変異が存在している。このように種間雑種において観察される形態・発生異常の多くは、2つないしはそれ以上の遺伝子座での異なるゲノムに由来する対立遺伝子間の相互作用によると考えられる。もちろん、これらの対立遺伝子も、由来したゲノムにおいては何ら異常をもたらすものではない。このことは遺伝子は独立に進化するのではなく、遺伝子座間の相互作用が制約をもたらしていることを示唆する。この意味で、この系は遺伝子座間の相互作用のあり方と進化に及ぼす影響を解析するよい材料となると考えている。

遺伝学的解析から、*D. simulans*のX染色体上に剛毛消失を起こす因子が存在することを明らかにし、欠失染色体系統によるスクリーニングと*D. simulans*の種内変異を利用したQTLマッピングを行ってきた。種間雑種の発生・形態異常は幾つかの異なった遺伝的要因によって引き起こされることが考えられる。①*D. melanogaster*との雑種での消失剛毛数に関して観察される*D. simulans*の種内変異の責任遺伝子(変異)、②雑種の剛毛消失を引き起こす*D. melanogaster*と*D. simulans*間の固定した変異、③遺伝子量効果を、特に雑種バックグラウンドにおいて示す遺伝要因。

QTLマッピングの結果から細胞学的位置14-15領域に用いた2系統間の差の約3/4の相対的効果をもった、おそらく単一の遺伝子座によると思われるQTLを見いだした。このQTLの存在は、他の複数の系統の組み合わせで確認している。一方で、欠失・重複染色体を用いたスクリーニングによって複数の領域が剛毛消失に関与することが示された。しかし、さらに詳細なマッピングを行ったところ、入手可能な欠失・重複染色体ではQTLと一致した位置には有意な領域を見出せなかった。現在、ゲノム情報を利用しつつ大規模なQTLマッピングを進行中で、まもなく遺伝子ごとの比較解析が可能な領域に絞り込めると期待している。本研究の結果の一部については、文献(1)を参照。

研究業績

(1) 原著論文

1. Takano-Shimizu, T.: Genetic screens for factors involved in the notum bristle loss of interspecific hybrids between *Drosophila melanogaster* and *D.simulans*. *Genetics* **156**. 269-282, 2000.
2. Takano-Shimizu, T.: Local changes in GC/AT substitution biases and in cross-over frequencies on *Drosophila* chromosomes. *Molecular Biology and Evolution* in press.

(2) 発表講演

1. Takano-Shimizu, T.: Substitution-pattern units and recombination units along *Drosophila* chromosomes. International Symposium: Evolution 2000, Tokyo, March, 2000.
2. Takano-Shimizu, T.: Erratic molecular evolution due to locally fluctuating mutation and recombination rates in *Drosophila*. German-Japanese Seminar: Methods of Reconstructing Evolutionary History of Genes, Mishima, March, 2000.

D-b. 進化遺伝研究部門

異なる視点から研究される傾向にあった進化の諸分野を、総合的視点で研究することをめざしている。実験的研究と理論的研究を並行させ、塩基配列レベルと染色体レベルの進化を関係づけ、分子進化と機能や表現型の進化とを総合的に理解することを目標にしている。これらの研究には、教授・池村淑道、助教授・斎藤成也、助手・深川竜郎が携わり、これに渡辺良久(中核的研究機関研究員)、岡村 淳(8月から中核的研究機関研究員)、市場勇太(4月から国立遺伝学研究所受託研究員として、協和醗酵工業より派遣)、西橋 藍(4月から国立遺伝学研究所受託研究員として、協和醗酵工業より派遣)、三上剛和(総合研究大学院大学1年)、北野 誉(中核的研究機関研究員、4月からドイツ Max-Planck Institute へ)、嶋田 誠(9月から中核的研究機関研究員)、金 衝坤(4月から国立遺伝学研究所外国人研究員)、野田令子(7月から日本学術振興会特別研究員)が加わった。イスラエルのヘブライ大学へ留学中の助手・天前豊明は、4月より休職して留学期間を延長した。宮内洋子(研究支援推進員)、鈴木和子、北きよみ、川本たつ子、青嶋昌子(4月から研究支援推進員)、野秋好実、近藤昌代、鈴木真有美、小平順子、水口昌子が研究の補助業務を行った。

教授・池村はイタリア(ナポリ)で5月に開催された国際分子進化学会に出席し発表を行うため渡航した。助手・深川は、10月にドイツ(ハイデルベルグ)で開催されたEMBO

国際研究集会“Centromere, Kinetochores and Spindle Interaction”に出席し、発表した。

本年度の研究は、文部省科学研究費補助金特定領域研究(A)(2)「ヒトゲノム広領域のGC含量分布とS期内複製時期の測定」(代表者池村)、特定領域研究(C)(2)「高等動物ゲノム配列と染色体構造の統合をめざす複製タイミングの高精度地図作成」(代表者池村)、萌芽的研究「染色体バンド境界の分子レベルでの特定とその機能探索」(代表者池村)、基盤研究(B)(2)「高等脊椎動物染色体DNAの核内での動態と配置を決める分子機構」(代表者池村)、基盤研究(B)(2)「染色体工学・発生工学を用いたヒト型MHCマウスの作出」(代表者池村)、研究成果公開促進費「遺伝暗号(コドン)データベース」(代表者池村)、特定領域研究(A)(2)「遺伝子系統樹の重層統合によるゲノム進化解析法と生物学的知識自動獲得システムの開発」(代表者斎藤)、基盤研究(A)(1)「ヒト化を特徴づける遺伝子変化探索システムの開発」(代表者斎藤)、萌芽的研究「分岐過程理論を用いた遺伝子と種の進化過程の新しい解析法の開発」(代表者斎藤)、特定領域研究(A)(2)「染色体工学的手法を用いたヒトゲノム非翻訳領域の機能解析」(代表者深川)、特定領域研究(C)(2)「染色体工学を用いたセントロメアを中心とするゲノムオペレーティングシステムの解明」(代表者深川)、特定領域研究(C)(2)「セントロメアタンパク質ZW10の細胞周期制御機構およびがん細胞における変異の解明」(代表者深川)、奨励研究(A)「遺伝学・染色体工学的手法による新規セントロメアタンパク質の同定と機能解析」(代表者深川)、等の援助を受けた。

共同研究は、共同研究(A)として、教授・池村は、高橋規郎・放射線影響研究所遺伝部遺伝生化学研究室長を代表に「GC含量の異なるヒト染色体領域における突然変異スペクトラム」に関して、吉川研一・京都大学理学部物理学第1教室教授を代表に「DNAにおける一次構造と高次の折り畳み構造の相関に関する研究」を行った。また、共同研究(B)として、金谷重彦・山形大学工学部応用生命システム工学科助教授を代表に「多細胞生物における細胞組織のtRNA量とコドン使用の関係の解析」を行った。総研大共同研究として「生命超分子構造体の総合的高精度解析」(代表者池村)に関して研究を行った。

助教授・斎藤は、植田信太郎・東京大学大学院理学系研究科助教授を代表に「古DNA分析に基づく人類集団の拡散と時代的変遷に関する解析」を行った。また、総研大共同研究として「意識の進化に関する学術的研究」(代表者斎藤)に関して研究を行った。

助手・深川は、共同研究(A)として、武田俊一・京都大学大学院医学研究科教授を代表に「高頻度に標的組換えを起こすニワトリBリンパ細胞株を用いたゲノム構造の維持機構の解析」を行った。また、共同研究(B)とし、舩本寛・名古屋大学大学院理学研究科講師を代表に「ヒト人工染色体を用いたセントロメアのDNA複製制御の解析」を行った。同じく、舩本寛・名古屋大学大学院理学研究科講師を代表者に遺伝研研究会「染色体分配の生物学」を開催した(9月)。

(1) ヒト 21 番ならびに 11 番染色体長腕の複製時期の測定：渡辺良久，藤山秋佐夫^{1,2}，榑佳之²，池村淑道（¹ 人類遺伝研究部門，² 理研・ゲノム科学総合センター）

染色体バンドに代表されるようなヒトゲノム上の大規模な構造の実体やその機能を分子レベルで解明することは、今後のゲノム解析に重要な知見を与える。特に、S 期内で前半と後半に区分化される複製タイミングは、染色体の機能構造を知るための重要なパラメーターと考えられている。全配列が決定されたヒト 21 番染色体長腕(34Mb)の全域と、11 番染色体の長腕の全域(約 80Mb)を対象に、詳細な複製時期地図をゲノム配列レベルで作成した。ヒト 21 番ならびに 11 番の長腕は、理研のゲノム科学総合センターが全域の配列決定を行っており、同センターとの共同研究として、約 400STS 部位に着目して複製時期の測定を行った。21 番染色体については公表された完全ゲノム配列をもとに、平均として 200kb ごとに PCR プライマーを作成したので、概略としてレプリコンごとに一箇所のプライマーを作成したことになる。11 番染色体については理研グループが BAC の選別に用いた STS マーカーを中心に、複製時期の測定を行った。染色体 11q および 21q の両方において、S 期前半と後半の複製領域が R と G バンド領域に対応することが判明し、複製時期が S 期前半から後半に明瞭に転換している領域を約 30 箇所、塩基配列レベルで特定できた。また、GC 含量の区分境界と複製時期の転換部位とが密接に関係することも明らかになり、これらの転換部位をバンド境界の構造上ならびに機能上の要件を満たす部位として塩基配列レベルで特定した。S 期の早い時期に複製する領域ほど遺伝子密度が高いことも明らかになった。この解析を行う過程で、S 期前半から後半への複製時期の転換部位には病因遺伝子、特に脳神経疾患遺伝子および癌関係遺伝子が集中して存在するとの予想外の知見を得た。例えば、21q では家族性アルツハイマー病の原因遺伝子の代表例である APP、家族性筋萎縮性側索硬化症 FALS の原因遺伝子 SOD1、てんかん症と関係したグルタミン酸レセプター GluR5 の遺伝子 GRIK1、11q では BCL1 (cyclin D1 遺伝子) や FGF4 をはじめとする癌関係遺伝子群、フェニルケトン尿症に対する PTS などが複製時期転換領域に存在していた。複製時期の転換領域では、DNA 複製フォークの進行が休止する可能性が指摘されており、組み換え頻度が上昇していると予想されてきた。染色体転座や遺伝子増幅と関係した癌関係遺伝子が、この領域に局在することと関係すると考えられる。着目の転換領域には、転座や遺伝子増幅と関係のない病因遺伝子類も存在していた。バンド領域は複製時期と関係するだけではなく、クロマチン構造の粗密度と関係することも知られている。従って、染色体バンド境界においてはクロマチン構造の粗密度が転換している可能性が考えられる。さらに、バンド境界は、核内配置においても特殊な状況にあることが知られている。バンド境界の持つこれらの特殊事情が、病因と関係する可能性を考えている。病因の分子機構を知る手がかりを与えるだけでなく、あらたな病因遺伝子を能率的に探索する方法としても有効と予想している(論文準備中)。

(2) 高等脊椎動物セントロメアの機能解析：深川竜郎，岡村 淳，西橋 藍，三上剛和，宮内洋子，鈴木和子，池村淑道

セントロメアは染色体分配に本質的な役割を行うDNA-タンパク質の複合体である。出芽酵母では遺伝学的解析により125bpの特異配列がセントロメアDNAとして同定されている。一方，高等脊椎動物では人工染色体を用いた解析から， α サテライトを中心とした数百kbにおよぶ高度な反復配列自身がセントロメアDNAとして機能することが複数のグループから報告されたが，正確なセントロメア機能領域は未知である。セントロメアDNAの一次配列は生物間で著しく異なるが，セントロメアタンパク質がそのDNAの何らかの立体構造を認識することでセントロメアが形成され，全生物に共通の機構で染色体分配がおけると我々は予想している。進化的に保存されたセントロメアタンパク質はこれまで少数しか見つかっていないが，ヒトで同定されたCENP-AとCENP-Cは酵母からヒトにいたるまで保存されており，酵母におけるそれらの対応遺伝子はCse4, Mif2と呼ばれている。最近，ネオセントロメアと呼ばれ，本来はセントロメアでない領域が活性化をうけてセントロメアとして機能する現象がヒトやショウジョウバエで観察された。ヒトネオセントロメアには常にCENP-AとCENP-Cが局在化していることから，これらのタンパク質がセントロメア機能に重要な働きを担うと考えられている。

今年度は特にCENP-C, ZW10, CENP-H, Mis6を対象に解析を進めた。DT40細胞は，哺乳類細胞に比べて，数十から数百倍の頻度で相同組換えを起こすことが知られている。その特徴を利用しDT40細胞を用いて，各種タンパク質を解析した。CENP-Cに関する研究として，ERシステムを用いた条件変異株を作成した。また，温度感受性変異株の作成を試み，4種類の変異株の単離に成功した。温度感受性変異株は34℃で通常に生育するが，43℃では温度移行後24h以内に80%の細胞が死滅した。ERシステムを用いた条件変異株では，多くの細胞がM期で異常を示した後死滅したが，間期に死滅する細胞も観察された。温度感受性変異株では，M期の異常よりはG1/S期で増殖を停止して死滅した。これは，CENP-CはG1/SとM期で機能するが，温度感受性変異はG1/S期特異的な変異であることを示唆している。さらに，レトロウイルスベクターを用いて，変異を抑圧する遺伝子の単離を試みた結果，SUMO-1遺伝子の大量発現により，CENP-C変異が抑圧された。SUMO化が行われないDT40細胞の解析を行った結果，細胞分裂後期に異常を生じており，SUMO化と細胞分裂の関連性が示唆された(論文投稿中)。

ZW10遺伝子はショウジョウバエで染色体不安定性を引き起こす変異体の原因遺伝子として単離され，M期にセントロメアに局在することが知られている。また，変異体の姉妹染色分体は微小管の重合阻害剤であるコルセミドの処理により分離してしまうことから，チェックポイントタンパク質の可能性も示唆されている。しかしながら，ショウジョウバエの変異体は蛹で致死となるため，詳細な細胞遺伝学的な研究は遅れていた。我々は，ZW10に対する抗体を作成してその細胞内局在を明らかにした(Okamura *et al.*, *Gene*, 2001)。また，テトラサイクリン(TET)の遺伝子発現制御システムを応用してZW10の条件的ノック

クアウト株を作成して、ZW10がチェックポイントタンパク質であることを示唆するデータを得ている(論文準備中)。

CENP-Hはマウスでセントロメアに局在するタンパク質として同定されたが、その機能については不明であった。我々はTETシステムを応用してCENP-Hの条件的ノックアウト株を作成した。CENP-Hのノックアウト細胞は分裂中期で増殖を停止して死滅した。また、染色体の不等分配や染色体配置に異常が生じた。抗体染色の結果、CENP-Cのセントロメアの局在に必須の働きを行っていることが明らかになった(論文投稿中)。

Mis6は分裂酵母で、CENP-Aのコネクター分子として報告されていたが、高等脊椎動物でその相同遺伝子の存在は知られていなかった。我々はニワトリの相同遺伝子を同定して、その細胞内局在を解析した。ニワトリMis6は細胞周期を通じて、セントロメアに局在することが明らかになった。現在、ノックアウト細胞を作成中である。

(3)人工染色体を用いたセントロメアDNAの複製タイミングの解析：深川竜郎，西橋藍，池村淑道，中野めぐみ¹，舛本 寛¹(¹名古屋大学大学院理学研究科)

セルソーターと定量的PCRを組み合わせた方法で、高精度にDNA複製タイミングを測定することが可能となっている。その方法を用いて、各種小型化染色体のセントロメアDNAの複製タイミングを測定した。小型化染色体は名古屋大の舛本らのグループが作成したものである。舛本らは安定に自律複製する小型化染色体を保持する細胞株を作成しているが、その過程で、同じ配列を持ちながら自律染色体にならず、宿主の染色体ヘインテグレートしてしまった細胞株も作成している。本年は、その2種の細胞株のセントロメア領域のDNA複製タイミングを測定した。自律複製する染色体のセントロメア領域のDNA複製タイミング(S期後半に複製)は、宿主の染色体ヘインテグレートしてしまった同じ配列のDNA複製タイミング(S期前半から中間で複製)とは明らかに異なっていた。これらは興味深い結果であるが複製タイミングの違いでキネトコア構造が形成されたか、キネトコア構造が形成された後、複製タイミングの違いが生じたかについては不明であり、セントロメアタンパク質の解析を含めた今後の解析が必要である。

(4)複製起点のゲノム情報処理による推定：市場勇太，渡辺良久，池村淑道

一本鎖の塩基配列に着目した場合、バクテリアのゲノムでは、leadingかlagging鎖として合成された配列の間で[G]頻度と[C]頻度の差違、いわゆるGCskewが知られている。この差違が起きる理由には、leadingとlagging鎖の合成過程における変異や修復の違いなどが考えられる。GCskew $[(C-G)/(C+G)]$ の転移領域として、バクテリアゲノムの複製起点が推定可能なことが報告されている。しかし、GCskew、ATskewともに明確な転移領域を示さないバクテリアも存在し、Synechocystis sp.はその代表例の一つである。本研究ではdi-nucleotide頻度のskewに注目し、バクテリアに加えて酵母やヒトのゲノムに対しても解析を行った。di-nucleotideを用いた解析は、多数の変数を扱うことになるため、多変数解析(主成分分析)を導入した。最も大きな特性をあらわす第1主成分と、それに直交する軸にあたる第2主成分に着目した。それぞれの主

成分における説明変量(di-nucleotide)の固有ベクトルを見ることにより、その特性が推測できる。これまで GCskew, ATskew とともに明確な転移領域が見出せなかった *Synechocystis* sp. について主成分分析を行った結果、第2主成分において、相補的な塩基対(AG-CT)の skew に転移領域が見出された。この第2主成分から導き出された主成分得点は、複製起点として推測されている dnaA の位置で大きく値が変化しており、解析結果から複製起点を推測できる可能性が示された。複数の複製起点が特定されている酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の6番染色体においてこの手法を用いたところ、実験的に知られている複製起点のうち8割ほどが skew の転移領域と一致していた。ヒト21番染色体における第1主成分の固有ベクトルは GG, CC と AA, TT の差が最も大きくなり、GC パーセントの偏りがゲノム全体において大きいことの反映である。第2主成分では GT と AC の差が最大になる。GT と AC は相補的な塩基対であり、leading と lagging strand 間の偏りが di-nucleotide において存在することを示唆している。第2主成分における説明変量の固有ベクトルは、相補的な塩基対は全て正負反対の符号を持っており、第2主成分得点から、複製起点の可能性の高い領域が導き出せる可能性が示唆された。この主成分得点が複製時期のタイミングと大きな関連を示していることが判明し、上記の可能性を支持している。ヒト22番染色体における主成分分析も第2主成分において相補的な塩基対間の値が大きかった。

(5) 遺伝子コドン選択パターンの研究：中村保一¹、池村淑道¹（かずさDNA研究所）

本年度も継続して、GenBank の全体を解析してコドン使用のデータベースの更新を続けた。生物種ごとに集計したコドンデータベースと併せて、World Wide Web で公開している (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>)。現在、約40万遺伝子のコドン使用と、1万2千の生物種(ウイルスを含む)について、生物種別のコドン集計値を収録している。詳細は、*Nucl. Acids Res.* (Nakamura *et al.*, 2000) に紹介した。

(6) 類人猿ゲノム計画 Silver：斎藤成也、金 衝坤、嶋田 誠、野田令子

現在大規模に行なわれているゲノム計画は、巨大な生命の進化樹のなかの点としてのモデル生物についてのみ解明が進んでいるに過ぎない。このあとには、当然各生物群の特徴を面的に押さえる必要がある。それは生物進化の過程で徐々に蓄積していった各生物系統の「独自性」を調べ上げてゆくことである。この独自性こそ生命の多様性の根元であるが、その解明には近縁種間の詳細な比較が必要である。この考え方にとって、われわれはヒト化によって生じた人間の独自性を規定する遺伝子の変化をさぐるために、類人猿ゲノム計画 Silver (web site = sayer.lab.nig.ac.jp/~silver/) を開始した。ある相同塩基サイトにおいて、ヒトが類人猿とは異なる塩基であれば、最大節約原理を適用して、チンパンジーとの共通祖先から別れた後のヒトの系統で塩基置換したと高い確率で推定できる。

すでに神経伝達物質受容体遺伝子などの脳神経系で主として発現している遺伝子30座位について分析したが、現在は Hox クラスター A の領域 20kb 余を、チンパンジー、ゴリ

ラ、オランウータンのゲノムDNAを用いて配列決定を行った。その結果、遺伝子間領域でもヒトとチンパンジーの違いは0.9%にすぎず、進化的に保存されている可能性が指摘された。一方、種内変異に関する研究も進めており、ミトコンドリアDNAのDループおよび16SrRNA遺伝子の配列決定を行って類人猿各種の種内変異を推定した。その結果、大部分の種でヒトよりも大きな変異が観察された。なお、shotgun方式による配列決定のために、ゴリラのフォスミドライブラリーを構築中である。

(7) 霊長類におけるABO式血液型遺伝子の進化：野田令子，北野 誉，竹中 修¹，斎藤成也¹ (京大・霊長類研)

ABO式血液型を決定しているのは血球表面の糖鎖であり、その遺伝子は糖転移酵素をコードしている。A型とB型の違いはこの糖転移酵素活性の違いに基づくが、2個のアミノ酸サイトによって決定されており、この多型はヒトのみならず広く霊長類に存在することが知られている。我々はこの遺伝子座が霊長類の中でどのように進化してきたのかを明らかにするため、まずチンパンジー19遺伝子座、ボノボ8遺伝子座、ニホンザル2遺伝子座の第6イントロン及び第7エキソンの塩基配列(約1.7kb)を決定した。またニホンザル3遺伝子座の第7エキソン(約0.5kb)の塩基配列も決定し、既に報告されている他種の配列と比較解析を行った。その結果、類人猿と旧世界猿の系統においてA型とB型の間の変換が独自に生じている可能性が示唆された。またマカクにおけるA型とB型の多型はヒビの系統とは独自に生じたと考えられる。ニホンザルの配列及びすでに報告されている他のマカク・ヒビの配列の多重整列結果をもとに、ネットワーク解析を行ったところ非常に複雑なネットワークが得られた。アカゲザル・カニクイザルおよびニホンザルのB型の配列は非常によく似ており、クラスターを形成している。一方でアカゲザルとカニクイザルのA型の配列はそれらとは離れていることが明らかになり、A型とB型の多型がこの3種では種を超えて保存されていることが読みとれた。この結果はGGs(Noda *et al.*, 2000)に論文として発表し、またチンパンジーおよびゴリラ2遺伝子座の配列とも解析を行い、霊長類研究に発表した。またこれらの研究成果を日本霊長類学会第16回大会、日本進化学会第2回大会、および日本分子生物学会第23回大会において発表した。

(8) 陸上甲虫オサムシの分子系統と形態進化：金 衝坤，蘇 智慧¹，大澤省三¹ (JT生命誌研究館)

オサムシは主に北半球に生殖している長さ2-3cmの肉食甲虫である。これは普通、後翅が退化しているため、移動は歩く方法しか持っていない。従って河川や山地などで囲まれた地域ごとに隔離されてきた。つまり、オサムシは分布地域ごとに進化の足跡がくっきり残っている生物である。この研究では、主にミトコンドリアDNAの塩基配列をもとに分子系統樹を作成し、1) 形態と重ね合わせることによって客観性の高い分類系統体系を確立すること、2) 地史との関連において、分布圏成立のシナリオを描くこと、および、3) 形態多様化(進化)の様式を推定することを目的としている。日本のクロナガ

オサムシ属は、クロナガ group (クロナガオサ, オオクロナガオサ, シコククロナガオサ, キュウシュウクロナガオサ) と、コクロナガオサ group に分けられている。朝鮮半島にもクロナガ group (*L. koreanus*) とコクロナガ group (*L. semiopacus*, *L. seishinensis*) が分布しており、クロナガ同志、コクロナガ同志がそれぞれ近縁とされている。しかし、mtND5 と核 28SrRNA 遺伝子の系統解析では、日本のクロナガと日本のコクロナガ、韓国のクロナガと韓国のコクロナガが、それぞれクラスターを形成し近縁であることが判明した(これらの結果を Kim *et al.*, 2000a, b; Tominaga *et al.*, 2000 にて発表した)。(9) 2500 年前から現在までの中国の人類集団の時間的变化: Wang Li¹, 太田博樹², 斎藤成也, Jin Feng¹, 植田信太郎²(¹中国科学院遺伝研究所, ²東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻)

生物集団の歴史を記述するには、理想的には過去から現在までのすべての時間変化を追うことのできるデータが必要である。残念ながら、実際には現在の集団のみの情報をもとに歴史を復元する場合が大部分である。しかし、ancientDNA を用いれば、多少は過去の状況を直接知ることができる。われわれは、中国山東省の付け根にある、春秋戦国時代の齊の国の都 Linzi から出土した、2500 年前に埋葬された人骨 63 個体から 34 個体についてミトコンドリア DNA の塩基配列を決定した。これらの配列データを、以前発表した同一地点の 2000 年前および現代集団の塩基配列ならびにユーラシアの他の集団と系統ネットワーク法および集団間の遺伝距離解析を用いて比較したところ、2500 年前の Linzi 集団が最も遺伝的に近縁だったのは、現代ヨーロッパ集団だった。一方、2000 年前の Linzi 集団は東西ユーラシアの集団の中間に位置し、現在の Linzi 集団は他の現代アジア集団と近縁であった。この結果は、過去 2500 年間のあいだに、中国内人類集団の遺伝的構成に大きな変動があったことを示唆する。

研究業績

(1) 原著論文

1. Okamura, A., Pendon, C., Valdivia, M. M., Ikemura, T. and Fukagawa, T.: Gene structure, chromosomal localization and immunolocalization of chicken centromere proteins CENP-C and ZW10. *Gene*, **262**, 283-290, 2001.
2. Nakamura, Y., Gojobori, T. and Ikemura, T.: Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic Acids Research*, **28**, 292(2000).
3. Kanaya, S., Fukagawa, T., Ando, A., Inoko, H., Kudo, Y. and Ikemura, T.: Distribution of polypurine/polypyrimidine tract sequences in the human MHC region and their possible functions. In: *Major Histocompatibility Complex*, Springer-Verlag Berlin/Heidelberg/New York/Tokyo, 131-145, 2000.
4. Ohno, M., Tenzen, T., Watanabe, Y., Yamagata, T., Kanaya, S. and Ikemura, T.: Non-B DNA structures spatially and sequence-specifically associated with

- individual centromeres in the human interphase nucleus. *Chromosomes Today*, **13**, 57-69, 2000.
5. Nogami, M., Nogami, O., Kagotani, K., Taguchi, H., Ikemura, T. and Okumura, K.: Intracellular arrangement of human chromosome 12 correlates to large-scale replication domains. *Chromosoma*, **108**, 514-522, 2000.
 6. Watanabe, Y., Tenzen, T., Nagasaka, Y., Inoko, H. and Ikemura, T.: Replication timing of the human X-inactivation center (XIC) region: correlation with chromosome bands. *Gene*, **252**, 163-172, 2000.
 7. Nogami, M., Kohda, A., Taguchi, H., Nakao, M., Ikemura, T. and Okumura, K.: Relative locations of the centromere and imprinted SNRPN gene within chromosome 15 territories during the cell cycle in HL60 cells. *Journal of Cell Science* **113**, 2157-2165, 2000.
 8. Uemura, T., Kubo, E., Kanari, Y., Ikemura, T., Tatsumi, K. and Muto, M.: Temporal and spatial localization of novel nuclear protein NP95 in mitotic and meiotic cells. *Cell Structure and Function*, **25**, 149-159, 2000.
 9. Sumiyama, K., Kitano, T., Noda, R., Ueda, S., Ferrell, R. and Saitou, N.: Sequence variation in the ABO blood group gene exon 7 of chimpanzee and bonobo. *Gene*, **259**, 75-79, 2000.
 10. Wang L., Oota, H., Saitou, N., Jin, F., Matsushita, T. and Ueda, S.: Genetic structure of a 2500-year-old human population in China and its spatiotemporal changes. *Molecular Biology and Evolution*, vol. **17**, no.9, pp. 1396-1400, 2000.
 11. Kitano, T. and Saitou, N.: Evolutionary history of the Rh blood group-related genes in vertebrates. *Immunogenetics*, vol. **51**, no.7, pp. 856-862, 2000.
 12. Noda, R., Kitano, T., Takenaka, O. and Saitou, N.: Evolution of the ABO blood group gene in Japanese macaque. *Genes and Genetic Systems*, vol. **75**, no. 3, pp. 141-147, 2000.
 13. Kitano, T., Noda, R., Sumiyama, K., Ferrell, R.E. and Saitou, N.: Gene diversity of chimpanzee ABO blood group elucidated from intron 6 sequences. *Journal of Heredity*, vol. **91**, no.3, pp. 211-214, 2000.
 14. Kikuchi, M., Misu, S., Imanishi, T. and Saitou, N.: CAMUS DB: Development of structural database for homology search. In Miyano, S., Shamir, R. and Takagi, T. (eds.), "Currents in Computational Molecular Biology", Universal Academy Press, Tokyo, pp. 80-81, 2000.
 15. Saitou, N.: Programs for constructing phylogenetic trees and networks of closely related sequences. In Iwatuki, K. (ed.), "IIAS International Symposium on Biodiversity", International Institute for Advanced Studies, Kyoto, pp. 45-50, 2000.

16. Kim, C.-G., Zhou, H.-Z., Imura, Y., Tominaga, O., Su, Z.-H. and Osawa, S.: Pattern of the morphological diversification in the *Leptocarabus* ground beetles (Coleoptera, Carabidae) as deduced from mitochondrial ND gene and nuclear 28S rDNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* 17: 137-145, 2000.
17. Kim, C.-G., Tominaga, O., Su, Z.-H. and Osawa, S.: Differentiation within the genus *Leptocarabus* (excl. *L. kurilensis*) in the Japanese Islands as deduced from mitochondrial ND5 gene sequences (Coleoptera, Carabidae) *Genes and Genetic Systems*, vol. 75, pp. 335-342, 2000.
18. Tominaga, O., Su, Z.-H., Kim, C.-G., Okamoto, M., Imura, Y. and Osawa, S.: Establishment of the Carabina fauna in the Japanese Islands inferred from Phylogenetic trees of mitochondrial ND5 gene sequences (Coleoptera, Carabidae). *J. Mol. Evol.* 50: 541-549, 2000.

(2) その他

1. 深川竜郎：動物細胞を用いた遺伝学的解析法-DT40細胞を用いた温度感受性変異株の単離とその応用。遺伝子医学 4, 457-462, 2000.
2. 深川竜郎：遺伝子相同組換えを用いた温度感受性変異株の単離法とその応用。実験医学 18, 2706-2707, 2000.
3. 斎藤成也：序論。「特集：人類の起源と進化をDNAレベルで探る」。蛋白質核酸酵素, 45巻16号, 2567-2570頁。(2000)
4. 斎藤成也：類人猿ゲノム計画 Silver。「特集：人類の起源と進化をDNAレベルで探る」。蛋白質核酸酵素, 45巻16号, 2604-2611頁。(2000)
5. 斎藤成也：霊長類のゲノム計画。学術月報, 53巻10号, 1082-1086頁。(2000)
6. 野田令子・斎藤成也：チンパンジーとニホンザルにおけるABO式血液型遺伝子の進化。霊長類研究, 16巻2号, 157-167頁。(2000)
7. 斎藤成也：類人猿ゲノム計画。霊長類研究, 16巻2号, 169-175頁。(2000)
8. 斎藤成也：遺伝子からみた人類の起源。国立科学博物館ニュース, No. 376, 11-13頁。(2000)
9. 斎藤成也：ヒトゲノム計画はいま。これまでの経緯とポスト・ヒトゲノム計画への道すじ。化学, Vol. 55, No. 4, 12-17頁。(2000)
10. 斎藤成也：類人猿ゲノム-Silver計画。科学, 4月号, 231-233頁。(2000)
11. 斎藤成也：遺伝子系統樹から生物進化を捉える。動物遺伝育種シンポジウム組織委員会編, 『家畜ゲノムと新たな家畜育種戦略』, 401-406頁, 畜産技術協会。(2000)
12. 斎藤成也：トピックス：日本進化学会の設立。遺伝, 54巻2号, 11-12頁。(2000)
13. 斎藤成也・五條堀孝：日本DNAデータバンクの「フィールドワーク」。サイアス, 2月号, 64-65頁。(2000)

(3) 発表講演

1. Ikemura, T.: Borders of isochores and of replication-timing zones: Evolutionary implication of correlation between the two borders. Anton Dohrn Workshop "Neutralism and Selectionism: the end of a debate", May 4-6, 2000, Italy.
2. 深川竜郎: DT40 細胞を用いたセントロメア・CENP-C の機能解析. 文部省科学研究費特定領域研究(A) 公開シンポジウム "細胞複製装置と DNA 修復装置の共役", 大阪, 1 月.
3. 深川竜郎, William Brown, 池村淑道: DT40 細胞を用いた CENP-C の機能解析. 第 17 回染色体ワークショップ, 神戸, 1 月.
4. Fukagawa T., Brown, W. and Ikemura T.: Functional analyses of CENP-C in the DT40 cell line. EMBO Workshop on "Centromere, Kinetochore and Spindle Interaction", Heidelberg, Germany, 10 月.
5. 池村淑道: ヒト細胞核内に存在する三重鎖の染色体 DNA 収納における役割. 日本生化学会, 横浜, 10 月.
6. 高見恭成, 深川竜郎, Ahyar Ahmad, 池村淑道, 中山建男: ジーンノックアウト法を用いた CAF-1 p48 の機能解析. 日本生化学会, 横浜, 10 月.
7. 池村淑道: ヒトゲノム上に存在する三重鎖形成能を持つ配列のゲノム上ならびに核内での配置. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月.
8. 深川竜郎, 岡村 淳, 三上剛和, 西橋 藍, 池村淑道: DT40 細胞を用いた各種セントロメアタンパク質の機能解析. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月.
9. 岡村 淳, 池村淑道, 深川竜郎: セントロメアタンパク質 ZW10 の機能解析. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月.
10. 三上剛和, 西橋 藍, 須賀田直子, 戸所一雄, 池村淑道, 深川竜郎: 新規セントロメアタンパク質 CENP-H の機能解析. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月.
11. 渡辺良久, 藤山秋佐夫, 榎 佳之, 池村淑道: ヒト染色体 11 番長腕と 21 番全域の S 期内複製時期地図の作成ならびにバンド境界の配列レベルでの特定. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月.
12. 高見恭成, 深川竜郎, Ahyar Ahmad, 池村淑道, 中山建男: ジーンノックアウト法を用いた CAF-1 p48 (RbAp48) の機能解析. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月.
13. Watanabe, Y., Fujiyama, A., Sakaki, Y. and Ikemura, T.: Genome-wide approach to put landmarks with biological significance along the human genome by defining transition zones for replication timing and GC% level. International Symposium "Evolution 2000", March 5-7, 2000, Japan.
14. 斎藤成也: 遺伝子の系統関係と生物種の系統関係. 日本動物分類学関連学会連合設立記念シンポジウム. 国立科学博物館分館, 東京, 1 月 8 日.
15. 斎藤成也: 塩基配列データにもとづく核遺伝子 20 座位の遺伝子系図. 「野生マウスの遺伝的背景の進化的位置」に関する会議. 総合研究大学院大学, 葉山, 1 月 13 日.
16. 斎藤成也: ミトコンドリア DNA 配列の系統樹とネットワークによる大規模解析. 数

- 理人類遺伝学研究会. 東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター, 東京, 1月28日.
17. Saitou, N.: Evolution of ABO and Rh blood group genes in primates and Ape Genome Project Silver. Toulouse, France, February 12.
 18. Saitou, N.: Evolution of ABO blood group genes in primates and Ape Genome Project Silver. Nimejen, Netherland, February 15.
 19. Saitou, N.: Evolution of ABO blood group genes in primates and Ape Genome Project Silver. Max-Planck Institute of Molecular Anthropology, Leipzig, Germany, February 16.
 20. Saitou, N., Kitano, T. and Kobayakawa, H.: Project Silver: an ape genome project toward deciphering genetic changes responsible for creating humanness. International Symposium "Evolution 2000" at Tokyo, March 5-7.
 21. Kitano, T. and Saitou, N.: Evolutionary history of the Rh blood group-related genes in vertebrates. International Symposium "Evolution 2000" at Tokyo, March 5-7.
 22. Kitano, T., Sumiyama, K., Noda, R., Ferrell, R.E. and Saitou, N.: Gene diversity of chimpanzee ABO blood group genes elucidated from intron 6 and exon 7 sequences. International Symposium "Evolution 2000" at Tokyo, March 5-7.
 23. Noda, R., Kitano, T., Sumiyama, K., Takenaka, O. and Saitou, N.: Evolution of the ABO blood group gene in primates. International Symposium "Evolution 2000" at Tokyo, March 5-7.
 24. Liu, Y.-H., Kitano, T., Kobayakawa, H., Koide, T., Shiroishi, T., Moriwaki, K. and Saitou, N.: Conspicuous differences among gene genealogies of 21 nuclear genes of five *Mus musculus* subspecies. International Symposium "Evolution 2000" at Tokyo, March 5-7.
 25. 斎藤成也: 遺伝子系統樹. 高知医科大学医学部附属医学情報センター, 3月10日.
 26. Saitou, N.: Silver: Ape Genome Sequencing Project. Symposium on Great Apes Phenotypes and genotypes. Banbury Center, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA, March 19-22.
 27. Saitou, N.: Network representation of trees. German-Japanese Seminar on "Methods of reconstructing evolutionary history of genes". National Institute of Genetics, Mishima, March 26-28.
 28. Kikuchi, M., Misu, S., Imanishi, T. and Saitou, N.: CAMUS DB: Development of a structured database for efficient homology search. RECOMB2000, Tokyo Bigsight, Tokyo, April 9-11.
 29. Kitano, T., Kobayakawa, H., Liu, Y.-H., Ueda, S., Ferrell, R.E. and Saitou, N.: Silver Project: Ape genome project toward deciphering genetic changes responsible for creating humanness. American Association of Physical

- Anthropologists annual meeting, San Antonio, Texas, USA, April 14.
30. Saitou, N.:Influence of introgression depicted from multiple comparison of gene genealogies. Workshop "Neutralism and Selectionism:the end of a debate". Stazione Zoologica Anton Dohrn, Benthos Ecology Laboratory, Ischia Porto, Italy, May 4.
 31. 斎藤成也：ヒトからバクテリアにおける糖転移酵素遺伝子の多様性と進化. バイオテクノロジー開発技術研究組合勉強会, 東京, 5月25日.
 32. Saitou, N.:Evolution of hominoid genome with special reference to blood group genes. Institute of Botany, University of Duesseldorf, Germany, June 7.
 33. Saitou, N.:Simultaneous Sequence Joining (SSJ):a new method for constructing phylogenetic networks. Workshop "Combinatorial Methods in Biological data analysis". Department of Mathematics,University of Bielefeld,Germany, June 8.
 34. Saitou, N.:Ape genome project Silver with special reference to evolution of blood group genes in hominoids. Department of Biological Evolution,University of Pompeu Fabra, Barcelona, Spain, June 13.
 35. Liu, Y.-H., Kitano, T., Kobayakawa, H., Koide, T., Shiroishi, T., Moriwaki, K. and Saitou, N.:Conspicuous differences among gene genealogies of 21 nuclear genes of five *Mus musculus* subspecies. Annual Meeting of the Society for Molecular Biology and Evolution (SMBE2000). Yale University, New Haven, USA, June 19.
 36. 斎藤成也：霊長類シンポジウム・京大霊長類研究所・犬山・7月。
 37. 野田令子, 斎藤成也：チンパンジーとニホンザルにおけるABO式血液型遺伝子の進化。霊長類シンポジウム・京大霊長類研究所・犬山・7月。
 38. 北野 誉, 小早川英美, 劉玉華, 植田信太郎, Ferrell R.E., 斎藤成也：Silver:類人猿ゲノム計画。霊長類学会, 名古屋東海学園大学, 7月8日。
 39. 野田令子, 北野 誉, Robert E.Ferrell, 竹中 修, 斎藤成也：霊長類におけるABO式血液型遺伝子の進化。第16回日本霊長類学会・名古屋東海学園大学・名古屋, 7月8日。
 40. 金 衝坤：類人猿Hox クラスターAの塩基配列。類人猿を中心とする霊長類ゲノム研究会, 三島, 9月。
 41. 斎藤成也：大規模ゲノム計画時代における遺伝子進化の研究。富士レビオ(株)中央研究所, 9月29日。
 42. 斎藤成也：類人猿を例とした近縁種ゲノム解析。日本進化学会第2回大会, 東京, 10月9日。
 43. 金 衝坤, 野田令子, 青島昌子, 鈴木真有美, 北野 誉, 斎藤成也：類人猿ゲノム計画 Silver-HOX A クラスターの塩基配列比較。日本進化学会第2回大会, 東京, 10月。

44. 嶋田 誠：savanna monkey (*Cercopithecus aethiops*) の亜種内および亜種間におけるミトコンドリア DNA 分化，日本進化学会第 2 回大会，東京，10 月。
45. 野田令子，竹中 修，斎藤成也：ABO 式血液型遺伝子を中心とした旧世界猿の分子進化学的研究．第 2 回日本進化学会，東京，10 月。
46. 斎藤成也：類人猿ゲノム計画 Silver．第 3 回 SAAGA シンポジウム，犬山，11 月。
47. 嶋田 誠，早川祥子，杉山幸丸：西アフリカ，ボソウおよびニンバの野生チンパンジー群における生態学的・集団遺伝学的研究(予報)．第 3 回 SAAGA シンポジウム，犬山，11 月。
48. 金 衝坤，野田令子，青島昌子，鈴木真有美，北野 誉，斎藤成也：類人猿ゲノム計画 Silver-HOX A クラスターの塩基配列比較．日本分子生物学会第 23 回，神戸，12 月。
49. 野田令子，竹中 修，北野 誉，斎藤成也：ABO 式血液型遺伝子を中心とした類人猿の分子進化学的研究．第 23 回日本分子生物学会，神戸，12 月。
50. 斎藤成也，金 衝坤，野田令子，青島昌子，鈴木真有美，北野 誉：類人猿ゲノム計画 Silver．文部省科学研究費特定領域研究 C「統合ゲノム」班会議，熱海，12 月。

D-c. 理論遺伝研究部門

発生における自発的パターン形成：近藤 滋

生命現象の理解を難しくしている原因の一つは，現象に関与する要素の多さと，要素と間の関係の複雑さにある．ゲノム解析が進み，全ての遺伝子産物の働きがわかったとしても，個々の遺伝子(分子)による相互作用が時間的，空間的広がりを持って起きる様子を想像することは非常に困難である．この点を克服する手段として，計算機によるシミュレーションが考えられるが，現状では，実際の研究に役に立つレベルからはほど遠い．本研究室では，生物現象のシミュレーション解析技術の開発に適したモデル系としてゼブラフィッシュの模様形成現象を選び，シミュレーションの有効性を高める技術を開発することを目的に研究を進めている．

タテジマキンチャクダイや他の魚類の模様変化の観察から，魚の模様が「波」であることは確かめられているが，その化学的な実体はまったく解っていない．ゼブラフィッシュでは，いくつかの模様変異の変異株が単離されており，その遺伝子をクローニングしていくことにより，ある程度の目星がつくと期待される．一方，位置情報形成の場としての皮膚構造の解明も非常に重要である．現在，反応拡散の波が皮膚のどの層に存在するか，どの細胞が波を作っているかに焦点を絞り，解析を進めている．

これまでに，主に電子顕微鏡による解析と，移植実験から以下のことが解っている．

- (1)ゼブラフィッシュの皮膚は，上皮，真皮，色素細胞層からできているが，メラノフォア，イリドフォアが色素細胞層に偏在するのに対し，ザントフォアは真皮層に存在する．
- (2)移植実験から位置情報は真皮層にあることがわかった．

(3)キメラ実験から、メラノフォア(黒色色素細胞)自体は、位置情報形成に関係がないことが解った。今後これらの結果を踏まえ、さらに模様変異遺伝子のデータを加えることにより、分子情報に基づいたシミュレーションを行うことにより、位置情報形成メカニズムの謎に迫りたい。

研究業績

(1) 原著論文

1. 近藤 滋：生物の模様を作る科学反応。数理科学, Vol. 45, No. 17, 2759-2765, 12月, 2000.
2. 近藤 滋：動物の皮膚はどのようにしてできるか。遺伝子医学, Vol. 4, No. 4, 358-362, 12月, 2000.

(2) 発表講演

1. 近藤 滋：自発的パターン形成の数理と実験。日本発生学会ワークショップ, 高知大学, 5月24日。
2. 近藤 滋：複雑な現象を理解するための構成的アプローチ。日本生化学会シンポジウム, 横浜, 10月12日。
3. 近藤 滋：高次生命現象を、分子生物学でどこまで理解可能か。日本分子生物学会, 神戸, 12月16日。
4. 近藤 滋：動物の形態形成にかかわる動的メカニズムとその遺伝子制御。日本人類遺伝学会, アクロス福岡, 11月24日。
5. 近藤 滋：チューリング波と形態形成の位置情報。電顕皮膚科学会, アクロス福岡, 9月28日。
6. 近藤 滋：動物の体に位置情報を作り出すメカニズム。細胞生物学会, アクロス福岡, 11月28日。
7. Kondoh, S.:The first international symposium on molecular synchronization for design of new materials system. Tokyo, Japan, September 11.

E. 総合遺伝研究系

E-a. 人類遺伝研究部門

この部門では、ヒトの正常および異常な形質にかかわる遺伝現象を、分子・細胞・個体レベルで研究し、それらを総合的に理解することをめざしている。教授・佐々木裕之の研究グループは哺乳類の発生過程におけるエピジェネティックな遺伝子発現調節の解明をテーマに据え、とくにゲノムインプリンティング(ゲノム刷込み)の分子機構を中心に研究を行っている。インプリンティングは、父・母由来の対立遺伝子間に発現差をも

たらず現象, 非メンデル遺伝を示す現象, あるいは哺乳類の単為生殖を妨げる現象として知られ, 種々の先天異常やがんとも関連している. 当部門では, 個体レベルの実験が可能なマウスをモデルとして, ゲノム解析技術と発生工学技術を駆使してこの現象の解明をめざしている. 助手・佐渡 敬は, やはり哺乳類のエピジェネティックな遺伝子調節の代表である X 染色体不活性化について研究している. 長らく謎であったその分子機構は, ここ数年で飛躍的に理解が進んだもののまだ不明な点が多い. マウス個体および胚性幹(ES)細胞を用いて *in vivo*, *in vitro* の両面からの解析を進めている. 当研究グループの本年度の在籍者は, 教授・佐々木裕之, 助手・佐渡 敬のほか, 遺伝学普及会研究員・白水久男, 総研大大学院生・石原 宏, 辻本直美, 横峯孝昭, 金田正弘, 特別共同利用研究員(九大大学院生)・ワヒューブルボワシト, 研究生・熊木健治, 技術課職員・古海弘康, 研究補助員・須田知賀子, 上林美奈子, 事務員・芳賀弘子であった.

助教授・藤山秋佐夫の研究グループは, 前年度に引き続き分裂酵母及びヒトを材料に全ゲノムのネットワーク解析研究, 染色体テロメア, セントロメア領域の構造解析研究を実施した.

本年度の研究は, 遺伝学研究所校費, 総研大校費のほか, 科学研究費特定領域研究(A)「ゲノムサイエンス」(佐々木), 特定領域研究(C)「ゲノム生物学」(佐々木), 特定領域研究(C)「発がんと防御」(佐々木), 奨励研究(A) (佐渡), 特別研究員奨励費(石原), 上原記念生命科学財団研究助成金(佐々木)の支援を受けた. また, 共同研究として, 遺伝学研究所共同研究(A)「哺乳類ポリコーム群遺伝子産物による転写制御メカニズムの解明(代表者・古関明彦・千葉大教授)」(佐々木), 共同研究(A)「先天的疾患および腫瘍における DNA メチル基転移酵素遺伝子の解析(代表者・久保田健夫・国立精神神経セ)」(佐々木), 共同研究(B)「鳥類における性染色体の遺伝子量補償機構に関する分子生物学的研究(代表者・松田洋一・北大教授)」(佐々木), および総研大共同研究「人間理解の科学的基礎: 脳活動の物質的および費物質的側面(代表者・森 茂美・生理研教授)」(佐々木)に参加した. (1) マウス 7F4/F5 領域のインプリンティングドメインのゲノム構造解析: 佐々木裕之, 須田知賀子, 白水久男, ワヒューブルボワシト¹, 向井常博², 服部正平³, 榎 佳之³ (1) 九大・遺伝情報, ² 佐賀医大・生化, ³ 理研・ゲノム)

ゲノムインプリンティングを受ける遺伝子の多くはゲノム上でクラスターを形成し, インプリンティングドメインを構成している. この事実は, インプリンティングの機構や進化を考えるうえで重要なヒントを含んでいると思われる. 当部門では, 少なくとも 8 つのインプリンティング遺伝子を含むマウス第 7 染色体 F4/F5 領域の全構造を明らかにすべく, およそ 1Mb をカバーする YAC, BAC, コスミドコンティグを作成し, 佐賀医大, 理化学研究所と共同でその全塩基配列を決定した(DDBJ に登録し, 一部の解析結果は論文 2 に報告). また, コスミドクローンをを用いた核マトリクス付着部位のマッピングを開始した. このインプリンティング領域はヒトの 11p15. 5 領域に相当し, Beckwith-Wiedemann 症候群, 各種小児がんの責任領域でもあることから, 今後これらの疾患が解

明されることが期待される。

(2) マウス *Igf2/H19* サブドメインの制御機構：佐々木裕之、石原 宏、古海弘康、大野みずぎ¹、植田孝之²、木南 凌³、梅澤明弘⁴(¹九大・遺伝情報、²新潟大・遺伝子、³新潟大・医、⁴慶大・医)

このインプリンティングドメインのセントロメア端にある *Igf2/H19* 両遺伝子は、下流に共通のエンハンサーをもち、一方の遺伝子だけがエンハンサーによる活性化を受けることで、対立遺伝子特異的発現を示す。当研究室では、マウス-ヒト間の塩基配列比較により、*H19* 下流に5個の進化的に保存された組織特異的エンハンサーを同定した(論文1)。また、*H19* 上流のDMR(differentially methylated region)に5回繰り返して存在する保存された配列を見つけ、ゲルシフト法でこれらの配列に結合するメチル化感受性蛋白質(標的配列がメチル化されると結合が弱くなる)があることを報告した(論文1)。のちにこの蛋白質はインスレータ蛋白質 CTCF であることが判明した。

DMRのメチル化の違いが父・母由来の対立遺伝子を区別するインプリントならば、その違いは配偶子に由来するはずである。当研究室では、*H19*の父由来特異的なメチル化が精子の前駆細胞であるプロ精原細胞の時期に確立されることを発見した(論文3)。また、この精子のメチル化をヒトでも示した(論文9)。さらに、父・母由来の対立遺伝子からの新生転写物を多型を利用して区別するRNA-FISH法を開発し、*Igf2*の対立遺伝子特異的発現は胚盤胞期に確立されること、胚を培養すると対立遺伝子特異的発現が乱れることを発見した(論文6)。最後に、インプリント遺伝子の対立遺伝子間でクロマチン凝縮度に違いがあることを示した(論文4)。

(3) *de novo*型DNAメチル化酵素 *Dnmt3a/Dnmt3b*のインプリンティングにおける役割：佐々木裕之、辻本直美、金田正弘、田嶋正二¹(¹阪大・蛋白研)

配偶子形成過程におけるインプリンティングの成立機構を探るため、*de novo*型DNAメチル化酵素 *Dnmt3a/Dnmt3b*の生殖巣での発現を調べている。その結果、雄のプロ精原細胞において特定のDNAメチル化酵素が存在することを見つけた。また、生殖細胞特異的にこれらの酵素遺伝子をノックアウトする準備を始めた。

(4) *de novo*型DNAメチルトランスフェラーゼ *DNMT3A/DNMT3B*とヒトの疾患：佐々木裕之、白水久男、水野晋一¹、久保田健夫²、田嶋正二³(¹九大・遺伝情報、²国立精神神経セ、³阪大・蛋白研)

各種のがんにおいてがん抑制遺伝子はしばしばメチル化され、そのために活性を失っている。急性骨髄性白血病ではがん抑制遺伝子 *p15* がメチル化を受けるが、そのような症例では3つのDNAメチル化酵素 *DNMT1/DNMT3A/DNMT3B*の発現が上昇していた(論文5)。また、*DNMT3B*はICF(immunodeficiency, centromeric instability, facial anomalies)症候群の原因遺伝子であるため、国内の2症例の遺伝子解析を行い変異を同定した。

(5) ニワトリにおけるゲノムインプリンティングと遺伝子量補償の検討：佐々木裕之、

横峯孝昭, 黒岩麻里¹, 松田洋一¹, 都築政起²(¹北大・染色体研, ²広大・生物生産)

インプリンティングは哺乳類に特有の現象だと考えられているが, その進化の理由を知るためには, 他の動物種の検討が必須である. そこで鳥類を選び, ニワトリ系統間のDNA多型を利用して, *IGF2*と*IGF2R/MPR*(ともに哺乳類ではインプリンティングを受ける)がインプリンティングを受けないことを示した(論文8). また, ニワトリの性染色体の量補償の有無を調べ, Z染色体は不活性化を受けないことを示した. さらに, ニワトリのDNAメチル化酵素*DNMT3A/DNMT3B*遺伝子を単離し, 哺乳類のホモログと機能的な比較をすることにより, インプリンティングや性染色体量補償の違いについてヒントが得られないか検討を始めた.

(6) ポリコーム遺伝子群のインプリンティングへの関与の検討: 佐々木裕之, 辻本直美, 古関明彦¹(¹千葉大・大学院)

ポリコーム群蛋白質はクロマチンの構成成分であり, 一般に遺伝子の抑制やインスレータ機能にかかわっている. ポリコーム群蛋白質のインプリンティングへの関与を検討するため, 2つのポリコーム遺伝子*Mel-18*, *Bmi-1*のノックアウトマウスにおいてインプリンティング遺伝子の発現を調べたが, 異常は見られなかった.

(7) *Xist* 遺伝子領域に見出されたアンチセンスRNAの解析: 佐渡 敬, 佐々木裕之, En Li¹(¹CVRC, MGH, USA)

*Xist*はX染色体不活性化に必須の遺伝子であるが, その転写産物はタンパク質に翻訳されず, RNAとして機能していると考えられる. 我々は*Xist* 遺伝子領域にその転写ユニットを完全に含むアンチセンスRNA(*Tsix*)を見出した. *Tsix*もまたタンパク質に翻訳されないRNAと見られる. *Xist* 遺伝子の発現調節機構に*Tsix*が関わっている可能性を検討するため, *Tsix*のノックアウトマウスを作製して調べたところ, *Tsix*欠損X染色体からの*Xist* 遺伝子の異所的発現とそれに伴う異所的X染色体不活性化が認められた. このことから, *Tsix*は*Xist*の発現を調節する因子として, X染色体不活性化機構において重要な役割を果たしていることが分かった(原著論文7). なお, この研究はThe 14th International Mouse Genome Conferenceにおいてベストポスター賞を受賞した.

(8) 分裂酵母の遺伝子機能ネットワークに関する研究: 檀上稲穂¹, Bong Yong-Sik², 阿久津達也³, 藤山秋佐夫¹(¹マックスプランク研究所・放射線影響研究所, ²総研大, ³東大医科学研究所)

ゲノムの構造情報が指数関数的勢いで蓄積されつつあるが, それがゲノム研究の本来的な目的ではない. 現在力が注がれているmapping & sequencingは, 80年代の分子生物学が遺伝子の構造情報をもとにして発展したように, ゲノムの構造情報に基づいた遺伝子群(遺伝子ネットワーク)の機能研究(Functional Genomics)を行うための基盤作りである. 我々は既にゲノム構造が決められた出芽酵母と近縁の分裂酵母(これもゲノムの配列決定が進められている)を用い, ras蛋白質の下流で発現を制御されている全遺伝子をカタログ化する事を目的に分裂酵母ゲノムDNAマイクロアレイと解析用ソフト

ウェアシステムの開発を行った。現在、ras- 遺伝子の欠損化など各種の条件に特異的に発現量が変化する遺伝子群のカタログ化を行っている。

(9) 染色体特異的ライブラリの作成とセントロメア、テロメア領域の構造解析：藤山秋佐夫、遠藤明子¹、遠藤光子¹(東邦大学)

ソーティングにより純化したヒト染色体をDNA材料とし、#9～#12を除くヒトの染色体特異的ライブラリの作成を世界で初めて完成させた。今後10年のヒトゲノム解析およびその後に行われるであろう機能解析のための研究資料として重要なものである。この材料を用い、ヒト21番染色体のセントロメア、テロメア領域の構造解析を行った。

(10) ヒト11番染色体長腕、ヒト18番全染色体ドラフト配列決定：藤山秋佐夫、服部正平¹、榊佳之^{1,2}、矢田哲士¹、伊藤武彦³(¹理化学研究所ゲノム科学総合研究センター、²東京大学医科学研究所、³三菱総合研究所)

ヒト全ゲノムの90%について多重度5のドラフト配列を決定させる国際コンソーシアム計画ののっとり、11番染色体長腕、18番全染色体について物理地図を作製し概要配列を決定した。現在11番染色体について99%をカバーする領域の配列解析が終了している。また、この計画に必要な地図情報をネット上から自動的に収集し図示するIMAPシステムを構築した。

(11) 単離染色体を用いた染色体テロメア領域の解析：藤山秋佐夫、瀧本光弘¹、須田剛士¹(¹新潟大学医学部)

染色体ソーターの改良により、かなりの程度に純粋なヒト染色体を大量に得ることが可能になった。単離可能なヒト染色体についてテロメア長の変動を測定した結果、テロメア長と染色体サイズに相関関係のあることを示唆する結果を得た。

(12) 共有結合型DNAチップの開発研究：藤山秋佐夫、井上将亮¹、小川伸哉¹、実吉峯男¹(¹帝京科学大学)

共有結合により、ガラス表面にオリゴヌクレオチドもしくはDNAを結合させる基礎条件について、検討を始めた。これまでに、アミノシリル化ガラス、アビジン化ガラスに対して、500bp程度のDNAもしくはチオール化オリゴヌクレオチドを共有結合させ、ハイブリッド形成効率についての検討を行った。

(13) DNAアレイ発現解析システムの構築に関する研究：藤山秋佐夫、大山彰¹、阿久津達也²(¹三井情報開発、²東京大学医科学研究所)

上記研究課題(13)に関連し、マクロアレイ、マイクロアレイ画像データ解析ソフトウェアの開発を始めた。基本的には、一昨年度までに完成させた2次元ゲルパターン解析ソフトウェアの拡張版とし、定量化機能を持たせることを計画している。

研究業績

(1) 原著論文

1. Ishihara, K., Hatano, N., Furuumi, H., Kato, R., Iwaki, T., Miura, K., Jinno, Y. and Sasaki, H.: Comparative genomic sequencing identifies novel tissue-spe-

- cific enhancers and sequence elements for methylation-sensitive factors implicated in *Igf2/H19* imprinting. *Genome Res.* **10**, 664-671, 2000.
2. Yatsuki, H., Watanabe, H., Hattori, M., Joh, K., Soejima, H., Komoda, H., Xin, Z., Zhu, X., Higashimoto, K., Nishimura, M., Kuratomi, S., Sasaki, H., Sakaki, Y. and Mukai, T.: Sequence-based structural features between *Kvlqt1* and *Tapa1* in mouse chromosome 7F4/F5 corresponding to the Beckwith-Wiedemann syndrome region in human 11p15. 5: long-stretches of unusually well conserved intronic sequence of *Kvlqt1* between mouse and human. *DNA Res.* **7**, 195-206, 2000.
 3. Ueda, T., Abe, K., Miura, A., Yuzuriha, M., Zubair, M., Noguchi, M., Niwa, K., Kawase, Y., Kono, T., Matsuda, Y., Fujimoto, H., Shibata, H., Hayashizaki, Y. and Sasaki, H.: The paternal methylation imprint of the mouse *H19* locus is acquired in the gonocyte stage during fetal testis development. *Genes Cells* **5**, 649-659, 2000.
 4. Watanabe, T., Yoshimura, A., Mishima, Y., Endo, Y., Shiroishi, T., Koide, T., Sasaki, H., Asakura, H. and Kominami, R.: Differential chromatin packaging of genomic imprinted regions between expressed and non-expressed alleles. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 3029-3035, 2000.
 5. Mizuno, S., Chijiwa, T., Okamura, T., Akashi, K., Fukumaki, Y., Niho, Y. and Sasaki, H.: Expression of DNA methyltransferases *DNMT1*, *3A* and *3B* in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. *Blood* (in press).
 6. Ohno, M., Aoki, N. and Sasaki, H.: Allele-specific detection of nascent transcripts by fluorescence *in situ* hybridization reveals temporal and culture-induced changes in *Igf2* imprinting during pre-implantation mouse development. *Genes Cells* (in press).
 7. Sado, T., Wang, Z., Sasaki, H. and Li, E.: Regulation of imprinted X-inactivation in mice by *Tsix*. *Development* (in press).
 8. Yokomine, T., Kuroiwa, A., Tanaka, K., Tsudzuki, M., Matsuda, Y. and Sasaki, H.: Sequence polymorphisms, allelic expression status and chromosomal locations of the chicken *IGF2* and *MPR1* genes. *Cytogenet. Cell Genet* (in press).
 9. Hamatani, T., Sasaki, H., Ishihara, K., Hida, N., Maruyama, T., Yoshimura, Y., Hata, J. and Umezawa, A.: Epigenetic mark sequence of the *H19* gene in human sperm. *Biochim. Biophys. Acta* (in press).
 10. Hattori, M., Fujiyama, A. et al.: The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature* **405**, 311-319, 2000.
 11. Park, H.-S., Nogami, M., Okumura, K., Hattori, M., Sakaki, Y. and Fujiyama, A.: Newly identified repeat sequences, derived from human chromosome 21q-

- ter, are also localized in the subtelomeric region of particular chromosomes and 2q13, and are conserved in the chimpanzee genome. *FEBS Letters* **475**, 167-169, 2000.
12. Bruels, T., Gyapay, G., Petit, J. -L., Artiguenave, F., Vico, V., Qin, S., Tin-Wollam, A. M., DaSilva, C., Muselet, D., Mavel, D., Pelletier, E., Levy, M., Fujiyama, A., Matsuda, F., Wilson, R., Rowen, L., Hood, L., Weissenbach, J., Saurin, W. and Heilig, R.: A clone map of human chromosome 14, *Nature* **409**, 947-948, 2001.
 13. The International Human Genome Consortium including A. Fujiyama and 55 authors: A physical map of the human genome. *Nature* **409**, 934-941, 2001.
 14. The International Human Genome Consortium including A. Fujiyama and 72 authors from international sequencing centers: The human genome: initial sequencing and analysis. *Nature* **409**, 860-921, 2001.

(2) その他

1. Sasaki, H., Ishihara, K. and Kato, R.: Mechanisms of *Igf2/H19* imprinting: DNA methylation, chromatin and long-distance gene regulation(Review). *J. Biochem.* **127**, 711-715, 2000.
2. 佐々木裕之: ゲノムインプリンティングと疾患. *実験医学* **18**, 1076-1080, 2000.
3. 佐渡 敬, 佐々木裕之: 生殖遺伝学とインプリンティング. *病理と臨床* **18**, 1223-1226, 2000.
4. 佐々木裕之: 単為発生とゲノムインプリンティング(第7章). 「バイオサイエンスの新世紀」, 第14巻「生命工学: 新しい生命へのアプローチ(浅島 誠・山村研一編)」(印刷中).
5. 佐渡 敬, 佐々木裕之: ほ乳類の発生におけるDNAメチル化の役割. *細胞工学*(印刷中).
6. 藤山秋佐夫: ゲノムリソース: ヒトゲノムリソースの整備. *現代医療* **32**, 85-88, 2000.
7. 藤山秋佐夫: ゲノムの歩き方. *遺伝* **54**, 21-25, 2000.
8. 藤山秋佐夫: 「遺伝子問題とは何か(青野由利著)」書評. 平凡出版, インターネット出版, 7月, 2000.
9. 榊 佳之, 服部正平, 藤山秋佐夫ほか: ヒト21番染色体の全解説. *蛋白質核酸酵素* **45**, 2520-2527, 2000.
10. 藤山秋佐夫: ヒトの遺伝子はいくつあるか. *遺伝* **54**, 8-9, 2000.
11. 藤山秋佐夫: ヒトゲノム. *理科年表(丸善)*, 1033-1034, 2000.
12. 藤山秋佐夫: ゲノム解析の現状と未来: ヒト, 植物, 細胞工学(印刷中).

(3) 発表講演

1. 佐々木裕之：哺乳動物におけるゲノミックインプリンティング機構．第2回国際シンポジウム，食資源動物の生物学，京都，1月．
2. 辻本直美，千々岩崇仁，田嶋正二，佐々木裕之：哺乳類DNAメチルトランスフェラーゼの細胞内局在．第17回染色体ワークショップ，神戸，1月．
3. 佐渡 敬，Fenner, M.H., Tan, S.S., Tam, P.P.L., Shioda, T. and Li, E.: *Dnmt* 欠損マウス胚におけるX染色体不活性化．第17回染色体ワークショップ，神戸，1月．
4. 佐渡 敬：DNAメチルトランスフェラーゼ(*Dnmt*)欠損マウスにおけるX染色体不活性化．国立遺伝学研究所研究集会：DNAメチル化にもとづくゲノム機能のダイナミズム，三島，3月．
5. Danjoh, I., Bong, Y.-S., Yada, T., Nakai, K. and Fujiyama, A.: Genome-wide screening for house-keeping GGENEs in fission yeast. Cold Spring Harbor meeting "Genome Sequencing and Biology", Cold Spring Harbor, May.
6. Hattori, M., Fujiyama, A. et al.: Human genome sequencing project at RIKEN-GSC: Progress reports on Chr21. 11. and 18. Cold Spring Harbor meeting "Genome Sequencing and Biology", Cold Spring Harbor, May.
7. Watanabe, Y., Fujiyama, A. et al.: High-resolution mapping of replication-timing through the entire human chromosome 11q at a genome sequence level: initiation of genome-wide approach to put landmarks with biological significance. Cold Spring Harbor meeting "Genome Sequencing and Biology", Cold Spring Harbor, May.
8. Sasaki, H.: DNA methylation and genomic imprinting in mammals. World Congress on Rett Syndrome 2000, Karuizawa, July.
9. Iwasa, Y., Sasaki, H. and Pomiankowski, A.: Genomic imprinting controlling maternal behaviors. The 8th International Behavioral Ecology Congress, Zurich, August.
10. 佐々木裕之：DNAメチル化に基づくインプリンティング制御機構．大阪大学蛋白研究所セミナー：染色体DNAのメチル化調節機構とその機能，大阪，9月．
11. 佐々木裕之：ゲノムインプリンティング領域とがん．日本癌学会第59回総会(シンポジウム：ポストシーケンス時代におけるがんのゲノム解析)，横浜，10月．
12. 木村博信，末武 勲，佐々木裕之，田嶋正二：アフリカツメガエル胚発生過程へのマウスDNAメチルトランスフェラーゼ3a, 3b1, 3b2, 3b3の効果．日本生化学会第73回大会，横浜，10月．
13. 青木麻子，末武 勲，宮川順一，千々岩崇仁，佐々木裕之，中村正彦，田嶋正二：大量発現した*de novo*型DNAメチルトランスフェラーゼ群の生化学的性質について．日本生化学会第73回大会，横浜，10月．
14. 巖佐 庸，佐々木裕之：母性行動に影響する遺伝子は刷り込みが進化する．日本

- 進化学会第2回大会, 東京, 10月.
15. 佐々木裕之, 石原 宏: *IGF2/H19* 遺伝子の刷込みを制御するシスおよびトランス因子の同定と解析. 日本人類遺伝学会第45回大会, 福岡, 10月.
 16. 白水久男, 久保田健夫, 熊沢あずみ, 佐渡 敬, 千々岩崇仁, 青木麻子, 末武 勲, 三木裕子, 林 正俊, 稲垣興一, 涌井敬子, 福嶋義光, 田嶋正二, 佐々木裕之: DNAメチル化酵素異常症: ICF症候群における *DNMT3B* 遺伝子の変異解析. 日本人類遺伝学会第45回大会, 福岡, 10月.
 17. 水野晋一, 千々岩崇仁, 佐々木裕之: 新規DNAメチルトランスフェラーゼ *DNMT3A*, *DNMT3B* の急性および慢性骨髄性白血病における発現レベルの検討. 日本人類遺伝学会第45回大会, 福岡, 10月.
 18. 佐々木裕之: ヒトゲノムから見た発生再生のしくみ. 福岡市西区医師会学術講演会, 福岡, 10月.
 19. Sado, T., Sasaki, H. and Li, E.: Role of Antisense RNA at the *Xist* locus in X-inactivation. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting "Germ Cells," Cold Spring Harbor, October.
 20. Fujiyama, A., Watanabe, H. et al.: Toward understanding ourselves through comparative genomics of primates. Cold Spring Harbor meeting "Human Origin and Disease", Cold Spring Harbor, October.
 21. 横峯孝昭, 黒岩麻里, 田中和明, 都築政起, 松田洋一: 鳥類におけるゲノムインプリンティングの検討. 日本遺伝学会第72回大会, 京都, 11月.
 22. 黒岩麻里, 横峯孝昭, 佐々木裕之, 都築政起, 田中和明, 並河鷹夫, 松田洋一: 鳥類のZ染色体における遺伝子量補正機構の解析. 日本遺伝学会第72回大会, 京都, 11月.
 23. Purbowasito, W., Kato, R., Suda, C., Shirohzu, H., Yokomine, T., Ishihara, K., Sado, T. and Sasaki, H.: Analysis of genomic sequence of the distal imprinted region of mouse chromosome 7. The 14th International Mouse Genome Conference, Narita, November.
 24. Sado, T., Sasaki, H. and Li, E.: Role of Antisense RNA at the *Xist* locus in X-inactivation. The 14th International Mouse Genome Conference, Narita, November.
 25. Tsujimoto, N., Koseki, H., Takiyama, Y., Katoh-Fukui, Y. and Sasaki, H.: Expression of imprinted genes in mice deficient for PcG proteins. The 14th International Mouse Genome Conference, Narita, November.
 26. Sasaki, H.: The Mechanisms of *IGF2/H19* imprinting: DNA methylation, chromatin and long-distance gene regulation. The 31st International Symposium of The Princess Takamatsu Cancer Research Fund-DNA Methylation and Cancer, Tokyo, November.
 27. 佐々木裕之, 石原 宏: DNAメチル化とゲノムインプリンティング制御機構. 第

- 23 回日本分子生物学会年会(ワークショップ:エピジェネティクスの分子基盤), 神戸, 12 月.
28. 黒岩麻里, 横峯孝昭, 佐々木裕之, 都築政起, 田中和明, 並河鷹夫, 松田洋一: 鳥類の Z 染色体における遺伝量補正機構の解析. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月.
29. 横峯孝昭, 黒岩麻里, 田中和明, 都築正起, 松田洋一, 佐々木裕之: 鳥類におけるゲノムインプリンティングの検討. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月.
30. 白水久男, 久保田健夫, 須田知賀子, 青木麻子, 三木裕子, 林 正俊, 涌井敬子, 末武 勲, 福嶋義光, 佐々木裕之: ICF 症候群における *DNMT3B* 遺伝子の変異解析. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月.
31. Purbowasito, W., 加藤玲子, 須田知賀子, 白水久男, 横峯孝昭, 石原 宏, 佐渡 敬, 服部正平, 榑 佳之, 佐々木裕之: マウス F4/F5 領域のインプリンティングドメインのゲノム構造解析. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月.
32. 辻本直美, 古関明彦, 龍原義宏, 福井由宇子, 佐々木裕之: PcG 蛋白質欠損マウスにおけるインプリンティング遺伝子の発現. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月.
33. 佐渡 敬, 佐々木裕之, Li, E: X 染色体不活性化における *Xist* アンチセンス RNA の役割. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月.
34. 宮崎順子, 末武 勲, 青木麻子, 佐々木裕之, 中村正彦, 田嶋正二: *De novo* 型 DNA メチルトランスフェラーゼの大量発現とその性質. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月.
35. 木村重信, 末武 勲, 佐々木裕之, 田嶋正二: アフリカツメガエル胚発生に対するマウス *De novo* 型 DNA メチルトランスフェラーゼの効果. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月.
36. 石田智咲, 裏 聖恵, 丹羽仁史, 佐々木裕之, 金田安史: ES 細胞における *Dnmt3b* 遺伝子のクロマチンを介した転写調節機構の解析. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月.
37. 藤山秋佐夫, 渡邊日出美, 稲垣尚美, 小林由一, 酒井良子, 塚本ゆみ, 寺田順子, 栃木美和子, 許山肖子, 吉田 悟, 米澤弥穂, 和田洋美, 豊田 敦, Taylor, T. D., 十時 泰, 矢田哲士, 服部正平, 榑 佳之: ヒトゲノムを特徴づける構造情報取得を目的としたチンパンジー/ヒト比較ゲノム解析. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月.
38. 榑 佳之, 服部正平, 藤山秋佐夫 他: ゲノムシーケンスから見たヒトの特色. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月.
39. 豊田 敦, 藤山秋佐夫, 服部正平, 榑 佳之 他: ゲノムシーケンスシステム: 21 番染色体の完成と 11, 18 番のドラフトシーケンス. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月.
40. Bong, Y.-S., Danjoh, I. and Fujiyama, A.: Expression profiling of *S. pombe* during nitrogen starvation. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸,

12月.

41. 渡辺良久, 藤山秋佐夫, 榑 佳之, 池村淑道: ヒト染色体11番長腕と21番全域のS期内複製時期地図の作製. 第23回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月.
42. 前川耕平, 豊田 敦, 藤山秋佐夫 他: ダウン症必須領域におけるヒト・マウス比較. 第23回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月.
43. 佐々木裕之: DNAメチル化酵素欠損症「ICF症候群」の分子病理とインプリンティング. 第4回遺伝性疾患の生殖遺伝学研究会, 名古屋, 12月.
44. 佐々木裕之: 生殖細胞におけるDNAメチル化とインプリンティング. 平成12年度後期大阪大学蛋白質研究所研究報告会, 大阪, 12月.

E-b. 育種遺伝研究部門

当部門では、植物遺伝子と転移因子の発現制御を研究している。4月に角谷徹仁が助教授として着任し、技官の三浦明日香、ポストドク(CREST)の渡辺光一、研究補助の佐々木優子、照井明子とともに研究を開始した。

本年度の研究は、科学技術振興事業団・戦略基礎研究「遺伝子の不活性化・活性化を通じた植物の生態制御」(代表・大橋祐子)、及び、科学技術振興調整費による総合研究「植物の環境適応と形態形成の相互調節ネットワークに関する研究」等の支援を受けた。

(1) シロイヌナズナのDNA低メチル化突然変異による形態形成異常誘発の機構: 角谷徹仁, 三浦明日香, 渡辺光一

高等植物や脊椎動物は他の生物と比べて巨大なゲノムを持つが、量的な面から考えれば、そのゲノムの大部分はトランスポゾン等の反復配列である。反復配列の多い染色体領域では、一般に転写や組換えの活性が低く、凝集(ヘテロクロマチン化)が観察される。さらに、反復配列領域のDNAではシトシンが高頻度でメチル化されている。反復配列の大部分は機能が未知であるが、その無制限な活性化や転移は宿主生物にとって有害と予想される。一方、反復配列の中には、セントロメアやテロメアのように染色体機能に重要と考えられているものもある。本部門では、遺伝学のモデル植物であるシロイヌナズナの突然変異体を用いて、反復配列とDNAメチル化の制御機構および種々の生物現象への影響を調べている。

シロイヌナズナは、高等植物ではじめてゲノムの全塩基配列が決まり、また、染色体レベルでの遺伝子発現制御に関する多くの突然変異体が利用可能である。シロイヌナズナの *ddm1* (*decrease in DNA methylation*) 突然変異は、反復配列のDNAメチル化頻度を下げ、その転写抑制を解除する。*DDM1* 遺伝子産物はクロマチンリモデリング因子 SWI2/SNF2 と類似の構造を持つ。また、*ddm1* 突然変異は他の遺伝子を変化させることにより、種々の発生異常を誘発する。これらの発生異常誘発系の内の2つについてその原因遺伝子を同定し、誘導機構を明らかにした。

そのうちの一つ *clam* は、葉、根、莖の細胞伸長の阻害を特徴とする。この形質は遺伝するが、ある頻度で正常な表現型のセクターを生じる。セクターの大きさと頻度は個体によって異なる。この系統の子孫系統の中には安定してこの表現型が観察される（正常なセクターの生じない）ものがある。安定な *clam* 系統を用いてこの遺伝子座の連鎖解析の精密化を行った。926 の染色体の遺伝型を調べることにより原因遺伝子が既知の遺伝子 *DWF4* であることがわかった。*clam* 系統では *DWF4* 遺伝子にシロイヌナズナの内在トランスポゾンが転移することによりこの表現型が誘導されていた。こうして我々が新たに見出したトランスポゾン *CACTA1* は *ddm1* 突然変異下で特異的に高頻度で転移しコピー数を増やす。メチル化に伴う遺伝子発現不活性化がトランスポゾンの抑制に働くことが示唆される。これは、植物における内在トランスポゾンを制御する宿主因子の始めての同定になる（論文印刷中）。

もう1つの発生異常、開花時期遅延形質 *FTS* は、多くの *ddm1* 系統で独立に誘導されるため、トランスポゾンの挿入のようなランダムな突然変異誘発によらないと予想された。*FTS* は既知の開花遅延突然変異 *FWA* と同じ染色体領域にマップされた。*FWA* 遺伝子がクローニングされた結果、これが新たなホメオボックス遺伝子であることがわかった。この遺伝子の上流にある反復配列の低メチル化に伴ってエクソピックな転写が起き、これが原因で開花遅延表現型の誘導されることが明らかにできた (*ref1*)。奇妙なことに、通常の突然変異原処理で得られた突然変異である *fwa-1* と *fwa-2* においても、コード領域に突然変異は観察されず、低メチル化に伴う過剰発現が表現型を引き起こしていたことがわかった。このような塩基配列の変化によらない遺伝子発現の修飾が安定な対立形質 (*epi-allele*) として振る舞う現象は、これまでシロイヌナズナの *SUPURMAN* 遺伝子やホソバウンランの *Leye* 遺伝子で報告されている。エピジェネティックな制御を受ける遺伝子を同定するのに、*ddm1* 突然変異と連鎖解析を組み合わせた系が利用できることがわかった。

(2) イネの DNA 低メチル化変異：角谷徹仁、渡辺光一

私達は DNA メチル化に伴う反復配列の転写抑制の機能をシロイヌナズナを用いて調べている。高等植物の中ではシロイヌナズナは例外的に反復配列の量が少ないため、第2の植物実験系としてイネを用いている。イネのゲノムにはシロイヌナズナの場合より多くの反復配列がある。シロイヌナズナの *DDM1* 遺伝子と類似の遺伝子をイネの cDNA から見つけ、これをアンチセンス方向に発現させる形質転換体を作出した。この突然変異体ではリボソーム DNA、レトロトランスポゾン様配列 *Tos3*、およびセントロメア付近のタンデムリピート、の全てでメチル化レベルの低下が観察された。このイネ突然変異体を用いて、活性化しうるイネの内在トランスポゾンを探すとともに、発生や染色体挙動に対する効果を調べる予定である。

これとは別に、アルキル化剤で突然変異原処理をしたイネの M_3 集団から、メチル化感受性制限酵素を用いたサザン解析による選抜で、rDNA のメチル化レベルの低下したイネ

突然変異体を得ている。この突然変異体では、rDNAのメチル化レベルは低下するが、他の配列のメチル化は影響されない。

研究業績

(1) 原著論文

1. W, Soppe, Jacobsen S. E., Alonso-Blanco, C., Jackson J., Kakutani, T., Koornneef, M. and Peeters, A. J. M.: The gain of function epi-mutant FWA causes late flowering. *Molecular Cell* 6:791-802, 2000.
2. Hirochika, H., Okamoto, H. and Kakutani, T.: Silencing of Retrotransposons in Arabidopsis and Reactivation by the *ddm1* mutation. *The Plant Cell* 12: 357-368, 2000.

(2) 発表講演

1. 角谷徹仁, 米林涉司, 三浦明日香, 渡辺光一, 遠山知子, 島田浩章, 広近洋彦: 「アラビドプシス *ddm1* 突然変異によるゲノムDNA低メチル化と発生異常誘発とトランスポゾン活性化」第23回日本分子生物学会年会ワークショップ, 2000年12月, 神戸
2. 角谷徹仁: 「DNAメチル化突然変異」第23回日本分子生物学会年会サテライトシンポジウム「高等植物研究の最前線」, 2000年12月, 京都

E.c. 脳機能研究部門

脳機能研究部門では、マウス嗅覚系を中心として神経の発生機構の研究を行っている。本年度は、科学研究費特定領域研究「脳研究の総合的推進に関する研究」、「神経回路の機能発達」、および奨励研究(A)、科学技術振興事業団から戦略的基礎研究「脳を知る」とさきがけ21「素過程と連携」の助成を受けた。また、総合研究大学院大学専攻間での共同研究費(代表 嶋本伸雄)の助成を受けた。

(1) 嗅索ガイドポスト細胞の運命決定および細胞移動(発表論文1): 平田たつみ, 富岡直美¹, (¹名古屋大学)

マウス終脳の吻側端には嗅球と呼ばれる領域が存在する。嗅球からの軸索は、終脳外側の狭い領域を尾側に向かって伸長し、嗅索(lateral olfactory tract; LOT)と呼ばれる軸索束を形成する。我々の作製したモノクローナル抗体 *lot1* が認識する細胞(*lot*細胞)は、嗅球から軸索が伸長し始めるより前から、将来この軸索が伸長することになる経路にわたって細胞の帯を作って配列する。そして、その後伸長してくる嗅球軸索を、この経路へとガイドする。したがって *lot* 細胞が終脳における嗅索の位置を決定していると考えられるが、なぜこの細胞が予定嗅索領域に配列するのかについては謎であった。そこで、様々な培養法を用いて *lot* 細胞が終脳のどこで発生し、どのようにして嗅索領域に局在するようになるのかを解析した。

lot 細胞が最終分裂を行っている E10.5 の終脳を様々な領域に分割して分散細胞培養し、lot 細胞が終脳のどの領域から分化してくるのかを検討した。この時期の終脳は、遺伝子発現の様式の違いから、背側の新皮質と腹側の神経節隆起との2つの区画に分けることができる。lot 細胞はそのうち新皮質の細胞を培養したときのみ分化し、神経節隆起を培養しても分化してこなかった。また終脳新皮質の中では、どこの部位からもまんべんなく分化してきた。lot 細胞が、実際の生体内で、新皮質全体で発生してくるとすれば、これらの細胞はかなりの距離にわたって終脳半球を腹側方向に移動しなければならない。しかしこれまでに腹側方向に移動する細胞の報告はない。このような細胞移動様式が存在するの確かめるために、東北大学の大隅典子博士と共同研究を行い、マウス全胚培養法による細胞移動の解析を行った。その結果、実際に終脳新皮質全体で生まれた細胞が腹側方向に移動し、予定嗅索領域に局在する事が確かめられた。このようにして移動した細胞の少なくとも一部は、lot1 抗体の抗原を発現して、lot 細胞へと分化することが確かめられた。以上の結果を総合すると、生体内で lot 細胞は終脳新皮質全体で発生し、予定嗅索領域まで移動するという興味深い発生過程をたどると考えられる。

(2) 嗅球軸索のガイダンスと軸索反発因子 Slit との関係(発表論文2): 平田たつみ

前述のように、嗅球からの軸索は lot 細胞によりガイドされて、嗅索という軸索束を形成する。この際の軸索ガイドの分子機構は未だ不明である。最近、拡散性ガイド分子の一つである Slit が、嗅球軸索の伸長を反発させる作用を持つことが示された。この結果から、lot 細胞による嗅球軸索ガイドが Slit を介して行われている可能性が考えられた。また逆に、Slit が lot 細胞の挙動を制御することで、嗅球軸索をガイドしている可能性も示唆されていた。

そこで、lot 細胞による短距離性の軸索ガイダンスの機構と Slit との関係を、終脳器官培養系を用いて検討した。具体的には、Slit を強制発現させた細胞を lot 細胞の近傍に移植して、嗅球軸索のガイドや lot 細胞の分布に対する影響を検討した。また Slit の合成源であると考えられる終脳の中隔部を除去し、さらに残存する Slit の活性を阻害する処理を施して、嗅球軸索伸長の様子を検討した。その結果、lot 細胞による軸索の短距離性のガイダンスと Slit とは無関係である可能性が示唆された。すなわち、この2種のガイド機構は、それぞれ独立に、嗅球軸索に作用していると考えられた。本研究は、さらに、生体内での嗅球軸索のガイダンスに中隔部からの Slit 活性が必要ない可能性を示唆した。

研究業績

(1) 原著論文

1. Tomioka, N., Osumi, N., Sato, Y., Inoue, T., Nakamura, S., Fujisawa, H. and Hirata, T.: Neocortical origin and tangential migration of guidepost neurons in the lateral olfactory tract. *J. Neurosci.* **20**, 5802-5812, 2000.

2. Hirata, T., Fujisawa, H., Wu, J. Y. and Rao, Y.: Short-range guidance of olfactory bulb axons is independent of repulsive factor slit. *J. Neurosci* (in press), 2001.

(2) その他

1. 平田たつみ：終脳における神経細胞の移動と領域特異化，*細胞工学* **20**，印刷中 2001.

(3) 発表講演

1. Hirata, T.: LOT cells that lay out prospective olfactory tract in mouse. The 8th International Conference: Peace through Mind/Brain Science, Hamamatsu, 2月.
2. Sato, Y., Hirata, T. and Fujisawa, H.: Production of hamster monoclonal antibody which inhibits neurite outgrowth. The NIBB International COE Symposium, Okazaki, 3月.
3. Hirata, T., Osumi, N., Tomioka, N., Sato, Y. and Fujisawa, H.: Neocortical origin and tangential migration of guidepost neurons in the lateral olfactory tract. The NIBB International COE Symposium, Okazaki, 3月.
4. Hirata, T.: Guidance of mitral cell axons by lot cells, a specific subset of early-generated neurons. Swiss-Japanese Scientific Seminar, Progress in Developmental Biology: Development of the nervous system and pattern formation, Switzerland, 4月.
5. 川崎能彦, 別宮洋子, 木津川尚史, 藤沢 肇: ニューロピリン-1とセマフォリン3Aの相互作用による交感神経系の形成制御. 第33回日本発生物学会, 高知, 5月.
6. Hirata, T.: Short-range and long-range guidance of olfactory bulb axons. Gordon Research Conference: Molecular and Cellular Neurobiology, Hong Kong, 6月.
7. 川崎能彦, 別宮洋子, 木津川尚史, 藤沢 肇: Neuropilin-1による交感神経系の形成制御. 第23回日本神経科学大会 シンポジウム, 横浜, 9月.
8. Sato, Y., Hirata, T. and Fujisawa, H.: Production of hamster monoclonal antibody that inhibits neurite outgrowth. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Axon Guidance and Neural Plasticity. Cold Spring Harbor, 9月.
9. 川崎能彦, 木津川尚史, 藤沢 肇: Neuropilin-1は胚発生時の血管形成を制御する. 第73回日本生化学会 シンポジウム, 横浜, 10月.
10. 平田たつみ: 神経細胞の軸索伸長とガイダンス機構 第23回日本分子生物学会年会 ワークショップ. 神戸, 12月.

E-d. 応用遺伝客員研究部門

(1) X染色体不活性化に関わるインプリントのマウス胚における解析：高木信夫

哺乳類では雌雄間に生じるX連鎖遺伝子量の差を補正するため、雌の細胞では2本のX染色体の一方を不活性化する。マウスの発生初期に発達する胚体外組織では、父由来の染色体(Xp)が優先的に不活性化する。不活性化と細胞の分化には密接な関係があり、胚盤胞では胚体外部に分化する細胞でのみ不活性化が始まっている。この組織特異的な不活性化様式は刷り込みによりもたらされると考えられるので、我々はその性質を調べることにした。FISHで大きなシグナルとして検出される、*Xist* 遺伝子の安定発現を指標として、Rb(X.2)2AdとRb(X.9)6Hをヘテロに持つ雌マウスより得られる、Xmを過剰に持つXmXmXpおよびXmXmY胚での不活性化を検討した結果、栄養芽細胞ではXmは決して不活性化されないことが判明した。更に、上記ロバートソン型転座と*lacZ* 遺伝子を持つX染色体をマーカーとして前核移植により作成した、Xpを2本持つ雄核発生胚を調べたところ、胚体組織のみならず胚体外組織でも、2本のXpの一方がランダムに不活性化していることが明らかになった。ただし、卵割期には両方のX染色体より安定型の*Xist* RNAが発現していた。これらの事実は、栄養芽細胞では刷り込みにより母由来*Xist* が転写されず、従ってXmが不活性化しないこと、父由来*Xist* は双方のXpから発現されるがX染色体数のcountingが起きるため不活性化は1本に限られると結論した。

(2) マウステトラソミー11による発生異常：高木信夫

哺乳類では、過剰な常染色体は流産など胚発生に重大な影響を引き起こすのに対し、X染色体の増加の影響はそれ程深刻ではない。その原因は2倍体細胞では、1本を除いて全てのX染色体が不活性化されるためである。ただし、不活性化異常によりX連鎖遺伝子量が正常の2倍になった場合、著しい発生異常が起こり、妊娠の前半で致死となることが示された。遺伝子量が倍加することによって引き起こされる著しい発生異常は、X染色体に特有なのか、常染色体にも普通に見られるのかを検討することにした。そこで、2種類のロバートソン型転座染色体Rb(10.11)8BnrとRb(11.13)6Lubをヘテロに持つマウスでは減数分裂時の染色体不分離頻度が上昇する事を利用して、11番染色体のテトラソミー(Tets 11)胚を作成し、初期胚発生における常染色体性の遺伝子量効果の影響を解析した。Tets 11胚は受精後7.5日目の時点で約5%の頻度で得られた。発生異常は顕著で、大きさのみの比較では48時間相当の遅れが認められた。ばらつきは大きいものの、胚体部と胚体外部の区別が明瞭ではなく、原羊膜腔に死細胞が多く、中胚葉の分化が認められないなど胚発生の根幹に影響が出ていた。2本の活性X染色体を持つ胚はTets 11胚と同程度程度の異常を示す。このことは常染色体でも遺伝子量が正常レベルの2倍になれば、胚発生は著しく異常になり、X染色体が他の染色体とは特別違ってはいないことを示唆する。また、この観察は活性X染色体が常染色体2本分の活性レベルを維持している事も間接的に示している。

(3) イネ生殖生長期における分裂組織アイデンティティーの転換制御：長戸康郎

イネの生殖生長期において、茎頂分裂組織は、穂軸分裂組織→枝梗分裂組織→小穂分裂組織→花分裂組織へとそのアイデンティティーを転換する。その転換制御のメカニズムを明らかにするために、穂及び花の構造の異常を示す *aberrant panicle organization 1 (apol)* を同定し、解析した(原著論文8)。*apol* の3つの allele を同定したが、いずれも穂及び枝梗が短く、花では鱗被の増加、雄蕊の減少、雌蕊の増加が見られた。野生型の穂軸分裂組織は、10本程度の1次枝梗を分化した後退化するが、*apol* 変異体では、数本程度の1次枝梗を分化した後小穂(花)に転換した。即ち、*apol* 変異体の穂軸分裂組織は、退化するより前に小穂分裂組織にそのアイデンティティーを転換したのである。同様の傾向は1次枝梗分裂組織でも観察され、側生器官をほとんど分化することなく小穂(花)に転換した。従って、*apol* の花序(穂)においては、分裂組織のアイデンティティーの転換が早まっており、その野生型遺伝子は、分裂組織の早すぎる転換を抑制していると考えられる。

apol は花においても興味深い表現型を示した。鱗被は正常な2枚から4-6枚に増加した。一方雄蕊は正常な6本から1-3本に減少した。鱗被と雄蕊の数は花により変動したが、それらの合計は、野生型の8とほとんど変わらなかった。従って、鱗被と雄蕊の領域全体の大きさは変わらないが、その中の鱗被の領域の拡大と雄蕊領域の縮小が起きていることを示している。言い換えれば、鱗被を分化する分裂組織が長く維持され、雄蕊を分化する分裂組織は非常に短期間で終了している。野生型では、雄蕊分化後、分裂組織は雌蕊の心皮を1枚分化し、それ自身胚珠に転換する。しかし、*apol* 変異体では、複数の心皮・胚珠を側生で分化し続け、分裂組織の *determinacy* が失われた。

このように、*APOL* は分裂組織のアイデンティティーの転換の時間的制御に関わる重要な遺伝子である。

(4) イネの茎頂分裂組織の構築と葉原基の分化パターン：長戸康郎

既に胚発生で茎頂分裂組織が欠失する変異体を解析し、*SHL1-SHL4* 遺伝子とその分化決定に関与していることを示した。しかしこれらの遺伝子が分化後の茎頂分裂組織の維持に関わっているかどうかは明らかでない。そこで、*SHL2* 遺伝子座の弱い対立遺伝子 *shl2-6* を同定した(原著論文10)。*shl2-6* は発芽後2, 3葉を分化した後枯死した。その時点で茎頂分裂組織は確認できなかった。胚発生過程を調べたところ、茎頂分裂組織は分化するが、第2葉を分化する頃には消失した。従って *SHL2* 遺伝子は茎頂分裂組織の維持にも必須である。その後の解析により、*shl2-6* では葉序など葉原基の分化パターンも異常になっており、茎頂分裂組織の維持と葉原基の分化パターンが密接に関連していることが明らかになった。

不規則な葉序と短い葉間期を示す *sho* 変異体を解析し、葉原基の分化パターンには茎頂分裂組織の形が重要であることを明らかにした(原著論文7)。*sho* 変異体の茎頂分裂組織では、未分化な細胞が極端に減少し、そのほとんどは葉原基に分化しうる細胞で占

められ、その結果異所的に葉原基が分化する。従って、*SHO* 遺伝子は茎頂分裂組織の中の未分化な細胞群の維持に関わっていると考えられる。また、*sho* 変異体の葉は、中央部分のみが生長した糸状になっており、葉原基の分化位置が葉の形態形成にも影響することが示唆された。

研究業績

(1) 原著論文

1. Goto, Y. and Takagi, N.: Maternally inherited X chromosome is not inactivated in mouse blastocysts due to parental imprinting. *Chromosome Res.* **8**: 101-109, 2000.
2. Sugimoto, M., Tan, S.-S. and Takagi, N.: X chromosome inactivation revealed by the X-linked *lacZ* transgene activity in periimplantation mouse embryos. *Int. J. Dev. Biol.* **44**: 177-182, 2000.
3. Tada, T., Obata, Y., Tada, M., Goto, Y., Nakatsuji, N., Tan, S.-S., Kono, T. and Takagi, N.: Imprint switching for non-random X-chromosome inactivation during mouse oocyte growth. *Development* **127**: 3101-3105, 2000.
4. Okamoto, I., Tan, S.-S. and Takagi, N.: X chromosome inactivation in XX androgenetic embryos surviving implantation. *Development* **127**: 4137-4145, 2000.
5. Kikuchi, K., Uekuchi-Tanaka, M., Yoshida, K. T., Nagato, Y., Matsuoka, M. and Hirano, H.-Y.: Molecular analysis of the NAC gene family in rice. *Mol. Gen. Genet.* **262**: 1047-1051, 2000.
6. Miyoshi, K., Nakata, E. and Nagato, Y.: Characterization of viviparous mutants in rice (*Oryza sativa* L.). *Breed. Sci.* **50**: 207-213, 2000.
7. Itoh, J.-I., Kitano, H., Matsuoka, M. and Nagato, Y.: *SHOOT ORGANIZATION* genes regulate shoot apical meristem organization and the pattern of leaf primordium initiation in rice. *Plant Cell* **12**: 2161-2174, 2000.
8. Ikeda, K., Nagasawa, N. and Nagato, Y.: *ABERRANT PANICLE ORGANIZATION 1* gene regulates meristem identity in reproductive phase. *Rice Genet. Newslett.* **17**: 31-34, 2000.
9. Hayashida, E., Satoh, H. and Nagato, Y.: *ADL* genes are required for adaxial-abaxial pattern formation in rice leaves. *Rice Genet. Newslett.* **17**: 28-31, 2000.
10. Satoh, N. and Nagato, Y.: *SHOOTLESS 2* gene is required for both initiation and maintenance of shoot apical meristem in rice. *Rice Genet. Newslett.* **17**: 26-28, 2000.

(2) 発表講演

1. 後藤友二, 高木信夫: マウス初期胚における X 染色体不活性化に関わる刷り込みの

- 消失．日本遺伝学会第72回大会，京都，11月．
2. 松井純子，高木信夫：刷り込み型X染色体不活性化に関わるXist RNA発現制御．日本遺伝学会第72回大会，京都，11月．
 3. 杉本道彦，Seong-seng Tan，高木信夫：マウス精子形成過程におけるX染色体の活性変化：トランスジーンによる解析．日本遺伝学会第72回大会，京都，11月．
 4. 辛島裕子，阿部訓也，高木信夫： l^{rs}/l^{rs} マウス胚に見られる発生異常の解析，日本遺伝学会第72回大会，京都，11月．
 5. Karashima, Y., Goto, Y., Abe, K., Tan, S.-S., Ko, M., Nagaraja, R., Artzt, K. and Takagi, N.: Nonepiblast tissues as the primary site of *tlw5* expression. 14th International Mouse Genome Conference, Narita, November, 2000.
 6. Okamoto, I., Tan, S.-S. and Takagi, N.: X chromosome inactivation in XX androgenetic mouse embryos surviving implantation. 14th International Mouse Genome Conference, Narita, November, 2000.
 7. Yamazaki, Y., Yoshimura, A., Nagato, Y. and Kurata, N.: Oryzabase-integrated map and mutant database. Plant and Animal Genome VIII, 2000.
 8. 山口貴大，石川元一，川崎信二，松岡 信，長戸康郎，平野博之：イネホメオボックス遺伝子 *DL* の単離．日本育種学会第96回講演会，岡山，1999．
 9. 佐藤奈美子，長戸康郎：イネ *SHOOTLESS2* 座の弱い対立遺伝子の同定と解析．日本育種学会第97回講演会，つくば，2000．
 10. 池田恭子，永澤信洋，長戸康郎：イネにおける穂・花器官の分化パターンに関わる変異体．日本育種学会第97回講演会，つくば，2000．
 11. 角倉 剛，池田恭子，長戸康郎：不安定な中肋の分化を示すイネの変異体．日本育種学会第98回講演会，弘前，2000．
 12. 林田恵美，佐藤 光，長戸康郎：イネの *ADL* 遺伝子は葉の表裏決定に関与する．日本育種学会第98回講演会，弘前，2000．
 13. 山木辰一郎，長戸康郎：珠皮の発生は胚の位置に影響する．日本育種学会第98回講演会，弘前，2000．
 14. 春原英彦，佐藤 光，長戸康郎：イネ短穂変異体の発生学的解析．日本育種学会第98回講演会，弘前，2000．

F. 系統生物研究センター

系統生物研究センターは、動植物・微生物の遺伝実験生物系統を基盤としたユニークで活発な研究を展開している。また、遺伝資源としての実験生物系統の開発・保存分譲事業を進めているのも本センターの特色の一つである。この期間の職員の異動としては、発生工学研究室の教授に国立医薬品食品衛生研究所から相賀裕美子が着任した。従って、各研究室を構成する教官名は次のようになった。哺乳動物遺伝研究室(城石俊彦教授，小出 剛助手)，発生工学研究室(相賀裕美子教授)，植物遺伝研究室(倉田のり助教授，伊

藤幸博助手，実験圃場所属の野々村賢一助手），原核生物遺伝研究室（西村昭子助教授），無脊椎動物遺伝研究室（林 茂生教授，後藤 聡助手）。

F-a. 哺乳動物遺伝研究室

この研究室では，標準的な実験用マウス系統に加えて，野生マウス自然集団から生物機能に関する特色ある遺伝子資源を導入して新しい実験用マウス系統を開発し，それらを用いて「形態形成機構の遺伝学的研究」，「マウス行動遺伝学」について独自の研究を展開した．これらの研究では，いずれも野生マウス由来の遺伝子の特性が有効に利用され，さらにゲノム解析的手法が活用された．

前年度に引き続き，石島淳子と田村 勝が，日本学術振興会特別研究員として研究に参加した．また，牧野 茂が，10月から中核機関特別研究員として参加した．昨年に引き続き総合大学院大学遺伝学専攻としての教育・研究活動も進められ，岡 彩子が大学院に在籍し，矢田有加里（お茶の水女子大学人間文化研究科人間環境科学専攻）と古瀬民生（東京農工大学大学院連合農学研究科生物工学専攻）が特別研究生として研究に参加した．本研究室の本年度の共同研究には，米川博通（東京都臨床研），宮下信泉（香川医大），若菜茂晴（実中研），朝田芳信（日本大学松戸歯学部）の4名が参加した．また，嵯峨井知子，浜田 俊（沼津学園）らが研究に参加した．

マウス系統の維持分譲事業は，「系統保存事業費」により運営した．平成12年12月現在，88系統のマウスを系統生物センターの附属マウス飼育棟，第1ネズミ飼育舎において維持・保存している．これらの系統については，実験動物中央研究所モニタリングセンターに依頼して，定期的に遺伝学および微生物学的モニタリングを行っている．また，「系統保存事業費」の委託事業として，桜井宣子と山本博美が（株）JACから派遣され，主にマウス受精卵及び配偶子の凍結保存を担当した．上記の維持系統は，国内外の大学・研究機関からの依頼に対応して分譲供与を行った．

(1) 軸前側多指症を示すマウス突然変異体 X-linked polydactyly (*Xpl*) 及び luxate (*lx*) の解析：矢田有加里¹，榎屋啓志²，牧野 茂，城石俊彦¹（お茶の水女子大・人間文化研究科，² 理研ゲノム科学総合研究センター）

マウスの四肢前後軸形成には，肢芽の中胚葉後端部に位置する ZPA と，外胚葉末端部に位置する AER が位置情報源として働くことが知られている．ZPA 活性の本体は，分泌型のタンパク質である Sonic Hedgehog (SHH) であると考えられている．マウスには軸前側多指症を示す自然突然変異体が多数存在し，それらの多くが肢芽前側で異所的な *Shh* を発現することが分かっている．

後肢にのみ軸前側多指症を示す X-linked polydactyly (*Xpl*) は，古くから知られている優性の突然変異体で，X 染色体上にマップされている．*Xpl* 遺伝子の単離を目的として，野生マウス由来の近交系である MSM 系統，KJR 系統，BLG/2 系統を用いた戻し交配

により得られた2,452個体のN2個体を用いて遺伝的連鎖解析を行った結果、*Xpl*遺伝子は、X染色体上のDNA多型マーカー*DXMgc39*と*DXMit32*の間0.89cMの領域に位置することが分かった。この領域には、レチノイン酸によってその転写が活性化される機能未知の遺伝子や、いくつかのESTがマップされている。さらに、*Xpl*胚を用いた*in situ* hybridizationの結果、後肢肢芽において前側での異所的な*Shh*と*Fgf4*の発現が観察された。異所的*Shh*の活性化は形態的異常が明らかになる前に起こっていることが、下流遺伝子である*Gli*の発現から明らかにされた。また、正常胚のLPAにおいては、*Shh*と*Fgf4*の発現はBMPのアнтаゴニストである*Gre*によって維持されていることがわかっている。*Xpl*における異所的な*Shh*、*Fgf4*の発現も*Gre*の発現を伴うことが明らかとなり、これらの維持にも正常胚と同様の機構が関与していることが示唆された。

また、別の突然変異体*luxate (lx)*も*Xpl*と同様、後肢にのみ多指症の表現型を示すことが分かっている。*lx*胚後肢肢芽においても前側での異所的な*Shh*や*Fgf4*の発現が観察されたが、*Fgf4*の発現領域全体が前側へシフトしており、*lx*の多指症発症の機構は、*Xpl*とは異なる可能性が示唆された。また、*lx*では肢芽発生の初期から通常肢芽後半部で発現する*Gre*が、肢芽前半部で発現している事が明らかになった。このことから、*lx*の肢芽は、その発生初期の段階から前後軸形成が異常である事が示唆された。さらに、*lx*は後肢肢芽が正常胚よりも前側に形成されることがわかった。このことから、*lx*遺伝子は正常胚において、肢芽の形成位置を決定する働きをすると考えられた。

(2) Patched(*ptc*)突然変異マウス mesenchymal dysplasia (*mes*)の解析: 牧野 茂, 矢田有加里¹, 榎屋啓志², 城石俊彦¹ お茶の水女子大・人間文化研究科,² 理研ゲノム科学総合研究センター)

Sonic hedgehog(*Shh*)は、形態形成における体軸形成のオーガナイザーとして働くことが知られている分泌性のタンパク質で、神経管の背腹軸や肢芽の前後軸形成に重要な役割を果たしている。*Shh*の受容体であるPatched(*Ptc*)は、12回膜貫通型の膜タンパク質であり、別の膜タンパク質Smoothened(*Smo*)と共に*Shh*受容体複合体を形成している。*mesenchymal dysplasia (mes)*は、四肢に形態異常を示す劣性突然変異マウスである。これまでに我々は、原因遺伝子の探索を行い、*mes*突然変異が*ptc*遺伝子のC末端細胞内ドメインにおける32bpの欠失であることを明らかにした。この突然変異により、*Ptc^{mes}*は、C末端細胞内ドメインのほとんどを失った部分的な機能欠失型のタンパク質であることが示唆された。今回我々は、マウス胚発生後期における*Ptc*の機能、特に*Ptc*のC末端細胞内ドメインの機能を明らかにするため、詳細な表現型の解析を行った。

生後すぐのコンパウンドヘテロ個体(*ptc/ptc^{mes}*)は、肺の形成不全のため致死になることが分かった。発生を追って肺の表現型を解析すると、発生17日以降上皮細胞の増殖に異常は見られないが、間葉細胞の過増殖が観察された。また、肺形成時の基部-先端部軸形成異常は観察されなかった。以上のことより、*ptc*は肺における間葉細胞の増殖抑制に関与していることが示唆された。また、*ptc/ptc^{mes}*個体は+/+個体と比較して

約1.4倍体重が増加したが、特に背側や食道、気管の周りの間葉細胞の過増殖が観察された。しかし、*ptc/ptc^{ess}* 個体において *Shh* の発現に異常は見られず、またスクレロトームの形成にも違いは見られなかったことから、*ptc/ptc^{ess}* 個体における間葉細胞の過形成は、リガンドである *Shh* に依存しない表現型であることが示唆された。つまり、*ptc* は *Shh* 発現領域から遠く離れた、そして分泌された *Shh* タンパクが届かないような細胞で発現し、細胞の増殖抑制に関与していることが示唆された。

一方、*ptc/ptc^{ess}* 個体において神経管の背腹軸形成を調べたところ、大きな異常は観察されなかった。*ptc* ノックアウトマウスは神経管の軸形成に大きな異常を示すことから、*Ptc* のC末端細胞内ドメインは神経管の背腹軸形成には必須でないことが明らかとなった。これらのことから、*Shh* シグナル伝達系は細胞の増殖抑制に関わるC末端ドメインを必須とする経路と、神経管の軸形成に関わるC末端ドメインを必要としない経路の二つに分岐している可能性が示唆された。

(3) 軸前側多指症マウス, *Hemimelic extra-toes (Hx)* の変異遺伝子の探索: 嵯峨井知子, 樹屋啓志¹, 清水邦彦², 矢田有加里³, 城石俊彦 (理研ゲノム科学総合センター,² 日大松戸歯学部,³ お茶の水女子大)

これまで、軸前側多指症を示す *Hx* 変異の原因を解明するためポジショナルクローニング法による原因遺伝子の単離を進めてきた。遺伝的連鎖解析から *Hx* は合指症を示す *Hammer-toes (Hm)* 遺伝子とともに、第5染色体上に位置する *sonic hedgehog (shh)* 遺伝子の極めて近傍にマップされた。加えて *Hx* を含む複数の軸前側多指症を示す系統が *shh* を胚芽の前端部に異所的発現を示すことから、軸前側多指の原因遺伝子と *shh* との関連性が論じられてきた。またヒトの相同領域7q36には複雑な多指、合指症がマップされており、近年ヒトとマウスでこれらの原因遺伝子についての解析がすすめられてきた。その結果、ヒトでは *c7orf2*、マウスではそのホモログ *Lmbr1* が有力な候補遺伝子にあげられている。これまでにヒトでは *c7orf2* のエクソン4を欠失している患者が前腕、前脚の欠失を示すこと、また *Hx* のホモ個体が四肢の発生初期に *Lmbr1* を胚芽で発現していないという報告がなされた。われわれがこれまで行ってきた連鎖解析や物理的地図、cDNA セレクションの結果からも *Lmbr1* が *Hx* 領域内にある唯一の遺伝子であろうと考えられる。しかし、*Lmbr1* の翻訳領域には *Hx* と親系統で塩基配列の差がなかったこと、またヒトでも軸前側多指を示す患者には *c7orf2* の翻訳領域には変異がみつかっていないことから、もし *Lmbr1* が原因遺伝子であるとしても多指を生じる変異は翻訳領域外にあることが示唆された。そこでゲノム配列を決定するため約140kbのBAC上の *Hx* 領域、約100kbをコスミドクローンでカバーし、ほぼ90%の配列を決定した。この配列をすでに報告されていたヒトの相同領域のゲノム配列と比較した結果、イントロンの中に役1kbにわたってヒトとマウスで85-90%の高い相同性を示す部位を見つけた。そこで *Hx* と親系統の野生型についてこの部位の配列を比較したところ、両者の間に1塩基の置換があることがわかった。この塩基は野生由来の系統を含む14の近交系で保存されており、*Hx* にみられた塩基置換は遺伝的多型では

ないと考えられる。この保存された1kbの配列内には典型的な転写因子結合部位などはみつかっていないが、イントロンにもかかわらずヒトとマウスで非常に高い相同性を示すことから、この部位での変異は何らかの意味をもつことが考えられる。*Lmbr1*の発現については、上記のように*Hx*は発生のある時期だけ、また肢芽だけで*Lmbr1*の発現を失うという報告がなされたが、我々の行ったNorthern blotおよびWISH法では*Hx*と野生型との間に*Lmbr1*の発現量の差はみられず、少なくとも発現量の低下はないと考えている。しかし、*Hx*領域内には他の遺伝子の存在を考えにくいため*Lmbr1*の発現量については現在詳しい解析を行っている。

(4) マウスコンソミック系統におけるオスの生殖能力低下に関する研究：岡 彩子，三田 晏彦，水品洋一，桜井宣子，年森清隆¹，高木信夫²，城石俊彦¹（宮崎医科大学 第一解剖学研究室，²北海道大学大学院地球環境科学研究科）

現在、本研究室において19種類の常染色体とX、Y染色体についての各コンソミックマウス系統を作製中である。これはあるマウス系統の遺伝的背景の中に、異なるマウス系統由来の染色体を一組ずつ組み込んでできるマウス系統である。作製は供与系統に受容系統を繰り返し戻し交配することにより行なう。コンソミック系統を作製する際には、供与系統と受容系統の間に遺伝的多型性が可能な限り多いことが望ましいため、受容系統には近交系マウスC57BL/6J(B6)を、供与系統には別亜種に属する日本産野生マウス(モロシヌス亜種)由来の近交系であるMSM系統を使用している。今回我々は、X染色体のコンソミックマウス系統(B6.MSM-Chr.X)を作製中にオスの生殖能力の著しい低下を認め、現在その原因を明らかにするため表現型の解析と原因遺伝子の探索を同時に行なっている。

B6.MSM-Chr.Xのオスの精子は頭部形態が異常であり、運動性も著しく低い。精巣組織に軽度ではあるが異常があり、精巣重量が少ないことから全体の精子産生量も減少していることが予想される。これらの表現型を詳細に観察していくと同時に、*in vitro*の実験系を使ってこれらの精子が受精、もしくは発生のどの段階に障害を起こしているかを解析中である。また、B6.MSM-Chr.Xのオスの生殖異常は受容系統の遺伝的背景の中に異なる系統由来のX染色体が持ち込まれたことが原因である。このことは、オスの生殖巣形成もしくは配偶子形成(あるいは双方)において、X染色体上の特定の遺伝子(もしくは領域)と、常染色体上かY染色体上の特定の遺伝子(領域)の相互作用が必要であり、さらにこれらの遺伝子(領域)は同系統由来のものでなければ正常に機能しないことを示す。QTLマッピング解析を行なった結果、精子形態異常のX染色体上の原因遺伝子は*DXMit210*から*DXMit44*の領域に存在する可能性が高い。この領域には精子形成後期の精子細胞で特異的に発現する遺伝子が存在し、さらにこの遺伝子のエクソン内にB6とMSMの間で大きな多型が存在することが明らかとなった。現在、この遺伝子を最も有力な候補遺伝子としてトランスジェニックマウスを作製中である。また、精巣重量のX染色体上の原因遺伝子は*DXMit217*を中心とする別の領域にマップされた。今後、この領域についてコ

ンジェニック系統を作製し、さらにその領域を狭めていく予定である。

(5) 早期老化症状を呈する Klotho(kl) 変異マウスについての研究：陣内寅佳，城石俊彦

Klotho 変異マウスは，laboratory mouse の単一遺伝子へ外部遺伝子挿入によつて作出された早期に多様な老化の形態を示す突然変異マウスであり，現在，ヒトの老化に伴う様々な障害についてのモデル動物として，多くの研究に使われている．これまで，Klotho 変異遺伝子はいくつかの標準的近交系マウスの遺伝的背景に導入されてきたが，その変異表現型に顕著な差異は認められなかった．しかし今回，Klotho 変異マウスの遺伝的背景を，日本産野生由来系統のマウスである MSM に置き換えることで，様々な変異表現型の変化が生じることを発見した．Klotho 遺伝子がかつても強く発現している腎臓において，標準的近交系では見られなかった異常が認められ，雄の精巣に見られていた不妊性の異常が，少なくとも形態的に緩和している事等が判った．また，興味深いことに，初期の戻し交配世代において，一部の Klotho 変異マウスについて，見かけ上変異表現型が消失する現象が確認された．Klotho 変異遺伝子をほぼ完全な MSM 系統の遺伝的背景に導入したマウスでは，いくつかの変異表現型の変化は見られるものの，不妊を含む様々な異常が認められ，寿命も4ヶ月前後である．しかし，これらの初期の戻し交配世代で現れる老化症状を示さないマウスは，生殖能力も有し，2年近く生存したものもいた．以上の結果から，Klotho 変異表現型が，標準的近交型マウスと MSM/MS 系統マウス間で多型を持つ修飾遺伝子によって影響を受ける事が示唆され，また，初期の戻し交配世代の Klotho 変異マウスにおける変異表現型の消失が，標準的近交型マウスと MSM 系統マウスの，それぞれの遺伝子の特定の組み合わせによって起こる効果である可能性が考えられる．現在，これらの遺伝的背景の変化による Klotho 変異表現型の様々な差異について遺伝学的な解析を行うため，いくつかの系統間交配を行っている．新たに観察された腎臓での変異表現型の病理学的解析を行うと共に，今後，これらの交配によって作出される Klotho 変異個体を用いて，各修飾効果についての原因遺伝子の遺伝的分離と連鎖解析を試みる予定である．

(6) 野生由来マウス系統群(Mishima Battery of Mouse Strains)を用いた自発運動性と恐怖条件付け学習能力の行動遺伝学：小出 剛，古瀬民生¹，森脇和郎²，城石俊彦¹ (東京農工大，² 総研大)

ゲノムプロジェクトにより，マウスにおいてはゲノムの全塩基配列が明らかになるのみならず，大多数の遺伝子 cDNA がクローニングされ，その情報も公開されようとしている．更に遺伝子座マーカーの数も7000を越え，遺伝学は新時代を迎えている．ヒトでは同様な理由で，これまではアプローチが困難だった疾患，体質，行動や性格までもそれらに関わる遺伝子座が解明されようとしている．マウスにおいても行動を司る遺伝子の遺伝学的解析はポジショナルクローニングの手法の進歩と共に現実的なものとなってきている．我々は，マウスの行動を制御する遺伝子を解明することを目的とした行動遺伝学を数年前より開始した．我々独自のアプローチとしては，これまでに使用されてき

た一般的実験用系統のみではなく、世界各地の野生マウスに由来する近交系マウスを用いた行動解析を行い、遺伝学的解析に使用することである。野生由来マウス系統を行動遺伝学に用いることの利点は以下の3点である。

- ・ヒトによる愛玩化を受けていないのでマウス本来の行動が解析できる
- ・各野生系統間では遺伝的に進化レベルでの大きな違いがある
- ・各野生マウス系統間の遺伝子多様性に基づいた行動の多様性が期待できる

以上の理由から、野生マウスに由来する10系統(BFM/2, PGN2, NJL, BLG2, CHD, HMI, CAST/Ei, KJR, SWN, MSM)、日本産愛玩用マウスに由来する系統(JF1)と一般的な近交系統3系統(C57BL/6J, DBA/1, BALB/cAnN)を用いている。これらの一連の系統は多くが当研究所で独自に樹立されたものなので、Mishima Battery of Mouse Strainsと呼ぶことにした。自発運動性、情動性、学習記憶能力などの行動解析を行った結果、行動には野生由来系統間で大きな多様性があることが分かった(Koide *et al.*, 2000)。このような行動形質の系統間での違いは、遺伝子により制御されていると考えられるので、その遺伝的機構を解明するための実験を行ってきた。対象とする行動として、飼育ケージ内での運動量を示す自発運動性と、嫌悪記憶に基づく回避行動を解析する受動的回避行動の2つの行動パターンについて遺伝的交配を行い解析している。

自発運動性の解析：野生マウス由来のKJR系統は高活動性であるのに対し、BLG2系統は低活動性である。この2つの系統を交配して得られたF1雑種は高活動性であることから、高い活動性は優性に遺伝することが示された。このF1をBLG2系統に戻し交配することにより戻し交配個体群であるN2を得て、その自発運動性解析と共に各個体から得たDNAサンプルの遺伝子型解析を進めてきた。得られたデータはMapManagerQTXソフトにより連鎖解析した。その結果、KJR系統の高い自発運動性に関わる遺伝子は第3番染色体の遠位部位に存在することが分かった。現在遺伝子座を更に詳細に解析すると共に、遺伝子単離に向けて解析を進めている。

受動的回避行動の解析：明暗箱内での嫌悪記憶に基づいた回避行動について、様々な系統を用いて解析し比較したところ、C57BL/6系統は高い学習能力を示したのに対し、BLG2系統は低い学習能力を示した。この能力差に関わる遺伝子をマッピングするために、高学習系統と低学習系統を交配し得られたF1個体をBLG2系統に戻し交配した。F1個体は解析により高い学習能力を示す。戻し交配個体群の各個体について受動的回避行動テストを行い、更にDNAサンプルから遺伝子型解析を行った。上記と同様に連鎖解析を行った結果、染色体の1番、2番、7番と18番に受動的回避行動に関わる遺伝子が存在することが示唆された。この遺伝子マッピングの結果が正しいとすると、逆にC57BL/6をBLG2に連続して戻し交配を続け、毎世代高い回避能力に関して選抜したコンジュニック系統では、これらの遺伝子座はC57BL/6系統由来のものが存在するはずである。独立に作出した3つのコンジュニック系統の内2系統で染色体2番と7番のマッピングされた領域がC57BL/6系統のものとして存在していることが全ゲノムを解析した結果判明

した。このことから、マッピングされた3つの遺伝子座のうち少なくとも染色体の2番と7番に関しては受動的回避行動と強く関連していることが示された。今後はこのコンジェニック系統の世代を進め、更に詳細な解析を行うことにより、2番、7番染色体の遺伝子座と関与している他の遺伝子座についても解析すると共に、2番、7番染色体上に存在する遺伝子のクローニングに向けた解析を進めていく予定である。

以上のように、Mishima Battery of Mouse Strainsと呼ばれる野生由来マウス系統を行動遺伝学に利用することにより、行動に関わる遺伝子のマッピングを有効に進め得ることが示された。

(7)野生由来マウス系統群(Mishima Battery of Mouse Strains)における辛味物質感受性の多様性：古瀬民生¹、矢ヶ崎一三¹、森脇和郎²、David A. Blizard³、城石俊彦、小出 剛^(¹東京農工大、²総研大、³The Pennsylvania State University)

動物がどのような餌を選択するかはそれぞれの食物の持つ味覚に強く依存する。動物の持つ味覚嗜好の形成には生後の経験の他に、遺伝的な因子が深く関わっているとされている。しかし、味覚嗜好の遺伝的プログラミングに関しては未だ不明な点が多い。動物の味覚は甘味、塩味、苦味、酸味、旨味に大きく分けられ、それらは五原味と呼ばれている。ヒトの場合、五原味以外に辛味が味覚として重要な地位を占めている。南米原産のトウガラシは15世紀終わりから世界各地に伝播したが、アジアやアフリカの一部で急速に受け入れられたのに対し、西欧、北米においてはほとんど受け入れられなかった。また、東欧では辛味をほとんど持たないトウガラシの品種が受け入れられた。これは、生後の食習慣だけでなく遺伝的バックグラウンドが辛味嗜好の形成に関与している可能性を示唆している。

トウガラシ由来の辛味物質 Capsaicin の受容体である Vanilloid Receptor-1 は、マウスにおいては侵害性の熱および痛覚刺激の伝達に必須であることが知られており、辛味と熱感覚、痛覚が共通の伝達経路を持つことが考えられる。また、哺乳動物遺伝研究室において樹立、維持されている野生由来マウス系統群 (Mishima Battery of Mouse Strains) では痛覚刺激に対する感受性に多様性が存在することが明らかになっている (Koide *et al.*, 2000)。以上の理由から、Mishima Battery of Mouse Strains において辛味に対する感受性に系統間差が存在することが期待された。そこで、本研究では Mishima Battery of Mouse Strains の11系統の野生由来マウスと、代表的な実験用マウス系統である C57BL/6, BALB/cAnN, DBA/1 の計14系統を用いて辛味嗜好性の遺伝的解析を目的とした実験を行っている。辛味嗜好性の試験として、最初に Capsaicin 水溶液を用いた12時間の l-bottle test を行った。まず、試験用給水瓶にて2日間予備飼育を行った後、暗期12時間の飲水量を測定し、その三日間の平均をマウス個体毎の飲水料のコントロールとした。その後、明期の終了直前に給水瓶を Capsaicin 水溶液の入った物に交換し、暗期中の飲水量を測定した。この Capsaicin 水溶液の濃度を日毎に0.5, 1.0, 4.0, 7.0, 10.0, 15.0 μ M の順に上昇させ、摂取量をコントロールと

の比率で表した。その結果、全ての系統でCapsaicin濃度の上昇と共に摂取量が減少し、マウス系統間でCapsaicin水溶液の摂取量に有意差が見られた。特に、KJRとMSMの野生由来マウスはCapsaicin水溶液を他の系統より有意に多く摂取し、C57BL/6、DBA/1、PGN2は他の系統よりCapsaicin水溶液の摂取量が少なかった。これらの結果はMishima Battery of Mouse Strainsに対して行った痛覚試験の結果と同様の傾向を示している。さらに、KJR、MSM、C57BL/6、DBA/1、SWNに対して行った3時間という短時間の1-bottle testの結果も12時間の1-bottle testと同様の傾向を示し、これらの系統間でのCapsaicin水溶液の摂取量の差は飲水欲求の差に由来するものではないことが明らかになった。また、二日間2本の実験用給水瓶での予備飼育した後、水とCapsaicin水溶液の2種類の給水瓶を48時間供給し、自由に選択させる2-bottle testをMSMとC57BL/6に対して行ったところ、どちらの系統にもCapsaicinに対する嗜好性は見出されず、Capsaicin水溶液は総飲水量の10%の飲水にとどまった。このことは、1-bottle testではCapsaicin水溶液を消費するMSMにおいても水とCapsaicin水溶液の選択になるとCapsaicinを嫌うことを示している。12時間1-bottle testでCapsaicinに対する感受性の大きく異なるC57BL/6とKJRを交配し、得られたF1雑種を用いて12時間1-bottle testを行ったところKJRと近似な結果が得られた。このことから、KJRのCapsaicinに対する高い耐性は優勢に遺伝することが示された。今後このF1個体同士を交配してF2個体群を得て1-bottle testと共に多型解析を行いマウスの辛味感受性に関与する遺伝子座のマッピングを進める予定である。

(8)野生由来マウス²細胞期胚の簡易ガラス化凍結法への応用：桜井宣子¹、水品洋一、陣内寅佳、中瀆直巳²、小出 剛、城石俊彦¹(株)ジー・エー・シー、²熊本大学動物資源開発研究センター)

近年、マウスを用いた遺伝学の研究において、従来用いられていた標準的な近交系との間に多くの遺伝的多型を有する野生由来系統マウスの必要性が注目されつつあり、これに伴ってこれら野生由来系統の胚や精子の凍結保存を行う機会の増加が予想されている。このような中、マウス胚の凍結保存方法として簡易ガラス化凍結法が確立され、その普及は従来の緩慢凍結法から移行しつつある。しかしながら現在のところ、簡易ガラス化法は代表的な標準的系統にのみ有効性が確認されたにすぎなく、また野生由来系統等のなかには著しく胚凍結保存効率及び融解後発生率の悪い系統が存在する。これを踏まえて、我々は本研究室で維持及び繁殖を行っている野生由来マウス系統のうち数系統(MSM/Ms, JF1/Ms等)と標準的系統(近交系、交雑群)を対象に、簡易ガラス化法の効果を調べている。

サンプルとなる2細胞期胚はその取得効率を考慮し、系統毎にIVF(*in vitro* fertilization)を行うことで得た。次に、これらを緩慢法及び簡易ガラス化法にて凍結保存した。融解はそれぞれの融解法に従って行い、その後形態を観察し、正常と判定した胚を偽妊娠雌(B6C3F₁)に卵管移植した。卵管移植後、18日目に開腹し着床、妊娠

および正常仔の確認を行った。結果、調べた系統のうち、近交系および交雑群に加え、JF1/Ms, BLG2/Msでは双凍結方法間の差はあまり見られなかった。また、KJR/Ms, SWN/Msでは、緩慢法に比べ簡易ガラス化法での効率が悪く、CHD/Msは、いずれの方法でも着床が確認されなかった。以上のことより、野生マウス系統によって緩慢凍結法と簡易ガラス化凍結法で胚に与える影響に違いが認められ、野生マウスを含む多くの系統で簡易ガラス化法が適応できることがわかった。現在は、まだ調べられていない系統についてさらに調べを進めており、今後緩慢凍結法と簡易ガラス化凍結法の効果がより明らかになることが期待される。

研究業績

(1)原著論文

1. Koide, T., Moriwaki, K., Ikeda, K., Niki, H. and Shiroishi, T.: Behavioral study on inbred strains established from wild mice: BLGs has impaired ability for learning and memory. *Mammal. Genome*, **11**, 664-670, 2000.
2. Saeki, N., Kuwahara, Y., Sasaki, H. and Shiroishi, T.: Gasdermin(Gs)localizing to mouse chromosome 11 is predominantly expressed in upper gastrointestinal tract but significantly suppressed in human gastric cancer cells. *Mammal. Genome*, **11**, 718-724, 2000.
3. Watanabe, T., Yoshimura, A., Mishima, Y., Endo, Y., Shiroishi, T., Koide, T., Asakura, H. and Kominami, R.: Differential chromatin packaging of genomic imprinted regions between expressed and non-expressed alleles. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 3029-3035, 2000.
4. Shimada, Y., Nishimura, M., Kakinuma, S., Okumoto, M., Shiroishi, T., Clifton, K. H. and Wakana, S.: Radiation-associated loss of heterozygosity at the *Znfn1a1(Ikaros)* locus on chromosome11 in murine thymic lymphomas. *Radiat. Res.* **154**, 293-300, 2000.
5. Shimizu, K., Nagamachi, Y., Tani, M., Kimura, K., Shiroishi, T., Wakana, S. and Yokota, J.: Molecular cloning of a novel NF2/ERM/4. 1 superfamily gene. *ehm2*. that is expressed in high-metastatic K1735 murine melanoma cells. *Genomics* **65**, 113-120, 2000.
6. Miyoshi, N., Wagatsuma, H., Wakana, S., Shiroishi, T., Nomura, M., Aisaka, K., Kohda, T., Surani, M. A., Kaneko-Ishino, T. and Ishino, F.: Identification of an imprinted gene. *Meg3/Gtl2* and its human homologue MEG3. first mapped on mouse distal chromosome 12 and human chromosome 14q. *Genes Cells* **5**, 211-220, 2000.
7. Ishii, T., Serizawa, S., Kohda, A., Nakatani, H., Shiroishi, T., Okumura, K., Iwakura, Y., Nagawa, F., Tsuboi, A. and Sakano, H.: Projection of three subsets of olfactory neurons expressing the odorant receptor transgene and the odor-

ant receptor transgene and the two cognate endogenous alleles. in press, Gene to Cell, 2000.

(2) その他

1. 城石俊彦：マウス突然変異体を利用した体系的遺伝子機能解析研究，実験医学増刊号「ゲノム医科学とこれからのゲノム医療」，Vol. 18, 69-74, 2000.
2. 城石俊彦：ランダムミュータジェネシス，変異原物質法，共立出版「生命工学新しい生命へのアプローチ」，印刷中．
3. 城石俊彦：ランダムミュータジェネシスに基づいたマウスゲノム機能解析，南山堂「免疫学のニューフロンティア」，印刷中．
4. 小出 剛：野生マウスの行動遺伝学，アニテックス 12:63-70, 2000.

(3) 発表講演

1. 矢田有加里，牧野 茂，榎屋啓志，石和貞男，城石俊彦：軸前側多指症を示すマウス突然変異体 X-linked polydactyly (Xpl) 及び luxate (lx) の遺伝学的解析，日本発生物学会第 33 回大会，高知，5 月，2000.
2. 牧野 茂，矢田有加里，石島淳子，榎屋啓志，深見伸一，中福雅人，橋本康弘，米川博通，城石俊彦：patched 突然変異マウス，mesenchymal dysplasia (mes) の解析，日本発生物学会第 33 回大会，高知，5 月，2000.
3. 小出 剛，森脇和郎，城石俊彦：学習記憶能力と自発運動性の行動遺伝学的解析，第 47 回日本実験動物学会，徳島，5 月，2000.
4. 城石俊彦：ポストシーケンス時代のマウスゲノム解析，Brain テクノフォーラム，東京，10 月，2000.
5. Makino, S., Yada, Y., Masuya, H., Ishijima, J. and Shiroishi, T.: Analysis of patched (*ptc*) hypomorph mutant, mesenchymal dysplasia (*mes*). The 14th International Mouse Genome Conference, Narita Japan, November, 2000.
6. Sagai, T., Masuya, H., Shimizu, K., Yada, Y. and Shiroishi, T.: Molecular analysis of a preaxial polydactyly mutation, Hemimelic extra toes (Hx). 13th International Mouse Genome Conference, Narita Japan, November, 2000.
7. Oka, A., Mita, A., Mizushina, Y., Toshimori, K. and Shiroishi, T.: Males of X-chromosome consomic strain, B6. MSM-Chr. X, show spermatozoa malformation and sterility : phenotype characterization and mapping of responsible gene(s). The 14th International Mouse Genome Conference, Narita Japan, November, 2000.
8. Yada, Y., Makino, S., Ishiwa, S. and Shiroishi, T.: Genetic analysis of a mouse preaxial polydactylous mutant, X-linked polydactyly (Xpl). 14th International Mouse Genome Conference, Narita Japan, November, 2000.
9. Koide, T., Furuse, T., Moriwaki, K. and Shiroishi, T.: Mapping of the genes

- responsible for the performance in the passive avoidance test using strains derived from wild mice. The 14th International Mouse Genome Conference, Narita Japan, November, 2000.
10. Shimizu, K., Ishijima, J., Kikkawa, Y., Yonekawa, H., Tsukahara, K., Hirasawa, T., Makino, S., Koide, T., Wakana, S., Balling, R. and Shiroishi, T.: Ribosomal protein L38 is essential for early embryogenesis and skeletal patterning of mice. The 14th International Mouse Genome Conference, Narita Japan, November, 2000.
 11. Ishijima, J., Shimizu, K., Kikkawa, Y., Yonekawa, H. and Shiroishi, T.: A modifier gene of the mouse ribosomal mutant Tail-short (Ts) is linked to the causative gene. The 14th International Mouse Genome Conference, Narita Japan, November, 2000.

F・b. 発生工学研究室

当研究室は、マウスの発生工学的手法を駆使して、発生現象の解明を目指した遺伝学的解析を行っている。研究室の構成としては相賀裕美子が平成12年10月1日付けで教授として着任、平成12年度に関しては、着任前に所属していた、国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・第4室室長と併任である。よって、今年度の研究はほとんど国立医薬品食品衛生研究所で行われたものである。研究の遂行にあたっては、日本学術振興会の基盤研究A「脊椎動物の体節形成の分子機構に関する発生遺伝学的解析」、文部省科学研究費・特定研究A「ボデイプラン」の公募研究「体節形成における分節化開始機構の解析」、特定研究A「転写調節機構」の公募研究「体節形成にのみ Mesp1, Mesp2 遺伝子を欠損したマウスの作成と解析」、特定研究B「分子時計による分節性の成立機構」に関して補助金の交付を受けている。また科学技術庁・振興調整費・総合研究「臓器・組織再生システムのための基盤技術の開発」のなかで研究題目「原腸陥入をモデルとした組織系形成の研究」を担当し、科学技術庁・振興調整費・開放融合「オーガニソースとしての中胚葉細胞と器官形成クロックの研究」をサブリーダーとして、また科学技術振興事業団の戦略的基礎研究推進事業「生殖細胞形成の分子メカニズム」(研究代表者・筑波大・小林 悟)の分担研究を行っている。

(1) 発生工学的手法の改革と開発：相賀裕美子

我々の研究室では、共通した手法として、主にES細胞を用いた相同組換を介したりバースジェネテイクスを行っている。近年、この手法を用いて、単に遺伝子をノックアウトするだけでなく、ある遺伝子を特定の場所で、特定の時間にノックアウトあるいは逆に発現させることも可能になってきた。また遺伝子を自由に入れ替えることも可能で

ある。しかしそのためには、多くの発生工学的手法の開発を行う必要がある。我々は、Cre-lox 系と Flp-*frt* 系という 2 つの site-specific recombination 系を駆使して、これらを可能にするシステムの開発を行っている。

(2) 体節形成における分節性確立の分子機構の解明：相賀裕美子，高橋 雄，高木篤也，北林あや(国立医薬品食品衛生研究所・毒性部)

近年、脊椎動物の分節性の形成機構がショウジョウバエの分節と全く異なっていることが明らかになってきており注目を集めている。我々は以前独自に単離した遺伝子がコードする転写因子 *Mesp2* が体節の分節化に非常に重要な働きをすることをしめしてきた。*Mesp2* ノックアウトマウスでは体節の分節化が全くおこらず、脊椎骨の後方化がおこる。一方、千葉大の古関らによって作成された *Presenilin-1* のノックアウトマウスは、体節が前方化するという正反対の表現型を示した。そこでこれらのノックアウトマウスを交配し、ダブルノックアウトマウスを作成したところ、*Mesp2* ノックアウトマウスと全く同じ表現型をしめた。この現象は *Mesp2* が Notch シグナル系を制御して、Notch リガンドである Dll1 を *Presenilin-1* を介さずに抑制する結果であると結論するにいたった(原著論文 2)。またその際に *Mesp2* の発現領域が 1 体節全体からその前方に片寄ることにより、体節の前後が形成されることも見出した。そこで、*Mesp2* 遺伝子の発現調節領域を解析したところ、発現の誘導に必要なエレメントと体節の後方で発現を抑制するために必要なエレメントが存在することがわかった。現在、*Mesp2* の上流および下流の遺伝子の探索を勢力的に行っており、体節の分節化に関わる遺伝子カスケードを明らかにしたいと考えている。

(3) 初期中胚葉の形成機構：相賀裕美子，北嶋 聡(国立医薬品食品衛生研究所・毒性部)

発生過程で最も重要なイベントのひとつが原腸陥入でこの結果形成された中胚葉がいろいろな組織、器官の形態形成に関わってくる。我々は *Mesp2* と同じファミリーに属するが、その初期の発現が初期中胚葉に限局する遺伝子 *Mesp1* が心臓、血管を形成する中胚葉に発現することを明らかにしてきた(原著論文 3)。*Mesp1* 遺伝子に Cre recombinase を導入したマウスを利用することにより、*Mesp1* を発現する細胞の細胞系譜を明らかにすることができる。我々は、心臓、血管以外にも、肝臓や、筋肉の一部にも *Mesp1* を発現する細胞が寄与することを見出した。またレポーターに GFP を発現するマウスを使用することにより、細胞を単離することが可能になった。この系を利用して、*Mesp1* 発現細胞がいつ、どのような状況でいろいろな組織の前駆細胞としての決定を受けるのか解析を行っている。

(4) 生殖細胞の発生機構：相賀裕美子，原口精輝(滋賀医科大学・微生物)

マウスの発生過程で始原生殖細胞の分化は、アルカリフォスファターゼ陽性の細胞として胚体外に形成される尿膜基部に現れる。このような出現様式は、ショウジョウバエの生殖細胞との相同性を彷彿させる。そこで我々はショウジョウバエ遺伝子の中でも特に生殖細胞の形成に重要な働きをしていると考えられた *Nanos* 遺伝子ホモログを単離し

た。マウスの *Nanos* 遺伝子は、ショウジョウバエ遺伝子と同様の Zinc finger モチーフを有しており、機能的な相同性を期待させるものであった。しかしその発現は未受精卵や受精直後の胚以外に、神経系に非常に強い特異的な発現を示した。そこでこれらの機能を解析するために条件付きのノックアウトマウスの作成を試みている。

研究業績

(1) 原著論文

1. Sawada, A., Fritz, A., Jiang, Y-J, Yamamoto, Y., Yamasu, K., Kuroiwa, A., Saga, Y. and Takeda, H.: Zebrafish *Mesp* family genes. *mesp-a* and *mesp-b* are segmentally expressed in the presomitic mesoderm. and *Mesp-b* confers the anterior identity to the developing somites. *Development* **127**: 1691-1702, 2000.
2. Takahashi, Y., Koizumi, K., Takagi, A., Kitajima, S., Inoue, T., Koseki, H., Saga, Y.: *Mesp2* initiates somite segmentation through the Notch signalling pathway. *Nat Genet.* **4**: 390-6, 2000.
3. Kitajima, S., Takagi, A., Inoue, T., Saga, Y.: *MesP1* and *MesP2* are essential for the development of cardiac mesoderm. *Development.* **127**: 3215-26, 2000.

(2) その他

1. 高橋 雄, 相賀裕美子: マウス体節形成と Notch シグナル, *細胞工学*, **19**: 1434-1437, 2000.

(3) 発表講演

1. 高橋 雄, 小泉健一, 北嶋 聡, 高木篤也, 井上 達, 古関明彦, 相賀裕美子: *Mesp2* は Notch シグナリングと *Dll1* の発現を制御することによって体節の前後極性の確立に関与する. 第 33 回日本発生生物学会, 高知, 5 月.
2. 北嶋 聡, 高木篤也, 井上 達, 相賀裕美子: 転写因子 *MesP1* および *MesP2* の初期中胚葉形成における役割. 第 33 回日本発生生物学会, 高知, 5 月.
3. 澤田篤志, 黒岩 厚, 相賀裕美子, 武田洋幸: ゼブラフィッシュ体節形成における *her1* の周期的な発現. 第 33 回日本発生生物学会, 高知, 5 月.
4. Kitajima, S., Takagi, A., Inoue, T. and Saga, Y.: *Mesp1* and *Mesp2* are essential for the development of cardiac mesoderm. *Mouse molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, New York, 8 月.
5. Nomura-Kitabayashi, A., Takagi, A., Kitajima, S., Sawada, A., Inoue, T., Takeda, H. and Saga, Y.: *mespb*, zebrafish *Mesp*-related gene, partially rescues segmentation defect in *Mesp2*-deficient mice. Cold Spring Harbor, New York, 8 月.
6. Takahashi, Y., Inoue, T. and Saga, Y.: Expression of *Mesp2* is correlated with the molecular clock and regulates Notch pathway genes in somitogenesis. Cold Spring Harbor, New York, 8 月.

7. Takahashi, Y., Koizumi, K.-i., Takagi, A., Kitajima, S., Inoue, T., Koseki, H. and Saga, Y.: Mesp2 initiates somite segmentation via the Notch signaling pathway. Cold Spring Harbor, New York, 8月.
8. Kitajima, S., Takagi, A., Inoue, T. and Saga, Y.: MesP1 and MesP2 are essential for the development of cardiac mesoderm. International congress on cell differentiation and development, Gold-cost, 9月.
9. 相賀裕美子: 体節形成とNotchシナリング: 転写因子Mesp2による制御. 第73回日本生化学会, 横浜, 10月.
10. 相賀裕美子: 繰り返しパターンの確立機構. 第53回日本細胞生物学会, 福岡, 10月.
11. Saga, Y.: Function of Mesp2, a bHLH-type transcription factor, in somite segmentation. International Symposium in Conjunction With Award of the International Prize for Biology -Frontiers of Developmental Biology, Tokyo, 11月.
12. 高橋 雄, 小泉健一, 北嶋 聡, 高木篤也, 井上 達, 古関明彦, 相賀裕美子: 体節の前後極性の形成におけるMesp2とNotchシグナリングの役割. 第23回日本分子生物学会, 神戸, 12月.
13. 高木篤也, 北嶋 聡, 北林あや, 高橋 雄, 井上 達, 相賀裕美子: 転写因子Mesp2及びParaxisのダブルノックアウトマウスの解析. 第23回日本分子生物学会, 神戸, 12月.
14. 北林あや, 高木篤也, 北嶋 聡, 澤田篤志, 井上 達, 武田洋幸, 相賀裕美子: Mesp転写因子の機能解析: ゼブラフィッシュMesp2ホモログ, mespbによるレスキュー. 第23回日本分子生物学会, 神戸, 12月.
15. 原口清輝, 北嶋 聡, 高木篤也, 北林あや, 井上 達, 小林 悟, 相賀裕美子: マウスnanos遺伝子の機能解析. 第23回日本分子生物学会, 神戸, 12月.

F-c. 植物遺伝研究室

当研究室が系統生物研究センターで植物遺伝研究室として研究を開始して4年が経過した。現在進行中の研究は「イネ胚発生およびシュート分化過程における遺伝的プログラムの解明」「イネ生殖細胞形成過程で機能する遺伝子群の解析」「イネ細胞核の構築機構研究」「遺伝子分離頻度の歪みをもたらす遺伝因子の解析」の4課題について分子細胞生物学および分子遺伝学的手法を用いて研究を進めている。これらの課題の素材開発を図る目的で遺伝子改変系統の作成と利用「イネエンハンサートラップ系統の開発」と「イネ遺伝子破壊系統の作成と検索」を進めた。またイネ遺伝資源事業としては、全国レベルでのイネ遺伝資源小委員会の組織と運営と、各委員の協力を得てイネ遺伝資源データベース“Oryzabase”の構築を行い、第1版を公開することができた。従来よりおこなわれて来た野生イネ系統の増殖、形質調査、保存、分譲も事業の一環として継続している。

スタッフは、助教授 倉田のり, 助手 伊藤幸博, 実験圃場助手 野々村賢一, 実験

圃場技官 永口 貢, また非常勤博士研究員として三好一丸, 鈴木 温, 遺伝学普及会研究員として春島嘉章, 守口和基が加わり研究の推進を計った. 実験圃場技官 宮林登志江は野生イネの増殖, 分譲を専任で, 遺伝学普及会研究員 井山審也は "Oryzabase" の構築支援をおこなった. 2000年度は, 総研大博士課程1年の安 炳玉(Byoung-Ohg AHN, 韓国), 東海大学工学部より修士2年の高谷和彦, 斎小百合の2名が研究に参加した. 研究補助員, 妹尾治子, 鈴木和子, 坂井里美, 牧野智美, 石井明美, 宮下弥生, 佐藤千尋, 望月宏美, 笹賀香苗が研究支援を, 佐伯園子, 近藤恭子が事業支援を行った.

2000(平成12)年度の研究は, 遺伝学研究所校費, 総研大校費および総研大共同研究費, 文部省系統保存事業費に加え, 文部省科学研究費助成金・奨励研究「イネの機能的動原体領域の単離と構造解析(野々村)」、基盤研究(B)「イネのエンハンサー・トラップ系統の作出と変異体解析(倉田)」、および生物系特定産業技術研究推進機構より新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業「穀類細胞への新たな遺伝子導入法の開発(野々村)」、農林水産省, 生物資源研究所より「遺伝子の分離ゆがみを引き起こす原因遺伝子の単離と機能解析(倉田)」「不稔遺伝子群の網羅的単離と不稔特性による機能分類(倉田)」、総合研究大学院大学共同研究「ゲノム構造のダイナミズムとその生体機能への変換(倉田)」(代表者, 基礎生物学研究所, 飯田 滋)に参加した. 研究室として以下4件の遺伝研共同研究「イネ5S rRNA 遺伝子の解析: スパーサー領域の多様性の獲得機構に関する研究」(東京大学, 大坪久子), 「トランスポゾン Rice mutator による新たな遺伝子破壊系ベクターの開発」(弘前大学, 石川隆二), 「イネの発生を制御する分子機構の解明」(東京大学, 平野博之), 「シロイヌナズナの根における環境シグナル受容細胞の特定」(東北大学, 高橋幸秀)および共同研究集会「種子を舞台とした発生生長プログラム」(代表: 三重大学, 服部束穂)を実施した.

1. イネ胚発生およびシュート分化過程における遺伝的プログラムの解明

この課題では, イネ胚発生過程および茎頂分化組織で発現する発生分化のキーマターとなる遺伝子を単離し, その解析を通して種子胚と再分化胚発生および茎頂分化を制御する遺伝プログラムを明らかにすることを目指している. そのターゲットとしてホメオボックス遺伝子や OshAP3 遺伝子群の解析を行っている.

(1) イネ胚発生過程で発現する KNOX ファミリーホメオボックス遺伝子の発現制御: 伊藤幸博, 丹羽康夫¹, 倉田のり¹(¹ 静岡県立大・食糧栄養科学部)

これまでに KNOX ファミリーのクラス1に分類されるホメオボックス遺伝子5つの cDNA とゲノムクローンを単離し, その発現パターンと過剰発現の影響を調べた. その結果, クラス1の遺伝子(OSH1, OSH6, OSH15, OSH71)はいずれもシュートメリステムの形成と形成されたメリステムが未分化な状態を維持するのに働いていると考えられた. イネの正常な発生にはこれらの遺伝子がシュートメリステム特異的に発現することが重要である. そこで OSH1 の発現制御機構を調べた結果, OSH1 プロモーターはシュートメリス

テムだけではなく葉でも活性があること、cDNAを導入するとプロモーターの有無やcDNAの向きに関係なくOSH1が葉で発現し、異所発現させた場合と同様な葉の形態異常が引き起こされることがわかった。このことはOSH1のプロモーター領域にシュートメリステムと葉の両方で発現させる配列があり、コード領域内には葉での発現を抑制する配列があることを示唆する。

今年度は、このことを検証するため、葉での発現抑制を引き起こす配列を検出する実験を行った。まずOSH1 cDNAの5'側および3'側から欠失cDNAのシリーズを作成しイネに導入した。その結果、葉でのOSH1の発現にはその方向には関係なく完全なOSH1タンパク質をコードできる配列が必要ながわかった。またフレームシフトしたcDNAでも導入による葉の形態異常は観察されない。さらに3' UTRの一部だけを欠失したcDNAを導入して発現解析を行った結果、葉の形態異常が見られ、ここでは導入遺伝子ではなく内在のOSH1が発現する事が明らかとなった。OSH6, OSH15, OSH71の発現制御機構についても、すべてOSH1と同様な結果を得た。このことはKNOXファミリーのこれらのホメオボックス遺伝子では、コード領域の特定のsequenceではなく、同じタンパク質をコードする全長の配列が与えられた時のみ内在のOSH遺伝子が葉で異所的に発現誘導され、形態異常が引き起こされることを示している。この奇妙な現象を説明できるメカニズムを見いだすためには、葉でのOSH遺伝子群の発現にかかわるシグナルの流れを理解する必要がある。

(2) KNOXファミリークラス2遺伝子のalternativeスプライシング：伊藤幸博，倉田のり

これまでにKNOXファミリーのクラス2に分類される3つの遺伝子(HOS58, HOS59, HOS66)のcDNAを単離した。塩基配列を調べた結果、いずれもタンパク質のC末端付近にalternativeスプライシングがあることがわかった。さらに今年度はこれらの遺伝子のN末端にもalternativeスプライシングがあることを見いだした。RT-PCRを行ったところ、3遺伝子とも同様なalternativeスプライシングが見られた。短いmRNAは長いmRNAの第1エクソンを欠き、第1イントロンの途中から始まっていた。第1エクソンがコードするアミノ酸配列にはアラニンの連続とグリシンの連続が見られ、転写の活性化あるいは抑制に寄与していると考えられている。それぞれのmRNAについて全ての器官(根、葉身、葉鞘、花、カルス、再分化中のカルス)でその発現を調べた結果、3つの遺伝子ともに調べた器官によって長いmRNAと短いmRNAの発現の差が検出され、それぞれの遺伝子に組織特異的スプライシングがあることがわかった。

(3) KNOXファミリーのホメオボックス遺伝子の突然変異体の選抜：伊藤幸博，広近洋彦¹⁾，倉田のり¹⁾ 農水省・生物資源研)

遺伝子の機能を明らかにしたり、上記のようなalternativeスプライシングの意義を明らかにするには、その遺伝子の突然変異体を分離し解析することが有効である。塩基配列が既知の遺伝子の突然変異体を分離する手法として、イネでは内在性のレトロトランスポゾンによる遺伝子破壊が現在最も有効な手法である。この方法は、培養により

Tos17 レトロトランスポゾンが無作為に転移させた個体を多数作成し、PCR により目的の遺伝子の Tos17 挿入株を選抜する方法である。昨年度はこの系を用いてホメオボックス遺伝子の突然変異体を選抜した結果、HOS59 の 3' UTR に Tos17 が挿入した株が得られた。今年度はこの株での HOS59 の発現パターンの変化と形態異常を調べた。その結果、mRNA の発現パターンも形態も野生型と違いが見られなかった。よってこの株では HOS59 は正常に機能していると考えられた。

(4) 初期胚で発現するレセプター型プロテインキナーゼ遺伝子の単離：高谷和彦，伊藤幸博，倉田のり

絶対的な細胞系譜がないと考えられる植物の発生では、位置情報や近隣の細胞とのコミュニケーションが重要な意味を持つ。そこで、そのようなシグナル伝達の重要な担い手と考えられているレセプター型プロテインキナーゼ遺伝子の解析を行っている。

昨年度、ニンジン体細胞胚の 1 細胞期から発現する SERK (somatic embryogenesis receptor-like kinase) 遺伝子のホモログを受精後 3 日胚 cDNA ライブラリーから 2 種類単離し、さらにそのゲノムクローンも単離した。それらは ORK1 (*Oryza sativa* Receptor-like Kinase 1) および ORK6 と名付けた。

今年度は ORK1 および ORK6 の塩基配列の決定と、ORK6 の過剰発現、アンチセンス導入実験を行った。ORK1 cDNA は全長 cDNA に至っていないが、ORK6 は全長 cDNA が得られ、推定タンパク質には N 末端からシグナルペプチド、ロイシンリッチリピートを持つレセプタードメイン、膜貫通領域、キナーゼドメインが見られた。ORK1、ORK6 ともそのキナーゼドメインは植物のレセプター型プロテインキナーゼのキナーゼドメインとよく似ており、その中でもシロイヌナズナの CLAVATA1、ERECTA などのシュートメリステムで機能するキナーゼやニンジンの SERK と特に似ていた。また、ORK1 のゲノムクローンは非常に特徴的な構造をしていた。ORK6 cDNA をカリフラワーモザイクウィルス 35S プロモーター (35S) の下流にセンスおよびアンチセンス方向に連結してイネに導入し、現在形質転換体を育成中である。

(5) イネの HAP3 サブユニット遺伝子群の解析：倉田のり，三好一丸，伊藤幸博

正常種子胚発生時における遺伝的プログラムと、培養細胞であるカルスからの不定胚再生分化時におけるプログラムの普偏性あるいは特異性を解析することを目的としてこの課題を進めている。アラビドプシス *LEC1* 遺伝子は、この遺伝子の過剰発現個体において、葉すなわち体細胞からほぼ完全な多数の不定胚を形成する。この遺伝子は、CAATT 結合タンパクのサブユニットのひとつ HAP3 であることがわかった。この遺伝子が不定胚形成のキーファクターとして働く可能性にもとづき、イネの不定胚形成における機能を解析するため、イネ HAP3 ホモログの複数の cDNA クローンを受精後 3 日胚のイネ cDNA ライブラリーより単離した。先に単離した OsHAP3-1 の完全長 cDNA は発現解析を行い

(6) の実験に進めた。また、完全長と思われるクローンとして OsHAP3-3 が、さらに約 6 割のゲノムシーケンス (Monsanto 提供) および EST 情報から *LEC1* とホモロジーの高

い2つのクローンOsHAP3-4, OsHAP3-5と, OsHAP3-1に近いOsHAP3-2, OsHAP3-6, OsHAP3-7, OsHAP3-8を検出した。これらの遺伝子の機能分化, 発現特性, 発生との関わりを解析を進める予定である。

(6) 形質転換イネを用いたOsHAP3-1の機能解析: 伊藤幸博, 永口 貢, 三好一丸, 倉田のり

(5)の系で得られたOsHAP3-1 cDNAを, 35Sの下流にセンスおよびアンチセンス方向に連結し, イネに導入した。センス個体は何ら異常は見られなかったが, アンチセンス個体では葉の緑色が薄くなり, 葉が小さくなった。RNAi個体でもアンチセンス個体と同様な異常が見られた。葉の緑色が薄くなるイネの突然変異体は多数知られ, マッピングもされている。そこでOsHAP3-1がそのような突然変異体の原因遺伝子である可能性を考え, そのマッピングを行った。その結果, OsHAP3-1は第1染色体長腕のRIマップ125.5cMから140.5cMの間に位置することがわかった。この付近には*virescent6*(CLマップ149cM)がマッピングされている。現在*virescent6*変異体のOsHAP3-1遺伝子に変異が見られないか調査中である。

(7) イネヘテロクロニック変異*plastichron 1*の原因遺伝子のポジショナルクローニング: 安 炳玉, 三好一丸, 伊藤幸博, 倉田のり

一般に植物のライフサイクルは胚発生, 初期栄養生長 (juvenile phase), 後期栄養生長 (adult phase), 生殖生長の4つの生長相に分類される。各生長相ではそれぞれ特異的な遺伝的プログラムが発現し, その生長相に独自の発生様式が展開される。これら各生長相特異的なプログラムが時間的に正確にコーディネートされることで, 植物体の正常なライフサイクルが達成されると考えられているが, その遺伝的制御機構や分子の基盤についてはほとんど明らかになっていない。近年, イネにおいて栄養生長相の発現期間が延長している (heterochronic mutation) と考えられる突然変異体*plastichron1*が単離された。*plal*突然変異は単因子劣性の遺伝様式を示し, 劣性ホモ接合体では植物体の矮化, 葉身, 葉鞘のサイズの縮小, 葉間期の短縮などの種々の表現型の他, 穂の原基がshootに転換するといった多面的な変異形質が観察され, 植物の発育制御の遺伝的プログラムを考察する上で非常に貴重な材料である。この*plal*突然変異の原因遺伝子のポジショナルクローニングを進めている。

すでに決定した*plal*遺伝子のラフな座上位置を基に, 詳細な連鎖解析を行い第10染色体の短腕, RFLPマーカーC961とR1738Aに挟みこまれる領域にファインマップした。最接近マーカーC961をプローブにBACライブラリーのスクリーニングを行い, BACコンテイングを用いて*plal*遺伝子座近傍の詳細な物理地図を作成した。その結果単一BACクローン上の約100Kbの領域の中に*plal*遺伝子を追い込むことが出来た。

2. イネ生殖細胞形成過程で機能する遺伝子群の解析

(1) イネの生殖細胞形成過程の細胞学的解析: 三好一丸, 野々村賢一

イネの生殖器官, すなわち葯や子房組織の形成過程と減数分裂各ステージにおける染

染色体動態の関係を明らかにするため、まず正常なイネの組織切片を作成して組織学的解析を行った。その結果、穎花長あるいは葯長は、他の水稻品種と同様に「日本晴」においても減数分裂のステージを推定するのに有効であった。特に穎花の長さで減数分裂開始期、染色体対合が進行するザイゴテン期、遺伝的組み換えが起こるパキテン期、第一減数分裂期、第二減数分裂の終了時期を特定出来ることがわかり、今後の実験系の基礎となった。

(2) イネの減数分裂期および生殖細胞形成期の突然変異体の選抜と解析：野々村賢一、永口 貢、廣近洋彦¹、倉田のり¹(農水省・農業生物資源研)

生殖細胞の分化から減数分裂の過程は、両親由来の相同染色体の対合や遺伝子の組み換えなど真核生物の遺伝に重要な現象を含んでおり、それらに関わる遺伝子は酵母から高等動物まで高度に保存されていることが知られている。しかしその現象は複雑で、まだ充分な遺伝学的解析がなされていない分野である。また主に植物でみられる倍数性進化を伴う遺伝様式については、ほとんど何もわかっていない。ここでは、減数分裂期を含む生殖細胞の形成過程に関するイネ突然変異体を選抜、解析することで、高等植物における生殖細胞形成過程と減数分裂の遺伝的制御機構を明らかにすることを目的とする。

イネでは内在性のレトロトランスポゾンによる遺伝子破壊系統が多数作成されており、これらの系統の後代より不稔の出現する300の変異系統についてスクリーニングを行った。不稔原因となる遺伝子の欠損がどのステージで見られるかにより、前減数分裂期、減数分裂期、半数性配偶子形成以降のステージに関わる変異体を選抜した。この中で減数分裂に関しては、相同染色体の対合異常、染色体の凝縮異常、あるいは配偶子形成の異常などを含む変異体40系統が得られた。今後より多くの突然変異系統を選抜していくとともに、原因遺伝子の単離、組織切片などを用いた機能解析を行っていく予定である。

3. イネ細胞核の構築機構研究

(1) イネ人工染色体の構築：野々村賢一、鈴木 温、斎小百合、倉田のり

植物はカルスから容易に細分化個体が得られる利点があり、人工染色体の細胞への導入、個体分化、および安定した遺伝が実現すれば、植物の染色体工学を大きく前進させることができる。本研究では単子葉植物で最小のゲノムサイズをもつイネで人工染色体を構築することを目的とし、染色体機能に必要な動原体領域に関する解析を行った。

イネの核ゲノムに由来する数百 kbp から 数 Mbp の巨大 DNA 断片を保持している酵母人工染色体(YAC)あるいはバクテリア人工染色体(BAC)のライブラリーから、イネの第5染色体の動原体領域に対応する複数のクローンを選抜し、各クローンを670kbpにわたって整列化した。この整列化地図中で、イネの動原体に局在して動原体機能に重要な役割を果たしていると考えられているタンデム型繰り返し配列 RCS2が100kbpを越えるクラスターを形成しており、その周辺に散在型繰り返し配列 RCE1やジブシー型レトロト

ランスポゾン様配列が多数分布していることが、本研究で明らかとなった。今回得られた整列化地図の周辺では、遺伝的組み換えが抑制されていることや蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションの結果から、この領域が機能的な動原体である可能性が極めて高いことが明らかとなった。

動原体領域に特異的に見られる RCS2 や RCE1 などの繰り返し配列を含む YAC あるいは BAC クローンは現在までに複数得られており、特にその繰り返し配列の構成から、動原体として機能する可能性の高い YAC あるいは BAC クローンをそれぞれ 1 つずつ選び、イネ人工染色体の素材として用いることとした。本年度は選抜した YAC クローンのベクター領域に、酵母の相同組み換え機構を利用して、イネ用のレポーター遺伝子 (35S-GUS) および選択マーカー (ハイグロマイシン耐性遺伝子) を組み込むことに成功した。今後はイネのカルスに導入し、再分化処理を行い、人工染色体を保持する形質転換個体を育成して基礎的あるいは応用的研究に用いる予定である。

(2) イネ染色体上の GFP タグを用いた細胞核内染色体動態の解析：倉田のり

イネ染色体を素材とした核内の染色体動態の研究は、人工染色体の動態解析のみならず、異種野生ゲノム種染色体添加系統や異数体、核構造変異体等の解析に非常に有用である。この課題では、イネ染色体に GFP-Lac repressor と Lac operator repeat array を組み入れて、operator の組込みサイトに GFP を結合させ、GFP の動きを追跡して染色体の核内動態を解析する。このため上記 2 種のベクターをイネ型に改変し、それぞれ別個に形質転換イネの作成を行った。GFP-Lac repressor 導入イネと Lac operator repeat の導入個体それぞれの自殖ホモ個体を選抜し、交配を行った。さらに交配個体を自殖させ Lac operator repeat と GFP-Lac repressor のホモ個体を選抜した。今後 Lac operator repeat の挿入サイトが異なる系統や人工染色体へ導入した系統を、異数体や変異体のバックグラウンド系統と交配することにより、GFP タグの核内での動きを解析し、マクロなレベルでの染色体動態解析に利用していく。

(3) イネ核タンパク質の網羅的単離と機能解析：守口和基、倉田のり

本テーマはイネを用いて、核タンパク質を網羅的に単離し、その全体の構成を明らかにする。さらに、単離した核タンパク質を遺伝子情報や、核内での局在性等で分類し、各分類グループのタンパク質の挙動を調べ、そのダイナミクスを明らかにする。このことにより核の中でゲノムを機能的に構築し作動させるために、何が必要であるかを明らかにすることを目的としている。今年度は核内の状態が最もドラスチックに変化すると考えられる 2 つのステージ、つまりイネ初期胚ステージと減数分裂期を含む生殖細胞形成ステージの細胞群から構築した cDNA ライブラリーを、核移行シグナルを持つタンパク質遺伝子を酵母細胞でトラップして発現させるシステムである NTT (Nuclear Transportation Trap) システム用ベクターに組み込み、解析を開始した。現在の所、マウスのデータに比べ、転写調節因子をコードすると思われる cDNA の割合が高い傾向が得られている。また低頻度ではあるが、RuBisCO activase など、本来核タンパク質ではない

ものをコードする cDNA クローンも得られてきており、全体でこのようなクローンがどの程度の割合で含まれているのか検討する必要がある。今後これまでに得られた 100 クローン程度を用い、GFP との融合タンパク質として植物内で発現させたり、抗体染色等で実際の核局在性を調べることで、NTT 系の植物核タンパク質解析における有効性について検証する。その後さらに多数のクローンの解析を進める。

4. 生殖的隔離に関与する遺伝子のゲノムワイドな解析とポジショナルクローニング

(1) 遺伝子分離頻度の歪みをもたらす遺伝因子の解析：春島嘉章，倉田のり

「種」を分ける遺伝的要因は生殖的隔離と呼ばれ、雑種不和合、雑種死滅、雑種不稔、雑種崩壊などがあげられる。近縁種間または種内では雑種はできるが、その後代で雑種半不稔、雑種崩壊などにより遺伝子型の分離頻度がメンデル則からはずれる現象がしばしば観測される。昨年度まで、ゲノム全体を網羅する遺伝的マーカーの遺伝型分離頻度から、それらの間の生殖的隔離障壁の位置と強さを解析する方法を開発した(投稿中)。アジアの栽培イネは主に 2 つの型(日本型とインド型)に分けることができる。今年度 3 つの異なる日印交雑の F₂ 集団で遺伝型分離頻度を歪める生殖的隔離障壁がどの様になっているか比較した。各 F₂ 集団で観測された生殖的隔離障壁の数は各集団 33, 32, 37 とあまり変わらないが合計 102 隔離障壁のうち少なくとも 83 は異なる遺伝子座であることを明らかにした。このことから日本型とインド型の栽培イネの生殖隔離障壁は日本型とインド型へ分化後にできたものと考えられる。この 3 組の日本型とインド型イネの塩基配列の違いはよく保存されており、共通に用いた RFLP マーカーの 70% 以上は同一の制限酵素断片長多型(RFLP)を示す。ところがこの生殖隔離障壁の遺伝子座は 3 つの組み合わせの間で 80% 以上が異なっており、生殖隔離障壁の遺伝子座領域が他の領域に比べ急速に進化していることを示している(投稿中)。

(2) 生殖的隔離障壁のポジショナルクローニング：春島嘉章，倉田のり

栽培イネの日本晴(日本型)と Kasalath(インド型)を交配した後、F₂ で最も大きく遺伝子型頻度を歪める隔離障壁は第 3 染色体に座乗する配偶体遺伝子であった。今年度はこの遺伝子が配偶体遺伝子で母親の第 6 染色体の遺伝子座と相互作用していることを明らかにした。つまり母親の遺伝子型が Kasalath ホモ型またはヘテロ型の時のみ、この遺伝子座が Kasalath 型の雄性配偶子を後代に 94% 伝達されることを明らかにした。この遺伝子を単離する目的で、この遺伝子領域で組換えしている個体を F₂ の 1,000 個体、戻し交雑 473 個体より選抜し、その自殖種子を得た。現在相互作用を考慮しながら自殖種子の目的遺伝子領域付近の遺伝型を明らかにし、詳細な遺伝子地図を作成している。また、目的遺伝子と最近接(0.13cM)のマーカー C582 をプローブに日本晴 BAC ライブラリーより 9 個のポジティブ BAC クローンを選抜し、これらの BAC クローンをを用いて目的遺伝子座近傍の物理地図を作成中である。

5. イネエンハンサートラップラインの作成

この課題では新たなイネ実験系統としてエンハンサートラップラインを作成し、様々な突然変異体の分離およびその原因遺伝子の単離やエンハンサーの同定を行うと同時に、研究用遺伝資源として保存し、その維持、増殖、分譲を行う予定である。エンハンサートラップ用のベクターとしては、トウモロコシのトランスポゾンAc/Dsをベースにシロイヌナズナ用に開発されたベクターDs-GUSおよび35S-AcTPaseを、一部選択マーカーをイネ用に改変し用いている。Ds-GUSは非自律性因子で、転移には35S-AcTPaseから供給されるAcトランスポゼースが必要である。35S-AcTPaseはトランスポゾンの末端配列を欠いており、転移できない。従って、Ds-GUS系統、35S-AcTPase系統をそれぞれ作成し、交配により両者を共存させることによりDs-GUSの転移を引き起こし、転移後はDs-GUSと35S-AcTPaseを分離させることにより、安定な転移系統として維持することができる。このような実験系統の開発を行っている。

(1)Ds-GUS系統および35S-AcTPase系統の作成と体細胞でのDs-GUSの切り出し：伊藤幸博、永口 貢、倉田のり

Ds-GUSベクターは、カリフラワーモザイクウイルス35S RNAの最小プロモーターにレポーターとしてGUSのコード領域を連結したトラップと選択マーカーとしてハイグロマイシン耐性遺伝子がDs上にのったものである。Ds-GUSの両側にはそれぞれ35Sプロモーターとクロルスルフロン耐性遺伝子のコード領域が存在するため、Ds-GUSが切り出されるとクロルスルフロン耐性遺伝子が発現するようになっている。これまでにDs-GUSを1コピー持つものを42系統、2コピー持つものを50系統作成した。

35S-AcTPaseベクターは、35Sプロモーターの下流にAcトランスポゼースのコード領域を連結したもので、選択マーカーとしてピアラフォス耐性遺伝子がついている。これまでに35S-AcTPaseを導入したイネを6系統作成した。

35S-AcTPaseの6系統とDs-GUSの4系統を交配し、そのうちの17組み合わせで葉でのDs-GUSの切り出しを調べた結果、多くの組み合わせでDs-GUSの切り出しが見られた。

しかし、35S-AcTPase系統の1系統はいずれのDs-GUS系統と交配してもDs-GUSの切り出しを誘導できず、またDs-GUS系統の1系統はいずれの35S-AcTPase系統と交配しても切り出しが見られなかった。

(2)Ds-GUSの生殖細胞での転移：伊藤幸博、倉田のり

今年度はF2個体を用いて、生殖細胞でのDs-GUSの転移を調べた。もしF1個体の生殖細胞でDs-GUSの転移が起これば、その細胞に由来するF2個体は転移体になるはずである。そこで、F2の葉からDNAを抽出しPCRにより転移体の選抜を行った。その結果、全体としては6%(675/10,524)が転移体であったが、転移頻度は0%~16%とDs-GUS系統により大きく異なり、体細胞でDs-GUSの切り出しが見られない組み合わせでは生殖細胞でのDs-GUS転移も見られなかった。また同じ個体でも転移頻度は穂により大きく異なっていた。このことはDs-GUSの転移が穂の発生過程の様々な時期に起こっており、

従って穂が異なれば独立の転移体であることを意味している。イネは株保存が可能で何サイクルにもわたって独立の穂を多数得ることが出来る。Ds-GUSのこのような転移特性は多くの独立の転移体を得るのに非常に有利な性質と考えられる。

(3) クロルスルフロン耐性によるDs-GUS転移体の選抜：伊藤幸博，倉田のり

ここで用いたベクターは，Ds-GUSの切り出しが起こるとクロルスルフロン耐性遺伝子が発現する構造になっている。そこでまずPCR法により選抜された転移体が本当にクロルスルフロン耐性を示すかどうか調べた。転移体由来のF3種子をクロルスルフロンを含む寒天培地に播いたところ，親のDs-GUS系統により程度は異なるがDs-GUS転移体はクロルスルフロン耐性を示すことがわかった。そこでクロルスルフロン耐性，ハイグロマイシン耐性を用いて転移体を選抜した。その結果，全体で7,630個体のF2のうち1,564個体(20%)が転移体と判断された。PCRによる選抜より転移体が得られる頻度が高いのは，PCR法による選抜で転移体を得られたF1の後代をより多く選抜したからと思われる。PCR法による選抜と同様，転移頻度はDs-GUS系統，さらに穂により大きく異なっていた。PCR法およびクロルスルフロン耐性による選抜の結果，現在までに合計2,239の転移体を得られた。以上のことは，ここで用いたAc/Ds系がイネで機能し，薬剤選抜で簡便に多くのDs-GUS転移体を得ることができることを示している。

(4) 新たな系統でのDs-GUSの葉での切り出し：伊藤幸博，永口 貢，倉田のり

4系統のDs-GUSを用いた小規模実験の結果，Ds-GUSがイネで効率よく転移し，転移したDs-GUSが次世代に遺伝することがわかった。そこでさらに多くの転移体を得るためDs-GUSを1コピー持つ新たな22系統を35S-AcTPase系統と交配し，得られたF1の葉でのDs-GUSの切り出しを調べた。35S-AcTPase系統は小規模実験の結果最も効率よくDs-GUSの転移を誘導できる1系統を用いた。その結果，20系統でDs-GUSの切り出しが見られた。

今後，より多くの転移体の選抜，Dsのマッピング，GUSを用いたエンハンサーの同定，突然変異体の分離を行う予定である。

研究業績

(1) 原著論文

1. Moriguchi, K., Maeda, Y., Satou, M., Kataoka, M., Tanaka, N. and Yoshida, K.: Analysis of unique variable region of a plant root inducing plasmid, pRi1724, by the construction of its physical map and library, DNA Research, Jun, 7. 157-163, 2000.
2. Ito, Y., Eiguchi, M. and Kurata, N.: Somatic and germinal transposition of a maize transposable element *Ds* in rice. Rice Genet. Newslet. 17: 110-111, 2000.
3. Moriguchi, K., Maeda, Y., Satou, M., Niken, S.N.H., Kataoka, M., Tanaka, N. and Yoshida, K.: The complete nucleotide sequence of a plant root-inducing (Ri) plas-

mid indicates its chimeric structure and evolutionary relationship between tumor-inducing (Ti) and symbiotic (Sym) plasmids in *Rhizobiaceae*, *J. Mol. Biol.*, in press.

4. Nonomura, K.I. and Kurata, N.: The centromere composition of multiple repetitive sequences on rice chromosome 5. *Chromosoma*, in press.

(2) その他

1. Nonomura, K.I. and Kurata, N.: Centromere structure of rice chromosome 5. In *RiceGenetics IV Int. Rice Res. Inst. Press.*, in press.
2. Harushima, Y., Nakagahra, M., Yano, M., Sasaki, T. and Kurata, N.: Reproductive barriers between japonica and Indica crosses. In *RiceGenetics IV Int. Rice Res. Inst. Press.*, in press.
3. Yamazaki, Y., Yoshimura, A., Nagato, Y. and Kurata, N.: Oryzabase- Integrated rice science database-. In *RiceGenetics IV Int. Rice Res. Inst. Press.*, in press.

(3) 発表講演

1. Nonomura, K.I. and Kurata, N.: Centromere structure with multiple repetitive sequences of rice chromosome 5. *Plant and Animal Genome VIII*, San Diego, USA, January.
2. 野々村賢一, 倉田のり: イネ第5染色体の構造解析: BAC クローン の 整 列 化, 日 本 育 種 学 会 第 97 回 講 演 会, つ く ば, 4 月 .
3. 野々村賢一, 倉田のり: イネ第5染色体の動原体領域の構造解析, イネ遺伝学・分子生物学2000, 京都, 6月.
4. 伊藤幸博, 倉田のり: イネのエンハンサートラップラインの作成, イネ遺伝学・分子生物学2000, 京都, 6月.
5. 丹羽康夫, 倉田のり, 伊藤幸博: イネにおける GFP の 利 用, イ ネ 遺 伝 学 ・ 分 子 生 物 学 2000, 京 都, 6 月 .
6. Kurata, N. and Nonomura, K. I.: Construction of rice artificial chromosome. 6th International Congress of Plant Molecular Biology. Quebec, Canada, June.
7. Ito, Y. and Kurata, N.: Complex regulation of OSH1 expression, a KN1-type homeobox gene of rice. 6th International Congress of Plant Molecular Biology. Quebec, Canada, June.
8. 安 炳 玉, 三 好 一 丸, 伊 藤 純 一, 長 戸 康 郎, 倉 田 の り : イ ネ Plal 遺 伝 子 座 の 高 密 度 連 鎖 地 図 及 び 物 理 地 図 の 作 製, 日 本 育 種 学 会 第 98 回 講 演 会, 弘 前, 9 月 .
9. 伊藤幸博, 永口 貢, 倉田のり: イネのKN1型ホメオボックス遺伝子の発現制御, 日本育種学会第98回講演会, 弘前, 9月.
10. 野々村賢一, 倉田のり: イネ第5染色体の動原体領域の構造解析. 染色体学会第51

- 回大会, 横浜, 10月.
11. 鈴木 温, 田中一郎: 高等植物の減数分裂における動原体の構造と機能. 染色体学会第51回大会, 横浜, 10月.
 12. Nonomura, K. I. and Kurata, N.: Centromere structure of rice chromosome 5. The 4th International Rice Genetics Symposium, Los Banos, Philippines, October.
 13. Harushima, Y., Nakagahra, M., Yano, M., Sasaki, T. and Kurata, N.: Reproductive barriers between japonica and Indica crosses. The 4th International Rice Genetics Symposium, Los Banos, Philippines, October.
 14. Yamazaki, Y., Yoshimura, A., Nagato, Y. and Kurata, N.: Oryzabase- Integrated rice science database-. The 4th International Rice Genetics Symposium, Los Banos, Philippines, October.
 15. Kurata, N., Suzuki, T. and Nonomura, K. I.: Rice centromere structure with repetitive sequences and construction of rice artificial chromosome (RACs). International Workshop on Integration of Biodiversity and Genome Technology for Crop Improvement, Tsukuba, Japan, November.
 16. 野々村賢一, 倉田のり: イネ第5染色体の動原体領域における繰り返し配列の構成, 第23回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月.
 17. 伊藤幸博, 永口 貢, 倉田のり: イネのエンハンサートラップ系統の作成, 第23回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月.

F-d. 原核生物遺伝研究室

原核生物遺伝研究室では, 大腸菌の細胞分裂の遺伝的調節機構, 特に分裂時期の決定機構について6テーマの研究を行った. 研究室構成員, 西村昭子(助教授), 藤島博史(東大/特別研究員), 中出晋介(JST研究員), 坂季美子(文部技官), 上山清子(研究支援推進員), 松本典子(実験補助員), 佐藤靖子(実験補助員), 植村 薫(パート), 岩田英子(パート), により研究の推進を行った. 本年度の研究は, 戦略的基礎研究推進事業(代表者, 森 浩禎) "大腸菌遺伝子の機能解析(西村)" の支援を受けた. 本研究共同研究として, 次の2件を受け入れ実施した: (i)大腸菌の細胞分裂に関与する遺伝子群の解析(東大: 松沢 洋), (ii)大腸菌緊縮応答関連酵素SpoT蛋白質の構造と機能(奈良女子大: 池原健二).

(1)細胞分裂の時期を決める分子機構: 西村昭子

cfcA 及び *cfcB* 変異株は, 核分裂後親株よりも早い時期に小さい細胞のまま分裂するが, 細胞周期の長さは変わらず, 分裂後親株細胞と同じ大きさ迄成長した後, 次のDNA複製を開始することから, *cfc* 遺伝子は細胞分裂のタイミングに関与することを昨年までに明らかにした. また *cfcA* 変異株はグリシル-tRNA合成酵素(GlyS)の α サブユニット

トをコードする *glySa* 遺伝子に, *cfcB* 変異株は Ap4A 分解酵素 (ApaH) をコードする *apaH* 遺伝子に変異を持つこと, 分裂時期は Ap4A の細胞内濃度で決まること, Ap4A のレベルは GlyS と ApaH により制御されていることなどを明らかにした. Ap4A は *in vitro* では, 多くのアミノアシル-tRNA 合成酵素により合成され, その合成様式もよく解っている. しかし細胞内合成様式については全く知られていない. 各種アミノアシル-tRNA 合成酵素の変異株やアミノアシル化の阻害作用で Ap4A のレベルが上昇するという報告もない. Ap4A の細胞内レベルが GlyS の変異によって変化する原因を明らかにする為に, 野生型及び変異型 GlyS の精製を行い Ap4A 合成活性, 分解活性, 及びグリシル化活性を測定した結果, ATP に対する変異型 GlyS の K_m / K_{cat} 値は野生型 GlyS の 20 倍, グリシンに対する変異型 GlyS の K_m / K_{cat} 値は野生型 GlyS の 100 倍以上高かった. また, 変異型 GlyS は, *in vitro* で野生型 GlyS の 2 倍以上合成活性があることが解った. このことから, *cfcA* 変異株で Ap4A の細胞内レベルが上昇するのは *glyS* 変異による間接的結果ではなく, GlyS 蛋白自身が Ap4A の細胞内レベルの制御に直接関与していると結論される. 一方 Ap4A による分裂時期の決定がどのように行われるか明確にする為に, Ap4A の標的蛋白を探索しその機能解析を行うことにした. その為に Ap4A 結合活性を持つ蛋白群を分離精製し N 末を決定した処, 未知の蛋白が見つかった. 塩基配列から蛋白の構造のホモロジーサーチを行った処, (1) Zn^{2+} 結合ドメインを持ち, (2) Ap4A などの多リン酸ヌクレオチド結合蛋白として殆ど全ての生物で保存されている蛋白であり, (3) 細胞増殖周期に係わっているらしいことが予測されているが, その機能については殆ど解析されていない新規の蛋白であることが解った. この蛋白を AbpA (Ap4A Binding Protein A), 遺伝子を *abpA* と命名し, 以下の研究を行った. *abpA* の条件破壊株は, 細胞分裂が遅れ約 1.5 倍長い桿菌となる. また *abpA* の高発現は分裂を促進し, Ap4A 過剰生産変異株の表現型を強調することが解った. また AbpA に His-tag を結合した蛋白をニッケルカラム精製した処, 約 10kDa の AbpA の他に約 14kDa の蛋白が常に付随して精製された. この蛋白のアミノ酸配列を現在解析中である. また Ap4A 結合活性や分解活性との関連や, 機能ドメインの活性を解析する為, 野生型及び機能部位を置換させた変異蛋白の精製を開始した.

(2) 大腸菌の *kdsA* 変異は FtsZ-ring 形成に影響を及ぼす: 西森加奈, 高木秀幸, 和地正明, 藤島博史, 川端 猛, 西川 建, 西村 昭子

大腸菌のようなグラム陰性菌の外膜は, イオンや栄養源の取り込み, シグナル伝達の制御, あるいは細胞外環境からの防壁として重要な役割を担っている. 従って膜構造の変化は細胞の増殖に重要な影響を及ぼすものと思われる. 一方正常な細胞分裂が起こる為には, 細胞質成分を 2 分裂する為の分裂装置の構築と共に膜構造の 2 分裂が必須である. 両過程は密接に関係していて, 膜構造の変化は, 分裂装置の構築や分裂遺伝子群の発現に大きな影響を及ぼすものと推測される. しかしながら, 膜構造と分裂相互の制御機構については, 全く研究されていない. グラム陰性菌の外膜は, 主にリポ多糖 (LPS)

とリン脂質からなり、LPSは外膜構成成分全重量の30%を占めている。LPSは疎水性のLipid Aと親水性の少糖鎖と両者を繋ぐ2-ケト-3-デオキシオクトン酸(KDO)から成る。KDOはD-アラビノース-5-リン酸とホスホエノールピルビン酸の縮合とそれに続く脱リン酸によって生合成されるが、その最初の反応を触媒するのが*kdsA*にコードされるKDO 8-リン酸合成酵素である。しかしながら大腸菌の*kdsA*遺伝子は、サルモネラ菌の*kdsA*変異を相補する遺伝子として同定されたものであり、今までの処、大腸菌の*kdsA*変異株は分離されていない。サルモネラ菌では、*kdsA*変異株を用いて、LPSが外膜から欠失することやLipid Aがペリプラズムに蓄積することなどが判明している。また条件致死変異株のみが分離可能であることから*kdsA*は必須の遺伝子であること、LPSの合成過程は転写レベルで増殖相の制御を受けることなどが解っているが、LPS生合成と分裂の関係については全く研究されていない。私達は、大腸菌の*kdsA*の温度感受性変異株を7株分離し、KDO生合成の欠失が分裂環FtsZ-ringの形成に影響を与えることを明らかにした。多数の細胞分裂の温度感受性変異株(*fts*)の中から、その変異が大腸菌染色体地図の27分にマップされる7株について解析を行った。7株は41℃で分裂が阻害されフィラメント細胞となり、蛍光抗体法で解析した結果FtsZ-ringが形成されていないことが解った。変異は何れも*trp*遺伝子と共形質導入され、13%の頻度で野生株に形質導入された。相補実験と、相補領域の野生型及び変異型DNAの塩基配列解析から、7株全てが、*kdsA*遺伝子にミスセンス変異を保持していた。変異株のKDO量を測定した結果、41℃で培養するとKDO量が減少していた。41℃でのKDOの減少やFtsZ-ringの欠失による分裂阻害、及び増殖阻害の全てが、野生型*kdsA*による形質転換で野生型に復帰した。しかし、ウェスタンブロットティングによる解析では、FtsZ量は野生株と差が見られなかった。以上の事実から、膜構造の不安定化は、FtsZ-ringの形成に影響を与えると結論した。しかし、FtsZ-ringは細胞質膜の内側に接してリング状に形成されるし、外膜に含まれる分裂蛋白も今迄の処見つかっていない。従って外膜の構造変化が直接分裂装置の構築に影響を与えているとは考え難い。一方変異株が増殖可能な最高の温度36℃で各種疎水性物質に対する感受性を解析した結果、ノボピオシンやエオシンY、SDSのように殆どの疎水性物質に対して感受性を示したが、メチレンブルーのようにコロニー形成能を逆に促進するものも検出された。つまり膜構造の変化は、外環境に対する細胞の応答を変化させ、一連の遺伝子の発現によりメチレンブルーに対する感受性を逆に克服しているようである。従って*kdsA*変異は、同様にFtsZ-ringの形成に必要な他の細胞分裂遺伝子(群)の転写にも影響を与えている可能性が考えられる。リポ多糖の欠失により、リン脂質層が外環境に剥きだしになると予測されるが、このリン脂質がシグナル伝達に重要な役割を担っていて、転写や複製におおきな影響を与えることが示唆されている(論文投稿中)。

(3)大腸菌ABCトランスポーターFtsXの機能解析:藤島博史, 川端 猛, 西川 建, 西村昭子

我々は細胞分裂の温度感受性変異株 *ftsE^{ts}* を 41℃ で培養すると, 大腸菌の3種の K⁺-ポンプを構成する膜蛋白の局在が阻害されることを明らかにした(J Bacteriol. 1998, 180:3663-3670). *ftsE* は *ftsYEX* オペロンを形成していて, FtsY は SRP 受容体のホモログであることから FtsE も膜透過装置を構成している可能性が予測された. しかし一方, (1) 低 pH 培養条件下では, *ftsE* 変異株の細胞分裂阻害や増殖阻害や K⁺-ポンプの構築阻害が回復すること, (2) *ftsE* 変異株は H⁺ のアンカプラー CCCP に対する感受性が親株と比べて低いこと, (3) *ftsE* 変異株では H⁺ のアンチポーターである TetA のテトラサイクリン耐性能が低下していることを見いだした. このことから FtsE は細胞内 pH の調節に関与している可能性も示唆されたので, *ftsE* 変異株の細胞内 pH の測定系の検討を行った. また FtsE の一次配列から得られた構造解析から, FtsE は ABC トランスポーターのポンプ駆動部分であり, これを膜に維持する蛋白として, FtsX が機能している可能性が示唆されたので, *ftsX* の条件破壊株を作成した. *ftsX* が破壊されると, L プロセス中では細胞容積の増加も分裂も共に徐々に阻害され, フィラメント細胞と桿菌が混在した. 培養を続けるとやがて両方共回復し桿菌となった. しかし pH7 に制御された最小培地中では, 細胞容積の増加は2時間で完全に停止, 分裂は直ちに停止し, 長いフィラメント細胞を形成した. このフィラメント細胞の核様体を染色すると, 所定位置に局在し多核フィラメントであったことから, DNA 合成や核様体の分離には直接は影響無いと思われる. この条件で, カリウムイオン・ポンプを構成する膜蛋白 KdpA と Kup について, 膜画分での濃度を解析した処, これらの蛋白の膜局在は, *ftsX* の破壊により阻害されることが解った. 現在反応の詳細な動態を解析している.

(4)大腸菌 SpoT 蛋白質における ppGpp 合成ドメインの推定:田中 愛, 池原健二, 松本邦男, 西村昭子

大腸菌 SpoT 蛋白質はアミノ酸欠乏などに伴って蓄積された ppGpp を分解する為の酵素であると考えられてきたが, 近年の研究結果, (1) SpoT 蛋白質は ppGpp 合成酵素である RelA 蛋白質と高い相同性を有すること, (2) 大腸菌の *spoT* 及び *relA* の二重欠変異株は ppGpp を合成する活性を全く失うこと, (3) それに伴って, 複数種のアミノ酸を要求する性質が生じることなどから, 大腸菌の SpoT 蛋白質は ppGpp の合成と分解を担う二機能性酵素であることが分かってきた. そこで我々はまず最初にこの大腸菌 SpoT 蛋白質をキモトリプシンなどの蛋白質分解酵素による部分分解産物の解析を行い, この蛋白質は4つのドメインからなることを確認した. 次に各ドメインをさまざまな組み合わせで発現するプラスミドを作成し, どのドメインに ppGpp 合成の活性が存在するのかをしらべた. *spoT* 及び *relA* の二重欠変異株に各ドメインをコードするプラスミドを導入する実験を行ったところ, N 末から2番目のドメインを含むプラスミドを導入した時には, 常に (1) アミノ酸合成能の回復によって最小合成培地での生育が可能となること, (2) ヒスチ

ジン類似体であるアミノトリアゾールに対する抵抗性を回復することが分かった。更にドメイン1+2で形質転換した株には、確かに ppGpp を合成する活性のあることが確認できたことから、大腸菌 SpoT 蛋白質の N 末端から 2 番目のドメインに ppGpp 合成の活性がコードされていることが推定できた。今年度は緊縮調節に於ける ppGpp 合成と増殖の関係を詳細に解析する為、ドメイン 1, 1+2, 1+2+3, 1+3+4, 1+2+3+4, 2, 2+3, 2+3+4, 3, 3+4, 4 をコードする 11 種類の DNA の発現ベクターへのクローニングを行い、*spoT-reIA* 二重欠失変異株を形質転換し、ppGpp の細胞内濃度と細胞増殖の関係を解析した(論文作成中)。

(5) 大腸菌の細胞分裂及び細胞周期関連遺伝子群の系統的解析: 中出晋介, 坂季美子, 松本典子, 北川正成, 森 浩禎, 西村 昭子

大腸菌の細胞分裂機構を構成する全遺伝子群を系統的に同定し、個々の遺伝子の構造と機能及び遺伝子発現のヒエラルキーを網羅的に解析することにより、細胞分裂機構の全貌を明らかにしたいと考え、数年前よりこれらの遺伝系統の樹立を開始し、細胞分裂に関する変異遺伝子(430 系統)のマッピングを行ってきた。これらの変異遺伝子とゲノム解析により明らかになった ORF との対応付けを行う為に、まず各 ORF を担うプラスミドを、F-pili を介した遺伝的手法を用いて簡単にしかも一度に種々の変異株に伝達することができるようなベクターと宿主(供与菌)の系を構築した。今年度は、約 2,500 の野生型 ORF をクローニングした。1,000 クローンを用いて、21 の *fts* 変異株についてレプリカ法により相補テストをした結果、11 の *fts* 変異株について ORF との対応付けができた。

研究業績

(1) 原著論文

1. Uehara, T., Matsuzawa, H. and Nishimura, A.: HscA is involved in the dynamics of FtsZ-ring formation in *Escherichia coli*. (submitted), 2001.
2. Nishimori, K., Takagi, H., Wachi, M., Fujishima, H., Kawabata, T., Nishikawa, K. and Nishimura, A.: The *kdsA* mutations affect the FtsZ-ring formation in *Escherichia coli*.(submitted), 2001.

(2) その他

1. 西村昭子: 大腸菌の系統保存. 中辻憲夫編ライフサイエンスのための系統保存とデータバンク. pp113-117. 共立出版, 2000.

(3) 発表講演

1. 西村昭子, 藤島博史, 川端 猛, 西川 建, 笹沼明美, 小林恭子: 大腸菌の細胞分裂の時期決定機構. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2000.
2. 藤島博史, 川端 猛, 西川 建, 松沢 洋, 西村昭子: 大腸菌 *ftsYEX* operon の機

能解析. 第23回日本分子生物学会年会, 神戸, 2000.

3. 中出晋介, 蓼沼磨貴, 北川正成, 森 浩禎, 西村昭子:「大腸菌の細胞分裂機構の全体像」ポストゲノム解析. 第23回日本分子生物学会年会, 神戸, 2000.
4. 山川武広, 池上 徹, 加藤潤一, 川端 猛, 西川 建, 森 浩禎, 西村昭子, 山崎由紀子:統合型大腸菌データベースPEC (Profiling of *E. coli* Chromosome)の拡張. 第23回日本分子生物学会年会, 神戸, 2000.

F.e. 無脊椎動物遺伝研究室

平成12年度も林 茂生, 後藤 聡を中心にキイロショウジョウバエの発生遺伝学に関する研究を行った. 林は, 5月より理化学研究所 発生・再生総合研究センターのグループディレクターを兼務することになった. 池谷智淳, 亦勝 和(国立遺伝学研究所非常勤研究員), 津田玲生, 林 永美(理化学研究所・研究員), 千原崇裕, 加藤 輝(総合研究大学院大学), 久保田一政(東京医科歯科大学大学院), 白木岐奈(奈良先端大)が研究に参加した. 文部技官 谷口美佐子, 実験補助員 鈴木恵子, 大藪陽子, 間瀬玲子, 栗田憂子, 丹羽ひろみ, 米山佐知子, 松永 彩, 佐渡由希子, 秋元 愛(理化学研究所・リサーチアシスタント)が研究と系統保存事業を支援した. 亦勝, 久保田, 千原は3月に米国ワシントンで行われた米国ショウジョウバエ学会に参加し, 発表を行った. 林は6月にギリシャ・クレタ島で行われたEMBO ワークショップにおいて発表した. 本年度の研究は文部省特定領域研究(B)「細胞分化による細胞間相互作用の変換機構」, 日本学術振興会未来開拓学術研究「発生におけるパターン形成」, 文部省特定領域研究(C)「ショウジョウバエ GAL4 エンハンサートラップ系統のマッピングと発現情報の統合データベース構築」(林), 文部省奨励研究(A)「1分子イメージングによる生体分子の時間的・空間的動態の解析」, 文部省特定領域(B)「発生における分子機構のイメージング」(後藤), の援助を受けて行われた.

(1) ショウジョウバエ胚発生における肢原基形成機構: 久保田一政¹⁾, 後藤 聡, 江藤一洋¹⁾, 林 茂生¹⁾(東京医科歯科大学)

ショウジョウバエの脚, 翅の原基は胚発生中に共通の前駆細胞群として誘導を受けた後に二つの細胞群に分離して脚, 翅の成虫原基を形成する. この共通の肢前駆細胞群が誘導された時点においては背側の部分にシグナル分子 Dpp が発現しシグナル強度依存的に脚, 翅の分化を制御することが以前の我々の研究から知られていた. 今回我々は肢前駆細胞群の腹側側に受容体チロシンキナーゼ EGFR が活性化されることを見いだした. EGFR の活性化は Dpp の標的遺伝子の発現を阻害し, 翅細胞の分化を抑制する. この結果は Dpp と EGFR が肢前駆細胞群の背腹軸上で非対称的に活性化されることが翅・脚の分化に必要な条件であることを示す. 詳細は原著論文(1)に報告した.

(2) 気管形成の細胞生物学：千原崇裕，林 茂生

Wnt ファミリーのリガンドは脊椎動物の肺胞形成の際に強く発現するがその機能は不明である。ショウジョウバエの気管発生においてWingless は気管原基に隣接した外胚葉において発現し，袋状の気管原基が管状化する過程に必須である。我々はWg シグナルが気管のdorsal trunkにおいてDelta, Escargotそしてspaltをそれぞれ異なる仕組みで制御することにより管のかたち，太さ，進展の方向を制御することを示した。この結果はWingless が組織のかたちを決める仕組みをよく説明する。詳細は原著論文(2)に報告した。

(3) 核マトリックス蛋白Plexusによる翅脈特異的転写の調節機構：亦勝 和，林 茂生

我々は成虫翅の翅脈パターンに乱れを来す突然変異plexusは新規の核マトリックス蛋白質の機能欠損によるものであることを昨年報告した。今年度はplexusと酷似した表現型を示すnet変異との相互作用を追求した。netはbHLH型の転写調節因子をコードしていることがすでに報告されている。我々はplexusがnetと相乗的に作用してシグナル分子Rhomboïdの翅脈特異的発現を制御することを見いだした。更にこの現象の背景にはNetの核内における局在化の制御があることを見いだしたので更に解析をすすめている。

(4) ショウジョウバエ GAL4 エンハンサートラップ系統のマッピングと発現情報の統合データベース構築：後藤 聡，谷口美佐子，佐渡由希子，丹羽ひろみ，林 茂生

遺伝子転写のエンハンサー活性の同定は生命の発生や高次機能に関わる遺伝子の発見と遺伝子機能の解析に有用な手段となる。染色体上に散在するエンハンサーを網羅的に同定する事はゲノムの総合的な機能解析に欠くことの出来ないアプローチである。ショウジョウバエゲノムは約13,600個の遺伝子を持つと推定されているがそのうち発現の解析がわずかでもなされているものはまだ10%以下にすぎない。ゲノムのもつ豊富な転写調節能力を理解するためにはより多くの遺伝子の発現パターンを記載することが重要である。ショウジョウバエにおいてこの目的にはエンハンサートラップ法が最も適している。欧米での研究により1,000余りのエンハンサー活性検定用のP因子ベクター(主にP[lacZ])の挿入株が得られている。これらは主に致死遺伝子に対する挿入であり全遺伝子への挿入を得るにはいまだほど遠い。そこで日本のNPコンソーシアムによって4,528のGAL4エンハンサートラップ系統が作成された。

エンハンサートラップ挿入とゲノムシーケンス上の転写単位との対応付けをはかる事を目的として挿入位置の配列決定を行った。これらの系統の成虫を凍結保存したサンプルからのゲノミックDNAの抽出，inverse PCR，シーケンシングなどをマイクロタイタープレート単位で処理する方法を最適化し，シーケンシングセンターにおいて配列決定を行った。得られた配列でショウジョウバエゲノム配列に対してblastサーチを行いゲノム地図上にマップした。

4,256系統の5'近傍配列を決定し，そのうち70%(2,966系統)は染色体上の特定の位

置にマップされた。マップされた挿入はホットスポットを考慮すると1,722の挿入サイトに分類され、それらの殆どは遺伝子近傍に見つかった。これらのデータをGAL4の発現パターンのデータと統合したデータベースを構築中で、P因子挿入特異性についての解析もすすめている。

研究業績

(1) 原著論文

1. Kubota, K., Goto, S., Eto, K. and Hayashi, S.: EGF receptor attenuates Dpp signaling and helps to distinguish the wing and leg cell fates in *Drosophila*. *Development*, **127**, 3769-3776, 2000.
2. Chihara, T. and Hayashi, S.: Control of tracheal tubulogenesis by Wingless signaling. *Development*, **127**, 4433-4442, 2000.

(2) その他

1. 林 茂生: Cdk1によるS期抑制: ショウジョウバエゲノムの培化を抑制するメカニズム. *細胞工学*, **19**: 576-582, 2000.

(3) 発表講演

1. 林 茂生: ショウジョウバエ気管発生にみる管状組織の形成原理. 第6回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー, 東京, 2月.
2. Hayashi, S.: Genetic basis of limb specification in *Drosophila*. International Symposium "Evolution 2000", Tokyo, March.
3. 志賀靖弘, 林 茂生, 山形秀夫: ミジンコの形態形成遺伝子の解析—ホメオティック遺伝子を中心に—. 第44回基礎生物学研究所コンファレンス「発生と進化」, 岡崎, 3月.
4. 林 茂生: 昆虫の付属肢の起源, 第44回基礎生物学研究所コンファレンス「発生と進化」, 岡崎, 3月.
5. Matakatsu, H., Tadokoro, R., Gamo, S. and Hayashi, S.: Repression of the wing vein development by the nuclear matrix protein Plexus. 41st Annual *Drosophila* Research Conference, USA, March.
6. Kubota, K., Goto, S. and Hayashi, S.: The role of Wingless signaling in the embryonic leg disc formation. 41st Annual *Drosophila* Research Conference, USA, March.
7. Chihara, T. and Hayashi, S.: Role of Wingless signaling during the tracheal development in *Drosophila*. 41st Annual *Drosophila* Research Conference, USA, March.
8. 久保田一政, 後藤 聡, 江藤一洋, 林 茂生: ショウジョウバエ脚原基形成におけるWgとEGFRの役割. 日本発生生物学会第33回大会, 高知, 5月.

9. 池谷智淳, 林 茂生: ショウジョウバエ気管形成における Notch シグナルと FGF シグナルの cross-talk. 日本発生生物学学会第 33 回大会, 高知, 5 月.
10. 千原崇裕, 林 茂生: ショウジョウバエ気管形成における Wingless シグナルの役割. 日本発生生物学学会第 33 回大会, 高知, 5 月.
11. 後藤 聡, 谷口美佐子, 林 茂生: 翅・脚原基で発現する gal4 エンハンサートラップシステムのスクリーニング. 日本発生生物学学会第 33 回大会, 高知, 5 月.
12. Hayashi, S.: Pattern formation in the imaginal disc and the tracheal system. Crete 2000 Workshop, Greece, June.
13. 千原崇裕, 林 茂生: ショウジョウバエ気管細胞の移動方向はどのように制御されているのか? 第 23 回日本分子生物学学会年会, 神戸, 12 月.
14. 林 茂生: ショウジョウバエ気管上皮のネットワーク形成を支配するシグナル分子. 第 23 回日本分子生物学学会年会, 神戸, 12 月.
15. 後藤 聡, 谷口美佐子, 佐渡由希子, 林 茂生: ショウジョウバエ GAL4 エンハンサートラップシステムの統合データベース. 第 23 回日本分子生物学学会年会, 神戸, 12 月.
16. 亦勝 和, Doris, Brenttrup., 林 茂生: ショウジョウバエ翅脈の分化は核内マトリックスタンパク質 Plexus と転写因子との相互作用により制御される. 第 23 回日本分子生物学学会年会, 神戸, 12 月.

G. 生物遺伝資源情報総合センター

本センターは、生命科学の学術研究にとって重要な生物系統と情報に関して、様々な生物種の系統保存事業を有効に進めるため及び系統情報を統合的に収集整理してデータベースを構築するためのセンターとして平成 9 年度に設立された。本センターは系統情報研究室(山崎由紀子助教授)と生物遺伝資源情報研究室(小原雄治教授)の 2 研究室からなり、それぞれ、系統情報データベース、生物遺伝資源委員会の運営という事業を担っている。系統情報データベースについては、多数の生物種のデータベース公開に至っている。〈<http://www.shigen.nig.ac.jp/>〉各生物種の関連研究者の協力を得て、ますますその内容を充実させていく計画である。生物遺伝資源委員会は年 1 回程度の開催であるが、有機的な運営のため設けた幹事会(ステアリングコミッティー)を中心にわが国の系統保存事業の効果的な運営のために活動を進めている。

一方、本センターに課せられた事業をより意義のあるものにしていくためには、生物学の新しい流れを踏まえた系統生物学・系統情報学の先導的研究を遂行してゆく必要がある。このために本センターでは、実験系と情報系が融合をめざして、ゲノム生物学(ゲノムの機能の徹底的な解明と生命システムの多様性研究)や生物情報科学(多様な生物情報のデータベース化と新しい知識の抽出)の研究を進めている。

G-a. 系統情報研究室

系統情報研究室では、山崎由紀子と鈴木健司（特別共同利用研究員）が「微生物ゲノムの比較解析に関する研究」を行った他、山崎由紀子、山川武廣（業務委託）、三ツ井和（業務委託）、渡辺功二（業務委託）、若林雅隆（業務委託）、齋藤真理（業務委託）、土屋里枝（業務委託）、鈴木栄美子（業務補佐員）、矢野澄子（事務補佐員）が、研究事業「遺伝資源情報データベースプロジェクト」を推進した。

本年度の研究は、科技庁科学技術振興調整費「マウス遺伝子多型情報に基づいた遺伝子機能解析システムの開発」（代表者：城石俊彦）、特定領域研究(C)「がん研究の総合的推進に係わる研究」（代表者：山村研一）、および科技庁科学技術振興事業団戦略的基礎研究推進事業(CREST)「オオムギゲノム機能の開発と制御」（代表者：武田和義）の支援を受けた。

また遺伝学研究所の共同研究として、「画像を含む生物情報データベースの構造化手法に関する研究」（広島市立大学情報科学部 北上 始）および、「ヒト腸管由来の *Lactobacillus gasseri* JCM1031 株における 2 種のフォスフォ-β-ガラクトシダーゼの構造遺伝子からの分子系統解析」（東北大学大学院農学研究科 齋藤忠夫）を実施した。

(1) 微生物ゲノムの比較解析に関する研究：鈴木健司¹、西川 建、小笠原直毅¹、山崎由紀子（¹奈良先端大）

これまで蓄積してきた生物学的知識を全く考慮せずに、純粋に全ゲノム配列(ATGC)情報のみからどのような知識を得ることができるのか、興味深い問題ではあるが、方法論については暗中模索の状態である。われわれは手始めに、ゲノム配列解析の完了した微生物、大腸菌、枯草菌、好アルカリバチルスゲノムを用いて 3 塩基組成分布を調べた。ゲノム全配列に対して 1000 塩基毎の 3 塩基出現頻度を求めて 64 次元の主成分解析を行なった。第一および第二主成分をそれぞれ X、Y 軸にとった散布図は、生物種毎に固有の空間を占めることを示した。また第一主成分が GC 含量と強く相関していることも確認できた。

ゲノム全体における 3 塩基の平均出現頻度を調べると、相補関係にある 2 種類の 3 塩基配列がほぼ同じ出現頻度を示す傾向がみられ、これはリーディング鎖、ラギング鎖、コーディング鎖、非コーディング鎖においても共通にみられる現象であった。生物学的な意味付けをするには至らなかったが、ローカルな塩基組成の偏りに注目した解析を継続していく予定である。

(2) マウス遺伝子多型情報データベース構築：山川武廣、吉川欣亮¹、城石俊彦、米川博通¹、外丸靖浩²、岡崎康司²、山崎由紀子（¹都臨床研、²理研）

「マウス遺伝子多型情報に基づいた遺伝子機能解析システムの開発」プロジェクトにおいて解析されたマイクロサテライト多型情報のデータベースを構築した。解析に用いられた系統は日本産亜種由来の 2 系統 (JF1/Ms および MSM/Ms) および標準近交系マウス

6系統(PGN2, SWR/J, A/J, SM/J, C57BL6, 129/svJ)であり、マーカーは約2000の遺伝子座に対応している。同プロジェクトでは、日本産亜種由来の系統(MSM/Ms)と標準近交系マウス系統(C57BL6)間のSingle Nucleotide Polymorphism(SNPs)も解析が進み、今年度は完全長cDNAの3'末端非翻訳領域におけるcSNPsを約200遺伝子座について決定するにいった。これらの異なる2種類の多型マーカーを同一マップ上にリンクしたものを作成したが、現在公開しているのはマイクロサテライト情報のみである。

(3)トランスジェニックマウスデータベース構築：若林雅隆，渡辺功二，中瀬直巳¹，山田 源¹，山村研一¹，山崎由紀子（¹熊大）

熊大動物資源開発研究センターにおける遺伝子改変マウスのデータベース(CARD R-BASE)の構築を開始するとともに、国際マウス系統資源(IMSR:International Mouse Strain Resources)の1メンバーとして総括的検索システムの開発に着手した。IMSRは米国Jackson Laboratoryと英国MRC(Medical Research Council)が既に立ち上げているプロジェクトであるが、システムの更新にともない、データ交換フォーマットのXML化やリレーショナルデータベースシステムの変更などがあり、CARD R-BASEは新システムで参画することになる。今年度は、Oracle8iデータベース管理ソフトを用い、XMLフォームへの書き出し機能およびJavaによる検索機能を装備したデータベースを構築することができた。来年度早々に公開を予定している。

(4)大腸菌遺伝子分類(PEC:Profiling of E.coli Chromosome)データベース構築：三ツ井和，山川武広，池上 徹¹，加藤潤一¹，山崎由紀子（¹東京大学医科学研究所）

PEC(<http://www.shigen.nig.ac.jp/eco/pec/>)は1)全遺伝子の基本情報(遺伝子名、別名、位置情報、関連データへのリンク)、2)遺伝子の分類情報：a:「生育に必須か否か」の分類、3)欠失株情報および関連文献情報、4)他生物の相同遺伝子情報、および5)系統情報から構成されるデータベースであり、昨年度から公開を開始している。今年度は特に、相同解析によるモチーフ抽出機能や蛋白質構造データベースとのリンク、全ゲノム配列が解析された他の微生物ゲノムとの配列比較機能などを充実させるとともに、ゲノム上の特定の領域をCSVフォーマットから簡単に色分けして表示できるアプリケーション(GenomePaint)を開発した。このアプリケーションは、環状ゲノム表示と2段階スケールの線上表示が可能であるが、初期バージョンは大腸菌とほぼ同じゲノムサイズに限定される。今後高等生物のゲノムにも対応すべく機能拡張を行っている。このようなツールは、情報学的なアプローチによるゲノム解析結果と、生物実験結果から得られる知見を同一の視野で観察検討するのに適していると思われる。

(5)世界の遺伝資源情報データベースの構築：齋藤真理，矢野澄子，山崎由紀子

世界における遺伝資源情報および関連情報のインターネット上の公開データベースアドレスを生物種毎にまとめてデータベース化し、公開を開始した(<http://www.shigen.nig.ac.jp/grd/>)。これまでに収録生物種・グループ26種、総サイト数およそ200を格納した。本プロジェクトは生物遺伝資源委員会活動の1つとして情報収集および情報更新を継続し

ていく予定である。

研究業績

(1) その他

1. PEC updated <http://www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/pec/>
2. Oryzabase updated <http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/>
3. Cloning vector Database updated <http://www.shigen.nig.ac.jp/cvector/cvector.html>
4. Mouse Database updated <http://www.shigen.nig.ac.jp/mouse/mouse.default.html>
5. Mouse Microsatellite Database of Japan (MMDBJ) <http://www.shigen.nig.ac.jp/mouse/mmdbj/mouse.html>
6. E.coli strain database <http://www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/strain/>
7. Information of Genetic Resource Databank <http://www.shigen.nig.ac.jp/grd/>
8. 中辻憲夫編「ライフサイエンスのための系統保存とデータバンク」共立出版(2000)。

(2) 発表講演

1. Y., Yamazaki, A., Yoshimura, Y., Nagato and N., Kurata: Oryzabase-Integrated map and mutant database-, Plant and Animal Genome VIII, San Diego, CA, January.
2. Y., Yamazaki, A., Yoshimura, Y., Nagato and N., Kurata: ORYZABASE-INTEGRATED RICE SCIENCE DATABASE, Fourth International Rice Genetics Symposium, Laguna, Philippines, October.
3. 鈴木健司, 山川武廣, 小笠原直毅, 加藤潤一, 西川 建, 山崎由紀子: 微生物ゲノムの情報学的解析. 第23回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月.
4. 山川武廣, 池上 徹, 加藤潤一, 川端 猛, 西川 建, 森 浩禎, 西村昭子, 山崎由紀子: 統合型大腸菌データベースPEC(Profiling of E.coli Chromosome). 第23回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月.
5. 三浦郁生, 吉川欣亮, 高浜純代, 坂井隆浩, 山崎由紀子, 城石俊彦, 米川博通: マイクロサテライト多型解析に基づく実験用マウス系統の起源の探索. 第23回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月.
6. 三ツ井和, 吉村 淳, 長戸康郎, 倉田のり, 山崎由紀子: オブジェクト指向技術を用いたイネの総合データベース(Oryzabase)の構築. 第23回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月.

G.b. 生物遺伝資源情報研究室

本研究室では、線虫を用いた動物発生過程の遺伝子発現ネットワークの解明をめざす研究と、並行してDNAシーケンシングセンター及び遺伝子ライブラリーの構築・維持・配布という研究事業を進めている。

研究室構成は、小原雄治（教授）、安達佳樹（助手）、小倉颯一（3月まで、4月から横浜市立大学医学部助手）、伊藤将弘、川崎一郎、平木秀明（10月から、科学技術振興事業団創造科学技術推進事業・土居バイオアシンメトリプロジェクト研究員から）（以上4名、科学技術振興事業団研究員）、鹿児島浩（9月から、スイスパール大学ポスドクから未来開拓研究事業ポスドク）、梶田 睦（10月から特別利用研究員、東京工業大学大学院理工学研究科博士課程在学）、水口洋平（受託学生、国立沼津工業高等専門学校専攻科学生）、新井 理（帝人システムテクノロジー、業務委託）、小川知之（CTI、業務委託）、廣野啓子、植田ゆみ子（7月から）（以上2名、科学技術振興事業団技術員）、大庭登紀江、杉浦郁子、小原真澄、長岡圭美（2月まで）、鈴木孝美、岩田未菜、（以上5名、科学技術振興事業団実験補助員）、大石加寿子、杉山康子、林 宏子（6月から）、太田ふみ子（6月から）、西坂聡子（7月から）、芳賀しのぶ（10月から）（以上6名、特定C派遣研究補助員）、佐野正子、上杉裕子、野本久代、北山小百合（7月まで）、田中紀子（7月まで）、芹澤路子、中田恭子、三浦沙知子（10月から）、長谷川範子（10月から）、水越ますみ（10月から）（以上10名、パート実験補助員）、杉本章子、大沼まゆみ（11月から）（事務補助員）、高橋初江、三田真澄、三田あつみ（補助業務員）であった。また3月に約2週間、Jean Thierry-MiegとDanielle Thierry-Mieg（共にCNRS, Montpellier, France）、7-8月の2ヶ月間Archana Oates（University of Leeds, UK）が研究室に滞在し、共同研究をおこなった。

本年度の研究は、文部省科学研究費特定領域研究A「ゲノムサイエンス」（小原）、文部省科学研究費特定領域研究C「統合ゲノム」（小原）、科学技術振興事業団戦略的基礎研究推進事業（CREST）（小原）、科学技術振興調整費「ゲノムフロンティア」（小原、代表・金久 実京大教授）、科学技術振興調整費「ゲノムフロンティア」（小原、代表・黒澤良和 藤田保健衛生大教授）の支援を受けた。

1. 研究事業

昨年にひきつづき大腸菌遺伝子ライブラリー、線虫cDNAライブラリー及びデータベースについて活動した。

(1) 大腸菌遺伝子ライブラリー事業

小原が名古屋大学在職中に作成した大腸菌ゲノムの遺伝子ライブラリーの維持、配布、情報収集を続けた。大腸菌全ゲノム4,700キロ塩基対が、互いに少しずつオーバーラップするクローンでおおわれており、総数3,400クローンの中から十分な重なりをもって

ゲノムをカバーする476クローンを選び出し、これを「ミニセット」としてリクエストに応じてきた。大腸菌全ゲノム塩基配列はすでに決定されたこともあり、リクエストは減ったが、それでも2000年中に16件、のべ1,481クローンを4ヶ国（日本、韓国、イギリス、インド、アメリカ（件数順））の研究者に送付した。これまでの累計は、25ヶ国830件、のべ10,557クローンにのぼっている。発送先の研究者には、その地域の研究者への二次配布を積極的に求めているので、クローンの利用者はこれらの数字よりはるかに多いことが予想される。

(2) 線虫遺伝子ライブラリー事業

次項で述べるcDNAの系統的解析プロジェクトから得られたクローンおよびその情報は、DNAデータバンクに送るとともに逐次線虫統合データベースACEDBなどに送付し公開している。タグ配列のうち約80,000本はDDBJに登録した。発現パターン情報と共にDDBJ計算機上でのWWWでの公開を開始している(<http://helix.genes.nig.ac.jp/db/>)。

cDNAクローンについては、2000年には778件のべ4,335クローンを16ヶ国（アメリカ、日本、イギリス、カナダ、ドイツ、韓国、スイス、台湾、フランス、ベルギー、イタリア、オランダ、オーストリア、オーストラリア、シンガポール、香港（件数順））の研究者に分与した。これまで(1995年-2000年)の累計は、24ヶ国3,272件、のべ14,912クローンにのぼっている。

2. 線虫 *C. elegans* のcDNA解析

線虫 *C. elegans* は動物発生・行動研究のすぐれたモデル系である。この全遺伝情報は100Mbのゲノム（染色体6本）に書き込まれているが、一方われわれは、ゲノムシーケンシンググループと緊密な連絡のもとに、発現遺伝子側の解析のセンターとして活動を進めてきた。すなわち、全遺伝子に対応するcDNAクローンの単離と同定、その構造、発現様式の解析、更には遺伝子破壊実験による生物機能の検定、というcDNAの系統的解析である。これは、単なるEST配列の集積ではなく、cDNAの塩基配列情報、類似遺伝子情報（BLAST検索）、スプライシングの制御に関する情報、発現時期、発現細胞の情報、将来的には遺伝子破壊結果の情報を、ゲノムマップ（究極的には塩基配列）上に統合化し、ゲノムの発現マップを構築するものである。また上述のように、ここで得られたクローンは内外の研究者からの請求に応じ配布をしているので、そこからのフィードバック情報も追加される。このような情報の集積が進むと、ゲノム軸、（発生）時間軸、細胞系譜（空間）軸などのいろいろな軸での検索が縦横にできるようになる。例えば、ある時期のある細胞で発現が始まるあるモチーフをもつ遺伝子群を検索する、といったことも可能になってくるだろうし、逆にそのような発現様式を支配する調節領域をゲノムDNA配列から推測することも可能になってくる。そして、線虫ではこれらの結果を実験的に検証することが可能である。本研究はこのような目的で *C. elegans* のcDNA情報の集大成と統合化を行うものである。

(1)cDNA 配列決定, 遺伝子構造の確定:大石加寿子, 佐野正子, 杉山康代, 野本久代, 田中紀子, 鈴木 穰¹, 菅野純夫¹, Jean Thierry-Mieg², Danielle Thierry-Mieg², 新井 理, 小原雄治(¹東京大学医科学研究所, ²NCBI, NIH)

5' 3' 両端からのいわゆるワンパスシーケンシングをおこない, 3' の配列情報をもとに分類をおこなってきた. これまでに8万クローンを解析し約1万のcDNAグループに分類してきた. この中の代表クローンを使って, 以下に述べるような発現・機能解析を体系的に進めているわけである. また, ORF 検索と合わせて, 遺伝子総数が19000程度であることも示してきた.

EST 配列としてデータベースに登録するのは一定以上のクオリティに部分のみである. しかし, その先も配列情報は十分保持している. ゲノム配列と比較してエキソン・イントロン構造を調べるのならば, この部分も使えるのではないか. このため, Jean Thierry-Mieg がシーケンサーからのクロマトデータをゲノム配列に並べていくプログラムを書いた. まず最初の高クオリティの部分がアラインされるが, エキソン・イントロン境界に来ると突然合わなくなる. しかし, その先を調べるとまたうまく合う部分がでてくる, これを繰り返すのである. データベース登録は400-500塩基であるが, クロマトパターンを比較するので, 800塩基程度まで合わせることができる. mRNAの平均鎖長は1.5-2Kbだから, 両側からのクロマトデータがあれば全領域をカバーできるのである. より長い遺伝子については, 途中クローンを利用した「unigene」方式になる. 完全オートマッチックではなく手作業(「目」作業?)となりきつい仕事であったが, その結果, 10126遺伝子の構造を確定し, 多数のalternative splicingを検出した. 遺伝子あたり平均1.5のalternative splicingを検出した. 最小のエキソンは9ベースであった. コンピュータプログラムは長いイントロンの予測は苦手らしく, 複数遺伝子が単一遺伝子にまとめられたものや, その逆もあり, 線虫予測遺伝子データベース WormPepの半分は何らかの修正が必要であることになった(Thierry-Miegら, 論文準備中, 多くの結果はWormBase< <http://www.wormbase.org/>>にのっている). プロテオーム解析には必須の情報となろう.

この解析過程では東大医科研・菅野研究室にオリゴキャッピング法による完全長ライブラリーを作っていただいた. その結果, 線虫のmRNAにはトランススプライスリーダー(SL)配列を持つことが多いが, これまで見いだされていたSL1, 2, 3に加え, 8種の新しいSLが見つかった. 興味深いことに, 発生時期での使い分けの傾向が見いだされたので詳細の解析中である(論文準備中).

3. 線虫 *C. elegans* 発生における遺伝子発現制御の解析

(1)発生各期における発現パターンの解析:杉浦郁子, 大庭登紀江, 小原真澄, 渡辺小百合, 鈴木孝美, 新井 理, 小原雄治

whole mount embryo のマルチウェルフォーマット *in situ*ハイブリダイゼーショ

ン法を用いて、大量試料の解析を引き続き進めた。ESTプロジェクトから分類したcDNAのうちこれまでに8200種をプローブにハイブリダイゼーションをおこなった。線虫は小さいので胚発生の全ステージが8ウェルスライドの1ウェルで検出できる。幼虫～成虫は少し大きくなるので4ステージに分け、それぞれ1ウェルで検出する。そして、画像を残し、以下のような最小限のアノテーションをつけてデータベース化している。胚発生については典型的な10ステージに分類し、それぞれについて10程度の典型的な細胞、組織、領域に分け、シグナル強度を3段階とっている。幼虫～成虫は4段階に分け、やはりそれぞれ10程度の典型的な領域と3段階のシグナル強度でアノテーションを与えている。結果的に(ステージが胚発生10+幼虫4)×領域10×強度3=420次元の情報となる。これらはNEXTDB<<http://helix.genes.nig.ac.jp/db/>>に統合化し公開している。発現パターンの類似性検索エンジン(SearchEX)も構築中である(芹澤路子ら、未発表)。

(2) 母性発現遺伝子サブセットのRNAi：廣野啓子，中田恭子，小原雄治

胚発生初期は胚性遺伝子の発現を止めても母性発現遺伝子のみで進行できる。線虫は不等卵割を含む卵割を繰り返し、母性遺伝子産物の局在やそれによって引き起こされる細胞間相互作用によって、運命の異なった細胞を生じるのである。この過程が大変興味深いのだが、*in situ*ハイブリダイゼーションの結果は全遺伝子の半数は卵巣で発現していることを示した。多くのハウスキーピング遺伝子がこの範疇にはいるからと思われる。一方、これまで初期発生の細胞運命決定遺伝子の解析経験から、「受精後速やかに消失するか、あるいは局在していく」遺伝子は初期発生で重要な働きをしている可能性が高いと考えられる。このカテゴリーに入る遺伝子は、約5000遺伝子解析の時点で全体の8.8%477遺伝子であることがわかった。適度な数であるので、これらについて詳細なRNAi解析と抗体染色を進めた。詳細は省くが、RNAiでは65%に表現型が見られた。ランダムなcDNAクローンをを用いた場合の表現型出現率が27%、予測遺伝子情報に基づいた場合が13%、であったことと較べるとはるかに高く、重要遺伝子が濃縮されたことを示唆している。この中から、強い胚致死を示す61遺伝子について、表現型を4D顕微鏡で調べたところ、精子侵入に引き続く卵母細胞の最終減数分裂から極初期の卵割パターンまで、順番に表現型が分類できた(廣野啓子ら、論文準備中)。

(3) 母性発現遺伝子サブセットの抗体染色：植田ゆみ子，岩田未菜，水口洋平，伊藤将弘，小原雄治

このように発現パターンに基づくサブセット化は、ある局面に働く遺伝子を網羅するのに有効であることがわかった。母性遺伝子は発生開始の時点では転写はすんでいるのだから、mRNAよりもタンパクの分布の方がより重要である。そこで、上記のサブセットについて親水性領域の部分タンパクを大腸菌で作し、抗体作成を進めている。この染色パターンは共焦点顕微鏡で取り込み、初期発生過程を再現したコンピュータグラフィックスに重ね合わせてデータベース化を行っている。この重ね合わせのプログラム

は発生時期を核の数と配置で認識し、マーカーとして入れた生殖細胞前駆細胞特異的抗体で前後軸を認識し、回転と若干の歪み補正を入れて、マッチングさせるものである(水口洋平ら, 論文準備中)。このようにして, ある局面に関わる全遺伝子産物の挙動を俯瞰できるデータベース構築を進めており, これとRNAi表現型との対比からその局面の発生プログラムの解説, 究極的には計算機シミュレーションをめざして研究を進めている。

(4) 発現調節領域の解析: 伊藤 将弘, 水口 洋平, 芹澤路子, 小原 雄治

遺伝子の半数は母性発現であったが, 残りは発生開始後に mRNAが見られる, いわゆる胚性発現である。これは実に様々なパターンが見られるが, 似た発現パターンを示す遺伝子を分類するクラスタリング解析を進めている。大きなクラスタとして腸系譜で発現する遺伝子群が得られた。腸は8細胞期のE細胞に由来する。E細胞は原腸陥入少し前に2つの細胞になり, 陥入とともに4細胞となる。その後8細胞となりシリンダー状に並び, 分裂を重ねてさらに伸びて腸となる。この過程で, ある遺伝子群は初期のEが2細胞で mRNA が検出され始めるし, 別の遺伝子群はシリンダー状になった頃から検出され始め, さらに別の遺伝子群はさらに後期から検出され出す。このような同じ細胞系譜の時系列で発現が次々開始していく遺伝子セットが得られた。現在, 同じ時期に発現が開始する遺伝子群の上流配列を較べて, 共通モチーフの探索を進めている(伊藤将弘ら, 未発表)。このような目的には近縁種のゲノムを比較するとよい場合があり, 近縁種のひとつ *C. briggsae* のホールゲノムショットガンがサンガーセンターとワシントン大学で進行中であり, その完成が待たれる。

(5) *C. elegans* の母性 mRNA の翻訳調節における POS-1 と PIP-1 の役割: 小倉顕一, 安藤恵子¹, 三谷昌平¹, 小原雄治¹(¹東京女子医科大学医学部)

線虫 *C. elegans* の卵は受精後不等分割をおこない, 体細胞系創始細胞の前割球 AB と生殖系列の後割球 P1 を生じる。これら割球およびその子孫細胞の運命決定には卵割に伴って局在化する母性因子(いわゆるデターミナント)が重要な働きをしていることが示唆されている。*C. elegans* の *pos-1* 変異体は, 母性胚致死で, 咽頭筋や腸, 生殖細胞の形成不全が観察される。また, *pos-1* 変異体では母性の *apx-1* mRNA が存在するにもかかわらず, APX-1 タンパク質が発現されないことから, POS-1 は母性の mRNA の翻訳調節に関わるのではないかと考えられていた。POS-1 は TIS11 型のジンクフィンガータンパク質であり, 初期胚の主として後部割球の細胞質に存在する。また, 線虫の生殖顆粒の構成タンパク質の1つである。しかし, その分子機能は不明であった。我々はその機能を明らかにするため, POS-1 と相互作用する分子をスクリーニングし, 新規の RNA 結合タンパク質 PIP-1 を同定した。PIP-1 は卵母細胞から2細胞期までは全ての割球の細胞質に存在し, 4細胞期以降は主として後部割球に存在する。また, PIP-1 も生殖顆粒の構成タンパク質の1つであることが判明した。*pip-1* 遺伝子の RNA 阻害の結果, 咽頭筋や腸, 生殖細胞の形成不全など, *pos-1* 変異体と良く似た表現型を示すことがわかった。PIP-1 は RNA 結合ドメインを持つこと, また, 初期胚の細胞質で観察されること,

特定の組織の分化に関わることから、やはりある特定の母性の mRNA の翻訳調節に関わるのではないかと予想される。そこで、*pip-1* 遺伝子の RNA 阻害の初期胚で、その発現や局在に影響が出る母性因子を探し、その候補分子を同定した。

第 2 卵割後の 4 細胞期の *C. elegans* 胚では母性 *glp-1* mRNA は後極細胞では翻訳が制限されている。これはその 3' -UTR に存在する 61 塩基の SCR (spatial control region) を通じて制御されている。我々は、POS-1 タンパクが SCR に結合することによって後極細胞での *glp-1* mRNA の翻訳を負に制御していることを見いだした。一方、PIP-1 タンパクの *glp-1* mRNA への結合は確認できていないが、前側細胞で POS-1 に依存した翻訳抑制をすることを見いだした。これらの結果から、前後細胞での POS-1/PIP-1 の濃度の違いで *glp-1* mRNA の翻訳を fine tuning している機構を提唱した。

(6) 線虫 *C. elegans* の生殖顆粒の構成成分 PGL-1, 2, 3 遺伝子産物の生殖系列の発生における機能の解析: 川崎一郎, Anahita Amiri¹, Yuan Fan¹, 辛島 健², 小原雄治, Susan Strome¹ (¹Indiana Univ, ²東大 理 生化)

線虫 *C. elegans* の生殖顆粒, P granules は、生殖系列に特異的な細胞内構造であり、成熟精子を除く全ての生殖系列細胞に、その発生の全段階を通して観察される。P granules は、未同定の (poly-A) RNA 成分と複数のタンパク質成分から構成されると推定されているが、その成分の多くは未同定のままである。我々はこれまでに分子遺伝学的な解析により、P granules の主要な構成成分のひとつとして PGL-1 タンパク質を同定し、それが生殖系列の発生、特に幼虫期における生殖系列の細胞増殖と配偶子形成、特に卵母細胞形成に重要な役割を果たしていることを明らかにした (1)。PGL-1 の C 末端には RNA 結合モチーフである RGG box が存在することから PGL-1 は RNA 結合タンパク質として機能していると考えられる。我々は、さらに yeast two-hybrid screen により PGL-1 と相互作用するタンパク質を検索し、PGL-1 自身と、PGL-1 に相同な二つのタンパク質、PGL-2 と PGL-3 を同定した。PGL-2 には無いが、PGL-3 にも PGL-1 と同様に、その C 末端に RGG box が存在するので、PGL-3 も RNA 結合タンパク質として機能していると考えられる。我々は特異的抗体を用いた免疫染色により、発現の仕方に違いがあるが、PGL-2 と PGL-3 も PGL-1 と同様に P granules の構成的タンパク質成分であることを明らかにした。また PGL-1 と PGL-3 が免疫共沈されることから、生体内でそれらが実際に同じ複合体中に存在していることを確認した。さらに我々は RNAi 法を用いて、*C. elegans* の生殖系列の発生において、少なくとも PGL-3 が PGL-1 と重複して機能していることを明らかにした。さらに本格的な遺伝学的解析を行うために、我々は *pgl-3* の欠失変異を逆遺伝学的に作製し、現在その表現型の解析を進めている。

(7) cDNA マイクロアレイ解析による T-box 型転写因子 *tbx-9* 標的遺伝子の探索: 安達佳樹

C. elegans 発生過程における遺伝子発現ネットワークの一端の解明をめざし、cDNA 解析より同定された T-box 遺伝子 (CELK02736=*tbx-9*) の解析を進めている。T-box は、DNA

結合モチーフの一つである。このモチーフを持つ遺伝子は、様々な多細胞動物で存在が確認されており、*C. elegans* では20個みつがっている。その機能として、発生や神経形成への関与が知られているが、特に発生初期の組織器官形成に関わるものが多い。またいくつかのT-box遺伝子は、その産物が転写調節因子であると分かっている。私はこれまでの解析から、*tbx-9*産物は配列特異的DNA結合能を持つ転写活性化因子であること、その発現は胚発生初期から中期における腸、体壁筋、表皮の前駆細胞の一部に起こること、その遺伝子変異体は胚発生期に尾部付近の形態異常を示すこと、この異常は体壁筋の形成不全などによるものであることを明らかにした。

本年度は、cDNAマイクロアレイ解析を基に、*tbx-9*により転写調節を受ける標的遺伝子の探索を行なった。基本的発想は、*tbx-9*産物量を変えた線虫株での各遺伝子発現量を、コントロール株のものと比較し、株間で発現量が異なる遺伝子より標的遺伝子を見つけ出すことである。標的遺伝子候補の選択には、cDNA解析による遺伝子発現パターン情報も加味した。候補遺伝子については、マイクロアレイ解析に用いた株への*in situ*ハイブリダイゼーションを行ない、発現パターンより標的遺伝子である可能性を検討した。最初の実験では、ヒートショックプロモーターを利用して*tbx-9*産物量を上昇させた株を調べた。その結果、発現量比が10倍まで異なる遺伝子が見つかり、発現解析でも株間に違いを見いだすことができた。しかし、これら遺伝子はいずれも胚発生後期の腸または咽頭で発現するものであり、*tbx-9*による発現調節を受ける可能性は低いと考えられた。この様な遺伝子が得られた原因として、用いたヒートショックプロモーターは腸や咽頭で特に強く発現誘導するため、これら組織で発現する遺伝子の一部が非特異的に発現パターン変化を起こしたことが考えられる。そこで次の実験では、*tbx-9*が本来発現している細胞での*tbx-9*産物量を変化させるため、*tbx-9*遺伝子を多コピー数導入した株、野生型株、*tbx-9*遺伝子変異株間での比較を行なった。その結果、5倍までの発現量比を示す遺伝子が見つかったが、これら遺伝子の発現解析では株間に違いを認められず、*tbx-9*による発現調節を確認することはできなかった。その原因として、多コピー導入株や変異株は強い異常を生じないため、標的遺伝子の発現量も大きく変化しておらず、見つけ出せないことが考えられる。そこで最後の実験では、*tbx-9*は別のT-box遺伝子*tbx-8*と機能に重複があり、これら遺伝子の単独変異では弱い形態異常しか示さないのに対し、2重機能破壊株は全身形態異常となることから、この2重破壊株を調べることにした。致死となる2重機能破壊胚は、feeding RNAi法により大量調製した。その結果は、各遺伝子の発現量比は4倍までであり、これまでのところ株間で発現パターンに違いのある遺伝子を見つけるには至っていない。今後のマイクロアレイ解析では、更に工夫した比較を行なう必要があると考えられる。

研究業績

(1) 原著論文

1. Cassata, C., Kagoshima, H., Andachi, Y., Kohara, Y., Durenberger, M.B., Hall, D.H. and Burglin, T.R.: The Lim Homeobox Gene *ceh-14* Confers Thermosensory Function to the AFD Neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Neuron* **25**, 587-597, 2000.
2. Asahiha, M., Ishihara, T., Jindra, M., Kohara, Y., Katsura, I. and Hirose, S.: A member of the ancient nuclear receptor class Ftz-F1 is required for embryogenesis, molting and reproduction in *Caenorhabditis elegans*. *Genes to Cells* **5**, 711-723, 2000.
3. Pujol, N., Bonnerot, C., Ewbank, J., Kohara, Y. and Thierry-Mieg, D.: The *C. elegans unc-32* gene encodes alternative forms of the 100-kDa a subunit of Vacuolar-ATPases. *J. Biol. Chem.* (2001 in press).
4. Maeda, I., Kohara, Y., Yamamoto, M. and Sugimoto, A.: Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. *Current Biology*, **11** No.3, 171-176, 2001.
5. Reboul, J., Vaglio, P., Tzellas, N., Thierry-Mieg, N., Moore, T., Jackson, C., Shin-I, T., Kohara, Y., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Lee, H., Hitti, J., Doucette-Stamm, L., Hartley, J., Temple, G., Brasch, M., Vandenhoute, J., Lamesch, Pl., Hill, D. and Vidal, M.: Open-reading-frame sequence tags (OSTs) support the existence of at least 17, 300 genes in *C.elegans*. *Nature Genetics*, **27**, 332-336, 2001.
6. Rosa, E., Eun, N., Shim, Y., Kohara, Y., Singson, A. and T., Keith, Blackwell: *cgh-1*, a Conserved Predicted RNA Helicase Required for Gametogenesis and Protection from Physiological Germline Apoptosis in *C. elegans*. *Development* in press.
7. Hanazawa, M., Makoto, M., Ueno, N., Kohara, Y. and Iino, Y.: Use of cDNA subtraction and RNA interference screens in combination reveals genes required for germ-line development in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* in press.
8. Altun-Gultekin, Z., Andachi, Y., Ephraim L. Tsalik, Pilgrim, D., Kohara, Y. and Hobert, O.: A regulatory cascade of three homeobox genes, *ceh-10*, *ttx-3* and *ceh-23*, controls cell fate specification of a defined interneuron class in *C.elegans*. *Development* **128**, 1951-1969, 2001.

(2) その他

1. 小原雄治: ゲノム解析のモデル生物: 多細胞生物のモデルとしての線虫. *現代医療*, **32**, 174-180, 2000.

2. 小原雄治：生物学者から見た分子生物情報学．人工知能学会誌，**15**，51-55，2000．
3. 豊島久真男，位田隆一，金久 実，小原雄治，辻 省次，中村祐輔，河村潤子：座談会，ゲノム科学の新展開－ヒトゲノムを中心に－，学術月報，**53**，884-909，2000．
4. 小原雄治：ヒトゲノム解析後の世界．DBC(ダイヤモンドビジネスコンサルティング)，**138**，4-9，2001．

(3) 発表講演

1. 小原雄治：ゲノム発生学－発生のコンピュータモデル化に向けて．公開シンポジウム「プロテオーム時代の計算情報生物学」2000年1月18日，東京．
2. Kohara, Y.: Gene Expression Patterns in *Caenorhabditis elegans*. The 8th International Conference: Peace through Mind/Brain Science, Feb.3, 2000, Hamamatsu.
3. 小原雄治：ゲノム生物学－生命システム解明のための総合研究戦略．日本学術会議公開講演会，“「ゲノム科学」の課題と統合的研究推進のための共同体制を考える”，2000年2月4日，東京．
4. 小原雄治：線虫ゲノムの遺伝子発現パターン解析．科研費特定領域A「多元的情報伝達」公開シンポジウム，2000年2月7日，東京．
5. 小原雄治：cDNA解析に基づく線虫ゲノムの読み方．科研費特定領域研究C合同公開シンポジウム．2000年7月19日，東京．
6. 小原雄治：CRESTシンポジウム．2000年7月26日，東京．
7. 小原雄治：生化若手夏の学校．2000年8月6日，神戸．
8. 小原雄治：がん若手ワークショップ，2000年9月1日，掛川．
9. 小原雄治：「遺伝子はいつ，どの細胞で，どの程度発現するか 線虫全遺伝子発現パターンの包括的コンピュータ解析」第71回日本動物学会大会シンポジウム，2000年9月22日，東京．
10. 小原雄治：「比較ゲノム発現学をめざして：線虫発生の遺伝子発現マップ」日本進化学会第2回大会シンポジウム，2000年10月9日，東京．
11. Kohara, Y.: Genome Biology of *C.elegans* Development. 3rd HUGO Pacific Meeting, Oct. 18-21, 2000, Shanghai.
12. 小原雄治：ゲノムから見た生命：第7回国際生命倫理福井セミナー，2000年11月2日，福井．
13. Kohara, Y.: Genome Biology of *C.elegans* Development. The 14th International Mouse Genome Conference, Nov. 8, 2000, Narita.
14. 小原雄治：「これからのゲノム解析と生命科学技術」第5回関西科学技術セミナー分科会，2000年11月15日，奈良．
15. Kohara, Y.: Comprehensive measurement of *C.elegans* gene expression. The 1st International Conference on Systems Biology, Nov. 16, 2000, Tokyo.
16. 新井 理，大庭登紀江，杉浦郁子，小原真澄，渡邊小百合，鈴木孝美，上杉裕子，

- 佐野正子, 杉山康子, 野本久代, 長岡圭美, 廣野啓子, 小原雄治: NEXTDB: *C. elegans* 発現パターンマップデータベース, 第23回日本分子生物学会年会, 2000年12月13日, 神戸.
17. 廣野啓子, 中田恭子, 小原雄治: 線虫 *C. elegans* 母性遺伝子の RNA i による系統的機能解析, 第23回日本分子生物学会年会, 2000年12月13日, 神戸.
 18. 小川知之, 水口洋平, 伊藤将弘, 小原雄治: 線虫 *C. elegans* 初期胚発生のコンピュータモデル化に向けて, 第23回日本分子生物学会年会, 2000年12月13日, 神戸.
 19. 伊藤 将弘, 水口 洋平, 芹澤 路子, 廣野 啓子, 小原雄治: 線虫 *C. elegans* における遺伝子発現パターンのクラスタリング解析, 第23回日本分子生物学会年会, 2000年12月13日, 神戸.
 20. 川崎一郎, Anahita Amiri, Yuan Fan, 辛島 健, 小原雄治, Susan Strome: 線虫 *C. elegans* の生殖顆粒の機能解析構成タンパク質 PGL-1, 2, 3 の生殖系列の発生における分子機能, 第23回日本分子生物学会年会, 2000年12月13日, 神戸.
 21. 花澤桃世, 餅井 真, 上野直人, 小原雄治, 飯野雄一: 線虫の整列 cDNA ライブラリーと RNAi 法を用いた生殖に必須な遺伝子の同定, 第23回日本分子生物学会年会, 2000年12月13日, 神戸.
 22. 杉本亜砂子, 丸山理香, 辛島 健, 住吉英輔, 前田郁麻, 小原雄治, 山本正幸: 線虫 *C. elegans* の減数分裂制御因子, 第23回日本分子生物学会年会, 2000年12月13日, 神戸.
 23. 森田清和, 餅井 真, 杉原由希子, Yo Suzuki, 吉田 悟, W. Wood, 小原雄治, 上野直人: 線虫 *C. elegans* において, cDNA マイクロアレイ法を用いた *dbl-1/cet-1* 下流遺伝子の探索により得られた *lon-1* 遺伝子の機能解析, 第23回日本分子生物学会年会, 2000年12月15日, 神戸.
 24. 森野和彦, 勝見治恵, 赤堀 泰, 鶴飼由範, 小原雄治, 黒沢良和: 蛍光を発する抗体, 第23回日本分子生物学会年会, 2000年12月16日, 神戸.
 25. 鹿兒島浩, T. Burglin, 小原雄治: 細胞特異的発現を制御するエンハンサーの網羅的解析, 第23回日本分子生物学会年会, 2000年12月16日, 神戸.

H. 構造遺伝学研究センター

構造遺伝学研究センターは、広い意味での構造生物学的手法を遺伝学に導入し、新たな分野を切り開くために、旧・遺伝情報研究センターを拡充・改組し、平成8年5月に設立された。本センターでは、平成12年に教官メンバーが大幅に充実した。まず、生体高分子研究室助教授の徳永万喜洋が4月1日付けで教授に昇任した。また、助教授として5月1日付けで今本尚子が、助手として1月1日付けで前仲勝実、2月16日付けで十川久美子、4月1日付けで椎名伸之、11月1日付けで小瀬真吾が着任した。この結果、現在の教官メンバーは、生体高分子研究室が教授・徳永万喜洋と助手・椎名伸之、超分子機能研究室が教授・嶋本伸雄と助手・永井宏樹(休職中)および十川久美子、構造制御研究室が教授・桂 勲と助手・石原 健、超分子構造研究室が助教授・白木原康雄と助手・前仲勝実、遺伝子回路研究室が助教授・今本尚子と助手・小瀬真吾の5研究室となった。スタッフの充実により、本センターが今後、一段と活発になり、飛躍的に発展することが期待されている。

H-a. 生体高分子研究室

当研究室では、生体高分子の機能を明らかにする事を目的として、生体分子1分子を観て・操作し・計測する独自技術を用い、新しい分野としての「生命現象の1分子イメージング」を開拓すべく、生物物理学および細胞生物学的研究を行っている。

研究活動は、徳永万喜洋(4月に教授昇任)、広島通夫(COE非常勤研究員)、坂根 勲(学術振興会特別研究員・東京大学大学院理学系研究科博士課程)に、4月から椎名伸之(助手)、新倉和美(技術補佐員)、小此木孝仁(総合研究大学院大学生命科学研究科博士課程)が加わって行った。遺伝研共同研究として、齋藤 究(金沢大学理学部)が参加した。文部省科学研究費の特定領域(B)「生命現象の1分子イメージング」(領域代表:徳永、1999-2003)から、「分子間相互作用の可視化と細胞内分子定量イメージング」(代表者:徳永)の援助を受けた。また、(財)東レ科学振興会より東レ科学技術研究助成金「プローブ顕微鏡下の1分子技術による生体分子未知機能の探索」(代表者:徳永)の援助を受けた。

(1) 新しい細胞内1分子蛍光イメージング法: 徳永万喜洋

対物レンズ型全反射照明法の開発により、1分子蛍光イメージング法を *in vitro* での観察ばかりでなく、細胞表面近傍での分子観察や操作プローブ顕微鏡への応用と、利用範囲を拡げることができた。今回、全反射照明法をさらに展開すべく新しい顕微鏡を作成した。照射レーザー光の対物レンズへの入射位置を中心から辺縁へと移動させることにより、落射照明から斜射照明、全反射照明へと変化させることができる。ガラス表面近傍100-200nmの範囲内の試料では全反射照明法を用い、それより深いところにある試

料観察では、全反射になる直前の低角斜光照明を用いる。この方法により、低背景で高感度に蛍光試料観察をすることができ、細胞内で蛍光1分子イメージングが実現できることがわかった。

(2) 核輸送の1分子イメージング：徳永万喜洋，今本尚子¹(¹ 遺伝子回路研究室)

低角斜光照明法を用いて、核膜を介した分子輸送の蛍光1分子イメージングを行った。試料としては、細胞質-核間で輸送される分子を蛍光標識し、セミインタクト細胞で観察した。核膜の底を観察したところ、核膜孔の点像からなる蛍光像を得た。点像の蛍光強度と形から、円形の輝点は核膜孔1個に対応していると考えられる。さらに、1分子観察条件にすることにより、核膜孔上での1分子像と考えられる像も得ている。

単核膜孔および1分子イメージングの実現により、分子レベルでの定量的な画像解析が可能となった。すなわち、核膜孔の通過速度・結合定数・結合分子数といった分子機構解明上重要な量を定量的に求めることができる。増殖細胞では1分間に100万個以上の分子が核膜孔を通過すると言われているが、この一見驚く様な数字を、今回の結果は説明することができる。

当研究は、従来求めることができなかった細胞内での諸量を定量的に求め、分子機構を解明する新しい手法として、1分子イメージング法が有用である事を示している。

(3) アフリカツメガエル中心体集積因子 Xp105-Xp65 複合体の同定と解析：椎名伸之，新倉和美，徳永万喜洋

微小管形成の中心であり、細胞内極性形成の鍵となるオルガネラである中心体に集積する因子の同定を行っている。アフリカツメガエルの中心体に対するモノクローナル抗体(S2B4)の抗原として同定した Xp105，及び Xp105 の結合因子として同定した Xp65 のクローニングと解析を行った。S2B4 を用いた免疫電顕により、Xp105 は中心体周辺に集積する中空の粒子に局在することが観察された。さらにこの中空の粒子は、培養細胞に Xp65-GFP タンパク質を発現させることにより中心体周辺に大量に形成されることがわかった。Xp65 のアミノ酸配列は昆虫のレトロトランスポゾンに弱い相同性をもち、しかもレトロトランスポゾンが形成する VLP (Virus-like particle) と Xp65 が形成する中空粒子が酷似していることから、Xp65 はアフリカツメガエルのレトロトランスポゾン因子であると考えている。一方、Xp105 は昆虫から哺乳類にわたり高度に保存された宿主側のタンパク質であることから、Xp105 はレトロトランスポゾン(VLP)に結合して中心体に集積する以外に、Xp105 が関与する宿主側のシステムがあると考えられる。そこで Xp105-GFP タンパク質を培養細胞に発現させてその動態を詳細に観察したところ、Xp105 が輸送小胞の構成因子である β -COP と共局在し、さらに細胞膜のダイナミクスに関与していることを示唆する結果が得られてきている。

(4) 分子間相互作用・分子内構造計測のための分子間力顕微鏡：廣島通夫，徳永万喜洋

生体分子間相互作用の力学測定と非接触計測が1分子レベルで可能な分子間力顕微鏡を、原子間力顕微鏡の技術を応用し開発した。市販品よりも100倍以上柔らかいカンチ

レバーを自作することでサブピコニュートン分解能を達成しているほか、光輻射圧によってカンチレバーの熱揺らぎを抑えて位置を遠隔制御するシステムを組み入れている。この顕微鏡をさらに拡張し遺伝学的に重要な分子の *in vitro* 研究に最適化するため、以下の改良および新システムの導入を行った。1) 光制御用レーザーを更新し、高精度に計測できる力のレンジを100～200pNにまで広げる。2) 水平方向に相互作用する生体分子の相互作用ポテンシャル曲線が計測可能な、水平型分子間力顕微鏡の導入。

その結果、1)に関しては、熱揺らぎによるカンチレバーの変位を0.8nm(r.m.s)に抑えつつ200pN以上の力計測が可能となった。また2)の水平型顕微鏡についても、熱揺らぎによる変位を0.7nm(r.m.s)に抑えつつ最大で90pNの力計測が可能となった。これらは、1分子レベルでの分子間相互作用や分子内構造計測に必要な性能が達成されていることを意味している。この分子間力顕微鏡を用いて、RNAなどの核酸や各種蛋白質分子の高次構造を保持している力や、分子間相互作用ポテンシャルの1分子計測を順次行っている。

(5) 分子間力顕微鏡によるタンパク質折れ畳み過程の1分子計測：坂根 勲^{1, 2}，桑島邦博²，廣島通夫，徳永万喜洋(¹遺伝研特別共同利用研究員，²東京大学大学院理学系研究科)

分子間力顕微鏡を用いて、タンパク質1分子の力学的アンフォールディングを計測している。1分子測定により、これまでのフォールディング研究では得られない、新たな知見が得られると考えられる。Staphylococcal Nucleaseの両端のアミノ酸をシステインに置き換え、金に化学吸着させた試料を用いて、分子間力顕微鏡によりタンパク質1分子の伸長実験を行った。得られたフォースカーブ(伸長力と伸長距離のプロット)から、試料が自己重合し2量体になっていると仮定した場合、試料全長が87nmという結果を得た。これは、1アミノ酸あたり0.29nmに相当し、従来の測定結果と一致した。アンフォールディングの力学的特性を高分解能に解明すべく、現在計測を進めている。

(6) 核-細胞質間輸送の1分子計測：小此木孝仁，廣島通夫，椎名伸之，小瀬真吾¹，今本尚子¹，徳永万喜洋(¹遺伝子回路研究室)

核-細胞質間輸送の分子メカニズム解明を目的として、核輸送タンパク質と核膜孔複合体の分子間相互作用に関する1分子計測を行っている。核膜孔の内径は20nm程度と考えられているので、核膜孔を通過し得る先端を持つ走査プローブの作成が必須である。カーボンナノチューブには外径が10nm前後の細いものあり、先端を化学的に修飾できるので、この目的に適している。そこで、カーボンナノチューブをプローブとしたカンチレバーの作成を行った。輸送活性のある核膜孔を基盤に保持した試料を作成するために、Xenopusの卵抽出液を用いたビーズ上への核膜再構築を行っている。

研究業績

(1) 原著論文

1. Yanagida, T., Esaki, S., Iwane, A. H., Inoue, Y., Ishijima, A., Kitamura, K.,

Tanaka, H. and Tokunaga, M.: Single-motor mechanics and models of the myosin motor. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.*, **355**, 441-447, 2000.

2. Mimori-Kiyosue, Y., Shiina, N. and Tsukita, S.: Adenomatous polyposis coli (APC) protein moves along microtubules and concentrates at their growing ends in epithelial cells. *J. Cell Biol.*, **148**, 505-518, 2000.
3. Mimori-Kiyosue, Y., Shiina, N. and Tsukita, S.: The dynamic behavior of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules. *Curr. Biol.*, **10**, 865-868, 2000.

(2) その他

1. 喜多村和郎, 岩根敦子, 徳永万喜洋: 「ミオシン頭部1分子はATP分解1回で複数ステップ動く: 1分子補足・操作によるルースカップリングの直接証拠」 *生物物理*, **40** (2), 89-93, 2000.
2. 徳永万喜洋: 「分子でできた究極の微小モーター」 “新生物物理の最前線” 日本生物物理学会編, 講談社ブルーバックス, 印刷中.

(3) 発表講演

1. 徳永万喜洋: 1分子イメージングと計測のための顕微鏡の開発, 特定領域(B)「生命現象の1分子イメージング」班会議, 浜名湖, 8月.
2. 徳永万喜洋, 今本尚子: 細胞質-核間輸送の1分子イメージング, 日本生物物理学会第38回年会, 仙台, 9月.
3. 廣島通夫, 徳永万喜洋: 分子間力顕微鏡の拡張, 日本生物物理学会第38回年会, 仙台, 9月.
4. 坂根 勲, 桑島邦博, 廣島通夫, 徳永万喜洋: フィードバックAFMを用いたタンパク質1分子のアンフォールディング, 日本物理学会第55回年次大会, 新潟, 9月.
5. 椎名伸之: 微小管依存性に中心体に輸送される新規オルガネラ, 哺乳動物遺伝学研究会, 京都, 9月.
6. 椎名伸之, 佐々木博之, 新倉和美, 徳永万喜洋, 月田承一郎: 新規中心体集積因子Xp105-Xp65複合体は β -COPと共局在する, 第53回日本細胞生物学会年会, 福岡, 10月.

H-b. 超分子機能研究室

当研究部門では、遺伝子の発現調節メカニズムの解明を、分子生物学と生物物理学の境界領域において、オリジナルな手法をもちいて行なっている。本年の構造研究室の主な研究活動は、嶋本伸雄教授と、十川久美子助手、学振PD 柁淵 隆、派遣研究員 Gyedu K. Ampaabeng (4月から)、総合研究員大学院生佐藤由美子、須佐元樹、研究補助員堀内恵美で行なわれた。永井宏樹助手はエール大学留学のため1999年9月より休職。

遺伝研共同研究として鷺津正夫, 黒沢 修, 加畑博幸(京都大学工学研究科), 原田慶恵, 木下一彦(慶応大学), 遺伝研COE 外国人招聘研究者として2-3月にRichard S. Hayward(エジンバラ大学)が参加した。

(1)プロモーターでの不活化による転写調節機構: 嶋本伸雄, 須佐元樹, 永井宏樹, Dipankar Chatterji³, Richard Hayward⁴(¹遺伝研CREST研究員, ²学術振興会奨励研究員, ³共同研究, インドCentre of Cellular and Molecular Biology, ⁴COE外国人招聘研究者, 英国エジンバラ大学)

一群のプロモーターに対して, 大腸菌RNAポリメラーゼは, プロモーターに結合したまま, 不活性な複合体を形成する。λ P_Rプロモーターにおいては, 転写開始からRNA伸長の過程で, 長鎖RNA合成にいたる転写複合体と, 短鎖RNAを繰り返し解離(abortive initiation)する複合体(moribund複合体と命名された)との分岐した反応経路をたどる。後者は, 短鎖RNAを一定の頻度で合成・解離し, また, 数分で基質存在下でも伸長反応を行わないdead-end複合体に変換する。

RNA切断因子GreAGreBは, RNA伸長時のブロックを解除する伸長因子と考えられて来たが, λ P_Rプロモーターにおける転写開始時の不活性化複合体を再活性化することが分かった。この再活性化は, RNA合成以前に起こっており, 開始ヌクレオチドであるGTPが高濃度(mM)存在することが必要である。このため, Gre因子は, 本来非可逆的に分岐した2つの反応経路を, プロモーター・ポリメラーゼ2体複合体のレベルで可逆的にしていると思われる。開始ヌクレオチドへの親和性が, 長鎖RNAを合成する複合体の方が高いため, Gre因子と高濃度GTPが共存すると, 二者複合体の中で平衡が長鎖RNAを合成する複合体のほうに傾く, と言うことになる(文献1)。

T7A1のようにもともと可逆的と思われるプロモーターでは, λ P_Rプロモーターと同様な不活性化やmoribund複合体の蓄積, Gre因子による活性化は, 通常条件では存在しない。反応経路も, 従来の直列経路に一致する。しかし, 低塩濃度では, T7A1プロモーターでの不活性な複合体の形成が, λ P_Rプロモーターと同様に観測された。このことは, 転写開始の一般的な経路は分岐経路であり, プロモーターによっては, 通常条件では分岐間の可逆性が高く, 直列経路と等価な分岐経路をとることを意味する。(文献1, 2)

(2)Gre因子の作用機構: 嶋本伸雄, 須佐元樹, 久堀智子¹(¹現エール大学)

細胞内でのGre因子の機能を推定するために, greA, greB単独・二重破壊株を作製して, 遺伝子発現の変化を見た。二重破壊株の蛋白質の分析では, 減少する蛋白質のうち9種, 増加する蛋白質のうち1種が同定された。一方, ゲノムアレイでは, 4290遺伝子のうち2600遺伝子のmRNAが検出され, そのうち200遺伝子のmRNAが二重破壊株で減少, 67遺伝子が増加した。このうち70%のものは, 転写開始段階でのgre因子の関与を推定させた。greA, greB単独・二重破壊株の表現型解析からも, gre因子はRNA伸長因子的なGreB因子の寄与よりも転写開始因子的なGreA因子の欠損ががより強い効果を与えることが見出された。また, 二価金属の転写への阻害効果を中和する働きを見い

でしたが、これは、遊離状態の Gre 因子が金属を無害化していることが判明し、転写因子以外の機能を初めて見いだした。

(3) 主要 σ 因子のアミロイドジェネシスによるプリオン様集合体形成：嶋本伸雄，佐藤由美子，Geydu K. Ampaabeng，永井宏樹，Richard S. Hayward¹(¹ エジンバラ大学：COE 招聘)

大腸菌の分子温度計・環境センサーの実体は、長い間の謎である。驚いたことに、主要転写開始因子 σ^{70} が、温度や環境変化に応じて、プリオンと同様なアミロイド集合体を形成して不活化する事を見出した。この変化は転写制御を通して、 σ^{70} が蛋白の分子温度計になり得ることが示され、その当否を決定しようとしている。

大腸菌主要 σ 因子 σ^{70} と枯草菌主要 σ 因子 σ^A とを比較すると、大腸菌では 200 アミノ酸近い部分が挿入されている。この部分には 15 も酸性アミノ酸が含まれているという特徴があるため、必須であるとの考えもあった。そこでこの部分を削除したものを作製した。異常に難溶性であったが、ホロ酵素は遜色のない活性を持っていた。この領域の役割の一つは、 σ の溶解度を保証することにあると考えられ、界面活性化ドメインであることが明らかになった。また大腸菌の染色体から σ^{70} の遺伝子を除くことに初めて成功、 σ^A が σ^{70} の欠損を相補する事が明らかになった。

(4) タンパク質の DNA 上のスライディングの役割：十川久美子，杵淵 隆，嶋本伸雄，加畑博幸¹，黒沢 修²，鷲津正夫¹，荒牧弘範³，(¹ 京都大学工学研究科，² アドバンス(株)，³ 第一薬科大学)

タンパク質の DNA 上のスライディングは、直接 DNA 結合タンパク質の DNA 上の動きを検出する手法で、大腸菌 RNA ポリメラーゼ、*P. putida* の cam リプレッサー (CamR) について観測され、スライディング運動は複数の DNA 結合タンパク質の性質であることが証明された。スライディングの生理的意義を明らかにするために、さらに CamR について研究した。RNA ポリメラーゼと異なり CamR は、特異的部位からの解離時にはスライディングをほとんど起こさない。結合時には、両者ともスライディングするので、CamR の場合には、スライディングできる距離が増加するにつれ、特異的部位への親和性が増加することになり、ゲルシフト法でも確認できた。このように、スライディングは、CamR のようなクラスのタンパク質の特異的結合を増強する働きをしている(アンテナ効果)。

大腸菌の TrpR は 10^4 以上の大きなアンテナ効果を示した。この効果は、スライディングによる結合の加速によって起こり、解離の原則ではないことがわかった。このことにより、TrpR の少ないコピー数に比べて特異性が異常に低く測定される矛盾が、特異性の測定を短い DNA で行ったことによる過小評価であることを証明した。また、アンテナ効果が、細胞内で起こっていることを、lacZ の発現で証明した。

スライディング運動が DNA のグルーブをなぞっているのかどうかは、塩基配列の読み出し効率に大きな影響を与えるので、長年の問題であった。分子の回転をマクロに引き出す方法論を考案し、それを用いて回転の程度を観察した。(文献 4)

(5) 原田慶恵¹, 木下一彦¹, 嶋本伸雄¹(慶応大学, CREST)

転写によってRNAポリメラーゼとDNAは相対的に回転する。この回転を磁気ビーズの回転として検出することに初めて成功した。遺伝研共同研究である。(文献3)

研究業績

(1) 原著論文

1. Sen, R., Nagai, H. and Shimamoto, N.: Conformational switching of *Escherichia coli* RNA polymerase-promoter binary complex is facilitated by elongation factors GreA and GreB. *Gene. Cells* **6**, in press, 2001.
2. Sen, R., Nagai, H. and Shimamoto, N.: Polymerase-arrest at the λ PR promoter during transcription initiation. *J. Biol. Chem.* **275**, 10899-10904, 2000.
3. Harada, Y., Ohara, O., Takatsuki, A., Itoh, H., Shimamoto, N. and Kinoshita, Jr. K.: Direct observation of DNA rotation during transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase. *Nature* **409**, 113-115, 2000.
4. Yamamoto, T., Kurosawa, O., Kabata, H., Shimamoto, N. and Washizu, M.: Molecular surgery of DNA based on electrostatic micromanipulation. *IEEE Trans. on Indst. Appl.* **36**, 1010-1017, 2000.
5. Matsumoto, T., Morimoto, Y., Shibata, N., Kinebuchi, T., Shimamoto, N., Tsukihara, T. and Yasuoka, N.: Roles of functional loops and the C-terminal segment of a single-stranded DNA binding protein elucidated by X-ray structure. *J. Biochem.* **127**, 329-335, 2000.
6. Muramatsu, H., Homma, K., Yamamoto, N., Wang, J., Sakata-Sogawa, K. and Shimamoto, N.: Imaging of DNA molecules by scanning near-field microscope. *Mater. Sci. Eng. C* **12**, 29-32, 2000.

(2) その他

1. 嶋本伸雄: リボ核酸, RNAポリメラーゼ, 転写開始, エロンゲーション(転写の), メッセンジャーRNA. 分子生物学・免疫学キーワード辞典(永田和宏, 長野 敬, 宮坂信之, 宮坂昌之 eds). 医学書院. Tokyo.
2. 嶋本伸雄: 大腸菌RNAポリメラーゼ, GreA, GreB. in *Bioscience 新用語ライブラリー転写因子*第2版(田村隆明, 山本雅之, 安田国男 eds). 羊土社. Tokyo.

(3) 発表講演

1. Shimamoto, N.: Nanobiology of protein sliding along DNA and its seemingly contradicting to thermodynamics. "Application of synchrotron radiation to studies of nano-structured materials" SPring-8 Center. Harima, Japan. 7月, 2000.
2. Shimamoto, N.: Binding of protein to DNA can disobey thermodynamics. "Golden Jubilee Symposium on Trends in Cellular and molecular biophysics"

- Saha Institute. Calcutta. India. 9月, 2000.
3. Shimamoto, N.: Aggregation of *E. coli* sigma-70: A molecular thermometer? International Congress Center. Beijing. 10月, 2000.
 4. 嶋本伸雄, 須佐太樹: 転写開始の2状態モデルとRNAの役割, 日本RNA学会年会, 東京, 7月.
 5. 須佐太樹, 嶋本伸雄: *E. coli* RNA切断因子GreAGreBはイオンセクターか, 日本RNA学会年会, 東京, 7月.
 6. 十川久美子, 嶋本伸雄: RNAポリメラーゼはgroove trackingするか?, 日本生物物理学会年会, 仙台, 9月.
 7. 加畑博幸, 鷲津正夫, 荒牧弘範, 嶋本伸雄: 誘導物質によるアロステリック効果とDNA長の変化によるアンテナ効果がCamRの転写抑制能を制御する, 日本生物物理学会年会, 仙台, 9月.
 8. 十川久美子, 嶋本伸雄: RNAポリメラーゼはgroove trackingしながらスライディングするか?, 日本分子生物学会, 神戸, 12月.
 9. 杵淵 隆, 加畑博幸, 黒沢 修, 鷲津正夫, 嶋本伸雄: 遺伝子発現に及ぼすDNA結合蛋白質のスライディングの効果, 日本分子生物学会, 神戸, 12月.
 10. 須佐太樹, 嶋本伸雄: RNA切断因子GreAGreBの転写を越える新機能, 日本分子生物学会, 神戸, 12月.
 11. 加畑博幸, 鷲津正夫, 荒牧弘範, 嶋本伸雄: *P. putida* camリプレッサー(CamR)の全結合機構の解明: 動的DNA結合と協同的インデューサー結合2重の転写抑制制御, 日本分子生物学会, 神戸, 12月.

H-c. 構造制御研究室

構造制御研究室では, 線虫 *C. elegans* を材料として行動と神経機能の分子生物学的研究を行っている. 本年の研究室メンバーは, 教授・桂 勲, 助手・石原 健, 学振PD・宮原浩二(4月まで), 総合研究大学院大学大学院生・大蔵清貴, 矢部智子(10月より), 研究補佐員・杉浦麻理子, 田山しのぶ(5月より), 岩間紀知(5月より), 本橋智子(8月より)であった. また, 技術課所属の技官・大石あかねの助けを受けた. 本年度は文部省科学研究費より, 基盤研究(B)(2)「線虫 *C. elegans* の神経機能の分子生物学的解析」(代表者: 桂), 特定領域研究(A)(2)微小脳システム「線虫 *C. elegans* の amphid 感覚情報処理機構の分子生物学的解析」(代表者: 桂), 同・総合脳「*C. elegans* を用いた高次神経機能に関わる新規分子の同定とその機能解析」(代表者: 石原), 同・神経回路「*C. elegans* の高次行動に関わる神経回路での情報処理機構の分子遺伝学的解析」(代表者: 石原), 奨励研究(A)「*C. elegans* の連合学習と感覚情報の選択に異常がある変異体の分子遺伝学的解析」(代表者: 石原)の援助を受けた.

(1) 線虫 *C. elegans* のフッ素イオン耐性変異の解析: 大石あかね, 石原 健, 桂 勲

我々は, *C. elegans* のフッ素イオン耐性変異を分離・解析している. これらの変異はすべて劣性で, 5つの遺伝子 *f1r-1* ~ *f1r-5* に位置し, クラス1 (*f1r-1*, *f1r-3*, *f1r-4*) とクラス2 (*f1r-2*, *f1r-5*) に分類される. 前者は, フッ素イオン強耐性である他に, 脱糞周期が短く, 脱糞の排出過程がしばしば欠落し, 成長が遅く, 合成dauer構成性(下記(2)参照), 餌の上に留まる傾向が弱い等, 多様な表現型を示す. *f1r-1* は degenerin/ENaC ファミリーに属するイオンチャネル, *f1r-4* はC末端側に疎水性配列を持つ新規の Ser/Thr キナーゼ, *f1r-3* は同様にC末端側に疎水性配列を持つキナーゼ様分子をコードする. 機能的な *f1r-1::GFP* 融合遺伝子は胚発生のコンマ期から成虫期まで腸でのみ発現し, *f1r-4::GFP* 融合遺伝子と *f1r-3::lacZ* 融合遺伝子も主に腸で発現する. これから, クラス1 遺伝子群は, 腸で働き食物関連の多様な機能を制御する調節系を作ると予想されている. クラス2 変異は, フッ素イオンに弱耐性である他に, クラス1 変異表現型のうち合成dauer構成性などの感覚異常と成長遅延を抑圧するが, フッ素イオン強耐性と脱糞の異常は抑圧しない. したがって, クラス1 遺伝子群の作る調節系は下流で少なくとも2つに分岐し, クラス2 遺伝子群は成長と感覚信号に関する部分のみを制御すると考えられる. クラス2 遺伝子群のうち, *f1r-2* 遺伝子は TGF- β 阻害因子である gremlin/DAN/cerberus ファミリーに属するタンパク質をコードするが, *C. elegans* の4つの TGF- β 遺伝子のいずれとも相互作用するという証拠が得られていない.

本年は, 主に *f1r-2* の遺伝子発現について研究した. *f1r-2* 変異表現型を野生型表現型に変える *f1r-2::GFP* 融合遺伝子は, 蛍光は弱く見えないが, 抗GFP抗体で染めると咽頭・頭部・尾部の少数の神経で発現していることがわかった. また, 大腸菌で発現させた FLR-2 蛋白質を抗原として抗FLR-2抗体を作成した. この抗体で染めると, 野生型 *C. elegans* で *f1r-2* 遺伝子は頭部・咽頭・尾部の少数の神経で発現していた. 腸で発現するクラス1 遺伝子がどのようにして感覚信号を制御するかは謎である. しかし, この働きを仲介すると考えられる *f1r-2* 遺伝子が神経で発現していることから, クラス2 遺伝子群の研究によりこの問題を解決する手がかりが得られると期待される.

(2) 合成dauer構成性変異の解析: 宮原浩二, 大蔵清貴, 矢部智子, 石原 健, 桂 勲

C. elegans は, 孵化直後に餌が不足し個体密度が高いと, 餌やフェロモンの信号を amphid(頭部の感覚器官の1つ)で感じて, 3齢幼虫の代りにdauer幼虫(口の閉じた耐久型の幼虫)になる. dauer幼虫形成は走化性等と比べてアッセイが簡単なので, これを利用して頭部神経系の機能解析を行っている. 我々は, 既知の50遺伝子以上の変異が特異的な組合せパターンで合成dauer構成性(Sdf-c)表現型, すなわち「それぞれ単一の変異ではdauer幼虫形成制御は正常だが二重変異にすると環境によらずdauer幼虫になる」という表現型をもつことを発見した. このような表現型が生ずるのは, dauer幼虫形成制御信号が複数の経路を通るため, 単一の変異ではその一部しか遮断できず2つの変異ではじめて全部を遮断できる例が多いからと推測される. dauer幼虫を生ずる変

異の組合せパターンと、それを抑圧する変異による抑圧パターンを調べ、感覚情報処理回路とそこでの各遺伝子の役割を解明しようと試みている。

さらに、新たな神経機能遺伝子を発見する目的で、「*unc-31* 変異と組み合わせると dauer 幼虫形成が構成性になる変異」を44個分離し、マッピングした。野生型線虫は amphid の感覚神経のうち、ADF, ASI, ASG の3種を破壊すると dauer 構成性になるが、*unc-31* 変異体は ASI 神経の破壊のみで dauer 構成性になる。したがって、これらの変異には ASI 神経の機能異常を起こすものが多数あると予想される。44個のうち8個は既知の遺伝子の変異だが、他の36個は未知の遺伝子(少なくとも13遺伝子)にあるらしい。これらの遺伝子を *sdf* 遺伝子と名づけた。*sdf* 変異体の中には、種々の感覚機能に異常をもつものが存在する。*sdf-1* 変異体は、野生型が正の走化性を示すベンズアルデヒド、イソアミルアルコール、ブタノンに負の走化性を示し、温度走性は好熱性になるなど、広範囲の異常がある。*sdf-13* 変異体は、AWC 神経で感じるベンズアルデヒド、イソアミルアルコール、ブタノンに対する走化性に異常はないが、これらの匂い物質に対する順応に異常がある。この遺伝子は、T-box をもつ転写因子(マウスの Tbx2 やシヨウジョウバエの Omb のホモログ)をコードする。

本年度は、*sdf* 変異体について、以下の結果を得た。

1) *sdf-13* 遺伝子の発現する細胞と機能する細胞を同定した。*sdf-13* 遺伝子のコード領域 C 末端に GFP の cDNA をつないだ融合遺伝子は、変異体に遺伝子導入すると表現型(合成 dauer 構成性および嗅覚の順応)を変異型から野生型に変える。この GFP 融合遺伝子は、胚発生後期~成虫期で咽頭の神経 M2 および I5 で発現するように見えた。しかし、GFP の蛍光が弱かったため、SDF-13 タンパク質の N 末端側 86 残基を大腸菌内で合成して、これに対する抗体を作った。抗体染色の結果は、amphid 感覚神経の中の AWB, AWC, ASJ と、咽頭の神経の中の I1, I3, I5, M1, M2, M5, NSM に SDF-13 タンパク質が存在することがわかった。また、*sdf-13* の cDNA を *gcy-10* プロモーターにつないで AWB, AWB, I1 でのみ発現させたところ、イソアミルアルコールに対する順応は回復するが、合成 dauer 構成性表現型は回復しないことを見つけた。この結果は、*sdf-13* 遺伝子が細胞自律的に働くことを示唆する。現在、AWC 神経のみでの発現で嗅覚の順応を回復するか、ASJ 神経での発現で合成 dauer 構成性表現型を正常にするかを検討している。

2) *sdf-9* 遺伝子には5株の変異体が得られているが、この遺伝子は染色体上で付近に位置する既知の dauer 関係の遺伝子とは異なる。*daf-7* 遺伝子(TGF- β 遺伝子の1つで dauer 形成制御に働く)のプロモーターに GFP をつないだ DNA を *sdf-9* 変異体に導入すると、幼虫はすべて dauer 幼虫になるが、すぐに脱皮して4齢幼虫から成虫へと成長した。しかし、*daf-7::GFP* は、*sdf-9* 変異存在下でも野生型と同様に発現していた。既知の変異との3因子交雑および SNP を使った方法により *sdf-9* 変異を詳細にマッピングし、第 V 染色体の右端付近(*rol-9* 遺伝子と右端の間)にあることをつきとめた。現在、この領域の様々な DNA 断片を変異体に導入して表現型を調べ、*sdf-9* 遺伝子のクローニングを

行っている。この遺伝子の分子レベルでの解析は、dauer 幼虫の形成と dauer 幼虫からの回復を分けて解析するために役立つと考えられる。

(3)二つの行動の選択性や行動の可塑性に異常を示す変異体の解析：石原 健，飯野雄一（東京大学，遺伝子実験施設），桂 勲

動物は、環境から様々な情報を感覚細胞を通じて受容し、神経回路上で必要な情報を取捨選択・統合し適切な応答をする。その際、それまでの経験（記憶）などに応じて、感覚情報に対する応答が変化する。これまで、*C. elegans*では、行動変異体の解析により匂い物質や温度の感覚に関わる分子機構が明らかにされてきた。我々は、高次の感覚情報処理システムに関わる新しい分子機構を明らかにすることを目的として、学習・感覚情報の選択（価値評価）などの高次行動に関わる変異体について遺伝学的解析を行った。

線虫 *C. elegans* は、銅イオンのような重金属イオンや匂い物質等を頭部の別々の感覚神経で感覚し、忌避反応や走化性行動をしめす。これらの行動における介在神経の機能を明らかにするために、銅イオンからの忌避行動と匂い物質への走化性とを組み合わせた行動測定法を開発した。野生株では、各々の濃度に依存して、どちらの行動を優先するかが変化した。このことは、これらの感覚情報の間に相互作用があることを示唆している。また、*C. elegans* の神経回路の構造や匂い物質受容細胞の同定などの知見から、この相互作用の情報処理は約 10 対の神経細胞からなる回路により行われていると予想される。また、通常は餌が十分にあるところで育てた虫で測定を行うが、5 時間餌がない状態で飼育し飢餓させた虫では、匂い物質への走化性が優先するようになった。そこで、飢餓状態の虫で、各々の行動を単独で測定したところ、銅イオンに対する忌避行動が弱くなっていることがわかった。また、満腹を疑似すると考えられるセロトニン存在下では、飢餓によるこの行動の変化がみられなくなった。この変化は、生態系で飢餓状態にあるときに忌避行動が弱くなり、行動範囲が広くなるという現象があることを示唆しているのかも知れない。

これらの行動を解析するために変異体の単離・解析を行っている。我々が同定した *ut236* 変異体は、野生型に比べ、匂い物質や銅イオンに対する各々の応答には異常が見られないが、二つの刺激がある場合には、匂い物質への走化性より銅イオンからの忌避を優先する。このことは、*ut236* 変異体では二つの応答の相互作用に異常があることを示唆している。さらに、この *ut236* 変異体は学習にも異常がみられた。野生型では NaCl と飢餓の対提示により NaCl への走化性が変化し NaCl を忌避するようになるが、*ut236* 変異体ではこの変化が野生型より小さい（東京大学・飯野らとの共同研究）。一方、飢餓による単純な行動の変化には異常がみられなかったことから、*ut236* 変異体は飢餓により誘導される学習過程に異常があると考えられた。

C. elegans での高次行動の分子機構を明らかにするために、ポジショナルクローニングを行ったところ、*ut236* 変異体の原因遺伝子は、LDL 受容体リガンド結合ドメインを持つ新規の分泌タンパク質をコードしていた。この遺伝子産物に対する抗体を用いた免

疫染色により、この遺伝子は各一對ずつの感覚神経と介在神経の細胞体と神経軸索でのみ発現していることがわかった。また、シナプス小胞の輸送に異常がある *unc-104* (キネシン KIF1A ホモログ遺伝子) 変異体では、この遺伝子産物の軸索への局在が見られなかった。さらに、様々なプロモーターを用いた強制発現の実験から、この分子は神経系において細胞非自律的に働くことがわかった。また、熱ショックプロモーターを用いて、表現型の回復に必要な時期を調べたところ、神経の発生期に発現していても表現型は回復しないが、成熟した神経回路路上に発現していると表現型が回復した。以上のことから、この分子は感覚情報の修飾や学習に広く関わる新規の神経機能調節因子であると考えている。

ut235 変異体では、飢餓による銅イオンからの忌避反応が弱くなるという変化が見られなかった。しかし、飢餓による運動量の変化や餌に対する応答性はほぼ正常であったので、*ut235* 変異体では飢餓による応答の一部だけに異常がみられると考えられる。*ut235; ut236* の二重変異体では、飢餓状態にあるかどうかに関わらず、銅イオンからの忌避反応が優先されることがわかった。この *ut235* 変異の原因遺伝子のクローニングのために、N2 株との多型の多い CB4856 株を用いた SNP によりマップ位置を決定した。

研究業績

(1) 原著論文

1. Okuda, T., Haga, T., Kanai, Y., Endou, E., Ishihara, T. and Katsura, I.: Identification and characterization of the high-affinity choline transporter. *Nature Neurosci.* **3**, 120-125, 2000.
2. Asahina, M., Ishihara, T., Jindra, M., Kohara, Y., Katsura, I. and Hirose, S.: The conserved nuclear receptor Ftz-F1 is required for embryogenesis, moulting and reproduction in *Caenorhabditis elegans*. *Genes to Cells* **5**, 711-723, 2000.
3. Aoki, H., Sato, S., Takanami, T., Ishihara, T., Katsura, I., Takahashi, H. and Higashitani, A.: Characterization of *Ce-alt-1*, an *ATM*-like gene from *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Gen. Genet.* **264**, 119-126, 2000.

(2) その他

1. 桂 勲: 巻頭言「科学は人の心から生まれた」生物物理, **40**(3). 147. 2000.
2. 桂 勲: 線虫の行動遺伝学。「行動の分子生物学」(山元大輔編), シュプリンガー・フェアラーク東京, 29-39. 2000.

(3) 発表講演

1. Katsura, I.: Genetic studies on the modulation and interaction of sensory signals in *C.elegans*. CCEP International Workshop 2000, Yokohama, March.

2. Ishihara, T., Iino Y. and Katsura, I.: The *ut236* mutant in *C.elegans* has defects in the interaction of two sensory signals and in associative learning. West Coast Worm Meeting. 2000, Los Angeles., U. S. A., June.
3. Ishihara, T., Iino, Y. and Katsura, I.: The *ut236* mutant in *C.elegans* has defects in the interaction of two sensory signals and associative learning. The Second Japanese *C.elegans* Meeting, Tokyo, August.
4. Oishi, A., Takeuchi, M., Ishihara, T. and Katsura I.: Analysis of class 2 *flr* genes, which control the growth rate of class 1 *flr* mutants. The Second Japanese *C.elegans* Meeting, Tokyo, August.
5. 石原 健, 飯野雄一, 桂 勲: *C. elegans* において二つの感覚情報の選択と連合学習能力に異常を持つ *ut236* 変異体の解析. 第23回日本神経科学大会第10回日本神経回路学会大会合同大会, 横浜, 9月.
6. 石原 健, 飯野雄一, 桂 勲: *C. elegans* において二つの感覚情報の相互作用と連合学習能力を制御している新規分泌タンパク質. 第23回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月.
7. 大石あかね, 武内昌也, 石原 健, 桂 勲: 線虫 *C. elegans* においてクラス1フック素イオン耐性変異体の成長速度を制御するクラス2遺伝子群の解析. 第23回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月.
8. 宮原浩二, 鈴木教郎, 石原 健, 土屋英子, 桂 勲: 嗅覚の順応に関わる線虫 T-box 遺伝子の解析. 第23回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月.
9. 大蔵清貴, 鈴木教郎, 石原 健, 桂 勲: *unc-31* 変異と組み合わせると *Daf-c* 表現型を示す *sdf* 変異体の解析. 第23回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月.

H.d. 超分子構造研究室

当研究室では、構造生物学における様々な生理活性機構を分子レベルで理解するために、X線結晶解析法を用いて、蛋白質・核酸などの生体高分子やその集合体(超分子)の立体構造決定を行っている。

今年度の超分子構造研究室の研究活動は、白木原康雄, 前仲勝実を中心に、総合研究大学院2年・進藤一泰, 研究実験補助員・白鳥 綾, 白木原千佳子によって行われた。所内共同研究は、Talukder A. Azam, 石浜 明(分子遺伝研究部門), 中山貴博, 広瀬 進(形質遺伝研究部門)と共に行った。更に、遺伝研共同研究として山登一郎, 保坂俊彰, 目黒俊幸(東京理科大学), 森口充暲, Panuan Chantawannakul, 佐藤晶子(大分大学)が参加し、また鈴木俊治, 吉田賢右(東京工業大学・資源化学研究所), 足立健吾, 木下一彦(CREST team13), 中迫雅由(東大・分生研), 荒牧弘範(第一薬科大), 岡村英保, 西村善文(横浜市立大), 牧野耕三(阪大微研), 前仲太恵子, David Stuart, Yvonne Jones (Wellcome Trust Centre for Human Genetics), Anton van der Merwe (Sir

William Dunn School of Pathology, University of Oxford). Peter Sondermann (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried). 白石充典, 津本浩平, 熊谷 泉(東北大学大学院工学研究科生物工学専攻). 三沢 悟(ジャパンエナジー)と協力して研究を行った.

(1) F1-ATPase の部分集合体の X 線結晶解析: 白木原康雄, 鈴木俊治, 白鳥 綾, 白木原千佳子, 吉田賢右, 足立健吾, 木下一彦, 中迫雅由

F1ATPase (F1, サブユニット構成 $\alpha 3 \beta 3 \gamma \delta \epsilon$) は, 呼吸鎖が形成する膜を隔てた水素イオンの濃度差を ATP に変換する ATP 合成酵素の, 膜から突き出した巨大分子集合体 (分子量 38 万) である. F1 の 3 つの β サブユニット上にある 3 つの触媒部位の間には極めて強い相互作用があり, 触媒過程のどの瞬間をとってもお互いが異なった状態にあり, この非等価性を決めているのは, 回転する γ サブユニットだとされている. このように極めて精緻に調節された触媒機構を理解するには, 活性化状態を含めた他の多くの状態の構造情報を必要としている. 私たちは数年前に解いた $\alpha 3 \beta 3$ 複合体 (F1 の 5 分の 1 程度の ATPase 活性を示し そのコア部分を形成する; 分子量 33 万) のヌクレオチド非存在下の構造をベースに, 上に述べた情報を得るために異なるサブユニットの組み合わせで得られる種々の集合体の構造解析を行っている. なお $\alpha 3 \beta 3$ 複合体と異なり, $\alpha 3 \beta 3 \gamma$ 複合体より上位の複合体は F1 とほぼ同様な酵素的な性質を示す.

この数年, 精製法の検討, 結晶化条件の検討と多大な努力を払って結晶化を行ってきた $\alpha 3 \beta 3 \gamma$ 複合体は Spring8 での回折実験の結果, 7-8 Å 分解能程度の反射を与えることが確認され, 更に結晶の改良の余地があることが示された. この複合体とは対照的に, 昨年度初めて結晶になった $\alpha 3 \beta 3 \gamma \epsilon$ 複合体は $\alpha 3 \beta 3 \gamma$ 複合体に比べて良い結晶を与えることが判明した. $\alpha 3 \beta 3 \gamma \epsilon$ 複合体の大量生産株から Ni カラム, イオン交換カラム, 弱疎水カラム, 熱処理の過程で精製された標品は鈴木によって供給された. $\alpha 3 \beta 3 \gamma \epsilon$ 複合体の結晶化条件は $\alpha 3 \beta 3 \gamma$ 複合体の結晶化条件 (10% PEG6000, 0.2M NaCl, pH6.6, 0.5mM ADP, 25 度) から出発した条件検討の結果, pH に関しては 8, ATP, ADP などの各種のヌクレオチドが 0mM-5mM 存在しても結晶化する, Mg イオンはない方が良いクライオプロテクトant (20% エチレングリコール) の導入は結晶化時に行う必要がある, ことがわかった. 現在 0.5mM ADP 存在下でできた結晶を中心に解析を進めている. 0.2x0.2x0.1mm 程度の中程度の大きさの結晶を液体プロパンで凍結後, 100K の窒素ガスの on/off アニールにより, 実験室では 7 Å 分解能の反射を記録できる. この結晶を用いて, SPring8/ 阪大蛋白研ビームライン (BL44XU) では 4.5 Å 分解能のデータを収集できた. 格子定数は 225.3, 225.7, 224.6 Å, 94.1, 117.5, 117.8 度 (P1) と決定された. 単位格子中に 4(1)22 の回転対称で配置している 8 個の $\alpha 3 \beta 3 \gamma \epsilon$ 複合体が存在する. 分子置換法による解析が進行中である.

(2) Camphor (樟腦) 代謝系オペロンを抑制するリプレッサー CamR の X 線結晶構造解析：前仲勝実，荒牧弘範，白木原康雄

Camphor 分解菌 *Pseudomonas Putida* が持つプラスミド上の Camphor 代謝系酵素群オペロン(シトクローム P450cam オペロン) はリプレッサー CamR により負に制御されている。CamR はホモダイマー型転写因子であり、2 つのインデューサー d-Camphor を負の協同性を持って結合する。現在まで負の協同性には不明な点が多く、これの構造的な基礎を与えることは重要であり、また、Camphor 酸化を行うシトクローム P450cam と CamR の Camphor 認識機構の構造比較も興味深い。そこで本研究では CamR の X 線結晶構造解析を目指し、大腸菌による発現系を用いて、野生型 CamR と MAD 解析用にセレノメチオニン誘導体 CamR を作製した。それぞれの結晶化と X 線データ収集に成功し、現在構造決定のための解析を行っている。更に、オペレーター DNA との複合体の結晶化にも取り組んでいる。

(3) 大腸菌転写活性化因子 PhoB 蛋白質の結晶化：進藤一泰，前仲勝美，岡村英保，白木原康雄，牧野耕三，西村善文

PhoB 蛋白質は、リン酸化による制御を受けるリン酸レギュロン遺伝子群の、正の転写制御因子である。リン酸受容部位は N 末側ドメインに、DNA 結合と転写活性化の機能は C 末側ドメインにある。

PhoB 蛋白質の DNA との相互作用の詳細とリン酸化に依存したドメイン間の相互作用基づく制御機構を解明する目的で、まず PhoB 蛋白質の C 末側ドメインの構造解析と C 末側ドメインと DNA との複合体の構造解析をおこなおうとした。このために MAD 法を採用することとし、野生型蛋白、セレノメチオニン誘導体蛋白の両方について高発現条件の検討、誘導体蛋白の精製について検討した後、結晶化条件を決定した。結晶は以前のリン酸塩を用いた条件では出ず、ポリエチレングリコールを用いた条件で得られ、SPring8 で MAD データを約 3 Å 分解能で収集できた。現在データ解析が進行中である。

(4) 大腸菌ヌクレオイド結合蛋白質の結晶化：白木原康雄，Talukder A. Azam，白鳥綾，石浜 明

大腸菌ゲノム全体を対象とした転写包括制御では、ゲノム DNA に結合し、ヌクレオイド構造形成に関与する DNA 結合蛋白質も一群の遺伝子の転写の活性化や抑制に関与する。Talukder A. Azam と石浜によって精製、同定された 12 種のヌクレオイド結合蛋白質のうち、3 種類のヌクレオイド蛋白質 IciA (Inhibitor of Chromosome Initiation A), Lrp (Leucine-Responsive regulatory Protein) 及び StpA (Suppressor of td-Phenotype A) の結晶化実験を行った。利用できる蛋白量が少ないため、少量向けのグリッドスクリーンを工夫し実験を行った。IciA では硫安溶液から針状微小結晶、Lrp ではリン酸溶液から板状結晶を得た。後者の結晶からは 4 Å 分解能の反射を記録できた。結晶解析に十分な量の標品を使う実験を計画中である。

(5) ショウジョウバエ GAGA 因子の結晶化：前仲勝実，中山貴博，白木原康雄，広瀬 進 *fushi tarazu(ftz)* や *Ultrabithorax* を初めとしてショウジョウバエのいろいろな遺伝子のプロモーター領域には GAGA 因子の結合配列が存在し，GAGA 因子とその結合配列はこれら遺伝子の転写に必須である．519 残基からなる GAGA 因子は溶解度が低いこと，いくつかの機能ドメイン(BTB/POZ ドメイン，DNA 結合ドメイン，Glutamine-rich ドメイン，及び残りのドメイン)からなることから，興味深い機能をもつ断片の大腸菌大量発現系を構築して結晶化を試みる方針を採用した．4つの断片について，大量発現系の構築と精製条件の検討を行っている．

(6) 免疫レセプター群の蛋白質間分子認識解明を目指した X 線結晶構造解析：前仲勝実，前仲太恵子，David Stuart，Yvonne Jones，Anton van der Merwe，Peter Sondermann，白石充典，津本浩平，熊谷 泉，白木原康雄

免疫系細胞に幅広く見られる免疫レセプター抑制性モチーフ(ITIM)を細胞内ドメインにもつヒト抑制性免疫レセプタースーパーファミリー(Inhibitory-receptor superfamily. 以下 IRS と省略する)の多くが Ig 様ドメインを持ち，また多様なリガンドを認識するため，統合的な蛋白質間分子認識データを収集する格好の標的である．我々は IRS の中から，主要組織適合性抗原(MHC)を認識する Killer cell Ig-like receptor(KIR) や Ig-like transcript(ILT)，更には抗体 Fc 部位を認識する Fc γ R についてリガンド分子認識機構の機能解析及び X 線結晶構造解析を行うことを目指した．これまでの KIR の MHC に対する分子認識に関して2つの Ig 様ドメインを細胞外にもつ KIR2D の解析を踏まえ，更に3つの Ig 様ドメインを持つ KIR3D のリガンド MHC，HLA-B51 の結晶構造解析を行った．決定した HLA-B51 の立体構造から，KIR 結合部位と予測される表面の電荷分布が他の KIR メンバーに対するリガンド MHC と異なっており，これが認識の特異性を決定していることが示唆された．また，真核細胞で発現させた活性型及び阻害型の KIR2D の機能解析から活性型が阻害型より弱い親和性を示すことがわかった．おそらく NK 細胞では活性型よりも阻害型のシグナルが強いことで誤った活性化を防いでいることが考えられた．現在同じく MHC を認識する Ig-like transcript4(ILT4)の解析に取り組んでいる．

(7) イオン輸送性 V 型 ATPase の結晶化：保坂俊彰，目黒俊幸，白木原康雄，山登一郎

P 型，F 型，V 型の三タイプのイオン輸送性 ATPase のうち，F 型 ATPase はミトコンドリアなどに存在し，ATP 合成酵素として機能するが，V 型 ATPase は真核細胞内膜系や一部の真核・原核細胞膜に存在し，その内膜内や細胞外の酸性化に重要な役割を果たしている．構造的にも F 型 ATPase に類似しており，7種のサブユニットからなる水溶性頭部と2種のサブユニットからなる膜結合部分を持つ超分子構造体である．しかし，V 型 ATPase の研究は F 型 ATPase より遅れており，その立体構造は未だに明らかにされていない．

山登らは，真性細菌である腸内連鎖球菌に Na⁺輸送性 V 型 ATPase を見出し，大量発現・精製系を確立した．本年度，精製標品を用いて結晶化を行い，触媒頭部部分の結晶

を得た。結晶化の条件は、27%PEG4000, 0.2M LiSO₄, 10mM Tris-HCl, pH7.5, 10% glycerolであった。針状, 棺状, 立方体状, 平板状結晶のうち平板状結晶が高分解能のX線回折像を与えた。結晶格子はC2, 241.6, 141.1, 239.1 Åであった。分解能は2.4 Åである。構造解析が進行中である。

(8)D-アミノアシラーゼの結晶化: Panuwan Chantawannakul, 佐藤晶子, 森口充暲, 白木原康雄

D-アミノアシラーゼはN-アシル-D-アミノ酸をD-アミノ酸と脂肪酸に加水分解する反応を触媒する酵素である。天然に存在しないD-アミノ酸化合物を基質にする酵素の活性中心の構造, 基質結合の様子を知ることが興味深いだけでなく, これらの知見はこの酵素の工業化に役立つと考えている。昨年度は精製標品の純度にばらつきがあったので今年度は注意深く精製した後, グリッドスクリーンとクリスタルスクリーンによる結晶化条件の探索を再度行ったが結晶は今のところ得られていない。平行して行った高塩濃度でも活性を保持するグルタミンナーゼの結晶化実験ではクエン酸溶液から六角柱状の結晶ができることを見出した。予備的な回折実験で単位胞は $a=b=110.5 \text{ \AA}$, $c=210.5 \text{ \AA}$ の六方晶で分解能は3 Åを超えることが示された。

(9)アルギニンデイミナーゼのX線結晶構造解析: 前仲勝美, 三沢 悟, 白木原康雄

Mycoplasma アルギニンデイミナーゼ(AD)は細胞増殖に必須なアミノ酸であるアルギニンシトルリンとアンモニアに加水分解する酵素である。この作用により強い制癌活性を示すことから, 新規な制癌剤として注目されている。そこで我々はADの酵素反応機序を理解するためにADのX線結晶構造解析に取り組んでいる。大腸菌により発現, 巻き戻しをした活性型ADを作成し, 結晶化条件の探索を行った。その結果, 20% PEG6K, 0.2M Ammonium Acetate, pH8の条件下で3Å分解能のデータを収集することができ, また極低温の実験用の結晶の作成にも成功している。現在は構造決定のために必要なこれらの結晶の良好な重原子同型置換体を探索中である。

研究業績

(1)原著論文

1. Samatey, F., Imada, K., Vonderviszt, F., Shirakihara, Y. and Namaba, K.: Crystallization of the F41 fragment of Flagellin and data collection from extremely thin crystals. *Journal of Structural Biology*. **132**, 106-111, 2000.
2. Maenaka, K., Maenaka, T., Tomiyama, H., Takiguchi, M., Stuart, D.I. and Yvonne, J.E.: Nonstandard peptide binding revealed by crystal structures of HLA-B*5101 complexed with HIV immunodominant epitopes. *J. Immunol*. **165**. 3260-3267. 2000.
3. George, F. Gao., Benjamin, E., Willcox, Jessica, R., Wyer., Johnathan, M. Boulter, Christopher, A. O'Callaghan. Katsumi, M., David, I. Stuart., E. Yvonne Jones., Anton, P., van der Merwe. John I. Bell. and Bent K. Jakobsen.: Classical and

nonclassical class I major histocompatibility complex molecules exhibit subtle conformational differences that affect binding to CD8 $\alpha\alpha$. *J Biol Chem.* **275**. 15232-15238, 2000.

(2) その他

1. 白木原康雄: F1-ATPase の $\alpha 3 \beta 3 \gamma$ 複合体構造解析: 結晶化と精製の実際. 生物マシーナリー News Letter. 72-79. No. 3. 2000.

(3) 発表講演

1. 白木原康雄, 鈴木俊治, 白鳥 綾, 白木原千佳子, 吉田賢右: 好熱菌 F1-ATPase $\alpha 3 \beta 3 \gamma \epsilon$ 複合体の結晶化. 日本生物物理学会 38 回年会, 仙台, 10 月.
2. 白木原康雄: F1- の回転触媒機構の理解を目指す結晶解析. 特定領域「シンクロトロン放射光による生物マシーナリーの構造生物学」シンポジウム, 生体超分子複合体の結晶構造解析の最前線, 大阪, 1 月.
3. Katsumi, M., van der Merwe, P.A., Yasuo, S., Stuart, D.I. and Jones, E.Y.: Molecular recognition of human killer Ig-like receptors (KIRs). International Conference on Structural Genomics 2000. Yokohama, November.
4. 前仲勝実, 福司功治, 荒牧弘範, 白木原康雄: camphor 代謝系酵素群オペロンを制御するリプレッサー CamR 蛋白質の結晶化. 日本生物物理学会第 38 回年会, 仙台, 9 月.
5. 前仲勝実, van der Merwe, P.A., 十字猛夫, 前仲太恵子, 白木原康雄, Stuart, D. I., Jones, E. Y.: ヒト killer cell immunoglobulin(Ig)-like receptor の構造と機能. 第 73 回日本生化学会. 横浜, 10 月.
6. 前仲勝実, van der Merwe, P.A., 前仲太恵子, 白木原康雄, Stuart, D. I., Jones, E. Y.: ヒト killer cell immunoglobulin(Ig)-like receptor の分子認識機構. 日本蛋白質学会合同年会, 東京, 5 月.
7. 前仲勝実, 前仲太恵子, 富山宏子, 滝口雅文, Stuart, D. I. and Jones, E. Y.: ヒト MHC クラス I HLA-B*5101 と HIV 由来の免疫優性エピトープペプチドの複合体の X 線結晶構造解析, 第 30 回日本免疫学会総会, 仙台, 11 月.

H-e. 遺伝子回路研究室

核と細胞質は、核膜を介した分子の流通を通して互いにコミュニケーションをもち、それによって細胞の恒常性が維持され、外界の環境に応じて増殖や分化誘導が制御されている。遺伝子回路研究室では、核-細胞質間分子流通の解析を通して、様々な細胞機能研究や生体レベルでの生命機能の解析といった幅広い研究領域に対して、新しい視点と統合的解析の土台を提供したいと考えている。

当研究室は、5月に今本尚子が助教授として着任して研究をスタートさせた。7月に特別共同利用研究員として古田満衣子(大阪大学大学院医学系研究科・大学院生)、10月に総合研究大学院大学遺伝学専攻大学院生として小池牧子が研究室に参加し、11月に小瀬真吾が助手として着任した。

本年度は、国立遺伝学研究所校費、リーダーシップ経費、文部省科学研究費特定領域(B)「生命現象の1分子イメージング」(2)「蛋白質の核-細胞質間輸送の可視化」(代表、今本)、科学研究費基盤研究(B)「蛋白質の核膜通過の分子メカニズム:ATPの作用と分子間相互作用の解析」(代表、今本)の支援を受けた。

近年、核と細胞質の情報交換の重要性が認識され、分子の細胞質から核への輸送機構や、分子の核から細胞質への輸送機構に関する分子レベルの解析が精力的に行われるようになってきた。特に進展が目覚ましいのは、SV40 large T抗原の核局在化シグナルを指標にして同定された輸送担体 importin β と、そのアダプター分子 importin α の発見が一つの大きなきっかけとなって、そのファミリー分子が各々異なる核内外局在化シグナルを認識する輸送担体として機能することが明らかにされてきていることである。出芽酵母では1種類存在する importin α がヒトなどの哺乳類では少なくとも7種類存在する。出芽酵母では14種類の importin β ファミリーが存在することがそのゲノム情報から明らかにされており、多細胞生物ではさらに多くの輸送担体の存在が示唆されているが、その全容把握にはまだまだほど遠いというのが現状である。また、輸送を担う可溶性因子の解析が進む一方で、全ての分子流通の場である核膜孔複合体の機能・構造解析は大きく遅れている。核膜輸送研究分野では、分子の核膜孔通過がどの因子との相互作用に基づいておこり、輸送の方向性がどのように制御され、多くの輸送経路に乗った両方向の通過が核膜孔上で混線することなく流通する仕組みがどのようにしているのかといった問題が大きな研究テーマとなっているが、これを調べるための確立された解析系もなく、はっきりとした研究の方向性も得られていない。新しくスタートさせた研究室では、「流通の場としての核膜孔複合体の機能解析」と「個体内で機能する輸送経路の多様性の問題」に取り組みたいと考え、本年度は以下の研究を行った。

1. 流通の場としての核膜孔複合体の機能解析

(1) 核膜孔通過反応の1分子イメージング: 今本尚子, 徳永万喜洋¹(¹ 生体高分子研究室)

分子量約125MDaの巨大な蛋白質複合体である核膜孔複合体は、脂質よりも蛋白質成分に富む核膜に埋め込まれているため、構造体を壊した状態で核膜孔複合体構成因子を抽出・分離することができて(今本, unpublished results)、機能構造体として単離することは不可能に近い。例えば、生化学的手法によって輸送担体と核膜孔複合体構成因子の結合を調べることができるが、それが機能構造体として assemble した核膜孔複合体構成因子との結合を反映しているのかが疑問である。また、酵母を用いた遺伝学的手法で核膜孔複合体構成因子の解析が勢力的に進められているが、輸送反応を阻害する

変異の影響が直接的なものなのか、あるいは間接的なものなのかを判断するのが困難である。もし、assembleした核膜孔複合体上で通過反応中の個々の因子の動態を直接みることができれば、通過反応に関する多大な情報が得られると考え、生体高分子研究室の徳永万喜洋教授と共同研究をはじめた。

ガラス表面に近いほど高感度観察ができるので、接着の強いMadin-Darby bovine kidney (MDBK)細胞を実験に用いることにした。また、輸送因子やenergy sourceを添加することで、核膜孔複合体への結合や通過反応、或いは核内輸送や核外輸送反応を自由に操作できるセミインタクト細胞を用いたin vitro系での観察をはじめた。本年度はGFP標識した輸送担体importin β とGFP標識したSV40 T抗原のNLSをもつ輸送の基質を用いて観察した。徳永教授の顕微鏡でsingle poreが観察でき、更に、single pore上で輸送担体1分子、輸送基質1分子が観察できた。このイメージング実験から、importin β のassembleした核膜孔への結合定数、1つの核膜孔がimportin β を結合しうるcapacity、importin β が1つの核膜孔を通過する速度といった、ごく基本的な、しかしきわめて重要な定量的情報をはじめて得ることができる。

(2)核外輸送担体と核内輸送担体のリサイクリングに着目した研究：今本尚子、小瀬真吾

importin α/β は、蛋白質を細胞質で認識した後に、核膜孔を通過して核内に移行する。核内に移行したimportin α がCASとよばれる別の輸送担体で核内から細胞質に運搬されるのに対し、importin β は核膜孔複合体と直接相互作用しながら核内から細胞質に戻る(輸送担体のリサイクリング反応)。両方向性の通過反応を調べる目的で、importin α を核内から核外へ輸送するCASをクローニングしてGFPで標識して、その挙動を調べた。

CASとよばれる核外輸送担体は、核内輸送担体importin β と同様に核膜孔複合体と直接相互作用しながら、それ自身が単独で核膜孔を通過する能力をもつ分子である。ところが、GFPで標識したimportin β とCASの細胞内局在をliving cellで観察すると、importin β は細胞質に優位に存在し、CASは核内に優位に存在する(郵政省通信総合研究所、原口徳子・平岡 泰研究グループとの共同研究)。同じファミリーに属するimportin β とCASの細胞内局在の相違に注目し、importin β とCASの挙動をセミインタクト細胞を用いたin vitro輸送系で調べると、importin β は系に加えた細胞質抽出液とATPの両方に依存して核内から核外に移行するのに対し、CASは系に加えた細胞質抽出液とATPの両方に依存して核外から核内に移行することがわかった。このことから、importin α を介した蛋白質の核内輸送を担うimportin β とimportin α の核外輸送を担うCASは、どちらも、それ自身で核膜孔を通過する分子であるにもかかわらず、細胞質性因子とATPによって、輸送の基質を受取るもとのコンパートメントにもどるために(リサイクリング反応)核膜孔を互いに逆方向に通過するように積極的に制御されていることにはじめて気付いた。これらの制御因子を同定し、その作用機序を明らかにすることで、両方向の通過が核膜孔上で混線することなく流通する仕組みの一端がみえてくる

可能性がある。

(3) 輸送担体分子 importin β の核膜孔通過機構の解析: 小瀬真吾, 米田悦啓¹, 今本尚子¹ (大阪大学大学院医学系研究科)

importin β は, この分子内の核膜孔結合領域に依存して, 核-細胞質間をシャトルする分子である。しかし, importin β がどのような分子機構で核膜孔を移行するのか, その通過の方向性を決定する因子は存在するか, といったような問題は未解決のままである。

薬剤処理により ATP を限りなく枯渇させた培養細胞に importin β をインジェクションし, その細胞内局在を観察すると, 核内移行は起こるが核外移行は起こらない。また, インジェクション後, 細胞を氷上で培養した場合でも, importin β の核内移行は起こるが核外移行は起こらない。これらの実験結果は, importin β の核膜孔通過が, 核内移行と核外移行でエネルギー要求性が違う事を示唆している。

この importin β のエネルギー依存的核外移行を *in vitro* 輸送アッセイ系で解析した。界面活性剤ジギトニンで細胞を処理すると, 細胞膜にのみ穴をあけ, 核膜は intact なままの semi-intact 細胞を作ることが出来る。この semi-intact 細胞を利用し, importin β の核外移行活性を解析したところ, その活性はエールリッヒ腹水癌細胞からの細胞抽出液並びに ATP 依存的であることが判った。さらに, 細胞抽出液から ATP アガロースを用いて ATP 結合蛋白質を吸収すると, importin β の核外移行活性が低下した。そこで, ATP 結合蛋白質をさらに分離精製することで, importin β の核外移行活性化因子として構成的に発現している熱ショック蛋白質 hsc70 (70kDa heat shock cognate protein) を同定した。

今後, hsc70 が importin β の核外移行(リサイクリング)や核蛋白質輸送機構にどのように関与しているかを解析していく予定である。

(4) β -カテニンの核膜孔通過に必要なドメインの解析: 小池牧子, 米田悦啓¹, 今本尚子¹ (大阪大学大学院医学系研究科)

β -カテニンは, 個体発生の段階で Wnt/Wg シグナルの存在下で安定化して核に局在することが明らかになるとともに, 発癌との関係でも注目されている分子である。一方, 我々の研究から, β -カテニンは importin β ファミリーと同様に核内に移行する能力を持つことが明らかになった。また, β -カテニンが核内から核外に移行することも明らかにしている。

核膜孔を通過する能力をもつ多くの分子の中で, 通過に必要な十分な領域が同定されているものは importin β を除いて殆どない。importin β で同定した領域を他の importin β ファミリーと比較しても, 一次構造上の相同性がみられず, 核膜孔通過に必要な領域を想定するのは困難である。Importin β 単体の結晶構造を得て(原著論文1), すでに報告されている β -カテニンの結晶構造と立体構造上の類似性を比較すると, 核膜孔通過に必要な十分な importin β の領域が β -カテニンの 9 番目から 12 番目アルマジロリ

ピートと非常によく似ていることがわかった。

β -カテニンが核膜孔複合体構成因子と相互作用し、核膜孔通過に必須のドメインを知る目的で以下の解析を行った。 β -カテニンの様々な欠失変異蛋白質を調整し、HeLa細胞の細胞質にマイクロインジェクションしたところ、10番目から12番目のアルマジロリピートを欠失した変異蛋白質が核へ移行できないことがわかった。一方、この3連アルマジロリピートのみでは核へ移行できず、アルマジロの外のC末端領域も必要である可能性が示唆されてきた。現在、 β -カテニンの核膜孔通過に必要かつ十分な領域をさらに詳細に解析するとともに、この領域が；1) importin β と同様にFGリピート構造をもつ核膜孔複合体構成因子と相互作用するのか、2) β -カテニンの核外輸送反応も担うのかの2点について検討している。さらに、*in vitro*輸送系を用いて、 β -カテニンの核外輸送機構の解析をはじめた。

(5) カルシウムイオンと通過反応、*in vitro*系での解析：今本尚子

カルシウムイオンは脳機能、発生、分化などの様々な生命現象で重要な役割を担うセカンドメッセンジャーとして機能する。セミンタクト細胞を用いた*in vitro*輸送系において、輸送反応に対するカルシウムイオンの影響を調べてみた。カルシウムイオン(μ Mオーダーと推定)を添加すると、SV40T抗原のNLS基質(importin α/β で運搬される)や、M9配列をもつ輸送の基質(transportinで運搬される)の核内輸送効率が極端に減少した。カルシウムイオンを除くと輸送反応が回復するので、カルシウムイオンによる輸送の障害は可逆的であるように思われる。更に検討していくと、カルシウムイオンの影響が、低分子量GTPase Ranなどの可溶性因子を必要としないimportin β 自身や β -カテニンの核内輸送反応に影響を与えることと、系にATPを添加してはじめてカルシウムイオンの影響がみられることがわかった。この結果は、カルシウムイオンがATPの存在に依存して、核膜孔複合体の機能に何らかの影響を及ぼす可能性を示唆している。この現象の生理的意味を知るために、今後、*in vivo*での検証と、通過反応に影響を与えるカルシウム及びATP感受性因子を同定したいと考えている。

2. 個体内で機能する輸送経路の多様性の問題

生物が多様な輸送経路をもつことの生理的意義を考えたとき、生体は核-細胞質間分子輸送という、細胞にとって基本的な機能を担う重要な遺伝子を少しずつ重複させて維持しながら、役割分担させることで、異なる組織や環境におかれた細胞が、多様な状況に対する適応性を高めることを可能にしているのではないかと考えられる。

(1) 70kDa熱ショック蛋白質を指標にした、正常時と熱ショック応答時に機能する輸送経路の同定と輸送機構の比較：古田満衣子，小瀬真吾，今本尚子

熱ショック応答系は、非常に強力な遺伝子制御系を備えていることが知られており、熱ショック応答時は転写をはじめとするゲノム機能が大きく変動する。また、70kDa熱ショック蛋白質(hsc70/hsp70)は正常時においても核内に移行するが、大部分は細胞質

に存在する。熱ショック時に細胞内で最も大量に存在する hsc70/hsp70 は、熱ショックに応答して細胞質から核内に移行し、熱ショックから解除されると核から細胞質に移行する蛋白質として古くから知られているが、その分子機構は明らかにされていない。環境変化の一つの代表的な例として、熱ショック応答をとりあげ、正常時と熱ショック時に機能する輸送経路を hsc70/hsp70 を指標に同定することを目的として、本年度は以下の実験をおこなった。

Hsc70 を大腸菌で発現させ、リコンビナント蛋白質を精製した。タグのないものと GFP タグをつけたものを準備し、GFP タグが hsc70 の挙動に影響を与えないかを内在性 hsc70 の挙動と比較することで確認した。研究室で使っている HeLa 細胞で、内在性 hsc70 の局在を指標に、熱ショック応答を引き起こす最適の温度と処理時間を検討して決めた。リコンビナント hsc70 を HeLa 細胞に injection し、正常時と熱ショック時におけるリコンビナント hsc70 が、内在性 hsc70 と同じ挙動をとるかを調べた。興味深いことに、この実験の過程で、熱ショックをかける前にリコンビナント hsc70 を injection すると、熱ショック応答そのものがかからず、内在性とリコンビナント hsc70 のどちらも核に集積しないが、一旦熱ショックをかけると、正常温度においても injection した hsc70 が内在性 hsc70 と同様に効率よく核内に集積することがわかった。正常時において、リコンビナント hsc70 は内在性 hsc70 と同様にわずかに核内に移行するだけで、その大部分は細胞質に残っている。この正常時と熱ショック時における hsc70 の *in vivo* 輸送解析系から、hsc70 の核内移行が正常時においても熱ショック時においても Ran に依存すること、また hsc70 の核外移行が Leptomycin B で阻害されないことがわかり、hsc70 の核外移行が疎水性アミノ酸を認識する輸送担体 CRM1 に依存しない可能性が高いと考えられる。Hsc70 の核外移行活性が正常時に特に強くないので、正常時と熱ショック時の hsc70 の細胞内局在の違いが、核内輸送反応と核外輸送反応のバランスの違いによるものではないと考えられる(検討中)。

Hsc70 の核内輸送因子を同定するために、*in vivo* 輸送系で得た情報をもとに hsc70 の核内輸送を解析する *in vitro* 輸送系を動かした。In vitro 系において、hsc70 の核内輸送反応は系に加えた細胞質抽出液と ATP に依存し、*in vivo* 輸送系と同様に GTP-Fix 型の Q69LRanGTP で阻害されることが確認できた。さらに、hsc70 の核内輸送は、importin α の importin β 結合領域 (IBB) で阻害されないだけでなく(知られている限りにおいて、importin β で運ばれる基質の核内輸送は IBB で阻害される)、逆に促進される結果を得ており、これまでに明らかにされている輸送経路とは異なる経路で核内に運ばれる可能性が示唆されている。現在、輸送因子の精製・同定にむけて準備中である。

研究業績

(1) 原著論文

1. Lee, S.J.*, Imamoto, N.*, Sakai, H.*, Nakagawa, A., Kose, S., Koike, M.,

- Yamamoto, M., Kumasaka, T., Yoneda, Y. and Tsukihara, T. *equally contributed authors: The adoption of a twisted structure of importin- β is essential for the protein-protein interaction required for nuclear transport. *J. Mol. Biol.*, **302**, 251-264, 2000.
2. Tachibana, T., Hieda, M., Miyamoto, Y., Kose, S., Imamoto, N. and Yoneda, Y.: Recycling of importin α from the nucleus is suppressed by loss of RCC1 function in living mammalian cells. *Cell Struct. Funct.* **25**:115-123, 2000.
 3. Matsubae, M., Kurihara, T., Tachibana, T., Imamoto, N. and Yoneda, Y.: Characterization of the nuclear transport of a novel leucine-rich acidic nuclear protein-like protein. *FEBS Lett.*, **468**, 171-175, 2000.
 4. Haraguchi, T., Koujin, T., Kaneda, T., Tsutumi, C., Imamoto, N., Akazawa, C., Sukegawa, J., Yoneda, Y. and Hiraoka, Y.: Reformation of the functional nuclear envelope during telophase: Temporal sequences determined by fluorescence imaging in living HeLa cells. *J. Cell Sci.*, **113**, 779-794, 2000.
 5. Kurisaki, A., Kose, S., Yoneda, Y., Heldin, C.H. and Moustakas, A.: Transforming growth factor- β induces nuclear import of Smad3 in an importin- β 1 and Ran-dependent manner. *Mol. Biol. Cell*, in press.

(2) その他

1. Imamoto, N.: Diversity in nucleocytoplasmic transport pathways (Review) *Cell Structure and Function*, 2000.
2. 今本尚子: 「核と細胞質の機能分子輸送」蛋白質 核酸 酵素, Vol. **145**, 2369-2377, 共立出版, 2000.
3. 今本尚子: 「核-細胞質間分子輸送-細胞の司令塔をさらに管理するのは?」, バイオサイエンスの新世紀 第2巻 「タンパク質の一生」, 122 - 136, 日本生化学会編, 共立出版, 2000.

(3) 発表講演

1. 今本尚子: 蛋白質の核-細胞質間輸送の可視化. 特定領域(B)「生命現象の1分子イメージング」班会議, 浜松, 8月.
2. Oishi, T., Imamoto, N., Fujii, R., Aratani, S., Ohshima, T., Yoneda, Y., Fukamizu, A. and Nakajima, T.: Hetero dimerization of importin α and β is required for recognition of a nuclear localization signal and mediates nuclear import of RNA helicase A, Cold Spring Harbor Meeting "Dynamic Organization of Nuclear Function", New York, USA, 9月.
3. Nagoshi, E., Ito, A., Imamoto, N., Sekimoto, T. and Yoshihiro, Y.: Analysis of nuclear import mechanism of CaMKIV. Cold Spring Harbor Meeting "Dynamic Organization of Nuclear Function", New York, USA, 9月.

4. 徳永万喜洋, 今本尚子: 細胞質-核間分子輸送の1分子イメージング, 第38回 日本生物物理学会年会, 仙台, 9月.
5. 大石貴之, 今本尚子, 荒谷聡子, 藤井亮爾, 大島隆幸, 米田悦啓, 深水昭吉, 中島利博: RNA helicase Aの核移行シグナルとそのメカニズムの解析, 第73回 日本生化学会大会年会, 横浜, 10月.
6. 名越絵美, 伊東 篤, 今本尚子, 関元敏博, 米田悦啓: CaMKIVの核内輸送機構, 第53回 日本細胞生物学会大会年会, 福岡, 10月.
7. 今本尚子: 核-細胞間機能分子輸送, 第2回「女性科学者によるセミナー」, 大阪 OBI 研, 11月.
8. 今本尚子: 核-細胞質間機能分子輸送: 輸送担体の性質と輸送経路の多様性. 第23回 日本分子生物学会年会 ワークショップ「プロテインフラックス&トラフィック」, 神戸, 12月.
9. 小瀬真吾, 今本尚子, 米田悦啓: 核蛋白質輸送担体 importin β の核膜孔通過における制御機構の解析. 第23回 日本分子生物学会年会, 神戸, 12月.
10. 小池牧子, 横屋史彦, 今本尚子, 米田悦啓: β -cateninの核膜孔通過に必要なドメインの解析. 第23回 日本分子生物学会年会, 神戸, 12月.

I. 生命情報研究センター

当センターは、生命情報科学に関する研究を行うとともに、DDBJ(日本DNAデータバンク)研究事業を担当することを目的に、平成7年4月に設立された。このセンターは、遺伝情報分析研究室(教授1名, 助手2名), 遺伝子機能研究室(教授1名, 助手1名), 大量遺伝情報研究室(教授1名, 助手1名), 分子分類研究室(教授1名, 助手1名)から成り立っている。遺伝情報分析研究室は、五條堀孝教授, 池尾一穂助手, 今西 規助手で構成されている。遺伝子機能研究室は館野義男教授, 深海 薫助手が担当している。大量遺伝情報研究室は西川 建教授, 太田元規助手が担当している。分子分類研究室は菅原秀明教授, 宮崎 智助手が担当している。

DDBJ 研究事業としては、昨年に引き続きDDBJ 独自のデータベース管理システムの開発, 各種二次データベースの開発, 提供や, WWW によるホームページを用いた各種検索システムの開発公開等を行った。このDDBJ 研究事業には、これらの教官以外に浅川紀子, 市川恵子, 市川ひろ美, 梅澤知美, 上田陽子, 江嶋真由美, 岡根谷美英子, 奥田啓子, 勝部有季, 川本たつ子, 五條堀まり子, 佐藤由美子, 島田明美, 杉山順子, 杉山祥子, 鈴木あかね, 鈴木満美, 大藤由紀子, 筒井波留, 柳楽幸子, 成田智子, 橋爪亜紀, 長谷川麻子, 平島美恵子, 堀江元乃, 真島 淳, 丸山瑞穂, 向笠奈緒子, 安田徳一, 山本ゆか, 渡辺昭乃という多くの人々が協力して参画した。

I-a. 遺伝情報分析研究室

当研究室は、五條堀孝教授、池尾一穂助手、今西 規助手により構成され、分子進化学を中心とした遺伝情報の分析を行うとともに、DDBJ 研究事業にも中心的に参画している。当研究室では、峯田克彦、太田欽也の2名が総合研究大学院大学の博士課程2年生として、小倉 淳、中村洋路、花田耕介の3名が博士課程1年生として在籍している。また、遠藤高帆、鈴木善幸、中澤真澄、新村芳人が日本学術振興会特別研究員として、T. Daniel Andrews が日本学術振興会外国人特別研究員として、伊藤 剛が6月までCOE研究員として研究に参加した。岩間久和、内山佳子、小笠原倫大、Jung Shan Hwang、Allison Wyndham は技術補佐員として研究活動を行った。小見山智義は湧永製薬株式会社の受託研究員として研究に協力した。また、岩本智恵、梅原由美、大泉ひろこ、羽原拓哉、水口明美、山口(羽原)香織が研究に協力した。DDBJ だけではなく、当研究室の活動補助を上田陽子、奥田啓子、勝部有季、杉山順子、中森亜紀子、丸山瑞穂、渡辺昭乃が積極的に行った。

(1) ヒト染色体におけるバンド構造とGC含量の変動との相関：新村芳人、五條堀孝

ヒト染色体はギムザ染色法により各染色体ごとに特徴的なバンド構造を示す。バンド構造は、ゲノム内におけるGC含量一定の領域であるアイソコアと対応すると考えられてきた。バンド構造とゲノムの塩基配列との対応を調べることは、塩基配列からクロマチンの機能・構造および進化を知る上で重要である。本研究では、ヒト21・22番染色体の全塩基配列のGC含量を用いて、コンピュータ上でバンド構造を再現した。その結果、Gバンドは、局所的にGC含量が低くなっている領域に対応していることが明らかになった。バンドパターンは、2つの異なる大きさのウインドウ内におけるGC含量の差と強く相関していた。この事実は、細胞分裂間期における染色体のポリマーモデルを自然に説明する。

(2) プラナリア cDNA チップを使った脳特異的遺伝子の探索：中澤真澄、池尾一穂、五條堀孝

我々は脳や神経系の解明に、分子進化的観点から取り組んでいる。脳の遺伝子発現プロフィールの種間比較から高等動物の複雑な集中神経系の特徴が明らかになると考え、その第一段階として最も原始的な脳を有すると言われるプラナリア(*Dugesia japonica*)のESTプロジェクトを開始し、現在までに約9000クローンの配列を決定した。この中からランダムに抽出した約1640遺伝子種を含んだプラナリアcDNAチップの作成に成功した。我々はプラナリアと高等動物の脳が同一起原を持つかどうかを調べるため、プラナリアの脳特異的遺伝子の大規模探索をプラナリアcDNAチップを用いて行なった。方法としては、プラナリアを頭部と体部に2分割し、それぞれから得られたmRNAに由来するcDNAをプラナリアチップ上で競合的にハイブリダイゼーションすることで、頭部により強いシグナルを示す遺伝子を探索した。これらを脳特異的遺伝子候補として、whole

mount in situ hybridization により発現パターンの解析を行なった。

1640 遺伝子のうち体部よりも頭部において強い蛍光強度を示す 205 クローンの中には、他生物種における神経特異的遺伝子に相同な遺伝子が約 20% の割合で含まれることが分かった。これに対して、既存の遺伝子に相同性を示さない未知遺伝子も多く含まれており、これらは脊椎動物においても、未だ見つかっていない新規の脳特異的遺伝子である可能性がある。さらに頭部において強い蛍光強度を示すクローンについて大量に in situ hybridization を行ったら、ほとんどがプラナリアの脳、および神経系に特異的に発現しており、これらの遺伝子がプラナリアの集中神経系に深く関わっていることが示唆された。また、in situ hybridization によるそれぞれの発現パターンの解析から、プラナリアの脳が領域化している可能性が示唆された。本研究の結果は、プラナリアの原始的な集中神経系が、基本的に脊椎動物のような高度に発達した神経系と同じ遺伝子セットによって形成されていること、さらに原始的な脳はすでに領域化が行われることで高次な機能を担っていたことを示唆する。このことは脳の分子進化学的研究が哺乳類等の高度に発達した神経系を理解するのに有用であることを示している。

(3) ヒト subgenomic 領域における SNP プロファイル：小笠原倫大, Silvana Gaudieri¹, 今西 規, 五條堀孝 (The University of Western Australia)

ヒトの SNPs の頻度と分布を考察するために、以前我々は MHC における SNP profile を作成し、HLA 周辺領域の塩基多様性がヒトの他のゲノム領域と比べ最大 80 倍も高くなっていることを示した。SNP profile を他の領域へ拡張し、現在まで 7, X, Y 染色体のゲノム領域において、公共のデータベースから 2 つの異なったハプロタイプを取り出し比較することにより SNPs を検出し SNP profile を作成している。596.62kb を調査し 523 個の SNPs を検出(平均 1141 塩基あたりに SNP 1 個, 0.088%)した。SNPs の頻度は他の研究者の報告より高かった。SNPs の頻度はゲノム領域によりまちまちで、分布は不均等であった。性染色体では常染色体に比べ塩基多様性が著しく低かった。

(4) プラナリア EST 解析による脳の進化過程に関する研究：峯田克彦, 池尾一穂, 五條堀孝

多細胞動物は進化の過程で多様な形態、機能を獲得してきたと考えられているが、その分子レベルにおける進化過程は依然としてよくわかっていない。本研究は、多細胞動物の細胞・組織に注目し、その多様化過程を発生進化学的に解明することを最終的な目的としている。特に、多細胞動物を構成する各要素の中で特に脳に注目し、脳・神経系の形態形成・機能に関与する遺伝子を網羅的に探索することを目的とした。プラナリアは、原始的な脳と考えられる集中神経系を保持していること、またその系統上の位置から、脳・神経系の進化を考察する上で非常によい材料を提供すると考えられる。まず始めに、プラナリア頭部より EST (Expressed sequence Tag) 配列の決定・解析を行い、プラナリアで発現している遺伝子を網羅的に収集した。続いて、得られたクローンから脳・神経系に関与すると考えられる遺伝子の同定を行った。これら脳・神経系に関与す

る遺伝子群に関して、線虫・ショウジョウバエ・マウス・ヒトの配列とプラナリアの配列との保存性を比較した結果、そのほとんどが調べた全ての種に存在していることが明らかとなった。また、一部の遺伝子は線虫やハエで相同な遺伝子を見つけることができなかった。以上の結果は、系統進化の過程で生じた脳・神経系の多様化の結果を示しており、本アプローチから脳・神経系の進化を検証できることを意味している。

(5) 豚繁殖呼吸器障害症候群ウイルス(PRRSV)の分子進化的研究：花田耕介，五條堀孝

豚繁殖呼吸器障害症候群ウイルス(PRRSV)は疫学調査により、1980年中頃にアメリカで発生し、その後ヨーロッパに広がり、アメリカ株とヨーロッパ株に分岐したと考えられている。しかし、この考え方が正しいかどうかや、このウイルスの進化的起源は分かっていなかった。そこで分離年が既知であるこれらのウイルスの塩基配列を用い、PRRSVの中和抗原といわれているORF3、4および5のORF全体および同義置換・非同義置換の進化速度を求め、これらの進化速度からアメリカ株とヨーロッパ株の分岐年代を推定した。その結果、1970年代の中頃にアメリカ株とヨーロッパ株が分岐していることが推定され、ヨーロッパ大陸に蔓延したウイルスが1980年中頃にアメリカで発生したウイルスに由来するという知見を否定し、それより以前に二つの株が既に分岐している可能性を強く示唆する結果となった。さらに、PRRSVの同義置換座位における年当たりの進化速度はインフルエンザウイルスやエイズウイルスより約10倍速い0.104を示し、驚異的な進化速度をもつウイルスであることが明らかとなった。同様に、非同義置換座位における年当たりの進化速度とさきほどのRNAウイルスの進化速度を比較すると、ほぼ同様な進化速度を示すことがわかった。PRRSVの同義置換速度が異常に速い現象は、このウイルスの複製酵素がエラーをおこす確率が極めて高いことによると思われる。しかし、一方で非同義置換速度がほかのRNAウイルスと同様である理由は、ウイルスは環境による自然選択を受けているため、ウイルスの非同義置換速度の限界があるのではないかということが推測された。

(6) マイクロサテライトデータベースの構築と新規多型マーカーの作成：遠藤高帆，五條堀孝

遺伝病の原因遺伝子特定には、通常染色体マーカーを用いた連鎖解析による候補領域の特定を行う。単一の遺伝子に由来する遺伝疾患は遺伝病を有する家系の染色体から少数のマーカーの連鎖解析により特定されるが、多因性の疾患(リウマチやアレルギー、色素性乾皮症、自閉症など)は多くのマーカーを用い、健康者グループとの比較を行う必要がある。これらのマーカーとしては染色体上の多型性を示す領域が用いられる。多型マーカーとして近年注目されているものとしてはSNPsおよびマイクロサテライトがあるが、本研究では東海大学の猪子研究室との共同研究により、SNPsよりも連鎖性の強いマイクロサテライトをマーカーとして用いることとした。現在全染色体を対象にした多型マーカーのデザインを行っている。マイクロサテライト領域の取得はこれまではハイブリダイゼーションによるウェットラボでの取得が行われてきたが、本研究においてはヒトゲノム計画により利用が可能となっているHTG配列からマイクロサテライト領域を取

得ることによってマーカーの効率的な取得を試みている。現在データベース中にはおよそ100万のマイクロサテライト領域が登録されており、このうち多型性を示すと期待される領域を選択してプライマーをデザインし、PCRで増幅することによって多型判定を行っている。データベースに登録されたマイクロサテライト領域はウェブによるアクセスによりマーカーを作成するためのプライマー設計を自動的に行う機能を統合し、これまでに1万以上の多型マーカーを取得した。

(7) 神経伝達にかかわる分子の分子進化：岩間久和，五條堀孝

神経伝達にかかわる分子の分子進化的特徴を調べる目的で、G蛋白共役型受容体であるカテコールアミン受容体とG蛋白 α サブユニットに着目し、それぞれの分子内における領域的な進化速度の比較検討を行った。この結果、カテコールアミン受容体系において、受容体-G蛋白の共役にかかわる分子領域の機能的制約は、リガンド結合にかかわる分子領域の機能的制約より有意に低く、かつ、G蛋白のセカンド・メッセンジャー系へのシグナル伝達にかかわる分子領域の機能的制約と比較しても、有意に低いことが示された。

(8) アポトーシスはプラナリアの再生において積極的な役割を果たしているのか？：Jung Shan Hwang, 五條堀孝

再生とは、傷ついたり失ったりした体の部分を修復したり置き換えたりする現象である。この現象は、ヒドラとプラナリアなどの原始的な生物ではよく見られるが、高等な生物においては限られている。脊椎動物の再生現象は、両生類の四肢や(目の)レンズ、ほ乳類の肝臓や筋肉細胞でしか見られない。このことは、なぜ再生能がいくつかの原始的あるいは限られた生物にしか備わっていないのかという問い、さらには進化の過程で再生能が失われたのだろうかという問いを投げかけるものである。我々は、淡水性のプラナリアを実験材料として用いた。プラナリアは扁形動物門に属し、三胚葉性の左右対称な体を持つ。また、顕著な再生能を有することが知られており、再生能の根底にある分子機構および進化的重要性を研究するためのモデル生物として、プラナリアは適していると言える。例えば、生理的機構の一つとしてアポトーシスがあるが、その中心的役割は細胞の機能と数の正確な発生を制御することであるから、これがプラナリアの再生に関与していることが考えられる。そこで我々は、プラナリアのアポトーシスに焦点を当てて研究を進めている。

現在までに、プラナリアのcDNAライブラリーから5つのカスパーゼホモログが単離され、BLASTによってこれらのホモロジーサーチを行った。その結果、カスパーゼファミリーの中でカスパーゼ3が、単離された全てのクローンと最も高い相同性を示し、カスパーゼ7, 8がそれに続いた。CLUSTAL Xを用いて、アミノ酸配列のアラインメントを行った結果、全てのクローンがカスパーゼの保存配列や非常に短いアミノ末端ドメインを持つことが分かった。さらにこのクローンの一つに対してノーザンブロットング解析を行ったところ、このクローンのmRNAの発現量は再生の間は減少していることが示された。この結果から、おそらくアポトーシスはプラナリアの再生過程において何らかの役

割を果たしていると思われる。今後は、ノーザンブロットングの結果を確認するためにも、また、全身を再生産し傷害を治癒していく過程でアポトーシスのカスケードがどういう役割を果たしているかを決定するためにも、さらに解析をする予定である。

(9) ヒトゲノムにおける塩基組成の違いと遺伝子の局在に関する研究：T. Daniel Andrews, 五條堀孝

我々は、これまでに配列が決定されたヒトゲノムを用いて、遺伝子の位置とその遺伝子が存在するアイソコアの塩基組成を調べることによって遺伝子の分布を解析した。まず、ウィンドウ解析により、約650MBの冗長性の無いヒトゲノム配列を、連続する100kbごとの領域に分割し、塩基組成を計算した。次に、EST配列やcDNA配列を用いてタンパク質コード領域を推定し、それぞれのウィンドウにおけるタンパク質コード領域の密度の変化を求めた。その結果、遺伝子密度とアイソコアの塩基組成は直接的な関係があることがわかった。これまでの研究により、高GC領域では遺伝子密度が高いことが知られている。しかし我々は、遺伝子の分布は均一な状態とはほど遠いことを発見した。ゲノムにおいて最も高ATな領域においては遺伝子数が非常に少ないが、最も遺伝子密度が高いと思われた高GCアイソコアでの遺伝子密度は高AT領域の4倍以下にすぎなかった。我々の研究から、ヒトゲノムの全遺伝子の26%は高GCアイソコアファミリーである12%の領域に存在すると、予測される。これらの結果は、公的なゲノム解読チームの努力とCelera社の貢献によるヒトゲノム配列解析によっても支持される。これらの発見は、温血動物のアイソコア形成過程の研究に強い示唆を与えると考えられる。

(10) 真核生物ゲノムにみられる大規模な重複領域の構造と進化：今西 規, 五條堀孝

ゲノムの進化においては、個々の遺伝子を単位とする重複だけでなく長い染色体領域が重複を起こすことがある。このような大規模な重複を過去に起こした染色体領域(重複領域)を、配列データの解析により探索した。ゲノムの全配列が決定された酵母、線虫、ショウジョウバエについて重複領域を探したところ、それぞれの種で数十組の重複領域がみつかった。したがって、真核生物ゲノムでは大規模な重複領域が一般的に見つかると考えられる。重複領域の分布様式は生物によって異なる。酵母ではそのほとんどが異なる染色体上に位置しており、ゲノムの倍数化が過去に起きたことが示唆された。それに対して線虫やショウジョウバエのゲノムにみられる重複領域は、その多くが同一染色体上の近接した位置にあり、tandem duplicationに類似した機構で重複領域が生じたことが示唆された。また、ショウジョウバエの重複領域は酵母や線虫の場合とは異なり、そのほとんどが非常に古い重複領域であることが重複遺伝子間のdivergenceから推察された。1~2個の遺伝子を単位とする局所的な重複を除けば、比較的最近に生じた重複領域はみつからなかった。このことは、過去数億年にわたって、ショウジョウバエではゲノム領域の重複に対して負の淘汰が働いたことを示唆しているのかもしれない。

(11)DDBJ/CIB ヒトゲノム情報工房におけるヒト染色体配列のアセンブル：今西 規，岡山利次，川西祐一，重元康昌，真島 淳，菅原秀明，宮崎 智，内藤公敏，五條堀孝

ヒト染色体の完全な配列を構築しそれを研究者に提供することを目的として，われわれは国際塩基配列データベースであるDDBJ/EMBL/GenBankに登録されたヒトゲノムの完了配列およびドラフト配列をアセンブル(組み立て)することを試みている．完了した配列およびphase 2のドラフト配列をDDBJから抽出し，その配列の両末端の2kbをRepeatMaskerで処理した後，それをクエリー配列として全ゲノム配列データに対してBLASTによる相同性検索を行った．その結果，もし2本の配列が50塩基以上の長さで重なり，99%以上一致した場合には，それらをコンティグと定義してアセンブルした．以上の処理を自動化し，定期的にデータの更新を行うシステムを構築した．2000年9月の時点では，ヒトの全ゲノムの1割にあたる約300MBのコンティグを作成できているが，この数字は徐々に増加している．本プロジェクトの成果は「DDBJ/CIBヒトゲノム情報工房」のホームページ(<http://studio.nig.ac.jp/>)で公開されている．

研究業績

(1)原著論文

1. Toyoda, R., Sato, S., Ikeo, K., Gojobori, T., Numakunai, T., Goding, C.R. and Yamamoto, H.: Pigment cell-specific expression of the tyrosinase gene in ascidians has a different regulatory mechanism from vertebrates. *GENE* **259**(1-2): 159-170, 2000.
2. Shimizu, N. and Gojobori, T.: How can human and simian immunodeficiency viruses utilize chemokine receptors as their coreceptors? *GENE* **259**(1-2): 199-205, 2000.
3. Ota, K., Kobayashi, T., Ueno, K. and Gojobori, T.: Evolution of heteromorphic sex chromosomes in the order Aulopiformes. *GENE* **259**(1-2): 25-30, 2000.
4. Iwata, A., Kobayashi, T., Ikeo, K., Imanishi, T., Ono, H., Umehara, Y., Hamamatsu, C., Sugiyama, K., Ikeda, Y., Sakamoto, K., Fumihito, A., Ohno, S. and Gojobori, T.: Evolutionary aspects of gobioid fishes based upon a phylogenetic analysis of mitochondrial cytochrome b genes. *GENE* **259**(1-2): 5-15, 2000.
5. Gojobori, T., Ohno, S.: 1928-2000. *GENE* **259**(1-2) 2-3, 2000.
6. Nakane, S., Shirabe, S., Moriuchi, R., Mizokami, A., Furuya, T., Nishiura, Y., Okazaki, S., Nakamura, N., Suzuki, Y., Nakamura, T., Katamine, S. and Gojobori, T.: Comparative molecular analysis of HTLV-I proviral DNA in HTLV-I infected members of a family with a discordant HTLV-I associated myelopathy in monozygotic twins. *Journal of Neuro Virology*. **6**: 275-283, 2000.
7. Gaudieri, S., Dawkins, R.L., Habara, K., Kulski, J.K. and Gojobori, T.: SNP profile within the human major histocompatibility complex reveals an ex-

- treme and interrupted level of nucleotide diversity. *Genome Research*. **10**(10): 1579-1586, 2000.
8. Seki, M., Higashiyama, Y., Mizokami, A., Kadota, J.-I., Moriuchi, R., Kohno, S., Suzuki, Y., Takahashi, K., Gojobori, T. and Katamine, S.: Up-regulation of human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) tax/rex mRNA in infected lung tissues. *Clin Exp Immunol*. **120**: 488-498, 2000.
 9. Suzuki, Y., Yamaguchi-Kabata, Y., and Gojobori, T.: Nucleotide substitution rates of HIV-1. *AIDS Reviews*. **2**(1): 39-47, 2000.
 10. Yamaguchi-Kabata, Y. and Gojobori, T.: Reevaluation of amino acid variability of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein and prediction of new discontinuous epitopes. *J. Virology*. **74**(9): 4335-4350, 2000.
 11. Pineda, D., Gonzalez, J., Callaerts, P., Ikee, K., Gehring, W.J. and Salo, E.: Searching for the prototypic eye genetic network: Sine oculis is essential for eye regeneration in planarians. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **97**(9): 4525-9, 2000.

(2) その他

1. 新井 理, 五條堀孝: 「15 DNA 情報解析」『医学・薬学研究者のためのバイオテクノロジー概論』木村彰方編 医薬ジャーナル社. pp 307-319, 2000.
2. 五條堀孝, 新村芳人: 特集「情報生物学の発展へ向けて」『生物物理誌』日本生物物理学会 Vol. **40**. No. 5 (231号) pp318-319, 2000.
3. 鈴木善幸, 五條堀孝: 「(suggestion) 病原性ウイルスの遺伝子型分類について」. 『治療学』ライフサイエンス出版. Vol. **34**. No. 9 pp 30-31, 2000.
4. 五條堀孝: 「バイオインフォマティクスの展望と将来」『学術月報』日本学術振興会 Vol. **53**. No. 8 通巻 669 pp865-870, 2000.
5. 五條堀孝: 「ウイルスの進化」第9回日本組織適合性学会大会シンポジウム II 「ウイルス感染とHLA」MHC Vol. **7**. No. 1 pp35, 2000.
6. 今西 規, 五條堀孝: 「HLA 多型の生成と分子進化」(特集「ゲノム多様性と機能解析-MHC 多型と疾患感受性」)『Molecular Medicine』中山書店. Vol. **37**. No. 5 pp540-547, 2000.
7. 五條堀孝: 「プラナリアに脳の起源をみる」『科学』岩波書店. Vol. **70**. No. 4 pp239-241, 2000.
8. 五條堀孝: 「情報生物学の時代に向けて-情報の流れとしての生命と進化」『続・ロマンチックな科学者』井川洋二編 羊土社. pp 174-184. (2000).
9. 五條堀孝: 「散歩道: もう一つのY2K問題-生命情報研究の新世紀に向けて-」『学術月報』日本学術振興会. Vol. **53**. No. 1 通巻 662 pp93-94.
10. 五條堀孝, 鈴木善幸: 「(インフルエンザの生態学 3) ウイルスの進化と予測」『治療学』ライフサイエンス出版. Vol. **34**. No. 1 pp22-26, 2000.
11. 斎藤成也, 五條堀孝: 『日本データバンクの「フィールドワーク」』サイアス・朝日

新聞出版局. Vol.5. No.2 pp64-65, 2000.

(3) 発表講演

1. 五條堀孝:「ゲノム・サイエンス」京都大学理学部生物科学特別講義, 京都大学(京都), 1月, 2000.
2. 五條堀孝:「ゲノム情報からみた生物進化」公開シンポジウム『プロテオーム時代の計算情報生物学』, 薬学会館・長井記念ホール(東京), 1月, 2000.
3. 五條堀孝:「生命情報科学の新世紀 - アカデミズムから産業化への橋渡し」富士通(株)Bio@NetLabセンター開設式典, 富士通(株)幕張システムラボラトリー(千葉), 1月, 2000.
4. 五條堀孝:「遺伝的多型と分子進化学」九州大学生体防御医学研究所遺伝学部門平成11年度生命基礎医学群『遺伝学』学生講義(医学部2年生), 九州大学生体防御研究所(福岡), 2月, 2000.
5. 五條堀孝:「ゲノム医療の将来と可能性」パネリスト 朝日新聞主催 医学を志す君たちへ〜「2010年ゲノム医学が医療を変える」, 東京ビックサイト国際会議場(東京), 2月, 2000.
6. 五條堀孝:お茶の水女子大学理学部特別講義1回目, お茶の水女子大学理学部生物学科(東京), 3月, 2000.
7. 五條堀孝:「疾患集団遺伝学」東京医科歯科大学学生講義, 東京医科歯科大学(東京), 3月, 2000.
8. 五條堀孝:お茶の水女子大学理学部特別講義2回目, お茶の水女子大学理学部生物学科(東京), 3月, 2000.
9. 五條堀孝:「バイオインフォマティックスの現状および産業利用における役割と課題について」(社)経済団体連合会・当会産業技術委員会バイオテクノロジー部会, 経団連会館(東京), 3月, 2000.
10. Imanishi, T.: Genomic organization and evolution of duplicated chromosomal regions in eukaryotic genomes. *Evolution 2000*. Tokyo. 3月.
11. Imanishi, T.: Genomic organization and evolution of duplicated chromosomal regions within the nematode and yeast genomes. 日独セミナー「遺伝子の進化史復元の諸方法」, 三島, 3月, 2000.
12. Mineta, K., Gaudieri, S., Nakazawa, M., Ikeo, K., Agata, K. and Gojobori, T.: The evolution of planarian eye from the viewpoint of gene expression profile. International symposium "Evolution 2000", Yoyogi Olympic Center(東京), 3月, 2000.
13. Mineta, K., Gaudieri, S., Nakazawa, M., Ikeo, K., Agata, K. and Gojobori, T.: The evolution of neural network from planarian to human - the approach of gene expression profiling -. The 44th NIBB Conference: EVOLUTION AND DEVELOPMENT - Generality and Diversity of Development in Animals and

- Plants- NIBB(Okazaki), 3月, 2000.
14. Gojobori, T.: "Evolutionary Features of Genomes as Disclosed by Comparative Analysis of Complete Genome Sequences" RECOMB 2000 The 4th Annual International Conference on Computational Molecular Biology. Tokyo Bay Ariake Washington Hotel(東京), 4月, 2000.
 15. Gojobori, T.: "Dynamics of Genes in a Population" "Random Genetic Drift and Natural Selection" "DNA databank of Japan" "Models of nucleotide changes" "Tree-making algorithms and methods"(Perth, Western Australia), 4月, 2000.
 16. Kikuchi, M., Misu, S., Imanishi, T. and Saitou, N.: CAMUS DB: Development of structural database for homology search. Recomb 2000, Tokyo, 4月, 2000.
 17. Gojobori, T.: "A method for detecting positive selection at single amino acid sites and its applications" Neutralism and Selectionism. Stanzone Zoologica Anton Dohrn(Ischia Island, Naples), 5月, 2000.
 18. Gojobori, T.: "Extensive gene arrangement and horizontal gene transfer in bacterial genome evolution" Microbial Variation and Evolution. Stanzone Zoologica Anton Dohrn(Ischia Island, Naples), 5月, 2000.
 19. 五條堀孝: シンポジウム II 「ウイルス感染とHLA」 「ウイルスの進化」 第9回日本組織適合性学会大会, 霧島ロイヤルホテル(鹿児島), 6月, 2000.
 20. Gojobori, T.: "Evolutionary features of prokaryotic and eukaryotic genomes" Mini Symposium, Pennsylvania State University (State College, U.S.A.), 6月, 2000.
 21. 五條堀孝: 「比較ゲノム学からの情報生物学へ」 - 生命システムの多様性と進化の解明に向けて - ゲノム情報科学オープンフォーラム, 理化学研究所本所(埼玉), 6月, 2000.
 22. 五條堀孝: 「21世紀の生命科学を考える - ゲノム研究と情報生物学(バイオインフォマティクス)の現状と展望 -」平成12年度第29回福岡県海外教育事情研究会(福岡有隣会)総会・研究大会, 福岡リーセントホテル(福岡), 8月, 2000.
 23. Gojobori, T.: "Synonymous/nonsynonymous substitution analysis of viral genes" The 6th European Workshop on Virusevolution and Molecular Epidemiology, University of Leuven (Belgium), 9月, 2000.
 24. 今西 規: 「ヒトゲノム内の重複領域の探索と有害突然変異の予測」類人猿を中心とする霊長類ゲノム研究会, 三島, 9月, 2000.
 25. Imanishi, T., Okayama, T., Kawanishi, Y., Shigemoto, Y., Mashima, J., Sugawara, H., Miyazaki, S., Naitou, K. and Gojobori, T.: Sequence assembly of human chromosomes at the DDBJ/CIB Human Genomics Studio. 12th International Genome Sequencing and Analysis Conference, Miami, 9月, 2000.
 26. 峯田克彦, 中澤真澄, 池尾一穂, 阿形清和, 五條堀孝: 遺伝子発現プロファイルから見た多細胞動物の進化, 日本進化学会第2回大会, 東京大学(東京), 10月, 2000.

27. 花田耕介, 鈴木善幸, 五條堀孝: 日本進化学会第2回大会 ポスター発表 題名「PRRSVの分子進化的研究」(東京), 10月, 2000.
28. 花田耕介, 鈴木善幸, 五條堀孝: 第130回日本獣医学会: PRRSVの分子進化的研究, 大阪, 10月, 2000.
29. 五條堀孝: 「ゲノム進化: 解読ゲノムの分析から何がわかったのか? “バクテリアのゲノム進化と水平遺伝子移行”」第73回日本生化学会大会, パシフィコ横浜(横浜), 10月, 2000.
30. 五條堀孝: 「分子進化学から比較ゲノム学への発展」日本人類遺伝学会第45回大会, アクロス福岡(福岡), 10月, 2000.
31. Gojobori, T.: “The cDNA project of planarian brain and its evolutionary implication” Biological Sciences: Challenges for the XXI Century, Continental Hotel-Naples(Italy), 11月, 2000.
32. Ogasawara, M., Gaudieri, S., Imanishi, T. and Gojobori, T.: “SNP profiles of the human subgenomic regions” The third international workshop on advanced genomics.(横浜), 11月, 2000.
33. 峯田克彦, 中澤真澄, 池尾一穂, 阿形清和, 五條堀孝: プラナリアから見た多細胞動物の進化, 日本遺伝学会第72回大会, 京都大学(京都)11月, 2000.
34. 岩間久和, 五條堀孝: Higher evolutionary rates in the contact regions between catecholamine receptors and G proteins, 日本遺伝学会第72回大会, 京都大学(京都)11月, 2000.
35. 今西 規, 五條堀孝: 「真核生物ゲノムにみられる大規模な重複領域の構造と進化」日本遺伝学会第72回大会, 京都大学(京都), 11月, 2000.
36. Wada, Y., Imanishi, T. and Gojobori, T.: Estimating the number of mouse genes and the duplicated regions within the mouse genome. The 14th International Mouse Genome Conference, Narita, 11月.
37. 五條堀孝: シンポジウム SIC「ゲノムからヒト・人間を見る」ゲノムから見たヒトの多様性と進化, 第23回日本分子生物学会年会, 神戸国際会議場(神戸), 12月, 2000.
38. 峯田克彦, 中澤真澄, Cebria Francesc, 池尾一穂, 阿形清和, 五條堀孝: 遺伝子発現プロフィールから生物の進化が見えるか? - プラナリアに注目した多細胞動物の発進進化的研究 -, 第23回日本分子生物学会年会, 神戸ポートピア(神戸), 12月, 2000.
39. 内山佳子, 池尾一穂, 五條堀孝: vsx 遺伝子の分子進化的研究 第23回日本分子生物学会年会(神戸), 12月, 2000.
40. Wada, Y., Imanishi, T., Gojobori, T.: Poster: No.19 “Estimating the number of mouse genes and the duplicated regions within the mouse genome” The 11th Workshop on Genome Informatics: GIW2000 Poster Session, Ebisu Garden Place(東京), 12月, 2000.

41. 今西 規, 山口香織, 五條堀孝:「ショウジョウバエゲノムにみられる大規模な重複領域の分子進化」日本分子生物学会, 神戸, 12月, 2000.

I-b. 大量遺伝情報研究室

当研究室は, タンパク質の立体構造に関するコンピュータ解析, とくに立体構造予測を中心に研究している. 昨年度からはゲノム情報解析にも本格的に取り組み, ゲノム上にコードされたすべてのタンパク質を対象として立体構造予測を中心とした解析を進め, 解析結果は GTOP データベース(<http://spock.genes.nig.ac.jp/~genome/gtop.html>)として公開している. また日本 DNA データバンク (DDBJ) の研究事業に参加するとともに, すべての種類のタンパク質に関する変異体データベース (PMD) の作成を独自に進めている. 研究室メンバーは, 西川 建(教授), 太田元規(助手), 金城 玲(総研大学院生 D3), 川端 猛(学振博士研究員), 福地佐斗志 (JST 受託研究員), 本間桂一 (JST 受託研究員), 伊藤憲子(技術員), 三村公子(研究補佐員), 中山尚子(研究補佐員), 黒丸美奈子(研究補佐員), 山本かよ子(研究補佐員), 阿部多美枝(研究補佐員), 鈴木小夜子(研究補佐員), 成田智子(秘書)からなる. また共同研究として中島広志教授(金沢大学医学部), 磯貝泰弘博士(理化学研究所)をはじめ所内外の方々の協力を得た.

(1) 相同性検索 (PSI-BLAST) 法による T4 ファージ未知タンパク質の構造 / 機能予測: 川端 猛, 有坂文雄¹, 西川 建¹(東京工業大学生命理工学部)

バクテリオファージ T4 の 274 個の全 ORF のうち約半数は機能が判明しているが, 残りの半数は機能未知である. 我々は, 近年開発された新しい相同性検索ツールである PSI-BLAST を用いて, 立体構造データベース (PDB) 中のタンパク質に対する検索を行い, 機能未知タンパク質の立体構造予測を試みた. PSI-BLAST は反復的にデータベースを検索してマルチプルアラインメントを作成するいわゆるプロフィール型配列検索プログラムであり, FASTA/BLAST など従来のペアワイズ型の配列検索法に比べ, 2 ~ 3 倍の遠縁の相同配列まで識別できるといわれている. 上記 T4 ファージ全 ORF に対し PSI-BLAST サーチを行なった結果, FASTA/BLAST など従来法では検出されないが, PSI-BLAST では有意な相同性が検出されたものが 13 個見つかった. これらに関しては既知構造との類似性から立体構造を予測することができた. さらに, 13 個のうちの 3 個については, 次のように機能予測された. vs.1 遺伝子は大腸菌 SLT70 の C 端ドメインとの類似性よりリゾチーム様活性をもつこと, また e.1 遺伝子は大腸菌 mutT との類似性よりピロリン酸加水分解酵素の 1 種と推定されること, rIIA 遺伝子は N 端ドメインが熱ショック性タンパク質 Hsp90 と類似し ATP 結合能をもつことが推定された. 詳細は文献¹および上記 GTOP データベースを参照されたい.

(2) 新しい立体構造比較アルゴリズム Matras の開発: 川端 猛, 西川 建

タンパク質の立体構造を相互に比較し類似性を定量化して示すような自動解析のプロ

グラムはすでにいくつか開発されているが、構造の類似度を与えるスコア関数は直観的または任意に定義されたものばかりで問題が多い。我々は、より客観的かつ妥当な定義として分子進化のマルコフ連鎖モデルに立脚した次のような定義を導入した。2つの立体構造 i と j の類似度は $\log P(j \rightarrow i) / P(i)$ で与える。ただし、 $P(j \rightarrow i)$ は進化の過程で構造 j が構造 i に変化する確率であり、 $P(i)$ は構造 i が偶然に生じる確率である。配列比較における Dayhoff のアミノ酸置換モデルと同様に、確率 $P(j \rightarrow i)$ はマルコフ連鎖モデルに従って算出する。必要なパラメータ値を計算するために、多数の類似した構造ペアを用意し、構造ペア間での構造変異を数え上げ、遷移確率行列を求める。遷移行列のベキ乗により得られる行列は、より長い進化過程の遷移行列を意味する。具体的な構造類似性スコアとして、残基環境スコア、残基間距離スコア、二次構造要素 (SSE) スコアの3種類を用いた。これらのスコアは階層的に使用され、まず第1段階では SSE スコアを用いて構造どうしの粗いアラインメントを行い、その後さらに詳細なスコアを用いてアラインメントを順次改善する。全工程は自動的に処理される。この新しいアルゴリズムを *Matras* と命名した。*Matras* の性能を見るために、立体構造データベース PDB に格納されたすべての立体構造に対して相互比較のテストを行ない、標準的な立体構造分類データベースである SCOP の結果と比較した。SCOP は自動分類ではなく、機能的な類似性など構造以外の知見も加味された分類であり、*Matras* による分類とは一致しない点もあるが、全体としては良好な結果を与えることが判った。*Matras* は他の方法と比べて計算時間もそれほど掛からず、新規に構造決定されたタンパク質が既知構造のどれかと類似するか否か等の判断などの実用にも適していると思われる。詳細は文献²で発表した。

(3) 人工グロビンの設計と合成(その2): 磯貝泰弘¹, 石井杏奈², 太田元規, 西川 建
(¹ 理化学研究所生体物理化学研究室, ² 学習院大学理学部)

前年に引き続き、人工グロビン創製における改良に取り組んだ。設計対象は153残基からなる α ヘリックス型マッコウクジラ・ミオグロビンであり、天然タンパク構造を固定し、3Dプロフィールを再帰的に作成しながら、最適配列を探索した。その後一般的なグラフィックソフトなどを利用し、明らかなぶつかりを解消して合成する配列を決定した。前回、こうして設計された配列 (DG1 と命名) を大腸菌で発現させ、構造の特性を調べたところ、モノマーでコンパクト、 α リッチな球状タンパクで、水中での概形はグロビン様であることがわかったが、アミノ酸側鎖間のパッキングが緩く、立体構造の単一性が実現されていないと思われた。その点を改善するために本研究では、疎水性残基間の相互作用に注意しながら DG1 の配列を見直すことにした。主な変更点は DG1 中のいくつかの Leu, Met をベータ炭素で分岐した側鎖をもつ Ile, Val で置換することであるが、3Dプロフィールを参照しながら、DG2-4 の3種類の配列を設計した。合成の結果、これらの変異体はどれもコンパクトかつ α リッチな形状をもつことが判ったが、変性剤による変性曲線には顕著な差が生じた。天然グロビンのアポ体 (apoMb) をコントロール

として比較すると、人工グロビンはどれも天然グロビンよりも安定で変性しにくいという結果になった。また、人工グロビンのうち、11個のLeuを7個のIleと4個のValに置き換えたDG3はもっとも安定性が低く(天然型に近く)、変性-再生実験における協同性がもっとも強く(天然型に近く)、もっとも分離の良いNMRスペクトルを与えることが判った。以上の結果、疎水性のLeu(またはMet)をベータ炭素分岐の側鎖をもつ同じ疎水性残基(IleまたはVal)で置き換えてやると、側鎖の自由度が減少し安定性は低下するが、構造の単一性(協同性)は増大することが示唆された。詳細は文献3, 4で発表した。

(4) 3D-1D法によって予測されたタンパク質立体構造の物理化学的評価: 金城 玲, 西川 建
タンパク質の立体構造予測はまだ未解決の問題である。天然構造を予測するのは非常に難しいので、通常は正しい「フォールド」を予測することが目標とされる。この場合のフォールドとは側鎖の詳細構造は無視したときの骨格構造の大まかなトポロジーを意味する。正しいフォールドを決定する物理化学的な要因は何かという問題はまだ明確にされていないが、近年では、水和項を加えた分子力場計算により、正しい天然構造をそれ以外の誤まった構造から区別することに成功したとする報告が出はじめている。本研究では物理化学的エネルギー関数を用いて、正しいフォールドと誤ったフォールドを識別する要因は何か、を見つけることを目的とする。まず最初に、標準的な3D-1D法を用いて正しいフォールドと誤ったフォールドを用意する。次にそれぞれのフォールドに基づき全原子モデルを生成し、原子間のぶつかりをなくすようにエネルギー最小化計算を行う。正しいフォールドから出発し上記の操作を実行すると、主鎖構造は天然構造のそれとほぼ同一だが、側鎖パッキングは異なるような構造が得られる。これを準天然構造と呼ぶことにする。X線構造から得られる天然構造、上記の準天然構造、誤ったフォールドに基づく非天然構造という3種類についてエネルギー値を比較すると、予想どおり前2者は非天然構造よりもエネルギー的に低くなる。さらに前2者を比較すると、天然構造は準天然構造よりも低く、両者のエネルギー差は大きい。エネルギーを個別のエネルギー項に分けて詳細に見ると、疎水相互作用や溶媒による電氣的遮蔽およびボルン・エネルギーなどの溶媒効果は、正しいフォールド(前2者)と誤ったフォールドの間で大きな差があること、一方、天然構造と準天然構造との間の大きなエネルギー差は主に側鎖パッキング・エネルギーによりもたらされることが判明した。詳細は文献7で発表した。

研究業績

(1) 原著論文

1. Kawabata, T., Arisaka, F. and Nishikawa, K.: Structural/functional assignment of bacteriophage T4 unknown proteins by iterative database searches. GENE, **259**, 223-233, 2000.
2. Kawabata, T. and Nishikawa, K.: Protein structure comparison using the

Markov transition matrix of evolution. *PROTEINS*, **41**, 108-122, 2000.

3. Isogai, Y., Ishii, A., Fujisawa, T., Ota, M. and Nishikawa, K.: Redesign of artificial globins: Effects of residue replacements at hydrophobic sites on the structural properties. *Biochemistry*, **39**, 5683-5690, 2000.
4. Isogai, Y., Ishii, A., Ishida, M., Mukai, M., Ota, M., Nishikawa, K. and Iizuka, T.: Structural and functional properties of designed globins. *Proc. Indian Acad. Sci. (Chem. Sci.)* **112**, 215-221, 2000.
5. Nakashima, H. and Nishikawa, K.: The genomic DNA sequences of various species are distinctively distributed in nucleotide composition space. *Res. Comm. In Biochem. Cell & Mol. Biol.*, **4**, 25-45, 2000.
6. Yusuf Ali, M., Khan, M. L. A., Shakir, M. A., Fukami-Kobayashi, K., Nishikawa, K., and Siddiqui, S. S.: Expression and cDNA cloning of klp-12 gene encoding an ortholog of the chicken chromokinesin. mediating chromosome segregation in *C. elegans.*, *J, Biochem. Mol. Biol.*, **33**, 138-146, 2000.
7. Kinjo, A. R., Kidera, A., Nakamura, H. and Nishikawa, K.: Physico-chemical evaluation of protein folds predicted by threading. *Eur. Biophys. J.*, in press.

(2) その他

1. 川端 猛, 西川 建: タンパク質構造予測コンテスト CASP3. *生物物理 Vol. 40*, pp. 52-56, 2000.
2. 西川 建: ゲノム情報からの立体構造予測. *生物物理 Vol. 40*, pp. 307-30, 2000.
3. 西川 建: 構造ゲノム学と立体構造予測. 「生物の働きを生み出すタンパク質のかたち」(「大学と科学」組織委員会編, クバプロ) pp. 43-56, 2000.
4. 松尾 洋, 西川 建: タンパク質の配列解析と構造予測. *廣川有機薬科学実験講座 第1巻(廣川書店)* pp. 92-109, 2000.
5. 太田元規: 複雑系の事典—適応複雑系のキーワード150—. (複雑系の事典編集委員会編, 朝倉書店), 分担執筆, 2001.

(3) 発表講演

1. 西川 建: ゲノム情報からタンパク質の立体構造へ. 科研費基盤研究(C)「プロテオーム時代の計算構造生物学」公開シンポジウム, 東京, 1月.
2. 西川 建: ゲノムの機能構造予測—情報解析の展望. 日本学術会議公開講演会「ゲノム科学の課題と統合的研究推進のための共同体制」, 東京, 2月.
3. 西川 建: 配列空間の“島モデル”再考. 京都大学基礎物理学研究所「物性研究」セミナー, 京都, 3月.
4. 磯貝泰弘, 太田元規, 石井杏奈, 藤沢哲郎, 西川 建: 球状タンパク質のデノボデザイン. 蛋白合同年会東京2000, 東京, 6月.
5. 西川 建, 川端 猛, 福地佐斗志, 石井崇洋, 太田元規: 遺伝子機能同定を目指し

- たゲノムサーチ. 高次ゲノム研究会, 三島, 7月.
6. Fukuchi, S. and Nishikawa, K.: Distinctive distributions of thermophilic / mesophilic bacterial proteins in the amino acid composition space (Poster presentation). The 14th Symposium of the Protein Society. San Diego. August. 2000.
 7. Nishikawa, K.: Nucleotide composition in bacterial Genomes. APAN'2000. Beijing. August. 2000.
 8. 磯貝泰弘, 太田元規, 西川 建: DNA結合タンパク質 CR0 モチーフのデノボ設計と合成. 第38回日本生物物理学会年会, 東北大学, 9月.
 9. 中島広志, 山下紗代, 西川 建: 2種マイコプラズマに見られるゲノム塩基組成の変異の方向性. 第38回日本生物物理学会年会, 東北大学, 9月.
 10. 金城 玲, 西川 建: 3D-ID法によって予測されたタンパク質立体構造の物理化学的評価. 第38回日本生物物理学会年会, 東北大学, 9月.
 11. 川端 猛, 福地佐斗志, 石井崇洋, 太田元規, 伊藤武彦, 落合孝正, 市吉伸行, 西川 建: 全ゲノム立体構造予測データベース GTOP. 第38回日本生物物理学会年会, 東北大学, 9月.
 12. 福地佐斗志, 西川 建: 好熱菌タンパク質の分子表面におけるアミノ酸組成の特徴. 第38回日本生物物理学会年会, 東北大学, 9月.
 13. 太田元規: ゲノムの design ability. コンピューテーショナルゲノミクス勉強会, 東北大学, 9月.
 14. Nishikawa, K.: Protein structure prediction from genome sequence information. The 12-th Nagoya Conference. Okazaki. October. 2000.
 15. 西川 建: 立体構造予測の10年史. 生物物理バイオインフォマティクス講習会, 東京農工大学, 11月.
 16. 西川 建: ゲノム情報からのタンパク質の立体構造/機能予測. 第23回日本分子生物学会シンポジウム, 神戸, 12月.
 17. 西村昭子, 藤島博史, 川端 猛, 西川 建, 笹沼明美, 小林恭子: 大腸菌の細胞分裂の時期決定機構. 第23回日本分子生物学会(ポスター発表), 神戸, 12月.
 18. 藤島博史, 川端 猛, 西川 建, 松澤 洋, 西村昭子: 大腸菌 *fts* YEX operon の機能解析. 第23回日本分子生物学会(ポスター発表), 神戸, 12月.
 19. 深海 薫, 館野義男, 西川 建: ペリプラズム結合タンパク質の立体構造の系統進化. 第23回日本分子生物学会(ポスター発表), 神戸, 12月.
 20. 山川武廣, 池上 徹, 加藤潤一, 川端 猛, 西川 建, 森 浩禎, 西村昭子, 山崎由紀子: 統合型大腸菌データベース PEC の拡張. 第23回日本分子生物学会(ポスター発表), 神戸, 12月.
 21. 鈴木健司, 山川武廣, 小笠原直毅, 加藤潤一, 西川 建, 山崎由紀子: 微生物ゲノムの情報学的解析. 第23回日本分子生物学会(ポスター発表), 神戸, 12月.

I-c. 遺伝子機能研究室

当研究室は、遺伝子ならびにタンパク質の機能を主に進化や構造の視点から解析・解明することを目的としている。

当研究室では、東海大学医学部とフジヤバイオサイエンス研究所との共同研究により、HLAクラスIゲノム領域の進化を調べている。HLAクラスIには主にA, B, Cの遺伝子座があるが、BとC遺伝子座は複製されたゲノム断片に存在していることが分かっている。私達は、複製断片のそれぞれに起原を同じくする数個の不完全なLINE配列が存在することを発見し、これらのLINE配列を解析することにより、BとC遺伝子座の進化起原を推定した。また、これらの遺伝子座には非常に多くの対立遺伝子があることが知られているが、これらの遺伝子の起原を探ると、その一部の遺伝子がヒトとチンパンジーの共通祖先から由来したという示唆に辿りつく。つまり、J. Kleinの提唱した種間多様性を支持する結果を得たことになる。1つのゲノム断片に中立的な配列と典型的な正の自然選択を受けている遺伝子が共存するのも面白い例だと思われる。

また当研究室では大量遺伝情報研究室と協同でペリプラズム結合タンパク質(PLBP)の進化を調べている。ペリプラズム結合タンパク質(PLBP)は、ATP-binding cassette (ABC)タンパク質が関与する輸送システムにおいて、輸送物質との結合を行なう一群のタンパク質である。立体構造の違いにより、3つのタイプに大別出来る。PLBPの系統樹と立体構造の比較結果をもとに、どのようにこの3つのタイプが出現したかを解析した。バクテリアのリプレッサーにはPLBPと相同な構造を持つものがある。全ゲノム配列が決定されている生物種でこれらリプレッサーとPLBPの系統関係を解析した結果、リプレッサー・PLBP各々で並行して基質特異性が獲得されたことが分かった。

さらにフロリダ大との共同研究で、タンパク質の進化の過程でアミノ酸の補償的な置換がどのように起こるかを、祖先配列を推定して調べた。

これらの他に、日本DNAデータバンクの活動、特に国内のゲノムプロジェクトチームなど大規模な配列決定を行なっている研究グループと緊密な協力関係を持つことにより、国内で決定された大量の塩基配列情報のデータベースへの登録・公開を行なった。

研究業績

(1) 原著論文

1. Tateno, Y., Miyazaki, S., Ota, M., Sugawara, H. and Gojobori, T.: DNA Data Bank of Japan in collaboration with mass sequencing teams. *Nucleic Acids Res* **28**, 2000.
2. Miyazaki, S., Hashimoto, H., Shimada, A., Tateno, Y. and Sugawara, H.: A new file format and tools for the large-scale data submission to DNA Data Bank of Japan (DDBJ). In *Currents in Computational Molecular Biology*. pp 60 - 61,

- Miyano, S., R. Shamir and Takagi, T. ed. Universal Academy Press. Tokyo, 2000.
3. Abola, E.E., Bairoch, A., Baker, W.C., Beck, S., Benson, D.A., Berman, H., Cameron, G., Cantor, C., Doubet, S., Hubbard, T.J.P., Jones, T.A., Kleywegt, G.J., Kolaskar, A.S., Kuik. Van. A., Lesk, A.M., Mews, H.-W., Neuhaus, D., Pfeiffer, F., TenEyck, L.F., Simpson, R.J., Stosser, G., Sussman, J.L., Tateno, Y., Tsugita, H., Ulrich, E.L. and Viegant, J.F.G. : Quality control in data banks for molecular biology. *BioEssays* **22**: 1024-1034, 2000.
 4. Yusuf, Ali, M., Khan, M. L. A., Shakir, M. A., Fukami-Kobayashi, K., Nishikawa, K. and Siddiqui, S. S. : Expression and cDNA cloning of klp-12 gene encoding an ortholog of the chichen chromokinesin. mediating chromosome segregation in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biochem. Mol. Biol.* **33** : 138-146, 2000.

(2) その他

1. 館野義男, 菅原秀明, 五條堀孝 : 日本 DNA データバンク (DDBJ) とゲノム医学, 現代医療 **32**: 89-96, 2000.

(3) 発表講演

1. 館野義男: Bioinformatic activity of the DNA Data Bank of Japan and Bioinformatic analysis of a HLA region, Interactive Meet on Genomics Research in the New Millennium, デリー, インド, 2月, 2000.
2. 館野義男: Neutral and selective aspects of a HLA I genome sequence region, The First Anton Dohrn Workshop, ナポリ, イタリア, 5月, 2000.
3. 館野義男: DDBJ activity on microarray database Ontologies and Database, The Second International Meeting on Microarray Data Standards, ハイデルバーク, ドイツ, 5月, 2000.
4. 館野義男: Genomic evolution of a HLA I region, Heinrich Heine Universitat Dusseldorf, デュッセルドルフ, ドイツ, 5月, 2000.
5. Fukami-Kobayashi, K., Tateno, Y. and Nishikawa, K.: A change of three-dimensional structure in periplasmic binding proteins in their evolutionary history. *SMBE 2000*. New Heaven, June, 2000.
6. 館野義男: DNA Data Bank of Japan for the study of evolutionary analysis of a HLA genomic region, 2000 Shanghai Symposium on Bioinformatics and Genomics, 上海, 中国, 7月, 2000.
7. 深海 薫, 館野義男, 西川 建: ペリプラズム結合タンパク質の立体構造の系統進化, 第2回日本進化学会, 東京, 10月.
8. 深海 薫, 館野義男, 西川 建: ペリプラズム結合タンパク質の立体構造の系統進化, 第23回日本分子生物学会第23回年会, 神戸, 12月.

I-d. 分子分類研究室

当研究室は、生物を対象とするデータベース、データ解析および統合システムの研究開発を行っている。特に、日本DNAデータバンク(DDBJ)運用の中核をなす情報処理システムの研究開発を担当している。また、1997年に理化学研究所から引き継いだWFCC-MIRCEN World Data Centre for Microorganisms(WDCM)の研究事業も行っている。当研究室における情報システムの研究開発にあたっては、互いに独立な機能を自由に組み合わせることによって生命情報研究における多彩な課題に答えられるモジュール構造を目指している。また研究室内のプロトタイプで終わらずに日常的な実務に耐える情報システムの構築を目指している。研究事業は菅原秀明と宮崎 智が遂行し、研究成果公開などのためのWeb ページを藤澤由美が作成し、杉山祥子が研究室事務を補佐した。

(1)DDBJ 研究事業：菅原秀明、宮崎 智(研究業績(3)-8, 9 参照)

a. 登録データ処理システムの強化

DDBJ は数年来ゲノムプロジェクトから生まれる大量データ処理システムの強化に務めてきた。国際塩基配列データベースに登録済みであった全データに匹敵する規模のヒトゲノムドラフトシーケンシングの成果の登録についても、国内のシーケンシンググループならびに米国NCBI および欧州EMBLの協力ならびに大量データ処理システムの先行開発によって対処することができた。

さらに、集中的に大量登録されたデータに対して、特に生物学的意味(アノテーション)について、大規模な更新が予想されることから、データ登録後の査定・公開までも視野に入れたデータの流れ全体を全面的に見直しを始めた(TSUNAMI プロジェクト)。

b. Genome Information Broker(GIB)の拡張 (研究業績(1)-1参照)

大腸菌ゲノムデータの登録を契機として、DDBJではそれまでのエントリー単位のデータベースと検索システムの他に、ゲノム単位の検索と解析が可能なシステム開発に着手した。GIBである。その後、ゲノム配列とアノテーションが公開され次第データをGIBに登録してきている。現在は、個別の菌株および横断的にキーワード検索とBLAST検索および検索結果のグラフィカル表示を公開している(<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>のゲノム解析のメニューから選択可能)。今後、独自のデータ解析を加えた結果を公開していく予定である。

また、データ解析の他に、多様な情報源からの大量のデータを効率的に処理するための基本システムの改良も進めている。このシステムではXMLを活用している。クライアントでユーザからの入力にしたがって問い合わせXMLを作成し、それがサーバに送られる。サーバでは送られてきた問い合わせXMLを解析し、検索を実行する。検索が終了するとサーバは結果XMLを作成し、クライアントに送信する。クライアントは結果XMLを受け取りHTMLに変換し表示する。

なお、微生物ゲノム配列が毎月のように公表されてきたが、それらは迅速にGIBに

組み込んでいる。

c. XML の応用 (研究業績(1)-1 参照)

データの相互利用性を高めると期待されている XML を GIB に加えて DDBJ 検索にも適用を試みた。これまではいわゆる FLAT FILE format (FF format) で扱われることが多かった種々の検索結果を XML 形式で利用可能になる。したがって、1000 万件、10 億塩基対を超えた DDBJ/EMBL/GenBank データベースから研究目的に応じて抽出した部分集合を、プライベートデータベースに自動的に取り組むことも可能になる。

(2) WDCM 研究事業：菅原秀明，宮崎 智

a. WDCM 事業(研究業績(2)-1 と(3)-4 参照)

分子分類研究室は WFCC-MIRCEN World Data Centre for Microorganisms(WDCM) の研究事業も担当している。WFCC は World Federation for Culture Collection を意味し、微生物、培養細胞、クローンなどを系統保存提供する機関の連盟であり、WDCM はそのデータセンターである。WDCM は 60 カ国 500 機関の国際ディレクトリーおよび維持されている微生物、培養細胞およびウイルスの統合リストを編集し、オンラインデータベース CCINFO および STRAIN として <http://wdcm.nig.ac.jp/> から公開している。

WFCC のデータセンターとして必須のデータベース CCINFO と STRAIN に加えて、微生物資源センターおよび微生物学への情報技術の活用を図っている。例えば、国内でもまだ事例がほとんどなかった時期に WWW サーバーを公開し、また、インターネット上に分散したデータベースを並列検索可能とした Agent for Hunting Microbial Information in Internet(AHMMI) も類似システムに先駆けて公開した。

b. 生物分類同定ワークベンチ InforBIO の研究開発(研究業績(3)-2, 5, 7 参照)

生物多様性研究の基盤の構築に資するため、遺伝情報、形質情報および所在情報で構成される菌株情報への自在なアクセス機能と、研究目的に応じた解析機能を有するワークベンチを、情報システムにおける様々な標準化の動向を踏まえながら、国際的に多様な系統保存が為されている培養生物をモデルとして試作を進めている。

InforBIO の開発にあたって、パブリックドメインで入手可能なコンピュータ言語、ツールおよびデータベース管理システムに基づいたオープンシステムを目指して、XML、パブリックドメインの CORBA 化ツールならびにパブリックドメインのリレーショナルデータベース管理システムを使用している。今年度末には、試作システムを CD-ROM で配布する予定である。

(3) 生物資源、生物資源情報などに関する調査研究協力：菅原秀明

a. 特許関連配列データの扱いについて

DDBJ は Japan Patent Office(JPO) から特許手続き上公開された塩基配列とアミノ酸配列を受領し、EMBL および GenBank とデータ交換することによって広く一般に公開している。そのために、JPO とデータ受け入れのために随時打合せを行ってきた。

今年度はデータ受け入れに加えてバイオインダストリー協会の委嘱を受けて、USTPO お

よびEPOにおける特許配列データの取扱いに関する訪問調査に協力した。その調査において注目すべき点は、USTPOもEPOも特許審査に必要な配列検索のアウトソーシングを検討中あるいは実施中であったことである。DDBJ/EMBL/GenBankのデータベースは直近の1年で2.7倍に増大したが、このように指数関数的に増加するデータベースをUSTPOならびにEPOの庁内で維持していくことに関して疑問が発生してきたためである。EPOはすでに、審査のためのキーワード検索と同源性検索を専用回線を介して、EMBLのサーバーで行っている。

b. 生物資源センター(Biological Resources Centres (BRC)) (研究業績(4)-3, 6 参照)

日本提案に基づいて、OECDのWorking Party for Biotechnology (WPB)において、生物資源センターのあり方が検討されている。具体的議論は、WPBに1999年に設けられたTask Force(議長 菅原)において進められてきたが、2000年末にTask Forceとしての報告書「Biological Resource Centres: Underpinning the future of life sciences and biotechnology」がまとめられ、WPB(2月16日)での承認を待っている。この報告書の結論は、Establish national BRCs, Develop an international accreditation system for BRCs, Create international linkages among BRCs, Enhance international co-ordination and harmonization of standards, rules and regulations for BRCsならびにEstablish a global BRC networkをOECD加盟諸国およびその他の国にも呼びかける形になっている。

c. Global Biodiversity Information Facility (GBIF)

GBIFは、米国の提案によって、OECDのMega-science Forumに設けられたBiological Informaticsのグループにおける3年間の議論から生まれた構想であるが、1999年9月からOECDの手を離れて独立のInterim Steering Committee (ISC)において、設立に向けて各国の間で議論と調整が行われてきた。その結果、2000年12月にコペンハーゲンで開催された第4回ISC会合で、設立に向けて各国の間の合意文書(MOU)などの文書がほぼ確定し2001年には国際公募によってGBIF事務局が決定し具体化に向かうことになった。分子分類研究室はMega-science Forumの時点からGBIFの議論に参加しており、WDCMとの関連からもDDBJの観点からも、GBIFに積極的に関与していくことが期待される。なお、参照URLは(<http://www.gbif.org/>)。

研究業績

(1) 原著論文

1. Miyazaki, S. and Sugawara, H.: Development of DDBJ-XML and Its Application to a Database of cDNA, Genome Informatics 2000, Universal Academy Press, Inc (Tokyo), 380-381, 2000.

(2) その他

1. 菅原秀明：微生物資源センターとデータ活動，ライフサイエンスのための系統保存とデータバンク(中辻憲夫編)，130-135，共立出版株式会社，東京，2000年。
2. 森 浩禎，菅原秀明，内山郁夫：大腸菌ゲノム，ライフサイエンスのための系統保存とデータバンク(中辻憲夫編)，118-124，共立出版株式会社，東京，2000年。

(3) 発表講演

1. 天野 誠，江崎孝行，河村好章，菅原秀明：DNAチップを用いた細菌同定法の開発，日本微生物資源学会第7回大会，仙台，2000年6月8日。
2. 菅原秀明，宮崎 智：微生物情報ネットワークの技術的課題，日本微生物資源学会第7回大会，仙台，2000年6月8日。
3. 菅原秀明：OECDによる新時代型生物資源センター(BRC)の考え方，生物資源ワークショップ，東京，2000年6月14日。
4. Miyazaki, S. and Sugawara, H.: WFCC World Data Centre for Microorganisms (WDCM): Its activities and the utilization of information technology for culture collections and microbiology. The 9th International Congress for Culture Collections, July 22-27, 2000, Brisbane.
5. Sugawara, H. and Miyazaki, S.: Linking microbial genetic resources in culture collections with nucleic acid sequences, The 9th International Congress for Culture Collections, July 22-27, 2000, Brisbane.
6. Salomon, W., Doyle, A. and Sugawara, H.: OECD Task Force on strategy for the long-term development and sustainability of Biological Resource Centres, The 9th International Congress for Culture Collections, July 22-27, 2000, Brisbane.
7. Sugawara, H.: Bioinformatics, Management and Operation of Culture Collections Training Course of the 9th International Congress for Culture Collections, July 29-30, 2000, Brisbane.
8. Sugawara, H.: Roles and Value of Public Databases in the time of Genomics and its Industrialization, Proceedings of BIO JAPAN 2000, 83-86, Sep. 27, 2000, Tokyo.
9. 宮崎 智，菅原秀明，五條堀孝：ゲノム情報学，最新医学，56(1)，64-71，2000。

J. 放射線・アイソトープセンター

「放射線アイソトープセンター」は，昨年，助手・藤田昌也が海外留学中に，助教授・定家義人が転出し，一時的に教官不在の状態となった。センター長・石浜 明教授(分子遺伝研究系兼任)が中心となり，技官・谷田勝教(放射線取扱主任者)，技官・原登美雄が協力して管理運営に当たった。本年度教官選考が進み，空席となっていた助教授に，本年11月に仁木宏典が熊本大学分子発生医学研究所から転任し，正常な状態に復帰した。

アイソトープ使用施設は、今年も所内の研究需要に応じて正常に管理運営され、放射線照射施設も頻度は低いが所内外の需要に応えた。

センター長・石浜 明は、分子遺伝研究部門での研究を統括すると共に、当センターでは、技官・谷田勝教の協力を得て、大腸菌転写因子の研究を行った。

(1)大腸菌転写因子とRNAポリメラーゼの相互作用：谷田勝教、石浜 明(遺伝研・放射線アイソトープセンター)

細菌の遺伝子発現には、恒常的に発現している遺伝子を除いて、遺伝子あるいは遺伝子群特異的な転写因子を必要とする。多くの転写因子は、RNAポリメラーゼと直接接触してその機能を制御することで支配下遺伝子の昂進または抑制を行う。大腸菌では転写因子100-150種類がRNAポリメラーゼと直接接触し、その機能に影響を与えると推定されている。これら転写因子群は、接触相手のRNAポリメラーゼのサブユニット α 、 σ 、 β 、 β' に応じて、クラス1、2、3、4の4群に分類されている(Ishihana, 2000)。最近、クラス1及びクラス2の転写因子群については、 α 及び σ サブユニット上での接点の分析が進んでいる。多数の転写因子、特に β 及び β' サブユニットと相互作用するクラス3及びクラス4転写因子について、RNAポリメラーゼ上の接点のマッピングを行う目的で、多数の大腸菌転写因子の大量発現と純化を行った。大腸菌蛋白でありながら時に大量発現が困難な転写因子があったので、各種の大腸菌株を準備して、発現を許容する宿主を選択する操作を挿入することで、これまでに転写因子26種類の発現精製に成功した。既に分子遺伝研究部門で純化されていたものを含めて50種類を超える大腸菌転写因子をもつこととなった。これら転写因子コレクションを用いて、RNAポリメラーゼ上の接点を同定すると同時に、抗体を調製し、各種培養条件で転写因子の細胞内濃度を測定する計画である。

K. 実験圃場

実験圃場は、植物関連研究および保存配布事業のための材料の栽培・管理を行い、これに必要な圃場、水田、温室の保守管理に携わる任務およびこれに必要な研究活動の任務を負っている。また系統保存事業に必要な業務や野生イネを中心とした植物実験システムの維持管理を行っている。実験圃場長は系統生物研究センター助教授・倉田のりが兼任し、野々村賢一助手および芦川祐毅、永口 貢、宮林登志江の各技官が運営に当たった。また本年度より鈴木 温と三好一丸の2名が生研機構派遣研究員として研究に参加している。各スタッフは上記業務管理に当たると共に、植物遺伝研究室の研究グループに加わり、植物資源としての新たな研究素材の開発、利用の研究に取り組んでいる。本年度の研究は、(1)文部科学省より科学研究費奨励研究(A)「イネの機能的動原体領域の単離と構造解析」(野々村)、および(2)生物系特定産業技術研究推進機構より新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業「穀類細胞への新たな遺伝子導入法の開発」(野々村)の支援

を受けた。植物遺伝研究室とのグループ研究の内容については植物遺伝の報告を参照されたい。

主に野生イネ種子について約151系統の更新増殖と900系統の配布を宮林技官が行った。圃場、水田、温室の利用に関しても、例年と同様幾つかの大学の研究者により共同研究への利用がなされた。

研究業績

(1) 原著論文

1. Nonomura, K.I. and Kurata, N.: The centromere composition of multiple repetitive sequences on rice chromosome 5. *Chromosoma*, in press.

(2) 発表講演

1. Nonomura, K.I. and Kurata, N.: Centromere structure with multiple repetitive sequences of rice chromosome 5. *Plant & Animal Genome VIII*, San Diego, USA, January.
2. 野々村賢一, 倉田のり: イネ第5染色体の構造解析: BAC クローンの整列化, 日本育種学会第97回講演会, つくば, 4月.
3. 野々村賢一, 倉田のり: イネ第5染色体の動原体領域の構造解析, イネ遺伝学・分子生物学2000, 京都, 6月.
4. 野々村賢一, 倉田のり: イネ第5染色体の動原体領域の構造解析, 染色体学会第51回大会, 横浜, 10月.
5. 鈴木 温, 田中一郎: 高等植物の減数分裂における動原体の構造と機能, 染色体学会第51回大会, 横浜, 10月.
6. Nonomura, K.I. and Kurata, N.: Centromere structure of rice chromosome 5. The 4th International Rice Genetics Symposium, Los Banos, Philippines, October.
7. Kurata, N., Suzuki, T., Nonomura, K.I.: Rice centromere structure with repetitive sequences and construction of rice artificial chromosome (RACs). International Workshop on Integration of Biodiversity and Genome Technology for Crop Improvement, Tsukuba, Japan, November.
8. 野々村賢一, 倉田のり: イネ第5染色体の動原体領域における繰り返し配列の構成, 第23回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月.

L. 技術課

1984年4月12日に国立大学共同利用機関への改組・転換に伴いこれまで各研究室に分散所属していた研究補助員は研究所全体として業務の効率化・待遇改善を目的として技術課が組織され現在に至っている。

技術課の組織は課長及び動物班、植物・微生物班、機器班の3班からなり、それぞれは第一技術係と第二技術係で構成されている。各技官の配属先は次の通りである。課長石井百合子は集団遺伝研究部門、動物班長境雅子は発生遺伝研究部門、第一技術係谷口美佐子係員は無脊椎動物遺伝研究室、古海弘康係員は人類遺伝研究部門、第二技術係陣内寅佳・水品洋一係員は共に哺乳動物遺伝研究室に配属されている。植物・微生物班長原登美雄は放射線・アイソトープセンター、第一技術係永口貢係長と宮林登志江係員は実験圃場に、三浦明日香係員は育種遺伝研究部門、第二技術係村松佐知子係員は微生物遺伝研究部門、坂季美子係員は原核生物遺伝研究室に配属されている。機器班長谷田勝教は放射線・アイソトープセンター、第一技術係長芦川祐毅は実験圃場、芦川東三夫係員は環境整備のため会計課管財係の業務を行っている。第二技術係大石あかね係員は構造制御研究室に配属されている。各技官はそれぞれの配属先で研究を支援している。

所内での技術課の主な活動は次の通りである。毎月1回のミーティング(全員参加；第三水曜日午後4時30分から)では教授会議や各種委員会の報告、研究会・研修の報告、各技官の業務内容紹介や所外機関での研究会の予行演習及びその他の話し合いなどを行い、課長・班長・係長出席の上、ミーティングでの協議事項の打ち合わせや各種意見の取りまとめ等を行っている。自由参加の勉強会(隔週火曜日午後5時30分から)では「Recombinant DNA」の輪読、課長との個人面接(平成12年は1回)等を行っている。

平成12年の所外活動としては「第11回生物学技術研究会」(基礎生物学研究所主催)が2月24日(木)～25日(金)の2日間、岡崎コンファレンスセンターで開かれ全国から約70名の技官が参加した。この生物学技術研究会には毎年数名が必ず参加・発表している。本年は5名の技官が参加した。口頭発表9題とポスター発表46題が提出され、村松佐知子技官が「出芽酵母の突然変異導入」の演題で口頭発表し、大石あかね技官が「線虫 *C. elegans* における走化性と温度走性のアッセイ」の題目でポスター発表を行った。谷口美佐子・坂季美子並びに三浦明日香各技官は発表に対する活発な質問や技術面での意見交換を行った。

「平成12年度東海・北陸地区国立学校教室系技術職員合同研修(生物コース)」が7月26日(水)～28日(金)の3日間、岡崎国立共同研究機構(主催)で開かれ、約30名の技官が参加した。今回の合同研修に初めての参加である水品洋一・谷口美佐子及び村松佐知子技官の3名が参加し、26日～27日の午前中にかけては「服務」に関する講義や基礎生物学研究所教官の講義を4題受講した。27日午後からは参加者全員が4班に分かれ谷口美佐子技官は第2班「ゲノムDNAの多型をみる」、村松佐知子技官は第3班「培養細胞を

用いたタンパク質の局在観察」を、水品洋一技官は第4班「mRNA発現の局在観察」の実験・実習でそれぞれ技術的な面を研修すると共に懇親会では活発な意見交換を行った。参加した技官3名は受講後の感想と要望を技術課ミーティングで発表した。

技術課組織の運営及び研究支援体制のより一層の充実のために、今後も生物学技術研究会をはじめ合同研修や講習会その他の集会等に積極的に参加すると共に、将来の法人化の可能性をにらんで、より効果的な研究支援体制を構築すべく検討中である。

IV. 海外における活動

氏名	内容	渡航先	期間
宮崎 智	Pacific Symposium on Biocomputingに参加し欧米における生物学データベース構築と利用の実態調査	アメリカ合衆国	12. 1. 4～ 12. 1.11
山崎由紀子	「Plant & Animal Genome」にてイネデータベースの発表	アメリカ合衆国	12. 1. 8～ 12. 1.14
広海 健	Pew Scholars Program Reunion 参加 U. C. SF で研究打ち合わせ	アメリカ合衆国	12. 1. 8～ 12. 1.14
野々村賢一	「Plant & Animal Genome」研究成果発表及び「Agriculture Microbes」において情報収集	アメリカ合衆国	12. 1. 8～ 12. 1.16
藤山秋佐夫	ヒトゲノムシーケンシング戦略会議出席及び米国エネルギー省ゲノム研究所にて研究打ち合わせ	アメリカ合衆国	12. 1.11～ 12. 1.15
菅原 秀明	「The sixth International Strategy meeting on Human Genome Sequencing」に出席しデータベースの調査研究	アメリカ合衆国	12. 1.11～ 12. 1.15
菅原 秀明	OECD/WPB 等に出席、調査研究 「微生物情報資源情報システム」に関する	フランス	12. 1.19～ 12. 1.28
五條堀 孝	魚類の系統進化に関する打ち合わせ	アメリカ合衆国	12. 1.22～ 12. 1.24
館野 義男	海洋動物学研究所において遺伝子の自然史学的研究の成果及び打ち合わせ	イタリア	12. 2. 5～ 12. 2.11
斎藤 成也	血液型遺伝子の進化、分子進化、類人猿ゲノムに関する共同研究	フランス オランダ ドイツ	12. 2. 9～ 12. 2.18

氏名	内容	渡航先	期間
石浜 明	ローンゲノム会議に出席及び日豪共同研究打ち合わせ	オーストラリア	12. 2.10～ 12. 2.21
武田 洋幸	ニューヨーク大学での講演及び研究打ち合わせ	アメリカ合衆国	12. 2.13～ 12. 2.18
小出 剛	Mus 類に関する博物館標本調査と画像資料等の収集	連 合 王 国 オ ラ ン ダ	12. 2.13～ 12. 2.27
館野 義男	インドレリーの生化学技術センターで開催される国際シンポジウムに出席・講演	イ ン ド	12. 2.21～ 12. 2.26
上村陽一郎	英国王立がん研究基金研究所における研究打ち合わせ	連 合 王 国	12. 2.21～ 12. 3. 3
石浜 明	遺伝学研究資料に関する調査研究	ド イ ツ 連 合 王 国	12. 3. 9～ 12. 3.16
斎藤 成也	Great Apes: phenotypes and Genotypes に出席・発表	アメリカ合衆国	12. 3.18～ 12. 3.24
上田 均	ショウジョウバエ研究会議に出席・発表	アメリカ合衆国	12. 3.21～ 12. 3.28
後藤 聡	ショウジョウバエ会議において分子機構のイメージングに関する研究発表	アメリカ合衆国	12. 3.22～ 12. 3.28
広海 健	ショウジョウバエ研究会議に出席・発表 日欧科学協力セミナーに出席	アメリカ合衆国 ス イ ス	12. 3.22～ 12. 4. 5
宮崎 智	微生物資源データベース及び解析ソフトの現状調査	アメリカ合衆国	12. 3.24～ 12. 3.26
岡部 正隆	ショウジョウバエ神経系に関する共同研究	ス イ ス	12. 3.25～ 12. 4. 2
五條堀 孝	Mouse Microarrays & Informatics に参加	連 合 王 国	12. 3.27～ 12. 3.31

氏名	内容	渡航先	期間
平田たつみ	日本スイス共同セミナー参加	ス イ ス	12. 3. 29 ~ 12. 4. 5
小原 雄治	線虫ゲノムデータベースに関する共同研究打ち合わせ	フ ラ ン ス	12. 4. 11 ~ 12. 4. 17
佐々木裕之	シンポジウム「DNAメチル化の生物学的重要性」に出席し資料収集及び情報交換	ド イ ツ	12. 4. 12 ~ 12. 4. 18
池尾 一穂	Scientific Retreatに参加及び講演	オーストラリア	12. 4. 12 ~ 12. 4. 19
斎藤 成也	第69回AAPA年會に出席・発表、テキサス大学にて研究打ち合わせ	アメリカ合衆国	12. 4. 13 ~ 12. 4. 18
五條堀 孝	Scientific Retreatに参加及び講演	オーストラリア	12. 4. 15 ~ 12. 4. 19
川上 厚志	「ゼブラフィッシュの発生と遺伝」における研究発表及び打ち合わせ	アメリカ合衆国	12. 4. 24 ~ 12. 4. 30
武田 洋幸	「ゼブラフィッシュの発生と遺伝」における研究発表及び打ち合わせ	アメリカ合衆国	12. 4. 25 ~ 12. 5. 4
斎藤 成也	ナポリ臨海実験所と国際研究集會に出席	イ タ リ ア	12. 5. 2 ~ 12. 5. 8
池村 淑道	ナポリ臨海実験所と国際研究集會に出席	イ タ リ ア	12. 5. 2 ~ 12. 5. 9
舘野 義男	海洋動物学研究所にて開催されるアントンドン学術會議に出席し講演	イ タ リ ア	12. 5. 3 ~ 12. 5. 8
五條堀 孝	The First and The Second Anton Dohrn workshopで講演	イ タ リ ア	12. 5. 3 ~ 12. 5. 14
菅原 秀明	ヒトゲノム国際戦略會議におけるシークエンシングプロジェクトの情報収集	アメリカ合衆国	12. 5. 9 ~ 12. 5. 20

氏名	内容	渡航先	期間
藤山秋佐夫	ゲノムシーケンシングバイオロジー会議に出席し研究発表	アメリカ合衆国	12. 5. 10～ 12. 5. 15
宮崎 智	国際塩基配列データバンク実務者会議に出席し、生物多様性に関する情報システムの情報収集	アメリカ合衆国	12. 5. 15～ 12. 5. 20
館野 義男	国際実務者会議に出席	アメリカ合衆国	12. 5. 15～ 12. 5. 20
小川 智子	遺伝的組換えに関するワークショップで講演及びキュリー研究所にて情報交換	フランス	12. 5. 19～ 12. 5. 28
館野 義男	マイクロアレイデータベース会議に出席し意見交換	ドイツ	12. 5. 24～ 12. 5. 31
池尾 一穂	DKFZ and EMBLでの会議に出席及びフランスがん研究所にてデータベースの研究調査	ドイツ フランス	12. 5. 24～ 12. 6. 1
平田たつみ	Molecular and Cellular Neurobiology において研究発表	中国	12. 6. 4～ 12. 6. 8
斎藤 成也	生命情報データベースの利用実態調査	ドイツ フランス アメリカ スペイン	12. 6. 6～ 12. 6. 28
山崎由紀子	ヨーロッパのマウス系統データバンクの視察及び情報収集	イギリス イタリア ドイツ	12. 6. 7～ 12. 6. 16
小林 薫	エール大学での SMBE2000 にて情報収集及びコロンビア大学等にて研究連絡	アメリカ合衆国	12. 6. 15～ 12. 6. 26
広海 健	第12回国際ワークショップで研究発表及びチェコ昆虫研究所等で研究打ち合わせ	ギリシャ チェコ ドイツ	12. 6. 15～ 12. 6. 28

氏名	内容	渡航先	期間
伊藤 幸博	第6回国際植物分子生物学会にて研究成果発表	カナダ	12. 6.16～ 12. 6.25
林 茂生	EMBO ワークショップに出席及び研究発表	ギリシャ ドイツ	12. 6.17～ 12. 6.28
倉田 のり	第6回国際植物分子生物学会にて研究発表	カナダ	12. 6.17～ 12. 6.28
石浜 明	国際会議での講演及びモントリオール大学等での研究打ち合わせ	カナダ アメリカ合衆国	12. 6.20～ 12. 7. 4
五條堀 孝	コロンビア大学等にてデータベースの利用状況調査	アメリカ合衆国	12. 6.21～ 12. 6.26
後藤 聡	アリゾナ州立大学等にて研究打ち合わせ及びフレッドアッチンソン	アメリカ合衆国	12. 6.22～ 12. 7. 3
石原 健	ウエストコーストC.elegans学会で発表及びカリフォルニア大学等にて研究連絡	アメリカ合衆国	12. 6.23～ 12. 7. 2
菅原 秀明	The Bioinformatics Industrialization Workshop Bioinformatics comes of age 等にて情報交換	アメリカ合衆国	12. 6.25～ 12. 7. 1
館野 義男	上海ゲノム情報生物学シンポジウムに出席講演	中国	12. 7. 1～ 12. 7. 6
五條堀 孝	コロンビア大学にて研究打ち合わせ及びデータベース利用状況調査	アメリカ合衆国	12. 7.11～ 12. 7.14
清水 裕	細胞マトリックス形態形成の細胞活性化の共同研究に関する事務連絡	アメリカ合衆国	12. 7.22～ 12. 7.29
菅原 秀明	第9回カルチャーコレクション会議出席	オーストラリア	12. 7.22～ 12. 7.31

氏名	内容	渡航先	期間
宮崎 智	第9回国際カルチャーコレクション会議 出席	オーストラリア	12. 7. 23～ 12. 7. 29
前仲 勝実	オックスフォード大学等にて共同研究打 ち合わせ	連 合 王 国 ス ペ イ ン	12. 7. 31～ 12. 8. 31
西川 健	第14回タンパク質学会シンポジウムに てポスター発表	アメリカ合衆国	12. 8. 4～ 12. 8. 10
石浜 明	コールドスプリングハーバー研究会議で 発表及び共同研究打ち合わせ	アメリカ合衆国	12. 8. 21～ 12. 8. 31
嶋本 伸雄	サハ核科学研究所シンポジウムにて講演	イ ン ド	12. 8. 31～ 12. 9. 10
五條堀 孝	Six European Workshop on Virus Evolution and Moleculer Epidemi- ologyにて講演	ベルギー	12. 9. 8～ 12. 9. 11
館野 義男	「総合ゲノム改正ソフト構築」ワーク ショップに出席	アメリカ合衆国	12. 9. 9～ 12. 9. 14
今西 規	12th International Genome Sequenc- ing and Analysis Conferenceに出席 発表	アメリカ合衆国	12. 9. 12～ 12. 9. 17
石浜 明	フランス生物物理学会シンポジウムにて 出席講演及び研究打ち合わせ	フ ラ ン ス	12. 9. 12～ 12. 9. 19
菅原 秀明	第8回ヒトゲノムシーケンシス国際戦略 会議に出席及び情報収集	フ ラ ン ス	12. 9. 13～ 12. 9. 17
今本 尚子	Dynamics Oraganization of Naclear Function学会にて学術的な情報収集及 びコールドスプリングハーバー研究所に て研究打ち合わせ	アメリカ合衆国	12. 9. 15～ 12. 9. 20

氏名	内容	渡航先	期間
荒木 弘之	ミラノ大学にてDNA複製研究について討 論及び研究会にて発表	イタリ ア イギ リス ドイ ツ	12. 9. 20～ 12. 10. 1
後藤 聡	日米先端科学技術シンポジウムに出席	アメリカ合衆国	12. 9. 21～ 12. 9. 26
菅原 秀明	第3回GBIF臨時運営委員会に出席し情 報収集	アメリカ合衆国	12. 9. 22～ 12. 9. 26
武田 洋幸	「国際分化細胞生物学会2000」に参加及 び研究発表	オーストラリア	12. 9. 22～ 12. 9. 30
林 茂生	中央研究院分子生物研究所でのセミナー	台 湾	12. 9. 25～ 12. 9. 27
菅原 秀明	OECDバイオテクノロジーに参加	フ ラ ンス	12. 10. 1～ 12. 10. 7
佐渡 敬	「生殖細胞ミーティング」に出席・発表	アメリカ合衆国	12. 10. 5～ 12. 10. 12
深川 竜郎	EMBO Workshopに出席・研究発表	ド イ ツ	12. 10. 12～ 12. 10. 20
山崎由紀子	マウス系統データベースの情報収集	アメリカ合衆国	12. 10. 12～ 12. 10. 21
菅原 秀明	科学技術データ委員会に出席及びデータ 収集	イ タ リ ア	12. 10. 14～ 12. 10. 23
小原 雄治	4Th Asia-Pacific conference on Human Genetics に出席発表	中 国	12. 10. 19～ 12. 10. 21
武田 洋幸	「体節形成に関するシンポジウム」に出席	フ ラ ンス	12. 10. 21～ 12. 10. 26

氏名	内容	渡航先	期間
相賀裕美子	「体節形成に関するシンポジウム」に出席・発表	フランス	12.10.21～ 12.10.26
倉田 のり	第4回国際イネシンポジウムにて研究発表	フィリピン	12.10.22～ 12.10.29
斎藤 成也	Human Origin & Diseaseにて研究発表 他	アメリカ合衆国	12.10.22～ 12.10.30
嶋本 伸雄	アジア転写会議における講演及び打ち合わせ	中国	12.10.22～ 12.11. 2
石浜 明	共同研究打ち合わせ	中国	12.10.23～ 12.10.27
野々村賢一	第4回国際イネシンポジウムにて研究発表	フィリピン	12.10.23～ 12.10.28
広瀬 進	第6回アジア転写会議に出席	中国	12.10.23～ 12.10.31
藤山秋佐夫	Human Origins 会議に出席	アメリカ合衆国	12.10.25～ 12.10.30
池尾 一穂	データベース構築に関する研究調査	ドイツ	12.10.27～ 12.11. 3
五條堀 孝	ナポリ臨海実験所にて遺伝子発現データの 研究調査	イタリア	12.11. 7～ 12.11.13
池尾 一穂	ヨーロッパにおけるデータベース調査	イタリア	12.11. 8～ 12.11.13
小川 智子	NAS シンポジウム出席及び打ち合わせ	アメリカ合衆国	12.11. 8～ 12.11.17
菅原 秀明	特許配列データ処理システムに関する調査	アメリカ合衆国 イギリス他	12.11.22～ 12.12. 5

氏名	内容	渡航先	期間
斎藤 成也	マックスプランク研究所等にて研究連絡	ドイツ フランス	12.12.10～ 12.12.17
館野 義男	ゲノムデータベースに関する意見交換	アメリカ合衆国	12.12.14～ 12.12.17
五條堀 孝	ゲノムデータベースの調査研究	アメリカ合衆国	12.12.14～ 12.12.17
石浜 明	細菌における環境応答の転写制御機構の研究	インド	12.12.27～ 13.1.4

V. ほかの機関における講義

氏名	機関名	期間	担当科目
廣海 健	東京工業大学大学院 生命理工学研究科	12. 4. 1 ~ 12. 9. 30	生命情報特別講義第二
池村 淑道	山形大学工学部	12. 4. 1 ~ 13. 3. 31	情報工学特論
池村 淑道	大阪府立大学農学部	12. 4. 1 ~ 12. 9. 30	応用生命化学特別講義 第二
城石 俊彦	大阪市立大学医学部	12. 2. 16 ~ 12. 2. 16	遺伝子制御
城石 俊彦	筑波大学大学院 医学研究科	12. 6. 1 ~ 13. 3. 31	医学セミナーⅠ
城石 俊彦	お茶の水女子大学理学部	12. 11. 1 ~ 13. 3. 31	生物学特別講義Ⅷ
小原 雄治	お茶の水女子大学大学院 人間文化研究科	12. 3. 16 ~ 12. 3. 31	分子進化学
徳永 万喜洋	静岡大学教育学部	12. 2. 1 ~ 12. 2. 29	物理学概論Ⅲ
嶋本 伸雄	名古屋大学大学院 理学研究科	12. 4. 1 ~ 13. 3. 31	生命理学特別講義17
桂 勲	信州大学理学部	12. 4. 1 ~ 13. 3. 31	生物学特論Ⅰ
桂 勲	京都大学医学部	12. 4. 1 ~ 13. 3. 31	C 発生学・遺伝学
五條堀 孝	九州大学医学部	12. 4. 1 ~ 13. 3. 31	遺伝学
館野 義男	東京医科歯科大学医学部	12. 6. 1 ~ 13. 3. 31	臨床遺伝学
山尾 文明	筑波大学大学院 医学研究科	12. 6. 1 ~ 13. 3. 31	医学セミナーⅡ
齋藤 成也	東京大学理学部	12. 4. 1 ~ 12. 9. 30	分子進化学
齋藤 成也	山形大学医学部	12. 4. 10 ~ 13. 3. 31	法医学
齋藤 成也	埼玉大学理学部	12. 10. 1 ~ 13. 3. 31	遺伝子操作・応用分子 遺伝学
倉田 のり	広島大学大学院 工学研究科	12. 4. 1 ~ 13. 3. 31	工業化学特別講義Ⅶ
前仲 勝実	東北大学大学院 工学研究科	12. 1. 19 ~ 12. 3. 31	分子生物化学
服田 昌之	新潟大学理学部	12. 4. 1 ~ 13. 3. 31	生物学特論Ⅳ

VI. 共同研究事業

1. 共同研究 A

- (1) 大腸菌の増殖曲線における相移行のメカニズムの解明
前田理久(明治大学農学部)
- (2) 生物医科学情報のインターネット統合技術に関する共同研究
金子周司(京都大学大学院薬学研究科)
- (3) 出芽酵母の細胞周期関連遺伝子の解析
河野享子(京都薬科大学薬学部)
- (4) ショウジョウバエ複眼発生における新規 Pc-G 遺伝子 401C の機能解析
松本耕三(徳島大学医学部附属動物実験施設)
- (5) カイウミヒドラの幼生変態の制御機構の研究
勝倉由樹(石巻専修大学理工学部)
- (6) ヒドラの形態形成と細胞分化に関連するペプチド性シグナル分子の作用メカニズム
小泉 修(福岡女子大学)
- (7) 動物門を超えたヒドラ同族体ペプチドの探索と機能解析
松島 治(広島大学理学部)
- (8) 多細胞動物の産卵・卵成熟制御-刺胞動物・棘皮動物の生殖巣刺激物質(GSSとMIS)の構造-
白井浩子(岡山大学理学部付属臨海実験所)
- (9) GSBP(G-stretch結合因子)の機能解析
赤坂甲治(広島大学理学部)
- (10) 扁平上皮癌組織特異的転写因子の同定継続
濱田雄行(愛媛大学医学部附属病院)
- (11) アミラーゼ重複遺伝子間の機能分化の解析
猪股伸幸(九州大学理学部)
- (12) DNAにおける一次構造と高次の折り畳み構造の相関に関する研究
吉川研一(京都大学大学院理学研究科)
- (13) GC含量の異なるヒト染色体領域における突然変異スペクトラム
高橋規郎((財)放射線影響研究所遺伝学部遺伝生化学研究室)
- (14) 脊索動物初期進化におけるゲノム重複とその後の遺伝子機能分化に関する解析
植田信太郎(東京大学大学院理学系研究科)
- (15) 高頻度に標的組換えを起こすニワトリBリンパ細胞株を用いたゲノム構造の維持機構の解析
武田俊一(京都大学大学院医学研究科)

- (16) 先天的疾患および腫瘍における DNA メチル基転酵素遺伝子の解析
久保田健夫(信州大学医学部)
- (17) ヒト X 染色体上 HPRT 領域に検出される X 線誘発欠失変異の解析
小平美江子((財)放射線影響研究所遺伝学部遺伝生化学研究室)
- (18) マウス肺腫瘍発生関連遺伝子群の同定
宮下信泉(香川医科大学)
- (19) マウスにおける組換え機構の分子遺伝学的解析
米川博通((財)東京都臨床医学総合研究所)
- (20) マウス歯胚発育におけるホメオボックス遺伝子の役割について
朝田芳信(日本大学松戸歯学部)
- (21) 多因子疾患感受性遺伝子の機能解析のためのスピードコンジェニックマウス作製法の確立
若菜茂晴(理化学研究所ゲノム科学総合研究センター)
- (22) イネ 5S rRNA 遺伝子の解析: スペーサー領域の多様性の獲得機構に関する研究
大坪久子(東京大学分子細胞生物学研究所)
- (23) トランスポゾン RiceMutator による新たな遺伝子破壊系ベクターの開発
石川隆二(弘前大学農学生命科学部)
- (24) イネの発生を制御する分子機構の解明
平野博之(東京大学大学院農学生命科学研究科)
- (25) 大腸菌の細胞分裂に関与する遺伝子群の解析
松澤 洋(青森大学工学部)
- (26) 大腸菌 SpoT 蛋白質のドメイン構造とそれが細胞分裂に及ぼす影響
池原健二(奈良女子大学理学部)
- (27) 線虫 NSP/RTN ホモログの研究
豊田哲也(久留米大学医学部)
- (28) 「ヒト腸管由来の *Lactobacillus gasseri* JCM1031 株における 2 種のフォスフォ- β -ガラクトシダーゼの構造遺伝子からの分子系統解析」
斉藤忠夫(東北大学大学院農学研究科)
- (29) 画像を含む生物情報データベースの構造化手法に関する研究
北上 始(広島市立大学情報科学部)
- (30) RNA ポリメラーゼによる DNA 転写の 1 分子実時間イメージング
原田慶恵(慶応義塾大学理工学部)
- (31) ナノマシーニングによる染色体 DNA の分子操作
鷲津正夫(京都大学大学院工学研究科)
- (32) L-ドーパ耐性線虫変異株の分子遺伝学的解析
五嶋良郎(横浜市立大学医学部)

- (33) クロマチン機能の制御に関する因子の線虫における機能解析
永田恭介(東京工業大学生命理工学部)
- (34) D-アミノアシラーゼのX線結晶解析
森口充暲(大分大学工学部)
- (35) 生体膜に存在するタンパク質性超分子構造体の構造解析
山登一郎(東京理科大学基礎工学部)
- (36) 原索動物マボヤにおける脳内感覚器色素細胞発生機構の系統解析
山本博章(東北大学大学院理学研究科)
- (37) 生命現象の最小遺伝子分析とシミュレーション
田中 博(東京医科歯科大学難治疾患研究所)
- (38) 無症候性キャリア, 活動性肝炎, 抗ウイルス療法施行時における肝炎ウイルスの変異速度の変化
熊田博光(虎の門病院消化器科)
- (39) クリグドメイン構造を持つ遺伝子群の分子進化と細胞外マトリックス蛋白質との相互作用の研究
高橋 敬(島根医科大学)
- (40) 膠原病・リウマチ性疾患における責任遺伝子の解析
橋本博史(順天堂大学膠原病内科)
- (41) ゲノムにおける重複ユニットの検索ならびにゲノム進化のメカニズムの解明
椎名 隆(東海大学医学部)
- (42) 核酸のコンフォメーションと塩基配列との相関
菊地武司(倉敷芸術科学大学産業科学技術学部)
- (43) ゲノム構造比較のための巨視的な類似性指標の細菌ゲノムへの適用
堀本勝久(佐賀医科大学医学部)
- (44) データベース解析とエネルギー計算による蛋白質の基質認識機構の解明
斉藤 稔(弘前大学理工学部)
- (45) 微生物の環境適応の分子機構
前田広人(鹿児島大学水産学部)
- (46) 大腸菌静止期の代謝調節に果たすポリアミンの役割
五十嵐一衛(千葉大学薬学部)
- (47) 「pox-neuro」遺伝子を指標にしたショウジョウバエ性行動制御の遺伝解析
木村賢一(北海道教育大学教育学部岩見沢校)
- (48) 核内酵素複合体によるクロマチンを介した転写の活性化機構の解明
中島利博(筑波大学応用生物化学系)
- (49) 真核細胞におけるクロマチンレベルでの遺伝子発現制御
半田 宏(東京工業大学フロンティア創造共同研究センター)

- (50) 哺乳類ポリコーム群遺伝子産物による転写制御メカニズムの解明
古関明彦(千葉大学大学院医学研究科)
- (51) ショウジョウバエを用いたミジンコの *Antennapedia* 遺伝子産物の機能解析
志賀靖弘(東京薬科大学生命科学部)
- (52) 細胞周期に伴うゴルジ体の複製機構
矢倉達夫(関西学院大学理学部)
- (53) 腔腸動物ペプチド性シグナル分子の遺伝子単離と発現解析
服田昌之(お茶の水女子大学理学部)
- (54) シロイヌナズナの根における環境シグナル受容細胞の特定
高橋秀幸(東北大学遺伝生態研究センター)
- (55) 大量の配列データに基づく遺伝子機能の分化進化的解析
遠藤俊徳(東京医科歯科大学難治疾患研究所)

2. 共同研究 B

- (1) 分裂酵母におけるユビキチン系を介したDNAポリメラーゼのスイッチのメカニズム
大森治夫(京都大学ウイルス研究所)
- (2) 真核細胞遺伝子の転写制御領域に存在するベントDNA構造の機能解析
大山 隆(甲南大学理学部)
- (3) 多細胞生物における細胞組織のtRNA量とコドン使用の関係の解析
金谷重彦(山形大学工学部)
- (4) ヒト人工染色体を用いたセントロメアのDNA複製制御の解析
舛本 寛(名古屋大学大学院理学研究科)
- (5) 鳥類における性染色体の遺伝子量補償機構に関する分子生物学的研究
松田洋一(北海道大学理学部)
- (6) ATP加水分解反応可視化技術を使った回転分子モーターF1の機能解析
斉藤 究(金沢大学理学部)

3. 研究会

- (1) ペプチド分子の機能の多様性
藤澤敏孝(国立遺伝学研究所)
- (2) 小型魚類研究会
田中 実(岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所)
- (3) 非B型DNAの生物学
清水光弘(明星大学理工学部)
- (4) 染色体分配の生物学
舛本 寛(名古屋大学大学院理学研究科)
- (5) DNAメチル化依存性のエピジェネティクス
向井常博(佐賀医科大学)
- (6) ポストシーケンス時代のマウス遺伝学
米川博通((財)東京都臨床医学総合研究所)
- (7) 動物行動の遺伝学
森 裕司(東京大学大学院農学生命科学研究科)
- (8) 種子を舞台とした発生生長プログラム
服部束穂(三重大学遺伝子実験施設)
- (9) ヒトゲノム多様性のSNP問題
五條堀孝(国立遺伝学研究所)
- (10) 発生過程における遺伝子発現ネットワークの解明とインホマティクス
五條堀孝(国立遺伝学研究所)
- (11) 微生物情報システム研究会
辨野義巳(理化学研究所生物基盤研究部)

4. 民間等との共同研究

コホーネンの自己組織化法を利用した蛋白質の機能分類システムの開発

池村淑道(国立遺伝学研究所), 市場勇太 西橋 藍(協和発酵工業株式会社)

生命情報科学的手法を用いた新規ヒト有用遺伝子の発掘

池村淑道(国立遺伝学研究所), 西 達也(協和発酵工業株式会社)

形態形成時の受容体による位置情報の提示機構

広海 健(国立遺伝学研究所), 平本正輝(科学技術振興事業団)

線虫における生殖顆粒の機能解析

小原雄二(国立遺伝学研究所), 川崎一郎(科学技術振興事業団)

VII. 生物遺伝資源・DNA情報

(1) 生物遺伝資源委員会と資源センター小委員会

実験生物の多様な系統は生命科学の研究にとって不可欠のものである。さらに最近では、ゲノム研究など生物学の爆発的な発展によって、莫大な数の突然変異系統が体系的に作り出され、それを用いた遺伝子機能の研究が世界的に進行している。このように増大する様々な生物系統の開発と解析、それらを保存して研究者の要望に応じて分譲する事業、そして増大する生物系統に関する情報を有効利用するためのデータバンク事業は、生命科学の基礎研究だけでなく、医学や農学などの応用分野でも極めて重要になってきた。

このような状況に対して、学術審議会学術情報資料分科会において報告「学術研究用生物遺伝資源の活用について」が出された(1996年6月)。この報告では「生物遺伝資源」を「遺伝子を基盤において取り扱う学術研究用の系統生物、学術研究の対象となる野生生物及びそれらの生物の細胞・DNAを包含する」と定義し、これらの広範かつ効果的な利用のためにその所在情報・特性情報のデータベース化とネットワークの整備を中心に提言したものである。このための体制作りの具体策の第1が、生物種毎の遺伝資源センターであった。主要な生物種毎に生物遺伝資源センターを整備し、各センターにおいては各生物系統の特性開発、維持保存、供給、データベースの構築の中心的な役割を果たすことが期待したものである。このため、各センターには当該生物遺伝資源に関する小委員会を設け、関連活動の推進、検討をはかることとした。第2に、それらの上部機構として生物遺伝資源委員会と系統情報データベース活動である。これは、わが国の生物遺伝資源の確保と活用に関して様々な学術的立場から総合的な検討・調整をすること、及び情報の総合的な収集発信の拠点作りを目的とするものである。

この報告などを受け、1997年度から、いくつかの大学において後述の資源センターが設置されてきた。国立遺伝学研究所においては遺伝実験生物保存センターを改組し、3つ生物種の資源センターの機能をもつ系統生物研究センターと生物遺伝資源委員会と系統情報データベースを運営する生物遺伝資源情報総合センターが設置された。

生物遺伝資源委員会はある意味では「遺伝資源事業」の国会であり、本来中央に置かれるべき性格のものといえる。これを国立遺伝学研究所で運営することになったため、性格がわかりづらくなった面があるが、別図に示すように、国立遺伝学研究所を管轄するものではなく、わが国の(特に)大学等における遺伝資源事業全体を検討・調整するものである。このためには遺伝資源事業の現状を把握し現場の声を反映することはもちろんであるが、一方で、バイオサイエンスにおける遺伝資源事業の位置づけなど大所高所からの将来計画策定が求められている。このような観点から、別表1に示すような様々な生物種の資源センター責任者や今後資源センターを作ろうとする関連研究者さらには他省庁の関係者を結

集するとともに、関係する学識経験者からなる幹事会(ステアリングコミッティー)を設けて有機的な運営をはかることとした。通常の研究所委員会とは異なることもあり準備に手間取ったが、1999年6月に幹事会を開き、さらに同年10月に全体会議を開催し、規約(付録1)を決めると共に活動を開始した。今後は、委員会の目的でもある遺伝資源事業のあるべき方向の検討、新資源センター設立の支援、などの活動が予定されている。

遺伝資源小委員会は各資源センターにおかれるものであり、各資源センター自体は所属大学等の概算要求によって設置されるものである。したがって、その運営・規則は所属大学・研究所に依存するが、委員会の主務は当該生物種の系統保存事業が円滑かつ有効に進むよう情報交換や調査検討をおこなうことであり、このためセンター責任者と関連研究者で構成される。また、所在情報・特性情報のデータベース化も任務に含まれるが、これは後述のように生物遺伝資源情報総合センターの系統情報データベース事業の支援を受けて進められることが多い。別表2のように、これまでのところ、国立遺伝学研究所系統生物研究センターにマウス、イネ、大腸菌の資源センター及び小委員会が立ち上がっている。他大学では、オオムギ(岡山大学資源生物研究所)、ショウジョウバエ(京都工芸繊維大学)培養細胞(東北大学加齢医学研究所)、カイコ(九州大学遺伝子資源開発研究センター)について資源センターが設立されている。資源センターの設立には至っていないが、小委員会活動などセンター設立に向けた準備を進めている生物種としては、コムギ、メダカがある。

ゲノム研究や生物多様性・進化研究の発展に伴って、系統保存事業には新しい光が当てられようとしている。バイオサイエンスの大きな流れに対応すべく系統保存事業も、ダイナミックに変革していくことも重要である。各種センター・委員会活動がこれらの動きを加速し、よい方向に導くことが期待されている。

別図. 遺伝資源センター、委員会の関係組織図

別表1. 生物遺伝資源委員会委員名簿

別表2. すでに設立された小委員会組織一覧

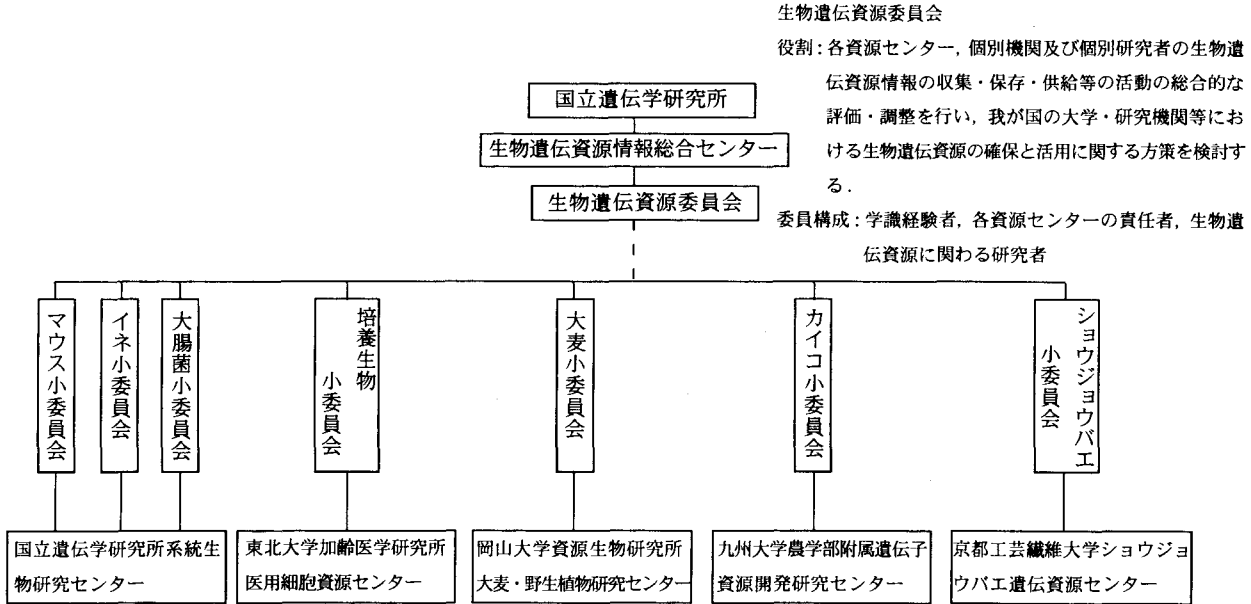
生物遺伝資源マウス小委員会委員名簿

生物遺伝資源大腸菌小委員会委員名簿

生物遺伝資源イネ小委員会委員名簿

参考資料. 生物遺伝資源委員会規則

別図 遺伝資源センター、委員会の関係組織図



生物遺伝資源委員会

役割: 各資源センター、個別機関及び個別研究者の生物遺伝資源情報の収集・保存・供給等の活動の総合的な評価・調整を行い、我が国の大学・研究機関等における生物遺伝資源の確保と活用に関する方策を検討する。

委員構成: 学識経験者、各資源センターの責任者、生物遺伝資源に関わる研究者

生物遺伝資源・DNA情報

各小委員会

役割: 当該生物遺伝資源に関する情報交換、維持系統事業の調整及び所在情報・特性情報データベースの検討等を行う。

委員構成: 各資源センターの研究者及び関連のある研究者

別表1 生物遺伝資源委員会委員名簿

	氏名	所属	事業/生物種
幹事	岩槻邦男	放送大学	植物系統保存
"	岡田清孝	京都大学大学院理学研究科	シロイヌナズナ
"	勝木元也	東京大学医科学研究所	モデルマウス
"	堀寛	名古屋大学大学院理学研究科	メダカ
"	山村研一	熊本大学発生医学研究センター	マウス
"	吉川寛	奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科	微生物ゲノム
"	小原雄治	国立遺伝学研究所生物遺伝資源情報総合センター	線虫
"	城石俊彦	国立遺伝学研究所系統生物研究センター	マウス
委員	松本耕三	徳島大学医学部動物実験施設	ラット
"	吉里勝利	広島大学大学院理学研究科	両生類
"	尾里健二郎	名古屋大学生物分子応答研究センター	メダカ
"	武田洋幸	国立遺伝学研究所個体遺伝研究系	ゼブラフィッシュ
"	佐藤矩行	京都大学大学院理学研究科	ホヤ
"	藤井博	九州大学農学研究院附属遺伝子資源開発研究センター	カイコ
"	山本雅敏	京都工芸繊維大学ショウヨウバクイ遺伝資源センター	ショウヨウバクイ
"	林茂生	国立遺伝学研究所系統生物研究センター	ショウヨウバクイ
"	藤澤敏孝	国立遺伝学研究所個体遺伝研究系	ヒドラ
"	倉田のり	国立遺伝学研究所系統生物研究センター	イネ
"	遠藤隆	京都大学大学院農学研究科	コムギ
"	笹隈哲夫	横浜市立大学木原生物学研究所	コムギ
"	武田和義	岡山大学資源生物科学研究所	オオムギ
"	後藤伸治	宮城教育大学教育学部	ソメイメイナ
"	西尾剛	東北大学大学院農学研究科	アブラナ
"	谷口研至	広島大学大学院理学研究科	キク
"	仁田坂英二	九州大学大学院理学研究院生物学部門	アサガオ
"	仁藤伸昌	佐賀大学農学部	柑橘系植物
"	金子嘉伸	大阪大学大学院工学研究科	出芽酵母
"	下田親	大阪市立大学大学院理学研究科	分裂酵母
"	帯刀益夫	東北大学加齢医学研究所	培養細胞
"	森浩禎	奈良先端科学技術大学院大学遺伝子教育研究センター	大腸菌
"	西村昭子	国立遺伝学研究所系統生物研究センター	大腸菌
"	小笠原直毅	奈良先端大学院大学バイオサイエンス研究科	枯草菌
"	石濱明	国立遺伝学研究所分子遺伝研究系	ウイルス
"	菅原秀明	国立遺伝学研究所生命情報研究センター	微生物
"	山崎由紀子	国立遺伝学研究所生物遺伝資源情報総合センター	データベース

	氏名	所属	事業/生物種
委員	水 沢 博	国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター変異遺伝部	厚生省細胞 バンク
"	大 野 忠 夫	理化学研究所筑波研究所 遺伝子基盤研究部細胞材料室	理研バンク
オブザーバ	長 村 吉 晃	農林水産省生物資源研究所 遺伝資源第2部DNA管理情報科長	農水省DNA バンク
"	長 峰 司	農林水産省農業生物資源研究所 植物評価保存研究チーム	農水省ジーン バンク
"	森 脇 和 郎	総合研究大学院大学 副学長	マウス

別表2 すでに設立された小委員会組織一覧

生物遺伝資源マウス小委員会委員名簿

(所外50音)

氏名	職名	所属
(所外)		
相 澤 慎 一	教 授	熊本大学発牛医学研究センター
伊 藤 豊志雄	センター長 代 理	(財)実験動物中央研究所 ICLASモニタリングセンター
勝 木 元 也	教 授	東京大学医科学研究所
木 南 凌	教 授	新潟大学医学部
日下部 守 昭	部 長	理化学研究所筑波研究所遺伝子基盤研究部
近 藤 壽 人	教 授	大阪大学細胞生体工学研究センター
芹 川 忠 夫	教 授	京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設
鍋 島 陽 一	教 授	京都大学大学院医学研究科
西 村 正 彦	教 授	名古屋大学医学部附属動物実験施設
野 田 哲 生	教 授	東北大学大学院医学系研究科
藤 本 弘 一	部 門 長	三菱化学生命科学研究所先端研究部門
松 本 耕 三	助 教 授	徳島大学医学部附属動物実験施設
森 脇 和 郎	副 学 長	総合研究大学院大学
山 村 研 一	教 授	熊本大学発牛医学研究センター
米 川 博 通	副 所 長	(財)東京都医学研究機構東京都臨床医学総合研究所
三 輪 尚 克	技 術 主 幹	(財)ヒューマンサイエンス振興財団研究企画部
(所内)		
城 石 俊 彦	センター長	系統生物研究センター
山 崎 由紀子	助 教 授	生物遺伝資源情報総合センター

生物遺伝資源大腸菌小委員会委員名簿

(所外 50音)

氏名	職名	所属
(所外)		
井口 八郎	教授	京都大学大学院理学研究科・理学部
加藤 潤一	助教授	東京大学医科学研究所
平賀 壮太	教授	熊本大学発生医学研究センター
森 浩禎	教授	奈良先端科学技術大学院大学遺伝子教育研究センター
山根 國男	教授	筑波大学生物科学系
由良 隆	研究顧問	(株)HSP研究所
(所内)		
西村 昭子	助教授	系統生物研究センター
荒木 弘之	教授	細胞遺伝研究系
菅原 秀明	教授	生命情報研究センター
山崎 由紀子	助手	生物遺伝資源情報総合センター

生物遺伝資源イネ小委員会委員名簿

(所外 50音)

氏名	職名	所属
(所外)		
北野 英巳	助教授	名古屋大学大学院生命農学研究科
佐藤 光	教授	九州大学大学院農学研究院附属遺伝子資源開発研究センター
佐野 芳雄	教授	北海道大学大学院農学研究科
島本 功	教授	奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科
谷坂 隆俊	教授	京都大学大学院農学研究科
長戸 康郎	教授	東京大学大学院農学生命科学研究科
松岡 信	教授	名古屋大学生物分子応答研究センター
吉村 淳	教授	九州大学大学院農学研究院生物資源開発管理学部門
(所内)		
倉田 のり	助教授	系統生物研究センター
伊藤 幸博	助手	系統生物研究センター
山崎 由紀子	助教授	生物遺伝資源情報総合センター
野々村 賢一	助手	実験圃場
(オブザーバー)		
小原 雄治	教授	生物遺伝資源情報総合センター
長村 吉晃	科長	農林水産省生物資源研究所遺伝資源第2部DNA管理情報科
長峰 司	チーム長	農林水産省生物資源研究所植物評価保存研究チーム

参考資料 生物遺伝資源委員会規則

平成11年10月12日

規則第3号

(設置)

第1条 国立遺伝学研究所生物遺伝資源情報総合センター(以下「情報総合センター」という。)に生物遺伝資源委員会(以下「委員会」という。)を置き、その運営はこの規則の定めるところによる。

(目的)

第2条 委員会は、学術審議会学術情報資料分科学術資料部会報告(平成8年6月20日)の趣旨を踏まえ、全国の生物遺伝資源センター(以下「資源センター」という。)等との連携・協力のもとに次の各号に掲げる事項を行う。

- 一 各資源センター、個別機関及び個別研究者の生物遺伝資源の収集・保存・供給等の総合的な評価・調整
- 二 我が国の大学・研究機関等における生物遺伝資源の確保と活用に関する方策の検討・提言
- 三 生物遺伝資源関連研究のあり方等に関する方策の検討・提言
- 四 新資源センター設立に関する検討・提言
- 五 その他生物遺伝資源情報に関する調査・検討等

(組織)

第3条 委員会は、次の各号に掲げる委員をもって組織する。

- 一 情報総合センター長
 - 二 情報総合センター教官 若干名
 - 三 学識経験者 若干名
 - 四 資源センター長
 - 五 生物遺伝資源に関わる研究者 若干名
- 2 前項第二号から第五号の委員は、委員会において選任し、所長が委嘱する。
- 3 前項の委員の任期は2年とし、再任を妨げない。
- ただし、委員に欠員を生じた場合の後任者の任期は前任者の残任期間とする。

(委員長及び副委員長)

第4条 委員会に、委員長及び副委員長各1人を置く。

- 2 委員長は情報総合センター長とする。
- 3 副委員長は委員が互選する。
- 4 副委員長は、委員長を補佐し、委員長に事故あるときはその職務を代理し、委員長が欠けたときはその職務を行う。

(招集)

第5条 委員長は委員会を招集し議長となる。

(会議)

第6条 委員会は、委員の過半数の出席がなければ、会議を開き、議決することができない。

2 委員会の議事は、出席者の過半数で決し、可否同数のときは委員長の決するところとする。

(委員以外の者の出席)

第7条 委員長は、必要に応じて、委員以外の者を会議に出席させ、意見を聴取することができる。

(幹事会)

第8条 委員会の円滑な運営のために幹事会を置く。

2 幹事会の組織運営については、委員会が別に定める。

(専門部会)

第9条 委員会は、必要に応じて専門部会を置くことができる。

2 専門部会の組織及び運営については、委員会が別に定める。

(庶務)

第10条 委員会の庶務は、管理部庶務課において処理する。

(細目)

第11条 この規則に定めるもののほか、必要な事項は委員会が別に定める。

附 則

1 この規則は、平成11年10月12日から施行する。

2 この規則施行後の最初の第3条第1項第二号から第五号の委員の任期は、同条第3項の規定にかかわらず平成13年3月31日までとする。

生物遺伝資源に関する小委員会規則(案)

平成 年 月 日
規 則 第 号

(設置)

第1条 国立遺伝学研究所系統生物研究センター(以下「センター」という。)に別表に掲げる生物遺伝資源に関する小委員会(以下「小委員会」という。)を置き、その運営はこの規則の定めるところによる。

第2条 各小委員会は、全国の関連研究機関及び研究者等との連携・協力のもとに次の各号に掲げる事項を行う。

- 一 当該生物遺伝資源に関する情報交換
- 二 当該生物遺伝資源に関する維持系統事業の調整及び所在情報・特性情報データベースの検討
- 三 その他当該生物遺伝資源に関する調査・検討等

(組織)

第3条 各小委員会は、次の各号に掲げる委員をもって組織する。

- 一 センター長又はセンターの教官 若干名
 - 二 所内の当該生物に関連のある教官 若干名
 - 三 所外の当該生物に関連のある研究者 若干名
- 2 前項の委員は、所長が委嘱する。
 - 3 前項の委員の任期は2年とし、再任を妨げない。
ただし、委員に欠員を生じた場合の後任者の任期は前任者の残任期間とする。

(委員長及び副委員長)

第4条 各小委員会に、委員長及び副委員長各1人を置く。

- 2 委員長は、前条第1項第一号及び第二号の委員のうちから所長が指名する。
- 3 副委員長は委員が互選する。
- 4 副委員長は、委員長を補佐し、委員長に事故あるときはその職務代理し、委員長が欠けたときはその職務を行う。

(招集)

第5条 委員長は小委員会を招集し議長となる。

(会議)

第6条 小委員会は、委員の過半数の出席がなければ、会議を開き議決することができない。

2 小委員会の議事は、出席者の過半数で決し、可否同数のときは委員長の決するところとする。

(委員以外の者の出席)

第7条 委員長は、必要に応じて、委員以外の者を会議に出席させ、意見を聴取することができる。

(庶務)

第8条 小委員会の庶務は、管理部庶務課において処理する。

(細目)

第9条 この規則に定めるもののほか、必要な事項は所長が別に定める。

附 則

(1)この規則は、平成 年 月 日から施行する。

(2)この規則施行後の最初の第3条第1項第一号から第三号の委員の任期は、同条第3項の規定にかかわらず平成13年3月31日までとする。

別表

小委員会名	マウス小委員会
	イネ小委員会
	大腸菌小委員会

(2) 生物遺伝資源情報データベース

2-1: 経緯

開所当時から遺伝学を基礎とした系統開発やそれらの保存・分譲などを通して各方面での研究に貢献してきた歴史がある。特にムギ、イネ、カイコ、大腸菌、マウス、ショウジョウバエなどの分野では全国の中心的存在として認められ、現在なお系統生物研究センターを中心に基礎研究と密着した有用系統の開発と保存・分譲が行われている。一方、遺伝資源情報の整備に関する試みは1984年に始まる。この年遺伝実験生物保存センター(現系統生物研究センター)に遺伝資源研究室が増設され、以来系統情報の収集やカタログ整備の試みが行われるようになった。1989年には「保存系統情報のデータベース化率調査」のための研究事業費が措置された。この間遺伝研が出版したカタログのリストを表1にまとめた。さらに、ネットワーク通信が飛躍的に普及した1995年には、カタログ出版に代わって情報のインターネット公開を開始した。1997年には遺伝資源研究室が遺伝実験生物保存センターから独立し、新たに設置された生物遺伝資源総合情報センターとして全国規模の遺伝資源データベースの整備を進めることになった。

1998年には遺伝資源情報データベースプロジェクト事業費が措置されるに至り、生物遺伝資源委員会の設立(前述)とともに、本データベースプロジェクトは、ポストゲノムサイエンスを視野にいれて新たな事業展開を開始したところである。

表1 遺伝資源関連カタログ一覧

発行年	カタログ名	内 容
1985	国・公・私立大学等における実験生物系統	172 機関 308487 系統
1986	DROSOPHILA STOCK LIST IN JAPAN	122 種 1250 系統
1987	国公立大学・研究所等に維持されている実験用マウス系統	621 種 1032 系統
1988	わが国におけるカイコ実験系統	943 系統
1990	国公立大学・研究所等に維持されている実験用ラット系統	実験系統 157 種を含む 260 亜系統
1993	Catalogue of Wheat Experimental Strains maintained in the universities and institutes in Japan	16 機関 2547 系統
1994	大腸菌遺伝系統	原核生物遺伝研究室から出版、 遺伝研保有株情報
1997	Rice Genetic Resources in Japan	33 機関 11080 系統
1997	クローニングベクターコレクション	微生物遺伝研究部門から出版、 遺伝研保有クローン情報

2-2：生物遺伝資源情報データバンク活動内容

本データバンクの果たすべき役割の第一は、研究用遺伝資源の共有と有効利用を実現するための情報公開である。遺伝研が保有する遺伝資源のデータベース化を行うほか、各生物種毎に設置される小委員会と連携し、情報収集、データベース構築および情報公開を全国規模で徹底するという責務を担っている。本年度は、大腸菌、イネ、マウス、オオムギの各遺伝資源小委員会およびコムギ遺伝資源小委員会準備会が発足し、委員会の議論を通して次世代型データベースの構築を開始し、一部公開することができた。データバンクで扱う情報は、遺伝資源*の所在情報、入手方法、作製方法、利用方法、特性情報および付随する知識情報などである。表2に1999年12月現在のデータベース構築および情報公開状況をまとめた。本プロジェクトの成果としてのデータベースは、データベースサーバーSHIGEN(SHared Information of GENetics) <http://www.shigen.nig.ac.jp> からインターネット上に公開している。

*遺伝資源とは、保存、増殖、分譲可能な「もの」と定義し、たとえば様々な生物種の生物個体、凍結胚、種、菌株、細胞、DNAなどをいう

担当：山崎由紀子

連絡先：〒411-8540 静岡県三島市谷田1111

国立遺伝学研究所・生物遺伝資源総合情報センター・系統情報研究室

FAX:0559-81-6886

e-mail:shigen@lab.nig.ac.jp

<http://www.shigen.nig.ac.jp>

表2 生物遺伝資源情報データベースの現状

生物種名	データベース名	収録機関	公開状況 (URL)	作業開始年	内容説明
DNAクローン	クローニングベクター	遺伝研	http://www.shigen.nig.ac.jp/cvector/cvector.html	1995	大腸菌K12で増殖可能なベクター情報、画像、配列データベースへのリンク
マウス	マウス系統情報データベース	遺伝研	http://www.shigen.nig.ac.jp/mouse/mouse.default.html	1995	飼育維持系統、凍結胚
マウス	MMDBJ(Mouse microsatellite DNA Database)	全国5機関	http://www.shigen.nig.ac.jp/mouse/mouse.html	1997	マイクロサテライトDNAの系統間比較情報、実験条件、電気泳動パターンなど
動物	実験動物データベース	実験動物協会ほか	http://www.shigen.nig.ac.jp/animal/animal1.html	1997	ウサギ、ラット、マウス他実験小動物維持系統
ショウジョウバエ	ショウジョウバエ系統情報データベース	全国26機関	http://www.shigen.nig.ac.jp/fly/CENTER.e.html	1996	JFLY情報提供
ショウジョウバエ	ショウジョウバエエンハンサートラップ系統と発現パターンデータベース	遺伝研	限定公開	1998	Gal4のエンハンサートラップベクター挿入系統、発現パターンイメージなど
コムギ	KOMUGI	全国16機関	http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/wheat.htm	1996	系統情報、形質画像
コムギ	ムギDNAクローンデータベース	全国8機関	限定公開	1997	ムギ類EST配列情報、解析情報など
オオムギ	オオムギ系統情報データベース	岡山大学	http://www.shigen.nig.ac.jp/barley/Barley.html	1998	栽培特性情報など
イネ	Oryzabase	全国32機関	http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase	1996	系統情報、遺伝子辞書、染色体地図ほか関連情報
シロイヌナズナ	アラビドプシス系統情報データベース	宮城教育大学	http://www.shigen.nig.ac.jp/arabidopsis/	1998	AISコレクション、仙台コレクション
大腸菌	PEC (Profiling of E. coli Chromosome)		http://www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/pec/	1998	遺伝子分類情報、欠失株情報など
大腸菌	大腸菌系統情報データベース	遺伝研	http://www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/strain/	1999	系統特性情報

(3) 系統保存事業について

ゲノム科学を基礎とするバイオサイエンスの発展にともない、独自の進化の歴史をもつ多様な生物の生命機構を遺伝子を共通項として理解するために、遺伝資源は欠くことのできない研究素材であることが理解されるようになってきた。遺伝子の共通性によって、大腸菌からヒトに至るまで幅広い生物の生命現象が統一的に理解し得ることが明らかになってきたのである。このことは、ヒトの遺伝病の原因解明に、ショウジョウバエやマウスの知見が重要な情報を与え得ることを示している。一方、遺伝資源としての生物多様性は、それ自体として生物進化の道筋を正しく理解するためにも必須の研究素材となっている。このように、基礎生物学から臨床医学、農学にわたる広い研究分野において、多様な生物種からの遺伝資源は、バイオサイエンス全般を支える重要な研究基盤となっている。

系統生物研究センターは、このようなバイオサイエンスの進展を踏まえて、植物、原核生物、無脊椎動物、脊椎動物に至る多様な生物種の遺伝子資源の系統保存を進めている。これらの中には、標準的な菌株や近交系統、さまざまな突然変異株(系統)、染色体異常系統、さらには野生由来の系統などが含まれる。これらの系統は、国内外の研究者からの要望に応じて無償で分与を行っている。また、ポストシークエンス時代のゲノム科学の発展を予測して遺伝子改変技術を駆使した新たな遺伝実験系統の開発や野生集団中の遺伝子多様性を活用した実験生物系統の開発も開始している。

尚、系統生物研究センターで維持されている遺伝資源情報は、生物遺伝資源総合センターと密接な連携をとりながら情報の収集と公開を行っている。

3-1 クローニングベクターコレクション

<http://www.shigen.nig.ac.jp/cvector/cvector.html>

収集および配布担当：安田成一

連絡先：〒411-8540 静岡県三島市谷田1111

国立遺伝学研究所 微生物遺伝研究部門 クローニングベクターコレクション

FAX:0559-81-6763

e-mail:cvector@lab.nig.ac.jp

微生物遺伝研究部門では大腸菌を宿主とするクローニングベクターの収集と配布の事業を行っている。現在、約480種類のプラスミドベクターを精製したDNAとして保存しており、これらは分譲が可能である。内訳は汎用ベクター80種、発現ベクター120種、遺伝子融合ベクター60種、プロモータクローニングベクター20種、直接選択用ベクター20種、その他、高コピーベクター、低コピーベクター、翻訳シグナル用ベクター、複製tsベクター、薬剤耐性遺伝子カセット、塩基配列決定用ベクター、部位特異的変異誘発用ベクター等数種ずつである。保有しているすべてのベクターのマップを含めたデータをまとめたカタログを印刷・製本して希望者への配布を行っているが、今年度はこのカタログの改訂版を作った。同じ内容のデータをインターネット上に公開しており(<http://>

www.shigen.nig.ac.jp/cvector/cvector.html), データベースファイルとして取り出せるようにもなっている。郵便, ファックス, あるいは電子メールでの問い合わせ, 請求に応じている。

なお, 本年の請求件数は219件, 分譲株数は663株で, その内訳は国内が160件416株, 国外が59件247株であった。

過去3年間のベクター分譲実績

〈分譲機関〉	〈平成10年度〉	〈平成11年度〉	〈平成12年度〉
国立学校	49 (149)	62 (176)	59 (147)
国立研究機関	24 (83)	31 (85)	51 (134)
公立大学	9 (33)	12 (23)	19 (53)
公立研究機関	10 (33)	0	6 (9)
私立大学	18 (48)	16 (50)	25 (73)
民間研究機関	0	0	0
高等学校	1 (15)	0	0
国外	100 (340)	78 (269)	59 (247)
その他	0	0	0
合計	211 (701)	199 (603)	219 (663)

※数字は件数, ()は分譲個数

3-2 大腸菌 <http://www.shigen.nig.ac.jp/eco/strain/>

収集および配布担当: 西村昭子

連絡先: 〒411-8540 静岡県三島市谷田1111

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・原核生物遺伝研究室

FAX:0559-81-6826

e-mail:genkaku@lab.nig.ac.jp

1976年に微生物保存研究室として設置が認められて以来、主として当研究所で開発された大腸菌変異系統及びそれらに感染するファージとプラスミドなどの維持保存分譲を行ってきた。現在、保有系統総数は約1万5千系統に及び、既知変異系統の80%をカバーする。この内請求頻度の高い2200系統については、データバンクに登録しインターネット上に公開している。分譲に関しては、イエール大学の大腸菌遺伝系統保存施設と相互協力を行っている(mary@fetalpig.biology.yale.edu)。

- 1) 突然変異株(栄養要求性, 薬剤抵抗性, ファージ抵抗性, 放射線感受性など): 7000株
- 2) トランスポゾン挿入変異株(染色体地図のほぼ1分毎に, Tn10, Tn10kan, Tn5で標識したもの): 473株

遺伝的背景の異なる株	203株
遺伝的背景が野生型の株	190株
Hfr株のkit	80株

- 3) クラーク・カーボンのpLCコレクション: 2000株
- 4) 広田の大腸菌温度感受性変異株のコレクション: 5000株

DNA複製欠損変異株	115株
RNA合成欠損変異株	100株
ムレイン生合成欠損変異株	55株
細胞分裂欠損変異株**	353株
染色体分配欠損変異株**	45株
膜蛋白欠損変異株	22株
リボソーム蛋白変異株	79株
未同定欠損変異株	約3800株

このほか、大腸菌のファージ(T_2 : T_3 , T_4 , T_4 GT7, T_5 , T_6 , T_7 , Plkc, Plvir, Mu, λ papa, λ vir, λ gt λ C, λ Cb2, λ cI₈₅₇S7, λ Tn5, λ Tn10, ϕ X174wild, X174am3, fl, MS2, Q β , その他)および枯草菌200株を保有している。

3-3 マウス<http://www.shigen.nig.ac.jp/mouse/mouse.dafault.html>

収集および配布担当: 城石俊彦

連絡先: 〒411-8540 静岡県三島市谷田1111

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・哺乳動物遺伝研究室

FAX: 0559-81-6817

e-mail: tshirois@lab.nig.ac.jp

国立遺伝学研究所におけるマウス系統保存は、昭和26年に北海道大学理学部よりラット及びマウス10系統が移されたことにより開始された。その後、国内調査、海外学術調査で採集した野生マウス、外国から輸入した標準的近交系マウス、コンジェニック系マウス、突然変異マウス、染色体組換え系マウス、遺伝子導入マウスが加わって規模が拡大してきた。これらの中で、野生マウスやそれらから由来した近交系マウス、さらには、野生由来系統を基に新たに開発した実験用マウス系統は、世界でも類を見ないユニークなマウス遺伝子資源となっている。昭和57年から、マウス受精卵による凍結保存を開始し、現在では目的に応じて精子凍結保存法も併用して、これらの貴重な遺伝子資源の維持に努めるとともに国内外の研究者への分譲業務も行っている。

飼育維持系統(50系統)

近交系マウス	22系統
H2 コンジェニック系マウス	2系統
野生ハツカネズミのH2染色体を導入したB10 コンジェニック系	2系統
その他の突然変異遺伝子を保有している系統	12系統
野生ハツカネズミ由来の系統	12系統

凍結胚保存系統(233系統)

近交系	32系統
H2 コンジェニック系	34系統
B10系	26系統
A系	3系統
C3H系	5系統
野生ハツカネズミのH2染色体を導入したB10 コンジェニック系	17系統
B10. MOLH2 コンジェニック系由来のH2染色体組換え系	45系統
その他のコンジェニック系	18系統
染色体変異をもつ系統	7系統
突然変異遺伝子を保有している系統	37系統
野生ハツカネズミ類	31系統
トランスジェニック系統	12系統

精子凍結保存系統

32系統

上記保存系統に関する情報はすべてインターネット上に公開している。

3-4 イネ <http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase>

増殖および配布担当：植物遺伝研究室・倉田のり

実験圃場・野々村賢一

連絡先：〒411-8540 静岡県三島市谷田1111

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・植物遺伝研究室

FAX:0559-81-6808

e-mail:nkurata@lab.nig.ac.jp

e-mail:knomomur@lab.nig.ac.jp

遺伝研におけるイネ遺伝資源のコレクションは、昭和32年ロックフェラー財団の援助の下に開始された「栽培稲の起源の研究」以来、現在まで引き継がれている。特に遺伝研では、遠縁野生種、栽培型近縁野生種、および在来型栽培種を数十年にわたり、世界各地より収集し、保有してきた。

遺伝研を含む全国32カ所の文部省関連研究機関が保有している稲系統については、既にデータベース化(Oryzabase:<http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase>)し、インターネット上に情報公開を開始している。Oryzabaseには、コレクション系統情報のみならず、種々の突然変異や野生稲分布など、関連有用情報も含まれる。コレクション系統の内訳は以下の通りであり、括弧内は遺伝研の保有数を示す。

標識遺伝子系統	1494
突然変異系統	669
同質遺伝子系統	459 (36)
同質4倍体系統	52 (15)
一次3染色体系統	71
染色体変異系統	224 (20)
細胞質変異系統	48
細胞培養再生系統	161
栽培品種	6293 (3134)
野生種	1609 (1609)
Total	11080 (4814)

()内は遺伝研が保有する系統数

3-5 アサガオ <http://mg.biology.kyushu-u.ac.jp/>

アサガオ系統の収集保存は故竹中 要博士によって創設間もなく始められ、昭和41年同博士の没後も550系統を引き続き保存してきた。これらはアサガオ研究者のいる機関に移管することとなり、平成10年度から九州大学、理学部、仁田坂英二博士にすべての系統の保存を託した。なおアサガオの系統についての情報はアサガオホームページ<http://mg.biology.kyushu-u.ac.jp/>で得ることができ、遺伝研ホームページ遺伝資源情報データベースからもリンクされている。

3-6 サクラ <http://www.db.its.hiroshima-cu.ac.jp/~kitakami/prunus.html>

サクラの品種は故竹中 要博士が「染井吉野」の起源などの研究のため収集したものを中心に250余りの系統が引き継がれている。その内貴重なものは済洲島産のヤマザクラ *P. yedoensis* *Matsumura* var. *undiflora* Koehneの他、自然変異株である船原吉野、鞍馬桜、八重大島、染井紅などをはじめ、人工交配によって選抜された天城吉野、伊豆吉野などがある。また木の花、気多の白菊桜、仙台屋、千原桜など園芸品種として貴重なものが多数含まれている。「遺伝研の桜(改訂版)」が遺伝学普及会から発行されている。しかし現在は、系統のほぼすべてが栄養体繁殖により多摩教育植物園に引き継がれており、系統保存事業としての栽培は終了している。

3-7 ショウジョウバエ <http://www.shigen.nig.ac.jp/fly/nighayashi.html>

収集および配布担当：林 茂生

連絡先：〒411-8540 静岡県三島市谷田1111

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・無脊椎動物遺伝研究室

FAX:0559-81-6825

e-mail:shayashi@lab.nig.ac.jp

キイロショウジョウバエおよび近縁種。特にキイロショウジョウバエの突然変異系統、分子遺伝学的研究に適した有用系統に力をおいている。

キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) 27種, 933系統

突然変異系統	
各染色体をカバーする欠失系統のセット	
X染色体	57系統
第二染色体	109系統
第三染色体	82系統
第四染色体	2系統
その他の変異系統	約600系統

変異系統は標準的なマーカー系統の他に、ホメオティック遺伝子の変異体を含む。また、FLP, Gal4, lacZ マーカー系統なども維持している。

野生型系統	
iso-female系統	37系統
標準系統その他	27系統

オナジショウジョウバエ (*Drosophila simulans*) 287系統

iso-female系統	90系統
標準系統その他	37系統

他の近縁種 (25種, 83系統)

これらのストックリストはwwwで閲覧・検索可能である。なお所外の各研究機関および研究者 (26箇所) が維持している系統 (約3000系統) に関する情報もSHIGENサーバーから公開している。

公開リストには二つのファイル, mutant listおよびNIG wild listがある。

mutant listはmelanogasterの標準的な系統とrearrangement mutantからなる。

各系統毎に、ストック番号 (Nで始まる番号)、遺伝子型、breakpoint、その他の情報を収録してある。

NIG wild list (E) もしくはNIG wild list (J) は野生種のリストである。ストック番号 (Wで始まる番号)、種名、採取地、整理番号、採取年度、その他の情報の6つの項目からなる。(J) は採取地に日本語を含むファイルであり、(E) は英語のみのファイルである。

3-8 ヒドラ <http://www.nig.ac.jp/labs/OntoGen/keitou.html>

収集および配布担当：清水 裕

連絡先：〒411-8540 静岡県三島市谷田1111

国立遺伝学研究所・発生遺伝研究部門(ヒドラ研究グループ)

FAX:0559-81-6770

e-mail: hshimizu@lab.nig.ac.jp

世界中から収集した種や系統に加えて遺伝的変異体等, 様々な形質を有する約100系統を維持管理し, 分譲を行っている. また DNA, RNA, cDNA library等や, 場合によっては生化学材料として大量の提供も可能である.

淡水ヒドラ (Hydra)

野生型	53系統
<i>Hydra magnipapillata</i> (日本産チクビヒドラ)	14系統
<i>H. carnea</i> (ヨーロッパ産)	2系統
<i>H. circumcincta</i> (ヨーロッパ産)	2系統
<i>H. hymanae</i> (北アメリカ産)	1系統
<i>H. oligactis</i> (ヨーロッパ産)	8系統
<i>H. oligactis</i> (北アメリカ産)	2系統
<i>H. viridissima</i> (北アメリカ産)	8系統
<i>H. vulgaris</i> (formerly attenuata) (ヨーロッパ産)	5系統
(北アメリカ産)	3系統
<i>Pelmatohydrarobusta</i> (日本産)	7系統
種不明 (オーストラリア産)	1系統

突然変異型 (*H. magnipapillata*) 36系統

- 1) Mini(mini1, -3, -4). Small body size with high budding rate.
- 2) Maxi(maxi1, -2, -4). Large body size.
- 3) L4. Large body size with low budding rate.
- 4) Multi head(mh -1, -3). Secondary hypostomes are formed all along the body length (abnormal budding zone?).
- 5) Twisted column(ts). Extended peduncle forms twisted column structure.
- 6) Holotrichous isorhiza minus(nem-3, -10).
- 7) Holotrichous isorhiza deformed(nem-1, -11, -15).
- 8) Male sterile(ms-1, -2). Non motile sperms.
- 9) Female sterile(def1-12, 1-13). Eggs not fertilized.
- 10) Embryo lethal(def1-14 (♂), 1-15 (♀)). Fertilized eggs produced between them do not hatch.
- 11) Regeneration deficient(reg-4, -16, -19, def-2 3, s9-k, s9-1, s10-a, s10-b).
- 12) Non feeding strain(ts)(nf-1). Produced by loss of interstitial cells by high temperature treatment(23°C) of parental strain sf-1.

- 13) Body tentacles(nf-11). tentacles move down from hypostome to body column during growth. Cannot capture brine shrimp.
- 14) Pinched budding zone(E4). Budding zone becomes very narrow in width when buds are formed.
- 15) Supernumeral tentacles(E6). 10-13 tentacles per hypostome.
- 16) Budding deficient(ts). Very low budding at 23°C.
- 17) 105 Epithelial(105Ep). Deficient in all the cell types in the interstitial cell lineage. Derived from a wild type strain 105.
- 18) Pseudo epithelial(nem1 Ps((♂)3 lines, nem1 Ps(♀)3 lines). Epithelial hydra derived from nem-1 containing only germ line cells.
- 19) Others 13 strains.

平成 11・12 年度 遺伝実験生物保存系統分譲実績

分譲機関	年度	マウス	ショウジョウバエ	ヒドラ	イネ	大腸菌・枯草菌 その他微生物	クローニング ベクター	計
国立大学	11	51 (86)	44(1,802)	6 (3)	8 (52)	119 (565)	62 (176)	290(2,684)
	12	52 (72)	41 (926)	2 (6)	8 (101)	131 (369)	59 (147)	293(1,621)
国立 研究機関	11		7 (94)			5 (6)	31 (85)	43 (185)
	12	2 (2)	9 (49)		2 (835)	11 (19)	51 (134)	75(1,039)
公立大学	11	2 (2)	9 (38)	4 (4)		2 (2)	12 (23)	29 (69)
	12	2 (2)	5 (32)	2 (4)	2 (65)	3 (4)	19 (53)	33 (160)
公立 研究機関	11	4 (34)	3 (10)			1 (2)		8 (46)
	12	3 (3)	1 (2)			3 (3)	6 (9)	13 (17)
私立大学	11	13 (16)	4 (10)	4 (3)		30 (514)	16 (50)	67 (593)
	12	6 (8)	1 (3)	1 (4)		29 (26)	25 (73)	62 (114)
民間 研究機関	11	23 (38)	2 (9)		2 (14)	26 (36)		53 (97)
	12	23 (38)	2 (4)		3 (796)	38 (478)		66(1,316)
高等学校等	11	3 (6)	1 (3)	4 (7)				8 (16)
	12	2 (7)	1 (10)	4 (4)		2 (6)		9 (27)
国外	11		32 (97)	1 (1)	4 (37)	36 (72)	78 (269)	151 (476)
	12	1 (2)	26 (81)	4 (1)	4 (55)	54 (87)	59 (247)	148 (473)
その他	11		3 (5)		1 (14)			4 (19)
	12							
合計	11	96 (182)	105(2,068)	19 (18)	15 (117)	219(1,197)	199 (603)	653(4,185)
	12	91 (134)	86(1,107)	13 (19)	19 (1,852)	271 (992)	219 (663)	699(4,767)

※ 数字は件数、()内は延べ系統数。

※ 枯草菌は研究者の異動に伴って系統保存事業の停止を行っているため、平成11年度より系統数から削除。

(4) 日本 DNA データバンクの「フィールドワーク」

この世のすべての生命は、DNA という生命体の高分子に刻みこまれた遺伝子やそれを制御する情報を持っている。

このDNAは、A, T, C, Gという4種類のアルファベットで略される塩基がある順序で重合したものであり、いわばこの文字列の並び方が遺伝情報を与えているといえる。生き物というふわふわした存在の最も核心的な部分がデジタル情報で記述できるということは、驚くべきことであり、ヒトの場合この情報が30億個の文字を超えるほど長大なものである。

70年代にATCGの並び（塩基配列）を比較的簡単に決める方法が開発されると、堰きを切ったようにいろいろな生物のDNAの塩基配列が発表されていった。

80年代にはいると、これらのデータを一定の規則でコンピュータファイルにしてまとめた「塩基配列データベース」の構築が欧州と米国で始まった。

日本もこれらの動きに呼応して、87年に国立遺伝学研究所で、日本DNAデータバンク(DDBJ; <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>)の活動が発足した。DDBJは、米国のNIH(国立保健研究所)のNCBI(国立バイオテクノロジー情報センター)およびEMBL(欧州分子生物学研究所)の分局であるEBI(欧州生命情報学研究所)とともに、「DDBJ/EMBL/GenBank」という国際塩基配列データベースを日米欧共同で構築している。

この共同作業は、いまや世界中にはりめぐらされつつあるインターネットを用いて行われている。

3データバンクの間で大量のコンピュータファイルが毎日行き交っており、それらが次々と巨大なデータベースに飲み込まれ、整理されて、統一した形式でWWWなどを使って公開されている。

データベースの大部分は研究者から直接インターネットを通して送られてくる情報もとになっている。DDBJでは、WWWを用いた塩基配列データ登録システムSAKURA(<http://sakura.ddbj.nig.ac.jp/>)などを使って、もっぱら日本の研究者からのデータ登録を受け付けているが、ゲノム研究を中心とする日本の生物学研究の進展の結果、99年になってはじめて、受け付けたデータ登録件数が、欧州のEBIを上回った。

ただし、米国のGenbankに登録される件数は日欧の10倍にのぼる。こうして登録されたデータは3データバンクで共有され、全人類の共有財産として世界中に公開されている。99年4月現在の総データ量は331万エントリー、総塩基数で23億7526万にのぼり92年から7年間で30倍以上に増加している。

この国際共同構築作業を円滑に行うために、日欧米のデータバンクは2年に1度「国際諮問委員会」というアドバイザー委員会を、年に1度「国際実務者会議」をそれぞれの場所で持ち回りで開いている。

後者の会議においては、99年に国立遺伝学研究所で4月に開催された。この会合の最大の目的は、データベースをどのように統一した形式で提供するかということであるが、これはそれほど簡単な問題ではない。

たとえば、DNAの塩基配列から、遺伝暗号表をもとにしてタンパク質のアミノ酸配列に変換することだけなら、実に簡単なことではないかと思われる方が多いかもしれない。しかし、遺伝暗号には生物の種類によって「方言」があり、その塩基配列がどの生物のものであるかをきちんと知っていなければ、間違ったアミノ酸配列に変換する可能性がある。

このほかにも、生物学の分野での新しい知見をどのようにデータベースに反映するかについて、詳しい議論が行われる。現在、多様な生物種の塩基配列が大量に決定されているので、情報検索という立場からだけでも、このようなデータベースの運用は現代生物学にとって必須のものとなっているのである。

(この報告は雑誌サイアス2000年2月号から抜粋したものである)

VIII. 行 事

研究所の一般公開

毎年科学技術週間における行事の一環として行われる研究所の一般公開は、4月22日(土)に行われた。4つのテーマに沿った研究成果の展示、学術講演、学術映画の上映等を行い、9時30分から16時30分までの間に約3,000人の見学者が来所した。

公開講演会の開催

国立科学博物館と共催で、一般を対象とした遺伝学公開講演会を次のとおり開催した。

日 時	平成12年11月11日(土)13:30～16:00
場 所	国立科学博物館新宿分館 研修研究館4階 (東京都新宿区百人町)
共 催	国立科学博物館
後 援	財団法人遺伝学普及会
講 演	

植物ゲノムと染色体の動的編成

系統生物研究センター 助教授
農学博士 倉田 のり

【要旨】

染色体は遺伝物質の担い手であると同時に、細胞周期や発生過程を通じて染色体自身のダイナミックな動きを自ら支配しています。近年、染色体やクロマチンの細胞核の中での動きや、それを支配する原理の研究が少しずつ動き始めています。

一方、植物でもゲノムに書き込まれた遺伝情報の解明が進んできました。植物には特に異数染色体系統(半数体、トリソミクスなど)の存在、異種ゲノム染色体の共存、ゲノムの再編など、多くの遺伝学上の興味ある現象とツールが存在しています。

植物自らの個体再生や胚発生、生殖細胞形成の過程で、あるいはゲノム進化の過程で、染色体とゲノムのダイナミックで統合的な制御機構の在り方とその原理を知りたいというのが私達の研究の出発点です。ゲノム情報、人工染色体、形質転換植物、遺伝子破壊系統などを用いてどの様に研究を進めているか紹介します。

魚にみる脊椎動物の形づくり

個体遺伝研究系 教授

理学博士 武田 洋 幸

【要旨】

ヒトを含めた多細胞生物は一つの受精卵から発生して複雑な形をつくり出します。この時間とともにダイナミックに変化する発生過程は、昔も今も多くの発生学者を魅了してきました。近年の遺伝学や分子生物学の進展により、脊椎動物の複雑な発生機構が徐々に解き明かされています。発生学の研究は様々な遺伝病や癌の発症機構の解明につながるだけでなく、今後展開される再生医療の基礎的な知識を提供するものと期待されています。

私たちは、脊椎動物の初期発生機構を小型魚類であるゼブラフィッシュとメダカを用いて研究しています。これらの小型魚類は多産であり、その胚は完全に透明でしかも母体の外で発生するため、発生学や遺伝学の分野で脊椎動物の重要なモデル生物として注目されています。ここでは、中枢神経系組織と骨や筋肉の原基となる中胚葉組織の発生機構について私たちの研究を紹介します。

IX. 庶 務

A. 沿 革

昭和15年8月、京城で開催された日本遺伝学会第13回大会において、国立遺伝学研究所設立決議案が満場一致で可決された。翌16年4月に日本学術振興会内に設けられた第4特別委員会(遺伝)がこれに協力して、研究所実現の努力を続けた。昭和22年5月、日本遺伝学会は、財団法人遺伝学研究所を設立し、側面的に国立機関設置の促進に努めた。これらの努力が実を結び、昭和24年6月1日、文部省設置法が施行されて、ここに待望10年の国立遺伝学研究所が誕生した。

最初は、第1(形質遺伝)、第2(細胞遺伝)、第3(生理遺伝)の3研究部をもって発足し、事務所を文部省内に置いた。昭和24年9月、敷地として静岡県三島市富士産業株式会社所有の土地77,773平方メートルを買収するとともに、同社の建物44,452平方メートルを借り受け、12月1日研究所を現在の地に移した。昭和35,37,38年度には、従前の木造の本館を鉄筋コンクリート3階建に改築する工事が逐次進められ、昭和42年度において全館が完成した。また研究部門の構成も、昭和27年度に形質遺伝部、細胞遺伝部、生理遺伝部と改組され、さらに昭和28年度に生化学遺伝部29年度に応用遺伝部、30年度に変異遺伝部、35年度に人類遺伝部、37年度に微生物遺伝部、39年度に集団遺伝部及び44年度に分子遺伝部が増設されて10部門となり、また50年度には遺伝実験生物保存研究施設が新設された。

昭和59年4月12日、国立学校設置法の改正により、文部省所轄機関から、大学共同利用機関へ改組・転換された。これに伴って、従来から設置されていた10研究部は、研究対象のレベルに応じて分子・細胞・個体・集団の4研究系およびこれらにまたがる総合遺伝研究系の5つに区分され、昭和59年度はその中の3つの研究系に客員研究部門が設けられ、また、共同利用の核となるべき附属施設として、既存の遺伝実験生物保存研究センターの拡充がはかられ、加えて、遺伝情報研究センターが設置された。

昭和60年度には、2つの研究系の客員研究部門と、遺伝情報研究センターに合成研究室、遺伝情報分析研究室が設置された。

昭和63年度には、放射線・アイソトープセンターと遺伝情報研究センターに遺伝子ライブラリー研究室が設置された。また、7つの大学共同利用機関を母体とする総合研究大学院大学開学に伴い、生命科学研究科の遺伝学専攻を担当することになった。

平成3年度には、寄附研究部門として大量遺伝情報研究部門が設けられた。

平成5年度には、伝実験生物保存研究センターに発生工学研究室が、平成6年度には、遺伝情報研究センターに遺伝子機能研究室が設置された。

平成7年度には、生命情報研究センターが設置され、遺伝情報研究センターから遺伝情報分析研究室と遺伝子機能研究室が振替られるとともに、新に大量遺伝情報研究室と

分子分類研究室が設置された。更に、平成8年度は、遺伝情報研究センターが構造遺伝学研究センターとして改組され、超分子機能研究室、構造制御研究室、超分子構造研究室及び遺伝子回路研究室の改組に加え、生体高分子研究室が設置され、平成9年度には、遺伝実験生物保存研究センターの改組により、系統生物研究センター(マウス系統研究分野 哺乳動物遺伝研究室・発生工学研究室、イネ系統研究分野 植物遺伝研究室、大腸菌系統研究分野 原核生物遺伝研究室、無脊椎動物系統研究分野 無脊椎動物遺伝研究室の5研究室振替)及び生物遺伝資源情報総合センター(系統情報研究室振替、生物遺伝資源情報研究室設置)が設置された。

平成10年度には、個体遺伝研究系に初期発生研究部門及び総合遺伝研究系に脳機能研究部門が設置された。

B. 組織(機構と職員)

○国立学校設置法(抄)

(昭和24年5月31日法律第150号)

最終改正 平成11年12月22日法律第166号(平成13年1月6日施行)

国立学校設置法

第1章 総則

(設置及び所轄)

第1条 文部科学省に国立学校を設置する。

2 国立学校は、文部科学大臣の所轄に属する。

(国立学校)

第2条 この法律で、「国立学校」とは、学校教育法(昭和22年法律第26号)第1条に定める学校で国が設置するものをいい、第3章の3、第3章の5及び第3章の6に定める機関を含むものとする。

2 国立の小学校、中学校、高等学校、中等教育学校、盲学校、聾学校、養護学校及び幼稚園は、この法律に特別の定めをするもののほか、政令で定めるところにより、国立大学若しくは国立大学の学部又は国立短期大学に附属して設置するものとする。

第3章の3 大学共同利用機関

(大学共同利用機関)

第9条の2 大学における学術研究の発展その他政令で定める目的に資するため、大学の共同利用の機関として、政令で定めるところにより、研究所その他の機関(以下「大学共同利用機関」という。)を置く。

2 大学共同利用機関は、大学の教員その他の者で当該大学共同利用機関の目的たる研究その他の事項と同一の事項に従事するものの利用に供するものとする。

3 大学共同利用機関は、大学の要請に応じ、大学院における教育その他その大学における教育に協力することができる。

第4章 職及び職員

(国立学校の職)

第10条 各国立学校に置かれる職の種類は、文部科学省令で定める。

(国立学校に置かれる職員の任免等)

第11条 国立学校に置かれる職員の任免、懲戒その他人事管理に関する事項については、国家公務員法(昭和22年法律第120号)及び教育公務員特例法の定めるところによる。

第5章 雑則

(文部科学省への委任)

第13条 この法律又は他の法律に別段の定めのあるものを除くほか、国立学校の位置並びに組織及び運営の細目については、文部科学省令で定める。

○国立学校設置法施行令(抄)

(昭和59年6月28日政令第230号) 最終改正 平成12年6月7日

国立学校設置法施行令

(大学共同利用機関)

第5条 法第9条の2第1項の政令で定める目的は、資料の公開等一般公衆に対する教育活動の推進及び大学における教育の発展とする。

第6条 大学における学術研究の発展に資するための法第9条の2に定める大学共同利用機関(以下単に「大学共同利用機関」という。)として、次の表の上欄に掲げる機関を置き、当該機関の目的は、それぞれ同表の下欄に定めるとおりとする。

大学共同利用機関の名称	目的
国文学研究資料館	国文学に関する文献その他の資料の調査研究、収集整理及び保存
国立極地研究所	極地に関する科学の総合研究及び極地観測
宇宙科学研究所	宇宙理学及び宇宙工学の学理及びその応用の研究
国立遺伝学研究所	遺伝学に関する総合研究
統計数理研究所	統計に関する数理及びその応用の研究
国際日本文化研究センター	日本文化に関する国際的及び学際的な総合研究並びに世界の日本研究者に対する研究協力
国立天文台	天文学及びこれに関連する分野の研究・天象観測並びに曆書編製、中央標準時の決定及び現示並びに時計の検定に関する事務
核融合科学研究所	核融合プラズマに関する学理及びその応用の研究
国立情報学研究所	情報学に関する総合研究並びに学術情報の流通のための先端的な基盤の開発及び整備

○国立学校設置法施行規則(抄)

(昭和39年4月1日文部省令第11号)

最終改正 平成11年9月14日(平成12年4月1日施行)

国立学校設置法施行規則

第4章 大学共同利用機関

(位置)

第46条 大学共同利用機関の位置は、次の表に掲げるとおりとする。

大学共同利用機関の名称	位 置	大学共同利用機関の名称	位 置
国 文 学 研 究 資 料 館	東京都	核 融 合 科 学 研 究 所	岐阜県
国 立 極 地 研 究 所	東京都	国 立 情 報 研 究 所	東京都
宇 宙 科 学 研 究 所	神奈川県	岡 崎 国 立 共 同 研 究 機 構	愛知県
国 立 遺 伝 学 研 究 所	静岡県	高エネルギー加速器研究機構	茨城県
統 計 数 理 研 究 所	東京都	国 立 民 族 学 博 物 館	大阪府
国 際 日 本 文 化 研 究 セ ン タ ー	京都府	国 立 歴 史 民 俗 博 物 館	千葉県
国 立 天 文 台	東京都	メディア教育開発センター	千葉県

(組織及び運営等)

第47条 大学共同利用機関に置かれる職の種類並びに大学共同利用機関の組織及び運営の細目については、大学共同利用機関組織運営規則(昭和52年文部省令第12号)の定めるところによる。

○大学共同利用機関組織運営規則(抄)

(昭和52年4月18日文部省令第12号) 最終改正 平成12年3月31日

大学共同利用機関組織運営規則

第1章 総則

(機関の長等)

第1条 大学共同利用機関(以下「機関」という.)に、次の各号に掲げる区分に応じ、それぞれ当該各号に掲げる職員を置く。

- 一 岡崎国立共同研究機構及び高エネルギー加速器研究機構 機構長
- 二 国立極地研究所、宇宙科学研究所、国立遺伝学研究所、統計数理研究所、国際日本文化研究センター、核融合科学研究所、国立情報学研究所、岡崎国立共同研究機構に置かれる分子科学研究所、基礎生物学研究所及び生理学研究所、高エネルギー加速器研究機構に置かれる素粒子原子核研究所及び物質構造科学研究所、並びにメディア教育開発センター 所長

- 三 国文学研究資料館，国立民族学博物館及び国立歴史民俗博物館 館長
 四 国立天文台 台長
- 2 機構長は，それぞれ岡崎国立共同研究機構又は高エネルギー加速器研究機構の業務を掌理する。
- 3 所長，館長又は台長は，それぞれ所務，館務又は台務を掌理する。
 (職員の種類)

第2条 前条に掲げるもののほか，機関に次の職員を置く。

- 一 教授
 - 二 助教授
 - 三 助手
 - 四 事務職員
 - 五 技術職員
- 2 機関に，前項に掲げるもののほか，講師(非常勤の者に限る。以下同じ。)を置くことができる。
- 3 教授は，研究に従事し，及び国立大学その他の大学の大学院における教育に協力するための学生の研究指導(以下「研究指導」という。)を行う。
- 4 助教授は，教授の職務を助ける。
- 5 講師は，教授又は助教授に準ずる職務に従事する。
- 6 助手は，教授及び助教授の職務を助ける。
- 7 事務職員は，庶務，会計等の事務に従事する。
- 8 技術職員は，技術に関する職務に従事する。

(外国人研究員)

第3条 機関の長は，国家公務員法(昭和22年法律第120号)第2条第7項に規定する勤務の契約により，外国人を研究に従事させることができる。

- 2 前項の規定の実施に関し必要な事項については，別に文部科学大臣が定める。

(評議員会)

第4条 機関(岡崎国立共同研究機構及び高エネルギー加速器研究機構(以下本章において「機構」という。))に置かれる研究所を含む。以下この条において同じ。)に，それぞれ評議員会を置く。

- 2 評議員会は，それぞれ当該機関の事業計画その他の管理運営に関する重要事項について，当該機関の長に助言する。
- 3 評議員会は，評議員20人以内(機構にあつては，15人以内とする。)で組織し，評議員は，左の各号に掲げる者のうちから，文部科学大臣が任命する。
- 一 国立大学の学長
 - 二 公立又は私立の大学の学長
 - 三 その他学識経験のある者

- 4 前項の規定にかかわらず，岡崎国立共同研究機構の評議員は，岡崎国立共同研究機

構に置かれる各研究所の評議員のうちから、高エネルギー加速器研究機構の評議員は、高エネルギー加速器研究機構に置かれる各研究所の評議員及び同項各号に掲げる者のうちから、それぞれ文部大臣が任命する。

- 5 評議員の任期は、2年とし、その欠員が生じた場合の補欠の評議員の任期は、前任者の残任期間とする。
- 6 評議員は、非常勤とする。
- 7 評議員会の運営に関し必要な事項は、別に文部大臣が定める。

(運営協議員会)

第5条 機関(機構に置かれる研究所を含む。以下この条において同じ。)に、それぞれ運営協議員会を置く。

- 2 運営協議員会は、それぞれ当該機関の共同研究計画に関する事項(国立極地研究所にあっては、極地観測の実施とする。)その他の機関の運営に関する重要事項で当該機関の長が必要と認めるものについて、当該機関の長の諮問に応じる。
- 3 運営協議員会は、運営協議員21人以内で組織し、運営協議員は、当該機関の職員及び当該機関の目的たる研究と同一の研究に従事する左の各号に掲げる者のうちから、文部大臣が任命する。

- 一 国立大学の教員
- 二 公立又は私立の大学の教員
- 三 前二号に掲げる者以外の者

- 4 前項の規定にかかわらず、高エネルギー加速器研究機構の運営協議員は、高エネルギー加速器研究機構に置かれる各研究所の運営協議員、高エネルギー加速器研究機構の職員及び高エネルギー加速器研究機構の目的たる研究と同一の研究に従事する同項各号に掲げる者のうちから、文部大臣が任命する。
- 5 運営協議員の任期は、2年とし、その欠員が生じた場合の補欠の運営協議員の任期は、前任者の残任期間とする。
- 6 運営協議員は、非常勤とする。
- 7 運営協議員会の運営に関し必要な事項は、別に文部大臣が定める。

(客員教授等)

第6条 機関の長は、常時勤務の者以外の職員で当該機関の研究に従事する者又は第3条第1項の規定により研究に従事する外国人のうち、適当と認められる者に対しては、客員教授又は客員助教授を称せしめることができる。

- 2 前項の規定に関し必要な事項については、別に文部大臣が定める。

(名誉教授)

第7条 機関は、当該機関に機関の長(機構に置かれる研究所の長を含む。)、教授又は助教として勤務した者であって、当該機関の目的達成上特に功績のあった者に対し、当該機関の定めるところにより、名誉教授の称号を授与することができる。

(寄附研究部門)

第8条 機関(機関に置かれる研究所を含む.)に、寄附研究部門を設けることができる。

2 寄附研究部門に係る経費は、国立学校特別会計法(昭和39年法律第55号)第17条の規定により機関の長に経理を委任された金額をもって支弁するものとする。

3 前2項規定の実施に関し必要な事項については、別に文部大臣が定める。

(内部組織に関する委任)

第8条の2 この省令又は他の法令に別段の定めのあるものを除くほか、機関の内部組織については、その機関の長が定める。

第5章 国立遺伝学研究所

(企画調整主幹)

第28条 国立遺伝学研究所に企画調整主幹1人を置き、教授をもって充てる。

2 企画調整主幹は、所長の命を受け、国立遺伝学研究所の行う研究に係る事業の企画及び実施について総合調整する。

(内部組織)

第29条 国立遺伝学研究所に、管理部及び次の5研究系並びに技術課を置く。

- 一 分子遺伝研究系
- 二 細胞遺伝研究系
- 三 個体遺伝研究系
- 四 集団遺伝研究系
- 五 総合遺伝研究系

2 前項に掲げるもののほか、国立遺伝学研究所に研究施設を置く。

(管理部)

第30条 管理部においては、庶務、会計及び施設等に関する事務を処理する。

2 管理部に、その所掌事務を分掌させるため、文部大臣が別に定めるところにより、課を置く。

3 管理部及びこれに置かれる課に、それぞれ部長及び課長を置き、事務職員をもって充てる。

4 部長は、所長の命を受け、部の事務を掌理する。

5 課長は、上司の命を受け、課の事務を処理する。

(研究系及び研究部門)

第31条 別表第6の上欄に掲げる研究系に、それぞれ同表の下欄に掲げる研究部門を置く。

2 各研究系に研究主幹を置き、教授をもって充てる。

3 研究主幹は、所長の命を受け、当該研究系における研究及び研究指導に関し、総括し、及び調整する。

(技術課)

第32条 技術課においては、技術に関する専門的業務を処理する。

2 技術課に、課長を置き、技術職員をもって充てる。

3 課長は、所長の命を受け、課の事務を処理する。

(研究施設)

第33条 研究施設の名称は、別表第7に掲げるとおりとする。

2 研究施設に長を置き、教授又は助教授をもって充てる。

3 前項の長は、当該研究施設の業務を処理する。

別表第6(第31条関係)

国立遺伝学研究所の研究部門

研究系の名称	左欄の研究系に置く研究部門
分子遺伝	分子遺伝 変異遺伝 *核酸化学
細胞遺伝	細胞遺伝 微生物遺伝 *細胞質遺伝
個体遺伝	発生遺伝 形質遺伝 初期発生 *生理遺伝
集団遺伝	集団遺伝 進化遺伝 *理論遺伝
総合遺伝	人類遺伝 育種遺伝 脳機能 *応用遺伝

別表第7(第32条関係)

国立遺伝学研究所の研究施設

名 称
系統生物研究センター
生物遺伝資源情報総合センター
構造遺伝学研究センター
生命情報研究センター
放射線・アイソトープセンター
実験圃場

○大学共同利用機関の内部組織に関する訓令(抄)

(昭和52年4月18日文部省訓令第8号) 最終改正 平成10年4月9日

大学共同利用機関の内部組織に関する訓令

(管理部等に置かれる部、課及び室)

第1条 大学共同利用機関(以下「機関」という.)の管理部等に置かれる部、課及び室は、次の表に掲げるとおりとする。

機関の名称	部等の名称	課又は室の名称
国立遺伝学研究所	管理部	庶務課 会計課

2 前項に規定する部(管理局に置かれる部に限る.)課及び室の所掌事務に関しては、その機関の長が定め、文部大臣に報告しなければならない。

○大学共同利用機関の評議員会及び運営協議会の運営に関する規程(抄)

(平成元年6月28日文部大臣裁定)最終改正 平成9年3月31日

(趣旨)

第1 大学共同利用機関(岡崎国立共同研究機構及び高エネルギー加速器研究機構に置かれる研究所を含む。以下「機関」という.)に置かれる評議員会及び運営協議会(以下「評議員会等」という.)の運営については、この規程の定めるところによる。

(会長及び副会長)

第2 評議員会等に会長及び副会長各1人を置く。

2 評議員会の会長及び副会長は、それぞれ評議員が互選する。

3 運営協議会の会長は、運営協議員のうち当該機関の職員にある者のうちから、副会長は、運営協議員のうち当該機関の職員以外の者のうちから、それぞれ運営協議会において選出する。

4 会長は、それぞれ評議員会等の会務を総理する。

5 副会長は、それぞれの会長を補佐し、会長に事故があるときはその職務を代理し、会長が欠けたときはその職務を行う。

(招集)

第3 評議員会等は、当該機関の長の求めに応じ、会長がこれを招集する。

(議事)

第4 評議員会等は、それぞれ評議員及び運営協議員の過半数の出席がなければ、議事を開き議決をすることができない。

2 評議員会等の議事は、それぞれ出席した評議員及び運営協議員の過半数をもって決し、可否同数のときは、会長の決するところによる。

○大学共同利用機関の長等の選考基準(抄)

(昭和52年5月2日文部大臣裁定)最終改正 平成9年4月1日

(趣旨)

第1 大学共同利用機関(以下「機関」という.)の長(岡崎国立共同研究機構及び高エネルギー加速器研究機構に置かれる研究所の長を含む. 以下同じ.)の採用並びに教授、助教授及び助手の採用及び昇任の選考の基準は、これに定めるところによる。

(機関の長の選考基準)

第2 機関の長となることができる者は、次の各号の一に該当する者で、人格が高潔で学識がすぐれ、かつ、教育行政に関し識見を有する者とする。

- 一 博士の学位(外国において授与されたこれに相当する学位を含む.)を有する者で、研究教育上の指導能力があると認められる者
- 二 研究上の業績が前号の者に準ずると認められるもので、研究教育上の指導能力があると認められる者
- 三 機関又は大学(旧大学令(大正7年勅令第388号)による大学を含む. 以下同じ.)において教授の経歴のある者
- 四 学術行政に関し、高い識見を有すると認められる者

(教授の選考基準)

第3 教授となることのできる者は、次の各号の一に該当する者とする。

- 一 博士の学位(外国において授与されたこれに相当する学位を含む.)を有する者
- 二 研究上の業績が前号の者に準ずると認められる者
- 三 機関又は大学において教授の経歴のある者
- 四 機関又は大学において助教授の経歴があり、研究教育上の業績があると認められる者
- 五 研究所、試験所、調査所等に10年以上在職し、研究上の業績があると認められる者
- 六 専攻分野について、特に優れた知識及び経験を有し、研究教育上の能力があると認められる者

(助教授の選考基準)

第4 助教授となることのできる者は、次の各号の一に該当するものとする。

- 一 第3に規定する教授となることのできる者
- 二 機関又は大学において助教授又は講師の経歴がある者
- 三 機関又は大学において3年以上助手又はこれに準ずる職員としての経歴があり、研究教育上の能力があると認められる者
- 四 修士の学位(外国において授与されたこれに相当する学位を含む.)を有する者で、研究教育上の能力があると認められる者
- 五 研究所、試験所、調査所等に5年以上在職し、研究上の業績があると認められる者
- 六 専攻分野について、優れた知識及び経験を有し、研究教育上の能力があると認められる者

(助手の選考基準)

第5 助手となることのできる者は、次の各号の一に該当する者とする。

- 一 学士の学位(外国において授与されたこれに相当する学位を含む。)を有する者
- 二 前号の者に準ずる能力があると認められる者

○人事に関する権限の委任等に関する規程(抄)

(昭和32年7月22日文部省訓令)最終改正 平成11年3月31日

人事に関する権限の委任等に関する規程

(趣旨)

第1条 任命権、選考の権限その他人事に関する権限の委任等については、法令又は別に定めるもののほか、この規程の定めるところによる。

(任命権)

第3条

5 文部大臣は、次の各号に掲げる官職を除き、大学共同利用機関の長に当該機関に属する官職についての任命権を委任する。

- 一 大学共同利用機関の長、所長(岡崎国立共同研究機構及び高エネルギー加速器研究機構に置かれる研究所の長に限る。)、企画調整官及び企画調整主幹
- 二 大学共同利用機関の局長、部長(行政職俸給表(一)適用者に限る。)、次長、課長及び室長(行政職俸給表(一)適用者に限る。)
- 三 大学共同利用機関の評議員及び運営協議員
- 四 大学共同利用機関に附属する施設の長(高エネルギー加速器研究機構の加速器研究施設の長に限る。)
- 五 大学共同利用機関の創設準備室の室長、次長及び主幹

12 前各項各号に掲げる官職と同等以上の官職で文部大臣の指定するものについての任命権は、前各項の規定にかかわらず、委任しない。

13 教育公務員特例法施行令(昭和24年政令第6号)第3条の2第3項第1号の規定中「任命権者」とあるのは、教育公務員特例法(昭和24年法律第1号)第8条を準用する場合にあっては、第5項から第8項までの規定にかかわらず、文部大臣をいうものとする。

○教育公務員特例法(抄)

(昭和24年1月12日法律第1号)

最終改正 平成11年5月28日(平成12年4月1日施行)

教育公務員特例法

第1章 総則

(この法律の趣旨)

第1条 この法律は、教育を通じて国民全体に奉仕する教育公務員の職務とその責任の

特殊性に基き、教育公務員の任免、分限、懲戒、服務及び研修について規定する。

第2章 任免、分限、懲戒及び服務

第1節 大学の学長、教員及び部局長

(採用及び昇任の方法)

第4条 学長及び部局長の採用並びに教員の採用及び昇任は、選考によるものとする。

2 学長の採用のための選考は、人格が高潔で、学識がすぐれ、かつ、教育行政に関し識見を有する者について、評議会(評議会を置かない大学にあっては、教授会。以下同じ。)の議に基づき学長の定める基準により、評議会が行う。

3 学部長の採用のための選考は、当該学部の教授会の議に基き、学長が行う。

4 学部長以外の部局長の採用のための選考は、評議会の議に基づき学長の定める基準により学長が行う。

5 教員の採用及び昇任のための選考は、評議会の議に基づき学長の定める基準により、教授会(国立学校設置法第2章の2の規定によりその組織が定められた大学にあっては、人事委員会。第12条第1項において同じ。)の議に基づき学長が行う。

6 前項の選考について教授会が審議する場合において、その教授会が置かれる組織の長は、当該大学の教員人事の方針を踏まえ、その選考に関し、教授会に対して意見を述べることができる。

(休職の期間)

第7条 学長、教員及び部局長の休職の期間は、心身の故障のため長期の休養を要する場合の休職においては、個々の場合について、評議会の議に基づき学長が定める。

(任期及び停年)

第8条 学長及び部局長の任期については、評議会の議に基づき学長が定める。

2 教員の停年については、評議会の議に基づき学長が定める。

(服務)

第11条 国立大学の学長、教員及び部局長の服務について、国家公務員法(昭和22年法律第120号)第96条第1項の根本基準の実施に関し必要な事項は、同法第97条から第105条までに定めるものを除いては、評議会の議に基づき学長が定める。

(勤務成績の評定)

第12条 学長、教員及び部局長の勤務成績の評定及び評定の結果に応じた措置は、学長にあっては評議会、教員及び学部長にあっては教授会の議に基づき学長、学部長以外の部局長にあっては学長が行う。

2 前項の勤務成績の評定は、評議会の議に基づき学長が定める基準により、行わなければならない。

第3章 研修

(研修)

第19条 教育公務員は、その職責を遂行するために、絶えず研究と修養に努めなければならない。

2 教育公務員の任命権者は、教育公務員の研修について、それに要する施設、研修を奨励するための方途その他研修に関する計画を樹立し、その実施に努めなければならない。

(研修の機会)

第20条 教育公務員には、研修を受ける機会が与えられなければならない。

2 教員は、授業に支障のない限り、本属長の承認を受けて、勤務場所を離れて研修を行うことができる。

3 教育公務員は、任命権者の定めるところにより、現職のまま、長期にわたる研修を受けることができる。

第4章 雑則

(兼職及び他の事業等の従事)

第21条 教育公務員は、教育に関する他の職を兼ね、又は教育に関する他の事業若しくは事務に従事することが本務の遂行に支障がないと任命権者において認める場合には、給与を受け又は受けないで、その職を兼ね、又はその事業若しくは事務に従事することができる。

2 前項の場合においては、国家公務員たる教育公務員にあっては国家公務員法第101条第1項の規定に基き命令又は同法第104条の規定による承認又は許可を要せず、地方公務員たる教育公務員にあっては地方公務員法第38条第2項の規程により人事委員会が定める許可の基準によることを要しない。

(教育公務員以外の者に対するこの法律の準用)

第22条 国立又は公立の学校において教員の職務に準ずる職務を行う者、文部省に置かれる研究施設、文化施設及び研修施設で政令で定めるもの並びに国立学校設置法第3章の3から第3章の6までに規定する機関の長(同法第3章の3に規定する機関に置かれる研究所で政令で定めるものの長を含む。)並びにその職員のうち専ら研究又は教育に従事する者並びに国立又は公立の専修学校又は各種学校の校長及び教員については、政令の定めるところにより、この法律の規定を準用する。

○教育公務員特例法施行令(抄)

(昭和24年1月12日政令第6号)最終改正 平成10年10月30日

教育公務員特例法施行令

第3条の2 法第22条の政令で定める研究施設、文化施設及び研修施設は、文部省組織令(昭和59年政令第227号)第71条第1項及び第108条に定める施設等機関並びに国立婦人教育会館とする。

2 法第22条の政令で定める研究所は、国立学校設置法施行令(昭和59年政令第230号)第7条第2項第3項の表に掲げる研究所とする。

3 第1項に規定する機関及び国立学校設置法(昭和24年法律第150号)第3章の3から第3章の6までに規定する機関の長(前項に規定する研究所の長を含む。以下この項

において同じ。)並びにその職員のうち専ら研究又は教育に従事する者については、法第4条、第7条、第8条、第11条、第12条、第19条、第20条及び第21条中国立学校の学長及び教員に関する部分の規定を準用する。この場合において、これらの規定中「大学管理機関」とあるのは次の各号の区別に従って読み替え、これらの機関の長及びその職員をそれぞれ学長及び教員に準ずる者としこれらの規定を準用するものとする。

- 一 法第4条第1項及び第8条については、「文部省令で定めるところにより任命権者」
- 二 法第4条第2項、第7条、第11条及び第12条については、「任命権者」

職員数

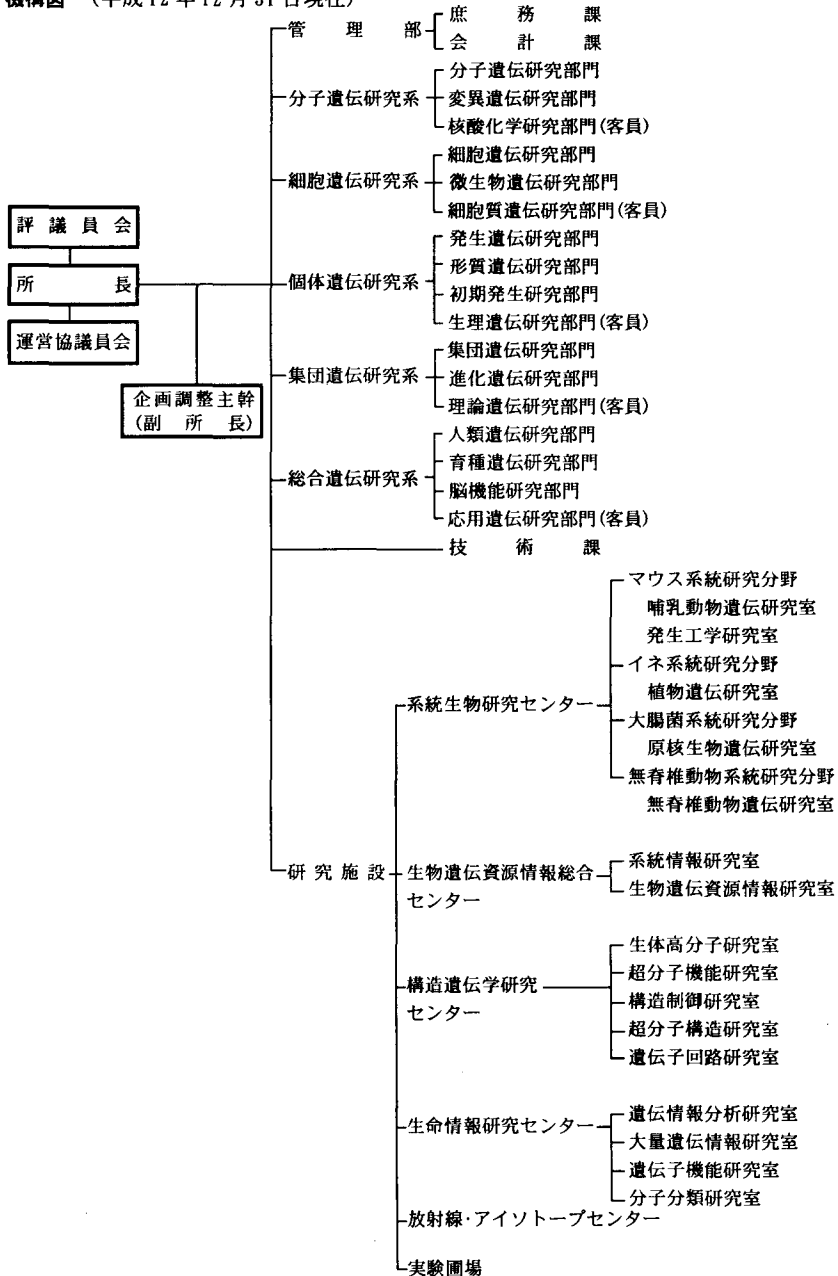
(平成12年12月31日現在)

区分	指定職	行政職(一)	教育職(一)	計
定員	1	40	79	120
現在員	1	38	68	107

所長

医学博士 堀田凱樹

機構図 (平成12年12月31日現在)



国立遺伝学研究所評議員名簿

(50音順)

(平成12年12月31日現在)

現 職	氏 名	任命年月日	備 考
国際日本文化研究センター 研 究 部 教 授	石 井 紫 郎	平成12年6月28日	
岡崎国立共同研究機構長	伊 藤 光 男	平成11年4月1日	
放 送 大 学 教 授	岩 槻 邦 男	平成12年6月28日	
国立学校財務センター所長	大 崎 仁	平成12年8月1日	
(株)生命誌研究館顧問	大 澤 省 三	平成12年6月28日	
北海道工業技術研究所主任研究官	大 塚 榮 子	"	
筑波大学名誉教授	岡 田 益 吉	"	
福井工業大学教授	京 極 好 正	"	
東京大学大学院	黒 田 玲 子	"	
総合文化研究科教授			
国立がんセンター名誉総長	杉 村 隆	"	
福 井 県 立 大 学 長	常 脇 恒 一 郎	"	
財団法人住友病院長	豊 島 久 真 男	"	
総合研究大学院大学長	廣 田 榮 治	"	
静 岡 県 立 大 学 長	廣 部 雅 昭	"	
名 古 屋 大 学 長	松 尾 稔	"	
(財)国際高等研究所副所長	松 原 謙 一	"	
学習院大学理学部教授	三 浦 謹 一 郎	"	
日 本 女 子 大 学 長	宮 本 美 沙 子	"	
岡崎国立共同研究機構 基 礎 生 物 学 研 究 所 長	毛 利 秀 雄	"	
(財)日本生物科学研究所 主 任 研 究 員	山 内 一 也	"	

国立遺伝学研究所運営協議員名簿

所外(副会長のほかは50音順)

(平成12年12月31日現在)

現 職	氏 名	任命年月日	備 考
福岡歯科大学歯学部教授	関 口 睦 夫	平成12年6月20日	副会長
神戸大学理学部教授	磯 野 克 己	"	
京都大学ウィルス研究所教授	伊 藤 維 昭	"	
東京大学医科学研究所教授	勝 木 元 也	"	
名古屋大学大学院理学研究科教授	郷 通 子	"	
九州大学生体防御医学研究所教授	笹 月 健 彦	"	
理化学研究所筑波研究所主任研究員	篠 崎 一 雄	"	
東京大学大学院理学系研究科教授	田 嶋 文 生	"	
大阪大学細胞生体工学センター教授	花 岡 文 雄	"	
お茶の水女子大学理学部教授	松 浦 悦 子	"	

所内(会長のほかは省令順)

現 職	氏 名	任命年月日	備 考
教 授 (細胞遺伝研究系)	小 川 智 子	平成12年6月20日	会 長
教 授 (分子遺伝研究系)	石 濱 明	"	
教 授 (細胞遺伝研究系)	荒 木 弘 之	"	
教 授 (個体遺伝研究系)	廣 海 健	"	
教 授 (個体遺伝研究系)	廣 瀬 進	"	
教 授 (集団遺伝研究系)	池 村 淑 道	"	
教 授 (総合遺伝研究系)	佐々木 裕之	"	
教 授 (系統生物研究センター)	城 石 俊 彦	"	
教 授 (生物遺伝資源情報総合センター)	小 原 雄 治	"	
教 授 (構造遺伝学研究センター)	桂 勲	"	
教 授 (生命情報研究センター)	五 條 堀 孝	"	

平成12年度 DNA データ研究利用委員会委員

平成12年4月1日～平成13年3月31日

氏名	所属・職
所外	
伊藤 彬	(財)癌研究会癌研究所物理部長
小笠原 直毅	奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科教授
金子 弘正	科学技術振興事業団研究基盤情報部長
金 久 實	京都大学化学研究所教授
篠崎 一雄	理化学研究所筑波研究所主任研究員
高木 利久	東京大学医科学研究所教授
田畑 哲之	(財)かずさDNA研究所植物遺伝子研究部長
長村 吉晃	農林水産省農業生物資源研究所 遺伝資源第2部DNA管理情報科長
服部 正平	理化学研究所ゲノム科学総合研究センター ゲノム塩基配列解析研究チームリーダー
水島 洋	国立がんセンター研究所がん情報研究部 がん診療支援情報研究室長

平成12年度 組換えDNA実験安全委員会委員

(所外委員のみ記載)

官職名	氏名
日本大学教授(国際関係学部)	青木 久尚
日本大学教授(国際関係学部)	大泉 光一

研究職員

(平成12年 3月31日現在)

部 門 名	官 職 名	学 位	氏 名	任用年月日
所 長	文部教官 所 長	医学博士	堀 田 凱 樹	9.10. 1
副所長 企画調整主幹 (併)	文部教官 教 授	薬学博士	小 川 智 子	(10. 4. 1)

分子遺伝研究系 研究主幹(併) 石濱 明

分子遺伝研究部門	文部教官 教 授	理学博士	石 濱 明	59. 4.12
	文部教官 助 手	理学博士	藤 田 信 之	59. 8. 1
	文部教官 助 手	理学博士	光 澤 浩	8. 2. 1
	文部教官 助 手	博士(理学)	木 村 誠	8. 4. 1
変異遺伝研究部門	文部教官 助教授	理学博士	山 尾 文 明	元 9. 1
	文部教官 助 手	博士(工学)	岸 努	5. 4. 1
	文部教官 助 手	博士(理学)	清 野 浩 明	6. 7. 1
核酸化学客員研究部門	非常勤講師	理学博士	水 本 清 久	11. 4. 1
	文部教官 助教授	理学博士	田 中 寛	12. 4. 1

細胞遺伝研究系 研究主幹(併) 荒木 弘之

細胞遺伝研究部門	文部教官 教 授	薬学博士	小 川 智 子	7. 4. 1
	文部教官 助教授	理学博士	今 井 弘 民	42. 3. 2
	文部教官 助 手	医学博士	田 中 茂 生	7.11. 1
	文部教官 助 手	博士(医学)	太 田 力	8. 4. 1
微生物遺伝研究部門	文部教官 教 授	理学博士	荒 木 弘 之	10. 1. 1
	文部教官 助教授	理学博士	安 田 成 一	51. 4. 1
	文部教官 助 手	博士(医学)	上 村 陽 一 郎	10.12. 1
細胞質遺伝客員研究部門	非常勤講師	薬学博士	富 澤 純 一	9.10. 1
	非常勤講師	医学博士 文学博士	二 木 宏 明	10. 4. 1

個体遺伝研究系 研究主幹(併) 廣瀬 進

部 門 名	官 職 名	学 位	氏 名	任用年月日
発生遺伝研究部門	文部教官 教授	理学博士	廣海 健	8.10.1
	文部教官 助教授	Ph.D.	藤澤 敏孝	49.4.1
	文部教官 助手	工学博士	清水 裕	60.6.16
	文部教官 助手	博士(理学)	服田 昌之	4.2.1
	文部教官 助手	博士(医学)	岡部 正隆	9.8.1
	文部教官 助手	博士(理学)	細谷 俊彦	10.3.1
形質遺伝研究部門	文部教官 教授	理学博士	廣瀬 進	61.6.1
	文部教官 助教授	農学博士	上田 均	62.10.1
	文部教官 助手	理学博士	湊 清	42.5.1
	文部教官 助手	農学博士	山田 正明	40.6.1
初期発生研究部門	文部教官 教授	理学博士	武田 洋幸	11.3.16
	文部教官 助手	理学博士	川上 厚志	
生理遺伝客員研究部門	文部教官 助教授	理学博士	白川 昌宏	11.4.1
	非常勤講師	理学博士	木山 亮一	12.4.1

集団遺伝研究系 研究主幹(併) 池村 淑道

集団遺伝研究部門	文部教官 助手	理学博士	高野 敏行	5.3.16
進化遺伝研究部門	文部教官 教授	理学博士	池村 淑道	60.4.1
	文部教官 助教授	Ph.D. 博士(理学)	齊藤 成也	3.1.16
	文部教官 助手	博士(農学)	天前 豊明	6.4.1
	文部教官 助手	博士(理学)	深川 竜郎	11.3.1
理論遺伝客員研究部門	文部教官 教授	理学博士	近藤 滋	12.4.1
	非常勤講師	工学博士	北野 宏明	10.4.1

総合遺伝研究系 研究主幹(併) 佐々木 裕之

部 門 名	官 職 名	学 位	氏 名	任用年月日
人類遺伝研究部門	文部教官 教授	医学博士	佐々木 裕之	10.12.1
	文部教官 助教授	理学博士	藤山 秋佐夫	62.12.16
	文部教官 助手	博士(理学)	佐 渡 敬	11.5.16
育種遺伝研究部門	文部教官 助教授	理学博士	角 谷 徹 仁	12.4.1
脳機能研究部門	文部教官 助教授	博士(医学)	平田たつみ	11.3.16
	文部教官 助手	博士(理学)	川 崎 能 彦	11.12.1
応用遺伝客員研究部門	文部教官 教授	農学博士	長 戸 康 郎	10.4.1
	文部教官 教授	理学博士	高 木 信 夫	12.4.1

研究施設

系統生物研究センター センター長(併) 城石 俊彦

(マウス系統研究分野)				
哺乳動物遺伝研究室	文部教官 教授	理学博士	城石 俊彦	59.9.16
	文部教官 助手	博士(医学)	小 出 剛	7.4.1
発生工学研究室	文部教官 教授	理学博士	相賀 裕美子	12.10.1
(イネ系統研究分野)				
植物遺伝研究室	文部教官 助教授	農学博士	倉 田 の り	8.10.1
	文部教官 助手	博士(農学)	伊 藤 幸 博	7.4.1
(大腸菌系統研究分野)				
原核生物遺伝研究室	文部教官 助教授	農学博士	西 村 昭 子	49.5.16
(無脊椎動物系統研究分野)				
無脊椎動物遺伝研究室	文部教官 教授	理学博士	林 茂 生	2.7.1
	文部教官 助手	博士(理学)	後 藤 聡	7.4.1

生物遺伝資源情報総合センター センター長(併) 小原 雄治

系統情報研究室	文部教官 助教授	理学博士	山崎 由紀子	7.5.1
	文部教官 助手	工学博士	藤 田 昌 也	6.4.1
生物遺伝資源情報研究室	文部教官 教授	理学博士	小原 雄 治	元 3.1
	文部教官 助手	理学博士	安 達 佳 樹	4.4.1

構造遺伝学研究センター センター長(併) 桂 勲

部 門 名	官 職 名	学 位	氏 名	任用年月日
生体高分子研究室	文部教官 教授	理学博士	徳永 万喜洋	9. 7. 1
	文部教官 助手	博士(理学)	椎 名 伸 之	12. 4. 1
超分子機能研究室	文部教官 教授	理学博士	嶋 本 伸 雄	63. 7. 16
	文部教官 助手	博士(情報科学)	十川久美子	12. 2. 16
	文部教官 助手	理学博士	(永井宏樹)	4. 4. 1
構造制御研究室	文部教官 教授	理学博士	桂 勲	3.12. 1
	文部教官 助手	博士(理学)	石 原 健	4. 4. 1
超分子構造研究室	文部教官 助教授	理学博士	白木原康雄	7. 8. 15
	文部教官 助手	博士(理学)	前 仲 勝 実	
遺伝子回路研究室	文部教官 助手	博士(理学)	今 本 尚 子	

* (永井 宏樹)研究休職中

生命情報研究センター センター長(併) 五條堀 孝

遺伝情報分析研究室	文部教官 教授	理学博士	五條堀 孝	58. 9. 1
	文部教官 助手	博士(理学)	池 尾 一 穂	4. 6. 1
	文部教官 助手	博士(理学)	今 西 規	6. 4. 1
大量遺伝情報研究室	文部教官 教授	理学博士	西 川 建	7.10. 1
	文部教官 助手	博士(理学)	太 田 元 規	8. 8. 1
遺伝子機能研究室	文部教官 教授	Ph. D. 理学博士	館 野 義 男	63. 4. 1
	文部教官 助手	学術博士	小 林(深海) 薫	8. 4. 1
分子分類研究室	文部教官 教授	工学博士	菅 原 秀 明	8. 2. 1
	文部教官 助手	博士(理学)	宮 崎 智	8. 8. 1

放射線・アイソトープセンター センター長(併) 石濱 明

実験圃場 圃場長(併) 倉田 のり

	文部教官 助手	博士(農学)	野々村 賢一	8.10. 1
--	---------	--------	--------	---------

名譽教授

氏 名	職 名	称号授与年月日
三 浦 謹一郎	学習院大学生命分子科学研究所長	63. 7. 5
松 永 英	元国立遺伝学研究所長	2. 2. 22
黒 田 行 昭	元国立遺伝学研究所教授	2. 7. 9
森 脇 和 郎	総合研究大学院大学副学長	7. 4. 1
杉 山 勉	石巻専修大学理工学部教授	8. 4. 1
瀬 野 悍 二	元国立遺伝学研究所教授	8. 4. 1
堀 内 賢 介	元国立遺伝学研究所教授	9. 4. 1
原田(太田) 朋子	元国立遺伝学研究所教授	9. 4. 1
富 澤 純 一	国立遺伝学研究所客員教授	9.10. 1
今 村 孝	元国立遺伝学研究所教授	10. 4. 1
冲野(森島) 啓子	元国立遺伝学研究所教授	10. 4. 1

名譽所員

氏 名	職 名	称号授与年月日
大 島 長 造	元国立遺伝学研究所生理遺伝部長	54. 4. 1
田 島 彌 太 郎	元国立遺伝学研究所長	58.10. 4

事務職員（管理部）

職 名	氏 名	任用年月日
管 理 部 長	上 隅 清 孝	12. 4. 1
庶 務 課 長	小 林 彰	10. 7. 1
会 計 課 長	高 橋 昭 二	12. 4. 1
庶務課課長補佐	山 田 勝 久	11. 4. 1
会計課課長補佐	佐 藤 隆 司	9. 4. 1
庶 務 係 長	秋 山 啓 剛	11. 4. 1
人 事 係 長	佐 藤 忠 弘	10. 4. 1
研 究 協 力 係 長	新 田 清 隆	5. 1. 1
共 同 研 究 係 長	芝 本 文 明	12. 4. 1
情 報 資 料 係 長	赤 川 哲 朗	12. 4. 1
總 務 係 長	引 地 光 夫	7. 4. 1
經 理 係 長	安 藤 又 己	11. 7. 1
用 度 係 長	坂 本 和 浩	12. 4. 1
管 財 係 長	梅 澤 三 郎	10. 4. 1
施 設 係 長	前 田 佳 宏	4. 4. 1
庶 務 主 任	土 屋 雅 義	7. 4. 1
經 理 主 任	中 荒 江 覺	12. 4. 1
用 度 主 任	齋 藤 勝 麗	10. 4. 1
人 事 係 員	片 瀬 綾 子	11. 4. 1
共 同 研 究 係 員	山 田 恵 子	10. 4. 1
總 務 係 員	渡 邊 晃	10. 4. 1
施 設 係 員	宮 原 一 樹	12. 3. 16
共同研究係員(併)	藤 井 真 貴 子	10. 4. 1

技術職員（技術課）

職 名	氏 名	任用年月日
技 術 課 長	石井百合子	12. 4. 1
動 物 班 長	境 雅 子	47.12. 5
植 物・微 生 物 班 長	原 登 美 雄	46. 9. 1
機 器 班 長	谷 田 勝 教	63. 4. 1
動 物 班 第 一 技 術 係 長		
動 物 班 第 二 技 術 係 長		
植 物・微 生 物 班 第 一 技 術 係 長	永 口 貢	63. 4. 1
植 物・微 生 物 班 第 二 技 術 係 長		
機 器 班 第 一 技 術 係 長	芹 川 祐 毅	35. 4. 1
機 器 班 第 二 技 術 係 長		
動 物 班 第 一 技 術 係 員	谷 口 美 佐 子	9. 4. 1
動 物 班 第 二 技 術 係 員	陣 内 寅 佳	10.11. 1
動 物 班 第 二 技 術 係 員	水 品 洋 一	11. 4. 1
動 物 班 第 二 技 術 係 員	古 海 弘 康	11. 5. 1
植 物・微 生 物 班 第 一 技 術 係 員	宮 林 登 志 江	2. 4. 1
植 物・微 生 物 班 第 一 技 術 係 員	三 浦 明 日 香	11. 4. 1
植 物・微 生 物 班 第 二 技 術 係 員	村 松 佐 知 子	10. 4. 1
植 物・微 生 物 班 第 二 技 術 係 員	坂 季 美 子	11. 4. 1
機 器 班 第 一 技 術 係 員	芹 川 東 三 夫	36. 4.16
機 器 班 第 二 技 術 係 員	大 石 あ か ね	8.11. 1

退職者 転出者等

職 名	氏 名	在職期間	備 考
構造遺伝学研究センター助手	齋藤哲一郎	9. 9. 1～ 12. 2.28	京都大学再生医科学 研究所助教授
会計課長	小 関 賢 三	10. 4. 1～ 12. 3.31	定年退職
個体遺伝研究系助教授	村 上 昭 雄	40.11.16～ 12. 3.31	停年退職
系統生物研究センター 助手	多 田 高	10.12.1～ 12. 3.31	京都大学再生医科学 研究所助手

職名	氏名	在職期間	備考
細胞遺伝研究系助手	太田 力	8. 4. 1～ 12. 3. 31	国立がんセンター研究所病理部 第三組織病理研究室長
個体遺伝研究系助手	服田昌之	4. 2. 1～ 12. 10. 1	お茶の水女子大学助教授
管理部長	砂田 箏	9. 11. 2～ 12. 3. 31	岡崎国立共同研究機構 総務部長
庶務係長	酒井清人	61. 4. 1～ 12. 3. 31	静岡大学学務部留学生課 専門員
総務係長	八木悟司	6. 4. 1～ 12. 3. 31	静岡大学経理部主計課 管財係長
経理係長	橋本 登	9. 10. 1～ 12. 3. 31	静岡大学契約室調達 第二係長
用度係長	岩崎久治	9. 4. 1～ 12. 3. 31	静岡大学経理課 情報企画係長
施設係員	上田敏史	4. 4. 1～ 12. 3. 31	国立天文台管理部施設課 設備係

平成12年度外国人研究員の受入

氏名	所属	研究課題	受入れ研究部門等	研究期間
Alexeev Andrei Alexeevich		真核生物のSOS応答に 関与する遺伝子の発現 制御機構に関する研究	細胞遺伝研究部門	平11. 6. 1～ 平12. 5. 31
金 衝 坤	慶北大学校農業 科学技術研究所	陸上甲虫オサムシの分 化系統と形態進化	進化遺伝研究部門	平12. 4. 1～ 平13. 3. 31
Salina Elena Artemovna	ロシア科学アカデミ 細胞学・遺伝学 研究所	穀類ゲノムの構造、 機能の比較解析と その利用	植物遺伝研究室	平12. 7. 15～ 平12. 10. 14
Hayward Ri- chard Scott	インハール大学	大腸菌主要σ因子 のアミロイドジェネシスに よる環境センシング	超分子機能研究室	平12. 7. 3～ 平12. 9. 30
Kolpashchikov Dmitry M.	ロシア科学アカデミ 生物有機科学研究所	転写装置の分子解剖	分子遺伝研究部門	平12. 9. 9～ 平13. 3. 31
劉 慶 信		ショウジョウバエの発 生における転写因 子TDFの役割	形質遺伝研究部門	平12. 10. 1～ 平13. 9. 30
Ozoline Olga N.	ロシア科学アカデミ 細胞生物物理学 研究所	転写装置の機能制 御機構	分子遺伝研究部門	平13. 1. 4～ 平13. 3. 31

大学院生（特別共同利用研究員）

氏名	研究課題	所属	受入期間
押海裕之	DNA 傷害と修復と減数分裂期組換え開始に関する MRE11 遺伝子の機能解析	大阪大学大学院 理学研究科	2000.4.1～ 2001.3.31
岩波将輝	神経発生における FGF シグナルの役割	東京慈恵会医科大学 大学院医学研究科	2000.5.1～ 2001.3.31
河村憲良	カイウミヒドラ発生制御因子の研究	石巻専修大学大学院 理工学研究科	2000.4.1～ 2001.3.31
神藤智子	小型魚類ゼブラフィッシュを用いた脊椎動物器官形成の分子メカニズム	名古屋大学大学院 理学研究科	2000.4.1～ 2001.3.31
澤田篤志	ゼブラフィッシュ体節形成における MesP 遺伝子の機能解析	名古屋大学大学院 理学研究科	2000.4.1～ 2001.3.31
新屋みのり	ゼブラフィッシュ胚を用いた頭部形態形成に関する解析	名古屋大学大学院 理学研究科	2000.4.1～ 2001.3.31
富木 毅	脳神経系遺伝子の系統解析	明治大学大学院 農学研究科	2000.4.1～ 2001.3.31
ワヒュー ブルボワント	ゲノムインプリンティングドメインの構造特性に関する研究	九州大学大学院 医学系研究科	2000.4.1～ 2001.3.31
佐藤泰史	嗅索形成機構の解析	名古屋大学大学院 理学研究科	2000.4.1～ 2001.3.31
矢田有加里	軸前側多指症を示すマウス突然変異体 X-linked polydactyly (xpl) 及び luxate (lx) の解析	お茶の水女子大学 大学院人間文化研究科	2000.4.1～ 2001.3.31
古瀬民生	野生由来マウス系統を用いた栄養摂取に関する行動遺伝学的研究	東京農工大学大学院 連合農学研究科	2000.4.1～ 2001.3.31
藤島博史	大腸菌の Ap4A 結合蛋白 HIT の解析	東京大学大学院 農学生命科学研究科	2000.4.1～ 2001.3.31
白木岐奈	Drosophila mab-21 ホモログの解析	奈良先端科学技術大学院 大学バイオサイエンス研究科	2000.4.1～ 2001.3.31
古田満衣子	核一細胞質間機能分子の輸送機構	大阪大学大学院 医学系研究科	2000.7.1～ 2001.3.31
梶田 睦	力学モデルに基づく線虫の初期形態発生のシミュレーションに関する研究	東京工業大学大学院 総合理工学研究科	2000.11.1～ 2001.9.30
鈴木健司	微生物ゲノム情報の情報学的研究	奈良先端科学技術大学院 大学バイオサイエンス研究科	2000.4.1～ 2001.3.31
柏木健司	フラボノイド生合成に関連した酵素タンパクの構造予測	静岡県立大学大学院 薬学研究科	2000.4.1～ 2001.3.31

大学院生（特別共同利用研究員）

氏名	研究課題	所属	受入期間
山市嘉治	バクテリア染色体の分配機構 とこれに関わる染色体領域の 研究	熊本大学大学院 医学研究科	2001.1.15～ 2001.9.30

受託研究員

氏名	所属会社名又は機関名	研究題目	受入れ研究部門等	研究期間
小見山智義	湧永製薬株式会社 広島事業所	鳥類，特に鶏の遺伝 情報分析と文化的背 景を含めた家禽過程 の考察	生命情報研究セ ンター	2000.4.1～ 2001.3.31
福地佐斗志	科学技術振興事業団 研究基盤情報部	遺伝子産物同定シス テム研究開発，Gene Catalog システム構築	生命情報研究セ ンター	2000.4.1～ 2001.3.31
川端 猛	科学技術振興事業団 研究基盤情報部	遺伝子産物同定シス テム研究開発，Gene Catalog システム構 築	生命情報研究セ ンター	2000.4.1～ 2001.3.31
中出 晋介	科学技術振興事業団	遺伝子産物同定シス テムの研究	系統生物研究セ ンター	2000.4.1～ 2001.3.31
本間 桂一	科学技術振興事業団	遺伝子産物同定シス テム研究開発，Gene Catalog システム構築	生命情報研究セ ンター	2000.10.1～ 2001.3.31
西尾 陽介	味の素株式会社・発 酵技術研究所	微生物ゲノム配列解析	生命情報研究セ ンター	2001.1.22～ 2001.3.31

C. 土地及び建物

(平成12年12月31日現在)

土地総面積	105,313m ²
(内訳) 研究所敷地	96,069m ²
宿舎敷地	9,244m ²
建物総面積(建面積)	13,142m ²
(延べ面積)	28,971m ²

建物内訳

区 分	構 造	数 量 (m ²)		建 築 年月日
		建 面 積 (m ²)	延 べ 面 積 (m ²)	
本館	鉄筋コンクリート造り3階建	1,602	4,763	S36. 9.19
自動車車庫	木造かわらぶき平屋建	52	52	S26.10. 1
公務員宿舎(21棟)	木造かわらぶき平屋建	1,250	1,250	S26.~40.
放射線実験室	鉄筋平屋建一部地下室	392	535	S31. 3.25
特別蚕室	ブロック造り一部地下	194	218	S35. 3.20
ポイラー室	鉄骨造り平屋建	97	97	S39. 3.30
研修室	鉄筋コンクリート造り2階建 屋根鉄板葺	233	465	S40.10.31
渡り廊下(本館~研修室)	鉄骨造り屋根防水モルタル塗	8	8	S40.10.31
ファイロン温室(2棟)	鉄骨造りファイロン張平屋建	284	284	S42. 1.10
堆肥舎	鉄筋造り波型スレート葺平屋建	128	128	S42. 1.10
孵卵育雛舎	鉄筋コンクリート造り平屋建	290	290	S42. 3.30
鶏糞処理小屋	ブロック造り平屋建	6	6	S44. 7. 9
麦温室	鉄骨一部補強コンクリート ブロック造り平屋建	146	146	S44.10.15
図書館	鉄筋コンクリート造り3階建	258	803	S46. 3.25
ネズミ飼育舎	鉄筋コンクリート造り平屋建	539	557	S47. 3.25
水源ポンプ小屋	鉄骨造り平屋建	5	5	S47.12.20
内部照射実験棟及び 附属棟	鉄筋コンクリート造り平屋建	591	645	S50. 3.10
系統生物研究センター棟	鉄筋コンクリート造り2階建	370	739	S53. 7.31
機械棟	鉄骨造り平屋建	380	380	S53. 7.31
廃棄物保管庫	鉄筋コンクリート造り平屋建	46	46	S54. 3.15
ネズミ附属棟	"	388	388	S55. 3.15
カイク附属棟	"	254	254	S55. 3.15
微生物附属棟	"	263	263	S56. 3.15
排水処理棟	"	56	56	S58. 3.17
組換えDNA実験棟	鉄筋コンクリート造り2階建	79	158	S59. 3.15
野生イネ温室	鉄骨平屋建一部鉄筋コンクリート	185	185	S59. 3.15
動物飼育装置上屋	鉄骨平屋建	32	32	S59. 1. 9

実験圃場管理棟	鉄筋コンクリート造り平屋建	407	407	S60. 3.28
焼却炉上屋	鉄筋造り波型スレート葺平屋建	22	22	S61.10.31
構造遺伝学研究センター棟	鉄筋コンクリート造り5階建	446	1,855	S62. 2.12
隔離温室	鉄筋コンクリート造り及び鉄骨造り平屋建	300	300	S62. 2.12
水田温室	"	183	183	S62. 3.27
桑温室	鉄骨造り及び鉄筋コンクリート造り平屋建	305	305	S62. 3.27
ベレット温室	鉄骨造り平屋建	93	93	S63.12.15
R I 実験棟	鉄筋コンクリート造り5階建	563	2,382	S63.12.15
中央機械室	鉄筋コンクリート造り平屋建	344	346	S63.12.15
R I ポンプ室	"	30	30	S63.12.15
テニスコートシャワー室	"	11	11	H 2. 3.27
屋外便所	ブロック造り平屋建	5	5	H 3. 3.26
研究員宿泊施設	鉄筋コンクリート造り3階建	346	807	H 4. 5. 1
廃棄物保管庫	ブロック造り平屋建	58	58	H 5. 3.30
研究実験棟	鉄筋コンクリート造り7階建	561	3,907	H 7. 3.10
渡り廊下(本館→実験棟)	鉄骨造り	41	41	H 7. 3.13
電子計算機棟	鉄筋コンクリート造り3階建	347	1,064	H 8. 3.25
系統生物研究センター棟	鉄筋コンクリート造り4階建	384	1,594	H 9. 3.25
生命情報研究センター棟	鉄筋コンクリート造り5階建	546	2,786	H10. 3.20
渡り廊下(電算棟→生命情報)	鉄骨造り	22	22	H10. 3.20
計		13,142	28,971	

D. 予 算 (平成12年度当初予算(項)研究所)

人件費	858,328(単位:千円)
物件費	2,195,097
合計	3,053,425

E. 奨学寄附金・受託研究費

平成12年奨学寄附金受入

奨学寄附金 54,850千円

寄附者の住所、職業及び氏名 (法人の場合は、法人名、主たる 事務所の所在地及び代表者名)	寄附金歳入 納付額	寄附の目的及び条件
東京都豊島区高田3丁目26番3号 財団法人上原記念生命科学財団 理事長 上原 昭二	5,000,000円	学術研究助成
東京都豊島区高田3丁目26番3号 財団法人上原記念生命科学財団 理事長 上原 昭二	5,000,000円	学術研究助成
東京都中央区京橋1丁目15番1号 味の素株式会社 研究開発戦略室長 湯川利秀	1,000,000円	研究助成のため
静岡県三島市谷田1111 国立遺伝学研究所 初期発生研究部門 武田洋幸	4,000,000円	ゼブラフィッシュ胚を用いた 脊椎動物中枢神経の発生機構 の解明
静岡県三島市谷田1111 国立遺伝学研究所 初期発生研究部門 武田洋幸	500,000円	ゼブラフィッシュを用いた脊 椎動物中枢神経発生における 領域特異性の獲得機構
静岡県三島市谷田1111 国立遺伝学研究所 生体高分子研究室 徳永万喜洋	3,300,000円	「プローブ顕微鏡下の1分子技 術による生体分子未知機能の 探索」研究のため
静岡県三島市谷田1111 国立遺伝学研究所 初期発生研究部門 武田洋幸	4,500,000円	ゼブラフィッシュを用いた脊 椎動物中枢神経発生における 領域特異性の獲得機構

神奈川県川崎市中原区上小田中4丁目1番1号 富士通株式会社 代表取締役社長 秋草 直之	10,000,000円	遺伝学の振興のため
三島市谷田1111 国立遺伝学研究所 初期発生研究部門 武田洋幸	5,500,000円	ゼブラフィッシュを用いた脊椎動物中枢神経発生における領域特異性の獲得機構
東京都世田谷区下馬6-12-11 森脇 和洋	100,000円	遺伝学研究助成のため
東京都中央区京橋1丁目15番1号 味の素株式会社 研究開発戦略室長 湯川利秀	1,000,000円	研究助成のため
三島市谷田1111 国立遺伝学研究所 初期発生研究部門 武田洋幸	3,500,000円	ゼブラフィッシュを用いた脊椎動物中枢神経発生における領域特異性の獲得機構
三島市谷田桜ヶ丘1171-195 財団法人遺伝学普及会 会長 森脇 和洋	150,000円	人類遺伝研究部門助手 佐渡 敬への研究助成(海外渡航費)
三島市谷田1111 国立遺伝学研究所 初期発生研究部門 武田洋幸	1,000,000円	ゼブラフィッシュを用いた脊椎動物中枢神経発生における領域特異性の獲得機構
東京都中央区日本橋3-15-5 第一化学薬品株式会社 開発企画部 稲葉 純一	500,000円	学術研究助成
三島市谷田1111 国立遺伝学研究所 初期発生研究部門 武田洋幸	2,000,000円	ゼブラフィッシュを用いた脊椎動物中枢神経発生における領域特異性の獲得機構

三島市谷田1111 国立遺伝学研究所 変異遺伝研究部門 山尾文明	1,300,000円	ユビキチン系における分子識別と 細胞機能制御の研究
三島市谷田1111 国立遺伝学研究所 超分子機能研究室 十川久美子	1,500,000円	1分子操作によるDNAタンパク質 のスライディング様式の研究
東京都豊島区高田3丁目26番3号 財団法人上原記念生命科学財団 理事長 上原 昭二	5,000,000円	学術研究助成
合 計	54,850,000円	

平成12年受託研究受入

産学連携等研究費 558,606,350円

研究題目	代表者・所属・氏名	研究期間	委託者	産学連携等 研究費 円
発生におけるパターン形成機構	系統生物研究センター 助手 林 茂生	2000. 4. 3～ 2001. 3. 31	日本学術振興会	36,000,000
クロマチン構造を介した転写組換え制御機構の解明	細胞遺伝研究部門 助手 太田 力	2000. 4. 3～ 2001. 3. 31	日本学術振興会	19,000,000
遺伝子不活化の分子遺伝学的解析	育種遺伝研究部門 助教授 角谷 徹仁	2000. 4. 3～ 2001. 3. 31	科学技術振興事業団	1,000,000
ENU, chlorambucil-mutagenesisによる高発がん感受性マウス系統の開発と未知のがん感受性遺伝子の単離, 同定の研究	系統生物研究センター 教授 城石 俊彦	2000. 4. 3～ 2001. 3. 31	医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構	10,000,000
エイズワクチン及びその評価動物モデルの開発におけるウイルスの遺伝子解析とデータベースの構築に関する研究	生命情報研究センター 教授 五條堀 孝	2000. 4. 3～ 2001. 3. 31	医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構	4,000,000
穀類細胞への新たな遺伝子導入法の開発	実験圃場 助手 野々村賢一	2000. 4. 3～ 2001. 3. 31	生物系特定産業技術研究推進機構	54,638,000

研究題目	代表者・所属・氏名	研究期間	委託者	産学連携等 研究費
リソース群の系統保存及び網羅的温度感受性株の変異位置の同定	系統生物研究センター 助教手 西村 昭子	2000. 4.13 ~ 2001. 3.31	科学技術振興 事業団	円 1,100,000
遺伝子産物同定システム研究開発, Gene Catalog システム構築	生命情報研究センター 教授 西川 建	2000. 4.14 ~ 2001. 3.31	科学技術振興 事業団	2,800,000
神経軸索の伸長経路を決める道標細胞の発現分子の検索	脳機能研究部門 助教授 平田 たつみ	2000. 4.14 ~ 2001. 3.31	科学技術振興 事業団	1,000,000
野生マウスの体内回路網形態と行動	系統生物研究センター 助手 小出 剛	2000. 4.14 ~ 2001. 3.31	科学技術振興 事業団	1,000,000
ゲノム全遺伝子の発現ヒエラルキー決定機構の解明	分子遺伝研究部門 教授 石濱 明	2000. 4.25 ~ 2001. 3.31	科学技術振興 事業団	6,930,000
DNA複製開始からDNA鎖伸長過程への移行機構	微生物遺伝研究部門 教授 荒木 弘之	2000. 4.26 ~ 2001. 3.31	科学技術振興 事業団	1,000,000
線虫全発生過程の遺伝子発現プログラム	生物遺伝資源情報 総合センター 教授 小原 雄治	2000. 4.26 ~ 2001. 3.31	科学技術振興 事業団	6,050,000

研究題目	代表者・所属・氏名	研究期間	委託者	産学連携等 研究費
gcm タンパクの 転写調節機能	所 長 堀田 凱樹	2000. 5. 10 ~ 2001. 3. 31	科学技術振興 事業団	円 3,960,000
組換えウイルス の分子進化の数 学的解析に關す る研究	生命情報研究センター 教 授 五條堀 孝	2000. 5. 11 ~ 2001. 3. 31	理化学研究所	4,458,000
データ抽出・分 類・同定ワーク ベンチに關する 研究	系統生物研究センター 教 授 菅原 秀明	2000. 5. 22 ~ 2001. 3. 31	科学技術振興 事業団	11,020,000
遺伝子発現と機 能に關する抗体 を用いたタンパ ク質レベルでの 網羅的及び体系 的解析法の開発	生物資源情報総合 センター 教 授 小原 雄治	2000. 5. 22 ~ 2001. 3. 31	株式会社医学 生物学研究所	29,611,000
発生分化におけ る情報分子の濃 度勾配と遺伝子 発現	発生遺伝研究部門 助教授 藤澤 敏孝	2000. 5. 29 ~ 2001. 3. 30	財団法人日本 宇宙フォーラ ム	5,213,000
魚類中枢神経系 の発達における 繊維芽細胞増殖 因子(FGF)の役割	初期発生研究部門 教 授 武田 洋幸	2000. 6. 12 ~ 2001. 3. 15	農林水産技術 会議	4,500,000
神経回路網形成 に關与する新た な遺伝子の同定	発生遺伝研究部門 教 授 広海 健	2000. 6. 13 ~ 2001. 3. 31	科学技術振興 事業団	132,000

研究題目	代表者・所属・氏名	研究期間	委託者	産学連携等 研究費
嗅覚回路形成機構の解析	脳機能研究部門 助教授 平田 たつみ	2000. 6. 19 ~ 2001. 3. 31	科学技術振興 事業団	円 330,000
魚類における中胚葉誘導と体節の形成・分化の分子機構の解明	初期発生研究部門 教授 武田 洋幸	2000. 7. 11 ~ 2001. 3. 2	養殖研究所	3,065,000
不稔遺伝子群の網羅的単離と不稔特性による機能分類	系統生物研究センター 助教授 倉田 のり	2000. 7. 24 ~ 2001. 3. 23	農業生物資源 研究所	4,061,000
遺伝子の分離ゆがみを引き起こす原因遺伝子の単離と機能解明	系統生物研究センター 助教授 倉田 のり	2000. 7. 24 ~ 2001. 3. 23	農業生物資源 研究所	3,927,000
遺伝子発現のエピジェネティック制御	育種遺伝研究部門 助教授 角谷 徹仁	2000. 8. 7 ~ 2001. 3. 23	農業生物資源 研究所	4,065,000
オーガンリソースとしての中胚葉と器官形成クロックの研究	初期発生研究部門 教授 武田 洋幸	2000. 8. 24 ~ 2001. 3. 31	国立医薬品食 品衛生研究所	170,542,000
ドラフト配列の情報の各染色体毎の整理や管理に適したデータベースの構築に関する研究	生命情報研究センター 教授 五條堀 孝	2000. 9. 19 ~ 2001. 3. 31	学校法人 東海大学	21,648,000

研究題目	代表者・所属・氏名	研究期間	委託者	産学連携等 研究費
線虫の遺伝子間相互作用に関する実験研究	生物遺伝資源情報総合センター 教授 小原 雄治	2000.11.28～ 2001. 3.31	宝酒造株式会社	円 12,973,000
DNA はいかにして分配されていくのか?	放射能・アイソトープセンター 助教授 仁木 宏典	2000.11. 8～ 2001. 3.31	科学技術振興事業団	500,000
加齢疾患の発症、症状の個体差に関与する遺伝子素因の研究	系統生物研究センター 教授 城石 俊彦	2000.12.13～ 2001. 3.31	科学技術振興事業団	550,000
オオムギゲノム機能の開発と制御	生物遺伝資源情報総合センター 助教授 山崎由紀子	2000.12.21～ 2001. 3.31	科学技術振興事業団	110,000
ショウジョウバエで単離する生殖細胞決定因子のマウスホモログの単離および機能解析	系統生物研究センター 教授 相賀裕美子	2000.12.25～ 2001. 3.31	科学技術振興事業団	25,960,000
合成DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現頻度解析	生命情報研究センター 教授 五條堀 孝	2001. 2. 8～ 2001. 3.31	社団法人バイオ産業コンソーシアム	19,999,350
新しいコンソミック系統の樹立に関する研究	系統生物研究センター 教授 城石 俊彦	2001. 2.22～ 2001. 3.31	財団法人実験動物中央研究所	49,278,000

研究題目	代表者・所属・氏名	研究期間	委託者	産学連携等 研究費
遺伝子多型情報のデータベース構築	生物遺伝資源情報総合センター 助教授 山崎由紀子	2001. 2. 22～ 2001. 3. 31	財団法人実験動物中央研究所	円 10,500,000
コンソミック系統を用いた高次機能遺伝子の解析システム	系統生物研究センター 教授 小出 剛	2001. 2. 22～ 2001. 3. 31	財団法人実験動物中央研究所	27,686,000

F. 日 誌

1月26日	第69回運営協議員会
3月22日	第70回運営協議員会
3月29日	第32回評議員会
4月22日	一般公開
6月12日	第71回運営協議員会
6月28日	第33回評議員会
9月28日	第72回運営協議員会
10月26日	第52回大学共同利用機関等管理部課長会議(庶務系)
11月11日	公開講演会

教授会 議

1月11日	第287回	1月25日	第288回
2月8日	第289回	2月29日	第290回
3月21日	第291回	4月11日	第292回
4月25日	第293回	5月8日	第294回
5月22日	第295回	6月6日	第296回
6月20日	第297回	7月25日	第298回
9月5日	第299回	9月26日	第300回
10月10日	第301回	10月24日	第302回
11月8日	第303回	11月20日	第304回
12月25日	第305回		

外国からの主な来訪者

1月7日～1月8日	Dr. Alisa S.W. Shum, Department of Anatomy The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong
1月27日～1月28日	Dr. Masayasu Nomura Department of Biological Chemistry University of California, Irvine
2月14日～2月15日	Hans R. Scholer, University of Pennsylvania New Bolton Center, Center for Animal Transgenesis and Germ Cell Research
2月17日～2月18日	Ralf Schnabel, Institut für Genetik, TU Braunschweig Pat Nolan, MRC Mouse Genome Center and Mammalian Genetics Unit, Harwell
3月7日～3月8日	Peter E. Nielsen, University of Copenhagen, IMBG,

- Laboratory B, The Panum Institute, Blegdamsvej3,
DK-2200 Copenhagen N, Denmark
- 3月13日～3月14日 Michael P. Stryker, Department of Physiology and W.
M. Keck Foundation Center for Integrative Neuro-
science, UCSF Tobias Bonhoeffer, Max-Planck-Institut
für Neurobiologie, München-Martinaried
- 4月10日 Stephen Buratowski, Biological Chemistry and Molecu-
lar Pharmacology, Harvard Medical School
- 4月11日～4月12日 Dr. Avante Paabo, Director, Max-Planck-Institute
of Evolutionary Anthropology Leipzig, Germany
- 4月12日～4月13日 Arnold J. Berk, Molecular Biology Institute, Uni-
versity of California, Los Angeles
- 5月1日～5月2日 Amos Oppenheim, The Hebrew University -Hadassah
Medical School Department of Molecular Genetics
and Biotechnology Jerusalem, Israel
- 7月10日 Matsuoka Shuhei, Baylar College of Medicine, U.S.A.
- 7月27日～7月28日 Dr. Takehiro Kawano, Samuel Lunenfeld Research In-
stitute of Mount Sinai Hospital, Toront
- 9月7日～9月8日 Prof. Peter Palese, Mount Sinai School of Medicine
Department of Microbiology New York, NY 10029, U.S.A.
- 9月20日～9月21日 Dr. Michael Glotzer, Research Institute of Moleculer
Pathology Vienna, Austria
- 9月28日～9月29日 Dr. Charles Bangham, Department of Immunology Imperial
college School of Medicine St Mary's Hospital, U.K.
- 10月3日～10月4日 Mr. Neil J. Campbell, Senior Director Celera Genomics, U.S.A.
- 10月12日～10月13日 Noel Lowndes, ICRF, Clare Hall Laboratories, U.K.
- 10月23日～10月24日 Harumi Kasamatsu, Moleculer Biology Institute, Uni-
versity of California, Los Angeles, U.S.A.
- 11月1日～11月2日 Masaki Okano, Cardiovascular Research Center, Massachu-
setts General Hospital, Harvard Medical School
- 11月6日～11月7日 Hiroki Kokubo, University of Texas, MD. Anderson Cancer
Center Department of Biochemistry and Moleculer Biology
- 11月10日～11月11日 M. Azim Surani, Wellcome/CRC Institute of Cancer
and Developmental Biology, University of Cambridge
Peter A. Jones, Norris Comprehensive Cancer Cen-
ter, University of Southern California
- 11月13日～11月14日 Dr. Nobuyosi Takasaki, Laboratory of Cellular and

- Development Biology, NIDDK, NIH
William M. Saxton, Department of Biology, Indiana University
- 11月15日～11月16日 Mr. Jian Lu, Bioinformatics Research Center Medical College of Wisconsin, U.S.A.
- 11月30日～12月1日 Randy L. Johnson, MD Anderson Cancer Center, Houston
- 12月18日～12月19日 Dr. Yoshiyuki Imai, Department of Development Biology Stanford University School of Medicine
- 12月19日 Dr. Hiroshi Akashi, Dept. of Biology, Institute of Molecular Evolutionary Genetics Pennsylvania State University, U.S.A.
- 12月19日～12月20日 Dr. Hisato Saitoh, Picower Institute, NY, U.S.A.
- 12月20日～12月21日 Yuji Kageyama Howard Hughes Medical Institute, Baylor College of Medicine
Dr. Masatomo Kobayasi, Kimmel Cancer Institute, Thomas Jefferson University

G. 諸 会

内部交流セミナー

研究所内における研究経過を討論する会で、盛夏の時期を除き毎週金曜日に開かれる。

- 1月14日 1. ショウジョウバエPlexusは核内マトリックスとして脈の形成を抑制する(赤勝 和)
2. 真核生物染色体DNA複製機構とそのモニター(荒木弘之)
- 1月28日 大腸菌データベース最新情報(山崎由紀子)
- 2月18日 1. 遺伝子発現パターン比較からみる分子進化(池尾一穂)
2. 機能獲得型突然変異Scutoidにみる遺伝子機能の不思議(林 茂生)
- 2月25日 1. ヒドラ神経系と散在神経系(清水 裕)
2. タンパク質の精製と結晶化：分子複合体での問題点とその解決(白木原康雄)
- 3月 3日 1. 中軸骨格系にホメオティックトランスフォーメーションを示すTail-short (Ts) 変異遺伝子のポジショナルクロニング(清水邦彦)
2. DT40細胞を用いたセントロメア・CENP-Cの機能解析(深川竜郎)
- 3月10日 1. 出芽酵母のテロメア長の維持機構に関与するMre11蛋白質の活性(田中茂生)
2. ゲノム情報のコンピュータ解析(西川 健)
- 3月17日 1. C. elegansの母性因子POS-1と相互作用する分子の機能解析(小倉頭一)
2. 比較ゲノムからみたGC含量の進化的変化(五條堀孝)

- 3月24日 大腸菌のDnaKホモログであるHscAは細胞分裂に関与する(上原 剛)
- 4月7日 1. M期における細胞周期停止を回復させる基本転写因子(光澤 浩)
2. The DNA sequence of human chromosome21(藤山秋佐夫)
- 4月14日 1. ショウジョウバエゲノムのエピソーティックな進化の3つの要因
(高野敏行)
2. 大規模マウス突然変異体作製とその作用(城石俊彦)
- 4月21日 1. FTZ-F1のMutantsについて(山田正明)
2. ヒドラの形態形成に関わる上皮ペプチド
- 4月28日 1. *C. elegans*において二つの感覚情報の選択と連合学習能力に異常を持つ
変異体の解析(石原 健)
2. Timing of cell division:lipopolysaccharide synthesis is coupled
with cell division in *Escherichia K12*(西村昭子)
- 5月12日 1. 神経発生と血球形成におけるgcm型転写調節因子の機能(細谷俊彦)
2. 転写装置の細胞内含有(石浜 明)
- 5月19日 1. 分裂酵母RNAポリメラーゼIIのサブユニット集合(木村 誠)
2. マウス嗅球-終脳神経回路とlot細胞(平田たつみ)
- 5月26日 1. 大腸菌RNAポリメラーゼ β サブユニットにおける α サブユニット結合領域
の同定及び新規RNAポリメラーゼ結合因子の探索(野村 扶)
2. 22遺伝子座の遺伝子系図に基づいたマウス亜種の進化史の推定
(斎藤成也)
- 6月2日 TWO TYPES OF END-JOINING REACTION OF MRE11(Daisuke Tatsuda)
- 6月9日 1. 1つのアミノ酸置換が、まわりのアミノ酸残基の置換に及ぼす影響
(深海 薫)
2. The function of Psf1 and Sld5 in DNA replication(Yuko Takayama)
- 6月23日 1. 出芽酵母MRE11のテロメア長維持機構(大田 力)
2. セブラフィッシュの分節形成・・・Her1の発現パターンを中心に
(武田洋幸)
- 6月30日 Functional analysis of WRN helicase, responsible for premature
aging disorder Werner's syndrome(坂本修一)
- 7月7日 1. Functional analysis of intrinsic restriction-modification
system of *Bacillus subtilis*(大島英之)
2. physico-chemical evaluation of protein folds predicted by
threading(金城 玲)
- 7月14日 1. A Workshop for Integration of Diverse Biological Data-Application
to the identification and classification of microbes
(Hideaki Sugawara)

2. Control of tracheal tubulogenesis by Wingless signaling
(千原崇裕)
- 7月21日 1. 出芽酵母 Sld3 の機能解析(上村陽一郎)
2. DNA メチル化酵素異常症” ICF 症候群” の分子病態(佐々木裕之)
- 9月8日 1. SCF における G1 サイクリングの時期特異的ユビキチン化(岸 務)
2. HLA クラス I ゲノム領域の進化: B と C 遺伝子座の起源と種間多様性
(箱野義男)
- 9月22日 1. 核/染色体タンパクを介するイネの機能的 genomics: histone hold motif(倉田のり)
2. dauer 幼虫形成制御から見た *C. elegans* 神経系の性質(桂 勲)
- 9月29日 1. cDNA microarray 解析による T-box 転写因子 *tbx-9* 標的遺伝子群の探索
(安達佳樹)
- 10月6日 1. The role of Dpp, Wg in the embryonic development of the *Drosophila* limb(久保田一政)
2. 蛋白質の DNA への結合平衡は熱力学に矛盾することがある(嶋本伸雄)
- 10月13日 スーパーコイル因子変異体分離の試み(広瀬 進)
- 10月20日 1. ゲノム比較のための情報の視覚化とその応用(宮崎 智)
2. 出芽酵母 Mre11 蛋白質の機能について: 相間換え, DNA 損傷の修復, テロメア長の維持での役割(小川智子)
- 10月27日 1. 分裂酵母 *ubcP1/ubc4* は分裂期および DNA 複製期の進行の制御に関与する
(清野浩明)
2. S 期内複製タイミングとゲノムの機能領域(池村淑道)
- 11月10日 1. 間違った配列-構造アラインメントを重ね合わせてタンパク質の立体構造予測をする方法(太田元規)
2. ショウジョウバエ *ras* の遺伝学(広海 健)
- 11月17日 1. イネ科植物の動原体構造(野々村賢一)
2. *E. coli* sigma70 is a possible thermometer limiting growth inhibition at high temperature(佐藤由美子)
- 11月24日 1. 真核生物ゲノムにみられる大規模な重複領域の構造と進化(今西 規)
2. Identification and characterization of genes which are regulated by Ras GTPase-mediated signal transduction pathway in *Schizosaccharomyces pombe*(Bong Yong-Sik)
- 12月1日 1. ショウジョウバエの付属肢形成に関わる遺伝子の解析-糖鎖修飾の役割-(後藤 聡)
2. The Analysis of the Regulatory Mechanisms of Mammalian BarH Homologue(MBH)1 Expression(Rie Saba)
- 12月8日 1. イネのエンハンサートラップ系統の作成(伊藤幸博)

2. Genome Biology of *C.elegans* development

- 12月22日 1. マウス行動の遺伝学的解析 - 受動的回避学習行動に関わる遺伝子座 -
 (小出 剛)
2. ショウジョウバエ転写因子FTZ-F1とFushi tarazu(FTZ)との相互作用
 による転写活性化機構(上田 均)

Biological symposium

- 1月7日 1分子操作によるDNAループの検出(十川久美子)
- 1月13日 バクテリアのDNA分配 - 細胞分裂周期に応じたDNAの細胞内局在性の変化を追って-(仁木宏典)
- 1月19日 ゼブラフィッシュにおける背腹軸決定の分子機構(日比正彦)
- 1月20日 シュレーディンガー50年の夢 - 復素電子顕微鏡と遺伝子直読(永山国昭)
- 1月25日 warts及びfzr/cdhlによる高等生物細胞における細胞周期制御機構
 (佐谷秀行)
- 1月28日 Transcription of yeast rDNA, RNA polymerase specificity, rDNA repeats and nucleolar structures. (Masayasu Nomura)
- 2月4日 Function and regulation of the transcription factor Oct-4 in the mammalian germline (Hans R. Schoeler)
- 2月15日 電子メディア時代の研究論文と日本の問題点(田中秀明)
- 2月17日 A 4-dimensional analysis of the embryogenesis of *C.elegans*: migrations, regions, linesge and binary specification (Ralf Schnabel)
- 2月17日 *E.coli* FIS controls DNA architecture and promoter activity (Georgi Muskhelishvili)
- 2月18日 哺乳類ポリコーム群による形態形成と細胞増殖のコントロール(古関明彦)
- 3月1日 WntシグナルとTGF-betaシグナルの分子機構(渋谷浩司)
- 3月2日 線虫の嗅覚におけるRas-MAPキナーゼシグナル伝達系の役割(飯野雄一)
- 3月7日 Gene Regulation by Peptide Nucleic Acid(PNA)(Peter E.Nielsen)
- 3月8日 分泌系オルガネラにおけるタンパク質輸送 - 高等植物の液胞への蛋白質輸送と出芽酵母の輸送装置 - (松岡 健)
- 3月13日 Activity dependent plasticity: new insights into functional and morphological changes on the synaptic level (Tobias Bonhoeffer)
- 3月13日 核 - 細胞質間機能分子の輸送機構(今本尚子)
- 3月14日 バクテリア染色体分配の新展開(仁木宏典)
- 3月14日 Mechanisms of activity-dependent plasticity in the mammalian visual cortex (Michael P. Stryker)
- 3月15日 核膜崩壊・再形成におけるLAP2の機能(古川和広)
- 4月10日 言語の脳機能 - 物理学から言語学へ - (酒井邦嘉)

- 4月10日 Connections among transcription, chromatin, and mRNA processing (Stephen Buratowski)
- 4月12日 Mechanisms underlying induction and progression of a neurogenic wave in the developing zebrafish retina (Ichiro Masai)
- 4月12日 A multiprotein mediator complex is required for the stimulation of transcription by activators in human cells. (Arnold J. Berk)
- 4月17日 WGAトランスジーンを用いた選択的シナプス経路可視化技術の開発とその応用 (吉原良浩)
- 4月24日 分子機械のルースカップリング (大沢文夫)
- 4月26日 イネの花の発生を制御するDL遺伝子の単離と解析 -ABCモデルは単子葉植物に適用できるか? (平野博之)
- 5月1日 Post-transcriptional and post-translational control in bacteriophage lambda lysis-lysogeny decision (Prof. Amos Oppenheim)
- 5月16日 神経細胞のシグナル伝達と形づくり: 極性と軸索の形成機構 (稲垣直之)
- 5月29日 転写因子 Mesp1, Mesp2 の機能: 初期中胚葉の発生と文節化 (相賀裕美子)
- 5月29日 Sonic hedgehog 標的遺伝子の発現制御における転写因子 Gli の役割 (佐々木洋)
- 7月6日 植物細胞の分化決定の分子機構を探る (岡田清孝)
- 7月10日 Chk1, Chk2 によるチェックポイント制御 (松岡秀平)
- 7月27日 神経軸索誘導及び細胞移動を制御する遺伝子群: C. elegans によるアプローチ (川野武弘)
- 8月1日 1. 膜蛋白質分解において見られる蛋白質の逆輸送
2. オートファジーと蛋白質輸送に働く, 異なる PI3K/Vps34p 複合体の同定と解析 (木原章雄)
- 9月8日 Attenuation of Influenza Viruses via Genetic Engineering: Modification of the Interferon Antagonist (Prof. Peter Palese)
- 9月20日 Molecular Dissection of Central Spindle Assembly and Cytokinesis (Dr. Michael Glotzer)
- 9月27日 神経成長円錐の細胞内シグナル伝達機構: CALI 法による細胞局所の選択的分子ターゲティングによるアプローチ (竹居光太郎)
- 9月29日 Predicting the future course of human influenza virus evolution (Dr. Walter Fitch)
- 9月29日 What determines the risk of inflammatory disease in HTLV-I infection? (Dr. Charles Bangham)
- 10月3日 The impact of Whole Genome Sequencing on Bioinformatics, Genomics and Proteomics (Mr. Neil J. Campbell)
- 10月12日 Sensing and responding to DNA damage (Noel Lowndes)

- 10月17日 母性局在 mRNA と細胞間相互作用による、ホヤ胚発生における細胞運命決定機構(西田宏記)
- 10月23日 How do animal DNA viruses get to the cell nucleus?
(Harumi Kasamatsu)
- 11月1日 染色体DNA メチル化パターンの調節とその機能(岡野正樹)
- 11月2日 ゲノム配列からの遺伝子同定(矢田哲士)
- 11月6日 Function analysis of a new bHLH family, hesr-1, -2 and -3:
potential regulators of vertebrate somitogenesis(小久保博樹)
- 11月10日 Germ Line, Stem Cells and Genomic Imprinting(M. Azim Surani)
- 11月10日 DNA Methylation in Cancer Tissue(Peter A. Jones)
- 11月13日 ESTによって単離されたマウス性決定期メス生殖細胞優先的に発現する新規
のホメオボックス遺伝子(高崎延佳)
- 11月13日 DNA コンピューティング(山村雅幸)
- 11月14日 Kinesin I is required for organelle transport in axons and for
anterior-posterior axis determination(William M. Saxton)
- 11月14日 MES PROTEINS AND MATERNAL CONTROL OF GERMLINE DEVELOPMENT IN C.
ELEGANS(Susan Strome)
- 11月15日 Rat Genome Database:A Platform for Rat, Mouse and Human Comparative
Genomics(Jian Lu)
- 11月30日 Molecular genetics of murine dorsal-ventral limb and mid-hind-
brain development(Dr. Randy L. Johnson)
- 12月19日 The Dynamic End:Silencing and Relocation of Telomeres in Yeast
(Daniel Gottschling)
- 12月19日 ユビキチン様タンパク質 SUMO-1 と染色体 DNA 相同組み換えおよび細胞増殖
の制御(斉藤寿仁)
- 12月19日 Codon bias evolution in Drosophila:Detecting the "footprint" of
weak selection at silent sites in DNA(Dr. Hiroshi Akashi)
- 12月20日 ショウジョウバエ Male-Specific Lethal 複合体の X 染色体特異的な局在
化機構(影山裕二)
- 12月20日 The role of the corepressor Groucho in the early embryonic func-
tion of Even-skipped(小林正友)

H. 栄 誉

1. 元所長(名誉教授)富澤純一は、分子生物学研究に対する功績として、平成12年11月3日文化功労者として表彰された。

I. 図書及び出版

図書委員会委員長 (2000 年度) 西川 建
 図書委員会委員 (2000 年度) 池村 淑道・城石 俊彦・徳永 万喜洋
 上田 均・藤田 信之・上村 陽一郎
 岡部 正隆・伊藤 幸博

1) 蔵書数

和書	3,401 冊	製本雑誌を含む
洋書	17,576 冊	製本雑誌を含む
計	20,977 冊	

2) 雑誌

和文	18 種	寄贈を含む
欧文	136 種	寄贈を含む
計	154 種	

3) 出版

書名	ページ数	発行数	配布先
国立遺伝学研究所 年報第 50 号	257	700 部	国内研究機関, 大学, 試験場ほか
Ann. Rep. Natl. Inst. Genet. No. 50	174	900 部	内外研究機関, 大学, 試験場ほか

5) 2000年購入外国雑誌リスト

1. Acta Crystallographica D:Biological Crystallograph
2. American Journal of Human Genetics
3. American Naturalist
4. Analytical Biochemistry
5. Annals of Human Genetics
6. Behavior Genetics
7. Biochemical Genetics
8. Biochemical and Biophysical Res.Communication
9. Biochemistry
10. Biochimica et Biophysica Acta:Gene Structure and Expression
11. BioEssays
12. Bioinformatics
13. Biophysical Journal
14. Cancer Genetics & Cytogenetics
15. Cancer Research
16. Caryologia
17. Cell
18. Chromosoma
19. Chromosome Research
20. Current Advances in Cell & Development Biology
21. Current Biology
22. Current Contents:Life Sciences
23. Current Genetics
24. Current Opinion in Cell Biology
25. Current Opinion in Genetics & Development
26. Current Opinion in Immunology
27. Current Opinion in Neurobiology
28. Current Opinion in Structural Biology
29. Cytogenetics & Cell Genetics
30. Development
31. Development Genes and Evolution
32. Developmental Biology
33. Developmental Genetics
34. Differentiation
35. DNA sequences
36. EMBO Journal

37. European J. of Biochemistry
38. Evolution
39. Evolutionary Ecology
40. Experimental Cell Research
41. FEBS Letters
42. Gene
43. Genes & Development
44. Genes to Cells
45. Genetica
46. Genetical Research
47. Genetics
48. Genome
49. Genome Research
50. Genomics
51. Hereditas
52. Heredity
53. Human Genetics
54. Human Heredity
55. Human Molecular Genetics
56. Immunogenetics
57. Immunological Reviews
58. Int.J.Syst.Bacteriol
59. Journal of Bacteriology
60. Journal of Biological Chemistry
61. Journal of Cell Biology
62. Journal of Cell Science
63. Journal of Cellular Physiology
64. Journal of Computational Biology
65. Journal of Evolutionary Biology
66. Journal of Experimental Medicine
67. Journal of Experimental Zoology
68. Journal of General Virology
69. Journal of Genetics
70. Journal of Heredity
71. Journal of Immunology
72. Journal of Medical Genetics
73. Journal of Molecular Biology

74. Journal of Molecular Evolution
75. Journal of Neuroscience
76. Journal of Neurogenetics
77. Journal of Virology
78. Korean Journal of Genetics
79. Lancet
80. Mammalian Genome
81. Mechanisms of Development
82. Microbiology
83. Microbiology and Molecular Biology Reviews
84. Microbial & Comparative Genetics
85. Molecular and Cellular Neuroscience
86. Molecular & General Genetics
87. Molecular Biology and Evolution
88. Molecular Biology of the Cell
89. Molecular Cell
90. Molecular Endocrinology
91. Molecular Microbiology
92. Molecular and Cellular Biology
93. Mutation Research
94. Nature Biotechnology
95. Nature Cell Biology
96. Nature Genetics
97. Nature Medicine
98. Nature Structural Biology
99. Nature
100. Neuron
101. New England Journal of Medicine
102. Nucleic Acids Research
103. Oncogene
104. Opensys. & Info.Dyna
105. Plant Cell
106. Plant Journal
107. Plant Molecular Biology
108. Plant Physiology
109. Plant Science
110. Plasmid

111. Proc. Nat. Acad. Sci.
112. Proc.of the Royal Society:ser.B(Biological Science)
113. Protein Engineering
114. Protein Science
115. Proteins
116. Quarterly Review of Biology
117. Quarterly Reviews of Biophysics
118. RNA
119. Radiation Research
120. Research in Microbiology+Res. in Virology
121. Science
122. Scientific American
123. Somatic Cell & Molecular Genetics
124. Structute
125. Systematic.Biol
126. Theoretical & Applied Genetics
127. Theoretical Population Biology
128. Trends in Biochemical Sciences
129. Trends in Cell Biology
130. Trends in Genetics
131. Trends in MicroBIOLOGY
132. Trends in Neurosciences
133. Trends in Plant Science
134. Virology
135. Virus Research
136. Yeast

X. 総合研究大学院大学生命科学研究科 遺伝学専攻の概要

A. 目的

総合研究大学院大学は、大学共同利用機関との緊密な連係・協力の下に、その優れた研究機能を活用して、高度の、かつ国際的にも開かれた大学院の教育研究を行い、新しい学問分野を開拓するとともに、それぞれの専門分野において学術研究の新しい流れに先導的に対応できる幅広い視野を持つ、創造性豊かな研究者を養成することを目的とします。

遺伝学専攻は、遺伝学を基礎とする生命科学の研究と教育を通じて大学の活動の一端を担うものです。

B. 教育研究の概要

遺伝学は、生命現象を遺伝子との関連のもとに解明する学問です。この学問は、従来から生物学の一分野にとどまらず、理学・農学・医学・薬学等の隣接分野とも深い関わりをもってきましたが、近年の分子レベルにおける遺伝学の目覚ましい発展に伴って、今日では広く生命科学の中核として重要な役割を担うようになりました。

本専攻は、母体となる国立遺伝学研究所で進められている分子・細胞・個体・集団の各研究分野及びこれらを基盤とする応用的研究分野において、遺伝学の最先端を学習させるとともに、高度でかつ独創性のある研究題目について、数多くの実験生物系統と、よく整備されたDNAデータベース並びに放射線・アイソトープ装置等をも活用して教育研究を行っています。

C. 教育研究の特色

遺伝学は、独創的・先端的で高度かつ学際的学問です。特色ある5大講座を設置します。また、各大講座には演習を設け、積極的な受講を促すとともに、研究指導の指針としています。

さらに、母体となる国立遺伝学研究所において実施される研究活動（内部交流セミナー、Biological Symposia等）の参加を義務づけるとともに、系統生物研究センター、生物遺伝資源情報総合センター、構造遺伝学研究センター、生命情報研究センター、放射線・アイソトープセンター及び実験農場が持つ機能、施設・設備等を十分に活用できるようになっています。

D. 大講座・教育研究指導分野

大講座	教育研究指導分野	分野の内容
分子遺伝学	分子構造学	遺伝物質の構造を分子生物学的に教育研究する。
	分子機能学	遺伝物質の機能とその制御を分子生物学的に教育研究する。
	分子形成学	遺伝物質の形成原理と形成機構を教育研究する。
細胞遺伝学	細胞遺伝学	細胞の遺伝・分化及びその遺伝子支配機構を教育研究する。
	哺乳類遺伝学	哺乳動物特有な遺伝機構を教育研究する。
	微生物遺伝学	原核生物の細胞分裂と染色体複製機構及び細胞質遺伝因子の遺伝機構等を教育研究する。

大講座	教育研究指導分野	分野の内容
個体遺伝学	発生遺伝学	動物の形態形成機構及びその基盤をなす細胞分裂・分化の機構を教育研究する。
	形質遺伝学	個体発生過程の遺伝的制御について教育研究する。
	行動遺伝学	動物の行動を制御する遺伝機構を教育研究する。
集団遺伝学	集団遺伝学	集団の遺伝的構成変化の法則に関して教育研究する。
	進化遺伝学	生物進化の遺伝的機構を表現型と分子の両レベルで教育研究する。
	分子進化学	遺伝子構造を実験的並びに理論的に解析し、進化の分子レベルでの機構を教育研究する。
応用遺伝学	人類遺伝学	ヒト・生命現象の分子遺伝学的特性と個体差に関して教育研究する。
	植物遺伝学	有用植物の進化・適応・形質発現に関する遺伝学的研究に関して教育研究する。

E. 年度別入学者数

年度	平成 元年度	平成 2年度	平成 3年度	平成 4年度	平成 5年度	平成 6年度	平成 7年度	平成 8年度	平成 9年度	平成 10年度	平成 11年度	平成 12年度
入学者数	9(1)	5(4)	8(3)	11(2)	13(1)	8(1)	9(2)	9(1)	11(5)	11(3)	14(3)	15(3)

()は女子で内数

F. 修了要件及び学位の種類

1. 修了要件

3年以上在学し、本専攻で定めた履修科目について、10単位以上修得し、かつ、必要な研究指導を受けた上、博士論文の審査及び試験に合格することとする。

ただし、在学期間に関しては、特に優れた研究業績を挙げた者については、短縮することがある。

2. 学位

博士(理学)。博士論文の内容によっては博士(学術)が授与される。

G. 学位授与状況

授与年度	平成 3年度	平成 4年度	平成 5年度	平成 6年度	平成 7年度	平成 8年度	平成 9年度	平成 10年度	平成 11年度
課程博士 (理学)	6	4	9	7	12	6	8	8	8
論文博士 (理学)	0	0	1	0	0	2	0	2	1

H. 正規生 50名

入学時期	氏名	所属講座	所内所属研究部門等
9年4月	上村隆俊	集団	集団遺伝研究系 進化遺伝研究部門
	片山映	分子	分子遺伝研究系 分子遺伝研究部門
	金子美華	集団	集団遺伝研究系 進化遺伝研究部門
	青木美和	分子	分子遺伝研究系 分子遺伝研究部門
	野田令子	集団	集団遺伝研究系 進化遺伝研究部門
	服藤尚恵	個体	個体遺伝研究系 発生遺伝研究部門
	福司功治	分子	構造遺伝学研究センター 超分子構造研究室
	牧野茂	細胞	系統生物研究センター 哺乳動物遺伝研究室
	三戸部治郎	分子	分子遺伝研究系 分子遺伝研究部門
	望月一史	個体	個体遺伝研究系 発生遺伝研究部門
10年4月	大島英之	分子	RIセンター
	金城玲	分子	生命情報研究センター 大量遺伝情報研究室
	坂本修一	個体	系統生物研究センター 発生工学研究室
	高山優子	細胞	細胞遺伝研究系 微生物遺伝研究部門
	只木敏雅	分子	分子遺伝研究系 変異遺伝研究部門
	立田大輔	細胞	細胞遺伝研究系 細胞遺伝研究部門
	千原崇裕	個体	系統生物研究センター 無脊椎動物遺伝研究室
	野村扶	分子	分子遺伝研究系 分子遺伝研究部門

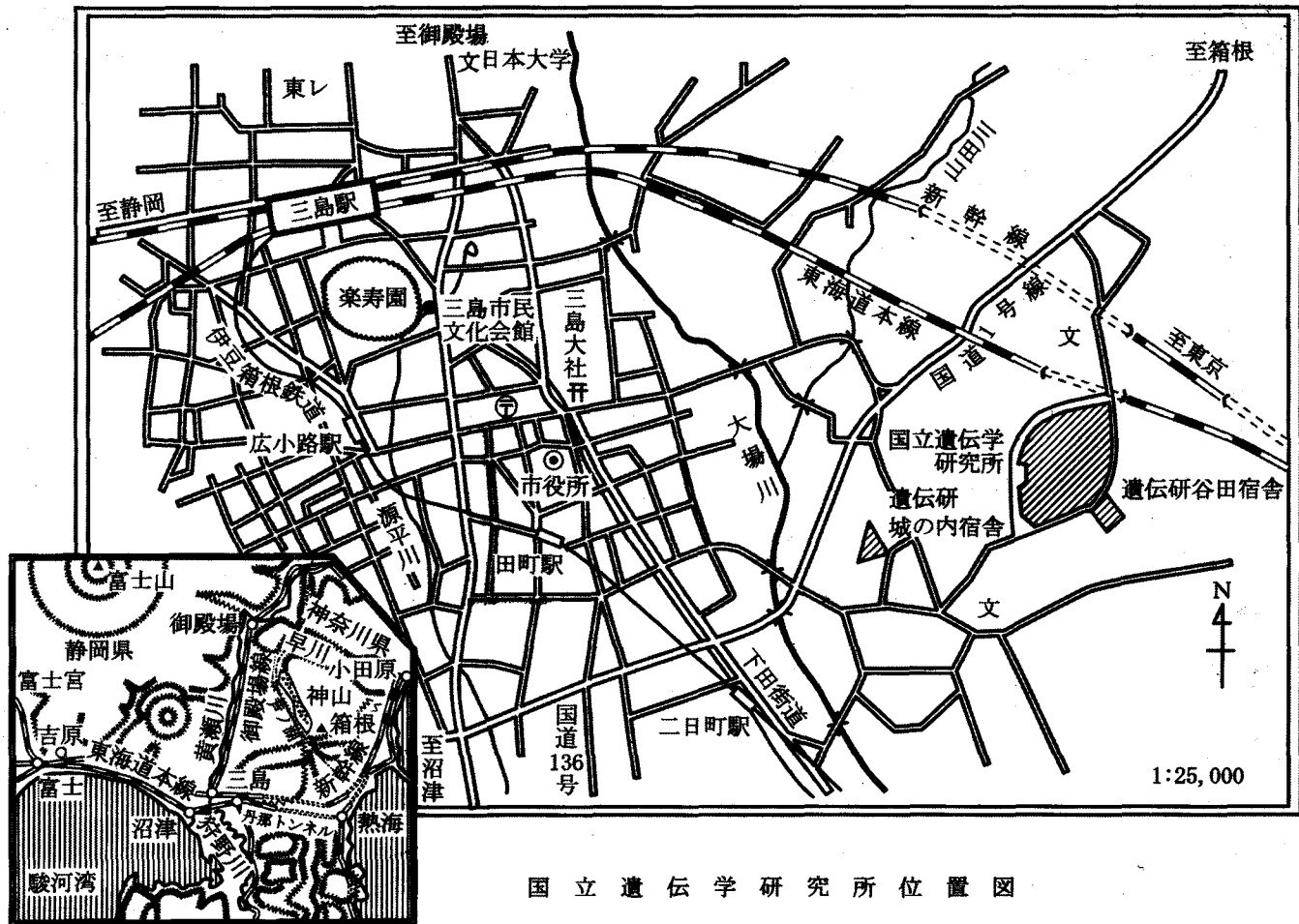
入学時期	氏名	所属講座	所内所属研究部門等
10年10月	佐藤由美子	分子	構造遺伝学研究センター 超分子機能研究室
	佐波理恵	個体	系統生物研究センター 発生工学研究室
	Bong Yong-Sik	応用	総合遺伝研究系 人類遺伝研究部門
11年4月	阿川泰夫	個体	個体遺伝研究系 形質遺伝研究部門
	飯田哲史	細胞	細胞遺伝研究系 微生物遺伝研究部門
	石原宏	応用	総合遺伝研究系 人類遺伝研究部門
	大蔵清貴	個体	構造遺伝学研究センター 構造制御研究室
	太田欽也	集団	生命情報研究センター 遺伝情報分析研究室
	岡彩子	細胞	系統生物研究センター 哺乳動物遺伝研究室
	須佐太樹	分子	構造遺伝学研究センター 超分子機能研究室
	辻本直美	応用	総合遺伝研究系 人類遺伝研究部門
	中山貴博	個体	個体遺伝研究系 形質遺伝研究部門
	松野元美	個体	個体遺伝研究系 発生遺伝研究部門
	峯田克彦	集団	生命情報研究センター 遺伝情報分析研究室
11年10月	萱嶋泰成	個体	個体遺伝研究系 形質遺伝研究部門
	進藤一泰	分子	構造遺伝学研究センター 超分子構造研究室
	Ahn Byoung-Ong	応用	系統生物研究センター 植物遺伝研究室
12年4月	小倉淳	集団	生命情報研究センター 遺伝情報分析研究室
	小此木孝仁	分子	構造遺伝学研究センター 生体高分子研究室

入学時期	氏名	所属講座	所内所属研究部門等
12年4月	加藤 輝	個体	系統生物研究センター 無脊椎動物遺伝研究室
	金田 正弘	応用	総合遺伝研究系 人類遺伝研究部門
	坂口 拓哉	個体	個体遺伝研究系 初期発生研究部門
	中村 洋路	集団	生命情報研究センター 遺伝情報分析研究室
	花田 耕介	集団	生命情報研究センター 遺伝情報分析研究室
	牧野 嶋 秀樹	細胞	系統生物研究センター 原核生物遺伝研究室
	三上 剛和	集団	集団遺伝研究系 進化遺伝研究部門
	山谷 仁志	応用	総合遺伝研究系 脳機能研究部門
	横 峯 孝 昭	応用	総合遺伝研究系 人類遺伝研究部門
	Park Joon-Hyun	分子	分子遺伝研究系 変異遺伝研究部門
12年10月	小池 牧子	細胞	構造遺伝学研究センター 遺伝子回路研究室
	矢部 智子	個体	構造遺伝学研究センター 構造制御研究室
	Tak Yon-Soo	細胞	細胞遺伝研究系 微生物遺伝研究部門

国立遺伝学研究所年報 第 51 号

発行者 堀 田 凱 樹
国立遺伝学研究所内
編集者 荒木 弘之・角谷 徹仁

発行所 国立遺伝学研究所
<http://www.nig.ac.jp/home-j.html>.
〒411-8540 静岡県三島市谷田1,111
TEL 0559(81)6718
FAX 0559(81)6719



国立遺伝学研究所位置図