

MNCB-7014 gb.:AU035964: AA351310 ESTS9009 Infant brain Homo sapiens cDNA 5' end, mRNA sequence.
 MNCB-7017 gb.:AU035985: MAPKCB2 Mouse mRNA for protein kinase C beta-II.
 MNCB-7018 gb.:AU035986: S72537 zebirin II [wice, C57BL/6J inbred, P20 cerebella, mRNA, 1587 nt].
 MNCB-7019 gb.:AU035987: MSALIN Mouse mRNA for alpha-enolase (2-phospho-D-glycerate hydrolase) (EC 4.2.1.11).
 MNCB-7021 gb.:AU035988: RBTFFINP R. norvegicus mRNA for unknown protein (PTPfin).
 MNCB-7025 gb.:AU035989: MAP1B Mouse MAP1B mRNA for MAP1B microtubule-associated protein.
 MNCB-7029 gb.:AU035990: AA467041 v617h01.r1 Soares mouse mammary gland NRMAG Mus musculus cDNA clone 831697 5', mRNA sequence.
 MNCB-7032 gb.:AU035991: MMU27340 Mus musculus sulfated glycoprotein (Sgp1) mRNA, complete cds.
 MNCB-7033 gb.:AU035992: EST
 MNCB-7034 gb.:AU035993: EST
 MNCB-7035 gb.:AU035994: D67899 House mouse
 MNCB-7038 gb.:AU036001: MURK34MG R. norvegicus mRNA for unknown protein UB-44 mRNA.
 MNCB-7040 gb.:AU035996: AA989827 uc79e08.y1 Sugano mouse kidney mKia Mus musculus cDNA clone 1431878 5' similar to gb:M29877 TISSUE ALPHA-L-PUCOSIDASE PRECURSOR (HUMAN)
 MNCB-7041 gb.:AU035997: EST
 MNCB-7042 gb.:AU035998: MUSAPG1 Mouse mRNA for germ cell specific protein APG-1, complete cds.
 MNCB-7046 gb.:AU035999: AA238650 mv76e07.r1 Soares mouse 3MME12 5 Mus musculus cDNA clone 660996 5', mRNA sequence.
 MNCB-7047 gb.:AU036000: EST
 MNCB-7048 gb.:AU036001: AA983014 ub59c11.r1 Soares mouse mammary gland NRMAG Mus musculus cDNA clone 1382036 5', mRNA sequence.
 MNCB-7049 gb.:AU036002: AA985704 uc13b11.y1 Sugano mouse embryo mewa Mus musculus cDNA clone 1480221 5' similar to gb:L01062 Mouse ATP synthase alpha subunit, complete cds (MOUSE)
 MNCB-7050 gb.:AU036003: EST
 MNCB-7052 gb.:AU036004: RNINSDGM R. norvegicus mRNA for insulin-degrading enzyme.
 MNCB-7054 gb.:AU036005: CRUTUBAB Chinese hamster alpha-tubulin II mRNA, complete cds.
 MNCB-7055 gb.:AU036006: EST
 MNCB-7057 gb.:AU036007: AA987024 uc81d04.y1 Sugano mouse kidney mKia Mus musculus cDNA clone 1432039 5' similar to gb:M26880 UBIQUITIN (HUMAN)
 MNCB-7058 gb.:AU036008: ST371 SB1.8/DMS423E
 MNCB-7060 gb.:AU036009: EST
 MNCB-7061 gb.:AU036010: EST
 MNCB-7062 gb.:AU036011: MUSSURP38 Mouse surfeit locus surfeit 3 gene, exon 8, and surfeit 1 and 2 genes, complete cds.
 MNCB-7063 gb.:AU036012: MNTS22 M. musculus TSC-22 mRNA.
 MNCB-7065 gb.:AU036013: AA989197 wh14d11.r1 Soares mouse hypothalamus M8Hy Mus musculus cDNA clone 1617909 5', mRNA sequence.
 MNCB-7066 gb.:AU036014: AA544421 EST199920 Normalized rat embryo, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone REMAG96 3' end, mRNA sequence.
 MNCB-7067 gb.:AU036015: W13012 ma87h12.r1 Soares mouse p3NMP19.8 Mus musculus cDNA clone 317735 5', mRNA sequence.
 MNCB-7072 gb.:AU036016: A1006637 uc6g06.y1 Sugano mouse embryo mewa Mus musculus cDNA clone 1480570 5' similar to TR:Q92560 Q92560 MYELOBLAST KIAA
 MNCB-7073 gb.:AU036017: AA911687 cl49h05.s1 Soares_NFL_T_GBC_S1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1526841 3' similar to TR:O19444 O19444 MRC CLASS I H3A MINOR HISTOCOMPATIBILITY PEPTIDE
 MNCB-7075 gb.:AU036018: A45921 Sequence 60 from Patent W09520654.
 MNCB-7079 gb.:AU036019: RATMBP2A Rat myelin basic protein mRNA, complete cds.
 MNCB-7081 gb.:AU036020: AA472518 vb02b05.r1 Soares mouse mammary gland NRMAG Mus musculus cDNA clone 874257 5', mRNA sequence.
 MNCB-7082 gb.:AU036021: EST
 MNCB-7083 gb.:AU036022: AA986622 uc82b04.y1 Sugano mouse kidney mKia Mus musculus cDNA clone 1432111 5' similar to gb:J05032 ASPARTYL-TRNA SYNTHETASE (HUMAN)
 MNCB-7084 gb.:AU036023: MUSEFTU Mus musculus protein synthesis elongation factor Tu (eEF-Tu, eEF-1alpha) mRNA, complete cds.
 MNCB-7085 gb.:AU036024: H5126B4 Human DNA sequence *** SEQUENCING IN PROGRESS *** from clone 1265
 MNCB-7088 gb.:AU036025: EST
 MNCB-7091 gb.:AU036026: R85763 yq23c06.s1 Soares retina M2B4HR Homo sapiens cDNA clone 274547 3', mRNA sequence.
 MNCB-7092 gb.:AU036027: RATMBP2A Rat myelin basic protein mRNA, complete cds.
 MNCB-7093 gb.:AU036028: EST
 MNCB-7094 gb.:AU036029: AA987104 uc74g12.y1 Sugano mouse liver mKia Mus musculus cDNA clone 1431430 5' similar to WP:C3644.9 C360376 ACETYL-COENZYME A SYNTHETASE
 MNCB-7095 gb.:AU036030: AA980213 uc55c04.s1 Soares mouse mammary gland NRMAG Mus musculus cDNA clone 1381638 3', mRNA sequence.
 MNCB-7096 gb.:AU036031: MMU15582 Mus musculus oligodendrocyte-specific protein mRNA, complete cds.
 MNCB-7097 gb.:AU036032: R3M0FPR81 R. norvegicus mRNA for Myelin-associated/Oligodendrocytic Basic Protein-61.
 MNCB-7098 gb.:AU036033: EST
 MNCB-7099 gb.:AU036034: AA986543 vx63f12.r1 Stratagene mouse macrophage (M937306) Mus musculus cDNA clone 1279919 5', mRNA sequence.
 MNCB-7100 gb.:AU036035: A1006688 uc16d09.y1 Sugano mouse embryo mewa Mus musculus cDNA clone 1480529 5' similar to gb:L11931 SERINE HYDROXYMETHYLTRANSFERASE, CYTOSOLIC (HUMAN)
 MNCB-7104 gb.:AU036036: A1006688 uc16d09.y1 Sugano mouse embryo mewa Mus musculus cDNA clone 1480529 5' similar to gb:L11931 SERINE HYDROXYMETHYLTRANSFERASE, CYTOSOLIC (HUMAN)
 MNCB-7106 gb.:AU036037: HSU47634 Human beta-tubulin class III isotype (beta-3) mRNA, complete cds.
 MNCB-7109 gb.:AU036038: EST
 MNCB-7110 gb.:AU036039: AA986679 uc82g09.y1 Sugano mouse kidney mKia Mus musculus cDNA clone 1432192 5' similar to gb:J06261 Mouse protective protein (MOUSE)
 MNCB-7112 gb.:AU036040: MSALIN Mouse mRNA for alpha-enolase (2-phospho-D-glycerate hydrolase) (EC 4.2.1.11).
 MNCB-7113 gb.:AU036041: AC002055 Human Chromosome 22q13 Cosmid Clone nlg3, complete sequence.
 MNCB-7114 gb.:AU036042: AA324100 EST26967 Cerebellum II Homo sapiens cDNA 5' end, mRNA sequence.
 MNCB-7115 gb.:AU036043: AA981588 uc23d06.r1 Soares mouse mammary gland NRMAG Mus musculus cDNA clone 1347563 5' similar to SW:AIG1_ARATH P64120 AIG1 PROTEIN.
 MNCB-7117 gb.:AU036044: MUSEFTU Mus musculus protein synthesis elongation factor Tu (eEF-Tu, eEF-1alpha) mRNA, complete cds.
 MNCB-7118 gb.:AU036045: W85341 mf46d08.r1 Soares mouse embryo KME13.5 14.5 Mus musculus cDNA clone 408111 5', mRNA sequence.
 MNCB-7119 gb.:AU036046: A1018652 uc92g03.r1 Soares mouse mammary gland NRMAG Mus musculus cDNA clone 1364980 5' similar to WP:R0554.1 CE05175 RIBONUCLEASE PH LIKE
 MNCB-7122 gb.:AU036047: H8MANT61K Human medium tumor antigen-associated 61-kD protein mRNA, 5' end.
 MNCB-7125 gb.:AU036048: EST
 MNCB-7126 gb.:AU036049: EST
 MNCB-7127 gb.:AU036050: HSU09466 Human home A:farnesyltransferase (COX10) mRNA, complete cds.
 MNCB-7128 gb.:AU036051: AF044334 Mus musculus pleiotropic regulator 1 (PLNG1) mRNA, complete cds.
 MNCB-7129 gb.:AU036052: AA977147 oc24g07.s1 MCI_CGAP_GC4 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1587324 3', mRNA sequence.
 MNCB-7130 gb.:AU036053: AA794722 vef4f1.s1 Knowles Soliter mouse 2 cell Mus musculus cDNA clone 1123821 5', mRNA sequence.
 MNCB-7131 gb.:AU036054: H87240 Rattus norvegicus R82K1 mRNA for fructose-6-phosphate 2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase, complete cds.
 MNCB-7132 gb.:AU036055: MUSNUCLEO8 Mouse nucleobindin mRNA, complete cds.
 MNCB-7134 gb.:AU036056: AB000733 Mouse mRNA for AFla, complete cds.
 MNCB-7135 gb.:AU036057: EST
 MNCB-7136 gb.:AU036058: S72537 zebirin II [wice, C57BL/6J inbred, P20 cerebella, mRNA, 1587 nt].
 MNCB-7137 gb.:AU036059: AC004542 Homo sapiens PAC clone DJ430N08 from 22q12.1-qtter, complete sequence.
 MNCB-7139 gb.:AU036060: EST
 MNCB-7140 gb.:AU036061: AF000423 Rattus norvegicus synaptotagmin XI mRNA, complete cds.
 MNCB-7141 gb.:AU036062: EST
 MNCB-7142 gb.:AU036063: MMH19RNA M. musculus mRNA for H19 clone.
 MNCB-7143 gb.:AU036064: AA387676 vb57f05.r1 Ko mouse embryo I1 5dpc Mus musculus cDNA clone 761121 5', mRNA sequence.
 MNCB-7144 gb.:AU036065: EST
 MNCB-7146 gb.:AU036066: AA107954 ml99f10.r1 Stratagene mouse kidney (M937315) Mus musculus cDNA clone 520171 5' similar to WP:W04D2.6 CE
 MNCB-7147 gb.:AU036067: W13545 ma55h02.r1 Soares mouse p3NMP19.5 Mus musculus cDNA clone 317523 5', mRNA sequence.
 MNCB-7148 gb.:AU036068: MMU15582 Mus musculus oligodendrocyte-specific protein mRNA, complete cds.
 MNCB-7151 gb.:AU036069: AC004475 Homo sapiens chromosome 19, cosmid F23858, complete sequence.
 MNCB-7153 gb.:AU036070: AA987024 uc81d04.y1 Sugano mouse kidney mKia Mus musculus cDNA clone 1432039 5' similar to gb:M26880 UBIQUITIN (HUMAN)
 MNCB-7155 gb.:AU036071: HUMNSPA Homo sapiens neuroendocrine-specific protein A (NSP) mRNA, complete cds.
 MNCB-7157 gb.:AU036072: EST
 MNCB-7158 gb.:AU036073: AA986626 uc82b11.y1 Sugano mouse kidney mKia Mus musculus cDNA clone 1432125 5' similar to gb:M19141 Mouse heat shock protein 70 cognate mRNA, complete cds (MOUSE)
 MNCB-7159 gb.:AU036074: EST
 MNCB-7160 gb.:AU036075: RATMBP2A Rat myelin basic protein mRNA, complete cds.
 MNCB-7161 gb.:AU036076: AA988836 UI-R-CO-ii-g-01-0-UI.s1 UI-R-CO Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-CO-ii-g-01-0-UI 3', mRNA sequence.
 MNCB-7162 gb.:AU036077: RNTUBB15 Rat mRNA for beta-tubulin T beta15.
 MNCB-7163 gb.:AU036078: EST
 MNCB-7164 gb.:AU036079: AA274969 va94h08.r1 Soares mouse 3MME12 5 Mus musculus cDNA clone 747135 5' similar to TR:C871299 G871299 HPBRII-4 RNA.
 MNCB-7165 gb.:AU036080: MSALIN Mouse mRNA for alpha-enolase (2-phospho-D-glycerate hydrolase) (EC 4.2.1.11).
 MNCB-7166 gb.:AU036081: EST
 MNCB-7167 gb.:AU036082: EST
 MNCB-7168 gb.:AU036083: EST
 MNCB-7169 gb.:AU036084: AA987028 uc81d10.y1 Sugano mouse kidney mKia Mus musculus cDNA clone 1432051 5' similar to SW:SELP_MOUSE P70274 SELENOPROTEIN P PRECURSOR. [1]
 MNCB-7170 gb.:AU036085: AP027707 Mus musculus apoptosis activator Mtd (Mtd) mRNA, complete cds.
 MNCB-7171 gb.:AU036086: RNDRI42 R. norvegicus mRNA for ER transmembrane protein.

疾病解析・治療にむけた遺伝子研究資源基盤整備に関する総合的研究
ヒトおよび霊長類各種組織からの完全長cDNAの分類
分担研究者 菅野純夫 東京大学医科学研究所癌ウイルス研究部助教授

研究要旨

本年度は、将来の完全長cDNAクローンの分離を念頭に、ヒト：脂肪組織、肺、骨格筋など、マウス：胸腺、脾臓など、サル：前頭部のオリゴキャップ法による完全長cDNAライブラリーの作成した。さらに、ヒト大腸粘膜cDNAライブラリー (ColF) を中心に、これらのライブラリーからcDNAクローンを分離し、1パス塩基配列決定を行った。このデータにつき、ホモロジー検索等の解析を行い、完全長クローン約510を選別しバンクデータベースに登録した。

A. 研究目的

悪性腫瘍・動脈硬化・糖尿病・精神病等疾病の理解とその解決ためには、システムとしての生体を遺伝子レベルで理解する事が必要である。このためにはヒトの全遺伝子が明らかにされ、その発現解析・機能解析が行われることが必要になる。

遺伝子の発現解析、機能解析には、mRNAの完全なコピーである完全長cDNAが必要であり、遺伝子レベルで疾病を研究していくための欠くことの出来ない基盤となっている。特に、疾病の遺伝子レベルの研究を広範に展開するために、ヒトの全遺伝子の完全長cDNAクローンを持つことは重要と考えられる。

本研究は、疾病の遺伝子レベルの研究基盤として、完全長cDNAクローンを多数収集することを目標とする。特に、完全長cDNAの機能解析に直結するように、発現可能な形の完全長cDNAの収集を目指す。

B. 研究方法

完全長cDNAクローンの収集を効率よく進めるため、我々の開発したオリゴキャップ法を用い、完全長cDNAライブラリーを各種臓器より作成する。この際、ベクターとして、強力な発現

ベクターであるpME18S-FLを使用する。それらのcDNAライブラリーより多数のクローンを分離し、それらの1パス塩基配列決定を行い、既知のcDNAとのデータ比較等を行うことで、完全長cDNAクローンを多数分離する。

cDNAライブラリーの作成を行うための材料採取にあたり、倫理面についての十分な配慮を行う。

C. 研究結果

1、完全長cDNAライブラリーの作成
本年度も前年度に引き続き、発現ベクターpME18S-FL3(Genbank accession number AB009864)をベクターに、完全長cDNAライブラリーを作成した。作成したライブラリーは、ヒトが、脂肪組織、肺、骨格筋など、正常組織8種。マウスが胸腺、脾臓など正常組織6種。サルが前頭部であった。これらのライブラリーの完全長率は40%-70%の間に分布していた。

2、完全長cDNAライブラリーの1パス塩基配列決定

現在までに、ヒト大腸粘膜由来の完全長cDNAライブラリーColFより、約3700クローン、その他のライブラリーより2000クローン、計5700クローンの1パス塩基配列決定を行った。

ColFについてホモロジー検索の結果、

既知のものとホモロジーを示すものが約50%を占め、このうち、約40%が既知の5'端と一致するか、それより長いもの(完全長)であった。ESTのみとホモロジーのあったものが約30%、何等の遺伝子ともホモロジーを示さない新規のものは約20%であった。クローンの重複度は約2であった。

ホモロジーを見出した既知ヒト遺伝子の完全長cDNAクローンは、約700クローンであった。これらColFの完全長cDNAクローン約510をバンクデータベースに登録した。

本年度は、さらに、前年度作製したカニクイザル側頭葉cDNAライブラリーよりの1pass配列決定を開始した。現在のところ、1000クローンまでデータが蓄積されている。

D. 考察

本年度はカニクイザルの脳各部分の完全長cDNAライブラリー作りに再挑戦を行った。この際、前年度の反省を生かし、詳細な部分に分けず、脳を大きく切り分け、多量の材料を得てから、完全長cDNAライブラリー作製を行った。現在のところ、前頭部とよべき部分のcDNAライブラリーの作製を修了した。順次作製する予定である。

カニクイザルのcDNA塩基配列は、既存のデータベースにほとんど登録されていない。カニクイザルの完全長cDNAライブラリーの作製は、ヒトでは入手しにくい脳より、新規の遺伝子を得ることを目的としていた。しかし、ヒトで既知の遺伝子の配列がカニクイザルで解っていないため、現在進行中の1pass配列決定によって得られるデータは、進化論的観点からも貴重なものである。

ゆっくりではあるが、完全長cDNAのデータが蓄積されつつある。これら

を、解析し、使用しやすいデータベースをインターネット上に公開していくことは、重要であると考え。そのため、情報機器、情報科学の面からの協力援助が必要であろう。

E. 結論

完全長cDNAライブラリーと1pass塩基配列を組み合わせて、完全長cDNAクローンを分離していく方法は、完全長cDNAクローンを収集して、疾患の研究基盤を整備する上で有効であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hiroi, N., Yakushiji, F., Shimojo, M., Watanabe, S., Sugano, S., Yamaguchi, N., Miyachi, Y. Human ACTH hypersensitivity syndrome associated with abnormalities of the ACTH receptor gene. *Clinical Endocrinology* 48: 129-134, 1998.
2. Yoshida, K., Yoshitomo-Nakagawa, K., Seki, N., Sasaki, M., Sugano, S. Cloning, expression analysis, and chromosomal localization of BH-protocadherin, a novel member of the cadherin superfamily. *Genomics* 49: 458-461, 1998.
3. Sugano, S., Yoshitomo-Nakagawa, K., Yu, Y.-s., Mizushima-Sugano, J., Yoshida, K. Transmembrane-domain trapping: a novel method for isolation of cDNAs encoding putative membrane proteins. *DNA Res.* 5: 187-193, 1998.
4. Matoba, H., Sugano, S., Yamaguchi, N., Miyachi, Y. Expression of transforming growth factor- β 1 and transforming growth factor- β type II receptor mRNA in papillary thyroid carcinoma. *Horm. Metab. Res.* 30:624-628, 1998.

5. Seki, N., Sugano, S., Suzuki, Y., Nakagawara, A., Ohira, M., Muramatsu, M., Saito, T., Hori, T. Isolation, tissue expression and chromosomal assignment of human RGS5, a novel G-protein signaling regulator gene. *J. Hum. Genet.* 43: 202-205, 1998
 6. Senoo, M., Seki, N., Ohira, M., Sugano, S., Watanabe, M., Tachibana, M., Tanaka, T., Shinkai, Y., Kato, H. A second p53-related protein, p73H, with high homology to p73. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 248: 603-607, 1998
 7. Yoshida, K., Hida, M., Watanabe, M., Yamaguchi, R., Tateyama, S., Sugano, S. cDNA cloning and chromosomal mapping of mouse BH-protocadherin. *DNA sequence* in press
 8. Takada, T., Yoshida, K., Nakamura, K., Nakao, K., Tsujimoto, G., Katsuki, M., Sugano, S. Expression of Green Fluorescent Protein in Transgenic Mice. *Methods in Enzymology* 302: in press
 9. Seki, N., Muramatsu, M., Sugano, S., Suzuki, Y., Nakagawara, A., Ohira, M., Hayashi, A., Hori, T., Saito, T. Cloning, expression analysis and chromosomal localization of HIP1R, an isolog of Huntington interacting protein (HIP1). *J. Hum. Genet.* in press
 10. Seki, N., Hattori, A., Sugano, S., Suzuki, Y., Nakagawara, A., Ohira, M., Muramatsu, M., Hori, T., Saito, T. Isolation, tissue expression and chromosomal assignment of a novel human gene which encodes a protein with RING finger motif. *J. Hum. Genet.* in press
 11. Seki, N., Hattori, A., Sugano, S., Suzuki, Y., Nakagawara, A., Muramatsu, M., Hori, T., Saito, T. A novel human gene whose product shares significant homology with the bovine brain-specific protein p25 on chromosome 5p15.3. *J. Hum. Genet.* in press
 12. Ito, E., Iwahashi, Y., Yanagisawa, Y., Suzuki, Y., Sugano, S., Yuasa, Y., Maruyama, K. Analysis of the promoter region for the human *p27^{Kip1}* gene. *Gene* in press
 13. Tasaki, Y., Fukuda, S., Iio, M., Miura, R., Imai, T., Sugano, S., Yoshie, O., Hughes, A. L., Nomiyama, H. Chemokine PARC gene (SCY18) generated by fusion of two MIP-1 α /LD78 α -like genes. *Genomics* in press
 14. Shibui, A., Tsunoda, T., Seki, N., Suzuki, Y., Sugane, K., Sugano, S. Isolation and chromosomal mapping of human homolog of intestinal Na⁺/PO₄ cotransporter. *J. Hum. Genet.* in press
 15. Ito, E., Yanagisawa, Y., Iwahashi, Y., Suzuki, Y., Nagasaki, H., Akiyama, Y., Sugano, S., Yuasa, Y., Maruyama, K. A core promoter and a frequent single-nucleotide polymorphism of the mismatch repair gene hMLH1. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* in press
 16. Shibui, A., Tsunoda, T., Seki, N., Suzuki, Y., Sugano, S., Sugane, K. Cloning, expression analysis and chromosomal localization of a novel butyrophilin like receptor. in press
2. 学会発表
1. 菅野純夫、鈴木穰、秦裕子、佐々木全英、小松孝美、渡邊学、水島一、菅野純子、大森義裕、角田猛、太田紀夫、磯貝隆夫 Oligo-Capping法を用いた完全長cDNAライブラリーの作成と解析 第71回日本生化学会大会、名古屋。
 2. 菅野純夫 Oligo-Capping法を用いた完全長cDNAライブラリーの作成と解析 第21回日本分子生物学会年会、横浜。

cDNAクローンの開発と発現プロフィール探査

研究分担者 榊 佳之 東京大学 教授

研究要旨

2つの異なるアプローチでcDNAクローンの収集と発現プロフィール探査を行った。(1) ゲノムシーケンスをもとに遺伝子(cDNA、EST)を染色体特異的に収集する。具体的には21番染色体について約8 Mb領域より63種の遺伝子を見出し、相同性探索の結果53種が新規であった。(2) 生物現象に特異的なcDNAの探索を行った。具体的に神経細胞のアポトーシス及び電氣的刺激に特異的に発現変化するcDNAをFDD法を用いて系統的に解析し、各々18種及び20種の新しいcDNAを収集した。その一部について完全長cDNAを作成した。

A. 研究目的

cDNAの収集では系統的或いは網羅的に進めることが重要である。本研究では染色体領域ごとに全てのcDNAを収集すること及び生体反応に対応して変化するcDNAを網羅的に収集することを考えスタートした。対象としてダウン症の原因であり、日本で解析の進んでいる21番染色体についてのcDNA収集と神経細胞におけるアポトーシスと長期増殖(LTP)に特異的なcDNAの収集を図った。

B. 研究方法

- ・科学技術振興財団(JST)の事業として本研究室で決定されたヒト21番染色体ゲノム配列約8 MbについてBLASTによる相同性探索及びGRAIL、GENESCANなどの遺伝子予測プログラムを用いて遺伝子の検索を行った。
- ・ヒト神経細胞SH-SY5Yにコルヒチン誘導のアポトーシスをおこし経時的にサンプルを収集し全RNAの発現プロフィールをFDD法で解析した。
- ・ラット脳に電極を挿入し刺激後経時的に脳よりRNAを抽出し、発現プロフィールを

FDDで解析した。

C. 研究成果

- ・ヒト21番染色体8 Mbの配列についてインターネットを通じてBaylor Colledgeのシステムを利用してGRAIL、GENESCANなどを利用して、7 Kb毎にexon予測、遺伝子予測を行う一方、BLASTによりESTの相同性を検索し、合計63種の遺伝子を見出した。結果の一部を表1に示す。その中でダウン症必須領域7種については完全長cDNAの分離、発現プロフィールの解析を行った。
- ・SH-SY5Yはレチノイン酸で分化後コルヒチンによりアポトーシスを起こす。我々はコルヒチン添加後0、4、6、12、24、48時間後にRNAを抽出し、FDDにより320のプライマーコンビネーションにより解析し約200個の発現パターンの変動するbandを見出し、それらのを切り出し、配列決定を行った。その内のひとつについて完全長cDNAを分離した結果3つのRNA結合ドメインを持つ新しいRNA結合タンパクであることが判明した。
- ・LTPには新規の遺伝子発現がかかわって

いると言われている。ラット脳に電極を挿入後一定条件下で電気刺激を与え海馬での遺伝子発現の変化をFDDで459プライマーコンビネーションについて調べた。その結果20種の発現パターンの著しく変化するクローンを見出し、バンドの切り出しとクローニングを行った。

D. 考察

ゲノムシーケンスデータに基づく遺伝子(cDNA)の予測はESTデータの集積と共に極めて強力な手段となりつつある。この配列をもとに(完全長)cDNAライブラリーより対応するクローンを抽出するのはたいして困難ではないので今後の有力な手法になるであろう。

生体反応特異的クローンの収集にFDDを採用した。この方法は全く新規発現配列を見つけることも可能な強力な手法である。しかしcDNAクローン/ESTデータの集積と共にcDNAマイクロアレイ技術が大量の発現プロファイル解析にとってより優れた手法になると予測される。今後双方の技術の長所を加味した手法の確立を試みる。

E. 結論

- ・ヒト21番染色体特異的遺伝子(cDNA)63種を見出したゲノム上に正確にマップした。
- ・神経細胞アポトーシス関連のcDNA18種を分離し、その一つについて完全長cDNAを決定したところあたらしいRNA結合タンパクであった。
- ・長期増強に対応すると思われる20種の遺伝子(cDNA)を見出した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ・ Dong-Kug Choi, Takashi Ito, Yuko Mitsui

and Yoshiyuki Sakaki:

Fluorescent differential display analysis of gene expression in apoptotic neuroblastoma cells, *Gene* 1998 Nov. 26, 223 (1-2) : 21-31 (1998)

・ R. Matsuo, A. Kato, Y. Sakaki, K. Inokuchi: Cataloging altered gene expression during rat hippocampal long-term potentiation by means of differential display. *Neuroscience Letters* 244, 173-176 (1998)

・ Nobuya Koike, Akiko Hida, Rika Numano, Matsumi Hirose, Yoshiyuki Sakaki and Hajime Tei: Identification of the mammalian homologues of the *Drosophila timeless* gene, *Timeless1*, *FEBS Letter*, 441, 427-431 (1998)

・ F. Tsukahara, I. Urakawa, M. Hattori, M. Hirai, k. Ohba, T. Yoshioka, Y. Sakaki and T. Muraki: Molecular Characterization of the Mouse *mtprd* Gene, a Homologue of Human *TPRD*: Unique Gene Expression Suggesting Its Critical Role in the Pathophysiology of Down Syndrome. *J. Biochem.* 123, 1055-1063 (1998)

2. 学会発表 省略

霊長類DNAライブラリー作製とESTの染色体へのマッピング

分担研究者 平井百樹 東京大学大学院理学系研究科教授

研究要旨

既存のESTについてのデータベースの整備と、完全長cDNAのクローニングは、ヒトの遺伝疾患の原因究明と治療のための重要な研究基盤となる。本研究では、cDNAの遺伝子としての機能を解析をする上で重要な染色体上での位置の情報を得て、遺伝子資源データベースの充実をはかることを目的としている。このために、短いcDNA用に改良した蛍光 in situ hybridization (FISH) 法により、ヒトならびにマウスの遺伝子のマッピングを行った。また、医学実験用霊長類として用いられているカニクイザルについて、ゲノムDNAライブラリーを作製した。さらに、ヒトでは採材が困難な組織・器官から得たサル類のcDNAクローン約100個のマッピングを実施した。そして、ヒトで synteny を示す染色体領域を特定することにより、ヒトでの相同遺伝子のポジショナル・クローニングのための情報を得た。

A. 研究目的

発現した遺伝子の部分的配列にあたる EST の登録数は膨大なものになっている。しかし、EST として登録されたものの多くは、3' 末端側の配列であり、遺伝子としての機能を知るには不十分なものが多い。そこで今後は完全長cDNAのクローニングとその管理が重要課題である。また、それらの機能解析のためには、対応するゲノムDNAの構造解析や染色体上の位置づけも必要である。

ヒトの疾患モデル実験の多くはマウスを用いている。交配実験、ジーンターゲティングとノックアウト・マウスの作製など、マウスでの研究の利点は大きい。しかし、ホモログスな遺伝子でもその発現や機能の点で、ヒトに直接的に外挿することが難しいこともある。その点、ヒトに近縁のサル類を用いた場合に利点がある。特にヒトで採取が困難な組織・器官での遺伝子発現の解析を行うため、サル類でのcDNAの収集ならびに解析が有効である。わが国においては、本研究事業の分担研究者である菅野らが、完全長 cDNA を効率的に得るための優れた方

法であるオリゴキャッピング法により、今後実験動物として利用価値が高いと考えられるカニクイザルについてcDNAを得るプロジェクトを進めている。

以上のような状況を踏まえ、本研究では、次の項目について研究することを目的とした。

(1) 遺伝疾患に関連する遺伝子のcDNA をプローブにして、FISH 法によりマッピングを行う。(2) ヒトに近縁のサル類で得られた新規遺伝子候補のcDNAのマッピングを行い、ヒトでの相同遺伝子のポジショナル・クローニングのための情報を得る。そして今後の遺伝子機能解析に備え、サル類のゲノムDNAライブラリーの作製を行う。

B. 研究方法

ヒトのcDNAのマッピング：cDNAのマッピングには、染色体パネル法やラディエーション・ハイブリッド (RH) 法とならんで、FISH による直接的な方法がある。本研究では、われわれが改良した短いcDNAクローン用のFISH 法によるマッピングを行なった。

サルのゲノム DNA ライブラリーの作製と cDNA のマッピング：狭鼻猿類のカニクイザル (*Macaca fascicularis*, $2n=42$) ならびに原猿類のメガネザル (*Tarsius bancanus*, $2n=80$) の培養腎細胞より抽出した DNA を用いて、ゲノム DNA ライブラリー (Vector: ラムダファージ EMBL3 BamHI) を作製した。メガネザルは原始的なサル (原猿) のうち、ヒトへの分岐点に近いところに位置づけられている種である。一方、菅野によりクローン化された、カニクイザルの脳の部位特異的完全長 cDNA のうち、約 100 クロオンを FISH 法によりマップした。スライドガラス上で、カニクイザルの染色体標本が左に、ヒトの染色体標本が右に分布するようプレパラートを作製した。標識プローブのハイブリダイゼーションと洗いを、同じ条件下 (ストリンジェンシー) で行ない、シグナルの観察を行なった。カニクイザルとヒトの染色体間のシンテニー関係については、染色体ペインティング法により決定した。

C. 研究結果

(1) 本年度は、他の研究グループとの共同により、Hfz1 (Sagara et al., 1998)、Hfz2 (Sagara et al., 1998)、Hfz6 (Tokuhara et al., 1998)、Hfz7 (Sagara et al., 1998)、DNase gamma (Shiokawa et al., 1998)、CSNK1G3 (Kusuda et al., 1998) など、疾患に関連する遺伝子についてのマッピングを行った。また、マウスの相同遺伝子についても、mtprd (Tsukahara et al., 1998)、taldo (Kusuda et al., 1998) などについてマッピングした。

(2) カニクイザルとメガネザル両種について、良質のゲノム DNA ライブラリーを得た。特にカニクイザルのライブラリーは、cDNA についての機能解析のために重要な素材となる。一方、菅野により得られたカニクイザルの完全長 cDNA について、データベース検索により未登録のシーケンスを含むものから約 100 クロオンを選び、マップを行った。ヒトとカニク

イザルの染色体間の synteny 関係は、ペインティング法による結果にもとづいている。しかし細部にわたっては必ずしも確立されていないことから、各クロオンの位置の対応の確定についてはまだ進行中である。これまでに複数回の FISH により位置の確認を終了した 52 クロオンについて述べると、48 クロオンがカニクイザル染色体上にマップできた。そのうち 36 クロオンについては、ヒト染色体上にも直接的にマップできた。これらの 36 クロオンのうち、32 はペインティングに基づく synteny 関係と矛盾しない染色体領域にあった。残りの 4 個についてはは予測された染色体領域とは異なる位置にマップされた。

D. 考察

ヒトと高等サル類とでは、遺伝子の機能や発現パターンにおいて極めて近い関係にあると推定される。したがって、ヒトにおいて採材が困難な組織や器官で発現している遺伝子について、サルの材料でクローン化することができれば、それをもとにヒトでのホモログを得て、ヒトの新規遺伝子をクローン化することが期待できる。これまでに調べられたヒトとカニクイザルの相同遺伝子間の塩基配列の相同性は、非翻訳部位を含めても極めて高い。このことから、カニクイザルで得た cDNA を直接ヒトの染色体上の相同配列部位にハイブリダイズさせることも可能なはずである。本研究で実際に FISH を行なった結果、それを裏付ける結果をえた。すなわち、多くのクロオンについて、synteny 関係を示す染色体領域にマップできた。ただし、サル染色体にはハイブリダイズするが、ヒトの対応する部位にハイブリダイズしないようなクロオンもあった。これは、両種が分岐後に大きく変異したか、あるいはゲノム構造 (イントロン・エクソン構成) が異なった遺伝子とも考えられる。しかし、実際にはそれらが未成熟 mRNA に由来する cDNA である可能性もあるので、今後さらに解析を進める。

カニクイザルは国立感染症研究所筑波医学実

験用霊長類センターで飼育しているものである。計画的に交配し、すでに3代あるいはそれ以上にわたり家系図が完備した集団で、疾患に関連する遺伝的背景が詳細に調べられた系統も保持されているとのことである。ヒト遺伝子治療を目的とした霊長類ゲノム研究が国際的にも展開しつつある。たとえば、米国テキサス州サンアントニオには、ヒヒの大コロニーが飼育されている。マイクロサテライトによる連鎖地図が作成されており、高脂血症などの家系の遺伝解析が進んでいると聞く。しかし、完全長cDNAを取る技術にかけては、国際的にみても菅野グループが断然リードしている。この利点を生かした新規疾患遺伝子のクローニングが期待できると考える。

E. 結論

カニクイザル由来の完全長cDNAを、FISH法でカニクイザル染色体上にマップし、synteny の関係からヒト染色体上の位置を推定した。並行して直接ヒト染色体上にFISHする方法も行った。これによりヒトでは解析し難い組織器官で発現する遺伝子群につき、ポジショナルクローニングをするための基盤ができたと考える。また、カニクイザルのゲノムDNAライブラリーも作製した。これは、新規遺伝子の構造解析とそれに基づく機能の解析に寄与できるものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Sagara, N., Toda, G., Hirai, M., Terada, M., and Katoh, M. (1998) Molecular cloning, differential expression, and chromosomal localization of human Frizzled-1, Frizzled-2, and Frizzled-7." *Biochem. Biophys. Res. Com.* 252: 117-122.

Shiokawa, D., Hirai, M., and Tanuma, S. (1998) cDNA cloning of human D Nase

gamma: chromosomal localization of its gene and enzymatic properties of recombinant protein. *Apoptosis* 3: 89-95.

Tokuhara, M., Hirai, M., Atomi, Y., Terada, M., and Katoh, M. (1998) Molecular cloning of human Frizzle-6. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 243: 622-627.

2. 学会発表

平井百樹：FISH 法による霊長類染色体の比較研究、シンポジウム「動物の染色体進化研究の新展開」、日本遺伝学会第70回大会（1998.9.23-25、札幌）

長田直樹、笠井文生、伊関可奈子、楠田潤、橋本雄之、平井百樹：「ヒト11番染色体末端領域におけるDNA複製タイミングの解析」、第21回日本分子生物学会年会、(1998.12.16-19、横浜)

坂手龍一、伊関可奈子、寺尾恵治、森裕介、早坂郁夫、平井百樹：「染色体複製バンドの動的解析—ヒトとサル類の比較研究—」、第21回日本分子生物学会年会、(1998.12.16-19、横浜)

森崎弘史、金子葉子、平井百樹、岡山博人、池田恭治、中西真：「ヒトCdslキナーゼのクローニング」、第21回日本分子生物学会年会、(1998.12.16-19、横浜)

相良憲彦、徳原真、戸田剛太郎、跡見裕、平井百樹、寺田雅昭、加藤勝：Wnt受容体をコードするHuman frizzled (Hfd)遺伝子群のクローニング」、第21回日本分子生物学会年会、(1998.12.16-19、横浜)

G. 知的所有権の取得状況
取得なし

分担研究報告書

マウス DNA ライブラリーの作製とヒト ホモログの分離

奥田晶彦 埼玉医科大学 第二生化学 講師

昨年分離した転写因子 UTF1 及び EFP をコードする領域を含むマウスゲノム遺伝子の詳細なマップを作るとともに、ターゲティングベクターを作成した。また、ヒトホモログの分離の一環としてヒト UTF1 遺伝子を含むゲノム DNA を分離した。新規クローンとして 129 マウスゲノム DNA ライブラリーから性腺刺激ホルモン放出ホルモンをコードする遺伝子をクローン化した。また、これらの研究と並行して、既にノックアウトの手法を用いて顕著な成果をあげている国内の 31 の研究グループに、その時に用いたゲノム DNA を供給していただけるよう依頼し、実際に、IL6 遺伝子等 5 つの遺伝子を入手した。それら DNA の品質のチェックに留意している。

A 研究目的

あらゆる生命現象は、その生物のゲノム DNA が持つ遺伝情報により規定される。従って、全ゲノム DNA の塩基配列を決定しようという考えは、極めて自然なものであり、事実、途中段階である現時点でも、既に、莫大な情報が得られている。但し、その全ゲノム DNA 塩基配列決定完了により、分子生物学の研究が終焉を迎えるのではなくて、その決定された塩基配列の意味を探るといった重要な研究課題が待ちかまえている。この様な状況の中で、ジーンタゲティング法を用いた解析がより盛んになることが想像される。さらに、この手法自体に関しても、従来の 1 つの遺伝子を 1 つの個体において完全に破壊してしまうというものではなくて、例えば、遺伝子を組織特異的に破壊するといった方法等、複雑な生命現象を明らかにすべく、より洗練された

手法が主流になってくると考えられる。従って、ノックアウトによる解析が既になされた遺伝子に関しても、新しいシステムであらためて解析するという状況が生まれてくることが考えられる。それ故、私の研究課題の 1 つは全国の研究者からクローン化されたゲノム DNA を供給していただき、それらの品質を管理することである。もう一つの目標は 129SV 系統マウス由来の新規ゲノム遺伝子をクローン化することである。究極的な目標としては、これらの方策により収集したゲノム DNA クローンを多くの研究者に供給する体制を作ることである。

B 研究方法

1) 昨年度、クローン化した 2 種類の転写因子、UTF1 と EFP をコードするゲノム遺伝子を含むファージ DNA を調製し、詳細な

制限酵素地図を作成する。さらに、これらのゲノムDNAを用いてターゲティングベクターを作成する。

2) マウス UTF1 遺伝子をプローブとしてヒトゲノムDNAライブラリーからそれに相当する遺伝子をクローン化する。

3) 129SVマウスゲノムDNAライブラリーから性腺刺激ホルモン放出ホルモンをコードする遺伝子を含むファージクローンを分離する。

4) 昨年までに、ジーンタゲティングの手法を用いて成果をあげている研究者に、実際に、その時用いたゲノムDNAを供給していただけるように依頼する。また、実際に送られてくるクローンの品質を管理する。

C 研究結果

1) 昨年分離した、UTF1 及び EFP 遺伝子を含むファージクローンからλDNAを大量に調製し、インサートの回収、プラスミドベクターへの導入といった過程を経て、最終的に制限酵素地図を完成させた。さらに、Neo耐性遺伝子を含むターゲティングベクターを作成した。

2) ヒトゲノムDNAライブラリーをヒューマンサイエンス振興財団より購入し、マウス UTF1 ゲノム DNA 断片をプローブとして約100万ブランクスクリーニングしたところ、2個のクローンが得られた。上記と同様に、λDNAを調製し、制限酵素地図を作

成した。また、遺伝子コード領域の塩基配列を決定した。

3) 性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) をコードする cDNA をプローブとして 129SVマウスゲノムDNAライブラリーをスクリーニングした。約50万ブランクスクリーニングしたところ、2個のポジティブクローンが得られた。ゲノムDNAを回収し、制限酵素地図を作成すると同時に、一部、DNAの塩基配列を決定し、得られたクローンが確かにGnRHをコードする遺伝子を含むことを確認した。

4) ノックアウトマウスを用いた研究で成果をあげている国内31の研究グループに、その時用いたゲノムDNAクローンを供給していただけるよう依頼した。実際に、5つのクローン、IL-6, stat6, XP(xeroderma pigmentosum)-A, vitamin D receptor, core-binding factor alpha 1 が送付されてきた。現在、それらのクローンの品質を管理している。

D 考察

ゲノムプロジェクトが着実に成果をあげ、ヒトゲノム全体のDNA配列を決定しようという試みがまもなく完了しようとしている。その次に大事になってくることは、個々の遺伝子の生物学的な機能をあきらかにすることであり、その意味で、ジーンターゲティング法が今にもまして利用されることが想像される。また、そのジーンタゲティング法も、従来の古典的な方法だけではなくて、点変異導入と

いった高度な技術を用いて解析したり、あるいは、1つの遺伝子を壊すだけではなくて、2つ以上の遺伝子を同時に欠失させ、その影響を見ようとするようなアプローチが主流になってくると考えられる。従って、既にノックアウトされている遺伝子に関しても、今後、また、必要となってくることも十分考えられる。それ故、全国の研究者にゲノムDNAクローンを供給していただけるよう依頼したが、僅か、5クローン供給されるにすぎなかった。従って、クローンを供給して頂けなかった研究者の方々と再度、コンタクトを取り数多くのクローンを1つの研究所に集めることの重要性を理解していただき、1つでも多くのクローンを入手出来るように努力したいと考えている。また、新規のクローンに関しても、出来るだけ多くの遺伝子をクローン化したいと考えている。

E 結論

マウス及びヒト UTF1 遺伝子、EFP, GnRH 遺伝子を含むDNAを分離し、制限酵素地図を決定した。全国の研究者から、IL6 遺伝子等5種類のクローンを入手し、それらの品質をチェックしている。

F 研究発表

1 論文発表

UTF1, a novel transcriptional coactivator expressed in pluripotent embryonic stem cells and extra-embryonic cells.

Okuda, A., Fukushima, A., Nishimoto, M., Orimo, A., Yamagishi, T., Nabeshima, Y.,

Kuro-o, M., Nabeshima, Y., Boon, K., Keaveney, M., Stunnenberg, H.G., Muramatsu, M.

EMBO J. 17, 2019-2032, 1998

Characterization of functional domains of an embryonic stem cell coactivator UTF1 which are conserved and essential for potentiation of ATF-2 activity. Fukushima, A., Okuda, A., Nishimoto, M., Seki, N., Hori, T., and Muramatsu, M. J. Biol. Chem. 273, 25840-25849, 1998

2 学会発表

An embryonic stem cell coactivator UTF1 acts downstream of Oct-3/4 in the regulatory cascade. Akihiko Okuda, Masazumi Nishimoto, Akiko Fukushima, and Masami Muramatsu.

The 3rd EMBL transcription meeting

(Heidelberg, Germany)

August 22-26, 1998

ES細胞特異的転写コアクティベーター UTF1 は Oct-3 の下流に位置する。

西本正純、福島亜紀子、奥田晶彦、村松正實
第21回日本分子生物学会 平成10年12月16日～12月19日

レチノイン酸レセプターに対する転写補助因子としての UTF1 の役割。

福島亜紀子、奥田晶彦、西本正純、村松正實
第21回日本分子生物学会 平成10年12月16日～12月19日

細胞移入可能なヒト染色体断片ライブラリー作製

分担研究者 押村 光雄 鳥取大学医学部教授

研究要旨

マウス ES 細胞中での強い発現を示すプロモーターを有する neo 遺伝子あるいは bsr 遺伝子をヒト線維芽細胞にトランスフェクションし、微小核融合法によりヒト染色体をマウス A9 細胞へ導入し、ヒト染色体を含むマウス A9 細胞を作製した。このヒト染色体ライブラリーが従来のライブラリーと異なる点は、①マウス ES 細胞への導入可能であり、②ヒト染色体の親起源を明かにすることが出来ることにある。本年度は、作製したライブラリーより染色体特異的 STS マーカーおよび染色体 FISH を用いて、1 番、2 番、4 番、5 番、8 番、10 番、14 番、15 番、18 番、20 番および X 染色体を含む A9 細胞を同定した。

A. 研究目的

ES 細胞において発現可能な優性選択マーカーをもつ親起源の明らかなヒト染色体やその断片を含むマウス A9 細胞を作製する。さらに、DNA 多型マーカーや染色体 FISH 法を用いて、それらのライブラリーを詳細に解析し、遺伝子の同定から機能解析、さらには遺伝子導入ベクターの作製にむける研究に資する。

B. 研究方法

はじめに、優性遺伝子マーカーである neo および bsr 遺伝子を各々ヒト正常線維芽細胞にトランスフェクションし、選択培養後に出現する G418 あるいは BS (blasticidin S) 耐性クローンを単離した。次に、得られた G418 耐性クローンとマウス A9 細胞をポリエチレングリコールを用いて細胞融合を行い、800 μ g/ml の G418 あるいは 3 μ g/ml の BS と 10mM の Ouabain を含む培地で選択培養後、雑種細胞を単離した。さらにこの雑種細胞にコルセミド処理を行い、微小核細胞を形成させ、サイトカラシン B 存在下で高速遠心を行い、微小核細胞を精製した。精製した微小核細胞は、再びマウス A9 細胞と融合させ、G418 あるいは BS を用いて選択培養を行った。なお、用いた線維芽細胞は DNA 多型マーカーを用いて染色体の親起源を特定できる。これらの細胞の DNA 抽出のため、細胞ペレットを 4ml のライシスバッファー (10mM Tris-HCl, pH 7.4, 50mM NaCl, 50mM EDTA, pH

8.0, 27% ショ糖) に十分懸濁した後、10mg/ml のプロテアーゼ K および 10% SDS を各 1/10 倍量ずつ加えた。ローテータを用い室温で 1 晩穏やかに攪拌し、フェノール・クロロホルム抽出を繰り返した後、エタノール沈殿により DNA ペレットを回収した。ペレットを適量の TE (10mM Tris-HCl, pH 7.4, 1mM EDTA, pH 8.0) に溶解し、4 $^{\circ}$ C で保存した。マウス A9 細胞中のヒト染色体の親起源は、線維芽細胞由来の本人とその両親の DNA を染色体特異的マイクロサテライトマーカーを用いて同定した。さらに、導入された染色体の解析と優性マーカーの染色体中の導入位置を検索するために、neo あるいは bsr をプローブとして FISH (fluorescence in situ hybridization) 解析を行った。

C. 研究結果

表 1 に親起源の明らかになったヒト単一染色体を含むマウス A9 細胞ライブラリーを示した。1 番、5 番、6 番、7 番、10 番、11 番、14 番、15 番、18 番、19 番および 20 番染色体に関しては父および母由来の染色体が分離された。また、これらのライブラリー中の染色体解析では、同一染色体であってもマーカー遺伝子の導入部位は異なっているため、同一クローンから得られたものでないことが明らかである。前述のマウス A9 雑種細胞において、11 番、15 番染色体上に存在する少なくとも数種のヒト刷り込み遺伝子につ

いてはその刷り込み状態が維持されていた。たとえば、D. 考察

11p15.5 領域に位置し母性発現を呈する *H19* および *KVLQT1* 遺伝子, あるいは 15q11-q13 領域に位置し父性発現を呈する *SNRPN* および *IPW* 遺伝子については, それぞれ母方のヒト 11 番染色体, 父方の 15 番染色体を保持する雑種細胞でのみ発現が認められた。また, *H19* 遺伝子のプロモーター領域を含む 5' 領域および *SNRPN* 遺伝子のイントロン 7 領域については父方特異的なメチル化が, 逆に *SNRPN* エキソン 1 領域に存在する CpG アイランドについては母方特異的なメチル化が認められた。また, 少なくとも数ヶ月の継代培養では刷り込み状態には変化がみられないことから, 雑種細胞においてもヒト遺伝子の刷り込み状態は安定に維持されると考えられる。したがって, これらの雑種細胞を用いることによりある遺伝子が刷り込みを受けるのかどうかを容易に知ることができるとともに, これらの染色体を導入し, 刷り込み遺伝子の存在や機能を検索できると考えられる。さらに, 染色体断片としては 9 番染色体の種々の断片を含むライブラリーも上述の研究に加えて作製した (図 2)。

表 1. 親由来の明らかなヒト染色体 1 本を保持するマウス A9 細胞

Human Chromosome	Hybrid clone	Parental origin	Integration site
#1	A9(neo1P)-1	Paternal	ND
	A9(bsr1M)-1	Maternal	1p36.3
#2	A9(bsr1M)-1	Maternal	2p22
	A9(bsr1M)-2	Maternal	2q35
#4	A9(bsr4P)-1	Paternal	4p13
	A9(bsr4P)-2	Paternal	4q23-q24
#5	A9(bsr5P)-1	Paternal	5q34
	A9(bsr5M)-1	Maternal	5q14
#6	A9(neo6P)-1	Paternal	ND
	A9(neo6P)-2	Paternal	ND
	A9(neo6M)-1	Maternal	ND
	A9(nwo6M)-2	Maternal	ND
#7	A9(bsr7P)-1	Paternal	7q22
	A9(bsr7P)-2	Paternal	7q21.2-q21.3
	A9(bsr7P)-3	Paternal	7q32
	A9(neo7M)-1	Maternal	ND
#8	A9(bsr8M)-1	Maternal	8p22
	A9(bsr8M)-2	Maternal	8q24.3
	A9(bsr8M)-3	Maternal	8q23.3
#10	A9(bsr10P)-1	Paternal	10q22
	A9(bsr10P)-2	Paternal	10q21.2-q21.3
	A9(bsr10M)-1	Maternal	10q15.3
#11	A9(bsr11P)-1	Paternal	11q25
	A9(bsr11P)-2	Paternal	11q22.3-q23.2
	A9(bsr11M)-1	Maternal	11q14.3-q22.2
#14	A9(neo14P)-1	Paternal	ND
	A9(neo14M)-1	Maternal	ND
#15	A9(bsr15P)-1	Paternal	15q21.3-q22.2
	A9(bsr15M)-1	Maternal	ND
#18	A9(neo18P)-1	Paternal	ND
	A9(bsr18M)-1	Maternal	ND
#19	A9(neo19P)-1	Paternal	ND
	A9(neo19M)-1	Maternal	ND
#20	A9(bsr20P)-1	Paternal	20q11.23-q12
X	A9(bsrXM)-1	Maternal	Xp11.2

10 年度においては, ヒト染色体を保持するマウス A9 細胞を作製し, 染色体特異的 STS マーカーを用いて親起源の明らかな染色体を保持する細胞クローンを同定した。今回, 単一ヒト染色体ライブラリーは ES 細胞中で極めて安定に機能する。本研究により作製されたライブラリーは, ES 細胞へのヒト染色体の導入が可能になりヒト疾患モデルマウスの作製に大きく貢献する資材になることが期待される。また, 導入染色体が生殖系列に効率良く伝達される一つの条件として, 染色体の大きさが関与していると考えられる。したがって, 上述に示した単一染色体ライブラリーのスクリーニングにおいて断片化ヒト染色体を含む細胞クローンの解析も重要な課題であると考えられる。

今回作製した単一ヒト染色体ライブラリーは, そのヒト染色体の親起源を検索することが可能である。したがって, 一对の相同染色体を父親と母親由来に分離しマウス細胞中に維持するため, 対立遺伝子特異的な遺伝子の発現や DNA のメチル化などの後成的な修飾を容易に検索することが可能になり, ゲノムインプリンティング等の検索にも有用な資材になると考えられる。昨年度は, 5 番, 10 番, 11 番, 15 番染色体に関しては父親と母親由来の染色体を有するマウス A9 細胞が得られており, 今年度はさらに 11 種類の染色体を含む A9 クローンを作製した。これらの資材から新規のインプリント遺伝子が単離され, その詳細な解析が進められている。また, 本研究により作製した親起源の明らかなヒト染色体を含む細胞クローンは, 配偶子形成過程におけるインプリント遺伝子の動的な挙動を観察することが可能になり, ゲノムインプリンティングの分子機構の解明にも重要な資材となることと考えられる。

E. 結論

マウス A9 細胞に親起源の明らかな優性遺伝マーカーで標識した 11 種類 (昨年度のものとおわせると 15 種類) のヒト染色体を導入したライブラリーを作製した。これらはゲノムインプリンティング等の研究に極めて有用な資材である。

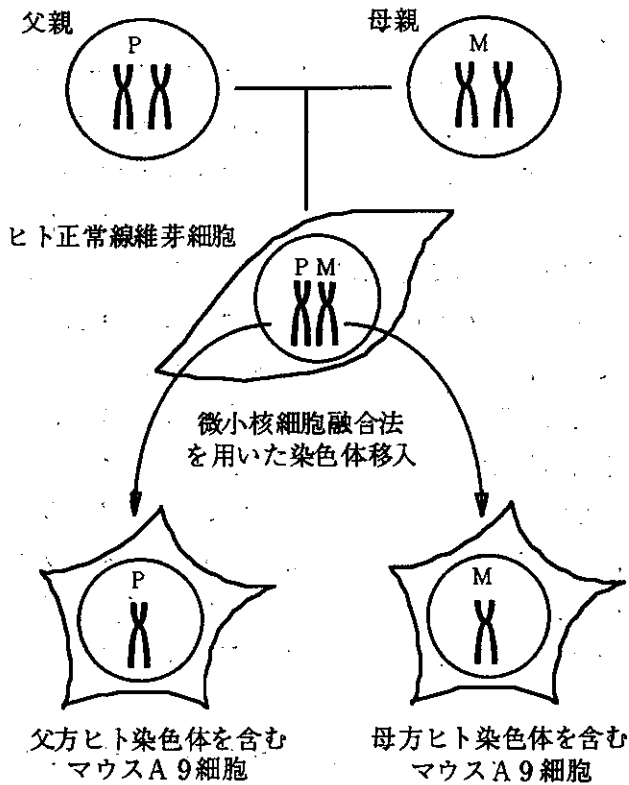


図1



図2 ヒト9番染色体特異的プライマーを用いたPCR解析

F. 研究発表

1. 論文発表

① Mitsuya, K., Meguro, M., Sui, H., Schulz, T.C., Kugoh, H., Hamada, H. and Oshimura, M.: Developmental reprogramming of the human H19

gene in mouse embryonic cells does not erase the primary parental imprint. *Genes to Cells*, 3:245-255, 1998

② Kuroiwa, Y., Shinohara, T., Notsu, T., Tomizuka, K., Yoshida, H., Takeda, S., Oshimura, M. and Ishida, I.: Efficient modification of a human chromosome by telomere-directed truncation in high homologous recombination-proficient chicken DT40 cells. *Nucleic Acids Res.*, 26:3447-3448, 1998

③ Uzawa, N., Yoshida, M.A., Hosoe, S., Oshimura, M., Amagasa, T. and Ikeuchi, T.: Functional evidence for involvement of multiple putative tumor suppressor genes on the short arm of chromosome 3 in human oral squamous cell carcinogenesis. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 107:125-131, 1998

④ Uejima, H., Shinohara, T., Nakayama, Y., Kugoh, H. and Oshimura, M.: Mapping a novel cellular senescence gene to human chromosome 2q37 via irradiation microcell-mediated chromosome transfer. *Mol. Carcinogen.*, 22:34-45, 1998

⑤ Tanaka, H., Shimizu, M., Horikawa, I., Kugoh, H., Yokota, J., Barrett, J.C. and Oshimura, M.: Evidence for putative telomerase repressor gene on the 3p14.2-p21.1 region. *Genes, Chrom. & Cancer*, 23:123-133, 1998

⑥ Nihei, N., Ohta, S., Kuramochi, H., Kugoh, H., Oshimura, M., Barrett,

J.C., Isaacs, J.T., Igarashi, T., Ito, H., Masai, M., Ichikawa, Y. and Ichikawa, T.: Metastasis suppressor gene(s) for rat prostate cancer on the long arm of human chromosome 7. *Genes, Chrom. & Cancer*, 24:1-8, 1998

- ⑦ Kugoh, H., Mitsuya, K., Meguro, M., Shigenami, K., Schulz, T.C. and Oshimura, M.: Mouse A9 cells containing single human chromosomes for the analysis of genomic imprinting. submitted

2.学会発表

- ① 黒岩義巳, 篠原徳之, 野津智美, 富塚一磨, 吉田均, 武田俊一, 押村光雄, 石田功:ト

リ DT40 細胞を用いたヒト染色体の高効率断片化

第 21 回日本分子生物学会年会 (横浜)

1998 年 12 月 16 日

- ② 門田満隆, 篠原徳之, 岡村大治, 髙原昇子, 西原茂城, 吉岡広陽, Thomas C. Schulz, 久郷裕之, 押村光雄:新規のヒト染色体を含む A9 細胞ライブラリーの作製

第 21 回日本分子生物学会年会 (横浜)

1998 年 12 月 19 日

- ③ 井上純, 神田将和, 柏木明子, 久郷裕之, 押村光雄:ヒト 11p15 および 15q11-q13 領域に位置する新規インプリント遺伝子の単離

第 21 回日本分子生物学会年会 (横浜)

1998 年 12 月 19 日