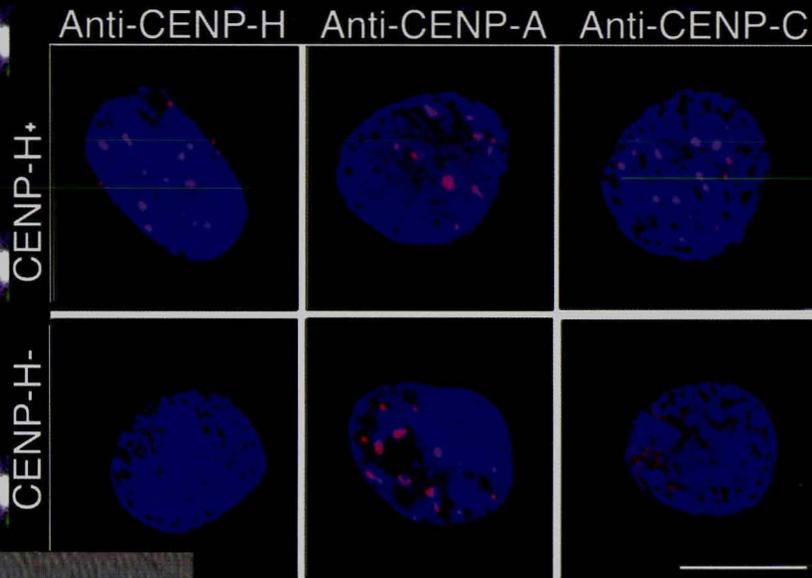
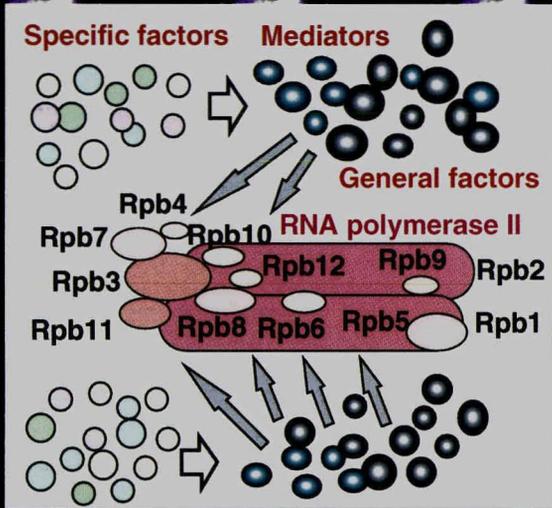


国立遺伝学研究所年報

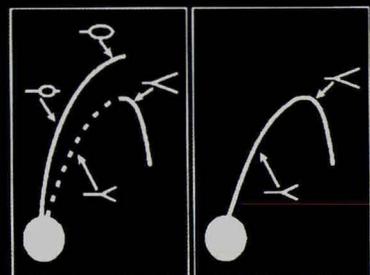
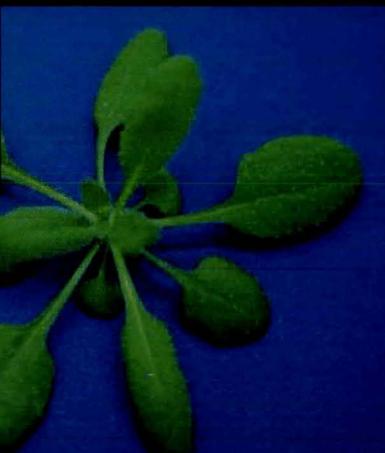
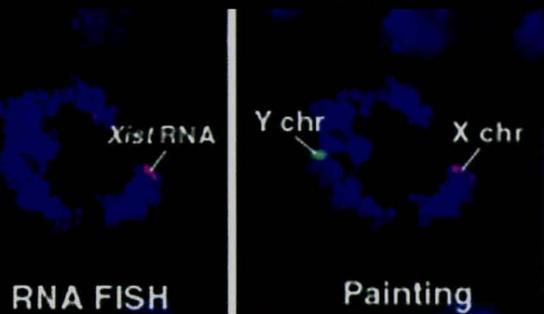
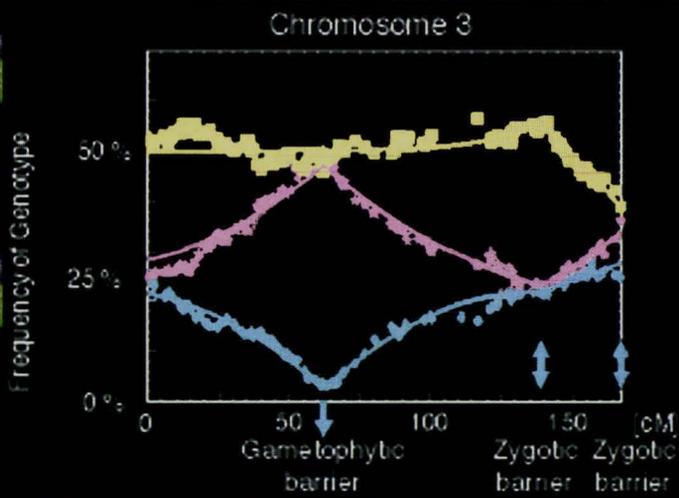


23°C

37°C

2hr

4hr





1. 基本転写装置が転写する遺伝子を選ぶ

Intracellular contents and assembly states of all twelve subunits of the RNA polymerase II in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*.

Kimura, M., Sakurai, H., Ishihama, A.

Eur. J. Biochem., 268, 612-619 (2001).

2. 高等脊椎動物の染色体セントロメアの形成機構

CENP-H, a constitutive centromere component, is required for centromere targeting of CENP-C in vertebrate cells.

Fukagawa, T., Mikami, Y., Nishihashi, A., Regnier, V., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Sugata, N., Todokoro, K., Brown, W., Ikemura, T.

EMBO J., 20, 4603-4617 (2001).

3. 翻訳抑制機構による神経分化能の決定

Translational repression determines a neuronal potential in *Drosophila* asymmetric cell division.

Okabe, M., Imai, T., Kurusu, M., Hiromi, Y., Okano, H.

Nature, 411, 94-98 (2001).

4. 生殖的隔離障壁の全ゲノム上での網羅的検出

A genome-wide survey of reproductive barriers in an intraspecific hybrid.

Harushima, Y., Nakagahra, M., Yano, M., Sasaki, T., Kurata, N.

Genetics, 159, 883-892 (2001).

5. 真核生物染色体 DNA 複製の開始機構

Sld3, which interacts with Cdc45 (Sld4), functions for chromosomal DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*.

Kamimura, Y., Tak, Y.-S., Sugino, A., Araki, H.

EMBO J., 20, 2097-2107 (2001).

6. X染色体不活性化を制御するアンチセンス RNA Tsix

Regulation of imprinted X-chromosome inactivation in mice by Tsix.

Sado, T., Wang, Z., Sasaki, H., Li, E.

Development, 128, 1275-1286 (2001).

7. ゲノム DNA のメチル化がトランスポゾン転移を制御

Mobilization of transposons by a mutation abolishing full DNA methylation in *Arabidopsis*.

Miura, A., Yonebayashi, S., Watanabe, K., Toyama, T., Shimada, H., Kakutani, T.

Nature, 411, 212-214 (2001).

目 次

<p>I. 巻 頭 言 1</p> <p>II. 研究室一覧 2</p> <p>III. 研究概要 3</p> <p style="padding-left: 20px;">A. 分子遺伝研究系 3</p> <p style="padding-left: 40px;">A-a. 分子遺伝研究部門 3</p> <p style="padding-left: 40px;">A-b. 変異遺伝研究部門 10</p> <p style="padding-left: 40px;">A-c. 核酸化学員研究部門 13</p> <p style="padding-left: 20px;">B. 細胞遺伝研究系 16</p> <p style="padding-left: 40px;">B-a. 細胞遺伝研究部門 16</p> <p style="padding-left: 40px;">B-b. 微生物遺伝研究部門 16</p> <p style="padding-left: 40px;">B-c. 細胞質遺伝客員研究部門 19</p> <p style="padding-left: 20px;">C. 個体遺伝研究系 21</p> <p style="padding-left: 40px;">C-a. 発生遺伝研究部門 21</p> <p style="padding-left: 40px;">C-b. 形質遺伝研究部門 27</p> <p style="padding-left: 40px;">C-c. 初期発生研究部門 30</p> <p style="padding-left: 40px;">C-d. 生理遺伝客員研究部門 32</p> <p style="padding-left: 20px;">D. 集団遺伝研究系 36</p> <p style="padding-left: 40px;">D-a. 集団遺伝研究部門 36</p> <p style="padding-left: 40px;">D-b. 進化遺伝研究部門 37</p> <p style="padding-left: 40px;">D-c. 理論遺伝客員研究部門 46</p> <p style="padding-left: 20px;">E. 総合遺伝研究系 49</p> <p style="padding-left: 40px;">E-a. 人類遺伝研究部門 49</p> <p style="padding-left: 40px;">E-b. 育種遺伝研究部門 53</p> <p style="padding-left: 40px;">E-c. 脳機能研究部門 55</p> <p style="padding-left: 40px;">E-d. 応用遺伝客員研究部門 56</p> <p style="padding-left: 20px;">F. 系統生物研究センター 60</p> <p style="padding-left: 40px;">F-a. 哺乳動物遺伝研究室 60</p> <p style="padding-left: 40px;">F-b. 発生工学研究室 64</p> <p style="padding-left: 40px;">F-c. 植物遺伝研究室 66</p> <p style="padding-left: 40px;">F-d. 原核生物遺伝研究室 72</p> <p style="padding-left: 40px;">F-e. 無脊椎動物遺伝研究室 75</p>	<p style="padding-left: 20px;">G. 生物遺伝資源情報総合センター 78</p> <p style="padding-left: 40px;">G-a. 系統情報研究室 78</p> <p style="padding-left: 40px;">G-b. 生物遺伝資源情報研究室 80</p> <p style="padding-left: 20px;">H. 構造遺伝学研究センター 89</p> <p style="padding-left: 40px;">H-a. 生体高分子研究室 89</p> <p style="padding-left: 40px;">H-b. 超分子機能研究室 91</p> <p style="padding-left: 40px;">H-c. 構造制御研究室 93</p> <p style="padding-left: 40px;">H-d. 超分子構造研究室 96</p> <p style="padding-left: 40px;">H-e. 遺伝子回路研究室 98</p> <p style="padding-left: 20px;">I. 生命情報・DDBJ 研究センター 102</p> <p style="padding-left: 40px;">I-a. 遺伝情報分析研究室 102</p> <p style="padding-left: 40px;">I-b. 大量遺伝情報研究室 108</p> <p style="padding-left: 40px;">I-c. 遺伝子機能研究室 111</p> <p style="padding-left: 40px;">I-d. データベース運用開発研究室 112</p> <p style="padding-left: 20px;">J. 放射線・アイソトープセンター 114</p> <p style="padding-left: 20px;">K. 実験 圃 場 116</p> <p style="padding-left: 20px;">L. 技 術 課 118</p> <p>IV. 海外における活動 119</p> <p>V. ほかの機関における講義 122</p> <p>VI. 共同研究事業 123</p> <p>VII. 行 事 127</p> <p>VIII. 庶 務 128</p> <p style="padding-left: 20px;">A. 沿 革 128</p> <p style="padding-left: 20px;">B. 奨学寄付金・受託研究費 144</p> <p style="padding-left: 20px;">C. 日 誌 147</p> <p style="padding-left: 20px;">D. 諸 会 148</p> <p style="padding-left: 20px;">E. 図書及び出版 152</p> <p>IX. 総合研究大学院大学生命科学 研究科遺伝学専攻の概要 156</p> <p>NIG 50 Years Ago 48, 59, 77</p>
--	--

1. 巻頭言

ここに国立遺伝学研究所年報第52号(平成13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「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。9月には「国立大学等の独立行政法人化に関する調査検討会議」の中間報告がまとめられ、大学共同利用機関の法人化の方向性も次第に明らかとなった。単なる効率化のための構造改革ではなく、学術研究と高等教育の向上のための法人化となるようにひきつづき努力をしていきたい。そのためにも、より一層研究成果をあげて、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。幸い今年度も多数の優れた成果の発表が行なわれたし、遺伝子資源・DNAデータバンクなどの事業も順調に進展した。またホームページの改善・「遺伝学電子博物館」の充実も行なわれ、遺伝学の市民レベルへの普及活動も軌道に乗ってきたこともご報告したい。

平成13年1月から12月までの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小川智子教授(企画調整主幹 細胞遺伝研究系)が停年退官された。また、企画調整主幹には石濱 明教授(分子遺伝研究系)が併任となった。さらに、生命情報研究センターの廃止・転換に伴い、生命情報・DDBJ研究センターが設置され、五條堀孝、西川 建、館野義男、菅原秀明の各教授、池尾一穂、太田元規、小林薫、宮崎 智の各助手がそれぞれ生命情報・DDBJ研究センターに配置換となるとともに、五條堀孝教授が生命情報・DDBJ研究センター長に併任となった。また、木下 哲助手が総合遺伝研究系育種遺伝研究部門に採用され、小久保博樹助手(系統生物研究センター)が岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所から着任し、研究部門の陣容が充実された。一方、武田洋幸教授(個体遺伝研究系)が東京大学大学院理学系研究科教授へ、川上厚志助手(個体遺伝研究系)が東京大学大学院理学系研究科助手へ転出した。また、細谷俊彦助手(個体遺伝研究系)、田中茂生助手(細胞遺伝研究系)、今西規助手(生命情報研究センター)がそれぞれ辞職した。

管理部では、4月の異動で小林彰庶務課長が信州大学総務課長に転任となり、後任には富山征夫(筑波大学広報調査課長)が着任し、10月の異動で上隅清孝管理部長が

千葉大学学生部長へ転任し、後任には石川健二(宮崎大学総務部長)が着任した。

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41名(13.3在籍者)の教育指導を行い、あらたに11名が入学、7名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5名、博士研究員8名が研究と教育とを行った。

ヒトゲノムの概略が解読されるという画期的な展開を経て、遺伝学研究も新しい時代を迎えたと言える。今後の研究所活動は、その動向を利用してさらに研究を進展させる使命をおびた新しい段階に進まねばならない。学問の転換と法人化とがうまくかみ合って新しい研究所としての発展を期したいと考えている。

所長 堀 田 凱 樹

II. 研究室一覽

所 長 堀田 凱樹

企画調整主幹 石濱 明

2001.12.31 現在

研究系等	研究部門名	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		藤澤 信之 澤村 浩誠			
	変異遺伝研究部門		山尾 文明	岸清 野浩 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		今井 弘民				
	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	吉川 武男(非) 柳田 充弘					
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	清岡 水部 正 裕隆			
	形質遺伝研究部門	廣瀬 進	上田 均	湊山 田正 田 正 清明志			
	初期発生研究部門	武田 洋幸 (併任)		川上 厚志 (併任)			
	生理遺伝客員研究部門	古山 関明彦 山 亮一(非)					
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 (天深 前川 豊明) 深川 竜郎			
	進化遺伝研究部門	池村 淑道	齊藤 成也				
	理論遺伝客員研究部門	近藤 滋久 高木 利久					
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 敬哲			
	育種遺伝研究部門		角谷 徹仁	木下 能彦			
	脳機能研究部門		平田 たつみ	川崎 能彦			
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	城石 俊彦		小出 剛樹	
		発生工学研究室		相賀 裕美子		小久保 博樹	
		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	原核生物遺伝研究室			西村 昭子	
	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)	
	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	
		遺伝子回路研究室			今本 尚子	小瀬 真吾	
	生命情報・DDBJ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	五條堀 孝			池尾 一穂	
		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(深海) 薫	
		データベース運用開発研究室	菅原 秀明			宮崎 智	
放射線・アイソトープセンター センター長(併) 仁木 宏典	遺伝子発現解析研究室						
				仁木 宏典			
実験圃場 圃場長(併) 倉田 のり					野々村 賢一		
現員(定員) ※所長を除く	64 (82)	18 (26)	15 (23)	31 (33)			

※研究休職者 永井宏樹 (H 11.10. 1~H 14. 9.30) 天前豊明 (H 12. 4. 1~H 14. 3.31) 藤田昌也 (H 13. 4. 1~H 14. 3.31) は現員から除く。

※併任 武田洋幸 (H 13. 4. 1~H 14. 3.31) 川上厚志 (H 13. 4. 1~H 14. 3. 1) は現員に含む。

III. 研究概要

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戦略基礎研究(CREST)研究員・本田文江、櫻井仁美、片山 映、山本兼由、遺伝研 COE 外国人研究員・Dimitry KOLPASHCHIKOV(ロシア科学アカデミー生物有機化学研究所)、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・牧野嶋秀樹(総研大・生命科学)、科学技術振興事業団 CREST 技術員・鈴木久子、海道雅子、岡本拓人、COE 研究支援推進員・神田えみ、技術補佐員・遠藤静子、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13年度文部省科学研究費重点領域研究・金属蛋白質(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・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・稲垣冬彦)「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(B)「転写装置の機能分化の全体像」(石浜)、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)「CTD ホスファターゼ Fcp1 による RNA ポリメラーゼ II の制御機構の解析」(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)(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)「転写因子による転写包括制御」(鹿児島大学・前田広人)、「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)、「Mg(2+)レギュロンによる情報伝達機構の解明」(近畿大学・内海龍太郎)、「温度感受性変異株を用いた RNA ポリメラーゼ II の機能解析」(放医研・菅野公彦)。

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、最終年度の研究を実施し、同プロジェクトは、平成13年11月終了した。5年間に亘る支援で、研究に集中出来た効果は大きく、系統的・組織的研究が実施できた。

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「ストレス応答の総合機構」に関する日印ワークショップ(平成13年10月、印度ハイデラバード)を組織し、また「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) 大腸菌各種シグマ因子及び各種転写因子の細胞内濃度：小塩悦子、前田広人*、岩田 晃**、石浜 明(遺伝研・分子遺伝、鹿児島大・水産*、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、実験室培養での増殖期には、 σ^{70} 、 σ^N 、 σ^F の3種類だけが存在している。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。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。生体内でのシグマ競合の実態を知る

目的で、定量的ウエスタンブロット法を利用して、(i) 細菌増殖相の変化、(ii) 細菌培養温度の変化、および (iii) 細菌培養の培地組成の変化に伴う、全7種類のシグマ因子の細胞内濃度の系統的測定を行った (Maeda *et al.*, 2000)。一方、シグマ因子が不要となった時、シグマ因子に結合し、活性のない状態で一時的に保存する生理機能をもつ、いわゆるアンチシグマ因子の量も活性シグマ因子の細胞内濃度の制御に関係している筈である。我々は、主要シグマ因子 σ^{70} および定常期遺伝子群の転写に関わる σ^S に対するアンチシグマ因子を発見した。そこで、アンチシグマ因子全種類を純化し、特異抗体を調製し、アンチシグマ因子の細胞内濃度の測定にも成功した。

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。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。これらの細胞内濃度も、ゲノムの全遺伝子の転写包括制御に密接に関わっている筈である。そこで、転写因子全種類の細胞内濃度の制御の実態解明を目指した研究を開始した。これまでに約 60 種類を発現・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 AcrR, AhpC, AhpF, Arc, CbpB, Crp, DeoR, Dps, FruR, Fur, GreA, GroE, HepA, Hns, IciA, IclR, Ihf, Ilv, InfB, KdpE, LacI, Lrp, NusA, OxyR, PhoP, SspA, Stp, SdiA, ThiI, TufB 等の細胞内濃度を定量的ウエスタン法で定量した。

イムノブロット法による、個別転写因子の定量に加えて、CREST 石浜研究チームでは、二次元電気泳動で展開された全蛋白を同定測定する PROTEOME 解析を行った。転写因子のいくつかは、PROTEOME でも測定出来ているので、直接定量と比較することが出来た。また、最近開始した TRANSCRIPTOME 解析から得られる、転写因子各成分の mRNA 量との比較も始めた。

(2) 大腸菌転写因子作用機構の系統的解析：山本兼由，谷田勝教*，石浜 明（遺伝研・分子遺伝，遺伝研・放射線アイソトープセンター*）

大腸菌で約 260 種類を推定される転写因子候補のうち、少なくとも 100 – 150 種類は、RNA ポリメラーゼと直接接触し、転写装置の機能制御に関与していると考えられている。転写因子が、接触する RNA ポリメラーゼのサブユニットに応じて、作用機構が異なることの発見を契機として我々は、転写因子群を、接触相手のサブユニット a, s, b, b' 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, 2000)。戦略基礎研究の一環として我々は、大腸菌の既知転写因子約 150 種類の全ての作用機構を解明し、その仮説を実証する目的で、試

験管内転写系で転写調節機構を解析し、また RNA ポリメラーゼ上の接点同定を進めた。特に本年は、大腸菌の外界金属に応答する転写制御に関わる転写因子群の全てを得て、集中的に解析した。転写因子と RNA ポリメラーゼの蛋白-蛋白相互作用の接点の同定は、従来、接触不能となる RNA ポリメラーゼ変異のマッピングで行ってきたが、遺伝解析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ことで、接点を決定する系を開発した。即ち、RNA ポリメラーゼ各サブユニットに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方法を確立した。

(3) 大腸菌転写包括制御：DNA チップを利用した TRANSCRIPTOME 解析：Olga OZOLINE, 前田広人*, 山本兼由, 野村 扶**, 片山 映***, 藤田信之, 石浜明（遺伝研・分子遺伝, 鹿児島大・水産*, 現・東京都精神研**, 現・日本医大***）

大腸菌ゲノムの全遺伝子を対象とした発現パターンの解析は、従来、戦略基礎研究 (CREST) の一環として、二次元電気泳動を利用した PROTEOME を行って来た。これまでに同定した大腸菌蛋白成分は、500 に到達した (CREST 石浜研究チーム)。この数量は、ひとつの生物種では最高の数値である。一方、ゲノム全シーケンスが決定されたことにより、全遺伝子プローブを含む大腸菌 DNA チップが開発された。我が国で先駆的に開発された大腸菌 DNA チップを利用して、大腸菌に存在する mRNA の全種類を一挙に検出同定する実験系を開発し、TRANSCRIPTOME の系統的解析を開始した。本年は、次の二つの方向の解析を進めた。ひとつは、RNA ポリメラーゼ β , β' サブユニットと相互作用をするクラス III, IV の転写因子制御下の遺伝子群を同定する目的での解析である。クラス I (α サブユニット接触) II (σ サブユニット接触) 転写因子については、既に多くの転写因子が同定され作用機構が解明されている。本年度は、クラス III (β サブユニット接触) 転写因子の HepA (野村担当) とクラス IV (β' サブユニット接触) 転写因子の Usg 欠損株 (片山担当) で、転写が増強されるか減少する mRNA 種を同定し、新たに同定したこれら転写因子の生理機能を推定することが出来た。

一方、既知の転写因子群の支配下遺伝子の全体像を同定する目的の解析では、シグマ因子 7 種類それぞれの支配下遺伝子群の同定を目指した (Ozoline 担当)。ストレス応答遺伝子群の転写に必要と考えられていたマイナーシグマ因子の欠損株で転写が減少した遺伝子は、それらシグマの直接の支配下にあるものが含まれていると考え

て良い結果が得られた。また、シグマ因子の機能成分の濃度制御に関わるアンチシグマ因子の遺伝子が欠損した大腸菌の TRANSCRIPTOME 解析も並行して実施した(前田担当)。さらに、約 150 種類の転写因子群の遺伝子破壊株についても、TRANSCRIPTOME 解析を実施することとした。その手始めとして、外界金属への応答に関する転写因子支配下の遺伝子群を同定する目的で、それら転写因子遺伝子欠損株の TRANSCRIPTOME 解析を開始した(山本担当)。

(4) 大腸菌定常期移行の制御機構：牧野嶋秀樹，西村昭子*，石浜 明(遺伝研・分子遺伝，遺伝研・系統生物研究センター)

大腸菌増殖の対数増殖期から定常期への移行過程でのゲノム全遺伝子を対象とした発現包括制御を解明する目的の研究を、戦略基礎研究(CREST)の一環として展開して来た。その中で我々は、パーコール(Percoll)密度勾配遠心法を利用して、大腸菌分化に従って、細胞の比重が増大することを発見した(Makinoshima *et al.*, 2002)。しかも、大腸菌分化過程での浮遊密度の増加は、不連続で、密度勾配遠心管中で、多数の細胞バンドを形成した。そこで、対数増殖期から定常期に移行する段階で細胞の浮遊密度増加の分子的基盤、密度増加機構を解明することを目的で、まず分離された細胞集団のそれぞれを特徴付ける分化マーカーの検索を行った。まず初めに、対数増殖期及び定常期に特異的に活性化される、各種の既知プロモーター支配下に蛍光タンパク質を発現する融合遺伝子ベクターを大腸菌に導入し、形質転換細胞培養各時期で、細胞をパーコール遠心で分画したところ、密度がより増加している細胞ほど定常期特異的に発現するプロモーターが活性化されていることが判明した。分画した細胞中に存在するタンパク質を免疫定量法で測定した結果でも、比重の重い細胞集団中では、定常期特異的タンパク質が増加していた。定常期細胞で、浮遊密度が増加する分子基盤を理解する目的で、細胞当りの体積、核酸・蛋白質・糖鎖・脂肪などの化学組成の正確な測定を目指した解析を行い、また、菌体表層の鞭毛・繊毛の種類と付着量・分布の測定を開始した。

一方、戦略基礎研究での PROTEOME 解析から、定常期大腸菌にだけ出現する蛋白質を多数同定した。これら蛋白質の出現の時間経過を追跡すると、対数増殖期から定常期移行過程で、逐次合成されることが判明し、定常期遺伝子発現のカスケードが予測された。そこで、これら定常期特異的発現遺伝子の欠損株の定常期移行と、細胞浮遊密度変化を解析することとした。予備的観察では、定常期遺伝子発現に関する調節遺伝子破壊株では、定常期への移行途中で生存率が急速に低下し、また浮遊密度増加が認められなかった。変異株の系統的解析を実施する予定である。

(5) 大腸菌における Quorum Sensing 機構：山本兼由，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いると我々は提唱してきた(Ishihama, 2000)。ビブリオ菌や緑膿菌では、Quorum Sensing の細胞間情報伝達物質は、ホモセリンラクトン類である。ところが、大腸菌は、ホモセリンラクトンは合成しないものの、ビブリオ菌ホモセリンラクトン受容体 LuxR に類似した SdiA が存在し、細胞分裂制御に関わっている。大腸菌 SdiA 蛋白を単離し、細胞分裂遺伝子群 *ftsQAZ* の転写活性化機構を解析したところ、ホモセリンラクトンが、SdiA を介して、このオペロンのプロモーターからの転写を促進することを発見した(Yamamoto *et al.*, 2001)。大腸菌 SdiA は、環境中で、多種類の細菌が共存する時、他種細菌の細胞間情報伝達を傍受する役割を果たしているようである。しかし、大腸菌間の情報伝達物質については、まだ同定されていない。我々は、定常期特異的シグマ因子 σ^S だけを特異的に活性化するグルタミン酸がひとつの候補であると提唱している(Ohnuma *et al.*, 2001)。

(6) 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)

現在までに 40 種を超えるバクテリアについて全ゲノム配列が明らかにされている。これらのバクテリアが持つ転写因子の全貌を明らかにし、相互に比較することによって、調節系の起源と進化、環境への適応戦略に迫りたい。また転写因子を軸としたゲノム情報の再構築をめざす。昨年までにプロテオバクテリア群を中心とした 14 種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ったが、本年は主要な分類群を網羅する 36 種を対象を拡張するとともに、大規模な系統解析を行ない、転写因子の起源および消長について考察を行なった。またその過程で、DNA 結合ドメインと考えられる保存領域を持ちながら既知の遺伝子を含まない新たな蛋白質ファミリーを数種見いだした。これまでの成果をデータベースとして公開する準備をすすめるとともに、新規に決定されたゲノム配列(ドラフト配列を含む)について転写因子の検索、分類、機能予測を支援するためのシステムの開発を行なっている。

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 の細胞内濃度と CTD のリン酸化状態の変化：櫻井仁美，石浜 明(遺伝研・分子遺伝)

分裂酵母の RNA ポリメラーゼ II 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)。その結果、完全培地での対数増殖期の分裂酵母 JY741 株では、細胞当たりで換算して、Rpb3 は 1.0×10^4 分子とともとも少なく、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判明した。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。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 (Sakurai and Ishihama, 2001)。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 と蛋白量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。

一方、存在する RNA ポリメラーゼの機能状態を知るひとつの手掛かりとして、サブユニット I (Rpb1) の C 端に存在する 7 アミノ酸の 29 回の繰返し (YSPTSPS) 構造のリン酸化を解析したところ、細胞増殖相の変化に応じて、リン酸化の程度が変動することが判明し、RNA ポリメラーゼ II の機能量は変動していることが示唆された (Sakurai and Ishihama, 2002)。

(2) 分裂酵母 RNA ポリメラーゼ II と相互作用する蛋白因子の単離・同定とその機能の解析：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 (pol II) は、Rpb1-Rpb12 の 12 種類のサブユニット蛋白質で構成される。我々は先に、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)。研究は、pol II の機能制御を解明する新たな段階に移行し、各サブユニットと

相互作用をする転写因子の系統的探索を開始した。

最大サブユニット Rpb1 の C 末端ドメイン (CTD) は、YSPTSPS のコンセンサス配列をもつ 7 アミノ酸残基の繰返し構造をもち、pol II 本体から外部へ突出している。分裂酵母ではその繰返し回数は 29 回である。CTD はリン酸化制御を受け、非リン酸化 CTD をもつ pol II はメディエーター複合体と相互作用して、数種類の基本転写因子とともに転写開始複合体を構成する。CTD は転写開始時に高度にリン酸化され、これが RNA プロセッシングに関与する複合体の集合基盤となることが知られている。このような機能をもつ CTD は真核生物の核内 RNA ポリメラーゼ I, II, III のうち mRNA を合成する pol II にのみ存在する。pol I, II, III は共通サブユニット、相同サブユニットをもつが、Rpb4 サブユニットは pol II のみに含まれる。出芽酵母での解析から、Rpb4 サブユニットは pol II 本体の構造を安定化する機能をもつと同時に転写の開始に関与することが知られている。

分裂酵母で pol II と相互作用しその機能を制御する蛋白因子を単離するため *rpb3* サブユニット遺伝子にタグ配列をもつ酵母株を作製し、タグを利用して pol II を含む蛋白質複合体を単離した。その際、細胞抽出液の調整方法を検討し、細胞内で DNA から遊離しており非リン酸化型 CTD をもつ pol II を含む複合体と、転写途中にありリン酸化型 CTD をもつ pol II を含む複合体を分離した。質量分析法による同定の結果、前者の非リン酸化型 pol II 以外の構成因子は、基本転写因子 TFIIF と CTD ホスファターゼ Fcp1 であった (Kimura *et al.*, 2002)。Fcp1 は、近年、ヒトと出芽酵母で報告されているが、このような複合体の単離は前例がない。遺伝子組換えにより作製した分裂酵母 Fcp1 は実際に CTD ホスファターゼ活性をもち、酵母 4 分子解析の結果、*fcp1* 遺伝子は必須遺伝子であった。Fcp1/TFIIF/pol II 複合体の架橋剤処理により、Fcp1 は pol II の Rpb4 サブユニットに結合する可能性が見いだされ、これは組換え蛋白質の結合実験により確認された。また、チアミン添加により *rpb4* 遺伝子の発現制御が可能な酵母株を作製し、*rpb4* の発現を停止した酵母細胞からタグを利用して Fcp1/TFIIF/pol II 複合体を単離すると、複合体中に Fcp1 が存在せず、同時に、複合体中の pol II はリン酸化型 CTD をもっていた。以上により、転写終了後の pol II は Fcp1/TFIIF/pol II 複合体を構成し、ここで次の転写開始のための CTD の脱リン酸化を受けること、この複合体構成に際し、転写開始に関与する Rpb4 が Fcp1 を pol II に結合させる機能をもつことが明らかとなった。

分裂酵母 Fcp1/TFIIF/pol II 複合体には、生物種間で保存された TFIIF の 2 つのサブユニット TFIIF α (RAP74)、TFIIF β (RAP30) 以外に、出芽酵母 TFIIF に含まれ、高等動物 TFIIF には存在しない第 3 のサブユニット Tfg3 が含まれる。転写制御に関し、分裂酵母は出芽酵母よりも

高等動物に近い性質を有する場合が多く報告されるが、TFIIFの構成に関しては出芽酵母と同様であり、転写制御系全体としては、分裂酵母は出芽酵母と高等動物の中間的な性質をもつ可能性が示唆される。

(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 に特異的なサブユニットのひとつである Rpb7 蛋白質は、プロモーターからの正確な転写開始には必要だが、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。RNA ポリメラーゼ II による転写における Rpb7 サブユニット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、出芽酵母の *NRD1* 遺伝子と高い相同性を示す新しい遺伝子を得た。出芽酵母 Nrd1 蛋白質に関しては、最近になって、RNA ポリメラーゼ II によって転写されるが poly(A) + が付加されない small nucleolar RNA や small nuclear RNA の 3' 末端形成に関与していることが報告された。我々は、出芽酵母 Nrd1 蛋白質と出芽酵母の Rpb7 蛋白質も、相互作用することを見出した。すなわち、Rpb7 と Nrd1 の相互作用は進化上保存されており、このことは、この相互作用が生体内で意味のある結合であることを示唆している。two-hybrid 法により検出された相互作用は、直接的な相互作用を保証しないので、試験管内での直接結合能を検討した。組換え蛋白質を大腸菌中で発現させると不溶性であったため、尿素で変性・可溶化したのち透析して、GST プルダウンアッセイをおこない、直接的結合を証明した。また、遺伝子破壊により分裂酵母の Nrd1 相同蛋白質が生存に必須であることが明らかになった。今後、生体内での相互作用を解析し、その転写における意義を明らかにしたいと考えている。

(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。TFIID の解析にはこれまでおもにヒト、ショウジョウバエ、出芽酵母が用いられてきたが、我々は遺伝学的手法の適用が容易な別のモデル生物として分裂酵母を用いた解析を進めている。これまでに、分裂酵母の TFIID は、他の生物のものとは異なり、WD リピートをもつ TAF を 2 種類（TAF72 および TAF73）含んでいることを明らかにしてきた（Mitsuzawa *et al.*, 2001）。興味深いことに、TAF72 あるいは TAF73 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性蛋白質分解の欠損による細胞周期停止が回復する。これらの TAF の WD リピート領域

の機能を明らかにするため、TAF72 の C 末端領域（その大部分が WD リピートからなる）と相互作用する蛋白質を two-hybrid 法を用いてスクリーニングした。その結果、ヒストン H4 と相同性を示す TAF をコードする遺伝子 (*taf50* と命名) を得た。遺伝子破壊実験の結果、*taf50* は必須遺伝子であった。また、免疫沈降実験により、TAF50 蛋白質は、TAF72 と同様に、TFIID および SAGA 様複体の両方の構成要素であることを証明した。これらの結果から、(1) TFIID に特異的な TAF73 をもつことが他の生物にはない分裂酵母の特徴であり、TAF73 は WD リピートをもつ TAF の TFIID 複合体中での機能の解析のモデルとして適している。(2) TAF72 の WD リピートを含む C 末端側領域は、TAF50 と相互作用する。つまり、これまで不明であった WD リピートを含む領域の機能のひとつは、ヒストン H4 様 TAF との相互作用であることが明らかになった。

3. ウイルスの転写・複製装置の構造—機能相関

(1) 「RNA エフェクター」としてのインフルエンザウイルス RNA：vRNA によるウイルス RNA ポリメラーゼ活性化：本田文江，水本清久*，岡本拓人，石浜 明（遺伝研・分子遺伝，遺伝研・核酸化学*）

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 エンドスクレアーゼ活性、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 蛋白質から構成される各種の P 蛋白質複体の精製に成功した。単離 3P 複合体は、しかし活性がなかった。vRNA を添加すると、RNA キャップ結合活性、cap-1 RNA 切断活性、プライマーとした RNA 合成活性、ポリ A 付加合成活性が検出された。これらの結果から、RNA ポリメラーゼ活性化作用を示す「vRNA エフェクター」説を提唱した (Honda *et al.*, 2001)。

様々のモデル vRNA, cRNA 様の人工ウイルス RNA を作製し、RNA エフェクターとしての機能に必要な素単位の同定を行った。vRNA と相補的な cRNA にエフェクター機能がないので、RNA ポリメラーゼが vRNA との複合体として細胞に導入され、転写機能を発揮することが良く説明できる。

(2) インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼの機能変換：転写酵素と複製酵素の分子実体：本田文江，岡本拓人，Dmitry KOLPASHCHIKOV，海道雅子，石浜 明（遺伝研・分子遺伝）

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 クラスターで終結しポリ 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。多機能酵素の機能地図の解析を本年も継続したが、特に、プライマー結合部位、RNA 合成活性中心部位を、特異的ヌクレオチドのクロスリンキング法で同定する試みを進めた。

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。そこで我々はお芽酵母の 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、大量発現・純化し、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。また特異抗体を調製し、免疫共沈反応で、各 P 蛋白と宿主因子の直接相互作用を検定した。また、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。

研究業績

(1) 原著論文

- Colland, F., Fujita, N., Meares, C., Ishihama, A. and Kolb, A.: The interaction between σ^S , the stationary phase σ factor, and the core enzyme of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Genes Cells*, in press.
- Culham, D.E., Lu, A., Jishage, M., Krogfelt, K.A., Ishihama, A. and Wood, J.M.: The osmotic stress response and virulence in pyelonephritis isolates of *Escherichia coli* contributions of RpoS, ProP, ProU and other systems. *Microbiology* **147**, 1657-1670, 2001.
- Gosh, P., Ishihama, A. and Chatterji, D.: *Escherichia coli* RNA polymerase subunit ω and its N-terminal domain bind full length β' to facilitate incorporation into the $\alpha_2\beta$ subassembly. *Eur. J. Biochem.* **268**, 4621-4627, 2001.
- Honda, A., Endo, A., Mizumoto, K. and Ishihama, A.: Differential roles of viral RNA and cRNA in functional modulation of the influenza virus RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **276**, 31179-31185, 2001.
- Ishihama, A., Zou, C., Kobayashi, M., Kumar, A., Fujita, N., Sakurai, H. and Hayward, R.S.: Molecular recognition in gene transcription. *Internatl. J. Med. Biol. Frontiers*, in press.
- Jishage, M., Dasgupta, D. and Ishihama, A.: Mapping of the Rsd contact site on the sigma 70 subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Bacteriol.* **183**, 2952-2956, 2001.
- Kimura, M., Sakurai, H. and Ishihama, A.: Intracellular contents and assembly states of all 12 subunits of the RNA polymerase II in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur. J. Biochem.* **268**, 612-619, 2001.
- Kimura, M., Suzuki, H. and Ishihama, A.: Formation of a carboxy-terminal domain-phosphatase (Fcp1) / TFIIF / RNA polymerase II (Pol II) complex in *Schizosaccharomyces pombe* involves direct interaction between Fcp1 and the Rpb4 subunit of Pol II. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 1577-1588, 2002.
- Makinoshima, H., Nishimura, A. and Ishihama, A.: Discontinuous transition of *E. coli* phenotype during growth transition from exponential to stationary phase. *Mol. Microbiol.* **43**, 269-279, 2002.
- Mitobe, J., Mitsuzawa, H. and Ishihama, A.: Functional analysis of RNA polymerase II Rpb3 mutants of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Genet.* **39**, 210-221, 2001.
- Mitsuzawa, H., Seino, H., Yamao, F. and Ishihama, A.: Two WD repeat-containing TATA-binding protein-associated factors in fission yeast that suppress defects in the anaphase-promoting complex. *J. Biol. Chem.* **276**, 17117-17124, 2001.
- Ozoline, O.N., Fujita, N. and Ishihama, A.: Mode of DNA-protein interaction between the C-terminal domain of *Escherichia coli* RNA polymerase α subunit and T7D promoter UP element. *Nucleic Acids Res.* **29**, 4909-4919, 2001.
- Raj, V.S., Tomitori, H., Yoshida, M., Apirakaramwong, A., Kashiwagi, K., Takio, K., Ishihama, A. and Igarashi, K.: Properties of a revertant of *Escherichia coli* viable under spermidine accumulation: Increase in L-glycerol 3-phosphate. *J. Bacteriol.* **183**, 4493-4498, 2001.
- Sakurai, H. and Ishihama, A.: Transcription organization and mRNA levels of the genes for all 12 subunits of the fission yeast RNA polymerase II. *Genes Cells* **6**, 26-36, 2001.
- Sakurai, H. and Ishihama, A.: Intracellular level of the RNA polymerase II in the fission yeast stays constant but the level of carboxyl-terminal domain phosphorylation varies depending on the phase and rate of cell growth. *Genes Cells*, in press.

16. Shin, M., Kang, S., Hyun, S.-J., Fujita, N., Ishihama, A., Poul Valentin-Hansen, P. and Choy, H.E.: Repression of *deoP2* in *Escherichia coli* by CytR: Conversion of a transcription activator into a repressor. *EMBO J.* **20**, 5392-5399, 2001.
17. Sujatha, S., Ishihama, A. Chatterji, D.: Functional complementation between mutations at two distant positions in *Escherichia coli* RNA polymerase as revealed by second-site suppression. *Mol. Gen. Genet.* **264**, 531-538, 2001.
18. Wigneshweraraj, S.R., Ishihama, A. and Buck, M.: *In vitro* roles of invariant helix-turn-helix motif residue R383 in σ^{54} (σ^N). *Nucleic Acids Res.* **29**, 1163-1174, 2001.
19. 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, 2001.
20. Yamamoto, K., Yata, K., Fujita, N. and Ishihama, A.: Novel mode of transcription regulation by SdiA, an *Escherichia coli* homologue of the quorum-sensing regulator. *Mol. Microbiol.* **41**, 1187-1198, 2001.
21. Yasuno, K., Yamazaki, T., Tanaka, Y., Kodama, T.S., Matsugami, A., Katahira, M., Ishihama, A. and Kyogoku, Y.: Interaction of the C-terminal domain of the *E. coli* RNA polymerase α subunit with the UP element: Recognizing the backbone structure in the minor groove surface. *J. Mol. Biol.* **306**, 213-225, 2001.
22. Yoshida, M., Kashiwagi, K., Kawai, G., Ishihama, A. and Igarashi, K.: Polyamine enhancement of the synthesis of adenylate cyclase at the translational level and the consequential stimulation of the synthesis of the RNA polymerase σ^{28} subunit. *J. Biol. Chem.* **276**, 16289-16295, 2001.

(2) その他

1. 石浜 明：金属で遺伝子転写装置の構造を見る。「生物と金属」第15回「大学と科学」公開シンポジウム組織委員会編, クバプロ, 167-179, 2001.
2. 石浜 明：プレゼンテーションの工夫 (5). 講演の工夫. 蛋白質核酸酵素 **46**, 1306-1309, 2001.
3. 石浜 明：大腸菌分子生物学。「部分から全体へ」, そして再び「全体から部分へ」. 蛋白質核酸酵素 **46**, 1868-1871, 2001.
4. 石浜 明：ひとつの大腸菌まるごとを知る. Biohistory 生命誌 **31**, 10-11, 2001
5. 村上勝彦, 石浜 明：RNA ポリメラーゼ機能の構造的基盤. 蛋白質核酸酵素 **46**, 1608-1617, 2001.

(3) 発表講演

1. 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.
2. 藤田信之：バクテリアの転写調節を支える蛋白質構造. 産業技術総合研究所人間系研究体セミナー, 大阪, 11月.
3. 藤田信之：バクテリア型転写因子の系譜—実験科学の視点からゲノム情報を再構築する. ゲノム情報解析技術チュートリアル講演会「生物学的視点からのゲノム情報解析」, 木更津, 12月.
4. 本田文江・岡本拓人・水本清久・石浜 明：インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼの機能制御：vRNA による転写装置への変換. 第49回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 11月.
5. 石浜 明：細菌における転写制御の全体像. 第74回日本細菌学会総会シンポジウム, 岡山, 4月.
6. Ishihama, A.: Differentiation of *Escherichia coli*: Discontinuous phenotype changes during growth transition into stationary phase. India-Japan Co-Operative Science Programme Workshop on "Fundamental Mechanisms of Stress Response", Hyderabad, India, November.
7. Ishihama, A.: Viral RNA polymerases: Molecular architectures and functional modulations. Molecular Biology and Genetics Unit Seminar, Bangalore, India, November.
8. 石浜 明：ウイルスはなぜ特定の宿主だけで増えるのか：インフルエンザウイルスの複製と転写. 弘前大学遺伝子実験施設シンポジウム, 弘前市, 11月.
9. Ishihama: Differentiation of *Escherichia coli*: Discontinuous phenotype changes. 第24回日本分子生物学会年会ワークショップ, 横浜, 12月.
10. 石浜 明：遺伝子発現ヒエラルキーの決定機構：発現遺伝子はこうして選ばれる. 戦略基礎研究「生命活動のプログラム」シンポジウム, 東京, 12月.
11. Ishihama, A., Fujita, N., Katayama, A., Nomura, T., Yamamoto, K., Endo, S., Koshio, E. and Maeda, H.: Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. The 13th RNA Polymerase Workshop, Nottingham, UK, March.
12. Ishihama, A., Jishage, M., Dugupta, D., Maeda, H., Fujita, N., Ohnuma, M. and Tanaka, K.: Regulation of *Escherichia coli* sigma factors: Anti-sigma factors and activity control. Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB) Summer Research Conference, Saxtons River, USA, July.
13. Ishihama, A., Maeda, H., Kosio, E., Yata, K., Iwata,

A. and Ueda, S.: Level control of transcription apparatus in *Escherichia coli*. The 2001 Molecular Genetics of Bacteria and Phages Meeting, Madison, USA, August.

14. Ishihama, A., Sakurai, H., Kimura, M., Mitsuzawa, H., Suzuki, H., Kanda, E.: Control of formation and function of the RNA polymerase II in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. The Fifth Symposium on Transcription Assembly, Hyderabad, India, November.

15. Ishihama, A., Sakurai, H., Kimura, M., Mitsuzawa, H., Suzuki, H., Kanda, E., Mitobe, J. and Ishiguro, A.: Regulation of synthesis and assembly of RNA polymerase II subunits in *Schizosaccharomyces pombe*. The 13th RNA Polymerase Workshop, Nottingham, UK, March.

16. Makinoshima, H. and Ishihama, A.: Fractionation and characterization of *Escherichia coli* cells of different stages during growth transition from exponential to stationary phase. The 2001 Molecular Genetics of Bacteria and Phages Meeting, Madison, USA, August.

17. Masamura, Y., Talukder, A. A., Ishihama, A. and Takeyasu, K.: Analysis of higher-order structure of *Escherichia coli* genome by using atomic force microscopy. JAIST Symposium on Nanobiology and Biotechnology, Kanazawa, March.

18. 正村祐介, 牧野島秀樹, Talukder, A.A., 石浜 明, 竹安邦夫: 大腸菌ゲノムの高次構造は各増殖期において大きく変化する. 第24回日本分子生物学会年会, 横浜, 12月.

19. 光澤 浩, 石浜 明: 分裂酵母のTFIIDおよびSAGA複合体の解析. 第34回酵母遺伝学フォーラム, 京都, 8月.

20. 光澤 浩, 石浜 明: 分裂酵母のTFIIDおよびSAGA複合体の解析. 第24回日本分子生物学会年会, 横浜, 12月.

21. 小笠原 寛, 加藤明宣, 中村浩士, 山本兼由, 石浜明, 内海龍太郎: 二成分制御系 PhoP/PhoQ による *phoPB*, *mgtA*, *mgrB* 遺伝子の転写制御. 日本農芸化学会 2001 年大会, 京都, 3月.

22. 小笠原 寛, 皆川 周, 山本兼由, 石浜 明, 内海龍太郎: 転写制御因子 PhoP によって制御される Mg^{2+} イオン応答性遺伝子群. 第24回日本分子生物学会年会, 横浜, 12月.

23. Yamamoto, K., Fujita, N. and Ishihama, A.: Novel class II transcription factors of *Escherichia coli*, SdiA, a homologue of the quorum-sensing regulator, and PhoP, a response regulator of Mg (II) -sensing

two-component system. Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB) Summer Research Conference, Saxtons River, USA, July.

24. 山本兼由, 小塩悦子, 谷田勝教, 藤田信之, 石浜明: 大腸菌細胞間情報伝達シグナルレセプター Sdi を介した転写制御. 第24回日本分子生物学会年会, 横浜, 12月.

25. 吉田 円, 柏木敬子, 石浜 明, 五十嵐一衛: ポリアミンによる RNA ポリメラーゼ σ^{38} サブユニットの合成調節機序とその生理的意義. 第74回日本生化学会大会, 京都, 10月.

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), 「分裂酵母接合型変換の分子機構と相同組換えの接点」(岩崎博史・横浜市立大学大学院総合理学研究科), 「細胞周期に伴う核・核膜構造形成機構に関する研究」(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。また研究集会は「ユビキチンを介した DNA 損傷応答のメカニズム」(榎本武美・東北大学大学院薬学研究科)を開催した。

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 (C) 「ユビキチン系による DNA 損傷修復の調節と発がん制御」(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), 特定領域研究 (C) 「SCF ユビキチンリガーゼの標的蛋白質の網羅的スクリーニング」(代表・岸努) によった。

昨今, ユビキチン研究が分子生物学, 細胞生物学の様々な分野から多大の興味を集めている。ユビキチンシステムの主要な役割であるタンパク質分解が、従来の細胞内の不要物の除去機構としての負のイメージを脱却し、逆に積極的な細胞機能調節機構として再評価されるに至っ

たからである。その重要性は、細胞間相互作用、細胞周期、情報伝達、遺伝子発現制御など近年ますます多くの重要な生命現象へと拡大し、確認されてきている。更に最近では、ユビキチンによる翻訳後修飾が分解以外のシグナルとして作用し、ユビキチン化タンパク質の機能修飾、変換をとおり細胞機能を調節すると考えられるケースが見つかってきたことは、ユビキチンシステムの機能制御系としての位置づけを更に確固たるものにしていく。

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。細胞周期制御の観点からみると、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。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ユビキチン経路を同定し、この経路に働く酵素、因子群を核機能制御や染色体機能の制御のネットワークの中に位置付けることを目的とした。

(1) 分裂酵母における DNA 修復のユビキチン経路: Park, 山尾

ユビキチン系の絡む生命現象として当初より注目されてきたものに DNA 修復系がある。出芽酵母において、Rad6 (Ubc2) に加えて、別の E2 である Ubc13 と E2 類似 (non-canonical E2) の Mms2 蛋白質が複合体を形成してユビキチン化反応を行い、この経路が Rad6 (Ubc2) と DNA 修復に関し同じエピスタシスに属し、変異誘発の表現型を示すことから、共に同じ DNA 複製に絡む修復系の調節に関わったことが示唆されている。さらに、Ubc13 / Mms2 の触媒するユビキチン化反応は奇異なポリユビキチン鎖形成を引き起こす。通常はユビキチン分子内の Lys48 残基を介して次のユビキチン分子を結合してポリユビキチン鎖を形成するが、Ubc13 / Mms2 のそれは Lys63 残基を介する鎖を形成する。Lys63 残基を介したポリユビキチン鎖は分解指標とはならず、蛋白質の機能変換、もしくは局在などに関与すると想像され、この意味においても興味深いユビキチン経路である。

他方、染色体 DNA 複製に関わる高い忠実度を持った DNA ポリメラーゼに対して、修復に関与する DNA ポリメラーゼの発見、同定がこの 2, 3 年に著しく進展し、DNA 上の

損傷箇所の複製に際し前者が立ち往生して、チェックポイントの起動、ないし細胞周期の停止が起こるのに対し、複製の忠実度を犠牲にしても損傷箇所を乗り越える活性を持ったポリメラーゼとして後者に属するものがそこへ呼び込まれることで修復と変異の誘発が起こると考えられている。

修復に関わるユビキチン経路の同定、修復現場における修復酵素の同定が進展にもかかわらず、その両者をつなぐ、あるいは制御する分子群については全く不明である。DNA の損傷修復とそのためチェックポイントで周期を停止させる、また損傷部位でどのようにして別のポリメラーゼにスイッチするのメカニズムやその特異性ははまだブラックボックスのままである。上記のユビキチン経路の発現がそこに関わっていることが強く示唆されるため、分裂酵母で Ubc13 / Mms2 のユビキチン経路とそれに相互作用する因子を検索した。

UbcP7 (Ubc13 ホモログ) の欠損は、UbcP2 (Rad6 ホモログ) の epistasis に属する紫外線感受性を示すことが判明した。さらにこの経路に関わる因子をさがすため、Two-hybrid 法で Mms2 と相互作用する蛋白質を検索して Cpc2 を同定した。Cpc2 の欠損は増殖に必須ではなかったが、意外にも、弱いながらも紫外線感受性を示し、かつ、Rad6 に同じエピスタシスを示した。さらにその欠損により G2 遅延の伸長した細胞を蓄積したことからチェックポイントにも関係していると思われる。Cpc2 は、GTP 結合タンパク質 β サブユニットに相同性が高く、多様なタンパク質と相互作用する多機能タンパク質と解されている。meiosis の開始因子 Ran1 や C キナーゼ、転写因子 GCN4 など、一般にストレス対応のタンパク質と思われるものと相互作用し、それらの核における Anchoring Protein で、且つ負の調節因子として作用していると考えられている。したがって UbcP7 / Mms2 経路にも Cpc2 による同様の負の調節作用が期待され、上記の観察結果から Cpc2 は Rad6 グループの新しい制御因子と期待される。Cpc2 が DNA 損傷時における UbcP2 / UbcP7 による複製修復シグナルの促進と DNA 修復チェックポイントの各々の負の調節機構として働きながら、両者の間のクロストーカーとして機能しているのではないかと我々の作業モデルを検証したいと考えている。

(2) 分裂酵母におけるクロマチン機能を制御するユビキチン経路: Park, 山尾

分裂酵母における E2 分子種の検索とその機能を解析する過程で、特定の株での接合型のヘテロタリズムをホモタリズムに転化させるものを見いだした。分裂酵母 UbcP3 (出芽酵母 Ubc7 ホモログ) の欠損によって、通常は接合型を変換しない heterothallic 株の h^{+N} 細胞が高頻度で h^{-} 細胞に変換した。生じた h^{-} 細胞も h^{+} に変換可能であった。つまり表現型では h^{90} (homothallic) 化したと考えられた。

この観察に用いた h^+ 株の heterothallism は、接合型を規定する *mat1* 座でのカセット転座反応 (Gene Conversion) における Resolution 反応の中間産物として *mat1* 座での *mat* 配列の重複配列が生じたためと考えられており、接合型変換のコピー元になる *mat2* (h^- 型), *mat3* (h^+ 型) カセットは正常なものが残っている。これに対し、コピー元の *mat2* (h^- 型), *mat3* (h^+ 型) カセットの欠失によって hetethallism を示す別のタイプの h^- , h^+ 株では UbcP3 の欠失による接合型変換は観察されなかった。分子的には h^+ 株での heterothallism の原因である *mat1* 座での重複配列がこのユビキチン経路の欠損により高頻度でループアウトしていることが観察された。これが *mat* 座に特異的な組換え (Gene Conversion) なのか、それとももっと一般的な相同組換えの頻度の上昇なのか、また、組換えに直接関わる分子装置への効果なのか、それとも組換えの場としてのクロマチン構造の問題なのか、さらにこのユビキチン化はタンパク分解を介するか否か等の問題を惹起する。いずれにしても、遺伝的組換えを抑制する機構の存在とそこでのユビキチンの関わりを示唆している。クロマチンの機能構造に関わるユビキチンの役割は、以前より予想と期待はされてはいても、その手がかりとなるものはいまだかつて何もなかったことを考えれば非常に興味深い系と言える。

mat 座はヘテロクロマチンに相当すると考えられ、遺伝子の Silencing 現象も観察されている。同様のことは染色体セントロメア領域、テロメア領域にもある。これらの遺伝子の Silencing 現象への UbcP3 の関与も含めて、クロマチンの Local Conformation の制御にユビキチンが関与する可能性も視野に入れながら、上記の分子メカニズムを解析している。

(3) 分裂期サイクリンの分解制御機構：清野

分裂期サイクリンおよび染色体分配を制御する securin 蛋白質のユビキチン経路による分解は重要な細胞分裂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分裂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。こ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。両遺伝子産物 UbcP1, UbcP4 は分裂期に機能するユビキチン・リガーゼ APC/C (anaphase promoting complex/cyclosome) の上流で直接、分裂期サイクリン Cdc13 のユビキチン化に関与し、しかも機能的に重複していないことが明らかになった。現在、この二つのユビキチン転移酵素 UbcP1, UbcP4 の分裂期サイクリンのユビキチン

化における機能的差異について解析中であり、重要な結論を導きだしつつある。更に、securin 蛋白質 Cut2 のユビキチン化への関与についても解析中である。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ていた。それに対して *ubcP4* 変異株中では総ユビキチン化蛋白質の顕著な減少は認められなかった。このことから UbcP4 が特定の蛋白質のユビキチン化に関与するのに対し UbcP1 は多くの蛋白質のユビキチン化に関与することが示唆される。今後、他のユビキチン化蛋白質についてそのユビキチン化における UbcP1 の関与を明らかにしていく。

(4) ユビキチンリガーゼ SCF 複合体の解析：岸 努

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。この中で、ユビキチン化の標的蛋白質を認識するのが F-box モチーフを持つ F-box 蛋白質である。これまでに、出芽酵母の G1 サイクリン Cln2 が、F-box 蛋白質の一つ Grr1 によって、SCF ユビキチンリガーゼにリクルートされ、ユビキチン化されることを明らかにした。

本年度は、Cln2 を安定化する変異株として分離した #75 変異株を用いて解析を行った。まず、#75 変異株で、Cln2 がどの段階で安定化されているのかを検討した。その結果、変異株では、ユビキチン化された Cln2 を検出することができなかった。したがって、#75 変異株では、Cln2 のユビキチン化ができないことが示唆された。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。この遺伝子を DOC1 (Degradation Of Cln2) とした。この遺伝子をコードする蛋白質 Doc1 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) Doc1 が、SCF ユビキチンリガーゼの構成因子をリン酸化することによって活性化する、という可能性が考えられるので、検討した。まず、免疫沈降した SCF ユビキチンリガーゼの中に、Doc1 蛋白質を検出することはできなかった。次に、野生株と *doc1* 変異株で、SCF ユビキチンリガーゼに含まれる Grr1 の量を比較したところ、大きな差はみられなかった。現在、(III) の可能性、すなわち、SCF ユビキチンリガーゼの構成する蛋白質の中で、リン酸化によって活性が制御されている

研究業績

(1) 原著論文

1. Mitsuzawa, H., Seino, H., Yamao, F. and Ishihama

A. Two WD repeat-containing TATA-binding protein-associated factors in fission yeast that suppress defects in the anaphase-promoting complex. *J. Biol. Chem.* **276**, 17117-17124, 2001.

(2) その他

1. 山尾文明：「細胞周期制御からみたユビキチンシステム」蛋白質核酸酵素（「新世紀におけるタンパク質科学の進展」）**46**, 1704-1789, 2001.

(3) 発表講演

1. Joon-Hyun Park, 山尾文明：3R Symposium 「Ubiquitin conjugating enzyme affecting heterothallism in fission yeast」, 三木, 11月.

2. Joon-Hyun Park, 逢坂文男, 山尾文明：第24回日本分子生物学会「分裂酵母の接合型変換はユビキチン経路で制御される」, 横浜, 12月.

3. Joon-Hyun Park, 山尾文明：第24回日本分子生物学会「Characterization of UbcP7-Mms2, a ubiquitin pathway for DNA repair in the fission yeast」, 横浜, 12月.

4. 土井康平, 野間将平, 山尾文明, 後神秀基, 矢倉達夫：第24回日本分子生物学会「ゴルジ体膜タンパク質 p138 の発現及び局在機構の解析」, 横浜, 12月.

A-c. 核酸化学客員研究部門

(1) センダイウイルスゲノムの転写機構：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要な宿主タンパク質(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つの宿主因子が必要であり、その内の2つについて細胞骨格系タンパク質のチューブリン(Mizumoto *et al.*, *J. Biochem.* **117**, 527, 1995)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(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はそのアミノ酸配列、酵素活性ならびに免疫学的な性質から解糖系酵素の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合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。また、SeV mRNAのキャップ構造(m⁷GpppAm)合成はウイルスタンパク質によって触媒されると推定されているが、その酵素活性の直接的検出はまだなされていない。我々は、まず、キャップメチル化酵素活性を検出するためにGpppA-RNAを基質として精製ウイルスRNPを用いて検討したところ、ウイルスRNPはAdoMet存在下にm⁷GpppA-RNAを合成する活性を有することが明らかになった。すなわち、ウイルスRNPには少なくともmRNA(guanine-7-)methyltransferase活性が存在し、それが独立した(転写とは共役しない条件下での)反応として検出可能であることが示された(Kobayashi *et al.*, 第24回日本分子生物学会年会講演要旨集, 630, 2001)。

研究業績

(1) 原著論文

1. 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.

2. 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.

3. Honda, A., Endo, A., Mizumoto, K., and Ishihama, A.: Differential roles of viral RNA and cDNA in functional modulation of the influenza virus RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **276**, 31179-31185, 2001.

4. Tsuji, K., Mizumoto, K., Yamochi, T., Nishimoto, I., and Matsuoka, M.: Differential effect of ik3-1/Cables on p53- and p73-induced cell death. *J. Biol. Chem.* in press, 2002.

(2) 発表講演

1. 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を含む2本鎖RNAに結合する宿主因子の解析：部分精製と機能解析。日本薬学会第121年会，札幌，3月。

2. 岩間美奈子，水本清久：センダイウイルスのmRNA合成を負に調節する宿主因子の解析。日本薬学会，第15回微生物シンポジウム，東京，9月。

3. 福田光治，塚本俊彦，水本清久：ヒトmRNAキャッピング酵素とmRNA(グアニン-7-メチル基転移酵素との相互作用部位の解析。第24回日本分子生物学会年会，横浜，12月。

4. 柴垣芳夫，久武幸司，福田 綾，深町伸子，塚本俊彦，水本清久：mRNAキャッピング酵素の転写開始複合体への取り込み。第24回日本分子生物学会年会，横浜，12月。

5. 小林正樹，荻野朝朗，岩間美奈子，水本清久：センダイウイルスのmRNAキャップメチル化酵素，mRNA(グアニン-7-メチル基転移反応の解析。第24回日本分子生物学会年会，横浜，12月。

6. 若井ちとせ，岩間美奈子，荻野朝朗，水本清久：インフルエンザウイルスキャップ依存エンドヌクレアーゼの基質特異性。第24回日本分子生物学会年会，横浜，12月。

7. 岩間美奈子，畑中利彦，鈴木雄次郎，水本清久：SPAビーズを用いたインフルエンザウイルスキャップ依存エンドヌクレアーゼ活性検出系の確立。第24回日本分子生物学会年会，横浜，12月。

(2) 原核型RNAポリメラーゼによる転写制御機構：田中寛

1) 大腸菌増殖定常期における転写抑制機構：

大腸菌は，栄養源の枯渇などにより環境が悪化すると，増殖を停止し定常期に入る。この際，多くのプロモーターからの転写が影響を受けるが，その機構の詳細にはまだ不明な点が多い。栄養増殖細胞における転写の大部分を占めるrRNAオペロンやその他の翻訳に関わる遺伝子は，ppGppによる緊縮応答の標的であり，定常期への移行に伴って転写抑制が起こる。今回我々は，この緊縮応答の支配外にある*lacUV5*プロモーターや人工的に合成されたコンセンサス型プロモーターについて，増殖相を追った経時的発現解析を行った。大腸菌ではβ-ガラクトシダーゼをレポーターとした研究が多いが，この酵素は細胞内で極めて安定であり，遺伝子発現抑制の指標としては不適切である。そこで，本研究では*V.fisheri*由来のLuciferase遺伝子をレポーターとして用いた。その結果，栄養増殖期から定常期への移行に伴うある時点から，ルシフェラーゼ活性の急激な低下が観察され，この蛋白質の合成が突然Shut-Offされたものと考えられた。遺伝的解析の結果，このShut-Offは*rpoS*，*rsd*，*crp*，*hfq*，*stpA*およびppGppに無関係であるが，*hns*遺伝子に強く依存していることが

明らかになった。H-NSは多くの例で転写の抑制に関わっているが，定常期における発現抑制にも関与していることが強く示唆された。

2) シアノバクテリアにおける窒素同化関連転写調節機構：

NtcAはシアノバクテリア一般に見いだされる転写因子であり，硝酸の細胞内への取り込みからアンモニアへの還元，炭素骨格へのアンモニア分子の取り込み等，窒素同化に関連した遺伝子群を正に調節している。NtcAは構造的に大腸菌のCRPと相同性が高く，転写開始点から約40bp上流を中心とする二回転対称配列に結合し，転写を活性化すると考えられる。大腸菌のCRPは，リガンドであるcAMPと結合することにより転写を活性化する。このことから，NtcAもCRPと同様に，リガンドと結合することで，転写の活性化を調節している可能性が考えられた。シアノバクテリアは一般に2-oxoglutarate dehydrogenaseを持たず，2-oxoglutarate (2-OG)は専ら窒素同化の際の炭素骨格として量的調節をうけている。窒素欠乏時には，細胞内の2-OGの濃度が増加することが知られていることから，本研究では，2-OGがNtcAの活性化因子である可能性を検討した。まず，大腸菌で発現し精製したNtcAを用い，NtcA結合領域を含むDNAとの結合活性をゲルシフト解析を行い比較した。その結果，2-OGにより特異的なDNAとの結合活性が上昇することを確認した。さらに，NtcAおよび*Synechococcus* PCC7942株のRNA polymeraseを用いた*in vitro*転写解析においても，2-OGによりNtcA依存のプロモーターからの転写が活性化されることを確認した。以上の結果は，2-OGを窒素欠乏のシグナルとしてNtcAは転写を調節していることを示唆している。

3) 葉緑体における核コードシグマ因子による転写調節：

高等植物の葉緑体における真正細菌型RNAポリメラーゼ(PEP)は，色素体ゲノムコードのコア酵素と，プロモーターを認識し転写を開始するのに必要とされる核コードのシグマ因子から構成されている。シグマ因子は複数種存在しており，各シグマ因子は葉緑体の発達や様々な環境の変化に反応して異なるプロモーターを選択的に認識しているものと考えられる。

我々はこれまでにシロイヌナズナから6種類のシグマ因子遺伝子(*SIG1-SIG6*)を同定し，それらの発現と機能について解析を進めている。最近，それらのうち*SIG2*遺伝子へのT-DNAの挿入による変異株を取得した。pale-greenの表現型を示すこの株では葉緑体の発達が著しく阻害されており，何らかの色素体遺伝子の転写が影響を受けていると考えられた。そこで本研究では，プライマー伸長法とS1マッピング法を用いて*SIG2*に依存したプロモーターの同定を行った。その結果，*trnE*プロモ-

ター及び *psbD* プロモーターの1つ (*psbD-256*) の転写量が *SIG2* 変異に依存して特異的に減少することを見出した。そこで、これらの転写開始点を決定し *SIG2* に認識されると考えられるプロモーター構造を解析した結果、大腸菌型の '-10', '-35' 領域が含まれていることが分かった。また、変異株に *SIG2* のゲノム領域を導入したシロイヌナズナにおいてこれらのプロモーターからの転写が野生株と同じレベルまで相補されることを確認した。一方、*psbA* 及び *rbcl* プロモーターからの転写は *SIG2* 変異の影響を受けていなかった。

研究業績

(1) 原著論文

1. Kengo Kanamaru, Akitomo Nagashima, Makoto Fujiwara, Hiroshi Shimada, Yumiko Shirano, Kazumi Nakabayashi, Daisuke Shibata, Kan Tanaka, and Hideo Takahashi An *Arabidopsis* sigma factor (*SIG2*)-dependent expression of plastid-encoded tRNAs in chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* **42**, 1034-1043, 2001.

(2) 発表講演

1. 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. 第3回クラミドモナス・ワークショップ, かずさアーク, 2001年3月9日.

2. 清水宏幸, 田中 寛, 高橋秀夫: 大腸菌増殖定常期における転写抑制機構の解析. 農芸化学会 2001年大会, 京都, 2001年3月.

3. 長沢桐奈, 田中 寛, 高橋秀夫: 原始紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* における, 葉緑体マイクロアレイの作成と転写発現解析. 農芸化学会 2001年大会, 京都, 2001年3月.

4. 金丸研吾, 田中 寛, 高橋秀夫: 葉緑体発達過程での σ 因子依存的な遺伝子発現調節と翻訳爆発. 日本植物生理学会ワークショップ, 福岡, 2001年3月.

5. 華岡光正, 金丸研吾, 田中 寛, 高橋秀夫: シロイヌナズナの葉緑体転写制御における *sigB* の役割. 日本植物生理学会, 福岡, 2001年3月.

6. 中野貴之, 鈴木石根¹, 村田紀夫¹, 田中 寛, 高橋秀夫: *Synechocystis* sp. PCC 6803 のグループ2シグマ因子遺伝子 *sigD* (*sl12012*) の機能解析. 日本植物生理学会, 福岡, 2001年3月.

7. Akira Ishihama, Miki Jishage, Dipak Dugupta, Hiroto Maeda, Nobuyuki Fujita, Mio Ohnuma and Kan Tanaka: Regulation of *Escherichia coli* sigma factors: Anti-sigma factors and activity control. FASEB Summer Conference, Vermont, 2001.7.

8. M. Hanaoka, A. Nagashima, K. Kanamaru, K. Tanaka & H. Takahashi: The role of *SIG2* on the expression of photosynthesis genes in chloroplasts.

PHOTOSYNTHESIS 2001, 12th International Congress on Photosynthesis, SYMPOSIUM 40, Sydney, Australia, 2001.8.

9. Kan Tanaka, Keiko Koga, Hiroyuki Shimizu & Hideo Takahashi: Post exponential gene silencing involved in H-NS in *Escherichia coli*. Cell Cycle 2001, Osaka, 2001.9.

10. Kan Tanaka: Functional analysis of the group 2 sigma factors in *Synechocystis* sp. PCC6803. The Japan-Germany Binational Seminar "Functional Genomics of Cyanobacteria, -Impact on Plant Biology-", Okazaki, 2001.10.6-11.

11. Kan Tanaka: Transcription factor sigma in chloroplasts: A bacteria life in plants. INDIA-JAPAN CO-OPERATIVE SCIENCE PROGRAMME "Fundamental Mechanisms of Stress Response", Hyderabad, INDIA, 2001.11.8-10.

12. 田中 寛: 植物のパワージェネレーター葉緑体はいかにつくられるか. 第16回「大学と科学」公開シンポジウム 明日を拓く植物科学, 神戸, 2001年11月17-18日.

13. 古賀恵子, 清水弘幸, 田中 寛, 高橋秀夫: 大腸菌増殖定常期における遺伝子発現機構の解析. 日本分子生物学会 2001年度年会, 横浜, 2001年12月.

14. 谷川亮平, 白兼正夫, 前田真一, 小俣達男, 田中 寛, 高橋秀夫: シアノバクテリア窒素同化関連転写因子 *NtcA* の転写機構の解析. 日本分子生物学会 2001年度年会, 横浜, 2001年12月.

15. 中野貴之, 鈴木石根¹, 村田紀夫¹, 田中 寛, 高橋秀夫: シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 株のグループ2シグマ因子遺伝子 *sigD* の発現解析. 日本分子生物学会 2001年度年会, 横浜, 2001年12月.

16. 華岡光正, 金丸研吾, 田中 寛, 高橋秀夫: シロイヌナズナにおける葉緑体 RNA ポリメラーゼシグマ因子 *SIG2* に依存したプロモーターの解析. 日本分子生物学会 2001年度年会, 横浜, 2001年12月.

B. 細胞遺伝研究系

B-a. 細胞遺伝研究部門

当部門はDNA組み換え反応を研究している小川研究室と、染色体進化の理論細胞生物学的研究を行っている今井研究室からなる。平成7年以来当部門の教授を務めていた小川智子は平成13年3月に定年を迎え、研究の場を岩手看護短大に移した。平成13年4月以降の当部門のスタッフは、助教授：今井弘民である。1月-3月に小川研究室に所属していた人達の現在の所属は以下の通りである。助手：田中茂生（インビトロジェン株式会社）、総合研究大学院大学：立田大輔（国立がんセンター研究・疾病ゲノムセンター博士研究員）、遺伝研特別研究生：押海裕之（大阪府立成人病センター研究所・第6部免疫博士研究員）、研究促進技術補佐員：池谷優子（発生遺伝研究部門・研究補佐員）、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：片野博一（スチュワート養成所）、研究補佐員：高田恭子（生体高分子研究室・研究補佐員）。

小川研究室の本年度の研究費は、文部科学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)の支援を受けた。

特別推進研究の分担研究者として、岩手看護短大・小川英行教授「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」と大阪大学理学研究科・篠原彰助教授「DNA複製に関する相同組換えの機能」と共同研究を行った。研究所の共同研究としては、田中茂生が甲南大学理学部・大山隆教授と「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」を行った。

研究業績

(1) 原著論文

1. Irina V. Bakhlanova, Tomoko Ogawa and Vladislav A. Lanzov :Recombinogenic activity of chimeric recA genes (*P. aeruginosa* / *E. coli*): RecA protein regions responsible for this activity. *Genetics*, **159**, 7-15, 2001.

2. Xiong Yu, Steven A. Jacobs, Stephen C. West, Tomoko Ogawa and Edward H. Egelman: Domain Structure and Dynamics in the Helical

Filaments Formed by RecA and Rad51 on DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **98**, 8419-8424, 2001.

3. Imai, H. T., Satta, Y. and Takahata, N.: Integrative study on chromosome evolution of mammals, ants and wasps based on the minimum interaction theory. *J. Theor. Biol.* **210**, 475-497, 2001.

(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 **46**, 1030-1037, 2001.

2. 今井弘民：21世紀の自然史科学とインターネット博物館。生物の化学 遺伝, **55**, 31-35, 2001.

3. 今井弘民：インターネット生物形態博物館。総研大ジャーナル, **0**, 26-29, 2001.

(3) 発表講演

1. 小川智子：Mre11の機能：テロメア長の維持、「分子生物学の躍動」日本分子生物学会・第1回春季シンポジウム, つなぎ温泉, 5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。

本年の研究は、昨年同様に文部科学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 (Masumoto et al., *Mol. Cell. Biol.* **20**, 2809-2817, 2000)。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須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、引き続き *Sld3* と *Cdc45* の機能解析を行った。その結果、*Sld3* が *Cdc45* と複合体を作り、複製開始領域の解離に必要であることを明らかにした。詳細は原著論文 1 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。昨年より新たな *cdc45* 変異を、プラスミドシャッフリング法により分離し、その解析を行った。これらの変異は、全て染色体 DNA 複製に欠損を示したが、個々の変異に特徴的なものはなく、複製開始に強い欠損を持つものばかりであった。

(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，村松佐知子，上村陽一郎，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は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) によりリン酸化されやすい部位を 6 つ持つため、これら部位の 1 ヶ所のセリン、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。これら変異は、細胞の増殖にまったく影響を与えなかった。

そこで、6 ヶ所すべてをアラニンに変換した All-A 変異を作成した。All-A 変異遺伝子は、*Sld2* 欠損株の増殖を相補することができず、染色体 DNA 複製に欠損を示す。All-A 変異の 6 つの CDK 部位のうち、3 ヶ所については野生型に戻すと、生育できるようになった。一方、リン酸化型に近いと考えられるアスパラギン酸に変化させたものでは、野生株同様に生育するので、アラニンへの置換による機能の欠損は、CDK によるリン酸化が起こらないためであろうと考えられる。さらに、この変異 *Sld2* は *Dpb11* と複合体を作ることができない。我々はこれまでに、*Dpb11* と複合体形成ができない *sld2* 変異は、多コピーの *DPB11* 遺伝子によりサプレッスされることを示している。そこで、All-A 変異が実際に *Dpb11* と複合体を作らないために機能を発揮できないのか調べるため、多コピー *DPB11* による All-A 変異のサプレッス能について調べた。その結果、多コピー *DPB11* は All-A 変異をサプレッスすることが分かり、All-A 変異の欠損が *Dpb11* との複合体形成能の低下にあることが分かった。これらのことから、*Sld2* が S-CDK によりリン酸化されると、*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*, *Psf1*, *Psf2* の解析：上村陽一郎，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。さらに温度感受性変異 *psf1-1* を分離し、この変異を多コピーで抑圧する必須遺伝子 *PSF2* を分離した。遺伝的及び生化学的解析から、*Sld5*, *Psf1*, *Psf2* は細胞周期を通じて複合体を形成していることが分かった。現在までに、*Dpb11* を始め複製関連因子の多くが複製開始点に結合することが CHIP (Chromatin Immunoprecipitation) 法により示されている。実際、*Psf1* も *Dpb11* や Pol ϵ と同様に、S 期に複製開始点への結合が観察された。また、*Psf1* の複製開始点への結合は *Sld3* の機能に依存していた。これらの結果と、2-hybrid 法において *Psf1* が *Dpb11*, *Sld3* と相互作用することを考えあわせると、*Dpb11*-Pol ϵ が *Sld5*-*Psf1*-*Psf2* 複合体を介し複製開始点上の *Sld3* と結合していることが予想される。現在は引き続き、*Dpb11*-Pol ϵ の複製開始点へのローディングにおける分子機構を、*Sld*, *Psf* 因子を中心に解析している。

(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回の繰り返しによってその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個分離し解析を進めている。

本年度は、前述の *Sld2* との結合能について、遺伝学的手法、生化学的手法により調べた。その結果、C末半分の変異が多コピーの *SLD2* 遺伝子によりサプレスされること、およびこれら変異が *Sld2* と免疫共沈降しないことから、Dpb11 のC末が *Sld2* との結合に関与していることが分かった。

(6) DNA ポリメラーゼ ϵ のサブユニットのサイレンシングへの関与：飯田哲史，荒木弘之

出芽酵母のテロメアでは、遺伝子の発現が抑制される(サイレンシング)。DNA ポリメラーゼ ϵ は、4つのサブユニット Pol2, Dpb2, Dpb3, Dpb4 からなり、Pol2, Dpb2 は増殖に必須であるが Dpb3, Dpb4 は必須ではない。この Dpb3, Dpb4 欠失株を用いてテロメアでの遺伝子発現を調べたところ、サイレンシングが低下していることが分かった。Dpb3, Dpb4 はヒストンに共通に存在するヒストンホールドの構造を持っており、これらの因子が染色体の複製とともに、クロマチン構造の変化を通して遺伝子の発現に関わっているのではないかと考えている。

(7) 大腸菌 DnaA 蛋白と酸性リン脂質との相互作用：安田成一

DnaA 蛋白は染色体 DNA の複製領域 *oriC* に結合して2本鎖を部分的に1本鎖にする反応を行うことによって染色体複製を開始する。DnaA 蛋白の活性に影響を与える因子は染色体複製の開始の調節に何らかの関与をしている可能性があるといえる。DnaA 蛋白の活性に影響を与える因子の一つにカルディオオリピンなどの酸性リン脂質がある。これらの酸性リン脂質は ATP や ADP の結合した DnaA からヌクレオチドをはずすことが知られている。ADP 型の DnaA は不活性であるので、ヌクレオチドフリー型になった DnaA はふたたび ATP を結合して活性型になって再利用される可能性がある。そのため、酸性リン脂質は DnaA 蛋白の再利用に関わることで染色体複製に関与しているとする考えが提出されている。DnaA 蛋白のドメイン III (ATP 結合) とそのとなりのドメイン IV (DNA 結合) との境界あたりに膜結合配列があることが指摘されており、その配列中の特定のリジンがグルタミン酸に変えた変異 DnaA 蛋白では結合した ATP や ADP がカルディオオリピンではずれなくなっていることが示さ

れているので、この配列が確かにリン脂質との相互作用に関与していると考えられる。今年度の研究では DNA 結合ドメインの大部分を欠失した変異 DnaA の種々の性質を野生型 DnaA との比較で調べた。この変異 DnaA は *dnaA* 遺伝子の *SspI* の位置にストップコドンを挿入したもので、DNA 結合ドメインの大部分を欠失しているが、膜結合配列は完全に含む。変異 DnaA は DNA に結合しないが、ATP は野生型と同じように結合する。その ATP 結合能を指標にして測定したところ変異 DnaA の方が熱に対してより安定であること、結合した ATP がカルディオオリピンではずれにくいことがわかった。野生型の DnaA については、*oriC* DNA を前もって結合させておくとカルディオオリピンを加えても ATP がはずれなくなることがわかった。カルディオオリピンのあとから DNA を加えても効果はなかった。このときの DNA は *oriC* でもそれ以外の DNA でも、また cccDNA でも線状の DNA でも差はなかった。この作用が DNA による立体的障害によるものか、それとも他のメカニズムによるものかは現在のところ不明である。さらに、カルディオオリピンを先に加えると、結合している ATP がはずれるだけでなく、*oriC* DNA も結合できなくなることがわかった。カルディオオリピンが DnaA からヌクレオチドをはずすには 38°C 10 分の熱処理が必要であるが、カルディオオリピンを加えても熱処理をしなければ DNA を結合することができる。これらのことから、カルディオオリピン (+熱処理) は ATP をはずすというだけの特異的な作用をしているのではなく、DnaA 全体を不活性にしている可能性が考えられる。従って、ヌクレオチドをはずすという観点だけから考えられたリン脂質による DnaA の再利用という仮説は再検討する必要があると思われる。

研究業績

- (1) 原著論文
 1. 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.* **20**, 2097-2107, 2001.
 2. Masumoto, H., Muramatsu, S., Kamimura, Y. and Araki, H.: S-Cdk-dependent phosphorylation of *Sld2* essential for chromosomal DNA replication in budding yeast. *Nature* **415**, 651-655, 2002.
- (2) その他
 1. 荒木弘之：DNA ポリメラーゼ ϵ とその関連因子の S 期チェックポイントへのかかわり。蛋白質核酸酵素，共立出版，**46**，1201-1207，2001.
- (3) 発表講演
 1. 飯田哲史，荒木弘之：テロメアクロマチン構造の維

持における出芽酵母 DNA ポリメラーゼεの役割, 第34回酵母遺伝学フォーラム, 京都, 7月.

2. Masumoto, H., Muramatsu, S., and Araki, H.: S-CDK dependent Sld2 phosphorylation essential for chromosome DNA replication in budding yeast.

3. Kamimura, Y., Takayama, Y., and Araki, H.: Functional characterization of Sld5-Psf1-Psf2 complex in budding yeast. Cold Spring Harbor Eukaryotic DNA Replication Meeting, Cold Spring Harbor, NY, USA, September.

4. Kubota, Y., Komori, Y., Kamimura, Y., Takayama, Y., and Takisawa, H.: Identification of Xenopus Sld5 and Psf1 as essential components for the initiation of DNA replication. Cold Spring Harbor Eukaryotic DNA Replication Meeting, Cold Spring Harbor, NY, USA, September.

5. 荒木弘之, 上村陽一郎, 増本博司, 高山優子, 村松佐知子: 出芽酵母 Dpb11 と Sld タンパク質群の複製開始から伸長反応への機能. 第24回日本分子生物学会, 横浜, 12月.

6. 久保田弓子, 小森靖則, 上村陽一郎, 高山優子, 荒木弘之, 滝澤温彦: アフリカツメガエル *SLD5* および *PSF1* 相同遺伝子の単離とその機能解析. 第24回日本分子生物学会, 横浜, 12月.

7. 卓妍秀, 上村陽一郎, 荒木弘之: 出芽酵母 *CDC45* の新規温度感受性変異株の解析. 第24回日本分子生物学会, 横浜, 12月.

8. 飯田哲史, 荒木弘之: テロメアサイレンシングの維持における出芽酵母 DNA ポリメラーゼεの役割. 第24回日本分子生物学会, 横浜, 12月.

9. 上村陽一郎, 高山優子, 荒木弘之: 出芽酵母 Sld5-Psf1-Psf2 複合体の染色体複製における機能. 第24回日本分子生物学会, 横浜, 12月.

B-c. 細胞質遺伝客員研究部門

(1) 機能性精神病の連鎖解析および連鎖不平衡法解析: 吉川武男

我々は精神分裂病および感情病圏の患者家系を精力的に収集してきた。2001年12月の時点で、合計132家系、411人に達した。その中で分裂病は119家系、357人、感情病は13家系、54人である。2001年度で、全分裂病家系の10cM密度のマイクロサテライトマーカーによるゲノムスキャンが終了した。染色体6番と11番、18番に関しては5cM密度のタイピングが終了した。解析手順は、第一段階で全家系メンバーのデータを含めて pedigree disequilibrium test, 第2段階で両親と発症した子供から成るトリオ家系のみを含めて extended transmission

disequilibrium test を行っている。第2段階まで有意差が残ったマーカーは染色体11番、18番上にあり、現在これらの領域を第3のサンプルパネルであるケース・コントロールを用いてさらに絞っている。

(2) QTL 解析: 吉川武男

強制水泳テストと尾懸垂テストは、抗うつ薬の有効性のスクリーニングテストとして広く採用されている。両テストで無動時間を減少させる薬理効果は、ストレス状況下にある動物が絶望状態に陥るのを阻止するのに関係すると考えられており、従って無動時間はヒトでのうつ状態感受性を反映すると考えられる。我々は数種のマウス系統を比較検討して、C3H/He マウスが両テストで無動時間が最も短く(うつ状態になりにくい)、C57BL/6 マウスが最も長い(うつ状態になりやすい)ことを見いだした。この2系統の種間交配から560匹のF2個体を作成し、120個のマイクロサテライトマーカーを用いてゲノムスキャンをした。強制水泳テストに関しては染色体6番、8番、11番、17番に、尾懸垂テストに関しては染色体4番、8番、11番、14番に2.8以上のロッドスコアを認めた(原著論文8)。これらの領域にうつ病関連の感受性遺伝子が存在する可能性がある。

(3) マイクロアレイを用いたうつ病モデル動物の遺伝子発現解析: 吉川武男

我々は学習性無力ラット作成の諸種パラメーターを検討し、効率よくこのラットを作成することに成功した。学習性無力を獲得した個体群およびそれらに抗うつ薬を投与した群、そしてコントロール群から前頭葉、海馬を取り出し、GeneChipを用いて遺伝子発現を解析した。その結果、学習性無力ラットでは両脳部位で神経伝達物質の各種受容体の発現が低下しており、それらが抗うつ薬の投与で回復することが判明した。

(4) 精神疾患の候補遺伝子解析: 吉川武男

候補遺伝子は染色体の連鎖領域および機能的関連性から選択している。2001年度において、*myo-inositol monophosphatase 2 (IMPA2)*(気分障害、分裂病)(原著論文1,8), *cholecystokinin*(不安障害)(原著論文3), *cholecystokinin B receptor*(不安障害、分裂病)(原著論文4,5), *adenosine A2a receptor*(不安障害)(原著論文4), *adenylate cyclase type 9 (ADCY9)*(気分障害)(原著論文6,7)等を解析して、各遺伝子の疾患発症に及ぼす影響を調べた。

研究業績

(1) 原著論文

1. Yoshikawa, T., Kikuchi, M., Saito, K., Watanabe, A., Yamada, K., Shibuya, H., Nankai, M., Kurumaji, A.,

Hattori, A., Ishiguro, H., Shimizu, H., Okubo, Y., Toru, M. and Detera-Wadleigh, S.D.: Evidence for association of the myo-inositol monophosphatase 2 (IMPA2) gene with schizophrenia in Japanese samples. *Mol. Psychiatry* **6**, 202-210, 2001.

2. Toyota, T., Shimizu, H., Yamada, K., Yoshitsugu, K., Meerabux, J., Hattori, E., Ichimiya, T., Yoshikawa, T.: Karyotype analysis of 161 unrelated schizophrenics: no increased rates of X chromosome mosaicism or inv(9), using ethnically matched and age-stratified controls. *Schizophr. Res.* **52**, 171-179, 2001.

3. Hattori, E., Ebihara, M., Yamada, K., Ohba, H., Shibuya, H., Yoshikawa, T.: Identification of a compound short tandem repeat stretch in the 5' upstream region of the cholecystokinin gene, and its association with panic disorder but not with schizophrenia. *Mol. Psychiatry* **6**, 465-470, 2001.

4. Yamada, K., Hattori, E., Shimizu, M., Sugaya, A., Shibuya, H., Yoshikawa, T.: Association studies of the cholecystokinin B receptor and A2a adenosine receptor genes in panic disorder. *J. Neural Trans* **108**, 837-848, 2001.

5. Hattori, E., Yamada, K., Toyota, T., Yoshitsugu, K., Toru, M., Shibuya, H., Yoshikawa, T.: Association studies of the CT repeat polymorphism in the 5' upstream region of the cholecystokinin B receptor gene with panic disorder and schizophrenia in Japanese subjects. *Am. J. Med. Genet. Neuropsychiatric Genet.* **105**, 779-782, 2001.

6. Toyota, T., Hattori, E., Meerabux, J., Yamada, K., Saito, K., Shibuya, H., Nankai, M., Yoshikawa, T.: Molecular analysis, mutation screening, and association study of adenylate cyclase type 9 gene (ADCY9) in mood disorders. *Am. J. Med. Genet. Neuropsychiatric Genet.* **114**, 84-92, 2002.

7. Toyota, T., Yamada, K., Saito, K., Detera-Wadleigh, S. D., Yoshikawa, T.: Association analysis of adenylate cyclase type 9 gene using pedigree disequilibrium test in bipolar disorder. *Mol. Psychiatry*, in press.

8. Yoshikawa, T., Watanabe, A., Ishitsuka, Y., Nakaya, A., Nakatani, N.: Identification of multiple genetic loci linked to the propensity for "behavioral despair" in mice. *Genome Research*, in press.

9. 菊池美香, 豊田倫子, 吉川武男: 融解曲線分析を用いた新しい遺伝子タイピング法および IMPA2 遺伝子解析への応用. *脳と精神の医学*, **12**, 63-71, 2001.

(2) その他

1. 山田和男, 吉川武男: 特集うつ病, 分子遺伝学的研

究の現状. *日本臨床*, **59**, 1465 - 1470, 2001.

2. 服部栄治, 吉川武男: 不安の分子遺伝学. *精神医学レビュー*, 19 - 27, ライフ・サイエンス, 東京, 2001.

3. 糸川昌成, 吉川武男: 分裂病の分子学. *現代医療*, **33**, 93- 99, 現代医療社, 東京, 2001.

(3) 発表講演

1. 糸川昌成, 山田和男, 清水浩光, 服部栄治, 車地暁生, 澁谷治男, 南海昌博, 融道男, 吉川武男: 精神分裂病患者における NMDA 受容体遺伝子の解析. 第 23 回日本生物学的精神医学会, 長崎, 4 月.

2. 山田和男, 菊池美香, 糸川昌成, 海老原充, 大野真一, 豊田倫子, 服部栄治, 吉次聖志, 有波忠雄, 清水浩光, 吉川武男: 精神分裂病家系を用いた染色体 18 番の連鎖解析および伝達連鎖不平衡テスト (TDT). 第 23 回日本生物学的精神医学会, 長崎, 4 月.

3. 服部栄治, 海老原充, 山田和男, 大羽尚子, 澁谷治男, 吉川武男: コレシトキニン遺伝子 5' 上流の short tandem repeat の同定およびその多型とパニック障害の関連研究. 第 23 回日本生物学的精神医学会, 長崎, 4 月.

4. 渡辺明子, 石塚祐一, 吉川武男: マウスモデルを使ったうつ病素因遺伝子群の同定-QTL マッピングを適用して. 第 23 回日本生物学的精神医学会, 長崎, 4 月.

5. Yamada, K., Iwayama, Y., Saito, K., Kikuchi, M., Toyota, T., Itokawa, M. and Yoshikawa, T.: A genome wide analysis of transmission disequilibrium in Japanese schizophrenic pedigrees. 9th World Congress for Psychiatric Genetics, St Louis, Missouri USA, October.

6. Meerabux, J. M. A., Iwayama, Y., Detera-Wadleigh, S., DeLisi, L. and Yoshikawa, T.: Molecular cloning of a t(18;21)(p11.1;p1.1) translocation associated with psychosis in one family. The American Society of Human Genetics 51st Annual Meeting, San Diego, California, USA, October.

7. Ebihara, M., Ohba, H. and Yoshikawa, T.: Promoter analysis of Kv8.1 revealed the essential element for Kv8.1 expression. The American Society of Human Genetics 51st Annual Meeting, San Diego, California, USA, October.

8. Kikuchi M., Yamada, K., Toyota, T., Itokawa, M., Ebihara, M., Ohno, S., Hattori, E., Yoshitsugu, K., Shimizu, H. and Yoshikawa, T.: Transmission disequilibrium analysis for a schizophrenia susceptibility locus on chromosome 18p. The American Society of Human Genetics 51st Annual Meeting, San Diego, California, USA, October.

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，細谷俊彦（2001年3月31日まで，現：ハーバード大学）の3名である。その他，リサーチアソシエート：丹羽尚（2001年3月31日まで，現：理化学研究所発生再生センター），科学技術振興事業団ポスドク：梅園良彦（2001年3月31日まで，現：無脊椎動物遺伝研究室），笹村剛司（2001年5月31日まで，現：東京理科大学），総合研究大学院大学学生：松野元美，近藤周，特別共同利用研究員：岩波将輝，金井誠，遺伝学普及会研究員：湯浅喜博，COE 特別共同利用研究員：滝沢一永，科学技術振興事業団さきがけ 21 研究員；平本正輝が研究に参加し，技術課職員：境雅子，研究補佐員：鈴木恵美子，浅香千枝子，青野真由美，池谷優子，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，文部科学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」（2001年3月31日まで），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」，「感覚器特異化に関わる体節内位置情報の遺伝解析」，gcm 転写調節因子ファミリーの造血における機能（2001年3月31日まで），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，2001年3月31日まで），奨励研究：哺乳類 GCM 遺伝子の腎臓形成における機能の解析（2001年3月31日まで），科学技術振興事業団さきがけ 21 「認識と形成」の支援を受けた。

ショウジョウバエグループは胚中樞・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細胞分化機構・神経回路形成機構の研究を行っている。

(1) 接合体遺伝子の翻訳調節による遺伝子発現制御：岡

部正隆，広海 健

個体発生は，ゲノム情報が正しい場所で正しい時期に発現することによっておこる。遺伝子発現調節は転写レベルで行われることが多いが，翻訳レベルの発現制御にも固有の利点が存在する。たとえば，翻訳調節を用いれば，卵に予め蓄積しておいた母性遺伝子 mRNA を利用することにより，必要量の蛋白質を速やかに合成することが可能である。我々は遺伝学的なアプローチにより，翻訳調節による接合体遺伝子発現制御の一例を明らかにした。ショウジョウバエ成虫の機械刺激受容器は1個の神経細胞と4個の支持細胞からなり，1つの感覚母細胞からの3回の連続した非対称性分裂によって生み出される。感覚母細胞の分裂の際に片方の娘細胞で Notch シグナルが活性化され，その結果，非神経細胞系列で転写因子 Tramtrack 蛋白質が神経細胞運命を抑制する。我々はこの tramtrack 遺伝子の発現が転写レベルでなく翻訳レベルで調節されていることを明らかにした。さらに，RNA 結合蛋白質 Musashi が tramtrack mRNA の 3' 側非翻訳領域に結合し，この mRNA の翻訳を恒常的に抑制していることを示した。Musashi 自身は発現調節を受けず，その活性が Notch シグナルによって抑制されることにより，翻訳抑制を解除して Tramtrack 蛋白質の合成を開始させる。恒常的な翻訳抑制と上流のシグナルによる抑制解除は，接合体遺伝子によって調節される後期発生においても，速やかな遺伝子発現を可能にしていると考えられる。

（原著論文1）

(2) 器官形成と位置情報の関係：丹羽 尚，岡部正隆，広海 健

様々な器官がそれぞれ体の独自の位置に正確に形成されることは，それらの形成誘導に特定の位置情報が必要であることを示唆する。しかし，その位置情報の実体や器官特異化機構との関係については明らかでない。ショウジョウバエでも，複眼，耳，伸展受容器のような異なる機能と形態を備えた感覚器官はそれぞれ異なる体節に形成されることから，形成誘導の条件も異なると予想されていた。我々はこれらの感覚器官の形成条件を比較解析した結果，形成誘導の時空間的条件は感覚器官のタイプに関わらず共通していることを見出した。形態形成因子 decapentaplegic によって担われる位置的条件と ecdysone ホルモンによって与えられる時間的条件の両シグナルは，ともに atonal 遺伝子の 3' enhancer 領域に作用してその発現を誘導する。atonal 蛋白質は発現細胞に神経分化能を与えるので，すべての感覚器官は atonal によって各体節に共通に規定される「神経分化領域」を利用して形成されていると考えられる。従来，「眼を作る」という機能を担っていると考えられていた eyeless 遺伝子の変異体でも，細胞死を抑制すると視細胞に分化しない atonal 発現細胞群がみられる。従って，eyeless 遺伝子は

「感覚器官を作る」という働きを持つのではなく、既存の神経分化領域に体節の個性を決める情報を付加することにより、「感覚器官の特異化」を行っている可能性が高い。脊椎動物でも、DPPやAtonalのホモログであるBMP-4/7, MATH-1/5は眼や耳の形成に関与する。感覚器形成誘導に必要な分子基盤は脊椎・無脊椎動物の分岐以前の段階ですでに確立されていたのだろう。

(3) 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：金井 誠, 岡部正隆, 広海 健

ショウジョウバエ中樞神経系では、幹細胞である神経芽細胞(NB)が遺伝的プログラムに従って分裂を繰り返す。多様なニューロン・グリアを生成する。NB細胞系譜から生まれる細胞の個性は、NBからの誕生の順序によって規定されている。そのためにはNB細胞系譜生成過程において、NBは分裂ごとに自らの個性を変化させていかななくてはならない。核内レセプター型転写因子をコードする seven-up 遺伝子はほとんどすべてのNBで発現するが、その発現時期はNBの細胞系譜の一部分に限られている。このことから seven-up がNBの細胞系譜の時間的情報の鍵を握る候補遺伝子と考え、seven-up 機能欠失変異体の中樞神経系の症状を解析した。その結果、複数のNB系譜において、特定の個性を持つ細胞の数が増加あるいは減少していることを見いだした。現在、この症状はNB系譜の時間的情報の異常によるという考えを検証している。

(4) 核内レセプター Seven-up の下流因子の探索：松野元美, 広海 健

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。昨年より引き続き、Seven-up の標的遺伝子の探索を行った。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。その結果、現在までに53の候補遺伝子が得られ、Seven-up の下流で転写因子や細胞骨格分子、細胞接着分子など様々な分子が機能することが示唆された。現在、その発現量の変化を発生中の複眼成虫原基で確認し、Seven-up の直接の標的遺伝子をしぼりこんでいる。

(5) TFIID p52 サブユニットの機能解析：松野元美, 広海 健

基本転写因子 TFIID は転写因子としての機能だけでなく、細胞周期の制御、DNAの修復、など様々な機能を持

つ多機能分子である。TFIIDは9つのサブユニットからなるが、3つはキナーゼ、ヘリケースといった酵素活性を持ち、細胞の状態に応じて各機能を担う酵素とそれに伴うサブユニットの組み合わせが決まると考えられている。しかし、TFIIDに関する研究の多くは *in vitro* または単細胞生物におけるものであるため、発生中の動物細胞のように転写、細胞周期の制御、DNA修復が同時に働いている場合、各々の機能間にどのような制御機構が存在するのかは全くわかっていない。そこで我々は本研究室で核内レセプター Seven-up と相互作用することが示された p52 サブユニットの機能解析を中心としてこの問題にアプローチを試みている。初めに、ショウジョウバエ p52 の機能欠失変異体を9系統同定し、それらが成長速度の遅滞及び行動異常を示し幼虫期に致死となることを明らかにした。また、遺伝的モザイク個体を用いた複眼成虫原基における p52 欠失細胞集団の解析より、p52がない細胞集団は細胞周期の異常を起こし、親まで維持されないこと、転写機能への影響はほとんど見られないことを示した。この細胞周期の異常は、細胞周期進行に関わる TFIID キナーゼサブユニットの変異表現型とは異なり、むしろ TFIID が関与する DNA 修復機構の変異表現型と類似していた。現在、p52 は DNA 修復の制御を介して2次的に細胞周期の制御に関わるというモデルを考え、それについて解析中である。

(6) longitudinal glia 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グリア細胞の分化は、glial cells missing (gcm) 遺伝子の発現により開始する。gcm は単にニューロンとグリアのスイッチとしての機能しか持たぬため、多様なグリアの個性を与え、細胞種特異的な形態変化をもたらすのは、gcm 下流の転写因子の働きである。これまでに、gcm の下流でグリア細胞特異的に発現する転写因子 Reversed polarity (REPO) がグリアの分化成熟に重要な働きをしていることを明らかにしてきた。repo 機能欠失型突然変異体では、グリア細胞は生成されるがその終分化に異常が起こる。そこで我々は 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。中樞神経系のグリア細胞の中で、Longitudinal Glia(LG)と呼ばれるグリア細胞は、縦走軸索束の形成・維持に重要な役割を果たす。我々は、REPO の下流標的因子として、新たに LG で発現している転写因子 DRI を同定した。さらに、DRI は gcm の下流標的転写因子 PointedP1 と協調して、LG 特異的な遺伝子発現の制御に関与していることを明らかにした。以上の結果、これらの転写因子の組み合わせが LG の分化成熟機構に参与している可能性が高いことが示唆された。

(7) グリア細胞の形態形成の分子機構：滝沢一永，鈴木えみ子¹，堀田凱樹，広海 健（¹東京大学医科学研究所・分子構造解析分野）

神経系の発生ではグリア細胞の移動・ターゲット認識・細胞形状変化が形態形成に重要な役割を果たしている。転写因子によるグリア細胞の特異化については研究が進んでいるが，細胞の移動や形状変化の分子機構についてはほとんどわかっていない。本研究では，Longitudinal Glia(LG)とよばれるグリア細胞で発現する細胞表面分子に焦点を当て，グリア細胞の移動と形態形成について解析した。

LG グリア細胞は，前駆細胞から生み出された後に正中方向に移動し，縦走軸索と会合すると軸索上にプロセスを伸ばし，その背側に規則正しく配列して軸索を覆う。グリア細胞が軸索と会合しプロセスを伸ばす時期に，コネクチン(Connectin)という膜蛋白質が一部の軸索とグリア細胞で発現する。コネクチンは細胞外に Leucine Rich Repeat とよばれるモチーフを有し，ホモフィリックな細胞接着能を持つ。コネクチン突然変異体では，軸索走行には顕著な症状が見られないが，LG が異常な位置にあるうえ，細胞が粒状になり正しい細胞形状をとらない。転写因子をコードする repo 遺伝子の突然変異体では，コネクチンの発現がおきず，LG の位置異常が生じるが，この症状はグリア細胞にコネクチンを発現させることによってレスキューされる。このことから，コネクチンは repo の下流で，軸索との会合や，形態形成に作用している分子であることが明らかとなった。

ニューログリアン(Neuroligin)は細胞外に免疫グロブリン様ドメインとファイブコネクチン様ドメインを有し，ホモフィリックな結合能を持つ細胞接着分子である。ニューログリアンは，LG 移動時には個々の LG の細胞表面に分布しているが，プロセスの延伸にともなって一時的に細胞質にも観測され，最終的に4細胞からなる格子状の区画構造の外壁面に再分布する。さらに，電子顕微鏡を用いた観察により，区画内でニューログリアンの局在する細胞膜としない膜では細胞接触面の形態が異なることがわかった。ニューログリアンの突然変異体では区画構造の形状が変形する。また，FGF シグナル系の突然変異体ではニューログリアンの再分布が正しくおきず，正常な区画化が起らない。以上のことから，グリア細胞が軸索を覆う過程では，FGF シグナルによってニューログリアン分子の局在が変わり，その分布にしたがって LG 細胞の区画化がおこる，という分子機構が明らかとなった。

(8) ras シグナル抑制因子 Spred の機能解析：近藤 周，広海 健

ras シグナルは発生途上の様々な細胞の分化・増殖の調節に用いられている。ras シグナル経路には様々な抑制因子が存在し，シグナルを時間的・空間的に精密に制御し

ていると考えられている。最近，ショウジョウバエの ras 抑制因子である Sprouty に存在するシステインリッチ領域を持つ新規ヒト蛋白質 Spred が同定された。Spred は培養細胞系において強力な ras シグナル抑制活性を持つが，その生理学的役割については全くわかっていない。そこで，我々はショウジョウバエゲノム中に一つ存在する Spred ホモログの機能解析を開始した。ショウジョウバエ spred 遺伝子は一部の複眼光受容細胞(R2/R5 および R8)，中枢神経系，腱細胞において発現していた。本年度は，spred 遺伝子のイントロンに P-element が挿入された系統を用いて spred 遺伝子の欠失変異体を作成した。spred 変異体は生存可能で生殖能力にも問題はなく，目立った表現型は観察されなかった。今後，spred を過剰発現しているハエの表現型解析，spred 変異体バックグラウンドにおける modifier スクリーンを行う予定である。

(9) 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

FGF シグナル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 branchless 遺伝子によってコードされる FGF (fibroblast growth factor) について，主に複眼成虫原基の発生過程における機能解析を行った。複眼成虫原基は，上層の Peripodial Membrane (PM) および下層の Disc Proper (DP) の2層の上皮細胞シートからなる袋状の構造をとり，1齢から3齢幼虫期にかけて細胞増殖をともない辺縁部に向かって突出しながら成長(outgrowth)を遂げる。Branchless は初期には PM 全体に，3齢幼虫期では成長に伴って突出する辺縁部に沿って位置する5-7細胞の PM 細胞に強く発現する。そこで，機能欠失変異体をもちいたモザイク解析によってこれらの領域に変異体細胞集団を作成した。その結果，野生型でみられる PM 細胞の特徴的な扁平な形態と比較して，変異体領域の PM 細胞に著しい形態異常を認めた。このことから，FGF シグナルは PM 細胞が正しく扁平状の形態をもつ上皮細胞として分化するために必要であることが考えられた。最近，PM 細胞が下の DP 層へ細胞プロセスをのぼし，成虫原基の形態形成・細胞増殖に重要な役割を果たしていることが報告された。実際，branchless 変異体でみられる PM 細胞の発生異常は，複眼成虫原基の著しい成長障害を伴う。このことから，FGF シグナルによる PM 細胞の扁平上皮化は，PM-DP 間におけるコミュニケーションを介して，2層の上皮細胞が協調的に成長するための重要な機能を担っていると考えられる。

(10) 神経軸索ネットワーク形成における位置情報の形成：平本正輝，広海 健

分泌型の軸索ガイダンス分子は，濃度勾配を形成して軸索の伸長方向や位置を制御している。こ

の考えはスペインの解剖学者 Cajal によって提唱された化学走性仮説に基づいており、「分泌源からの距離」が位置情報の基本となっている。我々は「細胞内の位置情報」に基づく新たな位置情報形成機構を明らかにした。Netrin は軸索誘因能を持つ進化的に保存された軸索ガイダンス分子であり、その受容体 Frazzled によって捕捉される。我々は、Frazzled が Netrin を捕捉後、自らの細胞内分布を再編成して Netrin を他の細胞に提示する事で位置情報を形成する (Capture / Relocation system) ことを示した。この過程では、Frazzled の軸索内の分布が、他の神経の軸索ガイダンスにおける位置情報となる。我々はこの機構が分泌型リガンドとその受容体による神経軸索ネットワーク形成機構の基本メカニズムであると考え、より複雑な位置情報を形成する分泌型リガンド Slit と受容体 robo によるパターンニング機構の解析を行った。Slit も拡散して medio-lateral 方向の位置情報となる濃度勾配を作ると考えられている。そこで我々は2つの縦走神経に注目し、medio-lateral positioning の仕組みを解析した。その結果、軸索内に局在する Slit 受容体が medio-lateral の位置情報として細胞非自律的に機能しうる事が明らかになった。この事は受容体による軸索ガイダンス情報の提示が一般的なものであり、その位置情報は受容体が軸索内に局在して作られる事を示唆している。

(11) 哺乳類造血における GCM-motif 転写因子の機能：細谷俊彦，堀田凱樹，¹ 岩崎靖乃，¹ 池田一裕，² 大里元美 (¹ 国立生理学研究所，² 京都大学・ウイルス研究所)

昨年度までに我々は、ショウジョウバエの神経系と血球系の細胞種決定機構が共通であることを見出した。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。本年度は GCM-motif 転写因子の機能が種を超えて保存されている可能性を検討した。まず、マウスの2つの GCM-motif 転写調節因子 mGCMa, mGCMb のうち、mGCMa が血液で強く発現していることを見出した。発現は胎仔期のみに見られ成体では検出されず、発生期の血球に特異的であることが分かった。mGCMa をショウジョウバエ血球系で強制発現したところ、ショウジョウバエ gcm と同様な分化転換を引き起こした。従って分化スイッチとしての分子機能は mGCMa でも保存されていることが分かった。mGCMa の KO マウスを作成し造血の異常を検討した。卵黄嚢に含まれる血球の培養を行ったところ、KO 由来組織では正常組織に比べてマクロファージコロニー数に著しい減少が見られた。その他の細胞種では緩やかな現象にとどまった。従って mGCMa は血球、特にマクロファージの発生に必要であり、GCM-motif 転写因子の血球での機能が保存されていると考えられる。哺乳類では細胞微小環境の変化により神経幹細胞が多様な血球細胞を、造血細胞が様々な神経系細胞を生み出すことが分かっている。ショ

ウジョウバエと同様な GCM-motif 転写因子を中心とした共通な細胞種決定機構が存在するかが今後の興味深い課題である。

(12) 色盲の人にもわかるバリアフリープレゼンテーション法の開発：岡部正隆，伊藤 啓¹ (¹ 国立基礎生物学研究所)

日本人男性の5%、白人男性の約8%は色覚障害(色盲)を持つ。その頻度はAB型の血液型の人(頻度3-10%)に匹敵し、「色覚のタイプの一つ」としてとらえられるべきである。最近カラーのスライドによるプレゼンテーションや学術雑誌のカラー図版が増加し、色そのものが情報の担い手として多用されている。しかし、そのようなカラフルなプレゼンテーションは、色の使い方によっては、色盲の聴衆や読者に十分に理解されていない場合が多い。できるだけ多くの聴衆が享受できるプレゼンテーションをするために、色盲の人にも十分に理解してもらえる色使いや表記方法の工夫について検討している。その成果を用いて、国内外の学会や研究集会において「色盲の人にもわかるバリアフリープレゼンテーション法」と題した啓蒙セミナーを行った。また同時にホームページにて関連する情報を公開している。

<http://www.nig.ac.jp/labs/DevGen/shikimou.html>

研究業績

(1) 原著論文

1. Okabe, M., Imai, T., Kurusu, M., Hiromi, Y. and Okano, H.: Translational repression determines a neuronal potential in *Drosophila* asymmetric cell division. *Nature* **411**, 94-98, 2001.

2. Takizawa, K. and Hotta, Y. Pathfinding analysis in a glia-less gcm mutant in *Drosophila*. *Dev. Genes Evol.* **211**, 30-36, 2001.

(2) その他

1. 平本正輝：パターンニングにおける受容体の第2の機能：Capture / Relocation システムと化学走性仮説，細胞工学，秀潤社，**20**，1030-1039，2001.

(3) 発表講演

1. 丹羽 尚，岡部正隆，広海 健：感覚器官形成の共通分子基盤と多様性。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非物質的側面」第2回研究発表会，三島，1月。

2. Iwanami, M. and Hiromi, Y.: Regulating the neuronal induction by Argos and Sprouty. 42nd Annual *Drosophila* Research Conference, Washington D.C., 3月。

3. 広海 健，丹羽 尚，岡部正隆：感覚器官の原点を

ショウジョウバエで探る。遺伝研・理研 合同公開シンポジウム, 東京, 6月。

4. Hiramoto, M., Hiromi, Y. and Hotta, Y.: A new model for positional information. 14th International Congress of Developmental Biology, Kyoto, 7月。

5. Iwanami, M. and Hiromi, Y.: The role of FGF in *Drosophila* imaginal disc. 14th International Congress of Developmental Biology, Kyoto, 7月。

6. Niwa, N., Hiromi, Y. and Okabe, M.: A common basis for formation of *Drosophila* sensory organs. 14th International Congress of Developmental Biology, Kyoto, 7月。

7. Takizawa, K., Hiromi, Y. and Hotta, Y.: *Drosophila* FGF receptor Heartless is required for glia-glia interaction and Neuroglial distribution. 14th International Congress of Developmental Biology, Kyoto, 7月。

8. Kurusu, M., Okabe, M. and Furukubo-Tokunaga, K.: Proliferation control of the mushroom body neuroblasts: functional requirement of a nuclear receptor gene, *tailless*, in the *Drosophila* brain. 14th International Congress of Developmental Biology, Kyoto, 7月。

9. Okabe, M., Imai, T., Kurusu, M., Hiromi, Y. and Okano, H.: Translational repression determines a neuronal potential in *Drosophila* asymmetric cell division. 14th International Congress of Developmental Biology, Kyoto, 7月。

10. Niwa, N., Hiromi, Y. and Okabe, M.: A common basis for formation of *Drosophila* sensory organs. 14th International Congress of Developmental Biology, Kyoto, 7月。

11. 岩波将輝, 広海 健: ショウジョウバエ複眼発生における FGF シグナルの機能解析. 第5回日本ショウジョウバエ研究集会, 三島, 8月。

12. 岡部正隆, 今井貴雄, 来栖光彦, 広海 健, 岡野栄之: ショウジョウバエ RNA 結合蛋白質 Musashi による *ttk69* の翻訳抑制と非対称分裂の制御. 第3回日本 RNA 学会年会, 神戸, 8月。

13. 松野元美, 小瀬博之, Steve West, 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5回日本ショウジョウバエ研究集会, 三島, 8月。

14. 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. 第5回日本ショウジョウバエ研究集会, 三島, 8月。

15. 来栖光彦, 岡部正隆, 古久保-徳永克男: ショウジョウバエ脳におけるキノコ体神経芽細胞の分裂制御: 核内レセプター *tailless* の機能的な重要性. 第5回日本ショウジョウバエ研究集会, 三島, 8月。

16. 丹羽 尚, 広海 健, 岡部正隆: ショウジョウバエ感覚器官の共通起源. 第5回日本ショウジョウバエ研究集会, 三島, 8月。

17. 岡部正隆, 伊藤 啓: 色盲の人にもわかるバリアフリープレゼンテーション法. 第5回日本ショウジョウバエ研究集会, 三島, 8月。

18. Iwanami, M. and Hiromi, Y.: Branchless controls the outgrowth of eye disc development. *Neurobiology of Drosophila*, Cold Spring Harbor, 10月。

19. Ito, K. And Okabe, M.: How to make figures and presentations that are friendly to color blind people. Cold Spring Harbor *Drosophila Neurobiology Meeting*, Cold Spring harbor, 10月。

20. 広海 健: 核内レセプター Seven-up / COUP と細胞運命決定. 転写研究会 2001, 筑波, 10月。

21. 岡部正隆, 伊藤 啓: 色盲の人にもわかるバリアフリープレゼンテーション法. 転写研究会 2001, 筑波, 10月。

22. 岡部正隆, 伊藤 啓: 色盲の人にもわかるバリアフリープレゼンテーション法. 科学技術振興事業団さきがけ研究 21 「素過程と連携」 領域会議, 大阪, 11月。

23. 岡部正隆, 伊藤 啓: 色盲の人にもわかるバリアフリープレゼンテーション法. 文部科学省科研費特定領域研究領域 (A) 発生システム班会議, 岡崎, 11月。

24. 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. 第24回日本分子生物学会年会, 横浜, 12月。

25. 丹羽 尚, 広海 健, 岡部正隆: ショウジョウバエ複眼形成誘導に必要とされる分子環境. 第24回日本分子生物学会年会, 横浜, 12月。

26. 岡部正隆, 伊藤 啓: 色盲の人にもわかるバリアフリープレゼンテーション法. 文部科学省科研費特定領域研究領域 (A) 総合脳班会議, 東京, 12月。

27. 広海 健: ショウジョウバエの遺伝的スクリーニング—理論と実際. 第24回日本分子生物学会年会, 横浜, 12月。

28. Hiramoto, M.: The second function of receptors in patterning: receptors that present ligands and the chemotropic hypothesis. Prize for Young Scientists, Stockholm, 12月。

2. 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, 高橋俊雄¹, 清水 裕, 小泉 修², 小早川義尚³, 森下文浩⁴, 松島 治⁴

(¹現カリフォルニア大学アーヴァイン校, ²福岡女子大学人間環境学部, ³九州大学理学部, ⁴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 60 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 Hym-301 について詳細な解析をおこなった。

(2) ヒドラの頭部形成に関わる上皮ペプチド, Hym-301 : 高橋俊雄, 清水 裕, 服田昌之, 小泉 修, 小早川義尚, 藤澤敏孝

シグナル活性を持つペプチドを探索する過程で, C-末端がアミド化し分子内 S-S 結合をもつアミノ酸 14 残基からなるペプチドを見いだした。構造から神経ペプチドと考えたが, 機能が不明であった。そこで, このペプチドの局在を知ることでその機能を推定すべく, ペプチドをコードする遺伝子のクローニングおよび抗 Hym-301 抗体を作成した。インシチュハイブリダイゼーション (ISH) および免疫組織染色 (IHCS) を行った結果, 両方法で基本的には同結果を得た。ペプチドは神経とは関係なくヒドラ頭部の外胚葉上皮細胞のみに局在した。更に, ISH では出芽体の頭部形成領域で形態が出来るはるか前から発現し, かつ将来触手が形成される領域で発現が抑制されていた。このことから Hym-301 は触手形成に関わる可能性が示唆されたため, 頭部形成へのペプチドの効果を調べた。結果はペプチド処理で触手数が有意に増加し, また 2 重鎖 RNA で Hym-301 遺伝子発現を抑制すると触手数が有意に減少した。このことから Hym-301 は少なくともヒドラの触手形成に関わるペプチドであることが強く示唆された。C-末端がアミド化した上皮ペプチドで形態形成に関わるものが示されたものは Hym-301 が初めてである。

(3) 多細胞動物の循環機能の進化的起源 : 清水 裕, 藤澤敏孝

最近の研究から我々は, 循環機能の中核である心臓の進化的起源が腔腸動物のヒドラまでさかのぼる可能性を示唆する結果を得た。循環機能は多細胞動物の組織に栄養や酸素を補給するのに不可欠の機能であり, 心臓, 血管系は循環機能を担う器官である。高等動物では心臓, 血管系が発達しているが, 下等動物例えばショウジョウバエなどでは未発達で, 血管系は高等動物の閉鎖血管系の代わりに開放血管系が一般的になり, 心臓はより簡単な構造になる。さらに下等な多細胞動物になると, 血液, 血管系, 心臓のいずれも持たないのが一般的になる。当研究室の研究材料である腔腸動物のヒドラなどはその代表とされている。ヒドラの体制の基本は袋状の体腔部でありこの体腔内を通じた栄養物などの拡散がこの空間内の循環機構であると考えられてきた。我々が見いだしたのはこの旧来の概念を根本から覆す以下の諸事実である。

(1) ヒドラ体腔内の主要な循環機構は拡散ではなく体腔部の収縮 (ポンピング運動) による体腔液の強制的循環

である。(2) 体腔液の循環はヒドラの足部を中核として起こる。(3) ポンピング運動の活性は神経ペプチドであるヒドラ RFamide 及びそれを持つ神経細胞によって大きく影響される。ヒドラ RFamide は, 心臓を持つ多細胞動物で心拍運動を活性化することが知られている FMRamide と構造が類似している。RFamide 陽性神経細胞はヒドラ足部と触手に多く, 循環の中核と一部重複する。(4) 既知の多細胞動物の心臓形成過程で心臓形成部域で特異的に発現するホメオボックス遺伝子 Nkx-2.5 がヒドラで循環機能の中核部分と位置づけられた足部で特異的に発現する。このように, ヒドラの足部は, 今回見つかった体腔液のポンピングによる循環現象において中核部分となるだけでなく, 心臓と類似の神経ペプチドとその陽性神経細胞を持ち, 心臓形成で例外なく認められる遺伝子発現を行うことが分かった。我々は, 以上の結果を次のように解釈している。心臓と同じような液体の循環機構は腔腸動物にも存在し, 血液の代わりに体腔内液の循環を制御する。腔腸動物は海綿動物とともに多細胞動物の最も原始的なグループを形成しているが, 多細胞動物は血管系の有無によらず循環機能を有しておりその基本機構は心臓と同じものを用いている。我々はこの仮説の検証を試みている。

研究業績

(1) 原著論文

1. 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* **211**, 299-308, 2001.
2. Bosch, T.C.G., and Fujisawa, T.: Polyps, peptides and patterning. *Bioessays* **23**, 420-427, 2001.
3. Harafuji, N., Takahashi, T., Hatta, M., Tezuka, H., Morishita, F., Matsushima, O., and Fujisawa, T.: Enhancement of foot formation in Hydra by a novel epitheliopptide, Hym-323. *Development* **128**, 437-446, 2001.
4. Shimizu, H.: Feeding and wounding responses in Hydra suggest functional and structural polarization of the tentacle nervous system. *Comp. Biochem. and Physiol.*, A. (in press), 2002.
5. Shimizu, H., Zhang, X., Zhang, J., Leontovich, A., Li Yan, K.F., and Sarras Jr, M.P.: Epithelial Morphogenesis in Hydra Requires De Novo Expression of Extracellular Matrix Components and Matrix Metalloproteinases. *Development* (in press), 2002.

(2) 発表講演

1. Fujisawa, T.: Epitheliopptides involved in patterning of Hydra. The 14th International Congress

of Developmental Biology, Kyoto, July.

2. Takahashi, T., Yum, S, Koizumi, O., Kobayakawa, Y., Bode, H.R., and Fujisawa, T.: A novel epithelipeptide, Hym-301 plays a role in tentacle formation in Hydra. The 14th International Congress of Developmental Biology, Symposium, Kyoto, July.

3. Shimizu, H.: Does diffusion dominate pattern formation in Hydra and other primitive metazoans? The 14th International Congress of Developmental Biology, Symposium, Kyoto, July.

4. Nishimiya-Fujisawa, C. and Fujisawa, T.: Expression of Hydra piwi homolog (Cniwi) in both germline cells and ectodermal epithelial cells. The 14th International Congress of Developmental Biology, Kyoto, July.

5. Takaku, Y., Hariyama, T., and Fujisawa, T.: Adhering endodermal epithelial cells exhibit high motility for aggregate formation in Hydra. The 14th International Congress of Developmental Biology, Kyoto, July.

6. Fujisawa, T.: An overview of the Hydra Peptide Project: Epithelipeptides involved in patterning of Hydra. International Workshop on Hydra and The Evolution of Metazoan Development. Tutzing, Germany. September.

7. Nishimiya-Fujisawa, C. and Fujisawa, T.: Cloning and expression of genes specific for germline cells in Hydra. International Workshop on Hydra and The Evolution of Metazoan Development. Tutzing, Germany. September.

8. Nishimiya-Fujisawa, C. and Fujisawa, T.: Region specific genes in Hydra. International Workshop on Hydra and The Evolution of Metazoan Development. Tutzing, Germany. September.

9. Takaku, Y., Hariyama, T., and Fujisawa, T.: Adhering epithelial cells exhibit cell-cell recognition and differential motility in Hydra vulgaris. International Workshop on Hydra and The Evolution of Metazoan Development. Tutzing, Germany. September.

10. Shimizu, H. and Fujisawa, T.: Circulatory phenomena in hydra: the foot region is the center of circulatory function and is specified by CnNK-2, a homolog of Nkx-2.5 that specifies ear formation in vertebrates. International Workshop on Hydra and The Evolution of Metazoan Development. Tutzing, Germany. September.

11. Shimizu, H. and Fujisawa, T.: Digestive movement in hydra: peristalsis and mass peristalsis occur in the gastric cavity and diffuse nerve net in the body column

regulates them as enteric nervous system.

12. 藤澤敏孝: ヒドラペプチドプロジェクトーペプチド性シグナル分子の網羅的解析. 第4回日本生化学会大会シンポジウム, 京都, 10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。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・霜島 司, 松本国治, 中島尚美, 総合研究大学院大学大学院生命科学研究科遺伝学専攻大学院生・中山貴博, 阿川泰夫, 萱島泰成, 古橋寛史, 岩手大学大学院生・川崎陽久, 国立遺伝学研究所発生遺伝研究部門教授・広海 健, チェコ科学アカデミー昆虫学研究所助教授・Marek Jindra, カナダ Simon Fraser 大学大学院生・Ho-Chun Wei, 東京工業大学フロンティア創造研究センター教授・半田 宏, 広島大学大学院理学研究科助教授・赤坂甲治, 愛媛大学医学部講師・濱田雄行が参加した。

広瀬は「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」(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), 「ヒト GSBP (G-stretch 結合因子) の機能解析」(代表者: 広島大学大学院理学研究科・赤坂甲治) 「One hybrid を用いた扁平上皮癌組織特異的転写因子のクローニング」(代表者: 愛媛大学医学部・濱田雄行) を組織し, 共同研究を行った。

本年度の研究は, 文部科学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), 同特定領域研究「神経回路」(2) 「神経回路網形成における Apontic / Trachea defective の役割」(広瀬), 同特定領域研究「転写調節機構から挑む高次生命の解析」(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。

上田は第42回 Drosophila Research Conference (3月, アメリカ合衆国, ワシントン DC), 広瀬は Cold Spring Harbor Meeting on Mechanism of Eukaryotic Transcription (9月, アメリカ合衆国, コールドスプリングハーバー) に参加し, 発表した。また, 広瀬はチェコ科学アカデミー昆虫学研究所に招待され, セミナーを行った (11月, チェコ, チェスケブデヨヴィツェ)。

(1) DNA 超らせんと転写に関する研究: 松本国治, 古橋寛史, 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。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 で変異誘起して *scf* 遺伝子変異株の分離を試みた (発表講演 4)。残念ながら *scf* に隣接する遺伝子のアレルが複数得られたものの、*scf* の変異株は得られなかった。そこで、GAL4 支配下に *scf* コード領域の二重鎖 RNA を発現するトランスジェニックフライを作製し、Actin 5C-GAL4 ドライバーとかけ合わせて *scf* の RNAi を試みた。その結果、ゲノムの異なる位置に挿入された複数のトランスジェニックラインで♂の成虫が出現せず、♂の X 染色体上の遺伝子発現を 2 倍活性化する dosage compensation に SCF が関わる可能性がでてきた。

転写にあたって RNA ポリメラーゼの進行に伴って DNA が回転するため、ポリメラーゼの前方には正の超らせん、後方には負の超らせんが生じる。トポイソメラーゼの変異株ではこうして生じた超らせんが蓄積することが知られている。しかし、トポイソメラーゼ活性が有る正常な細胞で、転写に伴って生じる超らせんを可視化した例は無かった。われわれはトリメチルソラレンが負に超らせん化した DNA に優先的に結合することに注目し、転写に伴って生じた負の超らせんをショウジョウバエ唾腺の多糸染色体上で蛍光染色により可視化することに成功した。特に、熱ショック後、熱ショック遺伝子座に生じるパフで強い染色が見られた (発表講演 13, 18)。

(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広島大学大学院理学研究科)

ショウジョウバエ GAGA 因子と結合し、クロマチンのリモデリングを促進する 2 つのタンパク質から成るヘテロダイマー p93-p130 に関して研究を進め、以下のことを明らかにした。1) p93-p130 複合体はクロマチンリモデリング因子の触媒サブユニットである ISWI によるヌクレオソームのスライディングを促進する。2) 唾腺の多糸染色体上で、GAGA 因子と p93, p130 は共局在する。3) *Ubx* 遺伝子のエピジェネティックな発現維持をめぐる、GAGA 因子をコードしている *Trl* 遺伝子と *p130* 遺伝子の間に遺伝学的相互作用がある。これらの結果は、GAGA 因子-p93-p130 複合体がクロマチンのリモデリングを介してエピジェネティックな遺伝子発現に関わることを示唆している (発表講演 1-3, 5, 8, 12, 14-17)。

また、広島大学、赤坂助教と共同してショウジョウバエの G-stretch 結合タンパク質に関する研究を開始し

た。このタンパク質をコードする遺伝子のイントロンに P エlement が入ったトランスジェニックフライから、P エlement をジャンプさせることにより、欠失変異を分離し、G-stretch 結合タンパク質の生体内での機能を解析している (発表講演 22)。

(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，上田 均，Marek Jindra¹，広海 健²，広瀬 進¹ (Czech Academy of Science, ²発生遺伝研究部門)

MBF1 は転写制御因子と TATA ボックス結合タンパク質 TBP の間を架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。ショウジョウバエ MBF1 のパートナーとして bZIP タンパク質 Trachea defective (TDF)/ Apontic (APT) を同定し、TDF / APT が認識する DNA の塩基配列を決定した。この配列と TATA ボックスを *lacZ* 遺伝子に連結したコンストラクトを導入したトランスジェニックフライの胚では、抗 TDF / APT 抗体で染色したパターンと同じ *lacZ* の発現がみられた。*tdf* 変異株ではこの *lacZ* の発現は検出されなかった。これらの結果は、TDF / APT が塩基配列特異的 DNA 結合性の転写活性化因子であることを示している。さらに、*mbf1* と *tdf* 遺伝子間に遺伝学的相互作用が見られることから、MBF1 は TDF / APT による転写活性化を仲介していることが明らかとなった (発表講演 7, 19)。

(4) ヒト扁平上皮癌抗原遺伝子に関する研究：濱田雄行¹，広瀬 進¹ (愛媛大学医学部)

扁平上皮癌抗原 (SCCA) は扁平上皮癌のマーカーとして使用されている。愛媛大学、濱田講師と共同してヒト SCCA1 遺伝子をクローニングし、そのプロモーター領域を解析した。また、46 種類のヒト培養細胞を用いて SCCA1 と SCCA2 遺伝子の発現量を調べた。その結果、SCCA1 遺伝子のプロモーター領域が扁平上皮癌の遺伝子治療のターゲットとなりえることが示唆された (発表論文 2, 3)。

(5) ショウジョウバエ FTZ-F1 を中心とした時期および組織特異的発現制御機構の解析：阿川泰夫，萱嶋泰成，山田正明，広瀬 進，上田 均

エクダイソンのパルスによって誘導される転写因子 FTZ-F1 の発現制御機構および FTZ-F1 による発現制御機構の解析を行なうことにより、ホルモンによって遺伝子発現が時期あるいは組織特異的に制御される分子機構を解明すること、さらに、この系を利用して転写制御機構の解明を目的としている。まず、ショウジョウバエ FTZ-F1 の発現制御機構を解析するため、FTZ-F1 遺伝子の転写制御領域に結合する新規因子 I-4 の精製を試みたところ、陽イオン交換樹脂と認識配列 DNA アフィニティーカラムを用いた方法で効率よく精製が進むことが判明した (発表

講演 21). また, ショウジョウバエのクチクラタンパクをコードし, 前蛹期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 *EDG84A* 遺伝子の発現制御機構を解析した結果, *EDG84A* 遺伝子は, 時期特異的発現を制御する FTZ-F1 の他に, 組織特異的発現を制御する複数の転写活性化因子と転写抑制因子によって複雑な機構で制御されていることが明らかになった. (発表講演 6, 9, 10, 20)

(6) FTZ-F1 と FTZ の相互作用機構: 鈴木大河, 川崎陽久, 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 FTZ は, 核内レセプター FTZ-F1 と相互作用して遺伝子の発現制御を行なう. 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てきた. このことをさらに確かめるため, p160 ファミリー因子と結合する際に相互作用にかかわることが知られている領域 (リガンド結合の 3 番から 5 番目の α ヘリックス部位) にアミノ酸置換変異を有する FTZ-F1 を作成し, 相互作用を調べた. その結果, リガンド結合型核内レセプターが p160 ファミリー因子と結合する際に相互作用にかかわるとされる 3 ヶ所のアミノ酸置換によって結合が極端に低下し, FTZ が FTZ-F1 と相互作用する様式は, 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が強く支持された (発表論文 1) (発表講演 9, 11).

研究業績

(1) 原著論文

1. Suzuki, T., Kawasaki, H., Yu, R. T., Ueda, H. and Umesono, K.: Segmentation gene product *fushi tarazu* is an LXXLL motif-dependent coactivator for orphan receptor FTZ-F1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 12403-12408, 2001.
2. Hamada, K., Shinomiya, H., Asano, Y., Kihara, T., Iwamoto, M., Hanakawa, Y., Hashimoto, K., Hirose, S., Kyo, S. and Ito, M.: Molecular cloning of human squamous cell carcinoma antigen 1 gene and characterization of its promoter. *Biochim. Biophys. Acta* **1518**, 124-131, 2001.
3. Hamada, K., Hanakawa, Y., Hashimoto, K., Iwamoto, M., Kihara, T., Hirose, S., Nakamura, M. and Ito, M.: Gene expression of human squamous cell carcinoma antigen 1 and 2 in human cell lines. *Oncology Rep.* **8**, 347-354, 2001.
4. Yabuki, T., Miyagi, S., Ueda, H., Saito, Y. and

Tsutsumi, K.: A novel growth-related nuclear protein binds and inhibits rat aldolase B gene promoter. *Gene* **264**, 123-129, 2001.

(2) その他

1. 広瀬 進: Polycomb および trithorax グループによる転写制御. *実験医学* **19**, 2186-2190, 2001.

(3) 発表講演

1. Shimojima, T., Okada, M., Nakayama, T., Ueda, H. and Hirose, S.: Chromatin remodeling and epigenetic gene expression. The 6th International Symposium of The Graduate University for Advanced Studies, Hayama, Kanagawa, March, 2001.
2. Hirose, S., Shimojima, T., Okada, M., Nakayama, T., Ueda, H.: Mechanism of GAGA factor-dependent chromatin remodeling that leads to epigenetic gene expression. Cold Spring Harbor Meeting on Mechanism of Eukaryotic Transcription, Cold Spring Harbor, New York, September, 2001.
3. Hirose, S.: GAGA factor-dependent chromatin remodeling and epigenetic gene expression. Seminar at Institute of Entomology, Ceskebudejovice, November, 2001.
4. 広瀬 進, 相田紀子, Ho-Chun Wei: 生体内でのスーパーコイル化因子の機能, 第 18 回染色体ワークショップ, 葉山, 1 月.
5. 広瀬 進, 霜島 司, 岡田聖裕, 中山貴博, 上田均: ユウクロマチンとヘテロクロマチン間をシャトルするタンパク質 GAGA 因子. 第 54 回日本細胞生物学会大会ワークショップ「ヘテロクロマチン—ゲノムと細胞機能をつなぐモジュレーター」, 岐阜, 6 月.
6. 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因子について. 第 5 回日本ショウジョウバエ研究会, 三島, 8 月.
7. Liu, Q.-X., Jindra, M., Ueda, H. and Hirose, S.: *Drosophila* coactivator MBF1 mediates Trachea defective-dependent activation. 第 5 回日本ショウジョウバエ研究会, 三島, 8 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ックな遺伝子発現. 転写研究会 2001, 筑波 10 月.
9. 上田 均: 核内レセプター型転写因子 FTZ-F1 による転写活性化機構. 転写研究会 2001, 筑波 10 月.
10. Kayashima, Y., Hirose, S., Ueda, H.: Mechanism of space specific gene expression in response to ecdysteroids-Expression of FTZ-F1 target gene *EDG84A* in *Drosophila melanogaster*. 内藤コンファレンス: 天然生理活性分子とその活性化機構 (III) - 昆虫生理

活性物質とその活性発現の分子機構 -, 葉山, 10月.

11. Kawasaki, H., Hirose, S., Ueda, H.: Analysis of transcriptional regulation mechanism of fushi tarazu by FTZ-F1, 内藤コンファレンス:天然生理活性分子とその活性化機構(Ⅲ) - 昆虫生理活性物質とその活性発現の分子機構 -, 葉山, 10月.

12. 広瀬 進: GAGA 因子複合体を介した高次クロマチン構造の変換. 第74回日本生化学会大会シンポジウム「遺伝子機能を支えるクロマチンインフラストラクチャー」, 京都, 10月.

13. 広瀬 進: 生体内で負に超らせん化したDNA領域の可視化. 国立遺伝学研究所研究会「非B型DNAの生物学: ゲノム核内構造のヒエラルキーと遺伝子発現制御」, 三島, 11月.

14. 広瀬 進: クロマチン構造変換によるエピジェネティックな遺伝子発現制御. 京都大学ウイルス研究所セミナー, 京都, 12月.

15. 広瀬 進, 霜島 司, 中山貴博, 上田 均: GAGA 因子-p93-p130複合体とエピジェネティクス. 第24回日本分子生物学会ワークショップ「和製クロマチン関連因子群」, 横浜, 12月.

16. 霜島 司, 中山貴博, 上田 均, 広瀬 進: ショウジョウバエ GAGA 因子-p93-p130複合体の機能解析. 第24回日本分子生物学会, 横浜, 12月.

17. 中山貴博, 霜島 司, 上田 均, 広瀬 進: ショウジョウバエ GAGA 因子-p93-p130複合体は活性クロマチンの形成に関与する. 第24回日本分子生物学会, 横浜, 12月.

18. 松本国治, 広瀬 進: DNAのnegative supercoilと転写活性のin situ解析. 第24回日本分子生物学会, 横浜, 12月.

19. 劉 慶信, 上田 均, 広瀬 進: ショウジョウバエのMBF1はTDFによる転写活性化を仲介する. 第24回日本分子生物学会, 横浜, 12月.

20. 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の解析. 第24回日本分子生物学会, 横浜, 12月.

21. 阿川泰夫, 広瀬 進, 上田 均: ショウジョウバエFTZ-F1の転写調節領域に作用する因子Factor I-4の解析. 第24回日本分子生物学会, 横浜, 12月.

22. 赤坂甲治, 井上 愛, 霜島太信, 中坪敬子, 上田均, 広瀬 進: 細胞周期に伴って変動する新規核タンパク質GSBPのヒト, ショウジョウバエホモログの機能解析. 第74回日本生化学会大会シンポジウム「核のダイナミズム」, 京都, 10月.

C-c. 初期発生研究部門

初期発生研究部門では, 小型熱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.

当研究部門では以下の研究メンバーで研究を行っています: 武田洋幸(教授, 4月より併任), 川上厚志(助手, 4月より併任), 小林大介(博士研究員), 北川忠生(博士研究員), 高島茂雄(博士研究員), 景 崇洋(博士研究員), 横井隼人(派遣研究員), 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, 3月まで), 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, 4月より派遣研究員), 木村哲晃(派遣研究員), 成田貴則(派遣研究員).

本年度の研究は以下の支援を受けて実施されています: 文部科学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」, 文部科学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」, 文部科学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」, 東レ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・内胚葉誘導に関与する新規遺伝子の単離: 坂口, 武田

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す. 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ました. 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の機構については分かっていません.

そこで, 独自の *in situ* hybridization screening 法を開発し, 効率よく卵黄細胞で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ーを作成し

ました。スクリーニングの結果、卵黄細胞で発現するクローンを30個以上単離する事に成功しました。本年は、その中の一つ、HMG型転写因子をコードする226D7の機能解析を行いました。その結果、この遺伝子は内胚葉分化に必須な遺伝子であることが判明しました(Sakaguchi et al., 2001)。

(2) 中枢神経系パターン形成におけるFGFシグナルの役割：新屋、武田

本研究では、中枢神経系組織の発生における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。その結果、中脳・後脳境界と終脳全前端部に活性化が認められました。次にアンチセンス技術を用いて、それらの領域で発現しているFgf8とFgf3の機能を調べました。その結果、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が主に機能することが判明しました(Shinya et al., 2001)。

(3) 体節の形成と分子時計：澤田、武田

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されることで形成されます。最近我々は、ゼブラフィッシュ胚においてhairy関連遺伝子であるher1の発現が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、尾芽領域から頭部側へ波状に移動することを見出しています(Sawada et al., 2000)。さらに本年は、FGFシグナルを胚体内で制御する実験により、FGFシグナルが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を示しました(Sawada et al., 2001; Saga and Takeda, 2001)。

(4) ゼブラフィッシュ突然変異体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、武田, W. Talbot, A. 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ます。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います。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、まだ明らかではありません。ゼブラフィッシュで単離されている突然変異体の一群には、ミッドラインでのシグナル伝達の異常によると考えられるものが多数あります。現在我々は、ミッドライン変異体のひとつ、chameleon (con) について解析を進めています。

(5) メダカ胚で発現する遺伝子の網羅的単離：木村、成

田、神藤、武田

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す。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網羅的単離と発現パターンの解析を行っています。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、所内にあるアカデミアシーケンズセンターの協力の下に、これの配列解析を進めています。2000年12月には、DDBJに約26,000のメダカEST配列を登録しました。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、メダカ体節形成期における発現パターンを個別に調べています。

(6) メダカを用いた突然変異体のスクリーニング：小林、北川、高島、景、横井、澤田、木村、成田、神藤、澤田、武田

科学技術庁振興調整費のプロジェクトにより、本年2月に完成したメダカ飼育施設において、メダカの突然変異体スクリーニングを開始した。初期発生や器官形成の研究に有用な突然変異体を体系的に収集することを目指している。すでに50系統あまりの変異体を単離しており、その中の重要と思われる変異体については表現型の解析、原因遺伝子のポジショナルクローニングを始めています。

研究業績

(1) 原著論文

1. Sakaguchi, T., Kuroiwa, A. and Takeda, H.: Expression of zebrafish btg-b, an anti-proliferative cofactor, during early embryogenesis. *Mechanisms of Development* **104**, 113-115, 2001.
2. Sakaguchi, T., Kuroiwa, A. and Takeda, H.: A novel sox gene, 226D7, acts downstream of Nodal signaling to specify endoderm precursors in zebrafish. *Mechanisms of Development* **107**, 25-38, 2001.
3. Shinya, M., Koshida, S., Sawada, A., Kuroiwa, A. and Takeda, H.: Fgf signalling through MAPK cascade is required for development of the subpallial telencephalon in zebrafish embryos. *Development* **128**, 4153-4164, 2001.
4. Sawada, A., Shinya, M., Jiang, Y.-J., Kawakami, A., Kuroiwa, A., and Takeda, H.: Fgf/MAPK signalling is a crucial positional cue in somite boundary formation. *Development* **128**, 4873-7880, 2001.
5. Haraguchi, S., Kitajima, S., Takagi, A., Takeda, H., Inoue, T. and Saga, Y.: Transcriptional regulation of Mesp1 and Mesp2 genes: differential usage of enhancers during development. *Mechanisms of*

(2) 総説

Saga, Y. and Takeda, H.: The making of the somite: molecular events in vertebrate segmentation. Nature Reviews Genetics 2, 835-845, 2001.

(3) 発表講演

1. A. Sawada, M. Shinya, Y-J. Jiang, A. Kawakami, A. Kuroiwa and H. Takeda.: "FGF / MAPK signaling regulates maturation of the presomitic mesoderm during vertebrate segmentation". The Second European Conference on Zebrafish Genetics and Development, London, April.

2. T. Sakaguchi, A. Kuroiwa and H. Takeda.: "In situ hybridization screening for novel genes expressed in the zebrafish yolk syncytial layer (YSL)" The Second European Conference on Zebrafish Genetics and Development, London, April.

3. A. Kawakami, R. Karlstrom, H. Takeda, W. Talbot and A. Schier.: "Molecular analysis of zebrafish midline mutant chameleon (con)" The Second European Conference on Zebrafish Genetics and Development, London, April.

4. H. Takeda, S. Koshida and M. Shinya.: "Roles of Fgf signal in induction and patterning of zebrafish neural tissues" 14th International Congress of Developmental Biology, Kyoto, July.

5. A. Sawada, M. Shinya, Y-J. Jiang, A. Kawakami, A. Kuroiwa and H. Takeda.: "FGF / MAPK signaling regulates maturation of the presomitic mesoderm during vertebrate segmentation" 14th International Congress of Developmental Biology, Kyoto, July.

6. T. Sakaguchi, A. Kuroiwa and H. Takeda.: "In situ hybridization screening for novel genes expressed in the zebrafish yolk syncytial layer (YSL)" 14th International Congress of Developmental Biology, Kyoto, July.

7. A. Sawada, M. Shinya, Y-J. Jiang, A. Kawakami, A. Kuroiwa and H. Takeda.: "FGF / MAPK signaling regulates maturation of the presomitic mesoderm during vertebrate segmentation" Society for Developmental Biology 60th Annual Meeting, Seattle, July.

8. A. Kawakami, R. Karlstrom, H. Takeda, W. Talbot and A. Schier.: "Molecular analysis of zebrafish midline mutant chameleon (con)" Society for Developmental Biology 60th Annual Meeting, Seattle, July.

9. 澤田篤志, 二階堂昌孝, 川上厚志, 荒木和男, 武田

洋幸: Fgf シグナルが制御する脊椎動物の分節. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月.

10. 坂口拓哉, 黒岩 厚, 武田洋幸: Yolk syncytial layer (YSL) で発現する遺伝子群の, Morpholino アンチセンスオリゴを用いた機能阻害による解析. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月.

C-d. 生理遺伝客員研究部門

ほ乳類ポリコム群遺伝子の構造と機能の解析

ほ乳類ポリコム群タンパク複合体の機能発現機序を明らかにしていくために, (1) ポリコム群タンパク複合体の構成成分の同定, (2) ポリコム群タンパク複合体の標的遺伝子座の同定, (3) ポリコム群タンパク複合体の標的遺伝子座への結合様式の解析についての解析を行ってきた.

(1) 155kDa スプライセオソーム結合タンパク (SAP155) によるポリコム複合体機能の調節

Mel-18 と Ring1B のインターラクターとして同定した SAP155 は, マウス胚においても構成的に Mel-18 と Ring1B に結合していることを免疫共沈降法を用いて明らかにした. SAP155 を欠損したマウスは, 8 細胞期におこるコンパクトを維持できず, それ以上に発生は進まない. SAP155 ヘテロ接合体では, 中軸骨格系にホメオチック変異が観察され, それは Mel-18 変異によって増強され, 逆に Mll 変異によって抑制された. これらの事実は, SAP155 がポリコム複合体のコンポーネントとしても作用することを示した. また, Mel18 と Bmi1 に結合するタンパクとして, 他に Ring1B と Mph2 などを同定し, それらを欠損したマウスを作成した. これらにおいても, 中軸骨格系にホメオチック変異が観察され, それは Mel-18 変異によって増強され, ポリコム複合体のコンポーネントとしても作用することを示した.

(2) マウス 11.5 日胚尾芽長鎖 cDNA ライブラリを用いた DNA アレイの作成

Mel-18 / Bmi1 二重欠失マウスの尾芽における異常を系統的に明らかにしていくために, 尾芽, 胎児小腸, 胸腺の全長 cDNA ライブラリから 1 万 5 千の独立したクラスターを同定し, それらを用いた DNA アレイの作成を行った. そのうちの 2000 をスポットしたフィルターを用いて, 現在までに, Mel-18 / Bmi1 二重欠失マウスと野生型の間で発現変化が見られた候補クローンを 10 個同定している.

(3) Hox クラスターにおける Ring1B / Mph1 結合領域同定の試み

Mel-18 結合タンパクである Ring1B と Mph1 が染色体

上にどのように結合するかを明らかにするために、クロマチン DNA との複合体の免疫共沈降を行い、Hox クラスタにおける結合領域の同定を試みた。Hoxb8 領域を全てフットプリントした結果、プロモーター上流にいくつかの結合領域を明らかにした。また、おもしろいことに、Ring1B は、転写が抑制されている場合に強く結合するが、Mph1 の結合は転写の状態と相関しないことが明らかになった。

研究業績

(1) 原著論文

1. Atsuta, T., Fujimura, S., Moriya, H., Vidal, M., Akasaka, T., Koseki, H.: Production of Monoclonal Antibodies against Mammalian Ring 1B Proteins. *Hybridoma* **20**, 43-46, 2001.
2. Sudo, H., Tonegawa, A., Arase, Y., Aoyama, H., Mizutani-Koseki, Y., Moriya, H., Wilting, J., Christ, B., and Koseki, H.: Inductive signals from the somatopleure mediated by bone morphogenetic proteins are essential for the formation of the sternal component of avian ribs. *Dev. Biol.* **232**, 284-300, 2001.
3. Isono, K., Abe, K., Tomaru, Y., Okazaki, Y., Hayashizaki, Y. and Koseki, H.: Molecular cloning, genetic mapping, and expression of the mouse Sf3b1 (SAP155) gene for the U2 snRNP component of spliceosome. *Mammalian Genome* **12**, 192-198, 2001.
4. Koizumi, K., Nakajima, M., Yuasa, S., Saga, Y., Sakai, T., Kuriyama, T., Shirasawa, T. and Koseki, H.: The role of Presenilin1 during somite segmentation. *Development* **128**, 1391-1402, 2001.
5. Fukamachi, H., Fukuda, K., Suzuki, M., Furumoto, T., Ichinose, M., Shimizu, S., Tsuchiya, S., Horie S., Shiokawa, K., Suzuki, Y., Saito, Y., Watanabe, K., Taniguchi, M., and Koseki, H.: Mesenchymal transcription factor *FKH6* controls gastric epithelial development and differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**, 1069-1076, 2001.
6. Akasaka, T., van Lohuizen, M., van der Lugt, N., Mizutani-Koseki, Y., Kanno, M., Taniguchi, M., Vidal, M., Alkema, M., Berns, A. and Koseki, H.: Mice doubly deficient for the Polycomb-Group genes *Mel18* and *Bmi1* reveal synergy and requirement for maintenance but not initiation of Hox gene expression. *Development* **128**, 1587-1597, 2001.
7. Yamamoto, K., Fujii, R., Toyofuku, Y., Saito, T., Koseki, H., Hsu, V.W. and Aoe, T.: The KDEL receptor mediates a retrieval mechanism that contributes to quality control at the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **20**, 3082-3091, 2001.

8. Ogita, J., Isogai, E., Sudo, H., Sakiyama, S., Nakagawara, A. and Koseki, H.: The expression of chicken *Dan*. *Mech. Dev.*, in press.

9. Kimura, M., Koseki, Y., Yamashita, M., Watanabe, N., Shimizu, C., Katsumoto, T., Kitamura, T., Taniguchi, M., Koseki, H. and Nakayama, T.: Regulation of Th2 cell differentiation by *mel-18*, a mammalian polycomb group gene. *Immunity*, in press.

(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

ベント DNA は様々な生物学的反応に関与していることが知られているが、その中でも転写反応の制御に関しては多くの報告がある。我々は、高等動物のゲノム上で周期性を示すベント DNA を発見し、その生物学的意義を議論してきた。具体的には、平均すると 4 ヌクレオソームの長さに対応する 680 塩基対の周期性、その位置が進化上良く保存されていること、コアヒストンに対する高い親和性とそのようなベント DNA がヌクレオソームの並進位相 (translational positioning) を決定していることを報告した。ヒトの β -グロビン遺伝子座における周期性ベント DNA の LCR (Locus Control Region) の HS2 領域におけるエンハンサーに対する転写制御機構を調べると、エンハンサー部位でのヌクレオソーム位相は 2 ヌクレオソーム離れた位置のベント DNA により決定され、その結果エンハンサー活性に対して影響を与える。エンハンサーとベント DNA の間の距離を変化させエンハンサー活性を調べると、距離を 100 塩基対以上長くするとエンハンサー活性が約半分になること、実際にその時にエンハンサー部位とベント DNA 部位の間に存在するヌクレオソームとエンハンサー部位のヌクレオソームの並進位相はその距離の増加にともない変化していることを *in vitro* だけでなく、*in vivo* でも DNase I Foot-printing 実験により示した。これらの結果は、高次のクロマチン構造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しており、特に、ヌクレオソームの directional cooperativity があると考えられる。また、さらに詳細なエンハンサー活性に対する影響についても現在調べている。(Onishi and Kiyama, 2001)

2) 遺伝子発現の Profiling によるゲノム機能情報の取得

我々は、エストロゲンに類似の活性を示す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、DNA マイクロアレイを用いてヒトの様々な癌細胞に対して化学物質を作用させてその遺伝子応答情報を取得し、プロファイル解析を行っている。まず、ヒトの乳癌由来の細胞株 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、約1万個の遺伝子の中からエストロゲン応答性を有する約200の遺伝子を選び、カスタムマイクロアレイを作成した。MCF-7細胞においてエストロゲン投与後の遺伝子発現の経時変化を調べたところ、発現上昇（Up-regulation）あるいは発現減少（Down-regulation）を示す遺伝子の中にも投与後早い時期に変化するものや後期に変化を示すものなどに分類することができた。また、エストロゲン活性を示す Estron や Estriol など 17β -estradiol 以外の化学物質、Nonylphenol, Bisphenol A, Dioxin などについても応答遺伝子群に関する情報を得た。このマイクロアレイを使用することにより、より簡便で、安価な評価系を作ることが可能になり、現在、このカスタムマイクロアレイを用いて遺伝子のエストロゲン応答性を様々な組織由来の癌細胞を用いてプロファイル解析を行っている。また、乳癌などホルモン依存性の癌についても創薬や治療の観点からの遺伝子情報の取得も現在進行中である。

3) ゲノム変異情報を利用した Genotyping とその利用
我々は、癌抑制遺伝子の LOH (Loss of Heterozygosity) の結果その遺伝子機能が失われることによって起こる癌化のメカニズムに注目し、マイクロアレイを利用して候補遺伝子座のスクリーニングをハイスループットに行うことにより Genotyping を行っている。ゲノムの LOH 情報は、ゲノムサブトラクション法を用いて、同じ個体の正常細胞と癌細胞のゲノム DNA を直接比べ、癌細胞 DNA で欠失の起こった部位をクローニングした。腎癌 (mixed cell type と clear cell type) 患者について調べ、このような遺伝子座を 44 箇所見つけた。これらの cluster は約 100 人近い患者では、10% から 90% 以上の頻度で LOH を示した。その中には、VHL (von Hippel Lindau) 遺伝子座や APC や IRF-1 などの遺伝子座、さらに新規に 5q32-q34, 6q21-q22, 8p12 などの部位が高頻度で LOH を示し、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。その中でも、1 メガ塩基対の範囲まで進んだ領域からは、癌細胞の増殖抑制を示す遺伝子を見いだすことができ、現在その遺伝子の機能解析を行っている。(Hatano, et al., 2001)

研究業績

(1) 原著論文

1. Onishi, Y. and Kiyama, R.: Enhancer activity of HS2 of the human beta-LCR is modulated by distance from the key nucleosome. *Nucl. Acids Res.* **15**, 3448-3457, 2001.
2. Hatano, N., Nishikawa, N. S., McElgunn, C., Sarkar, S., Ozawa, K., Shibana, Y., Nakajima, M., Gohji, K. and Kiyama, R.: A Comprehensive Analysis

of LOH Caused by Hemizygous Deletions in Renal Cell Carcinoma Using a Subtraction Library. *Mol. Carcinog.* **31**, 161-170, 2001.

3. Nadkarni, A., Sakaguchi, T., Takaku, H., Gorakshakar, A., Phanasaonkar, S., Colah, R., Mohanty, D. and Kiyama, R.: A Novel beta⁰-Thalassemia Mutation at Codon 55 (-A) and a Rare 17-bp Deletion at Codons 126-131 in the Indian Population. *Hemoglobin* in press.

(2) その他

1. 小口しのぶ, 木山亮一: DNA チップによる内分泌攪乱物質の影響評価システムの開発. *バイオインダストリー* **18**, 15-23, 2001.

(3) 発表講演

1. Kiyama, R., Onishi, Y. and Wada-Kiyama: Nucleosomal Phase over HS2 of the human beta-LCR. Annual Meeting of the American Society of Hematology, Orlando, USA, 2001 年 12 月.
2. Onishi, Y., Kiyama, R. and Wada-Kiyama: Nucleosomal Phase over HS2 of the human beta-LCR. 第 24 回分子生物学会年会, 横浜, 2001 年 12 月.
3. 西川直子, 小口しのぶ, 郷司和男, 青柳貞一郎, 木山亮一: DNA マイクロアレイを用いた腎細胞癌 LOH の検定. 第 24 回分子生物学会年会, 横浜, 2001 年 12 月.
4. 坂口武久, Anita Nadkarni, Chanane Wanapirak, 高久洋, 木山亮一: β -サラセミアの高速変異解析法. 第 24 回分子生物学会年会, 横浜, 2001 年 12 月.
5. 井上暁夫, 小口しのぶ, 吉田敦行, 大本陽子, 林慎一, 木山亮一: マイクロアレイを用いた各種培養細胞のエストロゲン応答性遺伝子群の発現プロファイル解析. 第 24 回分子生物学会年会, 横浜, 2001 年 12 月.
6. 魯禎妍, 李曉蔓, 木山裕子, 佐久間康夫, 木山亮一: ヒト・エストロゲン受容体 α 遺伝子転写制御における DNA 折れ曲がりの意義. 第 24 回分子生物学会年会, 横浜 2001 年 12 月.
7. Sarkar, S., Roy, B. D., Nishikawa, N. S., Shibana, Y., Nakajima, M. and Kiyama, R.: Kank, a candidate tumor suppressor gene at 9p23-24 for renal cell carcinoma. 第 24 回分子生物学会年会, 横浜, 2001 年 12 月.
8. Ebrahim, A., Sakaguchi, T., Sarkar, S., Roy B. C., Nishikawa, N. S., Onishi, Y. and Kiyama, R.: Genomic organization and comparative analysis of a mouse homologue of the human KIAA0172 gene. 第 24 回分子生物学会年会, 横浜, 2001 年 12 月.
9. 木山亮一: DNA マイクロアレイ…新ゲノム時代の遺伝子機能解析技術. ST スクエア「ゲノム時代のバイオ新

技術開拓」, つくば, 2001年11月.

10. 木山亮一: ヒト β -LCRにおける機能性ヌクレオソームの形成. 平成13年度国立遺伝学研究所研究集会「非BDNAの生物学: ゲノム核内構造のヒエラルキーと遺伝子発現制御」, 三島, 2001年11月.

11. 大西芳秋, 加藤 愛, 木山亮一: 周期性ベントDNAと転写制御機構: エンハンサーとサイレンサーにおける構想と機能の関係について. 第74回日本生化学会大会シンポジウム, 京都, 2001年10月.

12. 大西芳秋, 加藤 愛, 木山亮一: 周期性ベントDNAと転写制御機構: エンハンサーとサイレンサーにおける構想と機能の関係について. 第74回日本生化学会大会, 京都, 2001年10月.

13. 西川直子, 小口しのぶ, 郷司和男, 青柳貞一郎, 木山亮一: マイクロアレイCGHを用いた腎細胞がんLOHの検定. 第60回日本癌学会総会, 横浜 2001年, 9月.

14. ロイ・バダルチャンドラ, サーカー・シュバシシ, 西川直子, 郷司和男, 青柳貞一郎, 木山亮一: 腎細胞がん新規がん抑制遺伝子Kankの機能解析. 第60回日本癌学会総会, 横浜, 2001年9月.

15. 林 慎一, 井上暁夫, 吉田敦行, 大本陽子, 小口しのぶ, 木山亮一: マイクロアレイによるエストロゲン応答遺伝子群の発現プロファイル解析とホルモン療法反応性予測診断チップの開発. 第60回日本癌学会総会, 横浜, 2001年9月.

16. 吉田敦行, 井上暁夫, 大本陽子, 江口英孝, 東 靖宏, 末益公人, 中地 敬, 木山亮一, 林 慎一: マイクロアレイにより同定されたエストロゲン応答遺伝子の乳癌組織における発現の検討. 第60回日本癌学会総会, 横浜, 2001年9月.

17. 吉田敦行, 井上暁夫, 大本陽子, 江口英孝, 東 靖宏, 末益公人, 中地 敬, 木山亮一, 林 慎一: マイクロアレイによるエストロゲン応答遺伝子の同定と乳癌組織中発現量の検討. 第2回ホルモンと癌研究会, 大阪, 2001年7月.

18. 林 慎一, 井上暁夫, 吉田敦行, 大本陽子, 小口しのぶ, 木山亮一: マイクロアレイによるエストロゲン応答遺伝子群の発現プロファイル解析とホルモン療法反応性予測診断チップの開発. 第2回DNAチップ技術研究会, 京都, 2001年6月.

19. 林 慎一, 吉田敦行, 井上暁夫, 大本陽子, 小口しのぶ, 中地 敬, 木山亮一: マイクロアレイによるエストロゲン応答遺伝子群の発現プロファイル解析とホルモン療法反応性予測診断チップの開発. 第2回日本がん分子疫学研究会学術集会, 東京, 2001年3月.

20. 木山亮一: Expression Profiling of the Estrogen Responsive Genes Using DNA Microarrays for Hormone-based Assays in Diagnosis, Drug Screening and Environmental Monitoring. "International

Workshop on Genome Organization, Diversity & Evolution", ハイファ, イスラエル, 2001年7月.

21. 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」, 神奈川, 2001年3月.

22. 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」, 神奈川, 2001年3月.

23. 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」, 神奈川, 2001年3月.

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・石井百合子がこれを支援した。

(1) ショウジョウバエゲノムでの局所的な突然変異圧の変動：高野敏行

真核生物のゲノムは高次に組織化された構造より成っている。たとえば、温血の哺乳類、特にヒトの染色体は、それぞれ200kbから1Mbに及ぶGCに富んだ領域とGC含量の低い領域に分けることができる。このようなアイソコアと呼ばれるゲノム構造は突然変異の作用か自然選択、あるいはその両方によって維持されていると考えられているが、どちらの貢献が大きいかは長く論争的になっている。これまで、ショウジョウバエの染色体では、こうした領域による極端なGC含量の変動は観察されていなかった。本研究では近縁種間の塩基置換を置換の方向も含めて解析することで、局所的で極端な突然変異圧の変動が起きていることを明らかにした。キイロショウジョウバエ種亜群4種のX染色体のテロメア末端の10遺伝子について塩基配列の比較解析を行い、(i)全体に *melanogaster* と *erecta* の系統では遺伝子間でそれほど違いもなく全体に置換はATに偏っていること、(ii) *yakuba* と *orena* ではそれぞれ3つの遺伝子において有意にGCに偏った置換を示したが、その遺伝子は異なっていること (*yakuba* では *EG:165H7.3*, *171D11.2*, and *su(s)*; *orena* では *y*, *l'sc*, and *asè*)、(iii) *orena* とその姉妹種である *erecta* の系統間で進化速度を比較すると、*orena* の系統で有意にGCに偏った置換を示した3つの遺伝子でのみ *orena* の系統が *erecta* の系統より有意に進化速度が速いこと、(iv) *orena* においても最も動原体寄りの *sta* 遺伝子は有意にATに偏った置換を起こしていたことを明らかにした。こうした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。また、GC含量、進化速度等の情報から、*orena* の系統で有意にGCに偏った置換を示した3つの遺伝子では、A, TからG, Cへの突然変異率がそ

の逆方向の突然変異よりも9倍程度高いことが理論的に推測された。以上の知見から、ショウジョウバエでは突然変異圧はゲノム内で一定ではなく、領域によって異なることが強く示唆された。本研究の詳細については、文献(1)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

近縁種間で進む遺伝子変化を遺伝学的に解剖することを目的に、種間雑種の形態異常の解析を行った。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が観察されるにもかかわらず、キイロショウジョウバエと *D. simulans* の雑種ではこれらの胸部剛毛が失われる傾向がある。実際、*D. simulans* の系統によっては半数以上の剛毛が消失する場合もある。一方で、*D. simulans* により近縁な *D. mauritiana* とキイロショウジョウバエとの雑種では剛毛形成に異常は観察されず、*D. simulans* にも雑種において全く剛毛を失わない系統も存在している。このような種間雑種の形態異常は異種のゲノム間の不和合によっているが、遺伝学的解析から *D. simulans* の因子はX染色体上に存在していることを明らかにしている。また、すでに *D. simulans* 内の系統間変異(H, L)を用いたQTL (Quantitative trait loci) 解析から、系統間の違いの約3/4の相加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を見つけている。本年度は、このQTLのさらに詳細な物理的マッピングのため、約2,500のH, L系統間のF2系統について、剛毛消失の表現型と予想される領域の複数のマーカーについて遺伝子型タイピングを行った。その結果、QTLを含む約1Mbの領域内に15の組換え体を同定できた。現在、これらの組換え体を利用して、このQTLの正確なマッピングを行っている。

(3) 雄特異的形態形質・性櫛剛毛数の種内・種間変異の責任遺伝子の解析：高野敏行

モデル生物であるキイロショウジョウバエを含む *Sophophora* 亜属の雄は、性的二型を示す形質として前脚に性櫛と呼ばれる特殊化した剛毛列を持っていて、その剛毛数は種内・種間で非常に変異性に富んでいる。この性櫛はキイロショウジョウバエとおよそ4千年前に分岐したと考えられる *Drosophila* 亜属では見られないことから、比較的最近新たに *Sophophora* 亜属に生じた形質と考えられる。また、形態進化、特に性的二型を示す形質の進化には自然淘汰(性淘汰)が大きく働いたと考えられている。この性櫛剛毛数の種内・種間変異の責任遺伝子の同定と変異の実体を分子レベルで明らかにすることを目的に以下の解析を行った。キイロショウジョウバエの姉妹種であるオナジショウジョウバエについて性櫛剛毛数の多い系統(H, 個体当たり平均=24.7)と少ない

系統 (L, 平均 = 18.5) 間で, 第二, 第三染色体上の合計 22 のマーカーを用いて QTL マッピングを行った。その結果, 第二, 第三各染色体上にそれぞれ 2 つの QTL を見出した。第三染色体上の 2 つの QTL は期待される方向の (H 系統の対立遺伝子が剛毛数を増やす) 効果をもっていたが, 第二染色体上の QTL はいずれも, H 系統の対立遺伝子の相加的効果が負で, しかも一方の QTL は超優性を示した。この超優性効果を含む推定された相加的効果と優性の度合いが遺伝的背景に依存するものかどうかを検討するため, 異なる遺伝的背景において各効果の推定を現在行っている。ところで, オナジショウジョウバエに最も近縁な種のひとつである *D. mauritiana* はキイロショウジョウバエ, オナジショウジョウバエと比べ有意に性腺剛毛数が多いことが知られている (個体当たり 29.0)。オナジショウジョウバエと *D. mauritiana* 間の性腺剛毛数変異に関して同様の QTL 解析が行われていて, 第三染色体上に 2 つの有意な QTL がマップされている (True et al. 1997)。実はそのひとつは, 今回見いだされた第三染色体上の QTL のひとつとその位置が非常によく一致する。同一の遺伝子が種内と種間の変異の両方に貢献している可能性が高い。

研究業績

(1) 原著論文

1. Takano-Shimizu, T.: Local changes in GC / AT substitution biases and in crossover frequencies on *Drosophila* chromosomes. *Molecular Biology and Evolution* 18, 606-619, 2001.

(2) 発表講演

1. Takano-Shimizu, T.: A proposal of genome-wide linkage disequilibrium scan. 日本ショウジョウバエ研究会第 5 回研究集会, 静岡, 8 月。
2. Takano-Shimizu, T.: Three causes for episodic molecular evolution in *Drosophila* genomes. 日本遺伝学会第 73 回大会, 東京, 9 月。

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 (中核的研究機関研究員), 市場勇太 (進化遺伝研究部門研究員), 西橋藍 (科学技術振興事業団研

究員), 三上剛和 (総合研究大学院大学 2 年), 嶋田誠 (中核的研究機関研究員), 金衝坤 (国立遺伝学研究所外国人研究員), 太田聡史 (科学技術振興事業団研究員), 野田令子 (日本学術振興会特別研究員), 高橋文 (日本学術振興会特別研究員), 富木毅 (総合研究大学院大学 1 年), Kirill Kyukov (研究員) が加わった。宮内洋子, 鈴木和子, 北きよみ, 深川有子, 吉川美津子, 川本たつ子, 青嶋昌子 (研究支援推進員), 野秋好実, 鈴木真有美, 小平順子, 水口昌子, 井出敦子が研究の補助業務を行った。

教授・池村はコスタリカ (ガナカステ) で 1 月に, イタリア (イスキア島) で 10 月に開催された分子進化学の国際研究集会に出席し発表を行うため渡航した。また, 池村は 3 月に葉山で行われた総研大国際シンポジウム『21 世紀の総合ゲノム科学』を組織した。

助教授・斎藤はアメリカ (サンディエゴ) で 5 月に開催された米国遺伝学連合年會に, ロシア (ウラジオストク) で 9 月に開催されたシンポジウムに, アメリカ (ラホヤ) で 11 月に開催されたシンポジウムに出席し発表した。

また斎藤は 3 月に国際ワークショップ「遺伝子と心をつなぐ第一歩」(東京) を理化学研究所と共催し, 11 月には国際シンポジウム「進化ゲノム学: 21 世紀における生物学の新しいパラダイム」(熱海) を文部科学省からの資金補助を受けて主催した。

本年度の研究は, 文部科学省科学研究費補助金特定領域研究 (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「染色体バンド境界がハイリスク・ハイリターン領域である可能性の検証」(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), 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), 特定領域研究 (C) (2) 「比較ゲノム解析に基づく遺伝子システムの多様化と進化機構の解明」(分担者斎藤), 特定領域研究 (A) (2) 「新規セントロメアタンパク質による紡錘体チェックポイント制御機構の解析」(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), 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。また, 科学技術振興事業団, 計算科学技術活用型特定研究開発推進事業「自己組織化地図によるゲノム情報の包括的視覚化」(代表者池村), 総合研究大学院大学の共同研究「意識の進化に関する学術的研究」(代表者斎藤), 新エネルギー・産業技術総合開発機構より「類人猿ゲノム計画に関する動向調査」(代

表者齋藤), 科学技術振興事業団若手研究者研究推進事業「タイムシグナルと制御」領域(代表者深川)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の高次構造の挙動とその生物学的機能との相関に関する研究」に関して, 工藤喜弘・山形大学工学部応用生命システム工学科教授を代表に「遺伝子情報の解釈に関する小さい異論の収集と分析」に関して, 金谷重彦・奈良先端科学技術大学院大学・助教授を代表に「コドン使用特性および二アミノ酸配列組成に基づいた遺伝子の機能推定」を行った。また清水光弘・明星大学理工学部・助教授を代表に遺伝研研究会「非B型DNAの生物学」を行った(11月)。

助教授・齋藤は, 共同研究(A)として, 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」と松木孝澄・福井医科大学教授を代表に「新しい染色体特異DNAマーカーによる霊長類の系統進化に関する研究」を行った。

助手・深川は, 共同研究(A)として, 大戸茂弘・九州大学大学院薬学研究院助手を代表に「時計遺伝子に着目した時間治療法の開発」を行った。共同研究(B)として, 高見恭成・宮崎医科大学医学部助教授を代表に「DT40細胞を用いたクロマチンアセンブリーファクター(CAF-1)の解析」を行った。

1. 池村グループ

(1) ヒト11番および21番染色体長腕全域のS期内複製時期地図の作成ならびに複製時期転換領域の特徴の解析: 渡辺良久, 藤山秋佐夫^{1,2}, 榊佳之², 池村淑道

(¹人類遺伝研究部門, ²理研・ゲノム科学総合研究センター)

染色体バンドに代表されるようなゲノム上の大規模な不均一性の実体やその機能を分子レベルで解明することは, 今後のゲノム解析および医学研究において重要な基礎知見を与える。この目的を遂行するため, ヒト21番染色体長腕(34Mb)および11番染色体長腕(80Mb)の全域を対象に, 約450箇所のSTS部位のS期内複製時期を塩基配列レベルで測定し, 詳細な複製時期地図を作成した。11qおよび21qの解析から, GC含量の区分境界と複製時期の転換部位との間に密接な関係があることが判明した。S期前半から後半への複製時期の転換部位には腫瘍関連遺伝子が集中して存在しており, 家族性アルツハイマー病と関係した遺伝子であるAPPや家族性ALSの原因遺伝子のSOD1などの脳神経疾患遺伝子類も存在していた。複製時期の転換領域およびその周辺領域は, SNPの高頻度領域とも関係していた。また, 解析した11qお

よび21qについて, マウスゲノムと比較し, 染色体レベルで相同性の切り替わる部位を特定したところ, これらの部位は複製時期の転換領域またはその近傍に集中していることが判明した。これらの結果から, 複製時期の転換機構は, ヒトの疾患およびゲノム進化の分子機構と密接に関連しており, ゲノムに多様性をもたらす原因のひとつであると推定した。詳細については, *Hum. Mol. Genet.* **11**, 13-21, 2002と*Science* **294**, 2282, 2001を参照。

(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, 深川有子, 吉川美津子, 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こ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。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た。さらに、各種変異ZW10をノックアウト株に導入してZW10のチェックポイントに関わる機能ドメインを明らかにした(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。(Fukagawa et al., EMBO J., 2001)。

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り、CENP-Iと命名した。CENP-Iのノックアウト細胞を作成した結果、CENP-Iのノックアウト細胞はCENP-Hと同様に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-Aの局在には影響がなかったが、CENP-CおよびCENP-Hの局在に異常が生じた。またCENP-Hのノックアウト細胞でCENP-Iの局在を調べた結果、CENP-Iの局在異常が観察された。これらのことから、CENP-IはCENP-Hと協調してCENP-Cの局在に関わっていることが示唆された(論文投稿中)。

この他にCENP-Cの温度感受性株の樹立(Fukagawa et al., Nucl. Acids Res., 2001)および染色体接着因子であるコヒ-シンのサブユニットであるRad21の解析も行った。特に、Rad21に関してはノックアウト細胞を樹立してRad21がセントロメアタンパク質INCENPの局在に関与することを明らかにした(Sonoda et al., Dev. Cell, 2001)。

(3) 塩基配列情報の解析による複製起点の推定：市場勇太、阿部貴志¹、渡辺良久、金谷重彦²、池村淑道¹(ザナジェン、²奈良先端大)

一本鎖の塩基配列に着目した場合、細菌のゲノムでは、leading strandとlagging strandとして合成された配列の間で[G]頻度と[C]頻度の逆転、いわゆるskewが報告されている。1例を挙げると、*Escherichia coli*はoriCを境にしてleading strandでは[G] > [C]、lagging strandでは[C] > [G]の関係が成り立つ。Lobryらはこの偏りを表すためにGCskew[(C-G)/(C+G)]を用い、細菌ゲノムの複製起点とGCskewの転移領域とが密接な関係にあることを示した。またATskewの転移と複製起点が重なる細菌も報告されている。

しかし、*Synechocystis* sp. など GCskew, ATskew ともに明確な転移領域を示さない細菌も存在する。DNA分子内で塩基組成の偏りが起きる理由として、転写の際のleadingとlaggingにおける変異や修復、脱アミノ化の違い、遺伝子の転写方向や密度の差などが考えられている。

本研究ではdi-nucleotideのskewに注目し、現時点で全塩基配列が報告されている全ての細菌と、酵母やヒトのゲノムに対しても解析を行った。ヒトゲノムにはポリプリン/ポリピリミジン配列が数万コピー存在し、染色体の核内配置や遺伝子発現に深くかかわっていると考えられている。di-nucleotideによる解析は、ポリプリン/ポリピリミジン配列に対する感度も高くなり、mono-nucleotide(GC, ATskew)よりも多くの情報を抽出することができる。di-nucleotideを用いた解析は、16個の変数を扱うことになるため、多変量解析(主成分分析)を導入した。主成分分析の目的は対象である多変数(di-nucleotide全ての組み合わせ)を総合化することであり、代表する因子を読み取ることで、ゲノムの総合的な特性を抽出することができる。最大の特性をあらわすものを第1主成分、それに直交する軸にあたる次の特性が第2主成分として得られる。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最も大きいことが推測できる。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 strandとlagging strand間の塩基対の偏りがdi-nucleotideにおいても存在することを示している。また、第2主成分における説明変数の固有ベクトルは、相補的な塩基対は全て正負反対の符号を持つため、GC含量の特徴の次に相補的な塩基対の偏りが寄与していることがわかった。

これまでのGCskew, ATskewの両方ともで明確な転移領域が見出せなかった*Synechocystis* sp.について、同様に主成分分析を行った結果、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る主成分得点は、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、複製起点を推測できる可能性が示された。複数の複製起点を持つ場合でも同様な手法を用いることにより、予測が可能であると考えられる。酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)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(ARS)のうち8割ほどの確率でskewの転移領域と一致していた。ヒト21番染色体の第2主成分得点からも、複製起点の存在する可能性の高い領域が導き出せるが、実験的な結果が少なく現段階では推測の域が大きい。しかし、この主成分得点が複製時期のタイミングと関連することが判明している。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

対間の値が大きくなる傾向が見られた。di-nucleotide skew による解析に加え、同様な手法を用いた tri-nucleotide skew による解析をバクテリアからヒトまで行っている。mono-nucleotide や di-nucleotide skew には現れない解析結果や感度の上昇が期待できる。

(4) 『Genome Documentary Theater (Mishima)』の構築の準備：阿部貴志¹，和田健之介²，和田佳子²，市場勇太，池村淑道 (¹ザナジェン，²アントラッド)

Genome 情報の蓄積は急激であり，その大量情報法の全体像を把握し，そこからの知識発見を行うことが興味深く，重要となっている。Genome 情報の全体像を効果的に教育し啓蒙するシステムの必要性も明らかである。この目的で『Genome Documentary Theater (Mishima)』をプロデュースする事を計画している。Genome 情報の全体像を把握することを目的とするシステムであり，『ドキュメンタリー』との名称は，イラストを用いない実像での提供を基本方針とすることを意味している。Genome の大量で複雑な情報を計算機を用いて表示する方法として，大量な情報を多次元空間のベクトルとして表現し，多次元空間のデータを2次元ならびに3次元的に可視化することを試みる。多次元情報の有効な2次元可視化の例としては，コホネン博士の開発した自己組織化マップ (Self Organizing Map; SOM) を用いる。この方法は多次元情報の2次元空間への非線形写像が基本であり，線形写像を基礎にする従来の多変量解析に比べて，飛躍的に高い分離能力を持つことを明らかにした (Kanaya et al., 2001)。すでに構築を完成させた SOM マップとしては，69 種類のバクテリアに関する約6万の遺伝子についてのコドン使用の SOM マップであり，水平移動した遺伝子類の全体像を視覚的に把握することを可能にしている。これら69種類のバクテリアの genome 配列について，dinucleotide と trinucleotide 頻度に関しても SOM マップを構築している。ヒト21番と22番ゲノム配列についても同様な SOM マップを完成させ，skew 値を加えた3次元表示を行っている。本研究所で運用を計画している Super SINET を活用し，他機関とも共同して『Genome Documentary Theater』の構築と運用を目指している。

(5) 遺伝子コドン選択パターンの研究：中村保一¹，北きよみ，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55万遺伝子のコドン使用と，1万3千の生物種 (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。

研究業績

(1) 原著論文

1. Watanabe, Y., Fujiyama, A., Ichiba, Y., Hattori, M., Yada, T., Sakaki, Y. and Ikemura, T.: Chromosome-wide assessment of replication timing for human chromosomes 11q and 21q: disease-related genes in timing-switch regions. *Human Molecular Genetics*, **11**, 13-21, 2002.

2. Sonoda, E., Matsusaka, T., Morrison, C., Vagnarelli, P., Hoshi, O., Ushiki, T., Nojima, K., Fukagawa, T., Waizenegger, I.C., Peters, J-M., Earnshaw, W.C. and Takeda, S.: Scc1 / Rad21 / MCD1 is required for sister chromatid cohesion and kinetochore function in vertebrate cells. *Dev. Cell*, **1**, 759-770, 2001.

3. Kanaya, S., Yamada, Y., Kinouchi M., Kudo, Y., and Ikemura, T.: Codon usage and tRNA genes in eukaryotes: Correlation of codon usage diversity with translation efficiency and with CG-Dinucleotide usage as assessed by multivariate analysis. *J. Mol. Evol.*, **53**, 290-298, 2001.

4. Kanaya, S., Kinouchi M., Abe, T., Kudo, Y., Yamada, Y., Nishi, T., Mori, H. and Ikemura, T. Analysis of codon usage diversity of bacterial genes with a self-organizing map (SOM): characterization of horizontally transferred genes with emphasis on the *E. coli* O157 genome. *Gene*, **276**, 89-99, 2001.

5. Fukagawa, T., Regnier, V., and Ikemura, T.: Creation and characterization of temperature-sensitive CENP-C mutants in vertebrate cells. *Nucleic Acids Research*, **29**, 3796-3803, 2001.

6. Fukagawa, T., Mikami, Y., Nishihashi, A., Regnier, V., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Sugata, N., Todokoro, K., Brown, W., and Ikemura, T.: CENP-H, a constitutive centromere component, is required for centromere targeting of CENP-C in vertebrate cells. *The EMBO Journal*, **20**, 4603-4617, 2001.

7. Hamada, A., Ikemura, T. and Yoshinaga K.: Stabilization of *chlI* transcript by tRNA in chloroplast of green alga *Chlorella vulgaris*. *J. Biochem. Mol. Biol. & Biophys.*, **5**, 277-284, 2001.

8. 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.

9. Shina, T., Ando, A., Suto, Y., Kasai, F., Shigenari, A., Takishima, N., Kikkawa, E., Iwata, K., Kuwano, Y., Kitamura, Y., Matsuzawa, Y., Sano, K., Nogami, M.,

Kawata, H., Li, S., Fukuzumi, Y., Yamazaki, M., Tashiro, H., Tamiya, G., Kohda, A., Okumura, K., Ikemura, T., Soeda, E., Mizuki, N., Kimura, M., Bahram, S., and Inoko, H.: Genomic anatomy of a premier major histocompatibility complex paralogous region on chromosome 1q21-q22. *Genome Research*, **11**, 7879-802, 2001.

(2) その他

1. 渡辺良久, 池村淑道: ヒトゲノムの GC% 分布と S 期内複製時期 - 複製時期の転換領域に見いだされた病因遺伝子. 蛋白質核酸酵素, **46**, 2371-2374, 2001. 共立出版.

(3) 発表講演

1. Ikemura, T.: Replication timing of human chromosome 11q and 21q: disease genes in timing-switch regions. International Society of Molecular Evolution, "Chromosomes: structure, function and evolution" January 8 - 12, 2001, Costa Rica.

2. Watanabe Y., Fujiyama A., Hattori M., Sasaki Y., Ikemura T.: Determination of replication-timing of the entire length of human chromosome 11q and 21q at the sequence level: disease-related genes located in the replication-timing switch regions. International Symposium "Genome Science in the 21st Century: Information of the Higher-Order Structure beyond the Primary Sequence", Hayama, 3月.

3. Fukagawa T., Okamura A., Nishihashi A., Mikami Y., Ikemura T.: Genetic analyses of centromere proteins in vertebrate cells. International Symposium "Genome Science in the 21st Century: Information of the Higher-Order Structure beyond the Primary Sequence", Hayama, 3月.

4. Kanaya S., Kinouchi M., Abe T., Yamada Y., Kudo Y., Ikemura T.: Species-specific Diversity of Codon Usage based on Multivariate Analysis. International Symposium "Genome Science in the 21st Century: Information of the Higher-Order Structure beyond the Primary Sequence", Hayama, 3月.

5. Ichiba Y., Watanabe Y., Ikemura T.: Skew and principal component analysis of prokaryotic and eukaryotic genome sequences. International Symposium "Genome Science in the 21st Century: Information of the Higher-Order Structure beyond the Primary Sequence", Hayama, 3月.

6. Ohno M., Fukagawa T., Lee J. S., Kanaya S., Ikemura T.: Triplex-forming DNAs in the Human Interphase Nucleus Visualized *In Situ* by Polypurine/Polypyrimidine DNA Probes and Antitriplex

Antibodies. Triplex-forming DNAs Are Spatially Associated with Centromeres. International Symposium "Genome Science in the 21st Century: Information of the Higher-Order Structure beyond the Primary Sequence", Hayama, 3月.

7. Kinouchi M., Yamada Y., Kanaya K., Kudo Y., Ikemura T.: Detection of tRNA genes in the complete genome sequence of unicellular and multicellular species. International Symposium

"Genome Science in the 21st Century: Information of the Higher-Order Structure beyond the Primary Sequence", Hayama, 3月.

8. Fukushima A., Kinouchi M., Kanaya S., Kudo Y., Ikemura T.: Statistical Analysis of Genomic Information-Long-Range Correlation in DNA sequences-. International Symposium "Genome Science in the 21st Century: Information of the Higher-Order Structure beyond the Primary Sequence", Hayama, 3月.

9. Watanabe Y., Fujiyama A., Hattori H., Sasaki Y., Ikemura T.: Replication timing of human chromosome 21q and 11q and disease genes in timing-switch area. International Symposium on "Genome Science in the 21st Century: Information of the Higher-Order Structure beyond the Primary Sequence", Hayama, 3月.

10. 深川竜郎, 池村淑道: 染色体工学的手法を用いたセントロメアの機能解析. 日本遺伝学会第 73 回大会, 東京, 9月.

11. 渡辺良久, 藤山秋佐夫, 市場勇太, 榊 佳之, 池村淑道: ヒト 11・21 番染色体長腕の複製時期の測定: 複製転換領域に集中する病因遺伝子類. 日本遺伝学会第 73 回大会, 東京, 9月.

12. 横峯孝昭, 深川竜郎, 佐々木裕之: 鳥類の de novo DNA メチル化酵素の同定. 日本遺伝学会第 73 回大会, 東京, 9月.

13. Ikemura T.: Chromosome-wide assesment of replication timing for human chromosomes 11q and 21q: disease-related genes and genome-synteny breakage in timing-switch regions. The 5th Anton Dohrn Workshop "Natural Selection and the Neutral Theory". Ischia, Naples, 10月.

14. Ikemura T.: Chromosome-wide measurement of replication timing for human chromosomes 11q and 21q: disease-related genes and genome-synteny breakage in timing-switch regions. The Symposium on "Evolutionary Genomics", Atami, 11月.

15. 深川竜郎: 高等脊椎動物のセントロメア形成機構. 第 24 回日本分子生物学会年会シンポジウム, 横浜, 12月.

16. 前田大介, 関 政幸, 林 朋子, 小野田文俊, 深川

竜郎, 八木秀樹, 榎本武美: 出芽酵母 UBC9 温度感受性変異株及び DT40 細胞を用いた Ubc9 の機能解析. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月.

17. 横峯孝昭, 深川竜郎, 佐々木裕之: Identification of chicken de novo DNA methyltransferase. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月.

18. 岡村 淳, 池村淑道, 深川竜郎: ZW10 を含む新しい紡錘体チェックポイント経路の解析. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月.

19. 西橋 藍, 池村淑道, 深川竜郎: 分裂酵母 Mis6 の高等脊椎動物ホモログの機能解析. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月.

20. 阿部貴志, 西 達也, 河合宏紀, 市場勇太, 西橋藍, 中川 智, 上月登喜男, 大山 彰, 木之内誠, 工藤喜弘, 池村淑道, 金谷重彦: 改良型自己組織化法によるコドン組成に基づく遺伝子の分類. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月.

21. 上月登喜男, 笹本博幸, 高橋順子, 大山 彰, 河合宏紀, 市場勇太, 西橋 藍, 中川 智, 西 達也, 阿部貴志, 木之内誠, 金谷重彦, 工藤喜弘, 池村淑道: 改良型自己組織化法を利用した遺伝子機能予測システムの開発. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月.

22. 河合宏紀, 西 達也, 市場勇太, 西橋 藍, 太田紀夫, 中川 智, 上月登喜男, 大山 彰, 阿部貴志, 木之内誠, 金谷重彦, 工藤喜弘, 池村淑道: 自己組織化法によるヒト蛋白質の膜貫通領域の解析. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月.

23. 西 達也, 河合宏紀, 市場勇太, 西橋 藍, 太田紀夫, 中川 智, 上月登喜男, 大山 彰, 阿部貴志, 木之内誠, 金谷重彦, 工藤喜弘, 池村淑道: 改良型自己組織化法によるモデル生物のゲノム解析. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月.

2. 斎藤グループ

(1) 類人猿 HoxA cluster の比較ゲノム研究: 金 衝坤, 青島昌子, 井出敦子, 小原雄治¹, 早坂都夫², 斎藤成也
(¹ 遺伝研・生物遺伝資源情報総合センター ² 三和化学研究所熊本霊長類パーク)

われわれは, 類人猿の Hox クラスター A の塩基配列決定を行っている. ヒトゲノム計画で決定されたヒトの塩基配列を参考にして PCR プライマーを設計し, 類人猿のゲノム DNA をテンプレートに用いて, PCR-直接塩基配列決定を行なった. この方法で, チンパンジー, ゴリラ, オランウータンの Hox クラスター A の領域 21kb の配列を決定した. これらの配列をヒトの配列と多重整列して比較した結果, 大部分が遺伝子間領域であったにもかかわらず, ヒトとチンパンジーの違いは 0.9% にすぎなかった. これら遺伝子間領域に遺伝子発現制御部位が多数存在し, そのために進化上の制約を受けている可能性が示

唆された. また数カ所で種特異的な塩基の挿入・欠失変化も発見した. この 21kb の領域ではヒト, チンパンジー, ゴリラの間の進化系統的パターンが前半領域と後半領域で異なっていた. さらに, この領域のヒトとマウスの塩基配列を加えて比較した結果, ヒト上科だけ, あるいは霊長類だけで進化的に保存されている領域や哺乳類全体で保存されている領域の存在することが明らかになった. 現在はチンパンジーとゴリラについて, Hox クラスター A の全領域の shotgun 方式による配列決定を行っている. チンパンジーについては BAC ライブラリーを, ゴリラについては我々が構築したゴリラの fosmid library を用いている.

(2) ゴリラフォスミドライブラリーの構築: 金 衝坤, 青島昌子, 井出敦子, 藤山秋佐夫¹, 斎藤成也
(¹ 遺伝研・人類遺伝研究部門)

われわれが進めている類人猿ゲノム研究にはチンパンジーを含めた類人猿のゲノムライブラリーがなくてはならない. 幸いチンパンジーの BAC ライブラリーに関してはいくつかの研究グループで構築してあるので, それを使えるが, ゴリラ, オランウータンに関しては, 今まで作られていない. そこで我々はゴリラの fosmid library を構築した. fosmid library は, 他の genomic library に比べて挿入 DNA 長が 35-50kb で比較的短い, 比較的容易に作れるし, 挿入 DNA が非常に安定している. DNA は東京都恩賜上野動物園から供与された雌ゴリラの肝臓組織から抽出した. 5 μ g の DNA から挿入 DNA を調整し, pKS143 vector でライゲーションした後 in vitro Packaging し, 大腸菌に Transfection して, LB / Amp プレートにまいた. それを自動 colony picker を用いて, 総計 261,000 clone を 384 well plate 682 個におさめて, -80 $^{\circ}$ C の冷凍庫に保存した. この fosmid clone の平均挿入 DNA の長さは約 40kb である. これは, ゴリラのゲノムの約 3.5 倍に相当する量である. さらに, PCR 法による Screening を行うために, 各 384 well plate の clone を pool して, プラスミド自動分離装置で精製した. この pool DNA から, PCR 法による Screening で, ゴリラの Hox クラスター A 領域の 5 つの fosmid clone を Screening し, 現在 Shotgun sequencing を行っている. 他にもゴリラフォスミドライブラリーからは, ABO 式血液の領域などいくつかの clone を見いだすことができた.

(3) 野生チンパンジーの mtDNA 解析: 嶋田 誠, 野秋好美, 早川祥子¹, 杉山幸丸², 斎藤成也
(¹ 京都大学霊長類研究所 ² 東海学園大学)

1976 年より京都大学霊長類研究所により観察されてきたギニア共和国のボッソウ村のチンパンジー集団は, 観察開始当初より, 限られた範囲 (約 10 平方 km) を少数個体 (約 20 頭) の群れで遊動している. 近年生息地周辺

の開発により、近隣の群れとの移動が困難になり、同時に、近隣群の消息が途絶えるようになり、孤立が危惧されている。また、一般にチンパンジー集団ではメスが出生群から他群へ移籍しオスが出生群に残るが、ボツソウの群れでは、観察当初よりメスの移入は観察されず、オスメスともに一定の年齢に達すると出生群から姿を消している。ボツソウ群におけるこの移出入パターンが本来のものであるか観察開始時から行われているのかを調べるために、ミトコンドリア DNA のハプロタイプを体毛・糞・尿試料を用いて検出した。その結果、ハプロタイプ数の減少は観察されず、現在の移出入パターンは最近変化したものであると推定された。また近隣群からも同様に試料を集めて解析したところ、群れ間で共有しているハプロタイプは少なかったが、国際塩基配列データベース上の配列と併せた解析により、現在行き来できない生息地間でも、近年まで全亜種生息地規模のメスの移動がさかんであったことが示唆された。この研究は日本霊長類学会にて発表した。

(4) 類人猿の mtDNA16S rRNA 領域の多型解析：野田令子，金 衝坤，竹中 修¹，Robert Ferrell²，早坂郁夫³，田上哲也³，植田信太郎⁴，石田貴文⁴，斎藤成也

(¹京都大学霊長類研究所 ²ピッツバーグ大学 ³三和化学研究所熊本霊長類パーク ⁴東京大学理学系生物科学専攻)

ヒトと近縁な類人猿である、チンパンジー (35)、ボノボ (13)、ゴリラ (10)、オランウータン (16)、テナガザル (23) の遺伝的多様性を調べるため、ミトコンドリア DNA の 16S rRNA 領域の塩基配列約 1.6kb を各種複数個体 (種名のあとのかっこ内の数字が個体数) について決定し、分子進化的解析を行った。塩基多様度はどの種もヒトよりも大きな値を示した。系統樹と系統ネットワークを作成して遺伝子系図を推定したところ、オランウータンはボルネオとスマトラの 2 群に明瞭に分かれた。一方、テナガザルは同種でも単系統群にならない場合があった。この結果は、Journal of Heredity に現在印刷中である。

(5) ブリヤート人集団のミトコンドリア DNA 解析：嶋田誠，金 衝坤，高橋 文，Spitsyn, V.A¹，池尾一穂²，五條堀孝²，斎藤成也

(¹Laboratory of Ecogenetics, Research, Center of Medical Genetics, Russia ²遺伝研, 生命情報・DDBJ 研究センター)

ロシアのバイカル湖沿岸に住む蒙古系民族であるブリヤート人 (Buryats) は、世界各地の蒙古系民族における免疫グロブリン Gm 型の対立遺伝子頻度の研究により、日本人の頻度パターンに最も近いとされた集団である。われわれは、人の中でも比較的遺伝子交流の少ないと考え

られる奥地より 1989 年に行われたブリヤート集団のマクソホン (Mogsohon) 村でサンプリングされた血清サンプルを用いて、ミトコンドリア DNAD ループ領域の塩基配列を決定した。その結果 134 検体で塩基配列が決定できた (DDBJ アクセション番号：AB059865-AB059998)。これらの配列は東ユーラシア人に観察される配列の属するクラスター全般にわたって分布していた。また、それらのうち 2 ハプロタイプは縄文人に観察されたタイプと同一タイプであった。さらに、アジア系のミトコンドリア DNA に比較的多く観察される C 塩基の連続 (いわゆる poly-C 配列) を解読するために Pyrosequencing 法の使用を検討した。その結果 dye terminator 法では poly-C 配列以降ピークが重なり解読不可能であっても、Pyrosequencing 法では配列を得ることができた。これらの結果は日本 DNA 多型学会において発表した。

(6) マウス (*Mus musculus*) 5 亜種における 22 遺伝子座塩基配列の解析：高橋 文，劉 玉華，北野 誉，小出剛¹，城石俊彦¹，森脇和郎²，斎藤成也

(¹遺伝研・哺乳動物遺伝 ²理研・バイオリソースセンター)

マウス (*Mus musculus*) の 5 亜種 (*brevirostris*, *castaneus*, *domesticus*, *molossinus*, *musculus*) に属する近交系マウス 9 系統 (C57BL/10SnJ [B10], BFM/2, BLG2, CAST/Ei, MSM, Pgn2, SWN, HMI, NJL) 及び外群として用いた *Mus spicilegus* 1 系統 (ZBN) の計 10 系統について、22 遺伝子座 (常染色体 20 座, Y 染色体 1 座, ミトコンドリア DNA 1 座) の塩基配列の系統及び遺伝学的解析を行った。調べた常染色体 20 座のうち、いくつかの遺伝子について種間、亜種間で遺伝子交流の痕跡が示唆された。ただし過半数の遺伝子座は種内亜種間で期待されるパターンを示し、全体では従来の見解と一致する系統関係が見られた。また、各遺伝子座周辺の遺伝領域について、組み換え率と遺伝的変異の大きさに正の相関が見られた。この現象について亜種を種内の部分集団とみなして解析を進めたところ、各座位における部分集団間の相対的な遺伝的変異の大きさと組み換え率との間に負の相関が見られ、種内部分集団における自然選択の影響が検出された。この研究成果は、第 3 回日本進化学会および国際シンポジウム Evolutionary Genomics において発表した。

(7) エネルギー代謝系を構成するタンパク質の分子進化：富木 毅，鈴木博実¹，斎藤成也

(¹明治大学農学部農芸化学科)

生物が活動するためには、エネルギーが必要である。そのエネルギーの獲得過程は、大きく分けると基質レベルのリン酸化と電子伝達の 2 種類に分けられる。このうち、電子伝達に分類されるものとしては呼吸と光合成があるが、これらは反応形態、反応に用いられる物質において共通部分が多い。よって、呼吸を行う系と光合成系

は共通起源であることが考えられている。しかし、まだこれらの系において分子系統学的な解析は十分に行なわれていなかったため、われわれはこれらの系を構成しているタンパク質の分子系統学的解析を試みた。系統樹作成には NJML + 法 (Ota and Li, 2001) を用いた。解析の結果から、以下のことが分かった。(1) 呼吸を行う系を構成している formate dehydrogenase, polysulfide reductase, thiosulfatereductase, respiratory nitrate reductase, dimethyl sulfoxide reductase がオペロン単位で進化している。(2) 3 量体であった酵素が単量体の酵素 (dimethyl sulfoxide reductase, biotin sulfoxide reductase, trimethylamine-N-oxide reductase) に進化している。(3) シアノバクテリアが生じた後に NADH-plastoquinone oxidoreductase と photosystem I iron-sulfurcenter が分岐した。この研究成果は、第 3 回日本進化学会および国際シンポジウム Evolutionary Genomics において発表した。

研究業績

(1) 原著論文

1. Yuasa I., Umetsu K., Ago K., Sun C.-S., Pan I.-H., Ishida T., Saitou N., and Horai S.: Population genetic studies on nine aboriginal ethnic groups of Taiwan. II. Serum protein systems. *Anthropological Science*, **109**, 257-273, 2001.
2. Umetsu K., Tanaka M., Yuasa I., Saitou N., Naito E., Ago K., Nakayashiki N., Miyoshi A., Kashimura S., Watanabe G., and Osawa M.: Multiplex amplified product length polymorphism analysis to rapidly detect human mitochondrial DNA variations. *Electrophoresis*, **22**, 3533-3538, 2001.
3. Yamamoto M., Lin X.-H., Kominato Y., Hata Y., Noda R., Saitou N., and Yamamoto F.: Murine equivalent of the human histo-blood group ABO gene is a cis-AB gene and encodes a glycosyltransferase with both A and B transferase activity. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 13701-13708, 2001.
4. Osawa M., Yuasa I., Kitano T., Heinke J., Kaneko M., Saitou N., and Umetsu K.: Haplotype analysis of human alpha2-HS glycoprotein (fetuin). *Annals of Human Genetics*, **65**, 27-34, 2001.
5. Sanders Alan R., Qiuhe Cao, Jennifer Taylor, Tamara E. Levin, Judith A. Badner, Anibal Cravchik, Josep M. Comeron, Saitou N., Amado Del Rosario, Debra A. Salvi, Katherine A. Walczyk, Lynn R. Goldin, Bryan J. Mowry, Douglas F. Levinson, Raymond R. Crowe, Jeremy M.: Silverman, and Pablo V. Gejman Genetic diversity of the human serotonin receptor 1B (HTR1B) gene. *Genomics*, **72**, 1-14, 2001.

6. Misu S., Iizuka T., Kawanishi Y., Fukami K., and Saitou N.: CAMUS DB for amino acid sequence data. *Genome Informatics* **2001**, 502-503, 2001.

7. Kim, C.-G., Su, Z.-H., Tominaga, O., and Osawa, S.: On *Leptocarabus kyushuensis* from Shimabara Peninsula, Nagasaki Prefecture, Japan (Coleoptera, Carabidae).

SUKUNAHIKONA, Special Publication of the Japan Coleopterological Society, **1**, 41-44, 2001.

8. Takahashi A., Tsaur S.-C., Coyne J.A., and Wu C.-I.: The nucleotide changes governing cuticular hydrocarbon variation and their evolution in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 3920-3925, 2001.

9. Ting C.-T., Takahashi A., and Wu C.-I.: Genetics of incipient speciation in *Drosophila*: concurrent evolution at multiple loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 6709-6713, 2001.

(2) その他

1. 斎藤成也: 霊長類ゲノムの比較解析. 蛋白質核酸酵素, **46**, 2481-2485, 2001
2. 斎藤成也: ルーツを明かす DNA の世界. NHK スペシャル「日本人」プロジェクト編『日本人はるかなる旅』, マンモスハンター, シベリアからの旅立ち, **1**, 133-147, 2001. NHK 出版.
3. 斎藤成也: 配列から遺伝子の進化を探る. 蛋白質核酸酵素, **46**, 1410-1413, 2001.
4. 斎藤成也: ヒトにいたるゲノム進化. 榊 佳之・小原雄治編『ゲノムから個体へ』, 180-192, 2001. 中山書店.
5. 斎藤成也: ヒトと類人猿のゲノム比較から人間の独自性を探る. 「特集: ゲノム研究から見た 21 世紀の生命科学」. 細胞工学, **20**, 65-69, 2001.
6. Saitou N.: Trees. Encyclopedia of Genetics, pp. 2042-2045. Academic Press, London, 2001.
7. Saitou N.: Binomial distribution. Encyclopedia of Genetics, 215-216. Academic Press, London, 2001.
8. 嶋田 誠: 野生動物なのに首輪. JANES ニュースレター, **10**, 27, 2001.
9. 嶋田 誠: 動物園と研究所・協力の果実—ドイツ・Wofgang Kehler 霊長類研究センター見学報告. モンキー, **3-6**, 2001.

(3) 招待講演

1. 斎藤成也: DNA から生物進化を遡る. 頭頸部外科学会ランチョンセミナー, パシフィコ横浜, 横浜, 1 月 27 日.
2. 斎藤成也: 35 億年の夢を追い求めて～遺伝子の研究が人類の未来へ贈るもの～. 三島異業種交流会主催講演

会。三島プラザホテル, 三島, 3月8日。

3. Saitou N. Ape Genome Project Silver. GEMINI (Genes and Minds Initiative) Workshop on Ape Genomics. Hotel Inter-Continental Tokyo Bay, Tokyo, Japan, March 14-15.

4. Choong-gon Kim, Takashi Kitano, Asao Fujiyama, Ikuo Hayakawa, Yuji Kohara, and Naruya Saitou: Comparison of Hox A Cluster Sequences among Human, Chimpanzee, Gorilla, and Orangutan. GEMINI (Genes and Minds Initiative) Workshop on Ape Genomics. Hotel Inter-Continental Tokyo Bay, Tokyo, Japan, March 14-15.

5. Saitou N. Comparative genome analysis of apes and human. American Genetic Association Annual Meeting, San Diego, USA, May 19-20.

6. 嶋田 誠: 野生 savanna monkey における集団遺伝学的研究。第55回日本人類学会大会・第17回日本霊長類学会大会連合大会, シンポジウム7: ヒトを含む霊長類における DNA 多型。国立京都国際会館, 京都, 7月12-15日。

7. 斎藤成也: ゲノム情報生命学。第11回遺伝医学セミナー。仙台, 9月15日。

8. 斎藤成也: 霊長類ゲノム GEMINI プロジェクト。第210回 CBI 研究講演会: 「CIB・DDBJ のゲノムへの取り組み」。国立遺伝学研究所, 三島, 9月20日。

9. Saitou N. Genetic affinity of human populations in East Eurasia. Symposium "Evolution, Genetics, Ecology And Biodiversity", Vladivostok, Russia, September 28-30.

10. 斎藤成也: ゲノムから立ち昇る生命。「禅と生命科学」公開講演会。花園大学, 京都, 10月13日。

11. 斎藤成也: 環境の変化と人間の進化。日本大学市民公開講座, 三島市文化会館, 10月17日。

12. 斎藤成也: 糖転移酵素遺伝子群の分子進化的解析。日本生化学会年会シンポジウム「C. elegans に展開する生命科学研究<ゲノム・プロテオーム・グライコーム>」, 国立京都国際会館, 京都, 10月26日。

13. Saitou N. Evolutionary genomics of humans and apes. Symposium on Evolutionary Genomics, Atami Korakuen Hotel, Atami, Japan, November 4-6.

14. Saitou N. Comparison of Hox A Gene Cluster in Humans and Apes. LOH Symposium on "Explaining Humans", Salk Institute for Biological Sciences, La Jolla, California, USA, November 16-18.

15. 斎藤成也: ヒトと類人猿の比較ゲノム解析からヒト独自性を探る。第24回日本分子生物学会年会シンポジウム「種形成と生物多様性の分子機構」。パシフィコ横浜, 横浜, 12月11日。

16. 高橋 文, Chung-I Wu: キイロシヨウジョウバエ

初期種分化の分子遺伝学的機構。第24回日本分子生物学会年会シンポジウム「種形成と生物多様性の分子機構」。パシフィコ横浜, 横浜, 12月11日。

17. Shimada, MK.: Ape genome project Silver and wild chimpanzee mitochondrial DNA study. URA-CNRS, Universite Paris-Sud, Orsay, France, December 14.

(4) 発表講演

1. 高橋 文, 斎藤成也: 塩基配列データに基づく核遺伝子20座位の遺伝子系図。基盤研究(B) 森脇班班会議, 総合大学院大学, 葉山, 1月19日。

2. 斎藤成也: 古代DNAデータベースの構築。「DNA考古学」研究会。国際日本文化研究センター, 京都, 2月5-6日。

3. 斎藤成也: 類人猿ゲノムデータはヒトゲノム多様性研究へどのように貢献できるのか。「ヒトゲノム多様性」研究会。国立遺伝学研究所, 2月23日。

4. Saitou N. Ape Genome Project "Silver" - A comparison of closely related species. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Genome Sequencing and Biology. Cold Spring Harbor, USA, May 10-14.

5. Choong-gon Kim, Takashi Kitano, Asao Fujiyama, Ikuo Hayakawa, Yuji Kohara, and Naruya Saitou: Comparison of Hox A Cluster Sequences among Human, Chimpanzee, Gorilla, and Orangutan. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Genome Sequencing and Biology. Cold Spring Harbor, USA, May 10-14.

6. 斎藤成也, 金 衝坤, 北野 誉, 嶋田 誠, 野田 令子, 高橋 文, 富木 毅, Kirill Kyukov: 類人猿とヒトの比較ゲノム解析。第55回日本人類学会大会・第17回日本霊長類学会大会連合大会。国立京都国際会館, 京都, 7月12-15日。

7. 嶋田 誠, 早川祥子, 斎藤成也, 杉山幸丸: チンパンジー野生集団および飼育個体におけるミトコンドリア DNA D-loop 変異。第55回日本人類学会大会・第17回日本霊長類学会大会連合大会。国立京都国際会館, 京都, 7月12-15日。

8. 斎藤成也: ヒトと類人猿の比較ゲノム解析。特定研究Cゲノム4領域合同班会議。神戸, 8月24日。

9. 斎藤成也, Kirill Krukov: 塩基配列の系統ネットワーク。日本遺伝学会第73回大会。お茶の水女子大学, 東京, 9月22-24日。

10. 金 衝坤, 高橋 文, 嶋田 誠, 藤山秋佐夫, 小原雄治, 早坂郁夫, 斎藤成也: 類人猿 HoxA cluster の比較ゲノム研究。日本遺伝学会第73回大会。お茶の水女子大学, 東京, 9月22-24日。

11. 嶋田 誠, 早川祥子, 杉山幸丸, 篠田謙一, 早坂郁夫, 斎藤成也: チンパンジーのミトコンドリア DNA 多型

解析. 日本遺伝学会第73回大会. お茶の水女子大学, 東京, 9月22-24日.

12. 野田令子, 竹中 修, Robert E. Ferrell, 早坂郁夫, 田上哲也, 齋藤成也: 霊長類における ABO 式血液型遺伝子の進化. 遺伝学会第73回大会, お茶の水女子大学, 東京, 9月22-24日.

13. 高橋 文, Shun-Chern Tsaur, Jerry Coyne, Chung-I Wu: キイロシヨウジョウバエにおけるクチクラ炭化水素多型の分子機構とその進化. 遺伝学会第73回大会, お茶の水女子大学, 東京, 9月22日.

14. 齋藤成也, 小平順子, 植田信太郎, 佐藤大輔: 古代 DNA データベース AGE の構築. 日本進化学会第3回大会. 京都大学, 京都, 10月6-8日.

15. 金 衝坤, 嶋田 誠, 高橋 文, 藤山秋佐夫, 小原雄治, 早坂郁夫, 齋藤成也: 類人猿ゲノム計画 Silver: HoxA cluster の解析と鮭ら fosmid library の作成. 日本進化学会第3回大会. 京都大学, 京都, 10月6-8日.

16. 嶋田 誠, 金 衝坤, 齋藤成也: ゲノム配列比較によるヒト上科における転座部位の解析. 日本進化学会第3回大会. 京都大学, 京都, 10月6-8日.

17. 野田令子, 竹中 修, 齋藤成也: 旧世界猿マカクおよびヒトにおける ABO 式血液型遺伝子の進化. 日本進化学会第3回大会. 京都大学, 京都, 10月6-8日.

18. 高橋 文, 劉 玉華, 北野 誉, 小出 剛, 城石俊彦, 森脇和郎, 齋藤成也: マウス (*Mus musculus*) 5 亜種における 22 遺伝子座塩基配列の解析. 日本進化学会第3回大会, 京都大学, 京都, 10月6-8日.

19. 富木 毅, 齋藤成也, 鈴木博実: エネルギー代謝に関与する蛋白質の分子系統学的解析. 日本進化学会第3回大会. 京都大学, 京都, 10月6-8日.

20. Aya Takahashi, Shun-Chern Tsaur, Jerry A. Coyne, and Chung-I Wu: Genetics of incipient speciation in *Drosophila melanogaster*: QTN identified for cuticular hydrocarbon variation. 個体群生態学会シンポジウム, ホテル樹林, 蔵王温泉, 10月26日.

21. Choong-gon Kim, Makoto Shimada, Aya Takahashi, Asao Fujiyama, Ikuo Hayasaka, Yuji Kohara, Naruya Saitou: Comparison of Hox A cluster sequences among human, chimpanzee, gorilla, orangutan, and baboon. Symposium on Evolutionary Genomics. Atami Korakuen Hotel, Atami, Japan, November 4-6.

22. Shimada, MK., Kim C-G., Saitou, N.: Evolutionary analysis of translocational region in hominoid chromosome using genome sequencing comparison., Symposium on Evolutionary Genomics. Atami Korakuen Hotel, Atami, Japan, November 4-6.

23. Aya Takahashi, Yu-Hua Liu, Takashi Kitano, Tsuyoshi Koide, Toshihiko Shiroishi, Kazuo Moriwaki,

Naruya Saitou: Genealogies and molecular evolution of the 21 nuclear genes in *Mus musculus*: Natural selection detected in a subdivided population. Symposium on Evolutionary Genomics. Atami Korakuen Hotel, Atami, Japan, November 4-6.

24. Takeshi Tomiki, Naruya Saitou, Hiromi Suzuki.: Molecular phylogenetic analysis of proteins associated in energy metabolism. Symposium on Evolutionary Genomics. Atami Korakuen Hotel, Atami, Japan, November 4-6.

25. 嶋田 誠, 早川祥子, 齋藤成也, 杉山幸丸: Pan 属のミトコンドリア DNA 多型: 野生集団における遺伝子交流と飼育個体を加えた比較. 2001 年林原フォーラム/第4回 SAGA 国際シンポジウム. 岡山, 11月15-17日.

26. 嶋田 誠, 金 衝坤, 高橋 文, Spitsyn, V.A., 池尾一穂, 五條堀孝, 齋藤成也: ロシア・ブリヤート人集団におけるミトコンドリア DNA 多型, 日本 DNA 多型学会第10回学術集会. 岡山, 11月29-30日.

27. Misu S., Iizuka T., Kawanishi Y., Fukami K., and Saitou N.: CAMUS DB for amino acid sequence data. Japan Bioinformatics Society Annual Meeting, Ebisu Garden Place, Tokyo, Japan.

D-c. 理論遺伝客員研究部門

1. 近藤 滋

我々の研究室では、動物の形態形成が正確に起きるために必要な位置情報がどのようなメカニズムで自発的に発生するかを、理論(数理解析)と実験を併用して研究している。より具体的には、簡単な化学反応の組み合わせが位置情報(反応拡散波)を発生させることが理論的に証明されており、その「波」の生物における実例の探索と、分子メカニズムの解明を目指している。

実験対象としてはゼブラフィッシュの縞模様、ニワトリの体節形成を扱っている。以下に本年度の進行状況を簡単に記す。

(1) 魚の皮膚で見つかった反応拡散波の分子的細胞学的な実体を捕らえる。

波形成の場がどのようなものであるのかを正確に知るために、ゼブラフィッシュの皮膚の顕微鏡、電子顕微鏡レベルの観察を引き続き行っている。波形成の場であると考えられる真皮層にある細胞種の同定、それぞれの細胞の存在様式が皮膚模様とどのように関連しているかについての精密な記述を終えた。また、真皮内の各層に、未成熟色素細胞を移植する実験で、どの層に位置情報があるかを正確に知ることができた。

(2) 脊椎動物の体節形成のための位置情報が、反応拡散

波であることを証明する。

ニワトリの体節に物理的な伸張を行うと、長い体節ができるだけでなく、正常の長さの体節が数多くできるという「波」のような性質を持つことを、去年発見した。その後、増加した体節が正しい構造をもつことを、組織切片及び in situ hybri によって確認することができた。また、同様の結果をゼブラフィッシュについても行い、体節形成の位置情報が反応拡散波であることの傍証を一つ加えることができた。

研究業績

(1) 原著論文

1. 近藤 滋：複雑な生命現象理解のためのシミュレーション利用、たんぱく質核酸酵素, 46, 2461-2467, 2001.
2. 遺伝子制御と形態形成, 数理科学, 39, 44 ~ 47, 2001.

(2) 発表講演

1. 国際発生学会でシンポジウム "pattern formation: theories and experiments" をオーガナイズし、発表 (reaction diffusion system: a chemical basis of morphogenesis) を行いました, 京都, 7月9日.
2. 国際分節会議で講演 タイトル reaction-diffusion wave determines the position of segmentation, 奈良, 7月12日.
3. 細胞生物学会シンポジウムで講演 タイトル 発生の位置情報と反応拡散波, 岐阜, 5月24日.

2. 高木利久

(1) シグナル伝達に関するオントロジーとデータベースの開発

高井貴子¹, 高木利久¹(東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター)

生き物の成長や行動を制御する身体のなかの仕組みとして、シグナル伝達がある。シグナル伝達の仕組みは何千もの分子の協調した働きから成り立っているため、その全体の姿は、計算機にデータベースとして格納して初めてとらえることが可能になる。我々は、シグナル伝達のデータベース化とシミュレーションを目指して、シグナル伝達に関する概念や知識の枠組みを整理したシグナルオントロジーを開発した。また、このシグナルオントロジーを利用してシグナルデータベースを構築中である。このオントロジーとデータベースの詳細については、<http://ontology.ims.u-tokyo.ac.jp/>を参照されたい。

(2) シグナル伝達に関する知識の表現と推論

福田賢一郎¹, 高木利久¹(産業技術総合研究所 生命情報科学研究センター)

生体内のメカニズムを制御するネットワークの解明に大きな期待がよせられている。細胞システムは非常に複

雑であるため、研究を進展させるためには既に分かっている知識を有効に活用することが不可欠である。しかしこれらの知識はDNA配列の情報とは異なり言葉や図として表現されており計算機では扱づらい。本研究ではこの問題を解決するために、人間と計算機にとって記述が容易でかつ理解しやすい表現手法を開発した。具体的には、シグナル伝達に関する知識を複合グラフを用いて表現する手法を開発した。この表現方法を用いることにより、断片的、階層的、不完全な知識を自然に記述できる。また、人工知能で使われる推論手法を用いて生物学者の思考過程をモデル化して生体内ネットワークのデータベースに適用することによって、このようなネットワーク間の関わり方の解明を支援する手法を開発した。

研究業績

(1) 原著論文

1. Fukuda, K. and Takagi, T.: Knowledge representation of signal transduction pathways. *Bioinformatics*. 17, 829-837, 2001.
2. Fukuda, K. and Takagi, T.: Signal transduction pathways and logical inferences. The 2001 International Conference on Mathematics and Engineering (METMBS2001). 297-303, 2001.
3. Ono, T., Hishigaki, H., Tanigami, A., and Takagi, T.: Automated extraction of information on protein-protein interactions from the biological literature. *Bioinformatics*. 17, 155-161, 2001.
4. Hishigaki, H., Nakai, K., Ono, T., Tanigami, A., and Takagi, T.: Assessment of prediction accuracy of protein function from protein-protein interaction data. *Yeast*. 18, 523-531, 2001.

(2) その他

1. 高木利久：ゲノム情報科学の目指すもの, 数理科学 458, 5-7, 2001.
2. 高木利久：テキストからの情報抽出と辞書構築・機能データベースとオントロジーの構築に向けて, 榊・小原・大木・金久・高木・菅野・小笠原編, ゲノムサイエンスの新たなる挑戦. 蛋白質核酸酵素増刊号. 46, 2526-2531, 2001.
3. 小笠原理, 高木利久：SNPs データベース, 高木利久編 ゲノム医科学と基礎からのバイオインフォマティクス. 実験医学増刊号 19, 1322-1328, 2001.
4. 高井貴子, 高木利久：生命科学のためのオントロジー, 高木利久編 ゲノム医科学と基礎からのバイオインフォマティクス. 実験医学増刊号 19, 1337-1343, 2001.

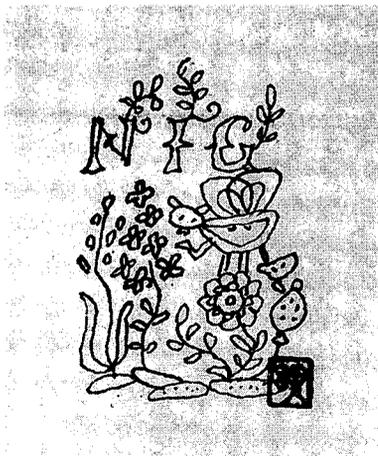
50年前には遺伝研年報第2号が発行され、1951年の活動が報告されている。

巻頭言では、遺伝研の目的として、民族の優良形質の遺伝と食料をはじめとする生物資源の問題があげられている。遺伝学において、生物遺伝資源は現在でも重要だが、その内容は育種的性格の強い当時とは根本的に変わっている。また、優生学 (eugenics) を看板に掲げたりするなど、時代の違いを感じる。(無署名、当時の小熊捍所長が執筆したとは限らない。)

この年には研究部門が3つあり、田中義麿、小熊捍、駒井卓ら8人の室長、8人の研究員、10人の補助員、計26人の陣容である。ちなみに研究部門には現在の様に「分子」「細胞」「個体」等、内容を特定する言葉はついておらず、単に研究第1部、第2部、……と呼ばれていた。研究室の名前も、室長の名を取って、小熊研究室、駒井研究室、等とストレートである。

木村資生の名は、研究第2部小熊研究室の研究員として見られる。京都大学の木原均のもとで植物の染色体研究を行っていた木村は、遺伝研の客員教官だった木原の紹介で1949年11月に遺伝研に入所し、集団遺伝学の理論的研究を開始している。独学でライトの論文「メンデル集団の進化」を勉強していたそうだが、非常に精力的な活動をしており、年報の研究紹介全52ページ中、11ページが木村の研究概要説明に当てられている。木村は「科学」に総説を書いたり、「数理集団遺伝学」(培風館)を分担執筆するなど、当時からかなり注目されていたことが伺える。

1951年1年間での遺伝研での研究セミナーは8回で、所内研究者による研究報告が6回、外国人研究者によるセミナーが2回である。2001年の110回(所内者56人、所外者77人)に比べて格段に少ない。しかし、ノーベル賞受賞者のJ. Muller博士が来訪し、研究室を訪問して議論するなど、研究者間の交流が活発なのは現在と変わらないようである。



図：遺伝研年報第2号表紙を飾った川島理一郎画伯によるイラスト
当時の遺伝研で使われていた「モデル生物」がシンボライズされている。

E. 総合遺伝研究系

E-a. 人類遺伝研究部門

この部門では、ヒトの進化、ヒトの正常・異常の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す現象、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、同じく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・ワヒューブルボワシト（九大大学院生）、研究生・熊木健治、加藤 謙、技術課職員・古海弘康、研究支援者・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、ヒトゲノムを特徴づけるゲノム構造の取得を目的とした、比較ゲノム研究を実施した。

本年度の研究は、遺伝学研究所校費、総研大校費のほか、科学研究費基盤研究(A) (佐々木)、特定領域研究(C) (佐々木)、奨励研究(A) (佐渡)、特別研究員奨励費(石原)、文部科学省革新的技術開発研究推進費補助金(佐々木)、持田記念医学薬学振興財団研究助成金(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) (代表者・久保田健夫・国立精神神経センター)、同じく(代表者・松田洋一・北大教授) (佐々木)、および総研大共同研究(代表者・森茂美・生理研教授) (佐々

木)に参加した。

(1) ゲノムインプリンティングドメインの構造解析：佐々木裕之、白水久男、横峯孝昭、須田知賀子、ワヒューブルボワシト¹、向井常博²、豊田 敦³、服部正平³、榊 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。この特徴はインプリンティングの機構や進化を知る上で重要なヒントになると思われる。当部門では、12個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 (1Mb)、およびこれに対応するニワトリのゲノム領域 (0.3Mb) の全塩基配列を明らかにした (投稿準備中)。ニワトリにはゲノムインプリンティングはないと思われることから (下記参照)、配列比較によりインプリント調節領域を浮き彫りにできると期待される。同領域はヒトの 11p15.5 領域に相当し、Beckwith-Wiedemann 症候群や各種小児がんの責任領域であることから、これらの疾患の解明に寄与することも期待される。

(2) マウス *Igf2/H19* のインプリンティング制御機構：佐々木裕之、石原 宏、古海弘康、加藤 謙、Wolf Reik¹ ('BBSRC, UK)

上記のマウスのインプリンティングドメインのセントロメア端には *Igf2*, *H19* 両遺伝子があり、それらは共通なエンハンサーを奪い合うことによりインプリンティングされている。まず、これらの遺伝子の発生過程における発現やメチル化の変化を調べ、その結果を報告した (論文 2, 4, 8)。さらに、これらの遺伝子のセントロメア側にある遺伝子 *L23mrp* や *Tnnt3* がインプリンティングを受けず、このエンハンサーの影響も受けないことから、*H19* と *L23mrp* の間にドメインの境界があると考え、境界を決める配列を探した。その結果、進化的に保存された CTCF 結合部位が存在し、この配列がインスレーター活性を示すことを見つけた (投稿中)。最後に、*H19* と *L23mrp* の間に切断点をもつ転座マウスを解析し、切断点付近のエンハンサーの組織特異性を調べた (論文 9)。

(3) *de novo* 型 DNA メチル化酵素 *Dnmt3a/Dnmt3b* の機能解析と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た。その結果、雄のプロ精原細胞、雌の成長期卵細胞において *Dnmt3b* と特定の *Dnmt3a* のアイソフォームが存在することを見つけた (投稿準備中)。また、これら *de novo* 型 DNA メチル化酵素の酵素学的性質を明らかにした (論文 6)。

(4) DNAメチル化、インプリンティングとヒト疾患：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1）。また，国内の ICF (immunodeficiency, centromeric instability, facial anomalies) 症候群2家系を解析し，原因遺伝子 *DNMT3B* のコード領域内に新規の変異を同定した（投稿中）。さらに，ヒト14番染色体上にインプリンティング遺伝子が存在し，この領域の父性ダイソミーを来すと，胸郭形成異常を主徴とする先天奇形症候群が生じることを明らかにした（論文7）。

(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5）。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見つけた。さらに，ニワトリのDNAメチル化酵素 *DNMT3A / DNMT3B* 遺伝子を単離し，哺乳類の相同遺伝子と機能の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) 未知の遺伝子の解析を可能とする次世代DNAチップ開発：佐々木裕之，白水久男，水野晋一¹，飯野忠史¹，小澤秀俊¹，大塚輝久¹（¹九大・医），田代康介²（²九大・農），五條堀孝

従来とは異なる方法で遺伝子発現プロファイルを調べるシステムの開発をめざして，九大と共同で研究を開始した。

(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（論文3）。

(8) X染色体不活性化における *Dnmt3a*, *Dnmt3b* の役割：佐渡 敬，岡野正樹¹，En Li¹，佐々木裕之（¹CVRC, MGH, USA）

一般に，DNAのメチル化はX染色体不活性化の開始のプロセスではなく維持に需要であると考えられている。その一方で，不活性化の開始に必須な *Xist* の発現は，メチル化によって制御されることが知られている。そこで，*Xist* のメチル化を担うと考えられる *Dnmt3a*, *Dnmt3b* の不活性化における役割を検討するために，これら *Dnmts* 欠損ES細胞における *Xist* の発現とその影響の解析を進めている。

(9) ヒトゲノムを特徴づける構造情報取得を目的とした比較ゲノム解析：藤山秋佐夫，黒木陽子¹，石田貴文²，Svante Paabo³，菅野純夫⁴（¹理化学研究所ゲノム科学総合研究センター，²東京大学大学院理学研究科，³Max-Planck Institute, ⁴東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター）

霊長類ゲノムと比較し，ヒトのゲノム構造上での差異を明らかにすることが本研究の第一目標である。比較は染色体レベル，地図レベル，遺伝子レベル，配列レベルへと，相互に関係を持たせながら系統的，階層的に進めている。比較対象とするのは，チンパンジーを中心に，ゴリラ，オランウータン，カニクイザル，アフリカミドリザル，クロオナガザル，ワオキツネザルの計7種である。比較手法として，染色体レベルではフローカリオタイプングとFISH，地図レベルではSTSマッピング，以下，クローニングとシーケンシングを行った。また，このための研究資料整備として，培養細胞株の蒐集，BACライブラリの作成，cDNAライブラリの作成，スクリーニングシステムの構築を関連研究グループと共同で進めている。

本年度の成果として，1) チンパンジーのフローカリオタイプを，ほぼ確定。2) チンパンジーの1系統についてBACライブラリの作成と配布。7月現在で2.4x。3) 上記のBAC全体とRPCI-43ライブラリの一部について末端配列を決定。4) チンパンジー大脳，小脳cDNAライブラリの作成とスクリーニングシステム化。5) 性染色体を含むヒトの10染色体から選択した3600箇所のSTSについて，霊長類間の比較を行った。Human(+)/Chimp(-)，human only等の各種の組み合わせでデータベース検索を行い，STSレベルでのデータ収集を継続的に行っている。

研究業績

(1) 原著論文

1. Mizuno, S., Chijiwa, T., Okamura, T., Akashi, K., Fukumaki, Y., Niho, Y. & Sasaki, H.: Expression of DNA methyltransferases *DNMT1*, *3A* and *3B* in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. *Blood* **97**, 1172-1179, 2001.
2. Ohno, M., Aoki, N. & 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* **6**, 249-259, 2001.
3. Sado, T., Wang, Z., Sasaki, H. & Li, E.: Regulation of imprinted X-chromosome inactivation in mice by *Tsix*. *Development* **128**, 1275-1286, 2001.
4. Hamatani, T., Sasaki, H., Ishihara, K., Hida, N., Maruyama, T., Yoshimura, Y., Hata, J. & Umezawa, A.: Epigenetic mark sequence of the *H19* gene in human sperm. *Biochim. Biophys. Acta* **1518**, 137-144, 2001.
5. Yokomine, T., Kuroiwa, A., Tanaka, K., Tsudzuki, M., Matsuda, Y. & Sasaki, H.: Sequence polymorphisms, allelic expression status and chromosomal locations of the chicken *IGF2* and *MPR1* genes. *Cytogenet. Cell Genet.* **93**, 109-113, 2001.
6. Aoki, A., Suetake, I., Miyagawa, J., Fujio, T., Chijiwa, T., Sasaki, H. & Tajima, S.: Enzymatic properties of *de novo*-type mouse DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucl. Acids Res.* **29**, 3506-3512, 2001.
7. 1. Takebayashi, S., Nakao, M., Fujita, N., Sado, T., Tanaka, M., Taguchi, H. & Okumura, K.: 5-Aza-2-deoxycytidine induces histone hyperacetylation of mouse centromeric heterochromatin by a mechanism independent of DNA demethylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **288**, 921-926, 2001.
8. Kurosawa, K., Sasaki, H., Sato, Y., Yamanaka, M., Shimizu, M., Ito, Y., Okuyama, T., Matsuo, M., Imaizumi, K., Kuroki, Y. & Nishimura, G.: Paternal UPD14 is responsible for a distinctive malformation complex. *Am. J. Med. Genet.*, in press.
9. Sotomaru, Y., Katsuzawa, Y., Hatada, I., Obata, Y., Sasaki, H. & Kono, T.: Upregulated expression of the imprinted genes *H19* and *Igf2r* in mouse uniparental fetuses. *J. Biol. Chem.*, in press.
10. Davies, K., Bowden, L., Smith, P., Dean, W., Hill, D., Furuumi, H., Sasaki, H., Cattanch, B. & Reik, W.: Disruption of mesodermal enhancers for *Igf2* in the minute mutant. *Development*, in press.
11. 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.
12. The International Human Genome Consortium including A. Fujiyama and 55 authors: A physical map of the human genome. *Nature* **409**, 934-941, 2001.
 13. Bruls, T., Gyapay, G., Petit, J.-L., Artiguenave, F., Vico, V., Qin, S., Tin-Wollam, A.M., Da Silva, C., Muselet, D., Mavel, D., Pelletier, E., Levy, M., Fujiyama, A., Matsuda, F., Wilson, R., Rowen, L., Hood, L., Weissenbach, J., Saurin, W. & Heilig, R.: A clone map of human chromosome 14. *Nature* **409**, 947-948, 2001.
 14. Graf, D., Timmons, P.M., Hitchins, M., Episkopou, V., Moore, G., Ito, T., Fujiyama, A., Fisher, A.G. & Merckenschlager, M.: Evolutionary conservation, developmental expression and genomic mapping of mammalian Twisted gastrulation. *Mammalian Genomics* **12**, 554-560, 2001.
 15. Fujiyama, A., Watanabe, H., Toyoda, A., Taylor, T.D., Itoh, T., Yaspo, M.-L., Lehrach, H., Chen, Z., Fu, G., Park, H.-S., Saitou, N., Tsai, S.-F., Osoegawa, K., de Jong, P.J., Suto, Y., Hattori, M. & Sakaki, Y.: Construction and analysis of a human-chimpanzee comparative clone map. *Science* **295**, 131-134, 2002.

(2) その他

1. 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」, 「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) 14.
2. 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* **20**, 351-355, 2001.
3. 佐々木裕之：ゲノムインプリンティング領域と関連疾患へのゲノムからのアプローチ. 蛋白質・核酸・酵素 (増刊号)ゲノムサイエンスの新たな挑戦, **46**, 2342-2345, 2001.
4. 佐々木裕之：エピジェネティクス：ゲノム修飾による哺乳動物発生の調節機構. *医学のあゆみ* **199**, 841-845, 2001.

(3) 発表講演

1. Sasaki, H.: The Mechanisms of *IGF2/H19* imprinting: DNA methylation, chromatin and long-distance gene regulation. Genomic Imprinting Workshop in Japan: Cancer and Genetic Disorder, Osaka, January.
2. 佐々木裕之：ほ乳類に特有な遺伝現象「ゲノム刷り込み」の機構と進化. 総研大共同研究第2回研究発表会：人間理解の科学的基礎：脳活動の物質のおよび非物質的側面, 三島, 1月.

3. Sasaki, H.: Mechanisms of mammalian genomic imprinting: DNA methylation, chromatin and long-distance gene regulation. SOKEN-DAI The 6th International Symposium on Genome Science in the 21st Century: Information of the Higher-Order Structure beyond the Primary Structure, Hayama, March.
4. 佐々木裕之: 生殖細胞におけるゲノムインプリンティング獲得機構. 岡崎基礎生物学研究所研究会: 生殖と性分化, 岡崎, 3月.
5. 佐渡 敬: X染色体不活性化における *Tsix* の役割. 国立遺伝学研究所研究集会: DNAメチル化依存性のエピジェネティクス, 三島, 3月.
6. Fujiyama, A., Watanabe, H. et al. Genome-wide Scanning of Human STSs in Genomes of Primates. Cold Spring Harbor meeting on "Genome Sequencing & Biology", Cold Spring Harbor, May.
7. 佐々木裕之: DNAメチル化とクロマチンによるゲノムインプリンティング制御機構. 第54回日本細胞生物学会: ワークショップ「ヘテロクロマチン-ゲノムと細胞機能をつなぐモジュレーター」, 岐阜, 6月.
8. 酒井康弘, 末武勲, 佐々木裕之, 山科正平, 田嶋正二: 胎生期マウス精巣におけるDNAメチルトランスフェラーゼの発現. 第54回日本細胞生物学会, 岐阜, 6月.
9. 村上千佳子, 宮崎順子, 末武勲, 中村正彦, 佐々木裕之, 田嶋正二: *De novo*型DNAメチルトランスフェラーゼの発現, 精製と性質. 日本蛋白質科学会第1回年会, 大阪, 6月.
10. 辻本直美, 佐々木裕之: 生殖細胞におけるゲノムインプリンティング獲得機構. 大阪大学蛋白質研究所セミナー: 遺伝子発現制御におけるエピジェネティクスの展開, 大阪, 6月.
11. Sasaki, H., Tsujimoto, N., Abe, K., Sakai, Y., Chijiwa, T., Tajima, S. & Li, E.: Methylation imprinting and DNA methyltransferase expression in male germ cell development. Gordon Research Conference on Epigenetics, Plymouth, August.
12. Sado, T., Wang, Z., Sasaki, H. & Li, E.: Regulation of imprinted X-chromosome inactivation in mice by *Tsix*. Gordon Research Conference on Epigenetics, Plymouth, August.
13. Ishihara, K. & Sasaki, H.: Systematic identification of regulatory sequences in the imprinted *Igf2/H19* domain through comparative sequence analysis. Mouse Molecular Genetics Meeting, Heidelberg, August.
14. Tsujimoto, N., Abe, K., Sakai, Y., Chijiwa, T., Tajima, S., Li, E. & Sasaki, H.: Methylation imprinting and DNA methyltransferase expression in male germ cell development. Mouse Molecular Genetics Meeting, Heidelberg, August.
15. Sado, T., Wong, Z., Sasaki, H. & Li, E.: Regulation of imprinted X-chromosome inactivation in mice by *Tsix*. Mouse Molecular Genetics Meeting, Heidelberg, August.
16. 佐渡 敬, 佐々木裕之, En Li: *Xist* 遺伝子座に見出されたアンチセンスRNAの機能. 日本遺伝学会第73回大会, 東京, 9月.
17. 横峯孝昭, 深川竜郎, 佐々木裕之: 鳥類の *de novo* DNAメチル化酵素の同定. 日本遺伝学会第73回大会, 東京, 9月.
18. 佐々木裕之, 辻本直美, 阿部訓也, 千々岩崇仁, 佐渡 敬, 河野友宏, 田嶋正二, En Li. 雌雄生殖細胞におけるDNAメチル化酵素の発現と局在: ゲノムインプリンティング機構との関連について. 日本人類遺伝学会第46回大会, 大宮, 10月.
19. 白水久男, 横峯孝昭, Wahyu Purbowasito, 豊田敦, 加藤玲子, 須田知賀子, 堀 哲也, 水野重樹, 向井常博, 服部正平, 榊佳之, 佐々木裕之: インプリンティングを受ける *IGF2* 遺伝子領域の比較ゲノム学. 日本人類遺伝学会第46回大会, 大宮, 10月.
20. 黒澤健司, 佐藤義朗, 山中美智子, 松尾真理, 今泉 清, 黒木良和, 佐々木裕之, 清水光政, 伊藤裕司, 奥山虎之, 西村 玄: 新しい奇形症候群としての14番染色体父性片親ダイソミー. 日本人類遺伝学会第46回大会, 大宮, 10月.
21. 佐々木裕之: 生殖細胞におけるゲノムインプリント獲得機構. 日本動物学会第72回大会: シンポジウム「生殖細胞の生物学」, 福岡, 10月.
22. 佐渡 敬, 佐々木裕之, En Li: *Tsix* によるX染色体不活性化の制御. 第74回日本生化学会大会: シンポジウム「エピジェネティクス: DNAメチル化とクロマチン」, 京都, 10月.
23. 青木麻子, 末武勲, 藤尾高行, 宮川順一, 千々岩崇仁, 佐々木裕之, 田嶋正二: 組換型 *de novo* DNAメチルトランスフェラーゼの酵素学的性質. 第74回日本生化学会大会, 京都, 10月.
24. Sasaki, H.: DNA methylation and genomic imprinting in mammalian germ cells. International Symposium on Development and Epigenetics of Mammalian Germ Cells and Pluripotent Stem Cells, Kyoto, November.
25. 佐々木裕之, 辻本直美: 哺乳類生殖細胞ゲノムのDNAメチル化とインプリンティング. 第24回分子生物学会: ワークショップ「ゲノム機能におけるエピジェネティクス」, 横浜, 12月.
26. 末武勲, 青木麻子, 宮崎順子, 藤尾高行, 宮川順一, 千々岩崇仁, 佐々木裕之, 田嶋正二: 組換型 *de novo* DNAメチルトランスフェラーゼの酵素学的性質. 第24回分子

生物学会：ワークショップ「ゲノム機能におけるエピジェネティクス」，横浜，12月。

27. Sado, T., Okano, M., Li, E. and Sasaki, H.: Ectopic expression of *Xist* in ES cells deficient for *Dnmt3a* and *Dnmt3b*. 第24回分子生物学会，横浜，12月。

28. 石原 宏，佐々木裕之：*Igf2/H19* 遺伝子ドメインの3ユ境界領域のインスレーター配列の同定。第24回分子生物学会，横浜，12月。

29. 辻本直美，阿部訓也，河野友宏，酒井康弘，千々岩崇仁，田嶋正二，En Li，佐々木裕之：生殖細胞の発生過程におけるメチル化インプリントの獲得とDNA methyltransferaseの発現。第24回分子生物学会，横浜，12月。

30. Wahyu Purbowasito, 須田知賀子, 横峯孝昭, 佐渡 敬, 佐々木裕之：マウス7F4/F5領域のインプリンティングドメインの核マトリクス付着部位のマッピング。第24回分子生物学会，横浜，12月。

31. 白水久男, 横峯孝昭, Wahyu Purbowasito, 豊田敦, 加藤玲子, 須田知賀子, 堀 哲也, 水野重樹, 向井常博, 服部正平, 榊 佳之, 佐々木裕之：インプリンティングを受ける *IGF2* 遺伝子領域の比較ゲノム学。第24回分子生物学会，横浜，12月。

32. 王 又冬, 城圭一郎, 張 忠明, 八木ひとみ, 鍋谷 彰, 増子貞彦, 横峯孝昭, 佐々木裕之, 向井常博：Analysis of mouse *Murr1* gene, a gene imprinted in a brain. 第24回分子生物学会，横浜，12月。

33. 石田智咲, 浦 聖恵, 丹羽仁史, 佐々木裕之, En Li, 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24回分子生物学会，横浜，12月。

34. 外丸祐介, 勝沢由紀子, 畑田出穂, 尾畑やよい, 佐々木裕之, 河野友宏：マウス片親性胎仔における *H19* および *Igf2r* 遺伝子の発現機構。第24回分子生物学会，横浜，12月。

35. 藤山秋佐夫, 渡邊日出美：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24回日本分子生物学会年会，横浜，12月。

E-b. 育種遺伝研究部門

遺伝子発現情報が塩基配列によらずに細胞分裂後も染色体上に保持される現象が哺乳類から酵母まで真核生物で普遍的に観察される。このような「エピジェネティック」な制御は、多細胞生物の発生過程における遺伝子発現の維持、老化、癌形成、等との関連が示唆されている。一方、私達の結果を含めた最近の知見は、トランスポゾンの制御やゲノム進化においてエピジェネティックな調節が重要なことを示している。(Science Vol. 293, No. 5532,

“EPIGENETICS” 特集, 参照)。当部門では、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、転移因子等の反復配列の挙動および植物発生のエピジェネティックな制御機構を調べている。

当部門は、2000年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。2001年3月に木下哲が助手として研究室に加わった。この他に2001年には、研究補助として木下由紀、森谷りつ子、特別共同利用研究員として加藤正臣が加わった。本年度の研究は、文部科学省科学研究費基盤研究「シロイヌナズナ内在トランスポゾンの転移活性化制御機構の解明」、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」、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)、等の支援を受けた。

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ている。

(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

低メチル化突然変異下で誘導された上記の発生異常の一つ *clam* 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。メチル化の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(原著論文1)。エピジェネティックな過程に影響するトランスの突然変異が *ddm1* 以外にもシロイヌナズナで多数利用可能であり、現在これらを用いて、トランスポゾンのエピジェネティックな制御の遺伝的解剖を試みている。

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異所的な転写が起き、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。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開花遅延表現型を引き起こしていたことがわかった。*fwa-1* や *fwa-2* において *FWA* 遺伝子のエピジェネティック発現異常を誘導し安定化する機構は未解明である。

(2) エピジェネティックな制御を受けるホメオボックス遺伝子 *FWA* の正常発生における働きについて：木下哲，角谷徹仁

上述のように、*FWA* 遺伝子は *ddm1* 突然変異下でエピジェネティックに異所的な発現をすることによって開花時期遅延表現型を引き起こすが、この遺伝子の正常発生における働きは未知である。この問題にアプローチするため、野生型における *FWA* 遺伝子の発現とその機能を調べている。野生型の *FWA* 遺伝子は *epi-allele* である *fwa* とは異なり、発生の初期においてのみ発現が観察される。このことから、*FWA* 蛋白質が初期発生において機能していることが推察される。さらに、In-situ での mRNA の局在や *FWA*-GFP 融合タンパク質の局在を調べた結果、*FWA* 遺伝子は配偶体の中央細胞と初期の胚乳で発現しており、融合タンパク質はそれぞれの核に局在していた。被子植物の初期発生では、卵細胞と中央細胞が同時に受精し発生を開始する。卵細胞は受精後、胚を形成し、次世代へ受け継がれる。一方、中央細胞は受精後胚乳を形成し、胚発生あるいは発芽期に栄養源を供給したのち退化する。胚発生以降で発現すると開花時期決定に影響を与える *FWA* 遺伝子が胚乳発生に機能を持つか、胚乳における発現が脱メチル化により制御されているか等を現在解析中である。胚乳組織の形成は、植物発生の中でも特異な仕組みで行われ、そのエピジェネティックな制御機構の解明は進化的にも興味深い。

(3) イネの DNA 低メチル化変異：角谷徹仁，渡辺光一

私達は DNA メチル化の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。ただし、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。この点で、典型的な植物により近い第 2 の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 *DDMI* 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。今後、このイネ突然変異体を用いて、活

性化す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。

研究業績

(1) 原著論文

1. Miura, A., Yonebayashi, S., Watanabe, K., Toyama, T., Shimada, H. and Kakutani, T.: Mobilization of transposons by a mutation abolishing full DNA methylation in Arabidopsis. *Nature* **411**, 212-214, 2001
2. Takeda S., Sugimoto K., Kakutani T., Hirochika H.: Linear DNA intermediates of the Tto1 retrotransposon in Gag particles accumulated in stressed tobacco and Arabidopsis thaliana. *Plant J.* **28**, 307-17, 2001
3. Kinoshita T., Harada J., Goldberg RB, Fischer RL.: Polycomb repression of flowering during early plant development. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98**, 14156-14161, 2001.

(2) その他

1. Habu Y., Kakutani T. & Paszkowski, J.: Epigenetic developmental mechanisms in plants: molecules and targets of plant epigenetic regulation. *Current Opinion in Genetics & Development* **11**, 215-220, 2001.
2. 角谷徹仁：「シロイヌナズナ突然変異体を用いたエピジェネティクス」細胞工学，**20**，363-367，2001.
3. 角谷徹仁：「DNA 低メチル化突然変異によるシロイヌナズナ内在トランスポゾンの活性化」植物の生長調節 **36**，178-180，2001.
4. 角谷徹仁：「DNA メチル化変異によるトランスポゾンの転移誘導」細胞工学，**20**，940-941，2001.

(3) 発表講演

1. 角谷徹仁：「シロイヌナズナの DNA メチル化突然変異」第 18 回染色体ワークショップ，葉山，1 月。
2. 角谷徹仁：「DNA メチル化とトランスポゾンと植物発生」公開シンポジウム「生命の誕生・成長・老化にひそむ謎」，東京，2 月。
3. 角谷徹仁：「植物のエピジェネティクス」名古屋大学バイオサイエンスセミナー，名古屋，2 月。
4. Kakutani T.: "Mobilization of a novel endogenous Arabidopsis transposons by a host mutation affecting epigenetic states" The 46th International NIBB Conference "Genetics and Epigenetics" Okazaki, March.
5. Kakutani T., Miura A., Yonebayashi S., Watanabe K. and Toyama T.: "Destabilization of Arabidopsis genome by *ddm1* (decrease in DNA methylation) mutation." The 12 International Conference on Arabidopsis Research, Madison, WI, June.

6. Kakutani T.: "Developmental Abnormalities Induced by *Arabidopsis ddm1* Mutations: Genetic and Epigenetic Bases" Gordon Research Conference on Epigenetics, Holderness, NH, August.

7. 角谷徹仁:「DNAメチル化とトランスポゾンと植物発生」第74回日本生化学会大会シンポジウム「エピジェネティクス:DNAメチル化とクロマチン」,京都,10月.

8. 角谷徹仁, 木下哲, 三浦明日香, 渡辺光一, 加藤政臣:「シロイヌナズナDNA低メチル化突然変異」第23回日本分子生物学会年会ワークショップ, 横浜, 12月.

E-c. 脳機能研究部門

脳機能研究部門では,マウス主嗅覚系をモデルとして,神経の発生機構の研究を行っている.本年の研究室の構成は,平田たつみ(助教授),川崎能彦(助手),佐藤泰史(COE特別研究員),山谷仁志(総研大大学院生),戸崎浩和(総研大大学院生),佐藤有美子(技術補佐員)であった.文部科学省科学研究費特定領域研究「神経回路の機能発達」,科学技術振興調整費「目標達成型脳科学研究」,科学技術振興事業団戦略的基礎研究「脳を知る」,および,さきがけ21「素過程と連携」の助成を受け研究を行った.

(1) 嗅球軸索の道標的細胞“lot細胞”と軸索ガイド因子Slitとの関係:平田たつみ(発表論文1)

嗅球の軸索は,終脳の特定の領域を選択的に伸長して,嗅索という軸索束を形成する.この際の軸索の伸長経路を決めるのがlot細胞である(Sato et al., 1998).この細胞は,軸索の伸長に先立って,将来の軸索伸長経路に整列し,軸索をこの経路へと導く.lot細胞による軸索ガイドの分子機構は不明である.最近,分泌性蛋白質Slitが,嗅球軸索の伸長を培養下で反発させる作用を持つことが報告された.その発現パターンの解析から,Slitは嗅球軸索経路とは少し離れた中隔野とよばれる所から分泌されて,軸索の伸長の方向を制御するのではないかと予想された.これらの報告から,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あるのではないかと考え,lot細胞とSlitとの関係について検討した.

Slitとlot細胞による軸索ガイドに相互作用があるとすれば,大きく分けて2種類の可能性が考えられる.1つは,lot細胞がSlitの反発作用をうち消すことで,軸索の伸長できる経路を作りだしているという可能性である(Slit不活化モデル).そしてもう一つは,Slitがlot細胞の分布を変えることで,反発作用を作り出すという可能性である(Slit決定因子モデル).もしこれらの相互関係モデルが正しいとすれば,何が予想されるだろうか?まずいづれのモデルにおいても,Slitはlot細胞による軸索ガイド

に不可欠な存在である.もしSlitが失われれば,lot細胞による軸索ガイドの力そのものが失われてしまうはずである.また逆に,Slitを大量に与えた場合にも,lot細胞による軸索ガイドに多大な影響を与えることが予想される.特に,後者のSlit決定因子モデルの場合では,Slitを本来の場所とは異なる場所に与えることで,lot細胞の位置異常が起こると予想される.これらの相互作用モデルに対して,Slitとlot細胞とが各々独立に嗅球軸索に作用する可能性も考えられる(独立モデル).この場合には,上述のようなSlitシグナルの操作は,lot細胞による軸索ガイドに対してそれほど強い影響は与えないと予想できる.

終脳器官培養系を用いて,これらのモデルの妥当性を検討した.まず,Slitを強く発現させた細胞をlot細胞の近傍に移植して,その終脳を器官培養した.すると,移植したSlit発現細胞は,lot細胞の分布には全く影響を与えないままで,嗅球軸索を強く反発させることが分かった.この結果はSlit決定因子モデルを否定する.またこの時,嗅球軸索はSlit発現細胞に反発されながらも,lot細胞の作り出す経路からは決して逸脱しないことも分かった.このことは,嗅球軸索がSlitの反発作用とlot細胞によるガイド作用の両方に対して同時に反応しうる事を意味しており,2つの軸索ガイド機構がそれぞれ独立に軸索に作用する独立モデルを示唆する.さらに終脳からSlitの活性を除去した実験も,両ガイド機構の独立性を支持した.終脳からSlitの分泌源である中隔野を除去し,さらにSlitの活性を完全に阻害する処理を行った場合でも,嗅球軸索は正常と同様にlot細胞の作り出す経路を伸長した.したがって,lot細胞による嗅球軸索ガイドはSlitとは独立に作り出されていることが示された.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野からのSlit活性が必要ない可能性も示唆している.

研究業績

(1) 原著論文

1. 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.* **21**, 2373-2379, 2001.

2. Kawasaki T., Bekku Y., Suto F., Kitsukawa T., Taniguchi M., Nagatsu I., Nagatsu T., Itho K., Yagi T. and Fujisawa H.: Requirement of neuropilin-1-mediated Sema3A signals in patterning of the sympathetic nervous system. *Development*, in press.

(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**, 508-512, 2001.

2. 平田たつみ:終脳における神経細胞の接線方向の移動 実験医学増刊号(印刷中), 2002.

(3) 発表講演

1. 平田たつみ：終脳における新しいタイプの神経細胞移動。第78回日本生理学会大会 シンポジウム，京都，3月。
2. 平田たつみ：嗅索の道標的神経細胞-lot細胞-の発生と移動平成。第54回日本細胞生物学会大会 シンポジウム，岐阜，6月。
3. 平田たつみ：嗅覚系の二次神経細胞の軸索投射。第24回日本神経科学学会大会 シンポジウム 京都，9月。
4. 川崎能彦，中福雅人，平田たつみ：lot細胞の移動制御機構。第24回日本神経科学学会大会 京都，9月。
5. 佐藤泰史，藤澤 肇，平田たつみ：神経突起の伸長に果たすM6aの役割。第24回日本神経科学学会大会 京都，9月。
6. 山谷仁志，佐藤泰史，藤澤 肇，平田たつみ：マウス嗅球におけるモノクローナル抗体H1-2C7陽性細胞の中樞投射パターン。第24回日本神経科学学会大会 京都，9月。
7. 平田たつみ：嗅覚二次神経細胞の軸索投射機構。第35回日本味と匂い学会 シンポジウム，高知，10月。
8. 川崎能彦，平田たつみ：終脳新皮質から嗅索領域へ移動する神経細胞についての解析。第24回日本分子生物学会 ワークショップ，横浜，12月。

E-d. 応用遺伝客員研究部門

(1) イネ・レトロトランスポゾン Tos17 を利用した遺伝子機能解析：廣近洋彦

イネに内在するレトロトランスポゾン Tos17 は培養によって活性化され，再分化により不活性化し，転写コピーは後代に安定に遺伝する。転移標的部位の解析から，染色体上をほぼランダムに転移すること，遺伝子に富む single copy 領域に選択的に転移することを明らかにした (Yamazaki et al. 2001)。この結果は，Tos17 は遺伝子破壊のツールとして非常に有効であることを示している。全イネ遺伝子を網羅する破壊システムの作出を目指して，昨年までに3万種類の破壊システムを作出したが，今年度は，新たに1万種類の遺伝子破壊イネを作出した。これらの遺伝子破壊システムを利用して，transposon-tagging が可能であることを示した (Agrawal et al. 2001)。これは，イネにおける transposon-tagging による遺伝子単離の最初の事例である。逆遺伝学的解析を推進するための資源の整備も行っており，3万の遺伝子破壊システムを対象に PCR により任意の遺伝子の変異体をスクリーニングできる系の構築を行った。また，農林水産先端技術研究所との共同で破壊遺伝子の網羅的解析とデータベース化にも取り組んでおり，これまでに3千系統由来の1万種類の破壊遺伝子情報をデータベース化した。これらの逆遺伝学的

研究資源を利用して単子葉植物では初めてフィトクローム A 遺伝子の変異体を単離した (Takano et al. 2001)。さらに，MAP キナーゼ (OSMPK2) の変異体を単離し，機能解析を行った。OSMPK2 は，植物で最もよく研究されているタバコの SIPK オーソログであり，タバコと同じように種々のストレス条件下で活性化されるため，ストレス応答に関わる因子と推測されていた。しかし，変異体の解析から OSMPK2 は，初期発生の制御に関わる重要な因子であることが示された。

(2) 植物レトロトランスポゾンの制御機構の解析：廣近洋彦，角谷徹二

植物ゲノム上には多数のレトロトランスポゾン (LTR-retrotransposon) が存在し，主要な構成要素となっている。大多数は既に転移活性を失っているが，一部のものが組織培養によって活性化されることが示されている。これまで，タバコのレトロトランスポゾン Ttol をモデルとして転移制御機構について解析し，培養による活性化は主に転写レベルで制御されていることを明らかにしてきた。また，培養以外のストレス条件下 (傷処理，傷で誘導されるセカンドメッセンジャーであるジャスモン酸による処理，エリシター処理等) や特定の組織 (花器官，根) でも転写の活性化がみられるため，これらの条件下でも転移の誘導がおこる可能性が考えられた。実際に転移の誘導がおこることを確認するために，転移の中間体である線状分子の生成について解析を行った (Takeda et al. 2001)。ジャスモン酸処理をした葉においては中間体が検出されたが，花器官においては転写が見られるにも関わらず線状中間体は全く検出されなかった。花器官においては転写後の制御が，転移抑制機構として働いていることを示す結果として注目される。

研究業績

(1) 原著論文

1. Teraishi, M., H. Hirochika, Y. Okumoto, A. Horibata, H. Yamagata and T. Tanisaka.: Identification of YAC clones containing the mutable slender glume locus slg in rice (*Oryza sativa* L.). *Genome* 44, 1-6, 2001.
2. Agrawal, G.K., M. Yamazaki, M. Kobayashi, R. Hirochika, A. Miyao, and H. Hirochika.: Screening of the rice viviparous mutants generated by endogenous retrotransposon Tos17 insertion: Tagging of a zeaxanthin epoxidase gene and a novel OsTATC gene. *Plant Physiol.* 125, 1248-1257, 2001.
3. Takano M, Kanegae H, Shinomura T, Miyao A, Hirochika H, and Furuya M.: Isolation and characterization of rice phytochrome A mutants. *Plant Cell* 13, 521-534, 2001.
4. Yamazaki, M., H. Tsugawa, A. Miyao, M. Yano,

J.Wu, S. Yamamoto, T. Matsumoto, T. Sasaki and H. Hirochika : The rice retrotransposon *Tos17* prefers low-copy number sequences as integration targets. *Mol Genet Genomics* **265**, 336-344, 2001.

5. Takeda, S., K. Sugimoto, T. Kakutani and H. Hirochika : Linear DNA intermediates of the *Tto1* retrotransposons in Gag-particles accumulated in stressed tobacco and *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **28**, 307-317, 2001.

(2) その他

1. Kumar, A. and H. Hirochika : Application of retrotransposons as genetic tools in plant biology. *Trends Plant Sci.* **6**, 127-134, 2001.

2. Hirochika, H.: Contribution of the *Tos17* retrotransposon to rice functional genomics. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 118-12, 2001

3. Okamoto, H. and H. Hirochika : Silencing of transposable elements in plants. *Trends Plant Sci.* **6**, 527-534, 2001.

4. Hirochika H, A. Miyao, M. Yamazaki, S. Takeda, K. Abe, R. Hirochika, G.K. Agrawal, T. Watanabe, K. Sugimoto, T. Sasaki, K. Murata, K. Tanaka, K. Onosato, A. Miyazaki, Y. Yamashita, and N. Kojima : Retrotransposons of rice as a tool for the functional analysis of genes. In *Rice Genetics IV*, IRRI (In press), 2001.

5. Murata, K., A. Miyao, K. Tanaka, M. Yamazaki, S. Takeda, K. Abe, K. Onosato, A. Miyazaki, Y. Yamashita, T. Sasaki, and H. Hirochika : A rice retrotransposon *Tos17* as a tool for gene-tagging. In *Rice Genetics IV*, IRRI (In press), 2001.

6. 廣近洋彦 : 遺伝子破壊による機能解析. 細胞工学別冊「植物のゲノムサイエンスプロトコール」, 秀潤社, 66-72, 2001.

7. 宮尾安藝雄, 廣近洋彦 : イネの *Tos17* による遺伝子破壊法. 細胞工学別冊「植物のゲノムサイエンスプロトコール」, 秀潤社, 73-81, 2001.

8. 廣近洋彦 : 遺伝子破壊を利用したイネ遺伝子の機能解析 *ブレインテクノニュース* **84**, 6-9, 2001.

(3) 発表講演

1. Onosato K., A. Miyao, K., Tanaka, K., Murata, T., Sasaki, H., Hirochika : Analysis of rice yellow-green mutant caused by the insertion of retrotransposon *Tos17*. *Plant and Animal Genome IX.* **390**, 2001. 1. 13-17.

2. Tanaka K., A. Miyao, K. Murata, K. Onosato, T. Sasaki, H. Hirochika : Characterization of rice cellulose synthase gene *OsCesA7* disrupted by insertion of the

retrotransposon *Tos17*. *Plant and Animal Genome IX.* **391**, 2001. 1. 13-17.

3. Miyao A., K. Murata, K. Tanaka, K. Onosato, Y. Yamashita, H. Hirochika : Profile of retrotransposon *Tos17* insertions in rice genome sequence. *Plant and Animal Genome IX.* **392**, 2001. 1. 13-17.

4. Hirochika, H., A. Miyao, M. Yamazaki, S. Takeda, K. Abe, R. Hirochika, G. K. Agrawal, T. Watanabe, T. Sasaki, K. Murata, K. Tanaka, K. Onosato, Y. Yamashita, N. Kojima : Use of *Tos17* for functional analysis of rice genes. Abstracts of rice genome workshop. **7**, 2001. 2. 7-9.

5. Yamazaki, M., G. K. Agrawal and H. Hirochika : Characterisation of a novel rice stripe dwarf mutant showing altered response to brassinosteroid. Abstracts of 17th International Conference on Plant Growth Substances. **159**, 2001. 7. 1-6.

6. Agrawal, G. K., M. Yamazaki, M. Kobayashi, R. Hirochika, A. Miyao and H. Hirochika : A *Tos17*-based forward genetic approach to understand ABA biosynthesis / regulation in rice. 17th International Conference on Plant Growth Substances. **161**, 2001. 7. 1-6.

7. Hirochika, H., A. Miyao, M. Yamazaki, S. Takeda, K. Abe, R. Hirochika, G. K. Agrawal, T. Watanabe, T. Sasaki, H. Sawaki, K. Tanaka, K. Onosato, Y. Yamashita, N. Kojima : Functional analysis of rice genes using the endogenous retrotransposon *Tos17*. *NIAS-COE / BRAIN Joint International Symposium: Genomic approaches to functional analysis of plant genes.* **9-10**, 2001. 11. 21-22.

8. 藤田直子, 宮尾安藝雄, 廣近洋彦, 中村保典 : ノックアウトイネ, スターチシンターゼ1型変異体の性質 *日本応用糖質科学会講演要旨集.* **68**, 2001. 9. 13-15.

9. 宮尾安藝雄, 田中克幸, 澤木弘道, 小野里桂, 山下優美子, 廣近洋彦 : イネミュータントパネルの作出と遺伝子破壊領域の解析. *第24回日本分子生物学会年会.* **3-54**, 2001. 12. 9-12.

10. 田中克幸, 宮尾安藝雄, 村田和優, 小島直子, やました優美子, 佐々木卓治, 廣近洋彦 : イネレトロトランスポゾン *Tos17* によってセルロース合成酵素 (*CesA*) 遺伝子が破壊されたカマイラズ変異体の解析. *第24回日本分子生物学会年会.* **3-55**, 2001. 12. 9-12.

11. 阿部清美, 武田 真, 澤木弘道, 宮尾安藝雄, 廣近洋彦 : レトロトランスポゾン *Tos17* の挿入によって誘発されたイネ curly root 変異体の解析. *第24回日本分子生物学会年会.* **3-56**, 2001. 12. 9-12.

12. 武田 真, 阿部清美, 小島直子, 矢野昌裕, 宮尾安藝雄, 廣近洋彦 : ミュータントパネルを利用した, 塩ス

- トレス耐性に関わる新規イネ遺伝子の単離同定と解析. 第24回日本分子生物学会年会. 3-57, 2001. 12. 9-12.
13. 阿部清美, 武田 真, 村田和優, 宮尾安藝雄, 廣近洋彦: イネレトロトランスポゾン Tos17 の挿入によって得られたクロマチン重合因子機能欠損変異体の解析. 第24回日本分子生物学会年会. 3-58, 2001. 12. 9-12.
14. 渡辺恒暁, 阿部清美, 若狭 暁, 杉本和彦, 廣近 玲, 小島直子, 宮尾安藝雄, 廣近洋彦: レトロトランスポゾン Tos17 による遺伝子破壊を利用したイネ MAP キナーゼ OSMPK2 の機能解析. 第24回日本分子生物学会年会. 3-59, 2001. 12. 9-12.
15. 小野里桂, 宮尾安藝雄, 田中克幸, 村田和優, 澤木弘道, 佐々木卓治, 廣近洋彦: イネレトロトランスポゾン Tos17 の挿入により生じた病斑葉変異体の解析. 第24回日本分子生物学会年会. 3-60, 2001. 12. 9-12.
16. Shin Takeda, Ganesh Kumar Agrawal, Hiroyuki Hirano, Akio Miyao, Hirohiko Hirochika: Systematic analysis of causes of somaclonal variation in rice. 第24回日本分子生物学会年会. 3-61, 2001. 12. 9-12.
17. 杉本和彦, 宮尾安藝雄, 廣近洋彦: レトロトランスポゾン Tos17 による遺伝子破壊を利用したイネ WRK 及び YMYB の機能解析. 第24回日本分子生物学会年会. 3-62, 2001. 12. 9-12.
18. 野々村賢一, 三好一丸, 永口 貢, 宮尾安藝雄, 廣近洋彦, 倉田のり: イネの生殖細胞の分化に関与する受容体セリン/スレオニンキナーゼ. 第24回日本分子生物学会年会. 3-615, 2001. 12. 9-12.

(1) マウス初期発生における X 染色体不活性化の制御: 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. 従来の研究から, 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ことが明らかにされている. 栄養芽細胞では刷り込みにより父由来 *Xist* のみが転写され, 従って Xp のみが不活性化する. 一方, Xp を 2 本持つ雄核発生胚では, 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. 本年は, 発生初期における X 染色体不活性化の制御を更に詳しく解析するために, In(X)1H ヘテロ雌より高頻度で得られる Xp0 胚を用い, *Xist* 遺伝子の安定発現を指標として検討を行った. 卵割期には全ての細胞で安定型の *Xist* RNA が発現し, FISH で大きなシグナルとして検出された. しかし, 胚盤胞期までにはペイントシグナル陽性細胞は 30% に激減し, その後も減少の一途をたどったが, 不活性 X は出現しない. これらの事実と従来の報告から, 父由来 *Xist* は卵割期には無条件で発現し始めることが分かる. その後のイベントは以下の通りに起きると考えら

れる. 先ず, X 染色体数のカウンティングがあり, 1 本ならば *Xist* の発現は停止して不活性化は起きない. 2 本であれば発現が継続して, しかも TE では細胞分化が起きるので, XmXp 胚では *Xist* の発現は不可逆的となり, Xp がそのまま不活性化するが, 全能性を維持している ICM では発現が停止する. この間に Xp と Xm は同等となり, ICM ではランダムな不活性化が起きると推定される. XpXp 胚では TE の分化前にどちらか一方の *Xist* が発現を停止させるイベントがなければならない.

(2) T(X;16)16H 転座マウスを利用した X 染色体不活性化関連遺伝子の検索: 伊藤充輝, 高木信夫

Searle 転座 (T16H) は X 染色体と 16 番染色体が部分的に入れ替わった相互転座で, ヘテロ接合雌では父親由来の正常 X 染色体のみが不活性化されている. 初期胚でも正常 X 染色体が不活性化された細胞が圧倒的に多く, 選択的に正常染色体が不活性化されている可能性が示唆されている. 不活性化の偏りは, ランダムな不活性化に必要な遺伝子の転座による切断や位置効果などのため生じる可能性があるため, 当研究では T16H 染色体転座点をクローニングし, 転座点近傍の遺伝子の単離・同定することを目的とした.

これまでのところ, 転座点は X 染色体上のと *Pola 1* 間の約 4 cM の領域に存在すると報告されている. そこで我々は転座点のより詳細なマッピングを試みた. 連鎖解析からより転座点に近いと考えられた *Pola 1* を含む YAC を入手し, この YAC 中に転座点が存在するか否かの確認を行ったが, この中に転座点は確認できなかった. 次に BAC ライブラリーのスクリーニングを行い, *G6pdx* と *Pola 1* 両遺伝子座間に存在する幾つかの DNA マーカーを含む BAC クローンを単離した. これらのクローンをプローブとして FISH を行ったところ, 転座点は遺伝子座 M-02832 と M-00766 間に存在していることが確認できた. 現在, 遺伝子座 M-02832 と M-00766 をそれぞれ含む YAC クローンを入手し, これらの YAC 中に転座点が含まれているか否か解析を行っている. 同時に, 遺伝子座 M-02832, M-00766 を含む転座点近傍の完全な物理地図の作製を試みている.

研究業績

(1) 原著論文

1. Matsui, J., Goto, Y. and Takagi, N.: Control of *Xist* expression for imprinted and random X chromosome inactivation. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 1393-1401, 2001.
2. Takagi, N.: The role of X chromosome inactivation in the manifestation of Rett syndrome. *Brain Develop.* **23 Suppl. 1**, 182-185, 2001.

(2) 発表講演

1. Takagi, N., Goto, Y., Okamoto, I. and Matsui, J.:

Control of *Xist* expression prior to imprinted and random X chromosome inactivation in mice. 14th International Chromosome Conference, Wurzburg, September 2001.

2. 水野博道, 岡本郁弘, 高木信夫: マウス初期発生に及ぼす 11 番染色体の遺伝子量効果, 日本遺伝学会第 73 回

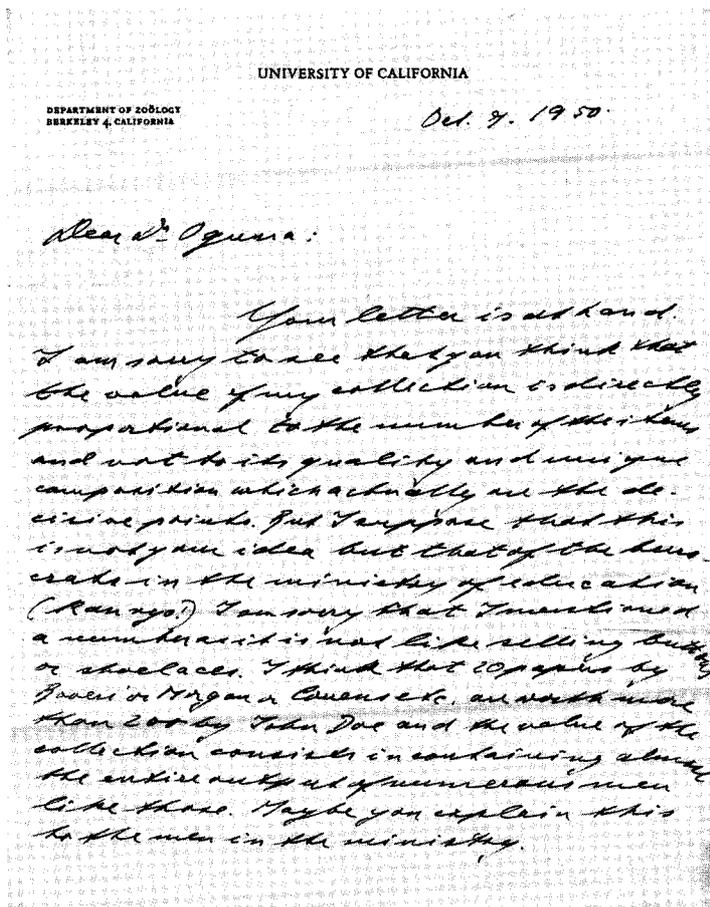
大会, 東京, 9月.

3. Takagi, N. and Farivar, S.: X chromosome inactivation and reactivation in mouse cells. International Symposium on Development and Epigenetics of Mammalian Germ Cells and Pluripotent Stem Cells, Kyoto, November 2001.

NIG 50 Years Ago

Goldschmidt 文庫

国立遺伝学研究所は 1949 年に設立されたが、遺伝研設立基盤の一つとなる図書・雑誌資源の確立に重要な貢献をしたのが Goldschmidt 文庫である。Richard B. Goldschmidt (1878-1958) はドイツの遺伝学者で、生理遺伝学 (現在の言葉で言うと発生遺伝学) を起こしたことで有名である。日本に知己が多く、マイマイガの性決定の研究のため 1914 年に来日したのを始め、1924 ~ 26 年には東京大学講師として滞在し、多くの日本人研究者を指導した。Goldschmidt は 1936 年に渡米し、California 大学 Berkeley 校の教授となったが、1948 年同校を退官するにあたり、当時創立の緒にあった遺伝研が世界に援助を求めているのを知り、自らの論文別刷りコレクションを遺伝研に提供することを申し出た。数ヶ月にわたる交渉の結果、当時のお金で \$ 15,000 (*) で遺伝研に売却することで合意がなされた。1951 年にはその第 1 弾として単行本 641 冊、雑誌 301 冊、論文別刷り 5 万部が遺伝研に到着した。1950 年に遺伝研が購入した図書の総数が 129 冊 (すべて和書、総額 47,530 円) であるから、Goldschmidt 文庫が知的基盤の充実にいかに役立ったかがよくわかる。文庫のうち、論文別刷りは厚紙の箱に著者別に整理されており、いまでも Morgan, Spemann, MacIntock などの重要な論文を見ることができる。静岡県はこの文庫の価値を高く評価し、その書庫として供するため、この年鉄筋コンクリート 2 階建の建物 (電子顕微鏡, X 線両実験室を含む) を遺伝研に寄贈した (1952 年 7 月完成)。



蔵書提供に関する Goldschmidt と小熊捍所長との往復書簡が残されている。日本側からの値引き交渉に対し、Goldschmidt が「このコレクションの価値を内容ではなく量で判断しようとしているのは文部省の役人 (Kanryo!) だろう。この別刷りコレクションの譲渡はボタンや靴ひもの売買とは違う。」と反論するなど、なかなかのやり手である。

(*) \$ 1 = ¥360 で計算すると 540 万円。ちなみに、1951 年の遺伝研総予算額は、2,098 万円である。

写真: Goldschmidt 博士から小熊捍所長に宛てられた手紙 (1950 年 10 月 7 日付け) の一部。

Your letter is at hand. I am sorry to see that you think that the value of my collection is directly proportional to the number of the items, and not to its quality and unique composition which actually are the decisive points. But I suppose that this is not your idea but that of the bureaucrats in the ministry of education (Kanryo!). I am sorry that I mentioned a number as it is not like selling buttons or shoelaces. I think that 20 papers by Boveri or Morgan or Correns etc. are worth more than 200 by John Doe and the value of the collection consists in containing almost the entire output of numerous men like those. May be you explain this to the men in the ministry.

注: John Doe というのはアメリカ人の典型的な名前 の例。特定の科学者を指すのではない。

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に基づいたユニークで活発な研究を展開している。また、国内における中核機関の一つとして遺伝資源である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。平成13年における各研究室を構成する教官名は次のようになっている。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，小久保博樹助手），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、さらにゲノム解析の手法が活用された。

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、牧野茂と嵯峨井知子が、遺伝学普及会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・榊屋啓志（理研 GSC），朝田芳信・清水邦彦（日本大学松戸歯学部）らが参加した。

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13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（精子）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*) の解析：矢田有加里¹，榊屋啓志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 が位置情報源として働き、その本体は、Sonic Hedgehog (SHH) であると考えられている。X-linked polydactyly (*Xpl*) は、優性のマウス突然変異体で、後肢にのみ軸前側多指症を示す。*Xpl* の多指症発症の機構について明らかにするため、*in situ* hybridization 法により四肢軸形成に関与する遺伝子の発現解析を行ったところ、胎生 11.5 日の *Xpl* 胚において、肢芽後端部での正常な *Shh* の発現に加えて、肢芽前側での異所的な *Shh* の発現が観察された。さらに、この異所的 *Shh* は、正常な *Shh* と同様のシグナル伝達活性を持つことも分かった。そこで、*Xpl* 肢芽において異所的な *Shh* が誘導される原因を明らかにするため、*Shh* 発現異常が見られない胎生 10.5 日の *Xpl* 胚での遺伝子発現の解析を行った。その結果、*Shh* 上流遺伝子の発現は正常であったが、下流遺伝子である *Gli1* が肢芽前側で異所的に発現していることが明らかとなった。これまで、*Gli1* の発現は *Shh* により誘導されると考えられていたが、本研究の結果は、*Gli1* の発現誘導に *Shh* 非依存的なシグナル伝達系が関与していることを強く示唆していた。このことから、正常発生において、*Xpl* 原因遺伝子が *Shh* 非依存的なシグナル伝達系を介して *Gli1* の発現を抑制する働きを持つと考えられた。

さらに、ポジショナルクローニングによる *Xpl* 原因遺伝子の単離を目的として遺伝子マッピングを行い、*Xpl* 遺伝子を X 染色体上の約 67cM の位置にマップした。この領域と相同なヒトの染色体上には、手足の骨格異常を示す遺伝的疾患である OFD1 がマップされていたため、これまで、*Xpl* は OFD1 のマウスモデルであると考えられてきた。しかし、近年同定された OFD1 原因遺伝子のマウスホモログ、*cXorf5* のマッピングを行った結果、*cXorf5* が *Xpl* 領域外に位置することがわかり、*cXorf5* が *Xpl* の原因遺伝子ではない可能性が示唆された。また、*Xpl* と相同なヒトの染色体領域のゲノムシークエンスデータベースの解析を行った結果、この領域に体軸形成に関与すると思われる既知の遺伝子が複数存在していることが分かった。これらのマウスホモログについてもマッピングを行い、いくつかの遺伝子が *Xpl* 領域内に存在することが明らかになった。このうち、レチノイン酸によって転写が

活性化される機能未知の遺伝子 *RAI2* については、全コーディング領域のシーケンスを行ったが、*Xpl* での変異は見いだされなかった。さらに、*Xpl* 領域内に存在する新規遺伝子の探索を行うため、cDNA セレクション法によるマウス胚芽 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行っている。

(2) 軸前側多指症マウス Hemimelic extra toes (*Hx*) の変異遺伝子の解析：嵯峨井知子，榎屋啓志¹，清水邦彦²，矢田由加里³，牧野 茂，田村 勝，城石俊彦（¹理研ゲノム科学総合センター，²日大歯学部，³お茶の水女子大）

Hx マウスの変異遺伝子の解析を引き続いて行っている。前年度、*Hx* マウスは候補遺伝子である *Lmbr1* のイントロン内でヒトと高い相同性をもつ領域に 1 塩基の置換を含むことを報告した。*Lmbr1* についてはヒトでは *Lmbr1* のホモログ *c7orf2* のエクソンを含む 4.5kb の欠損が四肢の末端部の形成不全を引き起こすことが報告されている。この結果から *Lmbr1* 遺伝子が四肢の形成に関与している可能性が強く示唆される。しかし、*Hx* マウスでは *Lmbr1* の翻訳領域に塩基置換は発見されないことから、イントロン内の調節因子の変異が *Hx* の軸前側多指を引き起こした可能性が考えられる。そこで胚芽の RNA を用いたノザンプロッティングおよび定量 PCR 解析を行った。この結果、*Lmbr1* の発現レベルの明確な異常は検出されず、*Lmbr1* が *Hx* の直接の原因遺伝子である証拠は得られなかった。

一方、*Hx* には、もう一つ候補遺伝子として *Lmbr1* の約 1Mb セントロメア側にマップされている sonic hedgehog (*shh*) 遺伝子があげられている。この隣接した位置関係に加え、数種の軸前側多指マウス同様、*Hx* が胚芽の軸前側に *shh* を異所的に発現することから、翻訳領域から遠く離れた *shh* のシス因子の変異によって *Hx* の表現型が生じた可能性が考えられる。これを確かめるため、現在、*Hx* マウスを *shh* のノックアウトマウス (*Shh* KO 変異マウス) と交配し、*Shh* KO 変異と *Hx* 変異を同一染色体上でシスの位置に持つ二重変異マウス系統の作製を計画した。もし、*Hx* が *Shh* のシス因子の変異であるならば、この二重変異のヘテロ個体では、*Hx* の表現型を示さないことが予想される。具体的には、*shh* と *Lmbr1* 遺伝子間の約 1Mb 内での組換え体の作製を試みている。

Hx 変異で検出された *Lmbr1* イントロン内の塩基置換の生物学的意義については、いまのところ直接の機能に結びつく結果は得られていない。しかし、間接的ではあるがこのイントロン周辺の構造が何らかの機能をもつことを示唆する結果を得ている。一つは、合成ヌクレオチドを用いたゲルシフト法を行った結果、*Hx* と同じ塩基置換をもつヌクレオチドは野生型と比較して異なる核内蛋白との結合性を示すとみられるバンドシフトを示した。また、この変異が検出された領域はイントロンでありながらヒトと非常に高い相同性を示すが、*Hx* の変異部

位を含む数 100bp の高い相同性 (85-90%) は哺乳動物に限らず、四肢に指をもつは虫類 (スッポン、かなへび)、両生類 (イモリ、カエル) にも及ぶことがわかった。この保存性と四肢末端部の形態形成が直接結びつくか否かは明らかではないが、この高い進化的保存性は、この領域の重要性を示していると考え、四肢に指を持つか否かを指標に保存性の限界がどの種にあるのかについても調べている。

(3) 軸前側多指症を示す突然変異マウス mesenchymal dysplasia (*mes*) の解析：牧野 茂，矢田由加里，石島淳子，榎屋啓志¹，城石俊彦（¹理研・GSC）

mesenchymal dysplasia (*mes*) は、さまざまな中胚葉由来の組織に異常を示す劣性マウス突然変異である。原因遺伝子を探索するため戻し交配個体を用いた連鎖解析を行った結果、*mes* は、分泌性シグナルタンパク質 *Shh* の受容体をコードする *patched* (*ptc*) 遺伝子と遺伝学的に分離されないことが分かった。そこで、*mes* マウスにおける *ptc* 遺伝子の塩基配列を調べたところ、*ptc* 遺伝子内に 32bp の欠失が存在することを明らかにした。この突然変異により、*Ptc^{mes}* は C 末端側細胞内ドメインのほとんどを欠いた機能欠損型のタンパク質であることが示唆された。*ptc* のノックアウトアレルと *mes* アレルの両方を持つコンパウンドヘテロ個体 (*ptc⁻/ptc^{mes}*) は、重度の軸前側多指症を起こしたため、*ptc⁻/ptc^{mes}* 胚芽における *Shh* と *Fgf4*、*Gli* の発現を調べた。その結果、これらの遺伝子は、胚芽前端部に異所的に発現していることが明らかとなった。また、*ptc⁻/ptc^{mes}* マウスは、神経管の背腹軸形成に大きな異常を起こすことが分かっている。一方、*ptc⁻/ptc^{mes}* 胚で神経管の背腹軸形成を調べたところ、複数のマーカー遺伝子の発現に大きな異常は見られなかった。これらの結果より、*Shh* シグナル伝達系は、*Ptc* の C 末端細胞内ドメインを必要とする胚芽前後軸形成を調節する系と、そのドメインを必要としない神経管背腹軸形成を調節する二つの系が存在する可能性が示唆された。

(4) X 染色体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，三田旻彦，水品洋一，桜井宣子，山本博美，高野敏行¹，高木信夫²，年森清隆³，城石俊彦（¹集団遺伝研究部門，²北海道大学，³宮崎医科大学）

現在、本研究室において、21 種類の全染色体のうち 1 本の染色体のみが異なるマウス系統の由来を持ち、その他の遺伝的背景が共通のマウス系統由来であるコンソミック系統を作製している。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間の遺伝的多型性が可能な限り大きいことが望ましいため、受容系統としては近交系マウス C57BL/6J を、供与系統としてはマウス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。コンソミック系統の作製は、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っている。本研究室では、21 種類の染色体すべてについてのコンソミック系統を作製中であるが、その過程で X 染色体のコンソミック系統の雄マウスにおいて世代を重ねるごとに生殖能力の減少が認められた。この雄マウスと交配した雌の卵管から卵を回収したが、それらはすべて 1 細胞期で発生が停止していたため、受精が起こっていないか、もしくは第一卵割以前の発生段階に何らかの障害があると考えられた。この雄マウスの精子頭部には形態異常があり、精子の運動性は著しく低かった。現在、頭部の形態異常によって受精が制約されるのかについて解析している。また、この X 染色体コンソミック系統の精子形態異常は、供与系統由来の X 染色体上のある特定の領域（遺伝子）と受容系統由来の常染色体もしくは Y 染色体上の領域（遺伝子）がうまく協調して働かないことにより発生すると考え、この二つの領域のマッピングを行っている。このうち、X 染色体側に存在する原因遺伝子を QTL 解析法により同染色体上の 3 箇所に限局することができた。

(5) マウス 1 細胞期胚移植による蘇生効率の改善：櫻井宣子¹、山本博美¹、小出 剛、城石俊彦¹（株式会社ジェー・エー・シー）

動物実験施設間でのマウスの授受を行う際に、病原微生物を持ち込む危険を避けるため、生殖工学技術を用いた 2 細胞期胚の移植を行うことが近年一般化してきている。哺乳動物遺伝研究室でも、数年前より胚移植操作を用いた施設間のマウス授受やマウス胚の凍結保存を行ってきたが、系統によっては何らかの原因により蘇生効率が著しく低いか、または不可能な系統があった。これらの重度に胚移植効率の低いマウス系統について、通常、体外受精翌日の 2 細胞期胚を偽妊娠雌に卵管移植するところを、体外受精当日の 1 細胞胚を偽妊娠雌に卵管移植することで、胚が受容雌の卵管内に滞在する時間をより長くして胚移植効率が改善されるか否かを検討した。動物は当研究所の系統生物研究センターで繁殖、維持している野生由来マウス系統の中で、胚移植による蘇生がこれまで不可能であった CHD / Ms を用いた。雌マウスは PMSG および hCG で過排卵処理し、採卵後体外受精を行った。体外受精 3 時間及び 6 時間後に、形態を観察し、正常と判定した胚を偽妊娠雌に卵管移植した。分娩時には必要であれば帝王切開を行った。離乳した産仔に対してマイクロサテライトマーカーを指標にして遺伝モニタリングを行った。その結果、これまで蘇生が不可能であった CHD / Ms 系統において、受精後 1 細胞期に胚を移植することで受容雌は妊娠し、産仔を得ることが出来た。現在、標準的実験用マウス系統や他の系統について、この方法の有用性を検討中である。

(6) QTL 解析法を用いた自発運動性に関する遺伝子の探索：小出 剛、古瀬民生、高野敏行¹、城石俊彦¹（国立遺伝学研究所・集団遺伝研究部門）

遺伝的に異なった動物が示す多様な行動パターンを制御する遺伝的プログラミングを解明し、行動がどのような遺伝的变化により進化するか明らかにするために、行動遺伝学を進めてきた。これまでに、野生由来の 12 系統と一般的実験用系統 3 系統 (Mishima Battery of Mouse Strains) を用いて様々な行動テストを行い、各マウス系統の行動パターンの解析を進めてきた。その結果、野生由来のマウス系統を用いることで実験用系統よりも容易に行動形質の差を見出すことができた。このような行動形質の違いをもたらす遺伝子を明らかにするために、現在遺伝学的解析を進めている。今回は飼育ケージ内での運動量を示す自発運動性について遺伝的交配を行い遺伝子座の同定を行った結果を報告する。

野生マウス由来の KJR 系統は高活動性であるのに対し、BLG2 系統は低活動性を示す。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予想された。このような KJR 系統の高活動性に関する遺伝子座を解明する目的で、戻し交配による N2 個体群を用いた QTL 解析を行った。その結果、KJR 系統の高い自発運動性に関する遺伝子は染色体の 3 番遠位部位に存在することが示され、*Loco1* と呼ぶことにした。更にこの *Loco1* と相互作用する遺伝子座を明らかにするために、N2 個体群の中から KJR 由来の *Loco1* 遺伝子座を持つ個体を選抜し、更に QTL 解析を行った。その結果、第 17 番染色体に *Loco1* と相互作用する遺伝子座が新たに見いだされ、*Loco2* と名付けた。このように、KJR 系統のマウスが示す高い活動性は、*Loco1* と *Loco2* に存在する遺伝子が働く事により生じることが示された。現在は、これらの領域に存在する候補遺伝子の探索及び解析を進めている。

(7) 野生由来マウス系統群 (Mishima Battery of Mouse Strains) における辛味及び痛覚感受性に関する遺伝的解析：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（¹東京農工大、²総研大、³The Pennsylvania State University）

野生由来マウス系統群 (Mishima Battery of Mouse Strains) において、トウガラシ由来辛味物質カプサイシンに対する感受性に多様性が見られたことに関しては、昨年度年報において既に報告した通りである。我々は、これらの系統の中でも特に辛味感受性の低い KJR 系統と感受性の高い C57BL / 6 系統の交配実験を行い、F1 個体、F2 個体を作成して関連遺伝子の単離を目指した遺伝解析を行っている。さらに、辛味物質 (Capsaicin) に対する受容体である 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

らており、辛味と熱感覚、痛覚が共通の伝達経路を持つと考えられている。また、代表的な熱痛覚試験の一つである 52°C hot plate test においても KJR 系統と C57BL/6 系統は同様の傾向を示した。そこで我々は、辛味感受性試験と同時に 52°C hot plate test を F1 個体、F2 個体に対して行った。その結果、F1 個体は辛味感受性試験では KJR と同様な傾向を示したのに対し hot plate test では逆に C57BL/6 と近似な値となった。さらに、F2 個体 94 個体に対して同様の試験を行い表現型の分布に関して検討を行ったところ、辛味感受性と hot plate test のいずれにおいても正規分布とはならず、これらの表現型に関わる主要な遺伝子座が、それぞれ少数であると考えられた。以上の結果より、カプサイシンと熱に対する感受性は同一のレセプターを持ち、親系統では類似した感受性を示しながら、これらの表現型が別々の遺伝的因子によって支配されている可能性が示唆された。現在、F2 個体群を用いて辛味感受性試験と共に hot plate test を行った後、多型解析を行い関連遺伝子座のマッピングを進めている。

研究業績

(1) 原著論文

1. Tomohiro Ishii, Shou Serizawa, Atsushi Kohda, Hiroko Nakatani, Toshihiko Shiroishi, Katsuzumi Okumura, Yoichiro Iwakura, Fumikiyo Nagawa, Akio Tsuboi, and Hitoshi Sakano: Projection of three subsets of olfactory neurons expressing the odorant receptor transgene and the two cognate endogenous alleles. *Genes Cells*, **6**, 71-78, 2001.
2. Tanooka, H., Sasaki, H., Shiroishi, T. and Moriwaki: p53 pseudogene dating: identification of the origin laboratory mice. *Gene*, **270**, 153-159, 2001.
3. Makino S., Masuya H., Ishijima J., Yada Y. and Shiroishi T.: A spontaneous mouse mutation, mesenchymal dysplasia (*mes*), is caused by a deletion of the most C-terminal cytoplasmic domain of patched (*ptc*). *Dev. Biol.* **239**, 95-106, 2001.
4. Kikkawa, Y., Miura, I., Takahama, S., Wakana, S., Yamazaki, Y., Moriwaki, K., Shiroishi, T. and Yonekawa H.: Microsatellite Database for MSM/Ms and JF1/Ms, *molossinusu*-derived strains. *Mammal Genome*, **12**, 750-752, 2001.
5. Haraguchi, R., Mo, R., Hui, C.-C., Motoyama, J., Makino, S., Shiroishi, T., Gaffield, W. and Yamada, G.: Unique functions of Sonic hedgehog signaling during external genitalia development. *Development* **128**, 4241-4250, 2001.

(2) その他

1. Nadeau, J., Balling, R., Barsh, G., Beier, D., Brown,

S., Bucan, M., Camper S., Carlson, G., Copeland, N., Eppig, J., Fletcher C., Frankel, W. N., Ganten, D., Goldowitz, D., Goodnow, C., Guenet, J-L., Hicks, G., Hrabe de Angelis, M., Jackson, I., Jacob, H., Jenkins, N., Johnson, D., Justice, M., Kay, S., Kingsley, D., Lehrach, H., Magnuson, T., Meisler, M., Poustka, A., Rinchik, E., Rossant, J., Russell, L., Schimenti, J., Shiroishi, T., Skarnes, W., Soriano, P., Stanford, W., Takahashi, J., Wurst, W. and Zimmer, A.: Functional Annotation of Mouse Genome Sequences. *Science*, **291**, 1251-1255, 2001.

2. 城石俊彦：大規模マウスミュータジェネシスによるゲノム機能解析, 中山書店, 榊 佳之/小原雄治編集「ゲノムから個体へ」生命システムの理解に向けて, 57-68, 2001.
3. 城石俊彦：マウス遺伝学の挑戦 - ヒトの疾患解析と遺伝子相互作用解析のための新しい実験用マウス系統 -, *BIO Clinica* **16**, 46-51, 2001.
4. 城石俊彦：化学変異原 ENU による大規模なマウス突然変異体の開発, 蛋白質・核酸・酵素, **46**, 2613-2618, 2001.
5. 榊屋啓志, 城石俊彦：ENU ミュータジェネシスによるマウス突然変異体の開発, 医学の歩み, 特集「発生学から再生医療へ」 **199**, 823-828, 2001.

(3) 発表講演

1. 城石俊彦：マウスミュータジェネシスによる遺伝子機能解析, 平成 12 年度特定 B 公開シンポジウム「メダカに学ぶ脊椎動物ゲノム再編の分子基盤」, 東京, 2001 年 1 月.
2. 古瀬民生, 三浦 豊, 矢ヶ崎一三, 城石俊彦, 小出 剛：マウスの辛味嗜好性に関する遺伝的解析, 日本農芸化学会 2001 年度大会, 京都, 2001 年 3 月.
3. 小出 剛, 古瀬民生, 森脇和郎, 城石俊彦：受動的回避学習能力に関わる遺伝子の単離に向けた行動遺伝学的研究, 第 48 回日本実験動物学会総会, 横浜, 2001 年 5 月.
4. 桜井宣子, 水品洋一, 陣内寅佳, 中瀬直巳, 小出 剛, 城石俊彦：野生由来マウス 2 細胞期胚の簡易ガラス化法への応用, 第 73 回日本遺伝学会, 東京, 2001 年 9 月.
5. 城石俊彦：マウス突然変異体に基づいたゲノム機能解析, 遺伝研・理研 GSC 合同公開シンポジウム - 生命システムの理解を目指して -, 東京, 2001 年 6 月.
6. Shiroishi, T.: Phenotyping and Gene Mapping in the Mutagenesis Program in RIKEN GSC, A Workshop of Identification of Genes underlying ENU-Induced Phenotypes, McLaughlin Research Research Institute, Great Falls, Montana, USA, July 13-15, 2001.
7. Yada, Y., Masuya, H., Ishiwa, S. and Shiroishi, T.: Alteration of expression domain of *Fgf* genes in a

mouse preaxial polydactyly mutant, luxate (*lx*). 14th International Congress of DEVELOPMENTAL BIOLOGY, Kyoto, Japan, July 2001.

8. Makino, S., Yada, Y., Masuya, H. and Shiroishi, T.: The C-terminal cytoplasmic domain of mouse patched (*ptc*) is indispensable for the A-P axis formation of the limb buds. 14th International Congress of DEVELOPMENTAL BIOLOGY, Kyoto, Japan, July 2001.

9. Sagai T., Masuya H., Shimizu K., Yada Y., Tamura M., Shiroishi T.: Genome analysis of critical region of a mouse preaxial polydactyly mutation, hemimelic extra toes (*Hx*). 15th International Mouse Genome Conference, Edinburgh, UK, October 2001.

10. 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*) の解析, 第 73 回日本遺伝学会, 東京, 2001 年 9 月.

11. 小出 剛, 古瀬民生, 高野敏行, 森脇和郎, 城石俊彦: マウス自発運動性の行動遺伝学的解析, 第 73 回日本遺伝学会, 東京, 2001 年 9 月.

12. 古瀬民生, 矢ヶ崎一三, 三浦 豊, 森脇和郎, David Blizard, 城石俊彦, 小出 剛: 野生由来マウス系統を用いたマウスの辛味嗜好性に関する行動遺伝学的解析, 第 73 回日本遺伝学会, 東京, 2001 年 9 月.

13. 牧野 茂, 矢田有加里, 榎屋啓志, 城石俊彦: マウス四肢形態形成における patched の C 末端ドメインの機能解析, 第 73 回日本遺伝学会, 東京, 2001 年 9 月.

14. 岡 彩子, 三田旻彦, 水品洋一, 桜井宣子, 山本博美, 年森清隆, 高木信夫, 城石俊彦: マウス X 染色体コンソミック系統におけるオスの生殖能力の低下に関する研究, 第 73 回日本遺伝学会, 東京, 2001 年 9 月.

15. 城石俊彦: マウス突然変異体に基づいたゲノム機能解析, 第 73 回日本遺伝学会, フォーラム「ゲノム遺伝学の世紀」, 東京, 2001 年 9 月.

16. 城石俊彦: マウス突然変異体に基づいたゲノム機能解析, 日本動物遺伝育種学会特別講演, 東京, 2001 年 11 月 6 日.

17. Shiroishi, T.: Male-specific reproduction failure caused by X-chromosome substitution between two mouse subspecies, Symposium on Evolutionary of Biology in the 21st Century, Atami, Japan, November 4-6, 2001.

18. Shiroishi, T.: Analysis of genome function based on a large-scale ENU mouse mutagenesis, General Meeting of the Korean Association for laboratory animal science in 2001, Seoul, Korea, November 23, 2001.

19. Yada, Y., Makino, S., Ishiwa, S. and Shiroishi, T.: Genetic analysis of a mouse mutant, X-linked

polydactyly (*Xpl*). The 15th International Mouse Genome Conference, Edinburgh, UK, October 2001.

20. Oka, A., Mita, A., Mizushima, Y., Takano, T., Toshimori, K., Takagi, N., Shiroishi, T.: Male-specific reproductive failure caused by X-chromosomal substitution between two mouse subspecies. The 15th International Mouse Genome Conference, Edinburgh, UK, October 2001.

21. Furuse, T., Blizard, D.A., Moriwaki, K., Miura, Y., Yagasai, K., Shiroishi, T., Koide, T.: Genetic analysis of diversity for capsaicin consumption in the Mishima Battery of mouse strains. 15th International Mouse Genome Conference, Edinburgh, UK, October 2001.

22. Koide, T., Furuse, T., Takano, T., Moriwaki, K., Shiroishi, T.: A quantitative analysis of spontaneous locomotor activity in the wild derived strains. 15th International Mouse Genome Conference, Edinburgh, UK, October 2001.

23. 小出 剛: 遺伝子と行動, 第 65 回日本心理学会大会, 筑波, 2001 年 11 月.

24. 古瀬民生, 高野敏行, 佐野裕美, 小林和人, 城石俊彦, 小出 剛: マウス多様性に基づく QTL 解析法を用いた自発運動生に関わる遺伝子の探索, 第 24 回日本分子生物学会, 横浜, 2001 年 12 月.

25. 古瀬民生, 矢ヶ崎一三, 三浦 豊, 森脇和郎, D.A. Blizard, 城石俊彦, 小出 剛: 野生由来マウス系統群 Mishima battery における辛味物質 capsaicin 感受性に関する行動遺伝学的解析, 第 24 回日本分子生物学会, 横浜, 2001 年 12 月.

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教授：相賀裕美子，助手：小久保博樹，技官：木曾誠，総合研究大学院大学の大学院生：笹岡由美子の他クレスト特別研究員：津田雅之，振興調整費開放融合の研究員：石川亜紀，振興調整費開放融合の技術補佐員：高橋幸希に加えて，パート職員の協力のもとで研究を行っている。また昨年度に引き続き国立医薬品食品衛生研究所との共同研究を行っている。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」，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・開放融合「オーガンリソースとしての中胚葉細胞と器官形成クロックの研究」の分担研究を，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, 木曾 誠

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えを介したリバースジェネティクスを行っている。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。今年度は変異型 lox を用いて挿入型相同組換えの効率化をはかろうと考えた。しかし今回用いたシステムでは想定していた組換え率は得られずさらに他の変異型 lox の導入や組換え体選択の方法を開発する必要がある。

(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, 小久保博樹, 石川亜紀, 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示してきた。*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。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* を抑制する結果である。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 (原著論文 1)。前後極性確立の分子機構に関しては、Notch シグナル遺伝子 (*Dll1*, *Dll3*, *PS-1*, *lunatic fringe*, *Hes7*) ノックアウトマウスを導入して詳細な遺伝学的解析を進めている。また、*Mesp2* の下流の遺伝子を探索するため、野生型マウスと *Mesp2* ノックアウトマウスの体節間でサブトラクションライブラリーを作成し、発現 (In situ hybridization) を指標としたスクリーニングを行い、現在までに興味深い発現パターンをしめす遺伝子候補を 4-5 個得ており、今後機能解析を予定している。また体節形成に重要な働きをする Notch シグナルの下流で働くと考えられている遺伝子 *Hesr-1, 2, 3* の遺伝子ノックアウトマウスを作成したが、それぞれ単独では全く異常をしめさないため、現在ダブル及びトリプルノックアウトマウスの作成を試みている。

(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局限する遺伝子 *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。*Mesp1* 遺伝子座に 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。心臓に関して詳細な観察をおこなったところ心臓の一部に *Mesp1* を発現しない細胞が存在することを明らかにした。その一部は神経提細胞由来と考えられるが、それ以外の細胞が刺激伝導系を構成していると考えられる細胞集団に見いだされた。これらの細胞の起源は謎であるが、従来提唱されていた心筋由来という説に異論を唱えるものである。さらに *Mesp1* を発現する細胞の細胞系譜としては血管、肝臓や、筋肉の一部など多岐にわたるため、レポーターに GFP を発現するマウスを使用するなどしてその動的な解析をおこなっていく予定である。またこのマウスを利用していろいろな遺伝子を強制発現する事が可能になった。この系を利用して、心臓血管系の細胞系譜を決定している現象に関する研究を行っていく予定である。

(4) 生殖細胞の発生機構：相賀裕美子, 津田雅之, 笹岡由美子, 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。最初に単離したマウスの *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。しかしその発現は始原生殖細胞や生殖巣にはなく、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。さらにノックアウトマウスを作成して解析しているが、今のところ異常は観察されていない。そこでさらに探索したところ、2つの *Nanos* 遺伝子ホモログを単離した。これらの発現は発生過程の生殖巣に観察されたため、生殖細胞の発生、分化に関与している可能性が高い。現在、これらの遺伝子の機能を解析するために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. Haraguchi, S., Kitajima, S., Takagi, A., Takeda, H., Inoue, T., and Saga, Y. Transcriptional regulation of *Mesp1* and *Mesp2* genes: differential usage of

enhancers during development. *Mech. Dev.* **108**, 59-69, 2001.

2. Saga, Y., Takeda, H.: The making of the somite: Molecular events in vertebrate segmentation. *Nature reviews genet.* **2**, 835-845, 2001.

(2) その他

1. 相賀裕美子. 転写因子 Mesp1 は心臓前駆細胞に発現し, 心臓形成に必須な因子である. *遺伝子医学*, **5** (2), 199-203, 2001.

2. 相賀裕美子. Notch シグナルを介した体節の分節機構. *医学のあゆみ*, **199** (13), 891-896, 2001.

(3) 発表講演

1. Saga, Y.: Function of Mesp2, a key player for somite segmentation. 14th International congress of Developmental Biology, Kyoto, July.

2. Kitajima, S., Takagi, A., Inoue, T., Saga, Y.: Mesp1 and Mesp2 are required cell-autonomously for the cardiac precursor development in mice. 14th International congress of Developmental Biology, Kyoto, July.

3. Takahashi, Y., Koizumi, K., Takagi, A., Kitajima, S., Inoue, T., Koseki, H., Saga, Y.: Dynamic change in *Mesp2* expression is essential for modulating Notch signaling to form rostro-caudal polarity in somites. 14th International congress of Developmental Biology, Kyoto, July.

4. Kitabayashi, A., Takagi, A., Kitajima, S., Inoue, T., Takeda, H., Saga, Y.: Analysis of knockdown-phenotype of Mesp2: Somitegenesis without normal rostro-caudal polarity. 14th International congress of Developmental Biology, Kyoto, July.

5. Takagi, A., Kitajima, S., Takahashi, Y., Inoue, T., Rawls, A., Saga, Y.: Synergistic function of Mesp2 and Paraxis on the vertebral development. 14th International congress of Developmental Biology, Kyoto, July.

6. Saga, Y.: Molecular events leading to the establishment of rostro-caudal polarity of a somite. Segmentation Meeting, Nara, July.

7. Kitabayashi, A., Takagi, A., Kitajima, S., Inoue, T., Takeda, H., Saga, Y.: Analysis of knockdown-phenotype of Mesp2: Somitegenesis without normal rostro-caudal polarity. Segmentation Meeting, Nara, July.

8. Kokubo, H., Johnson, R-L.: Functional analysis of a new bHLH family, Hesr-1,-2,-3: potential regulators of vertebrate somitogenesis. Segmentation Meeting,

Nara, July.

9. Takagi, A., Kitajima, S., Takahashi, Y., Inoue, T., Rawls, A., Saga, Y.: Synergistic function of Mesp2 and Paraxis on the vertebral development. Segmentation Meeting, Nara, July.

10. Takahashi, Y., Inoue, T., Saga, Y.: Interactions between Dll1 and Mesp2 are essential for modulating Notch signaling to establish segmental pattern in somitogenesis, Segmentation Meeting. Nara, July

11. 相賀裕美子: 心臓血管前駆細胞に発現する遺伝子 Mesp1 の機能解析, 下垂体研究会第 16 回学術集会, 名古屋, 8 月.

12. 北嶋 聡, 高木篤也, 富田幸子, 井上 達, 相賀裕美子: 転写因子 Mesp1 の発現を指標とした心臓形成における細胞系譜の解析, 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月.

F-c. 植物遺伝研究室

植物遺伝研究室は系統生物研究センター 5 研究室のひとつとして研究と事業を行っている。2001 年も引き続き「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た研究を進めた。これらの課題の素材開発を図る目的で遺伝子改変システムの作成と利用「イネエンハンサーシステムの開発」と「イネ遺伝子破壊システムの作成と検索」にも研究, 事業の両面から取り組んだ。またイネ遺伝資源事業として, 全国レベルでのイネ遺伝資源小委員会の組織と運営, および小委員会によるイネ遺伝資源データベース“Oryzabase”のバージョンアップもはかった。従来よりおこなわれてきた野生イネ系統の増殖, 形質調査, 保存, 分譲を行いデータベース化にも着手した。

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, また生研機構博士研究員として三好一丸, 鈴木 温が, 学術振興会ポスドクとして守口和基が, 遺伝学普及会研究員として春島嘉章が, 総研大博士課程 2 年の安柄玉 (Byoung-Ohg AHN, 韓国) と, 10 月からは総研大研究生 Thirumurugan Thiruvengadam (インド) も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”の事業支援をおこなった。派遣研究員, 村山裕子, 芹澤暁子, および研究補助員, 妹尾治子, 鈴木和子, 坂井里美, 牧野智美, 石井明美, 佐藤千尋, 望月宏美, 笹賀香苗, 松下英子, 朴 金珠が研究支援を,

佐伯園子, 近藤恭子が事業支援を行った。

2001 (平成 13) 年度の研究は, 遺伝学研究所校費, 総研大校費および文部科学省系統保存事業費に加え, 文部科学省科学研究費助成金・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)」, 独立行政法人, 農業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, 春島)」 「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, 野々村)」, 「イネ細胞系譜マーカーによる発生分化シミュレーターの開発 (倉田, 伊藤, 山崎)」の支援を受けた。研究室として以下 3 件の遺伝研共同研究「イネ 5SrRNA 遺伝子の解析: スーパ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), 「イネの発生を制御する遺伝子の遺伝学的分子生物学的解析」 (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とその機能」 (東北大学, 高橋秀幸) および共同研究会「イネを舞台とした発生, 分化プログラム」 (代表: 名古屋大学, 北野英己), 「高等植物の生殖システムの分子遺伝学的解析とポストゲノム戦略」 (東北大学, 東谷篤志) を実施した。

以下に主要 4 課題について 2001 年の研究経過を紹介する。

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

(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 (*OSHI*, *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 (原著論文 2)。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 *OSHI* の発現制御機構を調べた結果, *OSHI* 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 *OSHI* 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, cDNA の導入により少なくとも内在の *OSHI* が発現することがわかった。このことは *OSHI* のプロモーター領域にはシュートメリステムと葉の両方で発現させる活性があり, 葉での発現を抑制するには他の領域が必要なこと, *OSHI* が 1 コピー増えると葉での

発現を抑制できなくなることを示唆する。

今年度は cDNA の導入により引き起こされる葉の形態異常が, 内在の *OSHI* 遺伝子が発現した結果であることを確認する実験を行った。正常なタンパク質をコードできないように cDNA にフレームシフト変異を導入し, その変異 cDNA をイネに導入したところ, 野生型の cDNA を導入した場合と同様に葉の形態異常が見られた。しかし, 異常の度合いは非常に弱かった。RT-PCR により *OSHI* の発現を調べたところ内在の *OSHI* と導入した変異 *OSHI* の両方が発現していることがわかった。以上の結果, *OSHI* cDNA を導入すると内在の *OSHI* の発現が誘導され, 葉の形態異常が引き起こされること, *OSHI* cDNA には自分自身の発現を誘導する活性があると考えられた。今後, この奇妙な発現制御を説明するモデルを考案し, それを検証する実験を行う予定である

(2) 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: 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。

これまでに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 (*ORK1*, *ORK6*), さらにそのゲノムクローンも単離した。*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。

今年度は *ORK6* に関しては過剰発現, アンチセンス導入実験を行った。しかし, 正常な発生過程では特に異常は見られなかった。今後カルスからの再分化能を調べる予定である。*ORK1* に関しては, 全長の cDNA の単離を試みた。その過程およびゲノム配列から *ORK1* は非常に特徴的な構造をしていることがわかった。通常, レセプター型キナーゼには C 末端のキナーゼドメインの上流に膜貫通領域があり, さらにその上流にレセプタードメインが見られる。しかし, *ORK1* では C 末端のキナーゼドメインの上流に膜貫通領域が見られるもののその上流には再びキナーゼドメインの一部が見られた。また *ORK1* には alternative splicing が見られ, 膜貫通領域までコードし C 末端のキナーゼドメインをコードできない mRNA と C 末端のキナーゼドメインまでコードできる 2 種類の mRNA が存在することがわかった。

またイネのゲノム配列の検索により, 少なくともさらに 4 つのよく似たレセプター型プロテインキナーゼ遺伝

子 (*ORK3*, *ORK4*, *ORK5*, *ORK7*) が存在することがわかった。さらに *ORK1*, *ORK4*, *ORK7* にはイネ内在のレトロトランスポゾン挿入株が存在することがわかった。これらの挿入変異株や過剰発現体の解析、遺伝子発現のパターンなどからこれらの遺伝子の機能、特に再分化能との関係を明らかにしていく予定である

(3) イネの HAP3 サブユニット遺伝子群の解析：倉田のり，芹澤暁子，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、CAATT 結合タンパクのサブユニットのひとつ HAP3 であり、この遺伝子の過剰発現個体では、葉すなわち体細胞から多数の不定胚を形成する。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 cDNA クローン複数を受精後 3 日胚のイネ cDNA ライブラリーより、類推可能なゲノムクローンを現公開配列 (ゲノムの約 60%) より検索し、計 10 個 OsHAP3-1 ~ OsHAP3-10 を単離した。これらの発現時期、場所を RT-PCR により検出した結果、OsHAP3-1 ~ OsHAP3-3 の 3 クローンは、胚、カルス、シュート、葉、花などほぼ全ての組織で多量に発現していた。OsHAP3-4, OsHAP3-5, OsHAP3-6, OsHAP3-7 は初期胚およびカルス胚の特定の時期に微量の発現が見られ、OsHAP3-8, OsHAP3-9, OsHAP3-10 では調べたどの組織でも発現は確認できなかった。

さらに発現が特定されたクローンのいくつかを選び、5' 上流に GUS 遺伝子を繋いだもの、35S プロモーター下流に選抜クローンを連結したもの、および RNAi コンストラクトなどを作成しイネに導入した。OsHAP3-1 の、RNAi 個体や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。また OsHAP3-1 の過剰発現をイネで誘起したものと、アラビドプシスで誘起したものは、次世代の発芽時および発育初期に幼若葉や幼若組織の過剰発生が見られ、現在これらの変異に至る過程を解析中である。他のクローンの形質転換イネは現在転換当代を育成中である

(4) イネヘテロクロニック変異 *plastchron1* 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るが、その遺伝的制御機構や分子的基盤についてはほとんど明らかではない。近年、イネにおいて栄養生長相の発現期間が延長する (heterochronic mutation) 突然変異体 *plastchron1* が単離された。*pla1* 突然変異は単因子劣性の遺伝を示し、ホモ接合体は植物体の矮化、葉身、葉鞘のサイズの縮小、葉間期の短縮と共に穂の原基が shoot に転換するといった多面的な変異形質を示す。このような変異は、イネ以外の植物種でも皆無で、植物の発育制御の遺伝的プログラムを考察する上で貴重な材料である。そこで我々は、*pla1* 突然変異が引き起こす種々の変異形質についての分子的基盤を解析するため、原因遺伝子のポジショナルクローニングを開始した。

イネマッピング集団 (F2 世代, 579 個体) と RFLP マーカーを用いた遺伝解析により、*PLA1* 遺伝子は第 10 染色体の短腕に座乗していることが分かり、次に最接近マーカー C961 を起点に染色体歩行を行い、*pla1* 遺伝子座を包含する BAC コンティグを作製した。コンティグを構成する BAC クローンの末端配列をプローブに物理地図を構築し、*pla1* 遺伝子座を約 70kb の範囲に絞り込んだ (原著論文 6)。この領域の塩基配列をもとに、遺伝子予測プログラム GENESCAN (MIT) を用いて座上遺伝子の探索を行った結果、cytochromeP450, GTPase regulator protein, transposon like element 等の候補遺伝子が同定された。これら遺伝子の塩基配列を *pla1* 変異体及び野生型間で比較したところ、cytochromeP450 遺伝子については 3 つの *pla1* 変異体のすべてのアリルで変異が認められた。次に RT-PCR 法により発現解析を行ったところ、cytochromeP450 遺伝子は茎頂分裂組織 (SAM) あるいは花序分裂組織 (IM) を含む部位でのみ発現が認められ、*pla1* 変異体の表現型とよく一致する結果が得られた。これらの結果は *pla1* 突然変異の原因遺伝子が cytochromeP450 遺伝子であることを強く示唆している。現在、野生型 cytochromeP450 遺伝子を含むゲノム断片を *pla1* 変異体に導入し相補性検定を進行中である。

2. イネ生殖細胞形成過程で機能する遺伝子群の解析

(1) 種子稔性の低下するイネ突然変異体の網羅的解析：野々村賢一，三好一丸，宮尾安藝雄*，広近洋彦*，倉田のり (*農業生物資源研)

イネや穀類において、生殖細胞の発生から減数分裂を経て配偶子形成、そして受精に至る過程での遺伝的変異の系統的解析はほとんど行われていない。そこで水稻品種「日本晴」に由来する培養変異系統から、種子稔性および減数分裂時の染色体対合などを指標に突然変異体を選抜した。胚由来カルスの培養過程でイネ内在性レトロトランスポゾン Tos17 の転移が活性化されることが知られており、本研究で得られる突然変異も Tos17 による遺

伝子破壊の可能性が期待できる。

昨年度までに 300 の不稔系統の中から生殖細胞の分化から減数分裂を含む胞子形成過程で異常の見られる 38 の変異系統を選抜した。これらの表現型が単因子劣性のメンデル遺伝をすることを確認し、22 系統で Tos17 と不稔表現型との間の強連鎖を確認した (表 1)。その中には生殖細胞の分化初期の異常、花粉母細胞の大きさが不揃いなもの、減数分裂期における相同染色体の対合や分配、凝縮が異常なものなど、胞子形成過程の遺伝的制御を考える上で非常に興味深い表現型を示すものが含まれていた。

22 系統のうち 6 系統では葯の生長不全がみられ、6 系統ともに受容体型蛋白キナーゼをコードする遺伝子 *Msp1* が Tos17 による遺伝子破壊を受けていることを確認した。RT-PCR の結果から、*Msp1* 遺伝子は穂の発生初期から発現し、減数分裂に入る頃までに発現がほぼ停止することが示された。この変異体では雌雄の生殖細胞の発生初期段階での異常や雌雄の生殖母細胞の異常増加、葯壁内層の形成不全などが観察された。葯では減数分裂が途中で停止して雄性不稔となるが、複数の胚嚢母細胞は減数分裂を通過し、結果として 30% 程度の部分的な雌性稔性を伴う雄性不稔であることが確認された。これらの結果から *Msp1* 蛋白質は、生殖細胞が確立したあと、その分化・分裂を厳密に制御する信号を生殖細胞内に伝達する働きをもつ可能性が示唆された。

上記突然変異体のなかから、特に減数分裂期の染色体動態に関する異常を詳細に解析するための予備実験として、穎花の伸長と前減数分裂 DNA 合成期、減数分裂各ステージの対応関係を明らかにした。その結果イネでは、穎花長 2.0 から 2.5mm の間で DNA 合成を完了し、その後速やかに減数分裂へと移行することが明らかとなった。この結果は減数分裂が異常になる変異体の解析にとって重要な知見となった。

3. イネゲノムの核内構築に関する機能的解析

(1) 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事を第一の目的とする。さらに、単離した核タンパク質の遺伝子情報や、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と共に、核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。平成 13 年度は、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 (Ueki et al., (1998) Nat.

Biotechnol., 16: 1338-1342.) 用ベクターに組み込み、解析を行ってきた。これまでに約 430 種のタンパク質をコードすると推定される cDNA を得ている。推定アミノ酸配列から検索を行った結果、既知の核 (または核にも存在すると報告のある) タンパク質や、それらと類似性を持つ物が約 31% を占め、機能未知のタンパク質と類似性がある物や、既知のタンパク質と類似性が見られない物の割合が、約 45% を占めている。幾つかの機能未知タンパク質について、タマネギ表皮細胞での GFP との融合タンパク質の核局在性を調べたところ、7 割以上について、核局在、または核/細胞質共在が確認された。現在は再分化誘導カルス由来の cDNA ライブラリーについて解析を進行中である。

平成 14 年度に 3 種の課題を設定し、既に予備実験に入っている。第 1 は、より多くの核タンパク質の単離と核タンパク質間相互作用の解析である。これについては、植物特異的な NLS を認識出来るようにイネ importin- α 遺伝子を導入した、改変型 NTT システムの構築と、Two-Hybrid システムを用いることを予定している。第 2 は、得られた核タンパク質遺伝子の発現プロファイルからの核タンパク質構成の変化の解析であり、外部との共同研究を想定している。第 3 は、これまで得られた核タンパク質を用いて、核内構造をより詳しく比較観察できるマーカータンパク質の構築である。蛍光タンパク質 DsRed2 との融合タンパク質を構築し、これまで用いてきた GFP 融合タンパク質と 2 色蛍光での観察を予定している

(2) イネ人工染色体の構築：鈴木 温、野々村賢一、倉田のり

植物はカルスから容易に再分化個体を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出来る。イネは、主要穀物のひとつとして育種上重要であるだけでなく、単子葉植物で最小のゲノムサイズという利点から基礎研究においても重要視されている。本研究ではイネの人工染色体を構築することを目的とし、候補 DNA 断片の作成およびイネ細胞への DNA 導入法の検討を行ってきた。

人工染色体の候補 DNA は、イネの動原体領域を含む酵母人工染色体 (YAC) クローンおよびバクテリア人工染色体 (BAC) クローンを元に構築した。候補となる YAC クローンのインサートは、イネ動原体領域に局在する約 160bp を単位とするタンデムリピート RCS2 と約 1.9kb を単位とする散在型リピート RCE1 を含む約 300kb の断片を持ち、機能的な動原体領域の中心に由来すると考えられる (原著論文 1)。そこで、イネ細胞に導入するために、YAC クローンの両腕の YAC ベクター部分を、レトロフィット法によりイネ用の選抜マーカーを組み込んだ YAC ベクターに置換した。一方、候補とした BAC クローンは、RCS2

の繰返し配列約 100kb の領域を、イネ用のマーカーを持つバイナリー-BAC ベクターに組み込み、導入用の候補 DNA とした。

DNA の導入に関しては、巨大 DNA を植物細胞に導入する方法が確立していないことから、リポフェクション法およびパーティクルガン法を検討している。リポフェクション法は 100kb を越える巨大 DNA の物理的損傷を軽減出来ると考えられるが、これまで植物細胞への応用例がほとんど無い。そこで、GFP マーカーを持つ 4kbp 程度のプラスミドをイネの培養細胞である Oc 細胞へ導入し、リポフェクション法がイネ細胞の形質転換に利用可能かどうかを試験した。その結果、 2×10^6 形質転換細胞/総細胞程度の効率を得た。また、20kbp 程度までは導入可能であり、少なくとも一過的な発現の検定には有効であると考えられた。今後、安定な形質転換が可能か、より大きな DNA の導入に適用出来るかの検定が必要である。

一方、パーティクルガン法は既に植物細胞で実績のある手法であるが、巨大 DNA の導入には難がある。しかしながら、100kbp 程度までならば導入可能と考え、BAC クローンの導入を現在進めている。さらに、DNA への損傷を軽減するための改良を試みている。具体的には、金粒子に DNA をまぶす代わりに、カルシウムにより沈澱させた DNA 粒子を細胞にまぶし、そこに金粒子を打ち込むというものである。まだ予備的段階ではあるが、通常のプラスミドでは十分な導入効率を得られると考えられた。今後、詳細に条件を検討することで、従来方法以上の効率を得られるものと期待している。

今後は、候補 DNA の構築と導入法の検討をさらに進めつつ、順次候補 DNA のイネ細胞への導入、安定性の検定を進めていく。また、一方で、導入断片の検出・機能検定、あるいは機能的動原体領域を同定し、より効率的な導入用断片の構築を可能にするために、イネの動原体タンパク質の同定・解析を行う。

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子分離頻度から、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（原著論文 3）、今年度そのプログラムを公表した (<http://shigen.lab.nig.ac.jp/rice/seganalysis/>)。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。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（原著論文 5）

(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。この遺伝子は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、母親の遺伝子座が Kasalath ホモ型またはヘテロ型の時にのみ、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。この遺伝子を単離する目的で、この遺伝子領域の組換え個体を F2 の 1300 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、目的遺伝子と同一座のマーカー C582 をプローブに日本晴 BAC ライブラリーよりポジティブ BAC クローンを選抜し、これらの BAC クローンとその末端配列をもとに用いて目的遺伝子座近傍の物理地図を作成中である。BAC の末端を PCR にて増幅しその断片を RFLP marker として連鎖地図上にマップし、現在目的遺伝子の短腕側に 9 個、セントロメア側に 2 個の組換え目的遺伝子を挟み込む marker が得られ、それらの marker は BAC2 個の contig 上に位置付けられている。

5. イネエンハンサートラップラインの作成とその利用

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た。*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*の転移を引き起こす。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と、この中で得られる組織別発現遺伝子の捕捉、細胞マーカーとしての利用、変異系統のスクリーニング、捕捉遺伝子の単離など、総合的な取り組みを行う。

(1) *Ds-GUS*, 35S-AcTPaseを用いた実験系の確立：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。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を用いた。

昨年までに *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、また35S-AcTPaseを導入したイネを6系統作成した。すでにこのうち35S-AcTPaseの6系統と *Ds-GUS*の4系統を用いた小規模な実験から、*Ds-GUS*はイネの生殖細胞で効率よく転移すること、*Ds-GUS*の転移は多くの場合穂ごとに独立であること、*Ds-GUS*が切り出されるとクロルスルフロン耐性が発現すること、そのクロルスルフロン耐性とハイグロマイシン耐性を用いて簡便に転移体の選抜ができることを示した。

今年度は得られた転移体を用いてエンハンサーの選抜を行った。吸水1日後の発芽種子、発芽2週間後の実生、生殖生長に転換後の幼穂、出穂後の穂、花の各器官、胚、葉、根をX-glucで染色した。その結果、柱頭、花柱、葯、子房、幼穂、わき芽、根端、根毛、葉、葉の傷口が特異的に染色される系統が見られた。以上の結果は、この系を用いて多種多様な組織特異的エンハンサーを同定することが可能であることを示している。今後はより多くのエンハンサーの選抜を行うとともに、切片を用いたGUS染色組織の詳細な観察、*Ds-GUS*挿入変異系統の表現型解析、さらにその遺伝子の単離を行う予定である。

(2) *Ds-GUS*転移体の大規模選抜：伊藤幸博, 永口 貢, 倉田のり

上記の小規模実験からこの系がイネで予想通り機能することが確かめられた。そこでより多くの転移体の選抜、エンハンサーの同定を行うため *Ds-GUS*を1コピー持つ

別の22系統と35S-AcTPase系統の交配とF1育成を行った。現在までに3,277個体のF2を選抜した結果、926個体が転移体であることがわかった。またF1個体は株保存し、多くのF2種子を継続して得ている。

(3) *Ds-GUS*挿入部位のマッピング：

伊藤幸博, 永口 貢, 倉田のり

*Ac/Ds*は同一染色体の近傍に転移しやすいことが知られている。従って、転移前の *Ds-GUS*の染色体上の位置を同定しておけば、転移後の *Ds-GUS*挿入部位の傾向を事前に把握することができる。イネは今年中に全ゲノム塩基配列が決定される予定で、既にかかなりの割合が公開されている。そこで転移前の *Ds-GUS*の隣接配列を単離、塩基配列を決定し、イネゲノム配列と比較した。その結果、14系統の *Ds-GUS*の座乗染色体がわかった。今後、残り28系統の *Ds-GUS*挿入部位のマッピングを進める予定である。さらに転移後の *Ds-GUS*の隣接配列も全て決定し、データベース化することにより *in silico*で目的の遺伝子の *Ds-GUS*挿入株が同定できるようにする予定である。

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*, **110**, 284-291, 2001.
2. Ito, Y., Eiguchi, M., and Kurata, N.: KNOX homeobox genes are sufficient in maintaining cultured cells in an undifferentiated state in rice. *Genesis*, **30**, 231-238, 2001.
3. Harushima, Y., Nakagahra, M., Yano, M., Sasaki, T., and Kurata, N.: A genome-wide survey of reproductive barriers in an intraspecific hybrid. *Genetics*, **159**, 883-892, 2001.
4. 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) plasmid indicates its chimeric structure and evolutionary relationship between tumor-inducing (Ti) and symbiotic (Sym) plasmids in Rhizobiaceae. *J. Mol. Biol.* **307**, 771-784, 2001.
5. Harushima, Y., Nakagahra, M., Yano, M., Sasaki, T., and Kurata, N.: Diverse variation of reproductive barriers in three intraspecific rice crosses. *Genetics*, in press.
6. Ahn, B. O., Miyoshi, K., Itoh, J. I. Nagato, Y and Kurata, N.: A genetic and physical mapping of the region containing *PLASTOCHRON1*, a heterochronic gene, in rice (*Oryza sativa*, L). *Theor. Appl. Genet.*, in

press.

7. Nonomura, K-I., Miyoshi, K., Eiguchi, M., Miyao, A., Hirochika, H. and Kurata, N.: *acd1* mutant aberrant for archesporial cell division in the anther and ovule of rice. *Rice Genet. Newsl.* 18, in press.

8. Miyoshi, K., Kurata, N. and Nonomura, K.I.: Detection of the pre-meiotic DNA synthesis in pollen mother cells by immunofluorescence technique in rice. *Rice Genet. Newsl.* 18, in press.

9. Kurata, N., Nonomura K-I. and Harushima, Y.: Rice genome organization focusing on centromere and genome interaction studies. *Annals of Botany*, in press.

10. Kurata N. and Fukui K.: Chromosome research in genus *Oryza*. in Monograph in genus *Oryza*. *Nanda JS. ed. Springer*, in press.

11. Ito, Y., Hirochika, H. and Kurata, N.: Organ specific alternative transcripts of KNOX family class 2 homeobox genes of rice. *Gene*, in press.

(2) 発表講演

1. Kurata, N., Suzuki, T. and Nonomura, K.I.: Plant artificial chromosome and its prospect. Korean Plant Breeding Society Symposium, Souel, Korea, April.

2. 野々村賢一, 三好一丸, 宮尾安藝雄, 広近洋彦, 倉田のり: 減数分裂期突然変異体の選抜と解析, イネ遺伝学・分子生物学 2001, 東京, 6月.

3. 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, イネ遺伝学・分子生物学 2001, 東京, 6月.

4. 春島嘉章, 倉田のり: 栽培イネ間で観測される生殖的隔離障壁は急速に進化している, 日本遺伝学会第73回大会, 東京, 9月.

5. 野々村賢一, 三好一丸, 宮尾安藝雄, 広近洋彦, 倉田のり: 減数分裂期突然変異体の選抜と解析, 日本遺伝学会第73回講演会, 東京, 9月.

6. 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, 日本遺伝学会第73回講演会, 東京, 9月.

7. 野々村賢一, 三好一丸, 宮尾安藝雄, 広近洋彦, 倉田のり: 葯および胚珠の発生が異常なイネ突然変異体の解析, 日本育種学会第100回講演会, 福岡, 10月.

8. Ahn, B.O., 三好一丸, 伊藤幸博, 伊藤純一, 長戸康郎, 倉田のり: イネヘテロクローニ-突然変異体 *plal* 遺伝子のポジショナルクローニング, 日本育種学会第100回講演会, 福岡, 10月.

9. 守口和基, 伊藤幸博, 山崎由紀子, 倉田のり: 酵母核輸送トラップ (NTT) システムを用いたイネ核タンパク質の大量スクリーニング, 日本育種学会第100回講演会, 福岡, 10月.

10. 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, 日本育種学会第100回講演会, 福岡, 10月.

11. 野々村賢一: 生殖母細胞の数が増加するイネ突然変異体の解析, 遺伝研研究集会「イネを舞台にした発生, 分化プログラムの解明」, 三島, 11月.

12. 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, 遺伝研研究集会「イネを舞台にした発生, 分化プログラムの解明」, 三島, 11月.

13. 春島嘉章: イネ生殖的隔離障壁の genome-wide survey, 遺伝研研究集会「高等植物の生殖システムの分子遺伝学的解析とポストゲノム戦略」, 三島, 11月.

14. 野々村賢一: 生殖器官の発達と減数分裂に関わるイネ突然変異体の解析, 遺伝研研究集会「高等植物の生殖システムの分子遺伝学的解析とポストゲノム戦略」, 三島, 11月.

15. Harushima, Y., Nakagahra, M., Yano, M., Sasaki, T. and Kurata, N.: Comparative mapping of reproductive barriers among three rice crosses. Symposium on Evolutionary Genomics, Atami, November.

16. 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と選抜, 第24回日本分子生物学会年会, 横浜, 12月.

17. 野々村賢一, 三好一丸, 宮尾安藝雄, 広近洋彦, 倉田のり: イネの生殖細胞の分化に関与する受容体セリン/スレオニンキナーゼ, 第24回日本分子生物学会年会, 横浜, 12月.

18. 守口和基, 伊藤幸博, 山崎由紀子, 倉田のり: 酵母核輸送トラップ (NTT) システムによるイネ核タンパク質の大量スクリーニング, 日本分子生物学会第24回年会, 横浜, 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5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/特別共同利用研究員), 大崎恵理子 (総研大・D1), 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3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), (iii) 大腸菌におけるシグナル分子 diadenosine polyphosphate の動態と役割 (バイオ微生物研究所：小林恭子)。

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

細胞分裂装置を構成する蛋白の多くは膜蛋白であり, これらの蛋白が欠損すると例外なく細胞分裂が停止する。従ってこれらの分裂装置タンパク質がどのようにして膜に局在するのか大変興味深いがこの種の研究は未だ成されていない。一昨年我々の研究室では, FtsE がある種のマルチスパン型膜蛋白質の局在に関与していることを明らかにした。FtsE の温度感受性変異株は高温で細胞分裂が欠損すると共に, 3種類のK⁺ポンプ蛋白質(KdpFABC, TrkAEG / H, Kup)が膜に正常に組み込まれない(Ukai et al., 1998. J Bacteriol, 180:3663-3670)。ftsE 遺伝子は 大腸菌染色体地図の約 76 分にマップされ, ftsYEX オペロンを形成している。FtsY は真核生物で保存されているシグナル認識粒子 (Signal Recognition Particle) の受容体, SRP レセプターの α サブユニットと相同性があり, 膜蛋白質の膜への組み込みという機能を担っていることが知られている。しかし FtsX については機能解析が行われた例はほとんどなく, 過剰発現した FtsE と FtsX が相互作用するということが報告されているにとどまっている。一方, FtsE は ABC (ATP Binding Cassette) トランスポーターファミリーに含まれ, ATP 結合蛋白質に典型的に保存されているアミノ酸配列 (Walker motif A, B) と, 総称して ABC ドメインと呼ばれる4つの保存性の高い配列を持っている。ABC トランスポーターは低分子, 高分子, イオンなど様々な物質の輸送に関与し, モーター部位と膜貫通領域からなる。Doolittle らの方法による疎水性パターン解析が「FtsE は比較的親水性の高い膜表面性の蛋白質, FtsX は膜貫通領域を複数個持つ蛋白質である」ことを示していることから, FtsX は ABC トランスポーターの膜アンカー部位に相当し, FtsE がモーター部位に相当し, FtsE と FtsX が相互作用して, ABC トランスポーターとしての機能を担っている可能性が強く示唆された。

以上の理由から FtsX は FtsE と共に (あるいは FtsY も含む形で) 細胞分裂に関与する膜蛋白の局在に関与しているのではないかと予測した。そこで, 機能未知の遺伝子 ftsX が, ABC トランスポーターの膜アンカー部位をコードしていると洞察し, ftsX 破壊株を作製して, 細胞分裂とマルチスパン型膜蛋白の局在に与える影響を追究した。その結果 ftsX を破壊すると FtsZ リング形成が欠損すること, また, FtsX が減少すると, ftsE 変異株の場合と同様に, 12 回膜貫通領域を持つ KdpA は膜画分から減少するが, 2 回膜貫通の KdpD は変化なく存在することがわかった。以上の結果から, ftsX は ftsE と共にマルチスパン型の蛋白の膜局在に関与していることが強く示

唆された。今後は細胞分裂装置に含まれるマルチスパン型蛋白 FtsW の膜局在について解析を行うとともに, FtsX と FtsE の相互作用などについて研究を行う予定である。

(2) 細胞分裂の時期を決める分子機構：大崎恵理子, 西村昭子

昨年までに, (i) 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, (ii) 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, (iii) 分裂時期は Ap4A の細胞内濃度で決まること, (iv) Ap4A のレベルは GlyS と ApaH により制御されていること, (v) 探索した Ap4A の標的蛋白はヒトから微生物まで良く保存された蛋白であり, 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などを明らかにしてきた。abpA の条件破壊株は, 細胞分裂が遅れ約 1.5 倍長い桿菌となり, 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ので, この蛋白を AbpA (Ap4A Binding Protein A) と命名し, 本年度は以下の研究を行った。AbpA に His-tag を結合した融合蛋白をニッケルカラム精製し, Ap4A 結合活性, 分解活性を現在解析中である。この精製過程で, 約 10kDa の AbpA の他に約 14kDa の蛋白が常に付随して精製された。更に, Ap4A と AbpA の細胞分裂への機能的関係を追求する目的で, His-tag 抗体を用いて蛍光抗体法により, cfc 変異株での AbpA-Hisx6 の細胞内局在の解析を行っているが, Ap4A 過剰生産株 (cfc) では, AbpA が細胞内で顆粒状に固まってしまうので, その原因と改善策を検討中である。更にウェスタンブロット法により, cfc 変異株と親株での, AbpA-Hisx6 の細胞内レベルを測定した結果, Ap4A の細胞内レベルが高いほど AbpA レベルが高いことが解った。現在その原因を追及している。また機能ドメインを解析する目的で, 部位特異的変異導入法により, AbpA の予想機能ドメインに変異を導入した。このプラスミドを用いて, *in vivo* 及び *in vitro* での活性を解析している。

(3) 大腸菌の細胞分裂に於ける外膜の役割：藤島博史, 和地正明¹, 西村昭子 (¹東工大・生命理工)

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、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°C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°Cで培養すると KDO 量が減少していた。41°C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°C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。また、*kdsA* 変異により KDO が合成されないと、細胞分裂が停止する原因を検討した。一般にリポ多糖合成系の各種変異株では細胞増殖が阻害されるが、リポ多糖 A をペリプラズムに輸送する ABC トランスポーターである MsbA を過剰発現すると増殖が回復することから、リポ多糖 A が細胞質膜に蓄積することが増殖阻害の原因と考えられている。そこで MsbA を *kdsA* 変異株内で過剰発現させたところ、細胞分裂の欠損が回復した。しかしコロニー形成能は回復しなかった。また、リポ多糖合成の最初の段階を触媒する酵素の変異株 (*lpxA*) ではリポ多糖 A の蓄積が生じないにも関わらず細胞分裂の欠損が確認された。従ってリポ多糖 A の蓄積により細胞分裂の欠損が生じるのではなく、リポ多糖が外膜から欠失するために分裂が阻害されると結論した。分裂だけが回復したのはリポ多糖 A がペリプラズムに移行したことで多少なりとも膜が安定化したためと思われる。(Fujishima et al. Microbiol. 148, 103-112, 2002.)

(4) 大腸菌の細胞分裂における HscA の機能に関する研究：上原 剛, 松澤 洋¹, 西村昭子¹(青森大・生物工学)

真核生物のチューブリンとホモロジーを持つ FtsZ は普段は細胞質中に分散しているが、細胞分裂開始時期になると、細胞中央部の細胞膜内側に沿って環状に集まり、FtsZ-リングを形成する。この FtsZ の細胞質中から分裂予定面への移行は方向性を持って行われているのか、FtsZ-リング形成に関与する因子は存在するのか、という点に興味を持ち、この問題を解明することを目的に本研究を行った。その結果、DnaK のホモログである HscA が FtsZ-リングの形成に関与していることを見出した。本解析に用いた *fts715* 変異株は、30°Cでは正常に増殖し桿菌となるが、42°Cでは細胞分裂が阻害されて多核フィラメントとなる。FtsZ の細胞内局在を間接蛍光抗体法で観察した結果、30°Cでは野生株と同様、桿菌細胞の中央部に顕著な FtsZ-リングが観察されたが、42°Cでは FtsZ-リングは殆どの分裂予定位置に検出されなかった。FtsZ 量をウェスタンブロットングにより測定したが、*fts715* 変異株と野生株では FtsZ 量に違いは無かった。以上の結果から、*fts715* 変異は、細胞質中の FtsZ が集合して FtsZ-リングを形成する過程を阻害していることが解った。P1 マッピング、相補性テスト、シーケンス解析の結果、*fts715* は HscA 蛋白質の192番目のアラニンがバリンに置換し

たミスセンス変異であることが解った。HscA は Hsp70 ファミリーの蛋白質であり、大腸菌では、DnaK, Hsc62 と高い相同性を持ち、*in vitro*において ATPase 活性を持ち、細胞内ではシャペロンとして機能すると考えられている。また Kawula らにより *hscA* の変異株が分離されている。この変異は *hns*(大腸菌のヒストン様蛋白質をコードする遺伝子) の変異形質を部分的に抑制することが知られているが、分裂との関わりについては全く解析されていない。また、HscA は多くのバクテリアに広く保存されており、大腸菌の全蛋白質量の約 1% も存在するにもかかわらず、その細胞内機能については良く解っていない。野生株の *hscA* 遺伝子を破壊した株は、30°C, 42°C 共にゆっくりではあるが生育し桿菌形態を示した。しかし *fts715* 変異株は、野生型 *dnaK* を担うプラスミドにより、部分相補されることから、HscA と DnaK は相互に補い合っているものと思われる。野生型 HscA の機能を明確にする為に、野生株の *hscA* 遺伝子を破壊し、アラビノースプロモーターにより *hscA* 遺伝子の発現を制御した株について、FtsZ-リングの局在を解析した。その結果、*hscA* 遺伝子の発現が抑制された条件下では、*hscA* 遺伝子を発現させた細胞と比較して長い桿菌となり、15%の細胞で FtsZ-リングの位置に異常が観察された。FtsZ と HscA の共局在の可能性を検討する為に、蛍光抗体法により、野生株の *dnaK* を破壊した株について、HscA の細胞内局在を観察した。その結果、分裂直後の小さい細胞ではポール側に HscA が局在するが、少し成長した細胞では分裂予定面に HscA が局在していた。HscA と FtsZ の間に物理的相互作用があることが強く示唆された。そこで、FtsZ と HscA の蛋白質間相互作用を検討する為、精製された野生型 HscA と FtsZ を用いて共沈実験を行った結果、確かに HscA は重合した FtsZ と共沈した。以上の結果から、HscA は FtsZ-リング形成に関与していると結論した (Uehara et al. *Genes to Cells* 6, 803-814, 2001)。

(5) 大腸菌の細胞分裂に関与する遺伝子群の系統的解析：坂季美子，松本典子，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子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)の大まかなマッピングを行ってきた。更に、各変異遺伝子を同定する為に、シーケンス解析で明らかになった ORF と変異との対応付けを行うことにした。まず昨年度は、雄株から雌株に遺伝的手法によって容易に伝達されるプラスミドベクターに、約 4300 の ORF をクローニングし、個々のプラスミドで雄株を形質転換した系統を作成した。今年度はこの系統を用いて、レプリカ法で、雌株である *fts* 変異体バンクとかけ合わせ実験を行

い、相補する ORF を同定した。その結果これまでに、106 個の *fts* 変異についてその所在遺伝子が同定された。そのうち 5% は既知の *fts* 遺伝子であったが、35% は蛋白質合成や DNA の合成・分配、膜合成に関わるものであった。この結果は、「細胞は、細胞内諸反応の進行状況を識別し、分裂の時期を決定する遺伝的調節機構を持っている」という我々の仮説を支持するものである。機能未知 ORF も 6% 占めていたことから、新しい細胞分裂遺伝子の解析による新たな展開が期待される。

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* K-12. *Genes to Cells* 6, 803-814, 2001.
2. Fujishima, H., Nishimura, A., Wachi, M., Takagi, H., Hirasawa, T., Teraoka, H., Nishimori, K., Kawabata, T., Nishikawa, K. and Nagai, K.: The *kdsA* mutations affect FtsZ-ring formation in *Escherichia coli* K-12. *Microbiol.* 148, 103-112, 2002.
3. Makinoshima, H., Nishimura, A., and Ishihama, A.: Fractionation of *E. coli* cell populations of different stages during growth transition to stationary phase. *Mol. Microbiol.* 43, 269-279, 2002.

F-e. 無脊椎動物遺伝研究室

平成 13 年度も林 茂生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、平成 12 年度に引き続き理化学研究所 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した。後藤 聡は 7 月から 11 月にかけて英国 Medical Research Council, Laboratory of Molecular Biology に滞在し、研究を行った。津田 玲生, 林 永美(理化学研究所・研究員), 丹羽 尚(理化学研究所基礎特別科学研究員), 梅園 良彦, 千原 崇裕(日本学術振興会 PD), 加藤 輝, 新道 真代(総合研究大学院大学), 阪田 忠(総合研究大学院大学特別研究学生)が研究に参加した。文部科学省谷口美佐子, 実験補助員 鈴木 恵子, 大藪 陽子, 間瀬 玲子, 栗田 憂子, 佐渡 由希子, 小針 美夕紀, 鹿児島 由記, 秋元 愛, 白木 岐奈(理化学研究所・テクニカルスタッフ)が研究と系統保存事業を支援した。津田は 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, 津田, 千原, は 7 月に京都で行われた 14th International Congress of Developmental Biology において発表をおこなった。本年度の研究は文部科学省特定領域研究 (B) 「細胞分化による細胞間相互作用の変換機構」, 文部科学省特定領域研究 (C) 「ショウジョウバエ GAL4 エンハン

サートラップシステムのマッピングと発現情報の統合データベース構築」(林), 文部科学省特定領域(B)「発生における分子機構のイメージング」(後藤), 文部科学省特定領域研究(A)「EgfrとNotchシグナル間クロストークに関するebiの機能解析」(津田)の援助を受けて行われた。

(1) ノッチ細胞間情報伝達系における糖修飾の役割: 後藤 聡, 谷口美佐子, 村岡正敏¹, 豊田英尚², 佐渡由希子, 川喜田正夫¹, 林 茂生¹(¹東京都臨床医学総合研究所, 生理生化学研究系, 医化学研究部門, ²千葉大学大学院薬学研究部)

我々は脚形態異常を示す突然変異のスクリーニングから糖-ヌクレオチドの輸送担体をコードする遺伝子UST74C (fringe connection) を同定した。UST74C 変異体ではNotch およびWinglessによるシグナル伝達が異常となっていた。我々は更にUST74CがNotchの糖修飾を促進することでFringeによる活性調節とプロテアーゼによる成熟型Notchレセプターの形成に必要とされることを明らかにした。今回の研究は適正な糖-ヌクレオチドの細胞内量の維持が特異的なシグナル伝達系路の活性調節に必要とされることを示した点で重要である。詳細は文献1に発表した。

(2) 形態形成に関わる遺伝子の大規模スクリーニング: 津田玲生, 梅園良彦, 阪田 忠, 新道真代, 佐渡由希子, 谷口美佐子, 秋元 愛, 相垣敏郎¹, 林 茂生¹(¹東京都立大学)

ショウジョウバエゲノムのDNA塩基配列からは14000個以上の遺伝子の存在が予測されているがそのうち個体の生存に必須な遺伝子(致死遺伝子)は3600程度と見積もられている。残りの遺伝子には分子構造から考えて生理的に重要であることが明白な遺伝子が数多く含まれているがその多くは単一遺伝子の破壊のみでは生存をおびやかす効果はないと考えられる。したがって機能欠損時の表現型を指標とした遺伝子スクリーニングで形態形成に関わる遺伝子をすべて網羅することは困難である。一方ある遺伝子を異所的に発現させると機能獲得型(Gain of Function)の表現型を示したり, 大量に発現させることで正常とは異なる細胞内局在を示して本来の分子機能を阻害することが多く見られる。我々はゲノム上の遺伝子をシステムティックに, 大量に発現させることで起きる組織の形態異常を指標として新たな遺伝子機能を探索している。相垣らが作成したGene Search (GS) システムはゲノム上の各所に挿入された単一トランスポゾンを通じて挿入部位近辺の遺伝子をGal4遺伝子の制御下におくシステムである。我々は相垣らが作成したGSストックを用いて複眼の形態及び細胞の生存に影響を与える遺伝子を探索し(津田ら), その中から更に成虫の脚(梅園, 阪田)と胚の気管系(新道)において形態異常を与える遺伝子座を検索している。すでに約5000系統を検索し多くの興味深い表現型を示す座位を同定している。同時に挿入サイトのマッピングを相垣らと協力して行っている(佐渡, 谷口, 秋元)。

(3) 気管形成における細胞運動ダイナミクス: 加藤 輝, 千原崇裕, 林 茂生

形態形成における細胞運動の動的解析を行うためにアクチン繊維, 微小管, 細胞膜, 細胞間接着装置を胚の気管細胞において特異的にGFP標識し, コンフォーカル顕微鏡を用いて経時観察する方法を確立した。現在気管細胞の特製を決定する遺伝子(Esg, SRF), やRhoファミリーのsmall G-proteinなどの機能解析を行っている。

研究業績

(1) 原著論文

1. Goto, S., Taniguchi, M., Muraoka, M., Toyoda, H., Sado, Y., Kawakita, M. and Hayashi, S.: UDP-sugar transporter implicated in glycosylation and processing of Notch. *Nature Cell Biology*, 3, 816-822, 2001.

(2) 発表講演

1. 林 茂生, 赤勝 和, 林 永美, Doris Brentrup: ショウジョウバエ翅脈パターン形成を支配するbHLH転写因子と核マトリックスとの相互作用. 第54回日本細胞生物学会大会, 岐阜, 5月.

2. 津田玲生, 林 茂生: 細胞増殖と分化の決定に於けるEGFレセプターの役割. 第54回日本細胞生物学会大会, 岐阜, 5月.

3. Chihara, T. and Hayashi, S.: Guidance mechanism for tracheal cell migration in *Drosophila*. 14th International Congress of Developmental Biology, Kyoto, July.

4. Kato, K. and Hayashi, S.: Dynamic cellular movements in the tracheal system of *Drosophila*. 14th International Congress of Developmental Biology, Kyoto, July.

5. Matakatsu, H., Brentrup, D., Lim, Y.-M. and Hayashi, S.: *Drosophila* wing patterning requires interaction of bHLH proteins to nuclear matrix mediated by Plexus. 14th International Congress of Developmental Biology, Kyoto, July.

6. Tsuda, L., Lim, Y.-M. and Hayashi, S.: Ebi/TBL1, a component of a co-repressor complex, mediates the cross talk between Egfr and Notch signaling. 14th International Congress of Developmental Biology, Kyoto, July.

7. Sugimura, K., Yamamoto, M., Niwa, R., Usui, T., Goto, S., Taniguchi, M., Hayashi, S. and Uemura, T.: A genetic hunt for regulators of dendritic outgrowth and branching in vivo. 14th International Congress of Developmental Biology, Kyoto, July.

8. Shiga, Y., Akimoto, A., Yasumoto, R., Takagi, K., Hayashi, S. and Yamagata, H.: Developmental genes

in the water flea, *Daphnia magna*. 14th International Congress of Developmental Biology, Kyoto, July.

9. 林 茂生, 多羽田哲也, 広海 健, 野地澄晴: 発生におけるパターン形成機構. 日本学術振興会未来開拓学術研究推進事業「生命体の形成機構」第3回公開報告会, 東京, 9月.

10. 林 茂生: ショウジョウバエを用いた器官形成解析. 第24回日本分子生物学会年会, 横浜, 12月.

11. Goto, S., Taniguchi, M., Muraoka, M., Toyoda, H., Sado, Y., Kawakita, M. and Hayashi, S.: UDP-sugar transporter implicated in glycosylation and processing of Notch. 第24回日本分子生物学会年会, 横浜, 12月

12. 津田玲生, 林 永美, 林 茂生: ショウジョウバエ複眼と哺乳類内耳有毛細胞に共通した細胞生存維持メカニズムの解析. 第24回日本分子生物学会年会, 横浜, 12月.

NIG 50 Years Ago

発表論文

50年前の年報には1951年に発表された9冊の著書と42編の発表論文が記載されている。論文の内、英文雑誌に掲載されたのは6編、American Naturalist, Genetics, Cytologia等の外国雑誌が大部分である。日本が平和条約を締結し、国際社会に復帰したのは翌年の1952年であるが、科学の分野ではすでに国際的活動を開始していたのがよくわかる。当時の発表論文は植物関係が多く、42編中18編を占めている。まだアラビドプシスが登場しないのは当然だが、植物種も小麦、イネに限らず、みかん、ナス、甜菜、ペニバナ、タバコとさまざまである。タイトルに「育種」の名を含む論文も多い反面、発生遺伝学的な基礎研究の仕事も多数みられる。

著書・論文計51編の内、実に48編が単一著者によるものである。室長が執筆したものが34編でもっとも多いが、研究員の単一著者が7編、研究補助員が単一著者になっている論文も2編ある。当時、論文の著者に名前を連ねる条件としてどのようなものがあつたのか、想像してみるのもおもしろい。

13
遺傳の綜合研究 11: 225-245 1951

蠶の星紋の遺傳學的研究¹⁾

田 中 義 麿
国立遺傳學研究所

1. 星 紋 概 説

普通型(原形)に於ては第2腹節に星紋、第5腹節(前脚部)は黒帯を混濁する)に半月紋、第3, 8腹節に星紋が1対を有するを原形とする。その他の腹節に星紋を有するものを多星紋型と呼ぶ。このうち第3腹節の星紋は星紋、半月紋を有する凡ての星紋型に共通に存在し、これを欠くものがない。本研究に於ては考慮の外におき、第3腹節以外の腹節に一つも星紋を有しないものを無星紋型とする。星紋の大きき及び位置にかなりの差があり、大形星紋で原形のものもあれば小形星紋で原形に近似的なものを有するものもある。星紋の有無の判断はたとえ原色でも星紋の有無を判断するものはこれと存在し、星紋の形状をなさないもの。これを原形とした。

星紋の形成には孵化温度(養育温度)が大なる影響を有するもので、平田(1927)は日本種大蚕に於て高温養育(30°F以内)を行えば第6, 7, 8, 9の各腹節に星紋を無し、中温養育(27°F)では第6, 7, 9の腹節に片側欠きのものを生じ、低温養育(22-24°F)では第8腹節以外の星紋は極めて少数しか出現しないことを観察した。その他の報告(田中1942)は組換えの星紋型の1系より分岐した無星紋型(原形)と普通型(原形)とを用い、18°C, 20°C, 25°Cの温度で養育を行ったところ、低温では無星紋型が極めて少なく普通型が大部分を占め、高温では星紋型が多くなることを認めた。即ち平田の結論とは反対の結果となつたのである。何れに於て養育温度に對して星紋の有無を決定したかは不明であるが、品種の異なること(日本種と中国種)、星紋型の異なること(6-8型と0型)とが原因かと考えられる。

2. 材 料

本研究に用いた多星紋品種は凡て1915年明治大学高橋正親氏の果糖型別から分選を受け、1916年春養育に於て初めて飼育したただ1雄の中國種蠶から出來する。

3. 星 紋 型 の 分 類

原形はかつて(田中1927)星紋型を星紋の数により10種に分つたが、これでも凡ての星紋型を包含することはできず、高橋を以て分けられ数種の多きに達し、星の帯によつて星紋型を分類することは容易でない。やはり腹節番号を以て星紋の有無を表現するの最も簡単で便宜なることを知つた。即ち腹節番号だけを用ひ

腹節	番号	名 称	第 4	6	7	8	9	10	腹節
0		無星紋	-	-	-	-	-	-	-
8		普通型	-	-	-	+	-	-	-
8/10	8-10		-	-	-	+	+	+	
8/9/10	6-10	逆型多星紋	-	+	+	+	+	+	
4/7/8/10	4-10	完全多星紋	+	+	+	+	+	+	
6/7/8	6-8		+	+	+	-	-	-	
4/7/8/10	4-10		+	+	+	+	+	+	
4/7/8/10			+	+	+	+	+	+	
9/10			-	-	-	+	+		

第1図 左、多星紋(6-10型)。右、無星紋。 (注) 左側はその腹節に1対(2個)の星紋を有すること、点・を数字の上に示したものは片側(1個)に星紋を有すること、一を数字の上に示したのは原形

1) Yoshimaro TANAKA: Inheritance of the "star" spot in the silkworm larva. 国立遺傳學研究所報告第13号
2) 原形はかつてこれと半月紋型と呼んだ。第3腹節の半月紋とはその形状を異にし、第8腹節の星紋と同じ型に属するもの、近く誤解することになる。

1951

H. Kihara: Genome-Analysis in *Triticum* and *Aegilops*. X. Concluding Review^{1,2}

By
F. A. LILIENTHAL
National Institute of Genetics, Mishima, Japan

Received October 25, 1950

Cytogenetics of species hybrids and studies on polyploidy developed rapidly in the last three decades into a new branch of biology. Their theoretical and practical aspects seemed from the very beginnings to offer unlimited possibilities, and natural as well as artificial polyploids became the subject of great interest to plant geneticists in many countries.

Kihara's investigations of the karyogenetical relationships between the three wheat groups—Einkorn, Emmer and Dinkel—started in 1918 (Kihara, 1919). Then, in 1924, followed his well known, classical studies on the pentaploid hybrids, with many interesting sidelights, like his observations of viable, fertile 20-bivalent descendant's (Sears' nullisomics).

The relationships between the three genomes—A, B and D—having been laid clear, Kihara decided to include in his further investigations other groups of *Triticinae* and started with a few available species of *Aegilops*. The results of the first studies were published in 1929, upon which, starting with 1930, followed a series of contributions under the headline "Genomanalyse bei *Triticum* und *Aegilops*" (1930-1949).

In the first contribution (I, 1930) Kihara formulated a biogenetical definition of genome and laid down a broad foundation for his genome-analysis with his "Analysatoren-Methode" which proved to be very helpful in ascertaining the genomes of polyploid plants of unknown genomic constitution.

Between the years 1930 and 1936 followed, with short intervals, five more contributions. During the troubled times later, until 1949, only three further reports were published (VII-IX). But experimental work was going on, as well as it was possible under the circumstances, and a number of important separate reports, closely connected with the analysis of genomes, were published by Kihara (to a great extent in Japanese) and various members of his institute. Also, during these years, a considerable amount of additional information was provided by the more fortunately situated plant geneticists of America who developed

¹ Contributions from the Laboratory of Genetics, Biological Institute, Kyoto University, No. 208.
² Contributions from the National Institute of Genetics, Japan, No. 12.

写真:

左: 田中義麿による「蠶の星紋の遺傳學的研究」(遺傳の綜合研究 II: 225-245, 1951)。蠶は有益生物として日本では研究が盛んだったが、これは幼虫の表皮に生じる星型の斑紋パターンの遺傳を解析した純粋の基礎研究。本来第3, 8節にしか生じない星紋が多数の体節に生じる系統などを記述している。後に体の前後パターンを支配していることが示されたホメオティック遺伝子の変異だったのかもしれない。

右: 客員教授(非常勤研究員)だった Flora Alice Lilienfeld が書いた木原均の業績をまとめた総説。(Cytologia 16: 101-123, 1951) 後に遺傳研第2代所長となった木原は当時京都大学所属、遺傳研兼任所員であった。

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バンク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、<http://www.shigen.nig.ac.jp/>において多数の生物種のデータベース公開に至っており、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4回開催し、文部科学省で14年度から計画されているナショナルバイオリソースプロジェクトの重要拠点として運営を進めている。

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、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）、齊藤真理（業務委託）、土屋里枝（業務委託）、阿部洋一（業務委託）、加藤宏治（業務委託）、鈴木栄美子（業務補佐員）、矢野澄子（事務補佐員）、小松まり子（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）、基

盤研究(A)「コムギのミトコンドリアゲノムの構造と遺伝子発現の解析」（代表者：常脇恒一郎）、基盤研究(A)「DNAマイクロアレーを用いたコムギの機能ゲノム育種研究システムの開発」（代表者：荻原保成）、農水省試験研究「イネゲノムシミュレーターの開発：イネ細胞系譜マーカーによる発生分化シミュレーターの開発」（代表者：倉田のり）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種のフォスフォー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. 遺伝資源情報データベースプロジェクト(SHIGEN)：山川武廣、三ツ井 和、渡辺功二、若林雅隆、齊藤真理、土屋里枝、阿部洋一、加藤宏治、鈴木栄美子、矢野澄子、小松まり子、山崎由紀子

SHIGEN プロジェクトは開始以来利用者数が倍増しており、この5年間で10倍の月間16万件に達した。生物種別では大腸菌とイネが全体の4分の3を占めている。

(1) 大腸菌データベースはゲノム情報と遺伝子情報および文献情報を遺伝資源情報と統合したこと、また遺伝子に含まれるモチーフ情報や他の微生物遺伝子との比較情報なども付加し、全体にわかりやすいインターフェースを提供したことが利用者増加に結びついたと思われる。欠失株の情報はデータベースには既に格納済みであるが未だ公開には至っていない。

オブジェクト指向型の本データベースは、SHIGEN プロジェクトの中で完成度の最も高いデータベースであるが、最新情報をタイムリーに、しかも半自動的に収集するシステムを今後導入する必要がある。

(<http://www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/pec/>)

(2) イネの統合型データベース Oryzabase はイネ遺伝資源小委員会の活動の一環として構築しているものだが、ミュータントや遺伝子辞書情報など日本発のオリジナル情報が多いことと、Web ページとしてのわかり易さ、使いやすさから、Science Online Journal の Model organism, Site of the Month (January) に選ばれた。今年度は、遺伝研保有系統の形質情報、コアコレクション、系統の画像データなどを追加し、Plant Genome Center の野生イネデータベースとの系統間リンクを実現した。国際的には、USDA-Cornell-CSH (米国農務省と Cornell Univ. Cold Spring Harbor) の Gramene データベースや IIRI (国際イネ研究所) のイネデータベースとの連携について話し合いを開始した。また国際 Plant Ontology グループが立ち上がり、Oryzabase も国際標準作りに参加する

計画である。

(<http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/>)

(3) マウスの国内データベース共通検索システム(Japan Mouse Strain Resource, JMSR)の開発を行なった。このシステムを利用することにより、独立した複数のデータベースに対して、一回の操作で全データベースを検索することができる。これは前年度マウス遺伝資源小委員会での決定事項であり、現在4機関のデータベースに対して一括検索が可能である。希望するすべての機関がこのシステムに参加できるよう、データベースの管理ソフトはフリーウェアのPOSTGRESとし、検索にはJavaを用いた。データ交換フォーマットはCSVまたはXMLを考えている。SHIGENサーバーから公開しているマウスデータベースに関しては、各データベースとJMSRシステムが完全に連携しており、各データベースの更新が自動的にJMSRシステムに反映される仕組みを実現している。

(<http://jsmr.lab.nig.ac.jp/jmsr/>)

(4) コムギ遺伝子カタログ(1998年版遺伝子カタログおよび2001年までの文献情報を含む)のデータベースを構築した。Web公開を開始する一方、登録更新およびWordフォーマットへの出力機能を装備したスタンドアロン型システムも開発した。スタンドアロンシステムの開発は、遺伝子カタログの管理者であるProf. McIntosh(Sydney University)との共同作業として実施したものであり、カタログ管理を容易にすること、および最新情報を世界中のコムギデータベースに速やかに反映させることを目的としている。

(<http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/dictionary/>)

(5) 遺伝資源情報

前年度CD-ROM発行した「世界の系統情報データベース関連サイト」の情報を基にデータベースを構築しWeb公開を開始した。30の生物種について遺伝資源情報および関連情報の最新URLアドレスを収録した。さらにデータ更新ツールおよび自動URLアドレスチェックシステムを開発して自動定期更新(週1回)を可能とした。

(<http://www.shigen.nig.ac.jp/WGR/wgr/>)

(6) ツールの開発

微生物ゲノム内の特定領域を色分けするツールとして開発したGenomePaintの機能拡張を行いversion 2.0をopen source公開した。Version 2.0ではゲノムサイズが大幅に異なる対象についても無理なく表示できるようになり、オルガネラから高等生物の染色体までの利用が可能となった。またblastによる相同検索結果をグラフィカルに表示し、taxonomy, score, e-value, Description内の特定のkeywordなどで自由に並び替えができるツ

ルBlastScopeを試作した。これら2つのツールは比較ゲノム解析に利用できると考えており、基本的にopen sourceとして育成していく計画である。

(7) その他のデータベース

以上のほか、クローニングベクターコレクションデータベース、オオムギ系統情報データベース、マウス系統情報データベース、実験動物データベース、アラビドプシス系統情報データベース、ショウジョウバエ系統情報データベースの維持管理を定常作業として行なった。

2. 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, 加藤秀樹¹, 中潟直巳², 山田源², 山村研一², 山崎由紀子¹(¹浜松医科大, ²熊大)

熊本大学動物資源開発研究センター(CARD)の寄託マウスのデータベース(CARD R-DB)を構築し、公開を開始した。研究者が作成したtransgenic mouse, targeted mutation mouse, gene trap lineを中心とした遺伝資源について、由来, 作成情報および遺伝子情報, 検定情報などを収集し、ハードコピーからの電子化とデータベース構築を実施した。データベース管理ソフトにはOracleを用い、開発は遺伝研側のマシン上で行い、公開は熊本大学のサーバーマシンからミラーリングプロトコルにより行なえるようにした。今年度は加藤氏(浜松医科大)の協力により、データベース内の系統名, 遺伝子名, 機関コードなどを国際命名規約に従った形式へ全面変換して公開に至った。

(<http://cardb.cc.kumamoto-u.ac.jp/transgenic/index.jsp>)

3. オオムギESTデータ解析およびデータベース構築：山崎由紀子, 佐藤和宏¹, 武田和義¹(¹岡山大)

オオムギの3品種(赤神力, 野生種, はるな2条)および3組織(成葉, 幼植物, 発芽シュート)計6ライブラリに由来する約2万個のESTクローンについて5'および3'側の計43000の配列を用いてUnigene探索および系統間のSNP解析を行なった。全配列のblastによるクラスタリングと、同一クラスタ内クローンのphrap解析により、10555件のUnigene候補配列を得た。つぎに各アセンブリ配列の中から品種間に見られる1塩基置換を検出し、同一品種で少なくとも2クローン以上に保存されているものをSNPと定義した場合、387クローン約1000のSNPsが抽出された。クローン配列, 相同解析結果, アセンブル結果, SNPsなどの情報をデータベース化し内部公開を開始した。さらに43420クローン計92879配列の解析および海外の同種プロジェクトとの比較解析も進行中である。

研究業績

(1) 原著論文

1. Yoshiaki Kikkawa, Ikuo Miura, Sumiyo

Takahama, Shigeru Wakana, Yukiko Yamazaki, Kazuo Moriwaki, Toshihiko Shiroishi, Hiromichi Yonekawa: Microsatellite database for MSMM/Ms and JF1/Ms, molossinus-derived inbred strains, Mammal Genome 12, 750-752, 2001.

(2) その他

1. 山崎由紀子:「遺伝子操作動物のデータベース」遺伝子医学, 5 (2), 148-155, 2001.
2. 齋藤忠夫, 伊藤敏敏, 館野義男, 山崎由紀子:「ヒト腸管起源の *Lactobacillus gasseri* (ガセリ菌) におけるラクトースの資化系の新経路の発見」日本生物工学会誌, 9 (6), 2001.
3. SHIGEN DB <http://www.shigen.nig.ac.jp/>

(3) 発表講演

1. 山崎由紀子:「生物遺伝資源情報データベースの整備とその利用」日本生物工学会 山梨, 9月.
2. 佐藤和広, 武田和義, 山崎由紀子, 小原雄治:「オオムギに見出された一塩基置換多型」育種学会, 福岡, 10月.
3. 守口和基, 伊藤幸博, 山崎由紀子, 倉田のり:「酵母核輸送トラップ (NTT) システムを用いたイネ核タンパク質の大量スクリーニング」育種学会, 福岡, 10月.
4. 荻原保成, 根本康江, 村井耕二, 山崎由紀子, 新井理, 小原雄治:「倍数性コムギの EST 解析」第 24 回日本分子生物学会 横浜, 12月.
5. 山川武広, 三ツ井 和, 山崎由紀子:「比較ゲノム解析支援ツールとしての GenomePaint」第 24 回日本分子生物学会 横浜, 12月.
6. 守口和基, 伊藤幸博, 山崎由紀子, 倉田のり:「酵母核輸送トラップ (NTT) システムによるイネ核タンパク質の大量スクリーニング」第 24 回日本分子生物学会 横浜, 12月.
7. 坂井隆治, 三浦郁生, 高浜純代, 山田聡美, 鹿江雅光, 山崎由紀子, 城石俊彦, 吉川欣亮, 米川博通:「実験用マウスの起源: マウスゲノムの多様性と染色体進化」第 24 回日本分子生物学会 横浜, 12月.
8. Yukiko Yamazaki: Genetic Resource Information DB Project in Japan (SHIGEN): ICIS Workshop, Philippine, May.
9. Yukiko Yamazaki: Plant Genetic Resource Databases in Japan. Plant Genome Workshop Norwich, UK, August.
10. 大島 悟, 川井 泰, 北澤春樹, 館野義男, 山崎由紀子, 齋藤忠夫:「ヒト腸管起源 *Lb. gasseri* JCM1031 からの第 3 のラクトース資化性酵素は, 真性ホスホ-β-グルコシダーゼか?」日本畜産学会, 東京, 2002年3月.
11. Tateno Y., Yamazaki Y. and Saito T.: Evolution of the lactose Intake pathway In *Lactobacillus gasseri*, 5th Anton Dohrn Workshop October, Naples, 2001.

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を進めると共に, 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おこなっている.

研究室構成は, 小原雄治 (教授), 安達佳樹 (助手), 川崎一郎 (科学技術振興事業団「さきがけ」研究者), 伊藤将弘, 平木秀明 (科研費ポスドク), 鹿児島浩 (未来開拓研究事業ポスドク), 岸本憲人 (日本学術振興会特別研究員, 4月から), 梶田 睦 (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, 3月まで), 新井 理 (㈱インフォコム, 業務委託), 小川知之 (㈱ CTI, 業務委託), 川口久美子 (業務委託), 廣野啓子, 植田ゆみ子 (以上 2名, 科研費派遣技術員), 大庭登紀江, 杉浦郁子, 小原真澄, 鈴木孝美, 岩田未菜 (2月まで), 大石加寿子, 杉山康子, 林 宏子, 太田ふみ子, 西坂聡子, 芳賀しのぶ, 三浦沙知子, 森下知美 (5月から), 大地弘子 (6月から), 梶原淳子 (7月から), 土方千尋 (7月から) (以上 17名, 科研費派遣研究補助員), 佐野正子, 上杉裕子, 野本久代, 芹澤路子, 中田恭子, 長谷川範子, 水越ますみ, 坂本直子 (4月から) (以上 8名, パート実験補助員), 杉本章子, 大沼まゆみ (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 2-3 月の 2 ヶ月間 Jean Thierry-Mieg と Danielle Thierry-Mieg (共に NCBI, NIH, USA) が研究室に滞在し, 共同研究をおこなった.

本年の研究は, 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, 線虫遺伝子ライブラリーについて活動した. これに加え, 特定領域研究 C 「統合ゲノム」 総括班研究支援事業として, DNA シーケンシング施設を立ち上げ (アカデミア DNA シーケンシングセンター) 班員との共同作業を進めた. また, それに伴うリソースセンター事業も開始した.

(1) 遺伝子ライブラリー事業: 杉山康子, 杉本章子, 大沼まゆみ, 小原雄治

(a) 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整列クローンライブラリーの維持, 配布, 情報収集を続けた. 大腸菌全ゲノムを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「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2001年中に10件、のべ982クローンを3ヶ国(日本、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、31ヶ国840件、のべ11,539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。

(b) 線虫 *C.elegans* 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WWWで公開しており(<http://helix.genes.nig.ac.jp/db/>),ここで解析使用されたcDNAクローンについては研究者からのリクエストに応じて配布をしている。2001年には789件のべ4,249クローンを21ヶ国(アメリカ、日本、イギリス、カナダ、ドイツ、スイス、台湾、韓国、フランス、イタリア、香港、スウェーデン、チェコ、オランダ、イスラエル、ベルギー、ポルトガル、デンマーク、オーストラリア、フィンランド、ハンガリー(件数順))の研究者に分与した。これまで(1995年-2001年)の累計は、26ヶ国4,061件、のべ19,161クローンにのぼっている。

(c) リソースセンター事業

次に述べるDNAシーケンシングセンターで解析されたcDNAクローンの維持・配布を今秋から開始した。現在のところ、ホヤ及び粘菌のcDNAクローンを配布している。

(2) アカデミアDNAシーケンシングセンター事業: 大石加寿子, 芳賀しのぶ, 西坂聡子, 林 宏子, 太田ふみ子, 三浦沙知子, 森下知美, 佐野正子, 野本久代, 長谷川範

本年の処理数と共同研究班員は以下の通りである。

	生物種	依頼者	処理数	登録シーケンス数	備考
E S T	線虫	計画研究: 小原雄治 (遺伝研)	29,184	22,917	
	ユウレイボヤ	計画研究: 佐藤矩行 (京大)	220,896	158,991	
	マボヤ	公募研究: 真壁和裕 (京大)	50,304	39,652	
	メダカ	計画研究: 武田洋幸 (遺伝研) 公募研究: 工藤 明 (東工大)	55,296	38,625	
	シクリッド	計画研究: 岡田典弘 (東工大)	15,360	11,782	
	ツメガエル	公募研究: 餅井真 (姫路工大) + カエル研究コミュニティ	96,192	73,640	
	粘菌	領域3計画研究: 田仲可昌 (筑波大) + 粘菌研究コミュニティ	89,472	54,976	
	オオムギ	公募研究: 佐藤和広 (岡山大)	146,688	92,379	
	コムギ	公募研究: 荻原保成 (横浜市大) + コムギ研究コミュニティ	215,328	115,211	

子, 水越ますみ, 新井 理, 川口久美子, 小原雄治

ゲノム研究においては基盤情報作りにおいて一定以上の量をこなす必要があるが、大学研究室連合である特定領域研究にとってこれまで最大の弱点であった。そこで特定C「統合ゲノム」総括班ではスケールメリットが期待できるDNAシーケンシングとヒト多型タイピングを研究支援事業とし推進することとした。このうちDNAシーケンシングについては領域代表でもある小原の研究室で運営することにし、本年初めにプレハブ棟が完成し本格稼働を開始した。今年末には、キャピラリーシーケンサー(ABI3700)20台をフル稼働する体制ができあがり、400万リード/年のキャパシティに達した。当初は特定C「ゲノム」4領域班員の様々な生物のESTが中心であったが、シーケンシングキャパシティが上がったこともあり、ホールゲノムショットガンへ移行しつつある。ESTにあっては適切なcDNAライブラリーが班員から送付され、それ以後一切をセンターで行い、シーケンスデータと必要があればBLAST解析やクラスタリングをおこない、これらのデータを班員に送る。また、ESTクローンはレプリカを班員に返すと共に当センターでも保管し、(必要なら)上述のように班員に代わって配布作業をおこなう。ゲノム配列決定にあっては、BACやゲノムDNAが班員から送付され、ショットガンライブラリー作成から以後ショットガンアッセムブリとコンティグのホモロジー解析(BLAST, Pfam, など)までを当センターでおこなう。ギャップフィリング、アノテーションは班員グループの協力を得て進めている(論文7,9,10)。

	生物種	依頼者	処理数	登録シーケンス数	備考
EST	ヒメツリガネゴケ	公募研究：長谷部光泰（基生研）	26,880	19,462	
	原始紅藻	領域3計画研究：黒岩常祥（東大）	41,952	35,311	
	合計		987,552	662,946	
ゲノム			有効リード数	結果	備考
	ショウジョウバエ 異所発現ベクター 挿入サイト	計画研究：林茂生（遺伝研） + NP コンソーシアム		2,500 カ所	
	メダカ Hox 領域	計画研究：堀寛（名大）	20,000	BAC 6 本 1200Kb	
	霊長類ゲノム 1% (30Mb)	計画研究：斉藤成也（遺伝研）		ゴリラ fosmid 3 本	
	ホヤ (160Mb)	計画研究：佐藤矩行（京大）	39,214 486,211	BAC 10 本 ホールゲノム 2X	
	原始紅藻 (16Mb)	領域3計画研究：黒岩常祥（東大）	301,760	10X	終了
	近縁線虫(100Mb) Pristionchus	計画研究：小原雄治（遺伝研）	11,262	BAC 2 本	

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、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。そして、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・機能マップを構築するものである。上述のように、ここで得られたクローンは内外の研究者に分与しているため、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。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) *C.elegans* トランスクリプトーム解析：Jean Thierry-Mieg¹⁾, Danielle Thierry-Mieg¹⁾, 新井理, 鈴木穰²⁾, 菅野純夫²⁾, 上杉裕子, 大石加寿子, 芳賀しのぶ, 西坂聡子, 林宏子, 太田ふみ子, 三浦沙知子, 森下知美, 佐野正子, 野本久代, 小原雄治 (¹⁾NCBI, NIH, USA, ²⁾東

京大学医科学研究所)

発生時期などにより 7 種類の mRNA から通常法及びオリゴキャッピング法で cDNA ライブラリーを構築し、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 12 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。この過程で、Marc Vidal ら（米国マサチューセッツ総合病院）らとの共同研究により、ORF 検索と合わせて、遺伝子総数が 19000 程度であることを示した（論文 3）。

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部分のみ（400-500 塩基）である。しかし、その先も配列情報は十分保持しているため、ゲノム配列と比較してエキソン・イントロン構造を確定していくためのプログラムを開発した。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出てくるので、これを繰り返す。このやりかたでは、800 塩基程度まで合わせることができると、mRNA の平均鎖長（1.5-2Kb）のクローンであれば、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。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が入るが、その結果、約 1 万遺伝子の構造を確定した。多数の alternative splicing を検出し、遺伝子あたり平均 1.7 種の mRNA、1.4 種のタンパクコーディン

グ配列を見いだした。ちなみに、最小のエキソンは9ベースであり、アスパラギン酸・アスパラギン・アラニンをコードしていた(これらのアミノ酸の略号はD・N・Aである!)。Genefinderなどコンピュータによる遺伝子予測は特に長いイントロンが苦手であり、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(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る。また,系統的RNAi解析にも用いた(論文2)。

(2) 発現パターンの解析: 杉浦郁子, 大庭登紀江, 小原真澄, 鈴木孝美, 上杉裕子, 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た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9000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。幼虫から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) x 領域10x 強度3 = 420次元の情報となる。これらはNEXTDB <<http://nematode.lab.nig.ac.jp>>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)も構築した(芹澤路子ら,公開予定)。また,個別遺伝子の *in situ* 解析の共同研究も多数進めた(論文1,4)。

in situ 解析と並行して,cDNAマイクロアレイ解析もおこなった。分類した代表クローンのうち7500クローンの挿入cDNAをベクタープライマーを用いて大量に増幅し,poly-L-lysineコートスライドガラスやナイロンメンブレンにスポットして,様々な共同研究に供した(論文5)。

(3) 発現調節領域の解析: 伊藤将弘, 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。これらは時間的空間的な発現制御を受けており,発現制御システムの抽出のためには,共通の制御を受ける遺伝子群の抽出と制御領域の比較が必要であるので,発現パターンデータのクラスタ解析をおこなった。約7000遺伝子のデータを,まず因子分析を行った結果,発現時期(時間軸)と発現細胞(空間軸)にそって54クラスターに分類

された。これをさらにワード法で詳細なクラスタリング解析をおこなった。最大のクラスタは腸系譜に関わるものであった。この系譜は6細胞期のEという1個の細胞に由来するが,さらに細分すると,E細胞が分裂して腸に分化する時系列で少しずつずれて時期特異的に発現(この場合は転写)開始するものに分類された。興味深いことに,解析データに含まれていたリボゾームタンパクの9割以上が腸系譜で中期胚から発現が開始するグループに含まれていた。タンパクとしては全ての細胞に存在するものであり,転写が特定細胞の特定時期に一斉に開始するのは意外ではあるが,リボゾームという構造体の構成成分が共通制御を受けるのは理にかなっている。そこでこの遺伝子群について上流配列2500bpを切り出し,ウィンドウ解析,マトリックス解析やペア配列の出現頻度解析を行った。その結果,コーディング領域より5'上流に一定の間隔をおいて並ぶ7,10,7塩基長の3つのモチーフ(それぞれ1,2,1塩基のミスマッチを許容)を見いだした。同様な解析を,体壁筋系譜でもおこない,こちらではやはり5'-上流に12,11,12,10塩基長のモチーフを見いだした。このような候補モチーフについて実験的検証を計画している。

3. 線虫 *C.elegans* 発生における遺伝子発現・機能の解析

(1) 母性発現遺伝子サブセットのRNAi/4D顕微鏡解析: 廣野啓子, 中田恭子, 小原雄治

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。この過程は多くを母性遺伝子に依存している。しかし,母性で発現する遺伝子は,ハウスキーピング遺伝子を含み全遺伝子の半分を占める。そこで,このうち「2細胞期から原腸陥入開始期までにその発現が消失あるいは局在する遺伝子群」に注目した。経験上,胚発生に重要な役割をもつ遺伝子はこのような発現をすることが多いからである。約5000遺伝子の発現解析が行われた時点でこのクラスに分類された477遺伝子についてRNAi(RNA mediated interference)による機能解析を行った。具体的には標準N2株に各遺伝子の2本鎖RNAを顕微注入し,注した親虫,F1胚,孵化した幼虫(escaper)の成長,生殖能,形態等の表現型観察を行った。その結果,65%という高率で表現型が見られた。5%にF1数の減少,33%にF1胚致死,27%にescaperのみでの異常であった。強いF1胚致死を示す61遺伝子について4D顕微鏡で詳細に調べた結果,受精/最終減数分裂から8細胞期までの時系列での異常に分類できた。

そのうち最も早期の異常である「受精後分裂なし」の12遺伝子のうち6遺伝子はプロテアソーム関連遺伝子であった。線虫では20Sプロテアソームとして14遺伝子,19S複合体として19遺伝子が予測されており,これらの

うち、われわれのライブラリーに存在するが上記 5000 遺伝子に含まれていなかったものについて調べたところ、類似の母性発現を示し、RNAi 実験では受精卵は全く分裂が観察されず、減数分裂の途中で停止が示唆された。プロテアソームは他生物で卵母細胞成熟や受精に関与していることが明らかにされており、線虫における機能解析を進めている。

(2) *C. elegans* の母性 mRNA の翻訳調節における POS-1 と PIP-1 の役割：小倉頭一¹⁾、岸本憲人、安藤恵子²⁾、三谷昌平²⁾、小原雄治^{(1)現、横浜市立大学医学部、^{2)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。この時母性 mRNA の翻訳調節が重要であることが知られている。*glp-1* 遺伝子 (Notch ホモログ) の母性 mRNA 全割球に一樣に分配されるが、2 細胞期の前側割球 AB でのみ翻訳され、4 細胞期には前側 2 割球 (ABa, ABp) の細胞膜に局在する。同様に後側割球 P2 でのみ翻訳される *apx-1* 遺伝子 (Delta ホモログ) とシグナル伝達をおこない、本来等価であった ABa, ABp のうち P2 と接触した ABp の運命を変える。この *glp-1* mRNA の翻訳制御は 369 塩基長の 3'-UTR を介しておこなわれ、その中央部の 66 塩基長領域 (SCR) が空間的制御、そのうしろ 125 塩基領域 (TCR) が時間的制御に重要であることが知られている。

われわれは CCCH Zinc finger タンパクである母性遺伝子 *pos-1* タンパクが *glp-1* SCR に結合して、*glp-1* の翻訳を負に制御していることを、*pos-1* 変異体での *glp-1* タンパクの発現解析と *pos-1* タンパクと *glp-1* 3'-UTR 間の Tri-hybrid 解析をおこない、明らかにした。さらに、*pos-1* と相互作用する遺伝子を Two-hybrid 解析で探索し、RNP タイプ RNA 結合ドメインをもつ *pip-1* 遺伝子を同定した。*pip-1* タンパクは *pos-1* タンパクより早く卵母細胞から発現があり、2 細胞期以降の後側割球の細胞質で *pos-1* タンパクと分布が重なる。*glp-1* mRNA の翻訳への役割を調べた結果、*pos-1* とは反対に *pip-1* は正に制御しており、TCR の一部に結合することがわかった。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。(論文投稿中)

(3) 線虫 *C. elegans* における細胞特異的エンハンサーの系統的解析：鹿兒島浩、小原雄治

遺伝子の特異的発現はどのようなメカニズムによって制御されているのか? 本研究では、線虫 *C. elegans* で細胞特異的に発現する多数の遺伝子の調節領域を解析し、

その発現の細胞特異性を制御する転写調節機構の解明をめざす。

線虫においては、特定の細胞で発現する遺伝子が数多く報告されている。同一の細胞で発現する遺伝子群の中には、同じ転写因子(群)によって制御を受ける遺伝子が存在すると考えられ、これらは共通の調節配列を持つ可能性が高い。そこで、特定の細胞(特に感覚神経細胞)で発現している遺伝子を多数集め、これら遺伝子の調節領域を系統的に欠損させた配列と GFP 遺伝子とを持つレポーター DNA を線虫に導入し、その発現パターンを *in vivo* で観察することにした。この方法によって細胞特異的な発現に最小限必要な領域を絞り込み、これらを比較することによって個々の細胞での発現を制御する調節配列を同定する。

我々はまず、温度受容神経 AFD に特異的な発現を行う遺伝子群について解析を行った。その結果、現在までに、ホメオボックス型転写因子 *ceh-14*、グアニル酸環状化酵素 *gcy-8*、核受容体型転写因子 *nhr-38*、および 7 回膜貫通型受容体 *srq-6* の AFD での特異的発現を制御する領域が、それぞれ上流 0.7kb, 0.1kb, 0.2kb, 1kb であることを明らかにした。また、細胞特異的発現のための制御領域は比較的小型で、一ヶ所に固まって存在していること、特異性を決めるためには負の転写制御機構が重要な役割を果たすことが示唆された。

(4) 線虫における生殖顆粒の分子解析：川崎一郎、梶原淳子、小原雄治

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細胞に発生の全段階を通して観察される。P granules は未同定の RNA 成分と複数のタンパク質成分から構成されているが、その分子的全貌と機能の多くはまだ解明されていない。これまでに分子遺伝学的な解析により P granules の主要な構成タンパク質である PGL-1, 2, 3 を同定し、これらのうち特に PGL-1 と PGL-3 は発生の全段階を通して P granules に局在し、また RNA 結合モチーフである RGG box を持つことから、P granules 中で主要な RNA 結合タンパク質として機能していると考えられた。また、mRNA キャップ結合タンパク質である eIF4E が P-granules の構成成分であることを米国インディアナ大学の Strome 研究室との共同研究で明らかにした(論文 8)。

われわれは P granules の分子的全貌と機能の全貌解明をめざして以下の解析を進めた。第 1 には、PGL-1 および PGL-3 がどのような RNA 成分または他のタンパク質成分と相互作用するかであり、このために、抗 PGL-1 抗体等を用いて Pgranules 複合体を回収し、サブトラクション法、プロテオーム解析を用いて RNA 成分およびタンパク質を同定することを試みた。第 2 には、P granules と同様生殖系列に特異的に発現する遺伝子群のあぶりだし

である。このため、当研究室で行われている体系的 *in situ* hybridization の結果に基づいて始原生殖細胞 Z2, Z3 に特異的に発現している mRNA72 種について soaking 法による RNAi 解析をおこなった。その結果、37 遺伝子に表現型が現れた。現在、表現型の詳細な検討をおこなっている。

(5) 線虫 T-box 遺伝子 *tbx-9* 標的遺伝子群の探索：安達佳樹

DNA 結合モチーフ T-box を持つ遺伝子は、多細胞動物の形態形成などに関わる転写因子ファミリーを構成する。線虫 *C. elegans* T-box 遺伝子 *tbx-9* は、胚発生期に腸、筋肉、表皮の前駆細胞で発現し、その遺伝子破壊変異体は形態形成異常を示す。また、*tbx-9* と高い相同性を持つ T-box 遺伝子 *tbx-8* もよく似た発現パターンや機能欠損表現型を示し、更にこれら遺伝子の二重機能欠損表現型はそれぞれ単独の表現型を合わせたものより強くなることから、これら遺伝子間には機能的重複が推測される。

tbx-9 により発現制御を受ける標的遺伝子群の同定をめざし、*tbx-9* 産物量の増減により発現量が変化する遺伝子を、cDNA マイクロアレイ解析により探した。*tbx-9* 産物量の調整には、ヒートショックプロモーターによる *tbx-9* 発現誘導や、feeding RNAi による *tbx-9* および *tbx-8* 機能喪失を利用した。*in situ* ハイブリダイゼーションにより発現パターンの変化を確認した結果、これまでに、*tbx-9* 産物が存在する形態形成開始 bean 期の背側表皮前駆細胞において、発現が消失する 4 遺伝子を見つけた。これら遺伝子に対する RNAi では胚発生期に異常は見いだされていない。*tbx-9* により直接制御を受ける標的遺伝子であるのか更なる解析が必要である。

4. 線虫発生のコンピュータモデル化の研究

(1) 物理モデルを用いた線虫初期胚の細胞配置シミュレータの構築：梶田 睦，山村雅幸¹⁾，小原雄治¹⁾ 東京工業大学大学院理工学研究科)

細胞配置は、発生過程において重要な役割をはたしている。線虫 *Caenorhabditis elegans* の初期発生過程では、細胞配置によって空間的に制限された細胞間相互作用のために細胞の運命が決定されることが知られている。例えば、4 細胞期の ABp 割球は P2 割球と接触することによって初めて ABp 固有の細胞運命が決定される。線虫は卵から成虫までの全細胞系譜が調べられており、その細胞系譜や細胞配置は非常に再現的である。一方、個々の細胞は状況に合わせてダイナミックに変形したり、動くことができる。ダイナミックな発生過程にも関わらず一定の細胞配置が再現されるのは、細胞が持つ力学的特性が大きく関わっていると考えられる。

そこで本研究では、細胞の形状を力学モデルによって

構成し、細胞分裂にともない細胞配置が決定される現象を再現するシミュレータの構築を試みた。本シミュレータは、(1) 細胞の形状を質点のメッシュ状の袋としてモデル化、(2) 体積を一定に保つ、そして細胞形状を保つルールを導入、(3) 細胞分裂を紡錘体構造による細胞伸長・収縮環の収縮による細胞質分裂という二つの現象で構成、(4) 卵殻による細胞移動の制限の導入、以上により実装した。初期胚の 1~4 細胞期に対するシミュレーションを行った結果、実際の 1~4 細胞期胚と同じ細胞配置 (4 細胞がダイヤモンド状に並ぶ) を得ることができた。さらに、様々なパラメータに対して 1~4 細胞期の初期胚のシミュレーションを行い、提案するシミュレータの検証を行なった。

(2) 線虫胚発生における細胞形状モデルの半自動生成システム：平木秀明，小原雄治

線虫 *C. elegans* は、透明で細胞数が少ないため、発生の過程を詳細に観察することができる優れた系である。発生においては細胞間相互作用が重要な役割を果たすので細胞の形状・配置・隣接関係の把握が非常に重要である。当研究室では、線虫の初期発生の時系列 3 次元微分干涉顕微鏡画像から各細胞の形状のポリゴンモデルを作成し、初期発生における遺伝子発現調節モデルや卵割の力学モデルを構成するための基礎データとして、あるいは様々なタンパク質の抗体染色像と重ね合わせて局在を同定するための鋳型として利用してきた。しかし、微分干涉画像から細胞境界を自動的に抽出することは極めて困難であるため、このポリゴンモデルの構築には、画像上で各細胞の輪郭を手作業によりトレースする、ということを経るを得ず、作成には多くの時間と労力が必要であった。

そこで本研究では、細胞膜を蛍光染色して共焦点顕微鏡で観察した時系列 3 次元画をもとに、計算機を用いて自動的に細胞モデルを構築するシステムの開発を進めてきた。具体的には、3 次元画像上における領域拡張法により細胞形状を抽出するプログラムと、画像の距離変換フィルタを用いて各領域の種 (たね) にする点の候補を抽出するプログラムを作成し、24~200 細胞期の画像データに応用した結果、各時期の細胞の形状モデルを生成することに成功した。現在のところ、種となる点の候補から実際に用いるものを選択する過程に関しては対話的操作で指定した方が良い結果が得られるため、完全には自動化されていないが、さらに自動化や改善を進めるとともに、時系列のデータから細胞系譜を構成して 4 次元データベース化できるように計画中である。その上で、近縁種や RNAi 等による変異体の間で細胞の配置・隣接関係の比較に応用する。

研究業績

(1) 原著論文

1. 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.* **276**, 11913-11921, April 13, 2001.

2. 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**, 171-176, 2001.

3. 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., Vandenhaute, J., Lamesch, P., Hill, D. & 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.

4. Navarro, R.R., Eun Yong Shim, E.-Y., Kohara, Y., Singson, A. and Blackwell, T.K.: *cgh-1*, a Conserved Predicted RNA Helicase Required for Gametogenesis and Protection from Physiological Germline Apoptosis in *C. elegans*. *Development* **128**, 3221-3232, 2001.

5. Hanazawa, M., Motii, 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* **98**, 8686-8691, 2001.

6. Altun-Gultekin, Z., Andachi, Y., Tsalik, E.L., 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.

7. Satou, Y., Takatori, N., Yamada, L., Mochizuki, Y., Hamaguchi, M., Ishikawa, H., Chiba, S., Imai, K., Kano, S., Murakami, S., Nakayama, A., Nishino, S., Sasakura, Y., Satoh, G., Shimotori, T., Shin-i, T., Shouguchi, E., Suzuki, M., Takada, N., Utsumi, N., Yoshida, N., Saiga, H., Kohara, Y., Satoh, N.: Gene expression profiles in *Ciona intestinalis* tailbud embryos. *Development* **128**, 2893-2904, 2001.

8. Amiri, A., Keiper, B.D., Kawasaki, I., Fan, Y., Kohara, Y., Rhoads, R.E., Strome, S.: An isoform of eIF4E is a component of germ granules and is required for spermatogenesis in *C. elegans*. *Development* **128**, 3899-3912, 2001.

9. Nishikata, T., Yamada, L., Mochizuki, Y., Satou,

Y., Shin-i, T., Kohara, Y., Satoh, N.: Profiles of maternally expressed genes in fertilized eggs of *Ciona intestinalis*. *Developmental Biology* **238**, 315-331, 2001.

10. Inaba, K., Padma, P., Satou, Y., Shin-i, T., Kohara, Y., Satoh, N. and Satou, Y.: EST analysis of gene expression in testis of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Molecular Reproduction and Development* (in press).

11. Morino K, Katsumi H, Akahori Y, Iba Y, Shinohara M, Ukai Y, Kohara Y, Kurosawa Y.: Antibody fusions with fluorescent proteins: a versatile reagent for profiling protein expression. *J. Immunol Methods*. **257**(1-2), 175-84, 2001.

(2) その他

1. 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.

2. 小原雄治：線虫の発生遺伝子の網羅的測定. 「システムバイオロジーの展開(北野宏明編)」(シュエプリンガー・フェアラーク東京) 77-86, 2001.

3. 小原雄治：ゲノム研究事始め - 遺伝学と生化学, 工作少々. 蛋白質核酸酵素, **46**, 2183-2187, 2001.

4. 小原雄治, 榊佳之：ゲノムサイエンス：世界と日本の動向, 今後の展開. 蛋白質核酸酵素, **46**, 2225-2231, 2001.

5. 小原雄治：線虫ゲノムの体系的発現解析. 蛋白質核酸酵素, **46**, 2425-2431, 2001.

(3) 発表講演

1. 小原雄治：これからのゲノム科学 Evo, Devo の愉しみ, 特定領域 (B) 「メダカに学ぶ脊椎動物ゲノム再編の分子基盤」公開シンポジウム, 東京, 2001年1月23日.

2. 小原雄治：ゲノムから個体へ - 機能ゲノム科学の進展, 特定領域 A 「ゲノムサイエンス」公開シンポジウム, 東京, 2001年1月26日.

3. 小原雄治：生物進化多様性とゲノム科学の総合, 総合研究大学院大学国際シンポジウム一般講演会「21世紀の総合ゲノム科学」, 横浜, 2001年3月17日.

4. 小原雄治：生命システムの理解と *in silico* 再現をめざして. 第28回知能システムシンポジウム, 特別講演. 東京, 2001年3月28日.

5. 小原雄治：ヒトゲノム理解に向けて - 線虫ゲノムの網羅的発現機能解析. 第90回日本病理学会春期総会シンポジウム「疾患モデル研究の戦術・戦略 - ポストゲノム時代への視座」東京, 2001年4月5日.

6. Kohara, Y.: Developmental expression map of *C. elegans* genome - Towards *in silico* reconstruction of worm development - Genome 2001 Symposium, National Yong-Ming University, Taipei, May 29 2001.

7. Kohara, Y.: Genomics, bioinformatics and resources in Japan. NHRI Research Resources Series.

Taipei, May 30, 2001.

8. 小原雄治:「線虫の網羅的な遺伝子発現機能解析」——発生コンピュータ上再現を目指して——. 遺伝研・理研 GSC 合同公開シンポジウム, 東京, 2001 年 6 月 7 日.

9. 小原雄治: 遺伝子数のパラドックスゲノムは生命をどのように規定するのか? 総合研究大学院大学講演会, 東京, 2001 年 6 月 9 日.

10. 小原雄治: 線虫発生の機能ゲノム科学. JST 戦略的基礎研究推進事業「生命活動のプログラム」シンポジウム, 東京, 2001 年 6 月 13 日.

11. Kohara, Y., Sugiura, I., Oba, T., Obara, M., Suzuki, T., Shin-i, T., Ueta, Y., Iwata, M., Hirono, K., Nakata, K., Ito, M., Minakuchi, Y., Serizawa, M.: Developmental expression map of *C.elegans* genome. 13th International *C.elegans* Meeting, Los Angeles, USA, June 22-26, 2001.

12. Thierry-Mieg, J., Thierry-Mieg, D., Suzuki, Y., Sugano, S., Oishi, K., Sano, M., Nomoto, H., Haga, S., Nishizaka, S., Hayashi, H., Ohta, F., Miura, S., Uesugi, H., Thierry-Mieg, Y., Simonyan, V., Lowe, A., Shin-I, T. and Kohara, Y.: The worm transcriptome project. 13th International *C.elegans* Meeting, Los Angeles, USA, June 22-26, 2001.

13. Ogura, K., Mitani, S., Gengyo-Ando, K. and Kohara, Y.: Translational control of maternal *glp-1* mRNA by POS-1 and its interacting protein PIP-1. 13th International *C.elegans* Meeting, Los Angeles, USA, June 22-26, 2001.

14. Barstead, R., Dsouza, A., Edgley, M., Gengyo-Ando, K., Gilchrist, E., Holmes, J., Jones, S., Kohara, Y., Lansdale, M., McKay, S., Machiyama, E., Mitani, S., Moerman, D., Moulder, G., Noguchi, S., Osborn, J., Shen, B., Tamura, M., Viswanathan, M.: The *C. elegans* Knockout Consortium: Interim Report. 13th International *C.elegans* Meeting, Los Angeles, USA, June 22-26, 2001.

15. Kohara, Y.: Functional genomics of *C.elegans* development. 14th International Congress of Developmental Biology, Kyoto, July 9, 2001.

16. 小原雄治: 生物遺伝資源としてのショウジョウバエ. 日本ショウジョウバエ研究会第 5 回研究集会, シンポジウム. 三島, 2001 年 8 月 10 日.

17. 小原雄治: SimWorm に向けて - 線虫の体系的な遺伝子発現・機能解析. 「21 世紀の先端生命科学」慶応義塾大学先端生命科学研究所オープン記念シンポジウム, 鶴岡, 2001 年 10 月 19-21 日.

18. 小原雄治: 線虫 *C.elegans* の機能ゲノム科学. 第 74 回日本生化学会大会シンポジウム「*C.elegans* に展開する生命科学研究<ゲノム・プロテオーム・グライコーム>, 京都, 2001 年 10 月 26 日.

19. Kohara, Y.: Functional genomics of *C.elegans* towards comparative genomics. Symposium on Evolutionary Genomics, Atami, 5, 2001.

20. 小原雄治: 生命メカニズムの理解—創薬に向けて, 第 6 回静岡健康・長寿学術フォーラム, 静岡, 2001 年 11 月 10 日.

21. 小原雄治: ゲノムから個体へ - 線虫発生の体系的遺伝子発現・機能・ネットワーク解析. 第 6 回分生研シンポジウム「ポストゲノム研究 2001: 情報・機能解析・相互作用」, 東京, 2001 年 11 月 15 日.

22. 小原雄治: ゲノム時代のバイオリソースの重要性. 理化学研究所バイオリソースセンター公開シンポジウム, つくば, 2001 年 11 月 20 日.

23. 小原雄治: どのようにしてゲノムから生き物ができるのだろう? 特定領域研究「ゲノムサイエンス」公開講演会「ゲノムから見る生命のふしぎ」, 東京, 2001 年 12 月 1 日.

24. 小原雄治: 線虫のゲノムサイエンス. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001 年 12 月 9-12 日.

25. 伊藤将弘, 芹澤路子, 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 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001 年 12 月 9-12 日.

26. 小原雄治: 生命システム解明に向けた統合的ゲノム研究. 生命化学研究会第 4 回シンポジウム, 横浜, 2001 年 12 月 13 日.

27. 小原雄治: 生物遺伝資源委員会の活動報告. 遺伝研研究集会「生物遺伝資源の評価」新パラダイム構想に向けて, 三島, 2001 年 12 月 14 日.

28. Yuji Kohara: Functional genomics towards understanding of the mechanisms of life. 第 4 回内分泌攪乱化学物質問題に関する国際シンポジウム」つくば, 2001 年 12 月 16 日.

(以下ポスター発表)

29. H. Kagoshima, Y. Kohara: Systematic identification of cell specific enhancers in *C.elegans*. 13th International *C.elegans* Meeting, Los Angeles, USA, June 22-26, 2001.

30. Kajita, A., Yamamura, M., Kohara, Y.: Computer Simulation of Early Cleavage of *C. elegans* Embryo. 13th International *C.elegans* Meeting, Los Angeles, USA, June 22-26, 2001.

31. Hirono, H., Nakata, K., Ueta, Y., Iwata, M., Ito, M. and Kohara, Y.: Systematic RNAi analysis of maternal genes reveals the function of proteasome in oocyte maturation and fertilization. 13th International *C.elegans* Meeting, Los Angeles, USA, June 22-26, 2001.

32. Shin-i, T. and Kohara, Y.: NEXTDB: The nematode expression pattern database. 13th International *C.elegans* Meeting, Los Angeles, USA, June 22-26, 2001.

33. Andachi Y.: Toward an understanding of *t bx-9*. 3th

International *C.elegans* Meeting, Los Angeles, USA, June 22-26, 2001.

34. 岩橋 潤, 川崎一郎, 小原雄治, 大島靖美, 豊田哲也: 線虫の発生における nRTN-C の発現. 第 74 回日本生化学会大会, 京都, 2001 年 10 月 27 日.

35. 園田理沙, 浦和 寛, 富永伸明, 上杉裕子, 宮原真紀, 小原雄治, 井口泰泉, 有菌幸司: *C.elegans* cDNA マイクロアレイを用いたステロイドホルモン応答遺伝子の検索. 第 74 回日本生化学会大会, 京都, 2001 年 10 月 28 日.

36. 岸本憲人, 小倉頭一, 小原雄治: 線虫 *C. elegans* 母性 mRNA の翻訳調節における POS-1 の機能解析. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001 年 12 月 9-12 日.

37. 鹿兒島浩, 小原雄治: 線虫 *C. elegans* における細胞特異的エンハンサーの系統的解析. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001 年 12 月 9-12 日.

38. 新井 理, 伊藤将弘, 水口洋平, 芹澤路子, Jean Thierry-Mieg, Danielle Thierry-Mieg, 杉浦郁子, 大庭登紀江, 小原真澄, 鈴木孝美, 大石加寿子, 佐野正子, 野本久代, 芳賀しのぶ, 西坂聡子, 林 宏子, 太田ふみ子, 三浦沙知子, 森下知美, 坂本直子, 鈴木 穰, 菅野純夫, 植田ゆみ子, 大地弘子, 土方千尋, 岩田未菜, 廣野啓子, 中田恭子, 上杉裕子, 杉山康子, 小原 雄: NEXTDB: *C.elegans* 発現パターンマップデータベース. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001 年 12 月 9-12 日.

39. 廣野啓子, 中田恭子, 小原雄治: 線虫母性発現遺伝子の体系的 RNAi 解析 - プロテアソームの卵母細胞成熟と受精への関与 -. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001 年 12 月 9-12 日.

40. 梶田 睦, 山村雅幸, 小原雄治: 物理モデルを用いた線虫初期胚の細胞配置シミュレーション. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001 年 12 月 9-12 日.

41. 小川知之, 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 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001 年 12 月 9-12 日.

42. 平木秀明, 小原雄治: 線虫胚発生における細胞形状モデルの半自動生成システム. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001 年 12 月 9-12 日.

43. 川崎一郎, 梶原淳子, Strome, S., 小原雄治: 線虫における生殖顆粒の機能解析 - 構成タンパク質 PGL-1, 2, 3 を用いたアプローチ. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001 年 12 月 9-12 日.

44. 安達佳樹: 線虫 T-box 遺伝子 *tbx-9* 標的遺伝子群の探索. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001 年 12 月 9-12 日.

45. 村本哲哉, 鈴木勝也, 小原雄治, 田仲可昌, 漆原秀子: 細胞性粘菌におけるサブトラクションライブラリーを用いた配偶子特異的遺伝子プールの構築と機能解析. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001 年 12 月 9-12

日.

46. 北村敬一郎, 上杉裕子, 佐々寿浩, 小林 誠, 小原雄治, 細野隆次: cDNA マイクロアレイを用いた線虫 *C.elegans* 慣れ学習関連遺伝子同定. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001 年 12 月 9-12 日.

47. 荻原保成, 根本泰江, 村井耕二, 山崎由紀子, 新井理, 小原雄治: 倍数性コムギの EST 解析. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001 年 12 月 9-12 日.

48. 住友万里子, 黒澤 仁, 堀 寛, 石黒啓司, 小原雄治, 三浦恵二: 新規 *hox* 遺伝子 "*hoxc3a*" の解析. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001 年 12 月 9-12 日.

49. 黒澤 仁, 住友万里子, 山田晃司, 西井一宏, 石黒啓司, 松田 勝, 新井 理, 小原雄治, 浅川修一, 清水信義, 堀 寛: Analysis of BAC clones covering seven *hox* clusters in the Medaka fish genome. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001 年 12 月 9-12 日.

50. 一宮治美, 樋野興夫, 小原雄治, 石井直明: VHL (von Hippel-Lindau) 結合タンパク VBP-1 の *C.elegans* における機能解析. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001 年 12 月 9-12 日.

51. 梁瀬澄乃, 小原雄治, 上杉裕子, 石井直明: cDNA マイクロアレイを用いた *C.elegans* における酸化ストレス耐性獲得に関する遺伝子群の網羅的検出. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001 年 12 月 9-12 日.

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、平成8年5月に旧・遺伝情報研究センターを拡充・改組して設立された。現在のセンターは5研究室から成り、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・前伸勝実、遺伝子回路研究室が助教授・今本尚子と助手・小瀬真吾である。

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、教授・徳永万喜洋、助手・椎名伸之、PD 研究員・廣島通夫、学術振興会特別研究員・坂根勲（東京大学大学院理学系研究科博士課程）、総合研究大学院大学大学院生・小小木孝仁、新倉和美（研究支援推進員）に、4月から高田恭子（秘書）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。文部科学省科学研究費から、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）の「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）、基盤研究（C）「微小管依存的に中心体に集積する新規オルガネラの同定と解析」（椎名）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」（徳永）の援助を受けた。

(1) 細胞内1分子イメージングのための薄層斜光照明法：
徳永万喜洋

細胞内で蛍光1分子イメージングを可能にする方法として、新しく開発した薄層斜光照明法をさらに発展させた。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、照射角と照射半径を調整すること

により、厚さ5 μ m前後の薄い光の層で試料を照射するものである。低背景で高感度に蛍光試料観察をすることができたため、細胞内部でも明瞭な蛍光1分子イメージングを実現した。これまでは、我々の開発した対物レンズ型全反射照明法によって、細胞表面ないし直下のみで1分子イメージングが可能であった。これを、細胞内部でもはじめて可能にしたもので、蛍光1分子イメージングの有用性を大きく広げた。

さらに、低背景ゆえに定量性にもすぐれており、次項に述べるように細胞内における分子数定量を可能にした。

(2) 細胞質-核間輸送の1分子イメージングと分子機構の定量解析：徳永万喜洋、今本尚子¹（¹遺伝子回路研究室）

薄層斜光照明法を用いて、細胞質-核間で輸送される分子をGFPで蛍光標識し細胞内で観察したところ、分子1個の蛍光像が核膜上で観察された。蛍光像が光っている時間から、核膜孔上での通過時間が、約3秒であることがわかった。

蛍光ラベルした分子濃度を増やすと、核膜孔の点像からなる蛍光像が得られた。1分子と核膜孔1個との蛍光強度の比から、1つの核膜孔に結合している分子数を定量した。濃度を変えて定量的画像解析を行うことにより、核膜孔との結合分子数・結合定数といった、分子機構上重要な量を定量的に求めることができた。その結果、核膜孔には弱い結合部位と強い結合部位があることが見つかった。弱い結合部位は約100個の分子を集めておくアンテナとして働き、約8個の分子を結合できる強い部位もしくはその近傍で、Gタンパク質との反応がおこって核内に荷物を降ろすのであろうと考えている。

このように1分子イメージング法が、従来求められ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である事を、はじめて示すことができた。

(3) p105新規タンパク質による細胞質 mRNA 複合体の形成と細胞骨格依存的輸送：椎名伸之、新倉和美、徳永万喜洋

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の抗原として同定したp105の機能解析をおこなった。まず、p105の大量発現によって培養細胞の細胞質に形成される粒子状構造の微細構造を電子顕微鏡レベルで明らかにした。この構造には、リボソームと思われる粒子と、何らかの膜構造が含まれていた。実際この構造には、タンパク翻訳因子のEF-1 α や輸送小胞のコートタンパク質 β -COPが局在することがわかり、リボソームと膜の存在が裏付けられた。さらに、何らかのmRNAがこの構造に結合していることがわかった。このmRNAには特異性があり、例えばアクチンmRNAは局在していなかった。また、生化学的解析から、p105はmRNAを介してリボソームと結合していることが示唆された。以上の結果から、

p105はmRNA・リボソーム・膜から成る高次複合体を形成していることを明らかにした。さらに、Time-laps観察により、p105-GFPがアクチンや微小管依存的に、ダイナミックな細胞膜の直下に輸送されることがわかった。p105が形成する複合体の以上のような特徴は、これまでに知られているmRNA輸送体と多くの共通点を有しており、p105の機能と細胞極性についてさらに解析を進めている。

(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

分子間力顕微鏡は、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走査プローブ顕微鏡である。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、光輻射圧とフィードバックシステムによりカンチレバーの熱揺らぎを抑えて位置を遠隔制御している。カンチレバーの変位計測法として、従来はカンチレバーの角度を計る光てこ法を用いていたが、カンチレバーの実位置を計測するために、カンチレバーを45度傾け、カンチレバーを下から照明してセンサー上に影像を結像させ計測する新システムを導入した。この改良において、昨年度導入した横型の分子間力顕微鏡と同等またはそれ以上である100pN以上の計測レンジを確保した。

その結果、生体分子間相互作用を分子間距離の関数として、より精確に測定することが可能となった。DNA二重らせん構造の1塩基対の結合力や、蛋白質分子の高次構造を保持している力の1分子計測を行っており、従来の方法では得ることのできなかつた微細な情報を得ることができるようになった。

(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 Staphylococcal Nuclease (SNase) 分子1個を力学的にアンフォールドさせる実験を行った。SNaseの両端を、金に吸着するシステムに置換した変異体を試料として用いた。一端を基板に、他端を分子間力顕微鏡のプローブに吸着させ、両端の距離を伸長し、伸長距離とその時にプローブにかかる力を計測した。実験から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、SNaseが部分的にアンフォールドした中間状態を、はじめて同定することができた。1分子全長の伸長距離が約45nmであるのに対し、中間状態の伸長距離は約15nmである。Caの有無による違いと合わせて、この中間状態は、SNaseのC末側の α ヘリックス部分がアンフォールドしたものであると考えられる。さらに、中間状態を経てアンフォールドする場合と経ない場合との両方があることも発見された。

(6) 細胞質 - 核間輸送の新しい *in vitro* assay 系の開発：小此木孝仁，廣島通夫，椎名伸之，今本尚子¹，徳永万喜洋¹（遺伝子回路研究室）

細胞質 - 核間輸送の新しい1分子計測法の開発を目的として、顕微鏡用のカバーガラス上で核膜を人為的に再構築し、細胞質側・核側ともに溶液を自由に交換できる、新しい細胞質 - 核間輸送の *in vitro* assay 系を開発した。従来の assay 系はセミインタクト細胞を用いているため、細胞質側に関しては内容物を洗い流し輸送因子や基質を加え輸送系を再構築することはできるが、核内の液交換や内容物の洗い流しは不可能だった。そこで、アガロース表面上に *Xenopus* の卵抽出物を用いて、核膜を再構築する方法を開発した。輸送活性を保持したまま、細胞質側・核側の両方の溶液を自由に換えられる測定系の構築に成功した。核膜の形状を平面など自由にデザインできる、核膜以外の細胞内器官や構造物がほとんどない、という大きな特色をも併せ持っている。1分子研究を可能にしたばかりでなく、核膜機能の分子機構解明に大いなる発展をもたらすと期待される。

研究業績

(1) 原著論文

1. Kitamura K., Ishijima A., Tokunaga M., Yanagida T.: Single-Molecule Nanobiotechnology. *JSAP International*, **4**, 4-9, 2001.
2. Aoki T., Sowa Y., Yokota H., Hiroshima M., Tokunaga M., Ishii Y., Yanagida T.: Non-Contact Electrostatic Surface Force Imaging of Single Protein Filaments using Intermolecular Force Microscopy. *Single Mol.*, **3**, 183-190, 2001.

(2) その他

1. 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，第4章，85-121，2001.

(3) 発表講演

1. 徳永万喜洋，今本尚子：1分子蛍光イメージング法による細胞質 - 核間輸送の分子機構，日本分子生物学会第1回春季シンポジウム，盛岡，5月。
2. 椎名伸之，新倉和美，月田承一郎，徳永万喜洋：Xenopus新規タンパク質 Xp105の動きと細胞膜ダイナミクス，日本分子生物学会第1回春季シンポジウム，盛岡，5月。
3. 徳永万喜洋（オーガナイザー）：1分子蛍光イメージング法による細胞質核間輸送の分子機構，公開シンポジウム「構造生物学のフロンティア —分子モーター・ポンプ・分子輸送—」，東京，5月。
4. 椎名伸之，新倉和美，月田承一郎，徳永万喜洋：Xenopus中心体集積因子 Xp105の動きと細胞膜ダイナミクス，第

54 回日本細胞生物学会大会, 岐阜, 5 月.

5. 今本尚子, 徳永万喜洋: single pore 上の 1 分子イメージング, 第 54 回日本細胞生物学会大会, 岐阜, 5 月.

6. 徳永万喜洋: 分子動態・相互作用の 1 分子イメージング, 遺伝研・理研ゲノム科学合同公開シンポジウム「—生命システムの理解を目指して—」, 東京, 6 月.

7. Tokunaga M., Imamoto N.: Single Molecule Imaging of Nucleocytoplasmic Transport in Cells and Quantitative Analysis of Interaction with Nuclear Pores. 4th International Conference on Biological, ICBP2001, Kyoto, Jul-Aug, 2001.

8. Hiroshima M, Sakane I., Tokunaga M.: Refinement and Development of Inter Molecular Force Microscopy. 4th International Conference on Biological, ICBP2001, Kyoto, Jul-Aug, 2001.

9. 徳永万喜洋(招待講演): 細胞内分子動態と相互作用の 1 分子イメージング — 1 分子ナノ技術の展開 —, JBIC プロジェクト成果報告会, 東京, 9 月.

10. 徳永万喜洋: 細胞質 - 核間輸送の 1 分子イメージングによる分子機構, 第 10 回日本バイオイメージング学会, 東京, 10 月.

11. 徳永万喜洋, 今本尚子: 細胞質 - 核間輸送の蛍光 1 分子イメージングと定量解析, 日本生物物理学会第 39 回年会, 吹田, 10 月.

12. 廣島通夫, 坂根勲, 徳永万喜洋: プローブの実位置検出技術による分子間力顕微鏡の新しいシステム, 日本生物物理学会第 39 回年会, 吹田, 10 月.

13. 坂根 勲, 廣島通夫, 桑島邦博, 徳永万喜洋: 分子間力顕微鏡による Staphylococcal Nuclease1 分子のアンフォールディング, 日本生物物理学会第 39 回年会, 吹田, 10 月.

14. Imamoto N., Tokunaga M.: Single Molecule Imaging of Nucleocytoplasmic Transport at Nuclear Pores. Airlie 2001 transport meeting, Virginia, Nov, 2001.

15. Imamoto N., Tokunaga M.: Nucleocytoplasmic transport: A new approach to reveal function of nuclear pore complex. 第 16 回日仏がん会議, Kyoto, Nov, 2001.

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 杵淵 隆 (4 月まで), 派遣研究員 Gyedu K. Ampaabeng (8 月まで), 総合研究員大学大学院生 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), 荒牧弘範 (第一薬科大学), 原田慶恵 (東京都臨床科学研究所), 木下一彦 (慶応大学), また, 富澤純一 (名誉教授・客員教授) が参加した.

(1) タンパク質の DNA 上のスライディングの役割: 十川久美子, 嶋本伸雄

タンパク質の DNA 上のスライディングは, いろいろな遺伝子発現調節を行いうる新規な機構を生み出しうる. 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. グループトラッキングが起こると, RNA ポリメラーゼ分子と DNA との相対的回転が生じることを利用して, その相対的回転をレーザートラップされたビーズの回転として, 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. 1 秒程度と推定されているスライディング複合体の寿命が短い生じる不確かさを克服するために, 観察系に工夫をこらし, 有意の相対的回転を検出することが出来た.

(2) タンパク質の DNA 上のスライディングの役割: 杵淵隆, 嶋本伸雄, 加畑博幸¹, 黒沢修^{1,2}, 鷺津正夫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 のスライディングについて研究した. 結合時には, RNA ポリメラーゼと同様に CamR はスライディングして特異的複合体を形成したが, 特異的部位からの解離時には, RNA ポリメラーゼと異なり CamR は, スライディングをほとんど起こさなかった. この結果は, 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を予言する. 事実ゲルシフト法で, 親和性, 解離速度定数, 結合速度定数を測定したところ, 予言どおりの結果を確認できた. 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ことがあり, アンテナ効果と命名された.

大腸菌の TrpR は 10^4 以上の大きなアンテナ効果を示す. 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, 解離の減速ではないことがわかった. このアンテナ効果により, 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説明できる. つまり,

特異性の測定を短い DNA で行ったことによって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、*trp* オペレーターの 76-95 塩基上流に LexA 結合部位を付加すると、下流の *lacZ* 発現に対するリプレッションがほとんどなくなる (*TrpR* のオペレーターへの親和性が低下する) ことで証明した。

(3) DNA と蛋白質の結合平衡におけるエルゴード性の崩れ：嶋本伸雄，富澤純一

熱力学は、平衡を記述する方法論として経験的に構築され、3つのドグマの上に成立する公理系として確立され、統計力学を通して原子論と結びついた。一般に、平衡状態であれば、熱力学は問題なく適用できると誤解されているが、熱力学第二法則を満たすためには、分子系の状態は、エルゴード性を満たすように定義されなければならないという大前提が存在する。生物学で通常用いられる特異的複合体、非特異的複合体の状態の定義は、CamR、や *TrpR* の場合には、エルゴード性を満たさないことが、スライディング中の蛋白質と DNA との摩擦が小さく、平均的な熱揺らぎで移動できる実験事実から明らかになった。

事実、特異的部位への結合とそこからの解離の反応経路が異なること、結合親和性が DNA 長に依存すること (アンテナ効果) は共に、特異的複合体がエルゴード性を満たすならばあり得ないことである。この熱力学の適用限界にたいする誤解は、エルゴード性は「仮定ではなく常に経験的事実によって満たされている真理」であるとの誤解に一部基づいており、一部は、溶液において水分子の運動も含めてエルゴード性が定義されていることに対する無知に基づいている。生物学で通常用いられる特異的複合体がエルゴード性を満たさない場合でも成立する統計的方法を開発し、アンテナ効果に対する理論的根拠を与えた。

(4) プロモーターでの不活化による転写調節機構：須佐元樹，嶋本伸雄

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、不活性化複合体を形成する。 λ PR 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 を繰り返して合成・解離 (abortive initiation) する複合体 (moribund 複合体) との分岐した反応経路をたどる。後者は、基質存在下でも伸長反応を行わない dead-end 複合体に変換し、長鎖 RNA を合成できない部分となる (分岐モデル)。

RNA 切断因子 GreA/GreB 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 PR 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)。この効果は大腸菌内で、*greA*/*greB* 二重欠損株を用いて検討した。Northern 分析で数種に絞られたオペロンの中から、*unc* オペロンを選び、*in vivo in vitro* で *unc* の主要プロモーターにおける転写開始が分岐モデルに従うことを証明した。

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 PR 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、感度の高い assay では、T7A1 プロモーターでの不活性化複合体の形成が、 λ PR プロモーターと同様に観測され、とくに低塩濃度では、より多く形成された。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。

(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)

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} が蛋白質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。好熱菌の主要 σ とのキメラを作製して、大腸菌の生育温度が上昇するかどうかを確認している。

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**, 389-402, 2001.

(2) その他

1. 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* 第二版 (田村隆明, 山

本雅之, 安田国男 編), 羊土社.

2. 嶋本伸雄: スライディングによる DNA 結合のアンテナ効果: 1 分子観察により発見された分子効果. 細胞工学 20, 666-671, 2001.

3. 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. in 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) 医学書院.

(3) 発表講演

1. Nobuo Shimamoto and Motoki Susa: Generality of the branched pathway mechanism of transcription initiation. FASEB Meeting "Transcription initiation in prokaryotes". Saxton River, Vermont, U.S.A. 7月.

2. Kumiko Sakata-Sogawa and Nobuo Shimamoto: Does RNA polymerase track a groove of DNA during sliding? FASEB Meeting "Transcription initiation in prokaryotes". Saxton River, Vermont, U.S.A. 7月.

3. 嶋本伸雄, 杵淵 隆, 加畑博幸, 富沢純一, 新しい DNA 結合の調節機構: スライディングによるアンテナ効果, 分子生物春のシンポジウム, 盛岡, 5月.

4. 嶋本伸雄, 須佐太樹, Ranjan Sen: RNA ポリメラーゼにおける分子メモリー効果と転写調節, 日本蛋白質学会, 吹田, 6月.

5. Kyeremeh Ampaabeng Gyedu, 嶋本伸雄: GFP 融合タンパク質の落とし穴とその解決法日本蛋白質学会, 吹田, 6月.

6. 須佐太樹, 嶋本伸雄: RNA 切断因子 GreA, GreB の大腸菌内における役割, 日本 RNA 学会年会, 神戸, 8月.

7. 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, 吹田, 9月.

8. 須佐太樹, 嶋本伸雄: RNA 切断因子 GreA, GreB の役割, 日本分子生物学会, 横浜, 12月.

9. 嶋本伸雄: 「生物界に現れた 1 分子の運動と熱力学との食い違い: リプレッサーの DNA 上のスライディングによるアンテナ効果」蛋白質研究所シンポジウム, 吹田, 12月.

10. 嶋本伸雄: 「化学と生物学におけるナノ解析の落とし穴」未来へのバイオ技術勉強会バイオインダストリー協会, 吹田, 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, 総合研究大学院大学大学院生・大蔵清貴, 矢部智子, 虎山一郎(4月より), 研究補佐員・杉浦麻理子, 田山しのぶ(2

月まで), 岩間紀知(3月まで), 本橋智子(3月まで), 日吉雅人(4月より)であった. また, 技術課所属の技官・大石あかね(9月より育児休業), 釜本晃子(10月より)の助けを受けた. 平成 13 年度は文部科学省科学研究費より, 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・神経回路「*C.elegans* の行動遺伝学による感覚情報の選択と可塑性に関わる遺伝子の解析」(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) 合成 dauer 構成性変異による線虫 *C.elegans* 頭部神経回路の解析: 大蔵清貴, 矢部智子, 宮原浩二¹, 土屋英子¹, 石原 健, 桂 勲 (¹広島大学大学院工学研究科)

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, 通常の 3 齢幼虫の代りに口の閉じた耐久型の dauer 幼虫になる. この制御経路の変異体として, 野生型 *C.elegans* が dauer 幼虫になる条件でもならない dauer 欠損性変異体や, dauer 幼虫にならない条件でもなる dauer 構成性変異体が, すでに多数, 分離されている. しかし, 我々はこの中に既知の神経信号伝達の変異が少ないことに疑問を持った. そして, 「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」という合成 dauer 構成性(Sdf-c)表現型に注目し, 既知の 50 遺伝子以上の変異がこの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並行する複数の経路を通るためと推測される. 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, 感覚情報処理経路を解明しようと試みている.

また, 新たな神経機能遺伝子を発見する目的で, *unc-31* 変異との組合せで合成 dauer 構成性(Sdf-c)表現型を示す変異を 44 個分離した. *unc-31* 遺伝子は, dense core vesicle からの分泌に働く CAPS 蛋白質をコードする. 44 個の変異のうち 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(1株)は, AWC 神経で感じる誘因性の匂い物質を忌避し, 温度走性が好熱性である. *sdf-13* 変異体(2株)は, AWC 神経で感じる匂い物質への走化性は正常だが, その順応に異常がある. この遺伝子は, マウスの *Tbx2* やショウジョウバエの *Omb* のホモログをコードし, AWC, AWC, ASJ 感覚神経および多数の咽頭神経で発現する. *sdf-9* 変異体(5株)に *daf-7* 遺伝子(TGF- β 遺伝子の 1 つで dauer 幼虫形成を阻害する)のプロモーター DNA 断片を導入す

ると、幼虫はすべて dauer 幼虫になるが、すぐに脱皮して4 齢幼虫になるという独特な性質をもつ。

本年は、既知の変異の合成 dauer 構成性表現型、および新しい *sdf* 変異体について、以下の結果を得た。

(a) *daf-7::GFP* 融合遺伝子は、野生型 *C.elegans* が dauer 幼虫を生じる時は発現せず、生じない時に発現する。この発現を合成 dauer 構成性の二重変異体で調べたところ、発現するものとならないものがあることがわかった。これにより、二重変異体の遺伝子が dauer 幼虫制御経路で、*daf-7* の上流にあるかないかを推定できる。*unc-31*(CAPS), *unc-3* (Olf-1 / EBF), *egl-4* (PKG), *osm-1* (感覚繊毛形成に必要)の一重変異体では *daf-7::GFP* が発現するが、*unc-31; osm-1*, *unc-31;unc-3*, *egl-4;unc-3* という二重変異体では *daf-7::GFP* は発現しない。したがって、*daf-7* と *unc-3* が ASI 感覚神経で発現することを考慮すると、*daf-7* の発現は、ASI 神経の感覚繊毛から入った信号が転写因子 UNC-3 を活性化する経路と神経分泌や PKG シグナル伝達を含む経路の両方により制御されると予想される。

(b) SDF-13 タンパク質の細胞内局在を特異的抗体を用いて検討したところ、主として細胞質に存在することがわかった。この局在は順応を起こす程度の誘因性揮発物質の刺激でも変化しない。また、*sdf-13* の cDNA を *gpa-2* プロモーターにつないで AWC 神経でのみ発現させたところ、順応異常は回復するが、合成 dauer 構成性表現型は回復しないことを見つけた。この結果から、AWC 感覚神経で感じる匂い物質への順応に関して、SDF-13 は AWC 神経自身の中で働くことがわかった。

(c) *sdf-9* 遺伝子をクローニングしたところ、チロシン脱リン酸化酵素と相同性のある蛋白質をコードしていた。この蛋白質は、HCxxGxxR というチロシン脱リン酸化酵素のコンセンサス配列を持たないので、酵素活性がないかもしれない。機能的な *sdf-9::GFP* 融合遺伝子は神経環の前にある左右 1 対の細胞で発現する。

(d) *sdf-14* 変異 (5 株) と *unc-31* 変異との二重変異体は、寒天培地に塗る大腸菌溶液の量により dauer 幼虫の割合が大きく変化し、その dauer 幼虫が 4 齢幼虫に復帰しやすいという特徴をもつ。この変異のマッピングとコスミドスクリーン実験により 3 個のコスミドクローン内にあるところまで範囲を狭めた。

(2) 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、飯野雄一¹、毛利亮子²、森 郁恵²、桂 勲¹ (東京大学遺伝子実験施設、²名古屋大学理学部生命理学科)

動物は、感覚細胞を通じて環境から様々な情報を受容し、神経回路上で必要な情報を取捨選択・統合して、適切な応答をする。また、この応答は過去の経験 (記憶) によって変化する。線虫 *C.elegans* では、今までに匂い物質や温度などの感覚受容に関わる行動変異体が解析され、

その分子機構が明らかにされてきた。我々はこの基盤に立ち、さらに高次の情報処理に関わる分子機構を解明する目的で、学習・感覚情報の選択 (価値評価) などの行動に関わる変異体を解析している。

C.elegans は、銅イオンや匂い物質などを頭部の別々の感覚神経で感じ、忌避や走化性などの行動を行う。これらの行動における介在神経の機能を知るために、銅イオン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。野生型は各々の濃度に依存してどちらの行動を優先するかを変えるので、この 2 つの感覚信号間に相互作用があることがわかる。この相互作用は、約 10 対の神経細胞からなる回路で起こると思われる。また、通常は餌を十分に与えた虫で測定を行うが、5 時間飢餓させた虫では、銅イオンに対する忌避行動が弱くなるため、匂い物質への走化性が優先されるようになる。しかし、セロトニンの存在下 (満腹を疑似する) では、この変化が見られない。この忌避行動低下は、自然界で飢餓状態に行動範囲が広がるという利点がある。

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。*ut236* 変異体は、野生型と比べて、匂い物質や銅イオンの各々に対する応答は正常だが、両方の刺激がある場合は匂い物質への走化性より銅イオンの忌避を優先する。つまり、*ut236* 変異体では二つの感覚信号の相互作用に異常がある。

ut236 変異体の原因遺伝子 (*hen-1* 遺伝子と名づけた) は、LDL 受容体のリガンド結合 (LDL α) ドメインを 1 つだけ持つ新規の分泌タンパク質をコードする。免疫染色法によると、この遺伝子は感覚神経と介在神経、各一対ずつの細胞体と軸索でのみ発現している。しかし、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。また、様々なプロモーターを用いた強制発現実験から、この分子は神経系で細胞非自律的に働くことがわかった。熱ショックプロモーターを用いた強制発現実験では、神経の発生期ではなく成熟した神経回路での発現が必要だった。以上のことから、この分子は感覚信号の情報処理や学習に広く関わる新規の神経調節因子と考えている。

銅イオンの忌避が飢餓により弱くならない変異体として *ut235* 変異体を同定した。この変異体は、飢餓による運動量の変化や餌に対する応答はほぼ正常なので、飢餓に対する応答の一部だけに異常がある。*ut235;ut236* 二重変異体は、飢餓の有無に関わらず銅イオンの忌避を優先する。現在、*ut235* 変異の原因遺伝子のクローニングを行っている。

hen-1 変異体は学習にも異常がある。野生型は飢餓時に NaCl を感じると NaCl を忌避するようになるが、*ut236* 変異体はこの変化が野生型より小さい (東京大学・飯野との共同研究)。ただし、飢餓による単純な行動の変化が

正常なことから、*ut236*変異体は飢餓の信号伝達ではなく、飢餓と他の情報が統合される過程に異常があると考えられる。

本年は、温度と餌/飢餓の学習における *hen-1* 遺伝子の役割について研究した (名古屋大学・毛利, 森との共同研究)。野生型 *C.elegans* は、15°Cから 25°Cの範囲では、餌を与えて育てたときの温度を好むようになるが、その温度で飢餓状態になるとその温度を嫌うようになる。これに対し、*hen-1* 変異体は、餌のあるときには正常な温度走性を示したが、飢餓による行動の変化が起きなかった。また、飢餓による単純な行動変化には異常がみられなかった。このことは、*hen-1* 変異体が温度感覚や飢餓に対する応答は正常であるが、二つの組み合わせによる行動の可塑性に異常を持つことを示す。

(3) 匂い物質と飢餓の連合学習の変異体：虎山一郎，石原 健，桂 勲

線虫 *C.elegans* は、広い意味で連合学習 (条件付け) を行うことができる。しかし、その連合学習は、(a) 非条件刺激がほとんど餌や飢餓に限られていること、(b) 条件刺激を非条件刺激と同時に提示した時に学習効果が大きく、それ以前に提示すると効果がないか小さいことから、古典的な条件付けとは異なる機構によると考えられている。特に、条件刺激として味覚や嗅覚の刺激を用いた場合は、飢餓との連合学習が効率良く起こる。すなわち、好きな味や匂いでも、餌のない条件で感じていると好きでなくなる。我々は、この現象が餌による順応の阻害とも解釈できることに気づき、これが異常になった変異体の分離と解析を行っている。

本年は、嗅覚と餌/飢餓による連合学習の条件を検討したところ、匂い物質としてブタノンを用いて効率よく連合学習を行わせることができた。ブタノンは、誘因性の匂い物質だが、あらかじめ飢餓とブタノンで条件付けを行うと、ブタノンへの走化性の効率が大きく低下した。一方、餌とブタノンで条件付けを行うと、走化性の効率がさらに上がることもわかった。次に、これらの過程が異常になった変異体を分離したところ、餌とブタノンで条件付けしてもブタノンへの走化性の効率が低下する変異体 (餌の存在下でも順応が起こる変異体) や、餌とブタノンで条件付けしないとブタノンへ寄らない変異体が分離できた。前者に属する変異の1つ *ut305* を現在、マッピングしている。興味あることに、この変異体は、ブタノンと同じく AWC 神経で感じるイソアミルアルコールやベンズアルデヒドに対しては、逆に飢餓条件でも順応がほとんど起こらないことがわかった。

(4) 線虫 *C.elegans* のフッ素イオン耐性変異の解析：大石あかね，川上 穰¹，釜本晃子，石原 健，桂 勲 (¹Gothenburg University)

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 *flr-1* ~ *flr-5* に位置し、クラス1 (*flr-1, flr-3, flr-4*) とクラス2 (*flr-2, flr-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 (上記 (1) 参照)、餌の上に留まる傾向が弱い等、多様な表現型を示す。*flr-1* は degenerin / ENaC ファミリーに属するイオンチャンネル、*flr-4* は C 末端側に疎水性配列を持つ新規の Ser / Thr キナーゼ、*flr-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 *flr-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、機能的な *flr-4::GFP* 融合遺伝子も腸、咽頭後部、AUA 神経で発現する。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構成す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、*flr-2* 遺伝子は gremlin / DAN / cerberus ファミリーに属する分泌タンパク質をコードし、咽頭・頭部・尾部の少数の神経で発現する。これをもとに、クラス1 遺伝子群で制御される腸からの信号が神経系に行ってクラス2 遺伝子群の働きを抑制するというモデルが考えられている。

本年は、*flr-5* 遺伝子のクローニングと、*flr-3* 遺伝子の発現について研究した。*flr-5* 遺伝子は、古典的なマッピングにより範囲をせばめ、*flr-3; flr-5* 変異体における *flr-5* 変異の働き (*flr-3* 変異の成長遅延を抑圧) をレスキューする活性を指標に、候補となるゲノムクローンをコスミド数個に絞った。

以前の研究で、我々は *flr-3::lacZ* は腸のみで発現するという予備的結果を出した。しかし、その後、*flr-3* 遺伝子が隣接する遺伝子も含む polycistronic RNA として転写されることが判明したため、これが本来の *flr-3* 遺伝子の発現を反映しているかが疑問になった。そこで、転写領域全体を含み *flr-3* 変異を rescue するむゲノム DNA 断片を単離し、*flr-3* コード領域 C 末端に相当する位置に GFP cDNA を挿入したものを作り、野生型 *C.elegans* に導入した。この虫でも、GFP は腸のみで発現していた。この GFP 融合遺伝子をもつ虫は成長が遅いので、FLR-3::GFP 融合蛋白質が dominant negative に働いているかどうかを調べている。

研究業績

(1) 原著論文

1. Shioi G., Shoji M., Nakamura M., Ishihara T., Katsura I., Fujisawa H. & Takagi S.: Mutations affecting nerve attachment of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 157, 1611-1622, 2001.

(2) その他

1. 桂 勲: 「新ミレニアムへのメッセージ——“研究をする”とはどういうことか」蛋白質核酸酵素 46 (3), 251-254, 2001.

(3) 発表講演

1. Ishihara T., Iino Y., Mohri A., Mori I. & Katsura I.: A novel secretory protein, HEN-1, regulates integration of sensory signals and behavioral plasticity. The 13th International *C.elegans* Meeting, Los Angeles, CA, U.S.A., June.

2. Ishihara T., Iino Y., Mohri A., Mori I. & Katsura I.: HEN-1, a novel secretory protein, regulates sensory integration and learning in *Caenorhabditis elegans*. Gordon Research Conference. “Neural Plasticity”, Newport, RI, U.S.A., July.

3. 桂 勲: 線虫 *C.elegans* 研究の歴史・現状・展望. 第24回日本分子生物学会年会, 横浜, 12月.

4. 石原 健, 飯野雄一, 毛利亮子, 森 郁恵, 桂 勲: 線虫 *C.elegans* の感覚情報処理と学習を制御する LDL 受容体モチーフを持つ新規分泌タンパク質 HEN-1. 第24回日本分子生物学会年会, 横浜, 12月.

5. 大蔵清貴, 鈴木教郎, 石原 健, 桂 勲: 線虫 *C.elegans* の蛋白質チロシン脱リン酸化酵素様分子 SDF-9 は, L3/dauer 幼虫の発生の決定を調節している. 第24回日本分子生物学会年会, 横浜, 12月.

6. 矢部智子, 鈴木教郎, 石原 健, 桂 勲: 合成 dauer 構成性変異の新規遺伝子のクローニングと解析. 第24回日本分子生物学会年会, 横浜, 12月.

7. 虎山一郎, 石原 健, 桂 勲: 線虫 *C.elegans* の走化性における学習異常の変異体単離. 第24回日本分子生物学会年会, 横浜, 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3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. 更に, 遺伝研共同研究として鈴木俊治, 吉田賢右(東京工業大学・資源化学研究所), 白石充典, 津本浩平, 熊谷泉(東北大), 加藤晃一(名市大)が参加し, また足立健吾, 木下一彦(CRESTO team13), 中迫雅由(東大・分生研), 岡村英保, 西村善文(横浜市立大), 牧野耕三(阪大微研), David Stuart, Yvonne Jones, Anton van der Merwe (University of Oxford), Peter Sondermann (Max-Planck-Institut fur Biochemie, Martinsried), 山登一郎, 保坂俊彰, 目黒俊幸(東京理科大学), 森口充瞭, Panuwan Chantawannakul, 吉宗一晃, (大分大学)若山守(立命館大)と協力して研究を行った.

(1) F1-ATPase 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 つの触媒部位は触媒過程のどの瞬間をとってもお互い異なった状態にあり, この非等価性を決めているのが回転する γ サブユニットだとされている. 極めて精緻に調節された触媒機構の理解に必要な, 活性化状態を含めた他の多くの状態の構造情報を, $\alpha 3\beta 3\gamma$ 複合体, $\alpha 3\beta 3\gamma\epsilon$ 複合体を使って集めようとしている.

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 $\alpha 3\beta 3\gamma$ 複合体は更に結晶の改良の余地があることが示され, 結晶化条件の検討を引き続き行っている.

一方, $\alpha 3\beta 3\gamma\epsilon$ 複合体については, 昨年度行った 0.5mMADP 存在下でできた結晶の解析(4.5 Å 分解能)の経験をもとに, 今年は Mg /ヌクレオチド非存在下での結晶構造を解析した. よりよい結晶凍結法を見出した結果 SPring8 /阪大蛋白研ビームライン(BL44XU)で 3.8 Å 分解能データを得た. 分解能の向上により結晶格子も I4122, $a = b = 233.3 \text{ \AA}$, $c = 305.3 \text{ \AA}$ と確定した. 結合ヌクレオチドの定量と電子密度分布から, 得られた結晶中の分子は, 1 個 ADP を結合していると結論した. 標品中の 1 個 ADP を結合している分子種が選択的に結晶化したと考えられる.

ヌクレオチド非結合型 $\alpha 3\beta 3$ 複合体構造を初期モデルとした分子置換法の解析の結果, すべてのサブユニットの構造が得られた. ADP はヌクレオチド結合型の構造をとっている β サブユニットに結合していた. 他の 2 つのヌクレオチド非結合型 β サブユニットのうち, 従来の 2 個ヌクレオチド結合型 F1 構造で最も強くヌクレオチドが結合している β サブユニットと等価な位置にある β サブユニットは, 典型的なヌクレオチド非結合型の構造をして

いた。この構造の違いにより、1個ADP結合型の $\alpha 3\beta 3\gamma\epsilon$ 構造では ϵ サブユニットのC末のヘリックスが $\alpha 3\beta 3$ 下部に挿入されることが可能になり、これが ϵ サブユニットの位置とコンホメーションが従来のものとは大きく異なる原因となったと考えられる。

(2) 大腸菌転写活性化因子 PhoB 蛋白質の結晶構造解析：進藤一泰，前仲勝実，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り、構造的にも機能的にも2ドメイン構造を持つ。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、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行っている。

昨年度 SPring8 で収集した MAD データの処理を行い良質の電子密度マップを得ることができた。マップは NMR モデルのフォールド(winged-helix-turn-helix の変形体)でよく解釈されたが、これまで不明であった DNA 結合性ループの構造を明確に示していた。現在、最終的な構造の精密化を行っている。また、これと並行して、C末側ドメインと DNA との複合体の結晶化条件の探索を行い、複合体の結晶をポリエチレングリコールを用いた条件で得た。放射光施設 (PF) でデータを 3Å を越える分解能で回折データを収集できた。現在、データ解析が進行中である。

(3) 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，白石充典，津本浩平，熊谷泉，David Stuart，Yvonne Jones，Anton van der Merwe，Peter Sondermann，加藤晃一，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。本年度は低親和性 Fc γ R3 種 (IIa, IIb, III) と Fc との相互作用を表面プラズマ共鳴を用いて解析を行った。いずれのレセプターも一般的な細胞表面レセプターと同じく速い速度論的認識を示し、免疫複合体を細胞表面と同じように認識していることが

示唆された。また、熱力学的には Fc γ RII はエントロピー、エンタルピー駆動であるのに対して、Fc γ RIII は完全にエンタルピー駆動であり、分子認識に差異が見られた。他方、MHC を認識する Ig-like transcript4 (ILT4) については、大腸菌での封入体発現と巻き戻しの系を確立した。現在、生化学的解析と結晶化に取り組んでいる。

(4) 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

イオン輸送性 ATPase のうち、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 に類似している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。Spring8 でデータ収集を行い、4.5Å データを解析中である。なお以前に得られていた結晶はエノラーゼの結晶であることが判明したが、分子置換法による解析を行い、2.4Å 分解能の精密化構造を得た。

(5) 耐塩性グルタミナーゼの構造解析：Panuwan Chantawannakul，吉宗一晃，若山守，森口充隆，白鳥綾，白木原康雄

Micrococcus luteus K-3 由来のグルタミナーゼ (グルタミンを加水分解し、旨味成分であるグルタミン酸を生成する酵素) は他のグルタミナーゼと異なり、高塩濃度でも高い活性を示すことから、醤油生産等の醸造への応用が期待されるとともに、耐塩性の機構を探る良い対象となる。この耐塩性にアルギニン残基がかかわっていることがアルギニン特異的修飾実験から示唆されている。

昨年度報告した結晶化条件で、野生型蛋白とセレノメチオニン誘導体蛋白、及び C-末 80 残基が欠けた約 400 残基の断片及びそのセレノメチオニン誘導体の結晶、合計 4 種類からネイティブデータ又は MAD データを収集した。400 残基の断片からの結晶からの MAD データは、SOLVE, SHARP プログラムパッケージの使用による解析の結果、2.4Å の良好な電子密度マップを与えた。この断片の主鎖のトレースをほぼ完了し、その構造の精密化と野生型蛋白の分子置換法による構造解析を予定している。

研究業績

(1) 原著論文

1. Maenaka, K., van der Merwe, P.A., Stuart, D.I., Jones, E.Y., & Sondermann, P.: The human low-affinity Fc γ receptors IIa, IIb and III bind IgG with fast kinetics and distinct thermodynamic properties. *J. Biol.*

Chem. 276, 44898-44904. 2001.

2. Matsui, T., Otsuka, M., Maenaka, K., Furukawa, H., Yabe, T., Yamamoto, K., Nishioka, K., & Kato, T.: Detection of Autoantibodies to Killer Immunoglobulin-Like Receptors Using Recombinant Fusion Proteins for Two Killer Immunoglobulin-Like Receptors in Patients with Systemic Autoimmune Diseases. *Arthritis and Rheumatism*. 44, 384-388. 2001.

(2) その他

1. 前仲勝実: 免疫系レセプターの分子認識 蛋白質核酸酵素 46, 1805-1811. 2001.

(3) 発表講演

1. 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, 東京, 1月.

2. 白木原康雄: F1-ATPase の回転触媒機構の理解をめざす結晶構造解析. SPring-8 利用技術に関するワークショップ, 播磨, 3月.

3. 白木原康雄, 鈴木俊治, 白鳥 綾, 白木原千佳子, 中迫雅由, 吉田賢右: 好熱菌単一ヌクレオチド結合型 F1-ATPase $\alpha 3\beta 3\gamma\epsilon$ 複合体の構造. 日本生物物理学会 39 回年会, 大阪, 10月.

4. 進藤一泰, 前仲勝実, 秋葉俊彦, 岡村英保, 西村善文, 牧野耕三, 白木原康雄: 大腸菌由来転写活性化因子 PhoB DNA 結合ドメインの X 線結晶構造解析. 日本蛋白質科学会 第 1 回年会, 大阪, 6月.

5. Maenaka, K., van der Merwe, P.A., Davies, E.A., Stuart, D.I., Sondermann, P., Jones, E.Y., & Shirakihara, Y.: Molecular recognition of Ig-like receptors, KIRs and Fc γ Rs, Stockholm, July.

6. 前仲勝実, van der Merwe, P.A., Stuart, D.I., 白木原康雄, Jones, E.Y.: ヒト killer cell Ig-like receptor 群の MHC リガンドに対する分子認識機構. 第 1 回「タンパク質高次構造に基づくゲノム情報科学」公開ワークショップ, 東京, 1月.

7. 前仲勝実, van der Merwe, P.A., Davies, E.A., Stuart, D.I., Sondermann, P., Jones, E.Y., 白木原康雄: 免疫グロブリン様レセプター群の分子認識. 第 1 回日本蛋白質科学会, 大阪, 5月.

8. 前仲勝実: Ig-like receptor 群の分子認識機構. 第 10 回日本組織適合性学会 MHC と移植 シンポジウム, 福岡, 11月.

9. 前仲勝実, 白石充典, 津本浩平, van der Merwe, P.A., Stuart, D.I., Jones, E.Y., Sondermann, P., 熊谷 泉, 白木原康雄. 免疫グロブリン様レセプター群のリガンド認識に関する速度論的熱力学的解析, 第 31 回日本免疫学会

総会, 大阪, 12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つ。核と細胞質の分子情報の交換は、細胞がその恒常性を保ち、外界の環境にいかに対応して生きているかを考える上で重要である。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。

今年の研究室のメンバーは、今本尚子(助教授)、小瀬真吾(助手)、古田満衣子(特別共同利用研究員、大阪大学大学院医学系研究科博士課程)、小池牧子(総合研究大学院大学大学院生)、田原清志(総合研究大学院大学大学院生、10月より)、谷口直子(COE 非常勤研究員、4月より)、福川美津子(事務補佐員、4月より)である。

本年度は、国立遺伝学研究所校費、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)「核内輸送担体と核外輸送担体のリサイクリングから捉えた流通の制御機構の解析」(代表、今本)、奨励研究(A)「輸送担体 importin β の核膜孔通過における熱ショック蛋白質 hsc70 の機能」(代表、小瀬)の支援を受けた。

1. 研究概要

近年、細胞内には多くの輸送経路が存在し、多彩な輸送形態で様々な分子が核-細胞質間を流通していることが急速な勢いで明らかになりつつある。その一方で、全ての核-細胞質間分子流通の場として機能する核膜孔複合体を分子が通過するメカニズムの解析は、研究の方向性も定まらないまま大きく遅れている。また、複数の輸送経路に乗った分子が核膜孔上を滞りなく流通する機構や制御の仕組みは、核-細胞質間分子流通を理解する上で必要不可欠な問題と考えられるが、こうした問題も未だ手がつけられていない問題として残されている。当研究室では、「流通の場としての核膜孔複合体の機能解析」と「輸送経路の多様性の問題」に焦点をあて、本年度は以下の研究を行った。

2. 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を機能構造体として単離して解析することは極めて困難である。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精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。そこで、通過反応の新たな解析系を確立する目的で 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「見る」ことを試みた。本研究は、生体高分子研究室の徳永万喜洋教授との共同研究である。

レーザー光による全反射照明法を応用した、細胞内で 1 分子イメージング可能な蛍光顕微鏡法を用いて、GFP 標識した輸送担体 importin β の核膜孔複合体上での挙動をセミインタクト細胞を用いた *in vitro* 輸送系で観察した。その結果、核膜孔 1 個 1 個に対応すると考えられる点像からなる蛍光像と、核膜孔複合体に結合した GFP importin β 1 分子を捉えることにはじめて成功した。1 分子イメージングと合わせた画像解析により importin β の核膜孔への結合定数、1 つの核膜孔複合体が importin β を結合しうる分子数、及び、各々の importin β 分子が核膜孔を通過する速度を核膜孔上の滞在時間の寿命から求めることができた。

1 つの核膜孔複合体は最大 100 ~ 150 分子の importin β を結合し、個々の importin β の核膜孔通過速度は、その滞在時間の寿命から約 2 秒であることが判明した。これは、1 つの核には約 3000 ~ 4000 個の importin β が結合する核膜孔複合体が存在するので、1 つの核あたり毎分 900 万 ~ 1800 万個の importin β を通過させうることを証明したことになる。また、importin β と核膜孔の結合定数は約 70nM という、細胞内でおこる分子間相互作用としては極めて高い結合定数を示すことが判明した。このように、これまでの生化学的・遺伝学的手法では得られなかった定量的情報から、核膜孔複合体が輸送担体に対して高い affinity と capacity を有することで効率のよい通過反応を担うといった、流通の場として機能する核膜孔複合体の基本的な性質を明らかにすることができた。現在、基質や低分子量 G 蛋白質 Ran 存在下で importin β の挙動を比較しており、通過反応のメカニズムに示唆を与える結果が得られつつある。

(2) 核蛋白質輸送担体分子 importin β 点変異体を用いた核膜孔通過機構の解析：

小瀬真吾, 小沢仁美¹, 米田悦啓¹, 今本尚子 (¹大阪大学大学院医学研究科・機能形態学講座 A3)

核蛋白質輸送担体分子 importin β は、核膜孔構成因子と直接的に相互作用することにより、核膜孔を通過する活性を持っている。しかし、核膜孔通過反応における分子機構はほとんど明らかとなっていない。

我々は、importin β の核膜孔通過機構を解明するために、importin β の結晶構造解析をもとに、importin β の核膜孔通過に必要な十分な領域のアミノ酸の中から、表面に露出していると考えられるアミノ酸に変異を導入した変異体を幾つか作製し、その核膜孔通過活性を解析した。

トランスフェクション及びマイクロインジェクション法により、importin β 変異体の培養細胞における細胞内局在を調べたところ、野生型に比べ、核内に強く集積している変異体、逆に核内への集積が非常に弱い変異体が得られた。これらの変異体は、核膜孔構成因子との相互作用の変化により、核内移行活性もしくは核外移行活性に異常を来している可能性がある。現在、これらの変異体の核膜孔通過能を *in vitro* 輸送アッセイ系で解析するとともに、幾つかの核膜孔構成因子との相互作用を検討している。

(3) 輸送担体分子 importin β のリサイクリング機構：小瀬真吾, 今本尚子

輸送担体 importin β は、核膜孔との直接的な相互作用により核-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、といった問題は不明である。

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ことから、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を用いた 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 に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。

現在、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中である。

(4) β -カテニンの核内外通過機構とその制御機構の解析：小池牧子, 今本尚子

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。

β -カテニンの核内移行反応は、importin β ファミリーで担われる反応と異なり、低分子量 GTPase Ran 非依存的に核膜孔を通過する点に大きな特色がある。昨年度の研究より、 β -カテニンのアルマジロリピート 10 番目から C 末領域が、 β -カテニンが核内に移行するために必須なドメインであることを同定していた。

本年度は、 β -カテニンが核外へ移行する分子機構を明らかにすることを目的として、セミインタクト細胞を用いて、 β -カテニンの核外移行解析系を確立した。この系を用いた解析から、 β -カテニンはその核内移行と同様に、系に ATP や可溶性因子を添加しなくても核外へ移行することが明らかになった。また、様々な欠失変異蛋白質を用いた解析から、 β -カテニンのアルマジロリピート 10 番目から C 末領域が核外へ移行する能力を持つことも明らかになった。しかし、 β -カテニンの核外移行は ATP によって促進された。このことから、 β -カテニンは可溶性因子を必要とせず核内および核外移行する能力を持ち、それはアルマジロリピート 10 番目から C 末領域によって担われているが、セミインタクト細胞内の因子と ATP の作用で制御される可能性が示唆される。現在、*in vitro* および *in vivo* の両輸送系を用いて、 β -カテニンの核内・核外移行の制御因子について検討している。

(5) 核一細胞質間輸送の *in vivo* アッセイ系の確立：谷口直子、今本尚子

これまでに、核一細胞質間輸送のアッセイ系として、マイクロインジェクション法による細胞内分子導入と、ジギトニン処理で作製したセミインタクト細胞を利用した *in vitro* 輸送系を主として用いてきた。いずれの方法も、細胞内分子の挙動観察や輸送因子の同定に有効であるが、利用できる細胞種に制限があることや、個体内の細胞の中で輸送反応を見る系としては不適當である。そこで、核一細胞質間輸送を *in vivo* で調べるためのアッセイ系を、核膜孔を自由拡散しうる大きさの基質の性質を利用してつくった。

核膜孔を自由拡散する GFP に核内移行シグナル (GFP-NLS) や核外移行シグナル (GFP-NES) を結合して細胞内で発現させると、自由拡散しうる大きさであるにも関わらず、GFP-NLS は核内に、GFP-NES は細胞質に局在する。細胞外液に NaN_3 と deoxyglucose を加えると、細胞内の ATP が枯渇がするため蛋白質の核一細胞質間輸送が阻害される。このとき、GFP-NLS や GFP-NES は自由拡散するために細胞質と核の両方に分散する。細胞外液から NaN_3 と deoxyglucose を除くと、細胞内で ATP が産生されるため、GFP-NLS と GFP-NES は再び核と細胞質に各々局在する。この過程を生細胞内で経時的に観察することができる。

今後、この *in vivo* 輸送系を利用して、蛍光エネルギー移動 (FRET) を利用した核一細胞質間輸送の分子間相互作用、RNAi による輸送因子の機能阻害の影響、及び、カルシウムイオンによる輸送の制御を生細胞でみていきたいと考えている。

3. 個体内で機能する輸送経路の多様性の問題

(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

生物が多種多様な輸送経路をもつことの生理的意義を考えたとき、生体は核一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、多種多様な状況に対する適応性を高めていることが 1 つの可能性として考えられる。しかし、実際に細胞内で機能する輸送経路に違いがあるかは全く明らかにされていない。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。本研究では、環境変化の一つの代表例として熱ショック応答をとりあげ、熱ショック時に機能する核膜輸送機構を 70kDa 熱ショック蛋白質 (hsc70) を指標に解析するとともに、正常時の輸送機構との相違を明らかにすることを目的としている。

70kDa 熱ショック蛋白質 (hsc70) の大部分は正常時には細胞質に局在するが、熱ショック時には核に強く集積する。大腸菌で発現させたリコンビナント hsc70 を HeLa 細胞に微量注入して、正常時と熱ショック時における細胞内の挙動を調べたところ、細胞質に注入した hsc70 は熱ショック時に効率よく核内に集積するのに対し、正常時ではわずかに核に移行するだけであった。核に注入した hsc70 はいずれの場合も効率のよく核外へ移行しなかった。このことから、熱ショック時における hsc70 の核内集積は、核外輸送の抑制ではなく、核内輸送の促進によると考えられる。また、hsc70 のストレス応答性核内移行が低分子量 GTPase Ran に依存することを、昨年度までの研究で明らかにしていた。

本年度は、ストレス応答時の核膜輸送機構を解析するため、hsc70 の *in vitro* 核内輸送実験系を確立した。熱ショックをかけた細胞から細胞質抽出液とセミインタクト細胞を調製し、hsc70 の核内輸送の再構成を試みたところ、hsc70 は熱ショック時の細胞から得た細胞質抽出液に依存して効率よく核内に集積することがわかった。正常時の細胞から得た細胞質抽出液にはこの作用がみられなかった。セミインタクト細胞は熱ショックの有無にかかわらず、効率よく hsc70 を核に集積させた。このことから、hsc70 のストレス応答性核内移行は、熱ショック時の細胞に存在する細胞質性因子の作用によるものであると考えられ

る。また、この *in vitro* 実験系を用いて、SV40 large T 抗原の核局在化シグナル (NLS) や、hnRNPA1 の核局在化シグナル (M9) の核内移行を調べた。NLS や M9 は正常時の細胞から得た細胞質抽出液に反応して効率よく核に集積するのに対して、熱ショックをかけた細胞から得た細胞質抽出液には効率よく反応しなかった。マイクロインジェクションを利用した *in vivo* 実験系においても、正常時と比較して熱ショック条件下では NLS の核内輸送効率の低下がみとめられた。このことから、正常時とストレス応答時で機能する輸送経路や輸送因子に何らかの違いがあることが示唆される。

現在、hsc70 のストレス応答性核内移行を担う輸送因子と、ストレス応答時に conventional な核蛋白質の輸送活性が低下する原因の同定を試みている。

研究業績

(1) 原著論文

1. Jiang, C. J., Shoji, K., Matsuki, R., Baba, A., Inagaki, N., Ban, H., Iwasaki, T., Imamoto, N., Yoneda, Y., Deng, X. W., and Yamamoto, N.: Molecular Cloning of a Novel Importin α Homologue from Rice, by which constitutive photomorphogenic 1 (COP1) nuclear localization signal (NLS)-protein is preferentially nuclear imported. *J. Biol. Chem.* **276**, 9322-9329, 2001.
2. 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*, **12**, 1079-1091, 2001.

(2) 発表講演

1. 小瀬真吾, 米田悦啓, 今本尚子: 輸送担体分子 importin β の核膜孔通過の解析. 第 1 回日本分子生物学会春季シンポジウム, 岩手, 2001 年 5 月.
2. 徳永万喜洋, 今本尚子: 細胞質 - 核間輸送の 1 分子蛍光イメージング. 第 1 回日本分子生物学会春季シンポジウム, 岩手, 2001 年 5 月.
3. 今本尚子: 核-細胞質間分子流通のメカニズム. 生化学会中部支部シンポジウム, 名古屋, 2001 年 5 月.
4. 今本尚子, 徳永万喜洋: 核膜孔複合体の機能解析: single pore 上の 1 分子イメージング. 第 54 回日本細胞生物学会大会 ワークショップ「細胞核機能と構造のダイナミクス」, 岐阜, 2001 年 5 月.
5. 古田満衣子, 小瀬真吾, 米田悦啓, 今本尚子: 分子シャペロン hsc70 の核内輸送機構の解析. 第 54 回日本細胞生物学会大会, 岐阜, 2001 年 5 月.
6. 小池牧子, 横屋史彦, 米田悦啓, 今本尚子: β -catenin の核外移行の解析. 第 54 回日本細胞生物学会大会, 岐阜, 2001 年 5 月.

7. 小沢仁美, 小瀬真吾, 片平じゅん, 檜枝美紀, 立花太郎, 酒井宏明, 月原富武, 今本尚子, 米田悦啓: 核タンパク質輸送因子 importin- β の核膜孔通過機構の解析. 第 54 回日本細胞生物学会大会, 岐阜, 2001 年 5 月.

8. 小瀬真吾, 米田悦啓, 今本尚子: 輸送担体分子 importin β の核外輸送機構の解析. 第 54 回日本細胞生物学会大会, 岐阜, 2001 年 5 月.

9. 今本尚子: 核-細胞質間分子流通のメカニズム. 生物機能のニューバイオロジー, 東大, 2001 年 6 月.

10. 今本尚子: 核と細胞質の分子コミュニケーション. 遺伝子病制御研究所セミナー, 北大, 2001 年 7 月.

11. Makio Tokunaga, Naoko Imamoto: Single Molecule Imaging of Nucleocytoplasmic Transport in Cells and Quantitative Analysis of Interaction with Nuclear Pores. 第 4 回生物物理学国際会議, 京都, 2001 年 7 月.

12. 今本尚子: 核-細胞質間分子流通のメカニズム. 名古屋大学生物化学特別講義(セミナー), 名大, 2001 年 9 月.

13. 徳永万喜洋, 今本尚子: 細胞質 - 核間輸送の 1 分子蛍光イメージングと定量解析. 第 39 回日本生物物理学学会年会, 大阪, 2001 年 10 月.

14. Naoko Imamoto, Makio Tokunaga: Translocation through Nuclear Pore Complex: Single Molecule Imaging and Quantitative Analysis of Molecular Interaction. AIRLIE Meeting on NUCLEAR TRANSPORT, Virginia, USA, 2001 年 11 月.

15. Naoko Imamoto, Makio Tokunaga: Nucleocytoplasmic transport: A new approach to reveal function of nuclear pore complex. 第 16 回日仏がん会議, 京都, 2001 年 11 月.

16. 今本尚子, 徳永万喜洋: 1 分子蛍光イメージングを利用した核膜孔複合体の機能解析. 第 24 回日本分子生物学会年会 ワークショップ「分子生物学の新しい潮流」, 横浜, 2001 年 12 月.

17. 古田満衣子, 小瀬真吾, 米田悦啓, 今本尚子: 70kDa 熱ショック蛋白質のストレス応答性核内輸送機構の解析. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001 年 12 月.

18. 栗崎 晃, 小瀬真吾, 米田悦啓, Carl-Henrik Heldin, Aristidis Moustakas: Smad3 の核移行・核外移行制御機構. 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001 年 12 月.

I. 生命情報・DDBJ 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。(2001 年 4 月より「生命情報研究センター」から「生命情報・DDBJ 研究センター」に改称された。) 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), データベース運用開発研究室 (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, 池尾一穂助手で構成されている。2001 年 3 月で今西規助手が独立行政法人産業技術総合研究所生物情報解析研究センター統合データベース解析グループのチームリーダーとして転出した。遺伝子機能研究室は舘野義男教授, 小林 (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。データベース運用開発研究室は菅原秀明教授, 宮崎智助手が担当している。宮崎助手は、2001 年 3 月より 12 月までアメリカ合衆国のミシガン州立大学 Center for Microbial Ecology に文部科学省在外研究員として派遣され、研究を行った。

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青野英雄, 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, 大城戸利久, 岡田あゆみ, 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, 末木裕子, 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, 平島壮規, 堀江元乃, 真島 淳, 丸山瑞穂, 向笠奈緒子, 村形直子, 安田徳一, 山本ゆか, Lebowitz 紀子 (遠藤), 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。また、2001 年 4 月より今西規助手が独立行政法人産業技術総合研究所生物情報解析研究センター統合データベース解析グループのチームリーダーとして転出した。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 3 年生, 小倉 淳, 中村洋路, 花田耕介の 3 名が博士課程 2 年生, 田中 剛の 1 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, Wang Chi Chiu, T. Daniel Andrews (2 月まで) が日本学術振興会外国人特別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, 小見山智義, 田中信彦, 早川志帆, 間野修平 (6 月まで), Jung Shan Hwang は、受託研究員として研究活動を行った。岩本智恵, 竹澤 (梅原) 由美, 大泉ひろこ, 羽原拓哉 (7 月まで), 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, 梅澤知美, 奥田啓子, 勝部有季, 杉山順子 (9 月まで), 中森亜紀子 (10 月まで), 丸山瑞穂, 渡辺昭乃が積極的に行った。

(1) GASS モデルによる多遺伝子発現相互作用のシミュレーション: 遠藤高帆, 五條堀孝

近年 DNA マイクロアレイ技術の進展や EST プロファイルの情報量の増加により、多くの遺伝子の時系列的発現量変化を追跡することが可能になった。しかしこれらの関係を推測して記述することは容易なことではない。遺伝子間の相互作用を示すために我々は化学反応を記述するためのモデルとして提案されている S-System を使用して、遺伝子発現が相互にどのような影響を及ぼしあっているかをモデル化することを試みた。S-System は n 個の要素に対して $2n(n+1)$ 個のパラメタを最適化することで系の反応を推定するものであるが、ある遺伝子の下流遺伝子に限った場合でも細胞内では n は 100 以上になり、パラメタの推定は非常に難しい (いわゆる NP 問題) ものとなる。そこで我々は遺伝的アルゴリズムを利用したパラメタの最適化を行った。このモデルを Genetic Algorithm for S-System (GASS) と呼ぶ。これには遺伝研内に設置されているスーパーコンピュータである Supernig を使い、64CPU に並列化処理したプログラムを作成した。この結果、プロファイルのシミュレートにおいては非常によい一致結果を見ることができた。この GASS モデルを使用して公開されている DNA マイクロアレイのデータを利用し、新しい遺伝子発現の関連を見いだすことを次の課題としている。

(2) *In silico* 染色: ヒト全ゲノム配列からのギムザバンド構造の再構築: 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。G バンドは GC 含量の低い領域

に、RバンドはGC含量の高い領域にそれぞれ対応すると一般には考えられてきたが、この対応関係が必ずしも正しくないことを示す実験結果も報告されている。本研究の目的は、ギムザ染色によるバンド構造とGC含量との正確な対応関係を知ることである。我々は、ヒト全ゲノム配列から *in silico* でギムザバンド構造を再構築する「2-window」法を開発した。その結果、2.5Mbと9.3Mbの2つのウィンドウにおけるGC含量の差が、850バンドレベルでのバンドパターンと最も強く相関していることを見出した。ヒトの43の染色体腕の大部分において、両者の相関は統計的に有意であった。この結果は、従来いわれていたようなGC含量とバンド構造との単純な対応関係は正しくなく、Gバンドは、周囲に比べて相対的にGC含量が低くなっている領域であることを示している。これらの事実は、DNA配列上の核マトリックス結合領域がRバンドに比べGバンドに密に存在するというモデルによってうまく説明される。

(3) マウス胚の眼球および脳における遺伝子発現プロファイル：Chi Chiu WANG, Kazuho IKEO, Takashi GOJOBORI, Michael Scott ROGERS¹ (¹Department of Obstetrics and Gynaecology, The Chinese University of Hong Kong)

本研究は「正常および糖尿病状態下における初期胚形成の発生障害および分子制御研究」の初めての試みである。DNAマイクロアレイによる正常組織と被験組織の比較に関する包括的な応用は詳細な定量的および定性的な情報を与えるものと考えられる。本研究において、我々はNIA/NIHから15000以上の独自の配列を含むマウス胚体cDNAクローンを入手した。また、cDNAチップシステムを用いた実験に関する調整についてもすでに行われており、対照実験のため必要となるすべてのプローブを含むDNAチップを準備した。最初の試みとして、脳および眼球組織を異なる時期のマウス胚を実験に供し、競合ハイブリダイゼーションの対照としてC57BL/6JのE8.5システムを用いた。一方、前脳、中脳および後脳の転写制御の差異の検出についてはレーザーマイクロダイセクション技術を用いた。さらに、遺伝子発現解析には新たなニューラルネットワークを用いた。本研究は脳および眼球の発生および分化の過程の理解に密接にかかわるものである。

(4) 原核生物ゲノムにおける水平移行遺伝子の網羅的検出法の開発：中村洋路, 伊藤 剛, 松田秀雄¹ (阪大), 五條堀孝

現在DDBJに登録されている原核生物ゲノムは60を越える(平成13年12月1日の時点で63種)。我々はこれら原核生物のゲノム情報を用いて、ゲノム中の水平移行遺伝子、すなわち他種に由来する遺伝子を感度よく検出する方法を開発した。この方法は原理的には遺伝子発見

プログラムGenMarkを応用したものであり、対象とするゲノム上の各遺伝子とそのゲノム自身の遺伝子である事後確率を、マルコフモデルとベイズ決定に基づいて計算するものである。この事後確率値の低い遺伝子が、対象とするゲノムにももとは存在しなかった遺伝子、すなわち最近になって他種から水平移行してきた遺伝子と見なされる。さらに我々は、モンテカルロシミュレーションを行い、得られた事後確率値の統計的有意性を判定できるようにした。以上の解析システムを用いて、我々は全原核生物ゲノムについて自動的・網羅的に水平移行遺伝子の候補を検出することを試みた。その結果、全63種の原核生物ゲノム中で水平移行してきたと考えられる遺伝子は、1%の有意水準で判定したところ、遺伝子全体の10%を越えることが分かった。これらの遺伝子の中には、プロファージ、プラスミド、トランスポゾンといった、明らかに外来性と見なせる遺伝子だけでなく、何らかの遺伝子発現制御に関わるとされる遺伝子も多かった。このことは原核生物の進化研究において興味深い知見を与えるものである。

(5) 神経伝達物質受容体(GPCR: Gタンパク共役型受容体, および, LGIC: イオンチャンネル型受容体)の分子進化的解析: 岩間久和, 五條堀孝

中枢神経系で重要な役割をもつ分子の進化を解析することを目的として、以下の2点の解析をおこなった。(1) まず、Gタンパク共役型受容体(GPCR)であるカテコールアミン受容体とそれに共役するGタンパク α サブユニットに注目した。その理由は、カテコールアミン受容体はさまざまな精神疾患に対する薬剤の標的分子であり、中枢神経系の高次機能を考える上で重要であるためである。Gタンパク α サブユニットの機能分化は動物界の進化のごく初期に完了したと考えられるのに対し、カテコールアミン受容体群は脊椎動物の進化の段階で多様性を急速に増し、その後もリガンドとの結合特異性を変化させながら現在の脊椎動物の体制に至ったと考えられた。このような相互に作用する多様なタンパク質分子の出現には遺伝子やゲノムの重複が寄与し、それらの時期や進化的順序が重要な意味をもっていることが示唆された。(2) ヒトの脳で発現していることが知られている神経伝達物質受容体の遺伝子について、ヒト、マウス、ラット間で、文献の調査と、厳しい基準による配列データベース検索により、オーソログ遺伝子の同定を行った。この検索で得られた全長配列をもつ神経伝達物質受容体遺伝子オーソログは、ヒト脳で発現する神経伝達物質受容体(GPCRおよびLGIC)のほぼ全体を網羅した。このデータを用い、オーソログ間で同義置換・非同義置換数を推定し、その値に基づき、各神経伝達物質受容体遺伝子に対する選択的淘汰の強さを推定した。その結果、選択的淘汰が有意に緩んでいる4種の受容体遺伝子(NMDA-2Cグルタミン

ン酸受容体, GABAA- ϵ , GABAA- θ , ドーパミン D4) を検出した。これら受容体は記憶や新奇刺激への反応性という高次の認知活動に深く関与するという共通点をもつことが明らかになった。

(6) 下等後生動物の扁形動物門におけるアポトーシス機構 : Jung-Shan HWANG, 池尾一穂, 五條掘孝

扁形動物門に属す淡水性プラナリアは, 系統学的には前口動物と新口動物の間に位置しており, プラナリアの再生能力は, プラナリアの断片から完全体を形成できるほど特徴的である。再生は, 細胞増殖, 細胞の分化, 極性および構造の変化が胚発生と同じような現象で起こっている。そのため再生を観察することで, 胚発生の様子が比較的簡単に理解できる。我々の目的は, プラナリアを用いて, 下等後生動物におけるプログラムされた細胞の自殺 (アポトーシス) および発生の進化過程を観察することである。既に下等後生動物であるヒドラと海綿動物では, アポトーシス関連遺伝子のカスベースと Bcl-2 の相同遺伝子が確認されているが, 形態形成においてはアポトーシスの発現は確認されていない。そこで今回我々は下等後生動物であるプラナリアでのアポトーシスの発現を確認およびプラナリアの再生とアポトーシスの関連を観察している。プラナリアでのアポトーシスの存在を確認するため, プラナリアをコルシチン存在下で培養し AnnexinV と DAPI で染色した。細胞膜の破壊と DNA の凝縮が明らかに蛍光顕微鏡で確認され, アポトーシスが存在していることが明らかとなった。プラナリア cDNA ライブラリーからアポトーシス関連遺伝子 4 個の全配列を決定した。それらの遺伝子はカスベースの 3 つの相同遺伝子 (Dj-cas1, Dj-cas2 and Dj-cas3) と Bcl-2 の相同遺伝子 (Dj-blg) である。他の生物種のカスベース遺伝子にプラナリアカスベース 3 遺伝子を加えアライメントを行なったところ, Dj-cas1,2,3 はカスベース遺伝子の保存領域である CASc ドメインを保有しており, 分子系統樹から全てのプラナリアカスベース遺伝子はカスベース 3,6,7 のグループに属していることが解った。同様に Dj-blg 遺伝子は二つの保存領域 BH2 と BH3 を保有しており系統的に pro-apoptotic Bcl-2 family に近いことを示していた。また, それらアポトーシス関連遺伝子の発現を in situ ハイブリダイゼーションを用いてプラナリアを切断後, 2 時間, 1 日, 2 日, 3 日, 5 日, 7 日経過したもので確認している。Dj-cas2 と Dj-cas3 の発現が (Dj-cas1 発現は弱かった。) 切断後 7 日目に頭部の芽体形成領域で確認されたが, 尾部の芽体形成領域では認められなかった。また, 興味深いことにパラフィン切断を用いた in situ ハイブリダイゼーションでは Dj-cas2 と Dj-cas3 の発現が脳に認められている。Dj-blg は切断 5-7 日後の頭部においては芽体形成領域ではなく幹細胞で発現され, 切断 3 日後の尾部においては消化管領域に発現していた。今回の

結果は, プラナリアにおいてアポトーシスは再生において重要な役割を示すことを明らかにし, 実際のアポトーシスの反応が原始的な多細胞生物にも保存していることを示唆する結果となった。

(7) 同義置換の最高速度をもつニドウイルスとそのゲノムサイズの進化的変化 : 花田耕介, 鈴木善幸, 五條掘孝
宿主の壁を超えて感染するウイルスが, 強力な病原性を起す例が数多く見つかっている。そのような感染を予防するためにも, ウイルスの共通祖先から現在に至る変異や進化の過程を研究することは非常に重要であると考えられる。そこで今回, 大きいウイルスグループを構成するウイルス目として, コロナウイルス, トロウイルスおよびアルテリウイルスらに代表されるニドウイルス目に注目し, ゲノムサイズの進化的変化および進化速度の推定を行った。ニドウイルス目に属するコロナウイルス, トロウイルスおよびアルテリウイルスのウイルスゲノムの塩基配列を DNA データバンク (DDBJ / EMBL-Bank / GeneBank) から収集し, ドットプロットにより保存領域を確認後, その領域を用いて分子系統樹を構築した。さらに, 各ウイルス種における envelop 部分の同義置換速度および非同義置換速度の推定を行った。結果①系統樹の結果 : ニドウイルス目の分子系統樹から, コロナウイルス (平均ゲノムサイズ : 約 30kb), トロウイルス (約 23kb), アルテリウイルス (約 14kb) の順に共通祖先から分岐していることが明らかとなった。この結果は, ウイルスが分岐するたびにウイルスのゲノムサイズが短くなっていることを示す結果であった。②進化速度の結果 : コロナウイルスとアルテリウイルスのいくつかのウイルス種で同義置換速度の推定を行ったところ, 約 25 年前に分岐したと考えられるアルテリウイルスに属する豚繁殖呼吸器障害症候群ウイルス (PRRSV) の同義置換速度は約 0.1 / 同義座位 / 年であり, 極めて速い進化速度であることが解った。この進化速度は, ニドウイルス目の中だけではなく, HIV-1 やインフルエンザウイルスの進化速度と較べても約 10 倍速い驚異的な速度であった。考察 : 今回の系統樹から, ニドウイルス目は, 一般にゲノムサイズが小さいウイルスから大きなウイルスに進化するという考えと全く反対の進化過程をもつウイルスグループであることが示唆された。さらに, PRRSV の同義置換速度は今まで調べられていたウイルスの中でも最高速を示すものであり, その原因は複製酵素の精度の悪さによる可能性が考えられた。

研究業績

(1) 原著論文

1. F. CEBRIÀ, M. NAKAZAWA, K. MINETA, K. IKEO, T. GOJOBORI and K. AGATA : Dissecting planarian CNS regeneration by the expression of

neural-specific genes. *Dev. Genes Evol.* (in press), 2001

2. Cebria, F., Nakazawa, M., Mineta, K., Ikeo, K., Gojobori, T. and Agata, K.: Dissecting planarian CNS regeneration by the expression of neural-specific genes. *Dev. Genes Evol.* (in press), 2001.

3. Gojobori, T.: DNA sequence analysis, in Encyclopedia of Life Sciences. *Macmillan Reference Ltd* : (in press), 2001.

4. Sato, S., Tanaka, M., Miura, H., Ikeo, K., Gojobori, T., Takeuchi, T. and Yamamoto, H.: Functional conservation of the promoter regions of vertebrate tyrosinase genes. *J Invest Dermatol Symp Proc.* **6** (1), 10-8, 2001.

5. Bellgard, M., D, Schibeci., E, Trifonov. and Gojobori, T.: Early detection of G + C differences in bacterial species inferred from the comparative analysis of the two completely sequenced *Helicobacter pylori* strains. *J. Mol. Evol.* **53** (4-5), 465-468, 2001.

6. Tsunoyama, T., Bellgard, M. and Gojobori, T.: Intragenic variation of synonymous substitution rates is caused by nonrandom mutations at methylated CpG. *J. Mol. Evol.* **53** (4-5), 456-464, 2001.

7. Osawa, S. and Gojobori, T. Preface. *J. Mol. Evol.*(Thomas Jukes special issue), **53** (4-5), 257, 2001.

8. Suzuki, Y. and Gojobori, T. Positively selected amino acid sites in the entire coding region of hepatitis C virus subtypes 1b. *Gene.* **276** (1), 83-87, 2001.

9. Iwama H. and Gojobori T. [Evolution of molecules involved with neural transmission:in the case of catecholamine receptors and G protein alpha subunits] *Tanpakushitsu Kakusan Koso.* **46** (11 Suppl) , 1586-93, 2001.

10. Suzuki, Y., Gojobori, T. and Nei, N. ADAPTSITE : detecting natural selection at single amino acid sites. *Bioinformatics.* **17** (7), 660-661, 2001.

11. Sato, T., Terabe, M., Watanabe, H., Gojobori, T., Hori-Takemoto, C., Miura, K.: Codon and base biases after the initiation codon of the open reading frames in the *Escherichia coli* genome and their influence on the translation efficiency. *J. Biochem.* **129**, 851-860.

12. International Human Genome sequencing Consortium (DNA sequence databases: DNA Data Bank of Japan et.al) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* **409** (6822), 860-921, 2001.

13. Suzuki, Y., Wyndham, A. and Gojobori, T.: 14. Virus Evolution. Handbook of statistical genetics, eds. D.J.Balding, M.Bishop, and C.Canning. *John Wiley & Sons.* 377-413, 2001.

14. RIKEN Genome Exploration Research Group

Phase II Team and FANTOM Consortium (Okazaki, Y., Gojobori, T., et al.), Genelal organizer: Y.Hayashizaki Functional anotation of a full-length mouse cDNA collection. *Nature* **409** (6821), 685-690, 2001.

(2) その他

1. 五條堀孝監訳, 遠藤俊徳代表訳: 「分子生物学のためのバイオインフォマティクス入門 - 生物情報解析の理論とアルゴリズム」 (J.C.Setubal, J.Meidanis 著), 共立出版, 全 268 ページ, 2001.

2. 岩間久和, 五條堀孝: 「神経伝達にかかわる蛋白質分子の進化」『蛋白質・核酸・酵素』, 共立出版, **46**, 1586-1593, 2001.

3. 館野義男, 五條堀孝: 「基本編 - 第 8 章 DNA データバンクとゲノム研究」『ゲノム医学がわかる』わかる実験医学シリーズ, 羊土社, 86-92, 2001.

4. 館野義男, 五條堀孝: 「国際 DNA データバンクとバイオインフォマティクス」『ESTRELA』2001 年 7 月号, 統計情報研究開発センター, **88**, 11-17, 2001.

5. 遠藤高帆, 五條堀孝: 「3. 比較ゲノムによる機能予測」『実験医学』, 羊土社, **19**, 1357-1362, 2001.

6. 五條堀孝: 「遺伝子から見た生物の進化」『Computer Today』, サイエンス社, **104**, 30-37, 2001.

7. 五條堀孝: 「ゲノム比較から見えるもの」『biohistory』JT 生命誌研究館, **8**, 8-9, 2001.

8. 宮崎 智, 菅原秀明, 五條堀孝: 「ゲノム情報学」『最新医学』最新医学社, **56**, 64-71, 2001.

9. 岩間久和, 五條堀孝: 「研究資源としてのバイオインフォマティクス」財団会報『ヒューマンサイエンス』ヒューマンサイエンス振興財団, **12**, 19-21, 2001

(3) 発表講演

1. Gojobori, T.: "Evolutionary features of the human genome." Society of Molecular Evolution Meeting, Costa Smeralda, Guanacaste, (Costa Rica), 2001 年 1 月 8 日.

2. 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 12 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, 2001 年 2 月 5 日.

3. Gojobori, T.: "Organismic Evolution from the Viewpoint of Gene Expression Profiles.", The 46th International NIBB Conference, Genetics and Epigenetics -the first 100 years-, Okazaki Conference Center, Okazaki, 2001 年 3 月 6 日.

4. Gojobori, T.: "Organismal Evolution from the Viewpoint of Gene Expression Profiles.", Molecular Bases of Organismal Diversity, Kyoto International Conference Hall, Kyoto, 2001 年 3 月 8 日.

5. Gojobori, T.: "Reconstruction of chromosomal

banding in human genome by computer Takashi Gojobori and Yoshihito Niimura”, The 6th International Symposium on Genome Science in the 21st Century, The Graduate University for Advanced Studies, Hayama campus, Hayama, 2001年3月14日.

6. 五條堀孝:「ゲノム,どこまで分かるのか?」情報知識学会主催 講演会“ゲノムを知る”,慶応義塾大学三田キャンパス,東京,2001年3月24日.

7. T. GOJOBORI, K. MINETA, M. NAKAZAWA, F. CEBRIÀ, K. AGATA and K. IKEO: Evolution of genes expressed in the central nervous system. GEMINI: Genes and Minds Initiative, Workshop on Ape Genomics, Tokyo, Japan, Mar, 2001.

8. 五條堀孝:「集団遺伝と分子進化」生物情報学適塾,財団法人国際高等研究所,京都,2001年4月11日.

9. 五條堀孝:「ヒトゲノム多様性の集団遺伝学」セッション名:実地医家のための教育講演9,第45回日本リウマチ学会総会・学術集会,京王プラザホテル,新宿,2001年5月16日.

10. 五條堀孝:「微生物遺伝生化学」細菌ゲノムの進化,東大大学院理学系生物化学専攻大学院講義,東京大学本郷・駒場キャンパス,東京,2001年6月2日.

11. 五條堀孝:「ヒトゲノムの多様性とバイオインフォマティクス」セッション1 ヒトゲノム/比較ゲノムからのアプローチ,遺伝研・理研ゲノム科学合同公開シンポジウム~生命システムの理解を目指して~,日本薬学会長井記念ホール,渋谷,2001年6月7日.

12. Tateno, Y., Ikeo, K. and Gojobori, T.: “Current DDBJ activities in Bioinformatics” China-EU Workshop on Bioinformatics in the Post-Gnome Era, Shanghai, China, 2001年6月12-17日.

13. 五條堀孝:「バイオインフォマティクスの現状と将来戦略」JBIC 主催講演会,パレスホテル,東京,2001年6月11日.

14. Tateno, Y., Ikeo, K. and Gojobori, T.: “Current DDBJ activities in Bioinformatics” China-EU Workshop on Bioinformatics in the Post-Gnome Era, Shanghai, China, 2001年6月12-17日.

15. 五條堀孝:「ゲノム科学とバイオインフォマティクス」,日本大学大学院生講義,日本大学藤沢キャンパス,藤沢,2001年6月19日.

16. 五條堀孝:「ゲノムや大量遺伝子発現解析からみた生命の多様性と進化-遺伝子システムとして脳神経系の進化がみえるか?」メインシンポジウム“ところで生命ってなんだがや?”,2001年生物物理若手の会夏の学校,愛知県労働者研修センター,愛知,2001年8月6日.

17. 五條堀孝:「バイオインフォマティクスの先端研究と将来戦略」第一回JBIC バイオDB システム入門セミナー,鉄鋼会館,東京,2001年8月29日.

18. K. MINETA, M. NAKAZAWA, F. CEBRIÀ, K. IKEO, K. AGATA and T. GOJOBORI: Identification and Evolution of Neural Networks from the EST project of Planarian CNS. International symposium on developmental biology, Kyoto, Japan, Aug, 2001.

19. K. OGAWA, S. ISHIHARA, H. ORII, K. WATANABE, K. MINETA, K. IKEO, T. GOJOBORI and K. AGATA: Identification and characterization of receptor molecules of regenerating planarians. International symposium on developmental biology, Kyoto, Japan, Aug, 2001.

20. F. CEBRIÀ, M. NAKAZAWA, S. KOINUMA, K. MINETA, K. IKEO, T. GOJOBORI: Dissecting planarian CNS by gene probes. International symposium on developmental biology, Kyoto, Japan, Aug, 2001.

21. 五條堀孝:「生命情報科学をめぐる最近の話題」湧永製薬株式会社主催講演会,湧永製薬株式会社広島事業所,広島,2001年9月7日.

22. 五條堀孝:福岡大学平成13年度集中講義(地球圏科学特別講義V),福岡大学理学部,福岡,2001年9月9日-10日.

23. 五條堀孝:「バイオインフォマティクスの最前線と克服すべき課題-生物の多様性とビジネスチャンス」日経バイオビジネス主催講演会,幕張プリンスホテル,千葉,2001年9月21日.

24. 今西 規,羽原拓哉,山口香織,椎名 隆,安西達也,猪子英俊,五條堀孝:日本遺伝学会第73回大会,お茶の水女子大学,東京,2001年9月22日-24日.

25. 峯田克彦,中澤真澄,池尾一穂,阿形清和,五條堀孝:遺伝子発現プロフィールから見た脳・神経系の進化,日本遺伝学会第73回大会,東京,2001年9月

26. 宗形仁美,豊田礼子,矢嶋伊知朗,峯田克彦,岩間久和,池尾一穂,五條堀孝,山本博章:原索動物ホヤのオタマジャクシ幼生脳内色素細胞における遺伝子発現解析,日本遺伝学会第73回大会,東京,2001年9月

27. 房岡恵理,岡本圭司,峯田克彦,池尾一穂,五條堀孝,阿形清和,武内恒成:「新規モデル動物・プラナリアを用いた神経回路形成とIg スーパーファミリー接着分子群の解析」第24回日本神経学科学・第44回日本神経化学合同大会,京都国際会議場,京都,2001年9月26日.

28. 五條堀孝:「バイオインフォマティクスの課題と将来展望」株式会社日立製作所主催講演会,日立製作所ライフサイエンス推進事業部,埼玉,2001年9月27日.

29. 安西達也,椎名 隆,木村夏季,柳谷和代,須鎌千知,桑野裕子,重成敦子,成瀬妙子,Jerzy K Kulski,藤森克史,福住康仁,山崎正明,田代弘行,岩本千恵,梅原由美,今西 規,池尾一穂,五條堀孝,猪子英俊:「チンパンジー MHC クラス I 領域における比較ゲノム

解析」日本進化学会第3回大会, 京都大学, 京都, 2001年10月6日-8日.

30. 中澤真澄, F. CEBRIA, 峯田克彦, 池尾一穂, 阿形清和, 五條堀孝: 脳の構造の進化—cDNA チップを使ったプラナリア脳の細胞構築学的地図の作成, 日本進化学会第3回大会, 京都, 2001年10月

31. 五條堀孝: 「バイオインフォマティクスによるゲノム構造と遺伝子発現の進化的研究へのアプローチ」生物情報解析研究センター設立記念シンポジウム, ホテルグランパシフィックメリディアン, 東京, 2001年10月16日.

32. 五條堀孝: 「大量遺伝子発現解析からみた生命進化とバイオインフォマティクス」慶応義塾大学鶴岡タウンキャンパス設立記念シンポジウム, 慶応義塾大学鶴岡タウンキャンパス, 山形, 2001年10月20日.

33. 五條堀孝 パネルディスカッション「生命科学の発展と新規事業の創出について」～ポストゲノムシーケンス時代を受けた今後の重点分野と産業化について～ 第2回ライフサイエンスサミット, 東京プリンスホテル, 東京, 2001年10月21日.

34. K. Ota and T. Gojobori: “Disappearance of female heteromorphic sex chromosome in the order Aulopiformes” 5th Anton Dohrn Workshop Natural Selection and the Neutral Theory, Hotel Continental Terme, Ischia Island, Naples, Italy, 2001年10月.

35. K. Hotta and T. Gojobori: “Search for epoch-making genes in the evolution of chordate notochord” 5th Anton Dohrn Workshop Natural Selection and the Neutral Theory, Hotel Continental Terme, Ischia Island, Naples, Italy, 2001年10月26日.

36. T. Gojobori: “Bioinformatics Activities in Japan and the DNA Data Bank of Japan” The 3rd Korea-Japan Science and Technology Forum, Hotel the Shilla, Seoul, 2001年10月31日.

37. 五條堀孝: 「MHC から見たゲノム進化の典型と非典型」シンポジウム V ～MHC-総合ゲノム科学の視点から～, 第10回日本組織適合性学会大会, 福岡シーホークホテル&リゾート, 福岡, 2001年11月12日.

38. 椎名 隆, 羽原拓哉, 山口香織, 安西達也, 小原 栄, 今西 規, 五條堀孝, 猪子英俊: 「様々な生物種におけるMHC領域のシーケンシングとMHC統合データベース (M-integra) の開発」第10回日本組織適合性学会大会, 福岡シーホークホテル&リゾート, 福岡, 2001年11月1日-2日.

39. 安西達也, 椎名 隆, 木村夏季, 柳谷和代, 須鎌千知, 桑野裕子, 重成敦子, 成瀬妙子, Jerzy K Kulski, 藤森克史, 福住康仁, 山崎正明, 田代弘行, 岩本千恵, 梅原由美, 今西 規, 池尾一穂, 五條堀孝, 猪子英俊: 「チンパンジー MHC クラス I 領域における比較ゲノム解析」, 第10回日本組織適合性学会大会, 福岡シーホーク

クホテル&リゾート, 福岡, 2001年11月1日-2日.

40. T. Gojobori: “Evolution of central nervous system related genes from the viewpoint of gene expression profile” ~ Session4: Invertebrate Developmental Evolution ~ Symposium on Evolutionary Genomics New Paradigm of Biology in the 21st Century, Atami Korakuen Hotel, Japan, 2001年11月4日.

41. Niimura, Y. and Gojobori, T.: *In silico* chromosome staining: Reconstruction of Giemsa bands from the whole human genome sequences. Symposium on Evolutionary Genomics, New Paradigm of Biology in the 21st Century, Atami, 2001年11月.

42. K. MINETA, M. NAKAZAWA, K. IKEO, K. AGATA and T. GOJOBORI: Comparative study for the CNS evolution using neural-related genes found in the planarian EST project. Evolutionary Genomics: New Paradigm of Biology in the 21st Century, Atami, Japan, Nov, 2001.

43. M. NAKAZAWA, F. CEBRIA, C. KOBAYASHI, K. MINETA, K. IKEO, K. AGATA and T. GOJOBORI: The study of molecular diversity in the brain evolution; Planarian gene expression profiles revealing with cDNA chip technology. Evolutionary Genomics: New Paradigm of Biology in the 21st Century, Atami, Japan, Nov, 2001.

44. 五條堀孝: 「ライフサイエンスの将来展望について」平成13年度バイオ政策研修, 経済産業省経済産業研究所・東村山研修所, 東京, 2001年11月5日.

45. 五條堀孝: 「生物の進化とゲノム」第6回静岡健康・長寿学術フォーラム, 静岡県コンベンションツァーセンター “グランシップ”, 静岡, 2001年11月9日.

46. 今井 正, 高橋 敬, 新井盛夫, 永泉圭子, 稲葉 浩, 中村 伸, 福武勝幸, 池尾一穂, 五條堀孝: 「活性型第VII因子 (VIIa) クリンドロメインに統合する」第25回日本血栓止血学会学術集会, 神戸国際会議場, 神戸, 2001年11月15日-16日.

47. T. Gojobori: “Search for disease genes by use of genetics diversity of human populations, and the underlying ideas of population genetics” The First Hakone-yama Symposium, International Medical Center of Japan, Tokyo, 2001年11月20日.

48. 五條堀孝: 「バイオインフォマティクスの将来と課題」～わが国におけるバイオインフォマティクスの最前線～ 産業技術総合研究所セミナー, センチュリーロイヤルホテル, 札幌, 2001年11月22日.

49. 安西達也, 椎名 隆, 木村夏季, 柳谷和代, 須鎌千知, 桑野裕子, 重成敦子, 成瀬妙子, Jerzy K Kulski, 藤森克史, 福住康仁, 山崎正明, 田代弘行, 岩本千恵, 梅原由美, 今西 規, 池尾一穂, 五條堀孝, 猪子英俊:

「チンパンジー MHC クラス I 領域における比較ゲノム解析」, 第 24 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 横浜, 2001 年 12 月 9 日 -12 日.

50. Francesc CEBRIA, Masumi NAKAZAWA, Chiyoko KOBAYASHI, Katsuhiko MINETA, Kazuho IKEO, Takashi GOJOBORI and Kiyokazu AGATA: "Planarian brain structure: what does it tell us about the evolution of the central nervous system?" 第 24 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 横浜, 2001 年 12 月 9 日 -12 日.

51. 中澤真澄, F. CEBRIA, 小林千余子, 峯田克彦, 池尾一穂, 阿形清和, 五條堀孝: プラナリアの脳をつくる遺伝子プログラムの DNA chip を用いた解析, 第 24 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 横浜, 2001 年 12 月 9 日 -12 日.

52. 阿形清和, 洪健 智, 奥村亮一, 柴田典人, 林哲太郎, 小林千余子, F. CEBRIA, 樽井 寛, 久留智美, 熊代奈保子, 峯田克彦, 中澤真澄, 池尾一穂, 五條堀孝: プラナリアを用いた新しいアプローチ, 第 24 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 横浜, 2001 年 12 月 9 日 -12 日.

53. 房岡恵理, 峯田克彦, 明石哲人, 坂崎弘幸, 池尾一穂, 五條堀孝, 楠見明弘, 阿形清和, 武内恒成: プラナリアを用いた神経回路形成と Ig スーパーファミリー接着分子群の解析, 第 24 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 横浜, 2001 年 12 月 9 日 -12 日.

I-b. 大量遺伝情報研究室

当研究室で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とした研究を行っている. 最近ではゲノム情報解析にも積極的にとり組み, ゲノム上にコードされた全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, 解析結果を GTOP データベース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 (3 月まで総研大大学院生, 現神戸大にて博士研究員), 川端 猛 (9 月まで日本学術振興会特別研究員, 現奈良先端大助教授), 福地佐斗志 (JST 受託研究員), 本間桂一 (JST 受託研究員), 長島剛宏 (JST 受託研究員), 安達秀和 (研究支援), 坂本盛宇 (研究支援), 伊藤憲子 (技術員), 三村公子 (研究補佐員), 黒丸美奈子 (研究補佐員), 鈴木小夜子 (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), 杉山文予 (秘書) からなる. また中島広志 (金沢大学教授), 堀本勝久 (佐賀医大助教授), 磯貝泰弘 (理化学研究所先任研究員) をはじめ所内外の方々と共同研究を行った.

(1) 全ゲノム立体構造予測データベース GTOP の構築: 川端 猛, 福地佐斗志, 本間桂一, 太田元規, 西川 建
ポストシーケンス時代の研究目標は, 膨大な遺伝情報の意味を読み解くことであり, そのためにタンパク質レベルの機能解析が焦点の一つとなるのは必然であろう. 実験・理論を含めた様々なアプローチが進められているが, 我々は特にその立体構造に注目している. タンパク質は, ある特定の立体構造に折りたたんで初めて生物学的な機能を持つため, タンパク質の機能を詳細に理解するには, 最終的にはその立体構造をどうしても知る必要があるはずだ. 1 次配列に比べ, 3 次構造の決定には多大な時間と労力を要するが, ゲノム産物のタンパク質の中には, それ自身の立体構造は未知でも, 配列相同性から確実に構造予測できるタンパク質が数多くある. 我々は, そういった予測構造を集めたデータベースが機能理解に不可欠であると考え, 2 年ほど前から全ゲノム規模の構造予測データベースの構築を始めた. このデータベースを "GTOP" (Genome TO Protein structure and function の略, 「ジートップ」と読む) と名付け, 昨年からは WWW での公開も始めた. 近年の立体構造データベースの急速な増加と, 高感度の配列解析ソフトウェアの利用によって, 意外に高い割合のタンパク質について, その立体構造が予測できている. 現在, ゲノム配列の決定された 61 種の生物種について解析が終了し, 解析結果を <http://spock.genes.nig.ac.jp/~genome/gtop-j.html> より公開している. 詳細は文献 8 で発表した.

(2) エネルギー項からみた好熱菌と常温菌のタンパク質の違い: 金城 玲, 西川 建

好熱菌由来のタンパク質の安定性を知るために, 分子力学計算を 5 つの好熱菌のタンパク質と常温菌のホモログに適用した. 通常の構造エネルギー項に加え, 水和項と溶媒がもたらす静電的效果を扱った. 天然構造, ほぼ天然構造, そして非天然構造という 3 つの異なる状態のエネルギーを計算し, それぞれの差および各エネルギー因子の比較を行った. ほぼ天然構造は, 主鎖構造は天然構造とほとんど同じであるが, 側鎖パッキングが大きく異なる. 従って, 構造の詳細に立ち入らずに天然の主鎖構造を保つエネルギー因子を抽出することができる. 静電相互作用と水和項の和は, 正の値をとったが, 好熱菌のタンパク質では常温菌のタンパク質より常に低い値をとった. この傾向は天然構造と非天然構造のエネルギー差のみならず, ほぼ天然構造と非天然構造のエネルギー差にも見られた. 一方, 側鎖パッキングに関わるエネルギー項に関しては明白な傾向は見られなかった. これらの結果から, 天然構造の正確な側鎖パッキングは好熱菌由来のタンパク質の熱安定性には関与しないことが示唆された. この結論の解釈についても議論した. 詳細は文献 2 で発表した.

(3) 好熱菌由来タンパク質のアミノ酸組成の特徴：福地 佐斗志，西川 建

好熱菌由来のタンパク質は、電荷をもつ残基が多く、極性残基が少ないというアミノ酸組成を持つことが知られている。他方、分泌性タンパク質と細胞内在性タンパク質にもアミノ酸組成の違いがあり、この違いは主にタンパク質表面に露出した残基に拠る事も知られている。以上の背景から、好熱菌・常温菌由来タンパク質のアミノ酸組成の違いを、タンパク質表面・内部について比較を行った。分泌性・細胞内在性タンパク質間の組成の違いを考慮し、構造既知のタンパク質を三つの群、分泌性常温菌タンパク質・細胞内在性常温菌タンパク質・細胞内在性好熱菌タンパク質に分け比較を行った。構造既知タンパク質を、常温菌の大腸菌、好熱菌の *Thermus thermophilus* 由来のタンパク質を代表として選んだ。また、全ゲノム配列の決定された常温菌から *Bacillus subtilis*、好熱菌から *Aquifex aeolicus*、*Thermotoga maritima* を選び、構造既知タンパク質のアミノ酸配列とこれらの生物の相同配列を整列させ、タンパク質表面・内部別のアミノ酸組成を計算し比較に加えた。好熱菌・常温菌の平均組成の比較から、好熱菌の特徴的なアミノ酸組成の多くは、タンパク質表面に露出した残基に由来し、タンパク質内部ではほとんど差の無いことが解かった。個々のタンパク質のアミノ酸組成ベクトルを二次元平面に射影してみると、三つのタンパク質群は表面組成空間では分布が区別可能なのに対し、内部組成空間では三つの群は重なり合い区別できないことが示された。分泌性タンパク質は好熱菌由来のタンパク質とちょうど反対のアミノ酸組成の傾向を持ち、この特徴もタンパク質表面で顕著であることも示された。詳細は文献3で発表した。

(4) タンパク質設計用経験的ロータマー関数の開発：太田元規，磯貝泰弘（理研），西川 建

タンパク質の配列を設計するために、アミノ酸の側鎖構造（ロータマー）を考慮した経験的相互作用関数を開発した。アミノ酸の側鎖構造は56個のロータマーとして表現する。それぞれのロータマーの適合度は、2体の側鎖間相互作用関数、1体の水和および局所構造の関数の和として与える。構造部位環境とその天然配列の対の数と、仮想的に作成した非天然配列との対の数を用いてエネルギースコアを算出した。天然のロータマーの再現性を問うたベスト14テストにおいて、ヒトリゾチームとT4リゾチームの点突然変異体の安定性解析において、また、構造プロフィールを利用した配列データベースのインバースフォールディングサーチにおいて、開発したロータマー関数は従来の関数作成法によるロータマー関数や、以前我々が開発したアミノ酸ベースの関数より良い結果を与えた。様々なターゲット構造について配列のデノボデザインを実行したところ、適当な分子量をもち、疎水性／

親水性のパターンも天然配列に類似した配列が生成された。この配列でblastサーチを行なったところ、ターゲット配列のホモログと同様の結果が得られた。一連の配列設計能の改良について、関数規格化に利用する参照状態と、残基のぶつかりを回避するための短距離反発力の関連を議論する。詳細は文献4で発表した。

(5) 超好熱菌由来ピロリジン・カルボキシル・ペプチターゼのX線結晶構造と熱安定化機構：田中秀明（阪大），因 正信（九女大），水島恒裕（阪大），小笠原京子（阪大），太田元規，月原富武（阪大），油谷克英（阪大）

超好熱菌由来タンパク質の熱安定化機構を調べるために、*pyrococcus furiosus* のピロリジン・カルボキシル・ペプチターゼ (pfPCP)、およびシステイン結合部位をセリンに置換した変異体のX線結晶構造を決定し、既に構造が決定されている類縁タンパク質（超好熱菌 (*T. litralis*) 由来および常温菌 (*B. amyloliquefaciens*) 由来のピロリジン・カルボキシル・ペプチターゼ) との比較を行った。3つの構造はともにホモテトラマーを成すが、他のユニットとの相互作用を担うC末部分が大きく異なっていた。pfPCPの高い熱安定性は、疎水性相互作用、水素結合、イオンペアの増加などに起因することがわかったが、特別な1つの因子が主因となっているのではなく、様々な因子の組み合わせとして実現していることがわかった。詳細は文献5で発表した。

研究業績

(1) 原著論文

1. Kinjo, A., Kidera, A., Nakamura, H. and Nishikawa, K.: Physicochemical evaluation of protein folds predicted by threading. *Eur. Biophys. J.*, **30**, 1-10, 2001.
2. Kinjo, A. and Nishikawa, K.: Comparison of energy components of proteins from thermophilic and mesophilic organisms. *Eur. Biophys. J.*, **30**, 378-384, 2001.
3. Fukuchi, S. and Nishikawa, K.: Protein surface amino-acid compositions distinctively differ between thermophilic and mesophilic bacteria. *J. Mol. Biol.*, **309**, 835-843, 2001.
4. Ota, M., Isogai, Y. and Nishikawa, K.: Knowledge-based potential defined for a rotamer library to design protein sequences. *Protein Eng.*, **14**, 557-564, 2001.
5. Tanaka, H., Chinami, M., Mizushima, T., Ogasawara, K., Ota, M., Tsukihara, T., and Yutani, K.: X-ray crystalline structures of pyrrolidone carboxyl peptidase from a hyperthermophile, *Pyrococcus furiosus* and its cys-free mutant. *J. of Biochem.* (Tokyo), **130**, 107-118, 2001.

6. Nakashima, H., Yamashita, S. and Nishikawa, K.: Directional gene distributions of two mycoplasma species exhibited in the nucleotide composition space. Res. Comm. In Biochem., *Cell & Mol. Biol.*, **5**, 27-35, 2001.
7. Noguchi, T., Ito, M., Matsuda, H., Akiyama, Y. and Nishikawa, K.: Prediction of protein secondary structure using the threading algorithm and local sequence similarity. Res. Comm. In Biochem., *Cell & Mol. Biol.*, **5**, 115-131, 2001.
8. Kawabata, T., Fukuchi, S., Homma, K., Ota, M., Araki, J., Ito, T., Ichiyoshi, N. and Nishikawa, K.: GTOP: a database of protein structures predicted from genome sequences. *Nucl. Acids Res.*, **30**, 294-298, 2002.

(2) その他

1. 松澤史子, 西川 建: 「機能モチーフと機能ドメイン」『プロテオミクスの基礎』網沢進・平野久編, 講談社サンエンティフィック, 65-82, 2001.
2. 太田元規, 西川 建: 「タンパク質高次構造の予測」『プロテオミクスの基礎』網沢進・平野久編, 講談社サンエンティフィック, 82-111, 2001.
3. 西川 建: 「配列空間の“島モデル”再考」物性研究, **75**, 790-792, 2001.
4. 西川建: 「タンパク質立体構造の予測問題」Computer Today, **18**, 7月号, 10-15, 2001.
5. 川端 猛, 西川 建: 「蛋白質立体構造予測データベース GTOP」蛋白質・核酸・酵素(共立出版)増刊『ゲノムサイエンスの新たなる挑戦』, **46**, 2592-2597, 2001.
6. 磯貝泰弘, 太田元規: 「人工タンパク質の合理的設計」シリーズ・ニューバイオフィジックス9巻『生体ナノマシンの分子設計』城所俊一編, 共立出版, 102-121, 2001.

(3) 発表講演

1. 西川 建: ゲノム情報解析における立体構造予測. 高次ゲノム公開ワークショップ, 東京, 1月.
2. 太田元規, 磯貝泰弘, 西川 建: タンパク質設計用経験的ロータマー関数の開発. 高次ゲノム公開ワークショップ(ポスター発表), 東京, 1月.
3. 西川 建: タンパク質の謎を解く. 花園大学講演会, 京都, 3月.
4. 佐藤賢二, 太田元規, 鬼塚健太郎, 浅井 潔, 小長谷明彦: 計算機はタンパク質の本質にどこまで迫れるか. 人工知能学会, 松江, 4月.
5. 西川 建: ゲノム蛋白質構造予測データベース(GTOP)とその応用. 第1回日本蛋白質科学会ワークショップ, 大阪大学, 6月.
6. 磯貝泰弘, 太田元規, 田中敦成, 飯塚哲太郎, 西川 建: 計算とランダム変異実験を組み合わせたデノボタンパク質設計. 第1回日本蛋白質科学会(ポスター発表), 大阪

大学, 6月.

7. 磯貝泰弘, 太田元規, 石井杏奈, 石田 学, 西川 建: タンパク質の構造単一性に寄与するアミノ酸残基の同定一分子設計用特異性関数の開発. 第1回日本蛋白質科学会(ポスター発表), 大阪大学, 6月.
8. 田中秀明, 因 正信, 水島恒裕, 小笠原京子, 太田元規, 月原富武, 油谷克英: 超好熱菌由来のPyrrolidone Carboxyl Peptidaseの熱安定化機構. 第1回日本蛋白質科学会, 大阪大学, 6月.
9. 西川建: ゲノム情報からのタンパク質立体構造予測. 第28回生体分子科学討論会, 金沢大学, 7月.
10. 西川建: タンパク質立体構造の予測問題. 富士通SS研究会, 東京, 8月.
11. 西川建: 究極の立体構造予測; ブレークは近い. 第41回生物物理若手夏の学校, 愛知, 8月.
12. 西川建: アブイニシオ予測の実現可能性. 第39回日本生物物理学会シンポジウム, 大阪大学, 10月.
13. 福地佐斗志, 西川 建: コドン組成空間におけるゲノムの共通構造. 第39回日本生物物理学会(ポスター発表), 大阪大学, 10月.
14. 太田元規, 木下賢吾, 西川 建: 酵素の機能部位置換と構造安定性. 第39回日本生物物理学会(ポスター発表), 大阪大学, 10月.
15. 川端 猛, 西川 建: マルコフモデルによるタンパク質立体構造間の進化距離の推定. 第3回日本進化学会年会, 京都大学, 10月.
16. 太田元規: タンパク質の二次構造予測と構造認識. 生物物理バイオインフォマティクス講習会, 東京農工大, 11月.
17. 西川 建, 本間桂一, 福地佐斗志, 川端 猛: 立体構造予測によるゲノム中の偽遺伝子の探索. 第24回日本分子生物学会ワークショップ, 横浜, 12月.
18. 本間桂一, 福地佐斗志, 川端 猛, 太田元規, 西川 建: 大腸菌ゲノム中には相当数の偽遺伝子が存在する. 第24回日本分子生物学会(ポスター発表), 横浜, 12月.
19. 中島広志, 西川建: 遺伝子塩基組成とアミノ酸組成の関係. 第24回日本分子生物学会(ポスター発表), 横浜, 12月.
20. Fukuchi, S. and Nishikawa, K.: Pseudogenes in bacterial genomes. Asian Joint Workshop for Protein Informatics. 大阪大学, 12月.
21. Fukuchi, S., Nishikawa, K. and Horimoto, K.: Comparison between linear chromosomes in terms of duplicate genes: implication of whole genome duplication in yeast. GIW2001(ポスター発表), 東京, 12月.
22. Mori, K., Horimoto, K., Fukuchi, S. and Nishikawa, K.: Maintenance of Microbial Genome Architecture. GIW2001(ポスター発表), 東京, 12月.

23. 西川建：ラン藻ゲノム中の偽遺伝子. 基生研研究会, 岡崎, 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。

当研究室ではここ数年、東海大学の猪子研究室との共同研究でHLAクラスI遺伝子群の進化の仕事をしてきている。特に、特異なゲノム構造をもつクラスIのBとC遺伝子座並びにMICAとMICB遺伝子座の起源と進化に注目してきている。HLA遺伝子群はヒトの遺伝子の中で際立った多様性に富んでいるが、この多様性は正の自然選択の働きで生み出されてきた、ということがほぼ確かになってきている。このことは反面、HLA遺伝子群の起源の解明に問題をもたらすことにもなる。つまり、自然選択を受けている遺伝子は、一定の速度で進化していないということである。この矛盾を解決するには、一定の速度で進化している中立遺伝子あるいは機能を失った遺伝子やゲノム断片に注目する必要がある。私達は上記クラスIの遺伝子群が機能を失った反復配列と同じゲノム断片の中で進化していることを発見し、これらの反復配列の進化に注目することにより、クラスI遺伝子群の起源と進化の仕事を進めている。

また当研究室では大量遺伝情報研究室と協同でリプレッサーの進化を調べている。LacI, PurRといったリプレッサーは、N端はDNAと結合するHTHドメインであるが、リガンドとの結合を行なうC端のドメインはペリプラズム結合タンパク質(PBP)と相同な立体構造を持つ。この部分は以前我々が解析した結果、糖と結合するPBPと進化的に最も近縁であることが明らかになっている。糖と結合するPBPならびにリプレッサーの系統関係を解析した結果、リプレッサーは単一の起源を持ち、祖先PBPのN端にHTHドメインが付加することで現存するリプレッサーの共通の祖先が出現したことが明らかになった。したがって同一オペロンにコードされ同じ物質をリガンドとしているPBPとリプレッサーでも互いに進化的には遠い関係にあり、リガンド特異性は2つのタンパク質ファミリーで独立に獲得されたことが明らかになった。

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. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921, 2001.

(2) その他

1. 館野義男・五條堀孝：「国際DNAデータバンクとバイオインフォマティクス」エストレーラ, **88**, 11-17, 2001.

2. 館野義男・五條堀孝：「DNAデータバンクとゲノム研究」, わかる実験医学シリーズ・ゲノム医学がわかる, 菅野純夫編集, 羊土社, 86-92, 2001.

3. 深海-小林 薫：シリーズ『あなたにも役立つバイオインフォマティクス』第7回「アミノ酸配列の保存領域から蛋白質を知る」, 蛋白質核酸酵素, **46**, 2098-2003, 2001.

(3) 発表講演

1. Yoshio Tateno : Genomics Evolution of a HLA Class I Region, Symposium on Evolutionary Genomics, コスタ・リカ, 1月.

2. Yoshio Tateno : DNA Data Bank of Japan and its use for the study of protein structural evolution, シンガポール国立大学, シンガポール, 3月.

3. Yoshio Tateno : A project of an expression profile database, CIBEX, MGED3 (The 3rd Meeting on Microarray Genome Expression Database), パロ・アルト, アメリカ, 3月.

4. Yoshio Tateno : Protein Database of DDBJ, Protein Sequence Database Meeting, ワシントン, DC, アメリカ, 4月.

5. Yoshio Tateno : Current DDBJ activities in bioinformatics, Workshop on Bioinformatics in the Post-Genome Era, 上海, 中国, 6月.

6. Yoshio Tateno : Evolution of the lactose intake pathway in *Lactobacillus gasserii*, The 5th Anton Dornh Workshop on Natural Selection and the Neutral Theory, イスキア島, ナポリ, イタリア, 10月.

7. Kaoru Fukami-Kobayashi and Steven A. Benner : Detecting compensatory covariation signals in protein evolution using reconstructed ancestral sequences. SMCBE 2001, ジョージア大, アメリカ, 7月.

8. 深海 薫, 西川 建 : 分子レベルでの並行進化 : ペリプラズム結合蛋白質様ドメインを持つリプレッサーの系統解析, 日本遺伝学会第73回年会, 東京, 9月.

9. 深海 薫, David R. Schreiber, Steven A. Benner : 祖先配列を用いた補償的なアミノ酸置換の検出, 第3回日本進化学会, 京都, 10月.

10. Kaoru Fukami : Parallel evolution at molecular level between bacterial transcription factors in the

LacI / GalR family and sugar-binding periplasmic proteins. Evolutionary Genomics -- New Paradigm of Biology in the 21st Century, 熱海, 11月.

11. Sadahiko Misu, Takayasu Iizuka, Yuichi Kawanishi, Kaoru Fukami-Kobayashi, Naruya Saitou : Camus DB for amino acid sequence data. GIW 2001, 東京, 12月.

I-d. データベース運用開発研究室

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) の研究開発事業も行っている。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、宮崎 智および田中尚人が遂行し、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 (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>参照)

a. XML の応用と大量情報処理システムの強化 (研究業績 (1)-2, (2)-2 参照)

バイオインフォマティクスにおいては、複数の情報源からのデータを統合利用する必要がある。このため、各種情報源の相互運用性が課題になっていたが、近年 XML (eXtensible Markup Language) への期待が高まり、応用も試みられている。そこで、XML 技術を DDBJ のマスターファイルおよび次項の GIB にも採用し実用に耐えることを実証した。DDBJ のマスターファイルについては、当初、アクセス番号で検索した結果の出力として XML ファイルを一般に提供し、続いて、国際塩基配列データベース全件も XML ファイルとして ftp 可能とした。

大量登録システムについては従来の開発によって 2001 年 2 月に Nature 誌に発表されたヒトゲノム概要配列の登録公開に対応することができた。しかし、その後も国際塩基配列データベースのデータの増加は衰えることがない。2001 年 10 月には 1,300 万件 140 億塩基対を超えた。そこで、今後も継続するであろう多様な生物種の新たなゲノム配列決定プロジェクトと、既登録のゲノムデータに対する大規模な更新に対応するために、データ登録後

の査定・公開までも視野に入れた情報システムの改善を試みた (TSUNAMI プロジェクト)。

b. Genome Information Broker (GIB) の拡張 (研究業績 (1)-1 参照)

微生物ゲノムを中心に一般公開されたゲノム配列情報をゲノム単位で検索閲覧可能とするシステム GIB においても、毎月平均 1 種類以上のゲノムが公開されるような状況に 대응べく、大量のデータを効率的に処理するための基盤システムを構築した。このシステムでは XML と CORBA を活用して、比較的安価な PC サーバーを随時追加することによってシステムに柔軟性と拡張性を持たせている。これによって、国際塩基配列データから公開された微生物ゲノム配列データを迅速に GIB から公開できるようになった。また、染色体にそった GC 含量と GC skew の変化を図示する機能を追加した。

c. ゲノム情報バックボーンシステムの調査

実験的に決定された塩基配列データとそのアノテーションを獲得・公開するアーカイブとしての機能に加えて、ゲノム科学に貢献していくためのデータバンクとしてのあるべき姿について調査を進めた。なお、この項は科学技術振興事業団のバイオインフォマティクス推進事業の一環として行っている。

(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)

データベース運用開発研究室は 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。今年度は、データベースおよび Web 公開ページの XML 化を行った。また、UNESCO との契約により、Culture Collection 設立運営のガイドライン、研究室における技術マニュアル、CCINFO および STRAIN を格納した CD-ROM を作成した。

b. 生物分類同定ワークベンチ InforBIO の研究開発 (研究業績 (3)-3, 4, 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。今年度は、試作システムを CD-ROM にて配布して外部利用者の評価を求めた。

(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. 生物資源センター (Biological Resources Centres (BRC))
(研究業績 (3)-1,2, 6,9 参照)

日本提案に基づいて、OECD の Working Party for Biotechnology (WPB) において、Task Force (議長 菅原) においてまとめた報告書「Biological Resource Centres: Underpinning the future of life sciences and biotechnology」が OECD の公式文書として承認され一般に公開された。また、第 2 期 Task Force (議長国フランス) が発足し、報告書の実現に向けて走り出した。

b. Global Biodiversity Information Facility (GBIF) (研究業績 (2)-1 参照)

生物多様性情報に関する地球規模の情報システム構築を目的として GBIF は、数年の検討期間を経て今年 11 月からコペンハーゲンに事務局が設立されて、具体的な研究開発事業が始まることとなった。本活動に菅原が専門家として参加した (<http://www.gbif.org/> 参照)。

研究業績

(1) 原著論文

1. Goto, K., Miyazaki, S. and Sugawara, H.: Genome Information Broker for Data Retrieval and Comparative Analysis of Microbial Genomes, *Journal of Japan Society of Information and Knowledge* 10 (4), 4-13, 2001.

2. Miyazaki, S. and Sugawara, H.: Visualization of features in the Flat File by use of DDBJ-XML, *Currents in computational molecular biology*, 249-250, 2001.

(2) その他

1. 菅原秀明：ゲノム情報から多様性情報まで、情報知識学会誌, 10 (4), 1-3, 2001.

2. 菅原秀明, 宮崎 智：ヒトゲノムデータが DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に与えた影響, ゲノムサイエンスニュース, 5 (2), 2-7, 2001.

3. 菅原秀明：バイオインフォマティクス：「ツール」から「学」へ、生体の科学, 52 (4), 347-353, 2001.

4. 菅原秀明：数値分類, 鈴木健一朗, 平石 明, 横田

明編集「微生物の分類・同定実験法」, 231-24, シュプリンガー・フェアラーク東京, 東京, 2001.

5. 菅原秀明：バイオインフォマティクスへの期待, 蛋白質核酸酵素, 46 (6), 761-763, 2001.

(3) 発表講演

1. 菅原秀明：BRC 及び生物遺伝資源情報についての国際的動向, 発酵研究所講演会, 大阪, 2001 年 3 月 14 日.

2. Sugawara, H: Biological Resource Center-Underpinning the future of life science and biotechnology, Workshop on Microbial Data on Internet, Bangkok, 2001 年 3 月 26 日.

3. Sugawara, H: InforBIO: e-Workbench for systematics for microbes, Workshop on Microbial Data on Internet, Bangkok, 2001 年 3 月 26 日.

4. Sugawara, H: On-line registration system, new search system of WDCM and comparative genomics of microbes, Workshop on Microbial Data on Internet, Bangkok, 2001 年 3 月 26 日.

5. Sugawara, H and Miyazaki, S: An Integrated Retrieval and Analysis System for Microbial Data Distributed in the Internet: InforBIO American Society for Microbiology, Orland, USA, 2001 年 5 月 20-24 日.

6. 菅原秀明：OECD における Biological Resource Center の概念と進め方の戦略, 日本微生物資源学会「50 周年記念シンポジウム」, 東京, 2001 年 6 月 14 日.

7. 菅原秀明, 宮崎 智：微生物情報システムの展開：機関登録から分類同定支援まで, 日本微生物資源学会, 東京, 2001 年 6 月 15 日.

8. 菅原秀明：基調講演「バイオインフォマティクス：個々から連携へ」, 第 2 回 JBIC バイオ DB システム入門セミナー, 大阪, 2001 年 10 月 30 日.

9. 菅原秀明：系統保存機関から微生物資源センターへ, 理化学研究所微生物系統保存施設設立 20 周年記念理研シンポジウム「rDNA 分子系統解析が与えたインパクト」, 和光, 2001 年 11 月 16 日.

10. 菅原秀明：ヒトゲノムとバイオインフォマティクス入門, 日本菌学会関東支部第 16 回シンポジウム「ゲノム科学のインパクト, 社会と菌学」, 東京, 2001 年 12 月 8 日.

J. 放射線・アイソトープセンター

本放射線・アイソトープセンターでは所内の研究需要に応え安全かつ適切に放射線同位元素及び放射線を利用した研究ができるよう各種施設の管理運営を行っている。定家義人助教授の転出の後、放射線・アイソトープセンターの教官として平成12年11月より仁木宏典助教授が熊本大学より赴任した。さらに、平成14年4月よりセンター長の任を石浜明教授より引継ぎ、技官の谷田勝教(放射線取扱主任者)、技官・原登美雄らと協力して施設の管理運営を行って来た。

放射線・アイソトープセンターの研究は仁木宏典助教授を中心に「バクテリアの染色体分配の分子機構」に関して遺伝学的細胞学的手法を組み合わせた研究が始められた。この研究には谷田勝教技官と特別共同利用研究員として熊本大学医学研究科より派遣された山市嘉治が参加した。この研究に関して、科学技術振興事業団さががけ研究21「素過程と連携」領域の受託研究「DNAはいかにして分配されていくのか？」を平成13年9月まで行った。また、文部科学省科学研究費の特定領域(C)ゲノム生物学の公募研究「バクテリアの多様な *parAB* 分配遺伝子の基本分子機構の研究」の援助を受けた。

(1) 大腸菌染色体分配においてシスに機能する領域の探索：山市嘉治、仁木宏典

バクテリアの染色体は複製しながら娘細胞へと分配されていく。かつて、その移動は細胞伸長に因るものと考えられてきた。しかし、我々は分配過程の大腸菌染色体の特定領域の観察から、細胞伸長に因らない動的な染色体の移動があることを見いだした。染色体の複製起点(*oriC*)は細胞中央で複製し、それぞれのコピーは両極へ移動する。ではこの *oriC* 領域の両極への移動の仕組みはどうなっているのか、*oriC* 近傍にはセントロメアに相当する部位があるのか？ *oriC* 領域を含む約1Mbに渡る染色体領域が *oriC* 領域とほぼ同じ移動と局在性のパターンを示したことから、この染色体領域を複製後に両極へ移動させるに必要なDNA領域、いわゆるセントロメアに相当する領域が存在していると予想された。その領域を特定するため、染色体を2つに分断した変異株を作成し、その染色体分配を調べた。染色体上からセントロメアに相当する領域を切り離すとその染色体の分配には異常が生じるであろう。しかし、切り離した染色体領域を第2の染色体

として細胞内に保持させれば、この領域にある増殖に必須な遺伝子を失うことはない。このような方法で、*ori* 近傍の染色体領域を次々と切り出し、種々の染色体分断変異株を作成したところ、特定の染色体領域を失った変異株に、染色体分配の異常が見つかった。これら変異株では、複製後も倍化した *oriC* 領域が両極へ移動せず、それぞれが近接している細胞の割合が高まっていた。これは *oriC* 領域の両極への“速やかな”移動過程が阻害されたためと考えられる。このことからこの分断された染色体領域に染色体分配に関与するシス機能領域があることが明らかになった。このようにして特定できた染色体領域は約220kbの範囲にわたる領域であり、さらに細かく機能配列を特定するよう努めている。

(2) *parAB* 分配遺伝子の基本分子機構の解明：仁木宏典

バクテリアのプラスミドDNAは独自の分配機構により娘細胞へと精確に分配されている。これにはParA, ParBとよばれるDNA結合性タンパクとプラスミド分配においてセントロメアとして機能するDNA領域が必須である。分配過程においてプラスミドDNAは細胞中央部に局在していたものが複製後に細胞長の1/4と3/4に移動し、細胞が分裂する間、この位置に局在する。その結果として、プラスミドDNAはそれぞれの娘細胞に分配され、新生細胞の中央に局在することになる。これらプラスミドが中央部から1/4と3/4へ移動する機構また細胞の特定部位に局在化する機構についてはまだよくわかっていない。そこでParA, ParBタンパクの分配における分子的な役割を明らかにするため、FプラスミドとP1プラスミドで *parAB* 遺伝子の欠損したプラスミドDNAがどのように細胞内を分配されていくのか調べた。ParAタンパクを欠損した場合は分配機構の完全欠損と同じくサイトゾル内をランダムに分布している。これに対してParBタンパクを欠損した場合は、プラスミドの保持率はParAタンパクの欠損の場合と同じく著しく低下しているにもかかわらず、そのプラスミドDNAの細胞内での局在性は異なっていた。このプラスミドDNAは細胞中央に局在しており、このあと細胞長の1/4と3/4位置への局在が阻害されていた。このことはParBタンパクがプラスミド上のシス機能部位への結合とともに、このプラスミドDNAを細胞の中央に局在化させる結合の媒介分子であることを示唆していた。そして、ParAは細胞中央部に局在するParB-DNA複合体の解離因子であると考えられた。

(3) バクテリアゲノム上の *parAB* 分配遺伝子の研究：山市嘉治、谷田勝教、仁木宏典

枯草菌の染色体由来の *parAB* 分配遺伝子が大腸菌細胞内でプラスミドの分配機能を果たすことを実証した。このことはParABファミリーのメンバーがバクテリア種を超えて機能的に保存されていることと共に、この分配機

構を支える宿主因子においても種間でよく保存されていることを意味する。これをさらに検討するため、ピブリオ菌、放射線耐性菌染色体由来の *parAB* 遺伝子に関してそのプラスミド分配活性を大腸菌で調べた。分配機能をもたないプラスミドにピブリオ菌、放射線耐性菌染色体由来の *parAB* 遺伝子をそれぞれクローン化して、組み換えプラスミドの安定性が大腸菌内で向上するか調べた。しかしながら、いずれの場合も安定性が向上するものはなかった。他のバクテリア染色体由来の *parABC* 遺伝子が必ずしも大腸菌内でプラスミド分配機能を発揮しないがこれは単に遺伝子発現の問題もあり、遺伝子発現を大腸菌の中で制御しながら分配活性を調べる必要があるのかもしれない。また、分配のシス機能部位に関しては全くといっていいほど、共通する特徴はなかつた *parB* 遺伝子下流に位置するという大腸菌の染色体外因子で見出されてきた特徴から、その位置を仮定していることにも問題があるのかもしれない。

研究業績

(1) 原著論文

1. Inagawa, T., Kato, J., Niki, H., Karata, K., and Ogura T.: Defective plasmid partition in *ftsH* mutants of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genomics*, **265**, 755-762, 2001.

(2) 発表講演

1. 仁木宏典: Active segregation by the *Bacillus subtilis* partitioning system in *Escherichia coli*, 国際シンポジウム「枯草菌のゲノム生物学」, 立教大学太刀川記念会, 東京, 1月.

2. Niki, H.: Functional Domains of the organized chromosome in *Escherichia coli*. Gordon Research Conference on Plasmid and Chromosome Dynamics, New London, NH, USA, July.

3. Niki, H.: Functional Domains of the organized chromosome in *Escherichia coli*. The 3rd Fujiwara International Seminar "Bacterial Cell Cycle 2001", Senri Life Science Center, Osaka, Japan, September.

4. 仁木宏典: 変異の分離と導入によるバクテリア染色体分配機構の解明, 日本遺伝学会第73回大会, お茶ノ水大学, 東京, 9月.

5. 仁木宏典: DNAはいかにして分配されていくのか?, さきがけ研究21研究報告会「素過程と連携」領域, 東京ガーデンパレス, 東京, 11月.

6. 山市嘉治, 仁木宏典: 大腸菌染色体分配に関わるDNA領域の探索第24回日本分子生物学会年会, 横浜, 12月.

K. 実験圃場

実験圃場は、植物関連研究および系統生物、遺伝資源事業のための材料の開発・栽培・管理を行う。これらに必要な圃場、水田、温室の保守管理に携わる任務およびこれを用いた研究活動の任務を負っている。系統保存、遺伝資源事業としては、エンハンサートラップ系統の作成・選抜・解析・増殖および野生イネ系統の維持・増殖・配布を行っている。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、非常勤職員佐伯園子、近藤恭子、吉田崇、石井保が圃場管理および事業支援に当たった。鈴木温と三好一丸の2名は生研機構派遣研究員として研究に参加した。各スタッフは植物遺伝研究室の研究グループと共に、上記業務管理と平行して新たな研究素材の開発、利用の研究に取り組んでいる。特に圃場・温室の使用は、野々村助手による不稔変異系統の展開と解析、および植物遺伝研究室の伊藤幸博助手による、遺伝資源素材としての遺伝的改変系統の開発と解析の推進により相当な規模に達している。

これらの活動のため、昨年度から本年度にかけて、非閉鎖系形質転換温室の申請と承認、大型桑温室のイネ水田温室への転換、水田温室への照明装置設置などで、研究所より補助を受けた。圃場に関わる運営費・事業費は遺伝学研究所校費、および文部科学省系統保存事業費を用い、研究は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。研究内容の詳細は植物遺伝の報告を参照されたい。

野生イネと近縁栽培種子について約88系統の更新増殖と22件407系統の配布、および在庫2重保存のため農水省ジーンバンクへ2件1648系統の寄託を宮林技官が行った。また遺伝資源事業として公開しているイネデータベース Oryzabase に登録する野生イネ形質調査も開始した。圃場、水田、温室も大学共同利用機関として機能しており、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*, **110**, 284-291, 2001.

2. Ito, Y., Eiguchi, M., and Kurata, N.: KNOX homeobox genes are sufficient in maintaining cultured cells in an undifferentiated state in rice. *Genesis*, **30**, 231-238, 2001.

3. Harushima, Y., Nakagahra, M., Yano, M., Sasaki, T., and Kurata, N.: A genome-wide survey of reproductive barriers in an intraspecific hybrid. *Genetics*, **159**, 883-892, 2001.

4. 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) plasmid indicates its chimeric structure and evolutionary relationship between tumor-inducing (Ti) and symbiotic (Sym) plasmids in *Rhizobiaceae*. *J. Mol. Biol.* **307**, 771-784, 2001.

5. Harushima, Y., Nakagahra, M., Yano, M., Sasaki, T., and Kurata, N.: Diverse variation of reproductive barriers in three intraspecific rice crosses. *Genetics*, in press.

6. Ahn, B. O., Miyoshi, K., Itoh, J. I. Nagato, Y and Kurata, N.: A genetic and physical mapping of the region containing *PLASTOCHRON1*, a heterochronic gene, in rice (*Oryza sativa*, L). *Theor. Appl. Genet.*, in press.

7. Nonomura, K.I., Miyoshi, K., Eiguchi, M., Miyao, A., Hirochika, H. and Kurata, N.: *acd1* mutant aberrant for archesporial cell division in the anther and ovule of rice. *Rice Genet. Newsl.* **18**, in press.

8. Miyoshi, K., Kurata, N. and Nonomura, K.I.: Detection of the pre-meiotic DNA synthesis in pollen mother cells by immunofluorescence technique in rice. *Rice Genet. Newsl.* **18**, in press.

9. Kurata, N., Nonomura K-I. and Harushima, Y.: Rice genome organization focusing on centromere and genome interaction studies. "Biological Briefings." *Annals of Botany*, in press.

10. Kurata N. and Fukui K.: Chromosome research in genus *Oryza*. in Monograph in genus *Oryza*. *Nanda JS. ed. Springer*, in press.

11. Ito, Y., Hirochika, H. and Kurata, N.: Organ specific alternative transcripts of KNOX family class 2 homeobox genes of rice. *Gene*, in press.

(2) 発表講演

1. Kurata, N., Suzuki, T. and Nonomura, K.I.: Plant artificial chromosome and its prospect. Korean Plant Breeding Society Symposium, Souel, Korea, April.

2. 野々村賢一, 三好一丸, 宮尾安藝雄, 広近洋彦, 倉

田のり：減数分裂期突然変異体の選抜と解析，イネ遺伝学・分子生物学 2001，東京，6月。

3. 春島嘉章，倉田のり：栽培イネ間で観測される生殖的隔離障壁は急速に進化している，日本遺伝学会第73回大会，東京，9月

4. 野々村賢一，三好一丸，宮尾安藝雄，広近洋彦，倉田のり：減数分裂期突然変異体の選抜と解析，日本遺伝学会第73回講演会，東京，9月。

5. 伊藤幸博，永口貢，倉田のり：イネのエンハンサートラップシステムの作成，日本遺伝学会第73回講演会，東京，9月。

6. 野々村賢一，三好一丸，宮尾安藝雄，広近洋彦，倉田のり：葯および胚珠の発生が異常なイネ突然変異体の解析，日本育種学会第100回講演会，福岡，10月。

7. Ahn, B.O., 三好一丸，伊藤幸博，伊藤純一，長戸康郎，倉田のり：イネヘテロクローニ突然変異体 *plal* 遺伝子のポジショナルクローニング，日本育種学会第100回講演会，福岡，10月。

8. 守口和基，伊藤幸博，山崎由紀子，倉田のり：酵母核輸送トラップ (NTT) システムを用いたイネ核タンパク質の大量スクリーニング，日本育種学会第100回講演会，福岡，10月。

9. 伊藤幸博，永口貢，倉田のり：イネのエンハンサートラップシステムの作成，日本育種学会第100回講演会，福岡，10月。

10. 野々村賢一：生殖母細胞の数が増加するイネ突然変異体の解析，遺伝研研究集会「イネを舞台にした発生，分化プログラムの解明」，三島，11月。

11. 伊藤幸博，永口貢，倉田のり：イネのエンハンサートラップシステムの作成，遺伝研研究集会「イネを舞台にした発生，分化プログラムの解明」，三島，11月。

12. 春島嘉章：イネ生殖的隔離障壁の genome-wide survey，遺伝研研究集会「高等植物の生殖システムの分子遺伝学的解析とポストゲノム戦略」，三島，11月。

13. 野々村賢一：生殖器官の発達と減数分裂に関わるイネ突然変異体の解析，遺伝研研究集会「高等植物の生殖システムの分子遺伝学的解析とポストゲノム戦略」，三島，11月。

14. Harushima, Y., Nakagahra, M., Yano, M., Sasaki, T. and Kurata, N.: Comparative mapping of reproductive barriers among three rice crosses. Symposium on Evolutionary Genomics, Atami, November.

15. 伊藤幸博，永口貢，倉田のり：イネのエンハンサートラップシステムの作成と選抜，第24回日本分子生物学会年会，横浜，12月。

16. 野々村賢一，三好一丸，宮尾安藝雄，広近洋彦，倉田のり：イネの生殖細胞の分化に関与する受容体セリン/スレオニンキナーゼ，第24回日本分子生物学会年会，横

浜，12月。

17. 守口和基，伊藤幸博，山崎由紀子，倉田のり：酵母核輸送トラップ (NTT) システムによるイネ核タンパク質の大量スクリーニング，日本分子生物学会第24回年会，横浜，12月。

L. 技 術 課

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 水品洋一係員は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。

本年の人事面での異動は次の通りである。動物班第二技術係に木曾 誠係員(配属先:発生工学研究室)が2月1日付で採用になり、動物班第二技術係 陣内寅佳係員(配属先:哺乳動物遺伝研究室)は3月31日付で辞職した。後任として前野哲輝係員が4月1日付で採用された。大石あかね技官の育児休業(9月25日~平成14年7月28日)に伴い臨時任用技官 釜本晃子が10月1日付で採用され構造制御研究室に配属された。

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(隔週水曜日午後5時30分から)では「Recombinant DNA」の輪読を行っている。

平成13年の所外活動としては「第12回生物学技術研究会」(基生研及び生理学研技術課合同主催)が2月22日(木)~23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75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。口演発表20題とポスター発表44

題が提出され、陣内寅佳技官が「早期老化(*Klotho* 変異)マウスに対する野生由来系統 MSM/Ms の遺伝子が与える影響について」の演題で口演発表し、水品洋一技官が「マウスシステムの凍結保存—保存サンプルのデータベース管理について—」の題目で、三浦明日香技官は「既知の配列をもつ遺伝子の探索」という題目でそれぞれポスター発表を行った。石井百合子・古海弘康技官も参加し、発表に対する質問や技術面での意見交換を行った。

「第1回課題報告型技術シンポジウム」が3月27日生理学研究所で開かれ(生理学研究所技術課主催)、永口 貢技官が「イネ培養細胞からの再生植物体形成までの発生解剖学」(科学研究費奨励研究(B))の演題で口演発表し、技術課のミーティングでも発表した。

7月24日(火)~27日(金)の4日間、名古屋大学で開かれた「平成13年度東海・北陸地区国立学校等技術専門職員研修(生物・生命科学コース)」に境 雅子・谷田勝教技官が参加し、24日~25日は主に人事や大学に関する「行政上の諸課題」に関する講義や名古屋大学教官の講義を受講した。26日~27日の午前中にかけては参加者27名が4班に分かれ谷田勝教技官は第2班「PCR法を用いた真菌の同定」、境雅子技官は第4班「組織標本作製と共焦点レーザー顕微鏡観察」の実験・実習で研修し、共に懇親会では活発な意見交換を行った。

「平成13年度国立学校等技術専門官研修」が8月22日(木)~24日(金)の3日間東京大学で開かれ石井百合子が参加した。日程の前半は「大学行政上の諸問題」、「職場の安全管理」他4題の講義を受講した。後半はポスターセッション、施設見学とフリーディスカッション等を行い、ポスターセッションでは「ショウジョウバエの剛毛形成をモデル系とした自然集団中の種内・種間変異の遺伝的構造の解析」の演題で参加した。分野を超えた技官との意見交換ができ有意義であった。

古海弘康技官は10月30日(火)~11月2日(金)までの4日間、岡山大学医学部で開催された「平成13年度実験動物関係教職員高度技術研修(麻酔と外科)」に参加し第1日目は基調講演3題を受講し、2日目からは実験動物の麻酔や外科処置についての講義を受講すると共に実験・実習では技術的な面を研修した。また総合討論では実験動物に携わっている技官同士で活発な意見を交換した。

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	インシリコバイオロジー分野の研究動向および最新情報の調査	ア メ リ カ 合 衆 国	13. 1. 3~ 8
池村 淑道	国際分子進化学会主催の国際シンポジウムにて発表	コ ス タ リ カ	13. 1. 7~16
館野 義男	ISEM (国際分子進化学会) 会議・講演	コ ス タ リ カ	13. 1. 7~13
五條堀 孝	ISEM (国際分子進化学会) 会議・講演	コ ス タ リ カ	13. 1. 7~13
広海 健	ショウジョウバエ神経系発生に関するセミナー出席及び研究打ち合わせ	台 湾	13. 1. 8~11
斎藤 成也	Max-Planck 研究所, サンガーセンターにて研究連絡	ド イ ツ ・ イ ギ リ ス	13. 1.17~24
藤山秋佐夫	フランス科学技術庁, Max-Planck 研究所を訪問, 意見交換と共同研究打ち合わせ	フ ラ ン ス ・ ド イ ツ	13. 1.28~ 2. 4
菅原 秀明	OECD WPB (バイオテクノロジー部会) BRC 会合に参加	フ ラ ン ス	13. 2.12~18
荒木 弘之	英国王立ガン研究基金研究所にて DNA 複製研究について討論	イ ギ リ ス	13. 2.21~26
館野 義男	シンガポール国立大学及び中国科学院上海研究所でのデータベースの研究打ち合わせ	シ ン ガ ポ ー ル ・ 中 国	13. 3. 6~10
十川久美子	RNA ポリメラーゼワークショップにおける講演とエディンバラ大学およびトウエンテ大学における研究打ち合わせ	イ ギ リ ス ・ オ ラ ン ダ	13. 3. 7~19
菅原 秀明	地球規模生物多様性情報機構に関する情報収集のため	カ ナ ダ	13. 3. 8~11
石浜 明	RNA ポリメラーゼワークショップにて研究発表及び共同研究打ち合わせ	イ ギ リ ス	13. 3.10~19
広海 健	ショウジョウバエ学会に参加及び情報交換	ア メ リ カ 合 衆 国	13. 3.20~26
上田 均	米国 NIH の研究者とクロマチンの転写調節に関する打ち合わせ	ア メ リ カ 合 衆 国	13. 3.20~26
林 茂生	42th Annual Drosophila Research Conference に参加	ア メ リ カ 合 衆 国	13. 3.21~26
小林 薫	分子進化の研究打ち合わせ及びフロリダ大学でのゲノム情報解析に関する研究打ち合わせ	ア メ リ カ 合 衆 国	13. 3.22~29

氏名	内 容	渡 航 先	期 間
館野 義男	マイクロレイデータベース会議出席	ア メ リ カ 合 衆 国	13. 3.26～ 4. 2
池尾 一穂	マイクロレイデータベース会議出席	ア メ リ カ 合 衆 国	13. 3.26～ 4. 2
倉田 のり	韓国育種学会シンポジウムにて講演及びセミナー	大 韓 民 国	13. 4.12～16
五條堀 孝	「第2回JBIC 海外調査ミッション」に参加	デ ン マ ー ク	13. 4.21～28
石浜 明	分子遺伝学に関する集中講義及び研究セミナー実施	中 国	13. 5. 6～13
藤山秋佐夫	ゲノムシーケンス・バイオテクノロジー会議出席, 研究発表, 意見交換	ア メ リ カ 合 衆 国	13. 5. 8～14
館野 義男	国際実務者会議及び諮問委員会に出席	イ ギ リ ス	13. 5.20～27
菅原 秀明	国際実務者会議及び諮問委員会に出席	イ ギ リ ス	13. 5.20～26
五條堀 孝	情報生物学に関する研究動向と国際交流の可能性を調査	イタリア・イギリス・フランス	13. 5.21～28
角谷 徹仁	ワシントン大学での研究連絡及び国際会議出席	ア メ リ カ 合 衆 国	13. 5.21～29
小原 雄治	Genome 2001 symposium / workshop 及び Research Resource Week 2001 にて講演	台 湾	13. 5.28～30
藤山秋佐夫	真核生物ゲノムワークショップに出席, 情報収集及び意見交換	ギ リ シ ャ ・ ド イ ツ	13. 6. 5～14
菅原 秀明	科学技術データ委員会に出席及び情報収集	ア メ リ カ 合 衆 国	13. 6. 9～13
小原 雄治	第13回国際C.elegans 研究集会にて講演	ア メ リ カ 合 衆 国	13. 6.22～27
桂 勲	学会出席及び科研費研究のための資料収集	ア メ リ カ 合 衆 国	13. 6.22～28
石原 健	学会出席及び科研費研究のための資料収集	ア メ リ カ 合 衆 国	13. 6.22～28
広海 健	シンポジウムに参加及びカリフォルニア大学との研究打ち合わせ	ア メ リ カ 合 衆 国	13. 6.28～ 7. 2
小林 薫	SMBE2001 にて研究成果の発表及び研究連絡	ア メ リ カ 合 衆 国	13. 7. 6～12
城石 俊彦	マウス突然変異利用法に関するワークショップに出席及び研究打ち合わせ	ア メ リ カ 合 衆 国	13. 7.12～17
嶋本 伸雄	FASEB 会議における成果発表及び研究打ち合わせ	ア メ リ カ 合 衆 国	13. 7.13～23
十川久美子	FASEB 会議における成果発表及び研究打ち合わせ	ア メ リ カ 合 衆 国	13. 7.13～23
石浜 明	FASEB 会議出席及び研究打ち合わせ	アメリカ合衆国・カナダ	13. 7.13～24
石原 健	ゴードン会議に出席発表及び研究打ち合わせ	ア メ リ カ 合 衆 国	13. 7.14～25

氏名	内 容	渡 航 先	期 間
仁木 宏典	ゴードン会議への出席及び研究情報交換	ア メ リ カ 合 衆 国	13. 7.20~31
前仲 勝実	国際免疫学会に出席及び発表, 共同研究打ち合わせ	スウェーデン・イギリス	13. 7.21~30
石浜 明	「細菌とファージの分子遺伝学」での講演及び研究交流	ア メ リ カ 合 衆 国	13. 7.29~ 8. 8
斎藤 成也	「類人猿ゲノム研究」に関する調査研究表	フ ラ ン ス ・ ス ペ イ ン	13. 8. 3~20
山崎由紀子	植物ゲノムデータベース研究集会に出席発表及び研究打ち合わせ	イ ギ リ ス	13. 8. 5~ 9
佐々木裕之	「ゴードンリサーチカンファレンス」にて研究発表及び研究打ち合わせ	アメリカ合衆国・イギリス・ドイツ	13. 8.11~27
佐渡 敬	「ゴードンリサーチカンファレンス」にて研究発表及び研究打ち合わせ	アメリカ合衆国・イギリス・ドイツ	13. 8.11~27
舘野 義男	世界統計大会へ出席及び情報生物学に関する意見交換	大 韓 民 国	13. 8.21~24
藤山秋佐夫	ヒトゲノム計画戦略会議に出席	中 華 人 民 共 和 国	13. 8.27~ 9. 2
広瀬 進	真核生物の転写会議に出席, 発表	ア メ リ カ 合 衆 国	13. 8.29~ 9. 3
上村陽一郎	真核生物 DNA 複製会議に出席, 発表	ア メ リ カ 合 衆 国	13. 9. 1~10
荒木 弘之	真核生物 DNA 複製会議に出席, 発表	ア メ リ カ 合 衆 国	13. 9. 4~10
清水 裕	国際ワークショップに参加, 研究発表	ド イ ツ	13. 9.11~22
藤澤 敏孝	ミュンヘン大学動物研究所他にて研究打ち合わせ	ド イ ツ ・ ス イ ス	13. 9.13~10. 2
岡部 正隆	MRC 研究所にて研究打ち合わせ及び発生生物学会にて研究成果発表	イ ギ リ ス	13. 9.17~23
斎藤 成也	国際シンポジウムに出席, 発表	ロ シ ア	13. 9.27~30
池尾 一穂	Anton Dohrn Workshop にて研究発表	イ タ リ ア	13. 9.27~10. 4
五條堀 孝	研究課題に関する調査研究	イ タ リ ア	13.10.23~29
小原 雄治	第3回日韓科学技術フォーラムに出席	韓 国	13.10.30~11. 2
五條堀 孝	第3回日韓科学技術フォーラムに出席	韓 国	13.10.30~11. 2
石浜 明	インド転写集会及びワークショップ参加・講演	イ ン ド	13.11. 4~12
今本 尚子	Nuclear Transport:Molecules and Mechanisms 学会出席, 研究発表	ア メ リ カ 合 衆 国	13.11. 7~12
広瀬 進	チェコ共和国昆虫学研究所にて研究打ち合わせ	チ ェ コ 共 和 国	13.11.14~25

V. ほかの機関における講義

氏名	機関名	期間	担当科目
前仲 勝実	東北大学大学院・工学研究科	13. 1. 1～13. 3.31	タンパク質工学
五條堀 孝	東京大学大学院・理学系研究科	13. 4. 1～13. 9.30	微生物遺伝生化学
五條堀 孝	九州大学医学部	13. 4. 1～14. 3.31	遺伝学
桂 勲	東京大学大学院・総合分化研究科	13. 4. 1～14. 3.31	生命・認知科学特論 VI
相賀裕美子	千葉大学理学部	13. 4. 1～14. 3.31	遺伝子生物学特論 I
斎藤 成也	東京大学理学部	13. 4. 1～13. 9.30	分子進化学
廣瀬 進	京都大学ウイルス研究所	13. 4. 1～14. 3.31	クロマチン構造と転写制御
舘野 義男	東京医科歯科大学	13. 4. 1～14. 3.31	臨床遺伝学
今井 弘民	京都大学大学院・理学研究科	13. 4. 1～14. 3.31	理論細胞遺伝学
今本 尚子	名古屋大学大学院・理学研究科	13. 4. 1～14. 3.31	生物化学特別講義 1
仁木 宏典	東北大学大学院・理学研究科	13. 4. 1～14. 3.31	分子細胞生物学特選科目 IV・分子細胞生物学特別講義 IV
桂 勲	千葉大学大学院・自然科学研究科	13. 4. 1～14. 3.31	生命化学特別講義 II
桂 勲	京都大学医学部	13. 4. 1～14. 3.31	発生学 遺伝学
五條堀 孝	福岡大学	13. 4. 1～13. 9.17	地球圏科学特別講義 V
佐々木裕之	静岡大学理学部	13. 6. 1～14. 3.31	ほ乳類発生遺伝学
堀田 凱樹	東北大学医学部	13. 8. 1～14. 3.31	基礎特別講義
徳永万喜洋	東京大学教養部	13.10. 1～14. 3.31	生命・認知科学特論 VII・基礎科学特別講義 XIV
西川 健	東京工業大学	13.10. 1～14. 3.31	生命情報特別講義第 5
城石 俊彦	東京大学農学部	13.10. 1～14. 3.31	動物医科学特別講義
林 茂生	東京農工大学	13.10. 1～14. 3.31	生物制御科学特論 V
今本 尚子	東京工業大学	13.10. 1～14. 3.31	生命科学の基礎と応用
倉田 のり	お茶の水女子大学	13.11. 1～14. 3.31	生物学特別講義 IV
徳永万喜洋	静岡大学教育学部	13.12. 1～13.12.31	物性物理学
相賀裕美子	筑波大学大学院・生命環境科学研究科	13.12.16～14. 3.31	情報生物科学特講 IV

VI. 共同研究事業

1. 共同研究 A

- (1) Mg^{2+} レギュロンによる情報伝達機構の解明
内海龍太郎 (近畿大学農学部)
- (2) 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)
- (3) 細胞周期に伴う核・核膜構造形成機構に関する研究
矢倉達夫 (関西学院大学理学部)
- (4) 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)
- (5) トビキバアリ類の系統進化および染色体進化の分子遺伝的研究
平井啓久 (京都大学霊長類研究所)
- (6) プラスミド DNA の複製開始における宿主タンパク質および動く遺伝子の機能解析—DNA 複製開始装置の分子適応メカニズムの解明と共に—
犬塚 學 (福井医科大学)
- (7) ショウジョウバエを用いた遺伝子カスケードの解明
広常真治 (獣畜産技術協会附属動物遺伝研究所)
- (8) FGF シグナル抑制因子 Sprouty および Spred の生理機能と作用機序に関する研究
吉村昭彦 (九州大学生体防御医学研究所)
- (9) 軸索ガイダンスにおける軸索輸送による情報伝達系の解析
竹居光太郎 (東邦大学医学部)
- (10) 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)
- (11) 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)
- (12) 動物界における同族体ペプチドの探索と機能解析
松島 治 (広島大学大学院理学研究科)
- (13) ペプチドをリガンドとする受容体の解析
斎藤祐見子 (東京都臨床医学総合研究所)
- (14) *pox-neuro* 遺伝子を指標にしたショウジョウバエ性行動
木村賢一 (北海道教育大学教育学部岩見沢校)
- (15) ヒト GSBP (G-stretch 結合因子) の機能解析
赤坂甲治 (広島大学大学院理学研究科)
- (16) *one hybrid* を用いた扁平上皮癌組織特異適転写因子のクローニング
濱田雄行 (愛媛大学医学部附属病院)
- (17) 遺伝情報の解釈に関する小さい異論の収集と分析
工藤喜弘 (山形大学工学部)
- (18) DNA の高次構造の挙動とその生物学的機能と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)
- (19) 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)
- (20) 古人骨 DNA 分析に基づく古代人類集団の拡散に関する解析
植田信太郎 (東京大学大学院理学系研究科)
 - (21) 新しい性染色体特異 DNA マーカーによる霊長類の系統進化に関する研究
松木孝澄 (福井医科大学)
 - (22) 時計遺伝子に着目した時間治療法の開発
大戸茂弘 (九州大学大学院薬学研究院)
 - (23) 遺伝性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
久保田健夫 (国立精神・神経研究センター神経研究所)
 - (24) 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)
 - (25) ヒトゲノム上に検出される 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)
 - (26) シロイヌナズナ *ddml* 突然変異体のゲノムメチレーション解析
奥泉久人 (農業生物資源研究所)
 - (27) 野生マウス由来の系統に保持されている肺腫瘍抵抗性遺伝子のマッピング
宮下信泉 (香川医科大学)
 - (28) マウスにおける組換え機構の分子遺伝学解析
米川博通 (東京都臨床医学総合研究所)
 - (29) 近交系マウスを用いた下顎骨形態に関与する遺伝子の探索
清水邦彦 (日本大学松戸歯学部)
 - (30) SNP を用いたマウス遺伝子高速マッピングシステムの確立
若菜茂晴 (理化学研究所ゲノム科学総合研究センター)
 - (31) コンソミック系統を用いた、マウス四肢前後軸形成異常突然変異 *Rim4* の Modifier 遺伝子のマッピング
榎屋啓志 (理化学研究所ゲノム科学総合研究センター)
 - (32) イネ 5SrRNA 遺伝子の解析：スパーサー領域の多様性獲得機構に関する研究 散在性反復配列, p-SINEI によるイネの系統分類
大坪久子 (東京大学分子細胞生物学研究所)
 - (33) イロイヌナズナの根における環境シグナル受容細胞とその機能
高橋秀幸 (東北大学遺伝生態研究センター)
 - (34) イネの発生を制御する遺伝子の遺伝学的分子生物学的解析
平野博之 (東京大学大学院農学生命科学研究科)
 - (35) ヒト腸管由来の *Lactobacillus gasseri* JCM1031 株における 2 種のフォスフォーβ-ガラクトシダーゼの構造遺伝子からの分子系統解析
齊藤忠夫 (東北大学大学院農学研究科)
 - (36) 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)
 - (37) 病原性結核菌強毒株 H37Rv プロモーターのシステムティックな検索
荒牧弘範 (第一薬科大学薬学部)
 - (38) 静電気力と光圧力を用いた酵母染色体 DNA の分子操作
鷺津正夫 (京都大学大学院工学研究科)
 - (39) *Sphingomonas* sp. のダイアジノン分解酵素の精製とプロセッシング機構の解明
川崎東彦 (大阪府立大学大学院農学生命科学研究科)
 - (40) 線虫接地面の形状解析
坂田和実 (岩手大学工学部)
 - (41) 線虫ドーパ受容体のクローニングとその解析
五嶋良郎 (横浜市立大学医学部)
 - (42) 生体膜上に存在するエネルギー変換超分子構造体の構造解析
吉田賢右 (東京工業大学資源化学研究所)

- (43) 細胞増殖・分化に関する2種類のタンパク質 (TRAF6, Kid) の立体構造の解明
井上純一郎 (慶應義塾大学理工学部)
- (44) 主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) の立体構造形成と機能発現機構の構造生物学的解析
加藤晃一 (名古屋市立大学)
- (45) 原索動物ホヤ脳内感覚器色素細胞における遺伝子発現調節機構の系統解析
山本博章 (東北大学大学院理学研究科)
- (46) 各種新規へび毒インヒビター遺伝子群の分子進化的分析と画像データ解析による細胞-マトリックスとの相互作用の研究
高橋 敬 (島根医科大学)
- (47) 膠原病における遺伝子異常の解析
橋本博史 (順天堂大学医学部)
- (48) MHC領域の比較ゲノム解析
椎名 隆 (東海大学医学部)
- (49) 大量の配列データに基づく遺伝子機能の分化・進化解析
遠藤俊徳 (東京医科歯科大学難治疾患研究所)
- (50) 3D-1D タンパク立体構造予測法におけるアライメントの検討
菊地武司 (倉敷芸術化学大学産業化学技術学部)
- (51) 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)
- (52) 遺伝子の塩基組成変化と進化の関係の解析
中島広志 (金沢大学医学部)
- (53) PEG 代謝酵素の立体構造予測に基づく反応機構解析
河合富佐子 (岡山大学資源生物化学研究所)
- (54) グルタミンナーゼの立体構造予測
森口充暲 (大分大学工学部)
- (55) 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)
- (56) 温度感受性変異株を用いた RNA ポリメラーゼ II の機能解析
菅谷公彦 (放射線医学総合研究所)
- (57) 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)
- (58) コドン使用特性および二アミノ酸配列組成に基づいた遺伝子の機能推定
金谷重彦 (奈良先端科学技術大学院大学)
- (59) マウス nanos 遺伝子の機能解析
原口清輝 (滋賀医科大学医学部)
- (60) DNA ミスマッチ塩基対結合蛋白質 MutS を用いた DNA 微小変異の高効率多量解析
谷川雅人 (大分医科大学医学部)

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) ショウジョウバエ発生における新規 SAM motif 遺伝子, *samuel* の分子遺伝学的機能解析
小瀬博之 (徳島大学医学部)
- (3) DT40 細胞を用いたクロマチンアセンブリーファクター (CAF-1) の機能解析
高見恭成 (宮崎医科大学医学部)
- (4) ショウジョウバエを用いたミジンコの Hox 遺伝子群の機能解析
志賀靖弘 (東京薬科大学生命科学部)
- (5) 蛍光性 ATP アナログ 1 分子可視化技術を使った回転分子モーター F1 の機能解析

齊藤 究 (金沢大学理学部)

- (6) 免疫系受容体群の分子認識機構に関する研究
津本浩平 (東北大学大学院工学研究科)

3. 研究会

- | | |
|--|---------------------|
| (1) アリ類画像データベース改訂増補版の構築
今井弘民 (国立遺伝学研究所) | 13. 4.28 ~ 13. 4.29 |
| (2) ユビキチン系を介した DNA 損傷応答のメカニズム
榎本武美 (東北大学大学院薬学研究科) | 13. 6.18 ~ 13. 6.19 |
| (3) DNA 複製開始蛋白質が作る蛋白質-核酸複合体の機能と構造に関する研究会
伊藤建夫 (信州大学理学部) | 13. 8.24 ~ 13. 8.25 |
| (4) 動物行動の遺伝学
森 裕司 (東京大学大学院農学生命研究科) | 13.10. 4 ~ 13.10. 5 |
| (5) 霊長類遺伝子に関する総合的研究
斎藤成也 (国立遺伝学研究所) | 13.10.17 ~ 13.10.18 |
| (6) 非B型 DNA の生物学
清水光弘 (明星大学理工学部) | 13.11. 1 ~ 13.11. 2 |
| (7) 高等植物の生殖システムの分子遺伝学的解析とポストゲノム戦略
東谷篤志 (東北大学遺伝生態研究センター) | 13.11. 9 ~ 13.11.10 |
| (8) イネを舞台とした発生、分化プログラム
北野英己 (名古屋大学大学院生命農学研究科) | 13.11.15 ~ 13.11.16 |
| (9) 遺伝資源の評価
島本義也 (北海道大学大学院農学研究科) | 13.12.20 ~ 13.12.21 |

4. 民間等との共同研究

形成シグナル研究

林 茂生 (国立遺伝学研究所), 理化学研究所

生命情報科学的手法を用いた有用微生物のゲノム情報解析

池村淑道 (国立遺伝学研究所), 株式会社ザナジェン

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), 科学技術振興事業団

バイオインフォマティクス関連データベース整備—アノテーションデータベースの整備

五條堀孝 (国立遺伝学研究所), 社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム

ゲノム科学バックボーンデータベースの構築提供

菅原秀明 (国立遺伝学研究所), 科学技術振興事業団

遺伝子多様性モデル解析事業のデータベース構築・情報解析

五條堀孝 (国立遺伝学研究所), 社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム

VII. 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14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13年12月15日(土) 13:30～16:00
場 所 国立科学博物館 講堂 (東京都台東区上野)
共 催 国立科学博物館
後 援 財団法人遺伝学普及会
講 演

(1) 個体における遺伝子機能の解析：発生工学的手法による遺伝子変異体の作成と解析

系統生物研究センター 教授 理学博士 相賀 裕美子

からだの組織のすべての細胞に分化する能力(全能性)をもつ胚性肝細胞(ES細胞)が確立されて以来、遺伝子の相同組み換えを基礎とした発生工学的手法が開発され、特定の遺伝子の機能を破壊したいわゆる遺伝子ノックアウトマウスが数多く作成されています。これらのなかには、個体の発生過程で奇形をおこしたり、いろいろなヒト疾患と同じような症状を示すものがあり、疾患モデルとして、その原因究明や、治療薬の開発等に広く利用されています。

ここでは、私たちが特に注目している、心臓や脊椎骨の奇形がどのようにしておこるのか？ またその原因となる遺伝子はどのようなものかということを中心にお話したいと思います。

(2) 遺伝・情報とデータベース

生命情報・DDBJ研究センター 教授 工学博士 菅原 秀明

遺伝現象の法則性を見つけたメンデル以来、細胞と染色体の発見を経て1953年のDNA分子の二重螺旋構造の発見に到り、遺伝の基本的な仕組みがDNAの複製によるものであることが明らかになりました。私達は今やヒトのほぼ全ての遺伝情報を手にしたのです。一方、ヒトのみならずあらゆる生物の遺伝子がDNA分子を構成する4種類の塩基で特徴付けられることから、遺伝現象を情報の流れとしてとらえようとする研究も進んでおり、情報生物学という言葉も使われ始めました。また、データベースやデータ解析のシステムが、遺伝学ひいては生物学の研究に必須となりました。中でも、これまで明らかにされたDNAやRNAの配列データを蓄積したデータベースは世界中の機関で研究に開発にと間断なく利用されています。私達のセンターはこの貴重な知的基盤である塩基配列データベースを欧米と共同で構築しインターネット上に広く公開しています。ここでは、データベースはどのように作られているのか、どのように利用できるのか、どのような成果につながったのか、御紹介し、さらに、次世代のデータベースはどのようになっていくのか、について考えます。

VIII. 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55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。

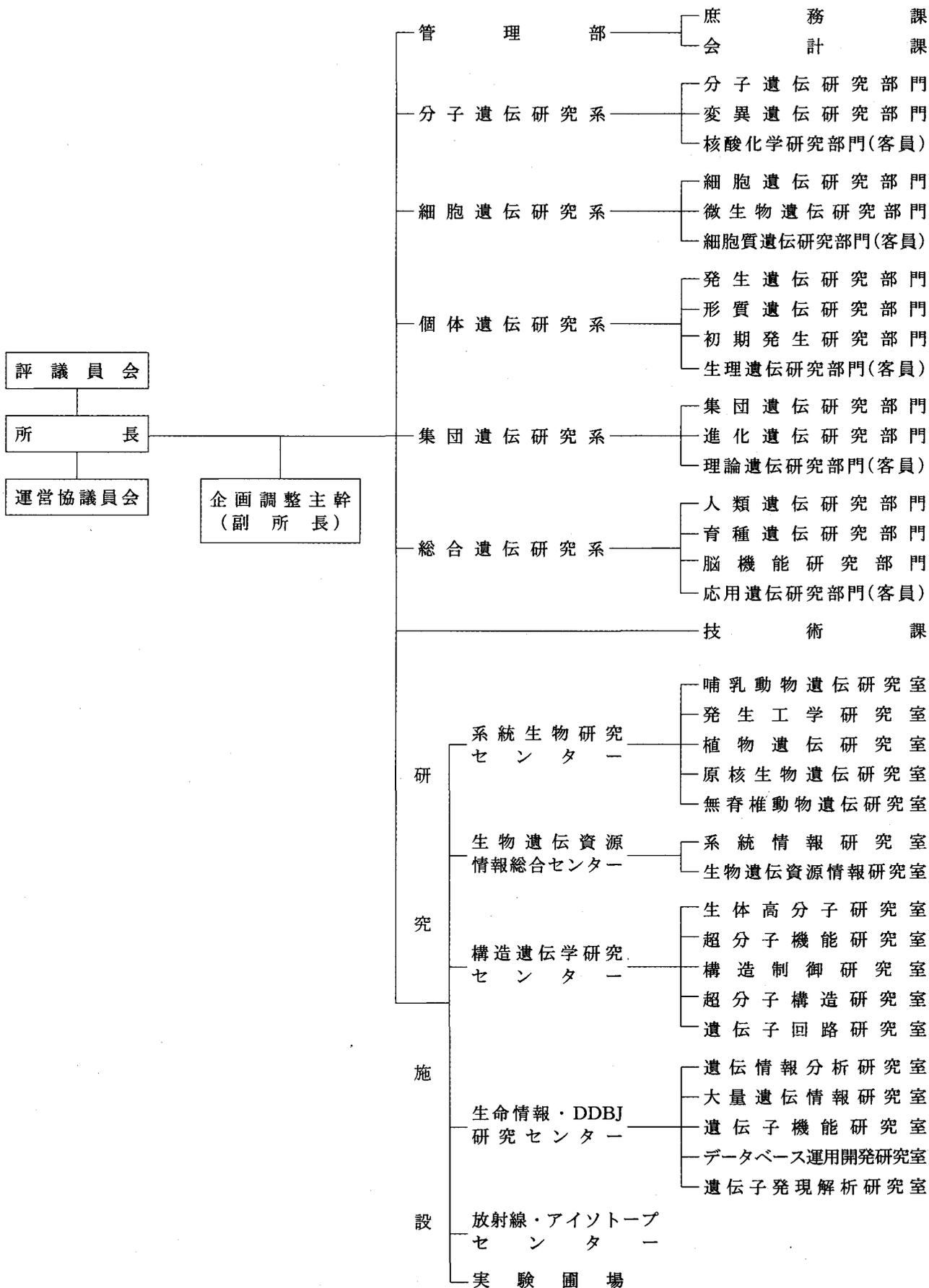
平成5年度には、遺伝実験生物保存研究センターに発生工学研究室が、平成6年度には、遺伝情報研究センターに遺伝子機能研究室が設置された。

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、新た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中心として改組され、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。

平成13年度には、生命情報・DDBJ研究センター設置（生命情報研究センターの改組）分子分類研究室振替、データベース運用開発研究室新設、遺伝子発現解析研究室が新設された。

機構図 (平成 13 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13年12月31日現在)

現 職	氏 名	任命年月日	備 考
内閣府総合科学技術会議議員	石井紫郎	平成12年6月28日	
放送大学教授	岩槻邦男	"	
国立学校財務センター所長	大崎仁	平成12年8月1日	
(株)生命誌研究館非常勤顧問	大澤省三	平成12年6月28日	
独立行政法人産業技術総合研究所フェロー	大塚榮子	"	
(財)国際高等研究所副所長	岡田益吉	"	
岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所長	勝木元也	平成13年4月1日	
独立行政法人産業技術総合研究所生物情報解析研究センター長	京極好正	平成12年6月28日	
東京大学大学院総合文化研究科教授	黒田玲子	"	
総合研究大学院大学長	小平桂一	平成13年4月1日	
東京農業大学長	進士五十八	"	
国立がんセンター名誉総長	杉村隆	平成12年6月28日	
福井県立大学長	常脇恒一郎	"	
(財)住友病院長	豊島久真男	"	
静岡県立大学長	廣部雅昭	"	
名古屋大学長	松尾稔	"	
DNAチップ研究所代表取締役社長	松原謙一	"	
国立遺伝学研究所名誉教授	三浦謹一郎	"	
岡崎国立共同研究機構長	毛利秀雄	平成13年4月1日	
(財)日本生物科学研究所主任研究員	山内一也	平成12年6月28日	

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 13 年 12 月 31 日現在）

現 職	氏 名	任命年月日	備 考
神戸大学理学部教授	磯 野 克 己	平成 12 年 6 月 20 日	
京都大学ウイルス研究所長	伊 藤 維 昭	〃	
岩手看護短期大学副学長	小 川 智 子	〃	
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	〃	
福岡歯科大学歯学部教授	関 口 睦 夫	〃	
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（分子遺伝研究系）	石 濱 明	平成 12 年 6 月 20 日	
教授（細胞遺伝研究系）	荒 木 弘 之	〃	
教授（個体遺伝研究系）	広 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）	嶋 本 伸 雄	平成 13 年 4 月 1 日	
教授（構造遺伝学研究センター）	桂 勲	〃	
教授（生命情報・DDBJ 研究センター）	五條堀 孝	〃	

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	独立行政法人農業生物資源研究所 ゲノム研究グループ DNA バンク長
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13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
日本大学名誉教授	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13年3月31日現在)

部 門 別	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

部 門 別	官 職 名	学 位	氏 名	任用年月日
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

部 門 別	官 職 名	学 位	氏 名	任用年月日
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 (併 任)	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 別	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 (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	12. 4. 1
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

部 門 別	官 職 名	学 位	氏 名	任用年月日
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 別	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
	文部教官 助手	博士(理学)	木 下 哲	13. 3. 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

部 門 別	官 職 名	学 位	氏 名	任用年月日
(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

部 門 別	官 職 名	学 位	氏 名	任用年月日
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

部門別	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	12.1.1
遺伝子回路研究室	文部教官 助教授	博士(医学)	今本 尚子	12.5.1
	文部教官 助手	博士(医学)	小瀬 真吾	12.11.1

※(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

部門別	官職名	学位	氏名	任用年月日
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	舘野 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

部門別	官職名	学位	氏名	任用年月日
	文部教官 助教授	博士(医学)	仁木 宏典	12.11.1

実験圃場 圃場長(併) 倉田 のり

部門別	官職名	学位	氏名	任用年月日
	文部教官 助手	博士(農学)	野々村 賢一	8.10.1

名誉教授

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
沖野(森島)啓子	元国立遺伝学研究所教授	10. 4. 1
小 川 智 子	元国立遺伝学研究所教授	13. 4. 1

名誉所員

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	富 山 征 夫	13. 4. 1
会 計 課 長	高 橋 昭 二	12. 4. 1
庶 務 課 課 長 補 佐	根 木 貴 行	13. 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	白 柳 孝	13. 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	高 野 学	13. 4. 1
經 理 主 任	中 荒 江 覚	12. 4. 1
用 度 主 任	渡 邊 晃	10. 4. 1
人 事 係 員	片 瀬 綾 子	11. 4. 1
共 同 研 究 係 員	増 田 純 子	13. 4. 1
總 務 係 員	小 尾 圭 一 郎	13. 4. 1
施 設 係 員	宮 原 一 樹	12. 3.16
共 同 研 究 係 員(併)	杉 本 奈 美	13. 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	芦 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	木 曾 誠	13. 2. 1
動 物 班 第 二 技 術 係 員	水 品 洋 一	13. 2. 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	芦 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
個体遺伝研究系助手	細 谷 俊 彦	10. 3. 1 ~ 13. 2.29	
細胞遺伝研究系教授	小 川 智 子	7. 4. 1 ~ 13. 3.31	停年退職
細胞遺伝研究系助手	田 中 茂 生	7.11. 1 ~ 13. 3.31	
生命情報研究センター助手	今 西 規	6. 4. 1 ~ 13. 3.31	独立行政法人産業技術総合研究所 生物情報解析研究センター総合デー タベース解析チームリーダー
技術課動物班第二技術係員	陣 内 寅 佳	10.11. 1 ~ 13. 3.31	辞職

職名	氏名	在職期間	備考
庶務課長	小林 彰	10. 7. 1 ~ 13. 3. 31	信州大学総務部総務課長
庶務課課長補佐	山田 勝久	11. 4. 1 ~ 13. 3. 31	静岡大学教育学部事務長補佐
庶務課人事係長	佐藤 忠弘	10. 4. 1 ~ 13. 3. 31	静岡大学総務部人事課福祉係長
庶務課庶務係庶務主任	土屋 雅義	7. 4. 1 ~ 13. 3. 31	東京農工大学農学部 庶務係庶務主任
会計課用度係用度主任	齋藤 勝麗	10. 4. 1 ~ 13. 3. 31	静岡大学理学部 総務係主任
庶務課共同研究係員	山田 恵子	10. 4. 1 ~ 13. 3. 31	静岡大学経理部 契約室係員
総合研究大学院大学 総務課企画・連係協力係員	藤井 真貴子	10. 4. 1 ~ 13. 3. 31	静岡大学総務部 研究協力課係員

平成 13 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
金 衝 坤	慶北大学校農業 科学技術研究所	類人猿ゲノム解析に関する研究	進化遺伝研究部門	平13. 4. 1～ 平14. 3.31
Kolpashchikov Dmitry M.	ロシア科学アカデミー 生物有機科学研究所	ウィルRNA ポリメラーゼ の機能制御機構	分子遺伝研究部門	平13. 7. 2～ 平14. 3.31
Ozoline Olga N.	ロシア科学アカデミー 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. 9. 5～ 平13.12.31
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13. 4. 1～ 平13. 9.30
		神経ネットワーク形成 における転写因子 TDF の 役割		平13.10. 1～ 平14. 3.31
Padmanabhan Usha	サハ核物理学研究所	転写の 1 分子ダイナミクス	超分子機能研究室	平13.11.28～ 平14. 3.31

大学院生（特別共同利用研究員）

氏 名	所 属	研 究 課 題	受入期間
金 井 誠	東京農工大学大学院 連合農学研究科 (博士後期課程)	ショウジョウバエ中枢神経系形成における seven-up 遺伝子の機能解析	2001. 4. 1 ~ 2002. 3.31
澤 田 篤 志	名古屋大学大学院 理学研究科 (博士後期課程)	ゼブラフィッシュ体節形成における FGF の機能解析	2001. 4. 1 ~ 2002. 3.31
ワヒュー プルボフシ	九州大学大学院 医学系研究科 (博士後期課程)	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	2001. 4. 1 ~ 2002. 3.31
加 藤 政 臣	信州大学大学院 工学系研究科 (修士課程)	シロイヌナズナの転移因子の活性制御機構	2001. 4. 1 ~ 2002. 3.31
古 瀬 民 生	東京農工大学大学院 連合農学研究科 (博士後期課程)	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	2001. 4. 1 ~ 2002. 3.31
阪 田 忠	東北大学大学院 生命科学系研究科 (博士後期課程)	付属肢の近遠軸形成機構	2001. 4. 1 ~ 2002. 3.31
坂 根 勲	東京大学大学院 理学系研究科 (博士後期課程)	タンパク質折れ畳み過程の1分子計測	2001. 4. 1 ~ 2002. 3.31
古 田 満衣子	大阪大学大学院 医学系研究科 (博士後期課程)	Hsc70 / Hsp70 の核内移行装置の同定とストレス応答性核移行制御機構の解明	2001. 4. 1 ~ 2002. 3.31
柏 木 健 司	静岡県立大学大学院 薬学研究科 (博士後期課程)	ペリプラズム結合タンパク質のフィールドタイプの変換	2001. 4. 1 ~ 2002. 3.31
矢 田 有加里	お茶の水女子大学 大学院人間文化研究科 (博士後期課程)	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	2001. 4. 1 ~ 2002. 3.31
梶 田 睦	東京工業大学大学院 総合理工学研究科 (博士後期課程)	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	2001.10. 1 ~ 2002. 9.30
山 市 嘉 治	熊本大学大学院 医学研究科 (博士後期課程)	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	2001.10. 1 ~ 2002. 3.31

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	湧永製菓株式会社 嘱託研究員	鳥類,特に鶏の遺伝情報 分析と文化的背景を含め た家禽化過程の考察	生命情報・DDBJ 研 究センター	2001. 4. 1 ~ 2002. 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, GTOP シ ステム構築	生命情報・DDBJ 研 究センター	2001. 4. 1 ~ 2001. 9.30
中 出 晋 介	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 ムの研究開発	系統生物研究セン ター	2001. 4. 1 ~ 2001. 9.30
本 間 桂 一	科学技術振興事業団 研究基盤情報部	GTOP システム構築	生命情報・DDBJ 研 究センター	2001. 4. 1 ~ 2001. 9.30

B. 奨学寄附金・受託研究費

平成 13 年奨学寄附金受入

奨学寄附金 20,815 千円

寄附者の職業及び氏名 (法人の場合は、法人名及び代表者名)	寄附金歳入 納付額	寄附の目的及び条件
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
国立遺伝学研究所 細胞質遺伝研究部門 富澤 純一	2,000,000 円	微生物遺伝の研究に関する経費の助成
国立遺伝学研究所 変異遺伝研究部門 山尾 文明	2,700,000 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
国立遺伝学研究所 構造遺伝学研究センター 徳永万喜洋	2,400,000 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
国立遺伝学研究所 人類遺伝研究部門 佐渡 敬	250,000 円	研究助成のため
国立遺伝学研究所 変異遺伝研究部門 山尾 文明	500,000 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
国立遺伝学研究所 生命情報・DDBJ 研究センター データベース運用開発研究室 菅原 秀明	1,064,690 円	生物系データベースに関する研究
味の素株式会社 発酵技術研究所 取締役所長 宇多川 隆	500,000 円	教育・学術研究助成のため
財団法人住友財団 理事長 宮原 賢次	2,000,000 円	研究助成のため
財団法人 持田記念医学薬学振興財団 理事長 持田 英	1,000,000 円	研究助成のため
国立遺伝学研究所 形質遺伝研究部門 廣瀬 進	1,500,000 円	研究助成のため
株式会社島津製作所 取締役社長 矢嶋 英敏	900,000 円	「大腸菌をモデル生物とした細胞分裂の遺伝的調節機構」の研究
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	学術研究助成のため
合 計	20,814,690 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
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	自 2001. 2. 8 至 2001. 3.31	(株)バイオ産業情報化コンソーシアム	円 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	自 2001. 2.22 至 2001. 3.31	財実験動物中央研究所	49,278,000
遺伝子多型情報のデータベース構築	生物遺伝資源総合センター 助教授 山崎由紀子	自 2001. 2.22 至 2001. 3.31	財実験動物中央研究所	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の開発	系統生物研究センター 助手 小出 剛	自 2001. 2.22 至 2001. 3.31	財実験動物中央研究所	27,686,000
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	自 2001. 4. 2 至 2001. 9.30	科学技術振興事業団	500,000
DNA はいかにして分配されていくのか?	放射線・アイソトープセンター 助教授 仁木 宏典	自 2001. 4. 2 至 2001. 9.30	科学技術振興事業団	500,000
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	自 2001. 4. 2 至 2001. 9.30	科学技術振興事業団	500,000
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	自 2001. 4. 2 至 2001. 9.30	科学技術振興事業団	1,000,000
遺伝子産物同定システム研究開発, GTOP システム構築	生命情報・DDBJ 研究センター 教授 西川 健	自 2001. 4. 2 至 2001. 9.30	科学技術振興事業団	150,000
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	自 2001. 4. 2 至 2002. 3.31	生物系特定産業技術研究推進機構	40,884,000
ゲノム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 石浜 明	自 2001. 5.11 至 2001.11.30	科学技術振興事業団	6,930,000
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	自 2001. 6.25 至 2002. 3.31	科学技術振興事業団	1,000,000

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
臭覚経路形成機構の解析	脳機能研究部門 助教授 平田たつみ	自 2001. 6.25 至 2000. 3.31	科学技術振興事業団	円 990,000
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 助教授 西村 昭子	自 2001. 7.24 至 2002. 3.31	科学技術振興事業団	1,100,000
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機能解析	系統生物研究センター 助教授 相賀裕美子	自 2001. 7.24 至 2002. 3.31	科学技術振興事業団	2,200,000
加齢疾患の発症, 症状の個体差に関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	自 2001. 8.13 至 2002. 3.31	科学技術振興事業団	1,320,000
オオムギゲノム機能の開発と制御	生物遺伝資源情報子烏合センター 助教授 山崎由紀子	自 2001. 8.27 至 2002. 3.31	科学技術振興事業団	380,000
DNA メチル化で制御される開花時期制御遺伝子の同定	育種遺伝研究部門 助教授 角谷 徹仁	自 2001. 8.27 至 2002. 3.31	独立行政法人農業技術 研究機構花き研究所	2,784,000
不稔遺伝子群の網羅的単離と不稔特性により機能分類	系統生物研究センター 助教授 倉田 のり	自 2001. 9. 4 至 2002. 3. 6	独立行政法人農業生物 資源研究所	3,862,000
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	自 2001. 9. 4 至 2002. 3. 6	独立行政法人農業生物 資源研究所	3,782,000
イネ細胞系譜マーカーによる発生分化シミュレーターの開発	系統生物研究センター 助教授 倉田 のり	自 2001. 9. 4 至 2002. 3. 6	独立行政法人農業生物 資源研究所	19,288,000

C. 日 誌

1月18日	第73回運営協議員会
3月21日	第74回運営協議員会
3月27日	第36回評議員会
4月14日	一般公開
4月23日	第75回運営協議員会
6月 4日	第76回運営協議員会
6月26日	第37回評議員会
7月26日	第77回運営協議員会
9月27~28日	第35回文部省所管研究所事務(部)長会議第2部会
11月1~2日	第45回支部科学者所轉並びに国立大学附置研究所長会議
12月15日	公開講演会

教授 会 議

1月16日	第306回	2月 5日	第307回
2月20日	第308回	3月13日	第309回
4月10日	第310回	4月24日	第311回
5月15日	第312回	6月 5日	第313回
6月19日	第314回	7月10日	第315回
7月24日	第316回	9月 4日	第317回
9月25日	第318回	10月 9日	第319回
10月23日	第320回	11月13日	第321回
12月 4日	第322回	12月18日	第323回

外国からの主な来訪者

1月19日	Anna R. Panchenko, National Center for Biotechnology Information, NIH
1月25日	Utpal Banerjee, Department of Molecular Cell & Developmental Biology, University of California, Los Angeles
1月29日	Walter Gilbert, Dept. of Molecular and Cellular Biology, Harvard University
2月 1日	Marco Foiani, F.I.R.C. Institute of Molecular Oncology, Milan
2月 7日	Masazumi Tada, University College London
2月 9日	Richard Carthew, Department of Biological Sciences, University of Pittsburgh
2月13日	Robert Martienssen, Cold Spring Harbor Laboratory
2月21日	Young K. Truong, Department of Statistics and Applied Probability, National University of Singapore
3月 5日	Wolf Reik, Laboratory of Developmental Genetics and Imprinting, The Babraham Institute, Cambridge
3月 8日	Andrew Travers, MRC Laboratory of Molecular Biology
3月 8日	Antoine Blancher, Laboratory of Immunogenetics, University of Paul Sabatier, Toulouse
3月 9日	Steven Henikoff, Division of Basic Sciences, Fred Hutchinson Cancer Research Center
3月12日	Chung-I Wu, Department of Ecology and Evolution, University of Chicago
3月12日	Werner E.G. Muler, Institut für Physiologische Chemie, Abteilung Angewandte Molekularbiologie, Johannes Gutenberg-Universität
4月 5日	Richard Roberts, New England Biolabs
4月13日	Ming Guo, Department of Neurology, School of Medicine, University of California at Los Angeles
5月29日	Cori Bargmann, HHMI, Departments of Anatomy and Biochemistry and Biophysics, University of California, San Francisco
6月 6日	Stanley Fields, Howard Hughes Medical Institute, Departments of Genetics and Medicine, University of Washington
6月 8日	Bertrand R. Jordan, CNRS Research Director (emeritus) Coordinator of Marseille-Genopole Marseille, France
6月11日	Amitabha Chattopadhyay, Centre for Cellular and Molecular Biology, Bangalore, India

- 6月11日 Thomas V. O'Halloran, Dept. Chem. and Dept Biochem., Mol. Biol., Northwestern Univ
6月27日 Stephen J. O'Brien, Director, Laboratory of Genomic Diversity National Cancer Institute-Frederick, MD, USA
7月 4日 Ulrike Heberlein, Department of Anatomy University of California San Francisco
7月 5日 Yi Rao, Anatomy of Neurobiology, Washington University School of Medicine
7月 5日 Vincent Stephane, Perrimon Lab, Department of Genetics Harvard Medical School, Howard Hughes Institute
7月 6日 Nipam Patel, University of Chicago, Dept. of Organismal Biology and Anatomy, Howard Hughes Medical Institute
7月 6日 Ralf Sommer, Department of Evolutionary Biology, Max-Planck Institute for Developmental Biology
7月13日 Michael Levine, Department of Molecular Cell Biology, University of California, Berkeley
7月16日 David J. Miller, Biochemistry and Molecular Biology, James Cook University
7月17日 Tomoko Obara-Ishihara, MGH Renal Unit, Harvard Medical School
7月24日 Stephen T. Sherry, National Center for Biotechnology Information
7月26日 Kenta Sumiyama, Department of Molecular, Cellular and Developmental Biology, Yale University
7月30日 Pavel M. Borodin, Institute of Cytology and Genetics
8月31日 Peter J. Tonellato, Bioinformatics Research Center and Rat Genome Database, Medical College of Wisconsin
8月31日 Shozo Yokoyama, Syracuse University
10月18日 Sun-Hee, Leem, Department of Biology, Dong-A University
10月29日 Iain Mattaj, EMBL, Gene Expression Programme
10月30日 Jeffrey Z. Chen, Texas A&M University
11月12日 Sydney Brenner, Molecular Sciences Institute
11月12日 Cletus P. Kurtzman, Microbial Genomics and Bioprocessing Research Unit, National Center for Agricultural Utilization Research
11月15日 Kelly Hughes, Department of Microbiology, University of Washington Seattle
11月12日 Thomas Mitchell-Olds, Max-Planck Institute for Chemical Ecology
11月22日 Shin-ichi Higashijima, State University of New York at Stony Brook
11月26日 Charles G. Kurland, Department of Molecular Evolution Evolutionary Biology Center Uppsala University
12月 5日 S. Shivaji, Centre for Cellular and Molecular Biology, Hyderabad
12月 7日 Pernille Rorth, Developmental Biology Programme, EMBL Heidelberg
12月 7日 Stephen Cohen, Developmental Biology Programme, EMBL Heidelberg

D. 諸 会

内部交流セミナー

- 1月12日 転写因子から見た微生物ゲノムの進化と退化 (藤田信之)
分裂酵母のホモタリズムに絡むユビキチン経路 (山尾文明)
1月19日 複製開始領域への複製酵素のローディング (荒木弘之)
2月 9日 感覚器特異化の分子機構 (岡部正隆)
悩ましいタンパク質の機能解析—生化学的解析結果と構造解析結果が一致しない例— (山崎由紀子)
2月23日 神経系と血球系に共通な分化決定機構 (細谷俊彦)
新しい細胞内1分子イメージング法と、核膜を介した分子輸送の定量的解析 (徳永万喜洋)
3月 2日 プラナリア EST による脳・神経系における遺伝子発現の進化 (池尾一穂)
ショウジョウバエゲノム解析における P 因子エンハンサートラップベクターの可能性と限界を探る (林 茂生)
3月 9日 神経突起伸長を阻害する抗体とその抗原分子の解析 (佐藤泰史)
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 (深川竜郎)
3月16日 感覚器形成の共通分子基盤と特異化機構 (丹羽 尚)
X線結晶解析を使ってタンパク質の作用機構を探る (白木原康雄)
3月23日 Mre11のテロメアの認識とテロメア長の維持 (田中茂生)
ヒトの中のサル (藤山秋佐夫)

- 3月30日 ゼロからの出発・喜びの時 (小川智子)
- 4月20日 X染色体不活性化における Tsix の役割 (佐渡 敬)
ヒトゲノムドラフト配列から見えるゲノム構造の多様性と進化 (五條堀 孝)
- 4月27日 ヒドラ体幹部の散在神経系は機能的に発達した腸管神経系である (清水 裕)
ゲノム全蛋白質構造予測データベース (GTOP) とその応用 (西川 建)
- 5月11日 RNA ポリメラーゼ II 第7サブユニットの機能 (光澤 浩)
Forward Genetics によるマウス形態変異 Tail short (Ts) の解析 (城石俊彦)
- 5月18日 雄特異的形態形質・性櫛剛毛数の種内・種間変異の責任遺伝子の解析 (高野敏行)
- 5月25日 低メチル化突然変異によるシロイヌナズナの発生異常誘発 (角谷徹仁)
Functional mechanism of a Drosophila nuclear receptor, Seven-up (松野元美)
- 6月 1日 RNA ポリメラーゼは groove tracking しながらスライディングするか (十川久美子)
1. Generality of the branched mechanism in transcription initiation
2. In vivo role of the transcription factors GreA and GreB (須佐太樹)
- 6月 8日 Analysis of sdf-9 mutants, which display a dauer-constitutive phenotype in the unc-31 mutant background (大蔵清貴)
Acquisition of methylation imprints and expression of DNA methyltransferases during germ cell development (辻本直美)
- 6月15日 The role of DNA polymerase ϵ for telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae* (飯田哲史)
Evolution of sex chromosomes in order Aulopiformes (太田欽也)
- 6月22日 ヒドラの形態形成を制御する上皮ペプチド (藤澤敏孝)
Regulatory mechanisms of the FTZ-F1 gene: -Characterization of factor I-4. — (阿川泰夫)
- 6月29日 Evolutionary features of central nervous system revealed by the comparative study of planarian ESTs (峯田克彦)
Identification of trans-translation targets in *Escherichia coli* (只木敏雄)
- 7月 6日 細胞分裂の時期を決める分子機構 (西村昭子)
Male-specific reproductive failure caused by X-chromosome substitution between two mouse subspecies (岡 彩子)
- 7月13日 An evolutionarily conserved insulator element at the 3' boundary of the imprinted Igf2/ H19 domain (石原 宏)
- 7月27日 Characterization of GAGA factor-p93-p130 complex (中山貴博)
- 9月 7日 免疫グロブリン様レセプター群の分子認識機構 (前仲勝実)
Fgf シグナルが制御する脊椎動物の分節 (武田洋幸)
- 9月14日 モノクローナル抗体が認識する抗原分子の組織的発現スクリーニング (平田たつみ)
大腸菌の分化: 細胞は不連続に変化する (石濱 明)
- 9月28日 生物情報資源の相互運用性の実現 (菅原秀明)
- 10月 5日 嗅索ガイドポスト細胞の移動制御機構 (川崎能彦)
出芽酵母 Sld5/ Psf1/ Psf2 の染色体 DNA 複製における役割 (上村陽一郎)
- 10月12日 インプリンティングの比較ゲノム解析 (佐々木裕之)
- 10月19日 RNA ポリメラーゼ II と CTD ホスファターゼ Fcpl の相互作用 (木村 誠)
HLA クラス I 遺伝子群の進化 (館野義男)
- 10月26日 イネの発生分化/核構築解析へのゲノム的アプローチ (倉田のり)
分子レベルでの並行進化: ペリプラズム結合蛋白質様ドメインを持つリプレッサーの系統解析 (深海 薫)
- 11月 2日 類人猿ゲノム計画 Silver (斎藤成也)
線虫 *C.elegans* の行動を遺伝学的方法で解析する (桂 勲)
- 11月 9日 p105新規タンパク質による細胞質 mRNA 複合体の形成と運動 (椎名伸之)
cDNA マイクロアレイ解析による線虫 T-box 遺伝子 tbx-9 標的遺伝子の探索 (安達佳樹)
- 11月16日 岐路の転写と転写の岐路 (嶋本伸雄)
Regulation mechanism of space specific expression of FTZ-F1 target gene EDG84A in *Drosophila melanogaster* (萱島泰成)
- 11月30日 ショウジョウバエコアクチベーター MBF1 の生体内における機能 (広瀬 進)
Positional cloning of PLASTOCHRON1, heterochronic gene in rice (*Oriza sativa*) (Ahn Byoung-Ohg)

Biological Symposia

- 1月19日 Using threading in protein classification and genome analysis (Anna R. PANCHENKO)
- 1月25日 Signal transduction and developmental strategies in *Drosophila* hematopoiesis and neural development (Utpal BANERJEE)
- 1月29日 The evolution of Gene Structure (Walter GILBERT)
- 2月 1日 DNA damage checkpoints and replication controls in budding yeast (Marco FOIANI)
- 2月 9日 Gene silencing by RNA in *Drosophila*: mechanism and applications (Richard CARTHEW)
- 2月13日 Epigenetics and the plant genome (Robert MARTIENSSEN)
- 2月21日 Machine learning with Splines (Young TRUONG)
- 2月27日 最近新たに見つかった不忠実な DNA ポリメラーゼ (大森治夫)
- 3月 5日 Mechanisms and consequences of genomic imprinting (Wolf REIK)
- 3月 8日 DNA supercoiling and transcription in *Escherichia coli*-the FIS connection (Andrew TRAVERS)
- 3月 8日 Molecular polymorphism of O alleles in five populations of different ethnic origins (Antoine BLANCHER)
- 3月 9日 Evolution and dynamics of centromeric histones (Steven HeHENIKOFF)
- 3月12日 Formation of new genes and new species (Chung-I WU)
- 3月12日 How was the metazoa threshold crossed: the urmetazoa (Werner E. G. MULDER)
- 3月26日 電子線結晶学によるプロトンポンプと水チャンネルの立体構造—プロトン構造のメカニズム—(光岡 薫)
- 3月26日 トランスクリプトームからの知識発見 (大久保公策)
- 4月 5日 Using bioinformatics to find restriction enzymes (Richard ROBERTS)
- 4月10日 Regulation of DNA replication in budding yeast (Seiji TANAKA)
- 4月13日 Site specific proteolysis and its regulation in cell death and Alzheimers disease: insights and approaches using *Drosophila* (Ming GUO)
- 4月25日 シロイヌナズナとその近縁種を用いた分子遺伝学的解析・花粉管ガイダンス・生殖隔離・形態進化 (清水健太郎)
- 5月14日 ゲノムオントロジーの構築と文献からの生物知識抽出 (高木利久)
- 5月17日 ポストゲノム時代を担う糖鎖生物学 (入村達郎)
- 5月28日 生細胞におけるヒストンの動態：ヌクレオソーム構造の安定性とクロマチン活性との関係 (木村 宏)
- 5月29日 Signaling pathways that generate olfactory diversity and odor discrimination in *C. elegans* (Cori BARGMANN)
- 6月 6日 Using yeast to analyze interactions of proteins, nucleic acids and small molecules (Stanley FIELDS)
- 6月 8日 Gene expression measurement using DNA arrays: present results, future trends (Bertrand R. JORDAN)
- 6月11日 The hippocampal serotonin Type 1A receptor and its interaction with the membrane (Amitabha CHATTOPADYAY)
- 6月14日 JAK / STAT pathway の抑制因子 SCCS-1の増殖抑制作用と肝細胞癌におけるメチル化不活性化 (吉川浩英)
- 6月14日 DNA distortion mechanism for transcription activation by a Zinc-responsive gene-regulatory protein Znr in *E.coli* (Thomas V. O'ALLORAN)
- 6月19日 脊椎動物における内胚葉形成機構ゼブラフィッシュの突然変異体を用いた解析 (菊池 裕)
- 6月27日 The moving landscape of comparative genomics for mammals (Stephen J. O'BRIEN)
- 7月 2日 WNT signals control FGF-dependent limb initiation and AER formation in the chick embryo (Yasuhiko KAWAKAMI)
- 7月 3日 熱ショック応答の制御機構：サーモセンサーの実体を求めて (由良 隆)
- 7月 4日 Flies and drugs: studying drug abuse in *Drosophila* (Ulrike HEBERLEIN)
- 7月 5日 Molecular signaling mechanisms guiding cell migration (Yi RAO)
- 7月 5日 Comparison of the morphological segmentation along the embryonic anteroposterior axis and leg proximodistal axis of *Drosophila melanogaster* (Vincent STEPHANE)
- 7月 6日 The evolution of segmentation and axis formation (Nipam PATEL)
- 7月13日 A perfect vulva every time: changes in signaling and gene function during nematode evolution (Ralf SOMMER)
- 7月16日 Associative information access using DualNAVI--Is it applicable to the navigation of biological information?- (Akihiko TAKANO)
- 7月17日 Zebrafish mutants reveal a link between pronephric cyst formation and epithelial cell polarity (Tomoko

OBARA-ISHIHARA)

- 7月24日 Computation and annotation of human genome sequence variations (Stephen T. SHERRY)
- 7月26日 Analysis of genomic regulation of the Dlx3-Dlx7 cluster of mouse (Kenta SUMIYAMA)
- 7月30日 Chromosome versus genic mechanisms of hybrid sterility in mammals (Pavel M. BORODIN)
- 8月31日 Disease centric rat gene initiative (Peter J. TONELLATO)
- 8月31日 Molecular genetic and evolution of color vision in vertebrates (Shozo YOKOYAMA)
- 9月 3日 細胞の位置ぎめにはたらく分子機構 (本多久夫)
- 9月26日 細胞生化学のための蛍光スペクトル顕微鏡 (原口徳子)
- 10月11日 小胞体からの情報伝達—タンパク質の品質管理機構の理解を目指して (森 和俊)
- 10月11日 細胞の構造と機構を支えるメンブレントラフィック—エンドソーム系とオートファジーの分子機構 (吉森 保)
- 10月18日 Cloning of the human telomerase gene: complete genomic sequence and analysis of tandem repeat polymorphism in intronic regions (Leem SUN-HEE)
- 10月24日 脊椎動物の文節における境界形成と細胞間シグナリング (高橋淑子)
- 10月29日 Ran tells cells where their chromosomes are (Iain MATTAJ)
- 10月30日 Epigenetic regulation of redundant genes in polyploid genomes (Jeffrey Z. CHEN)
- 11月 1日 超好熱古細菌パイロコッカスにおける DNA 複製開始機構 (松永藤彦)
- 11月 8日 Information extraction from molecular biology journal articles (Nigel Collier)
- 11月12日 Genetic complexity (Sydney BRENNER)
- 11月12日 Evolutionary relationships among the yeasts from multigene phylogenetic analyses (Cletus P. KURTZMAN)
- 11月15日 神経軸索ガイド分子によって引き起こされる細胞内小胞輸送とその機構 (五嶋良郎)
- 11月15日 Coupling gene expression to flagellar assembly by secretion of anti-sigma factor (Kelly HUGHES)
- 11月16日 環境適応と遺伝子変異における DNA 動態の役割—環境のストレスによって誘導される DNA スーパーコイルリングの変化と DNA 二重鎖切断
- 11月19日 Arabidopsis quantitative genomics (Thomas MITCHELL-OLDS)
- 11月22日 Optical and genetic approaches toward understanding spinal circuits in zebrafish (Shin-ichi HIGASHIJIMA)
- 11月26日 ショウジョウバエ Gene Search システムの開発とその応用 (相垣敏郎)
- 11月26日 遊び心のイメージングを目指して (宮脇敦史)
- 11月26日 Evolution of genome size and diversity in microorganisms (Charles G. KURLAND)
- 11月28日 誘導型 RNAi を利用したショウジョウバエ全遺伝子変異体バンクの構築 (上田 龍)
- 11月28日 神経細胞の birth order identity 決定分子—ショウジョウバエを用いた研究 (一色孝子)
- 12月 3日 小型魚類を用いた形態形成に関する変異体の genome-wide スクリーニング (清水 誠)
- 12月 5日 Molecular basis of cold adaptation—the role of membrane lipids (S. SHIVAJI)
- 12月 7日 Regulation of cell migration in *Drosophila* (Pemille RORTH)
- 12月 7日 Boundary formation in *Drosophila* wing development (Stephen COHEN)
- 12月14日 ゼブラフィッシュの眼原基の形成と眼柄特異化の遺伝子経路 (武内昌哉)
- 12月17日 線虫 *C.エレガンス* の体長と探索行動の制御における感覚入力と cGMP 依存性蛋白キナーゼの役割 (藤原 学)
- 12月25日 環境情報の感知・応答の制御機構とその分子基盤の解明を目指して (小林麻己人)
- 12月25日 Toward understanding transcriptional gene silencing in *Arabidopsis* (Yoshiki HABU)
- 12月26日 ゼブラフィッシュにおけるトランスポゾン転移システム：遺伝子導入法と挿入変異生成法の開発 (川上浩一)
- 12月26日 脊椎動物のモデルとしての魚類の可能性：初期発生分化・形態形成から脳の高次構造まで (八田公平)

E. 図書及び出版

図書委員会委員長 (2001 年度)
 図書委員会委員 (2001 年度)

西 川 建
 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	3,421 冊	製本雑誌を含む
洋 書	16,973 冊	"
計	20,394 冊	"

2) 雑 誌

	購 入	
和 文	18 種	
欧 文	133 種	
計	157 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 51 号	301	700 部	国内研究機関, 大学, 試験場ほか
Ann.Rep.Natl.Inst. Genet.No.51	191	900 部	内外研究機関, 大学, 試験場ほか

4) 2001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 Research Communication
9. Biochemistry
10. Biochimica et Biophysica Acta: Gene Structure and Expression
11. BioEssays
12. Bioinformatics
13. Biophysical Journal
14. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention
15. Cancer Genetics & Cytogenetics
16. Cancer Research
17. Caryologia
18. Cell
19. Cell Growth & Differentiation
20. Chromosoma
21. Chromosome Research
22. Clinical Cancer Research
23. Current Advances in Cell & Development Biology
24. Current Biology
25. Current Contents: Life Sciences
26. Current Genetics
27. Current Opinion in Cell Biology
28. Current Opinion in Genetics & Development
29. Current Opinion in Immunology
30. Current Opinion in Neurobiology
31. Current Opinion in Structural Biology
32. Cytogenetics & Cell Genetics
33. Development
34. Development, Genes and Evolution
35. Developmental Biology
36. Developmental Cell
37. Developmental Genetics (Genesis)
38. Differentiation
39. DNA sequeces
40. EMBO Journal
41. European J. of Biochemistry
42. Evolution
43. Experimental Cell Research
44. FEBS Letters
45. Gene
46. Genes & Development
47. Genes to Cells
48. Genetica

49. Genetical Research
50. Genetics
51. Genome
52. Genome Research
53. Genomics
54. Hereditas
55. Heredity
56. Human Genetics
57. Human Heredity
58. Human Molecular Genetics
59. Immunogenetics
60. Immunological Reviews
61. Journal of Bacteriology
62. Journal of Biological Chemistry
63. Journal of Cell Biology
64. Journal of Cell Science
65. Journal of Cellular Physiology
66. Journal of Evolutionary Biology
67. Journal of Experimental Medicine
68. Journal of Experimental Zoology
69. Journal of General Virology
70. Journal of Genetics
71. Journal of Heredity
72. Journal of Immunology
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. Mammalian Genome
80. Mechanisms of Development
81. Microbiology
82. Microbiology and Molecular Biology Reviews
83. Microbial & comparative genomics
84. Molecular and Cellular Neuroscience
85. Molecular & General Genetics
86. Molecular Biology and Evolution
87. Molecular Biology of the Cell
88. Molecular Cell
89. Molecular Cancer Therapeutics
90. Molecular Endocrinology
91. Molecular Microbiology
92. Molecular and Cellular Biology
93. Mutation Research
94. Nature
95. Nature Biotechnology
96. Nature Cell biology
97. Nature Genetics

98. Nature Medicine
99. Nature Structural Biology
100. Nature Reviews Genetics
101. Nature Reviews Molecular Cell Biology
102. Nature Reviews Neuroscience
103. Neuron
104. Nucleic Acids Research
105. Oncogene
106. Opensys.& Info.Dyna
107. Plant Cell
108. Plant Journal
109. Plant Molecular Biology
110. Plant Physiology
111. Plant Science
112. Proceedings of the National Academy of Sciences
113. Proc.of Association for Cancer Research
114. Proc.of the Royal Society:ser.B (Biological Science)
115. Protein Engineering
116. Protein Science
117. Proteins
118. Quarterly Reviews of Biophysics
119. RNA
120. Science
121. Scientific American
122. Structute
123. Theoretical & Applied Genetics
124. Theoretical Population Biology
125. Trends in Biochemical Science
126. Trends in Cell Biology
127. Trends in Genetics
128. Trends in Microbiology
129. Trends in Neurosciences
130. Trends in Plant Science
131. Virology
132. Virus Research
133. Yeast

IX. 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携・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圃場が持つ機能、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。

大講座	教育研究指導分野	分野の内容
細胞遺伝学	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。
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. 年別入学者数

年	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
入学者数	11	13	8	9	9	11	11	14	15	11

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	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
課程博士 （理学）	7	5	7	9	12	6	10	9	8	8
論文博士 （理学）	0	0	1	0	2	0	0	2	1	1

H. 2001 年学位授与者

氏 名	論 文 題 目	指 導 教 官 (紹介教官)
大島 英之	枯草菌制限修飾系遺伝子 <i>BsuM</i> の分子遺伝学的解析	定家 義人 石浜 明
金城 玲	Computational studies on energetics of protein fold: distinctive roles of solvent effect and side-chain packing	西川 健
坂本 修一	遺伝性早老症ウエルナー症候群原因遺伝子産物 WRN ヘリカーゼの機能解析	中辻 憲夫 広海 健
高山 優子	The Sld5 and Psfl proteins required for chromosomal DNA replication in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	荒木 弘之
立田 大輔	Basic functions of Mre11 and their roles in recombination and repair in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	小川 智子
千原 崇裕	Role of Wingless signaling during <i>Drosophila</i> tracheal development	林 茂生
野村 扶	Protein-protein interactions on the β subunit of <i>Escherichia coli</i> RNA polymerase	石浜 明
中村 保一	Data analysis and presentation of large-scale nucleotide sequence information	(池村 淑道)
奉 龍 湜	Identification and characterization of genes which are regulated by Ras GTPase-mediated signal transduction pathway in <i>Sschizosaccharomyces pombe</i>	藤山秋佐夫

国立遺伝学研究所年報 第52号

発行者 堀 田 凱 樹

国立遺伝学研究所内

編集者 廣海 健・荒木弘之・角谷徹仁

発行所 **国立遺伝学研究所**

〒411-8540 静岡県三島市谷田1,111

TEL 055(981)6718

FAX 055(981)6719
