

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) S. Jeong, J. Goto, H. Hashida, T. Suzuki, K. Ogata, N. Masuda, M. Hirai, K. Isahara, Y. Uchiyama, I. Kanazawa: Identification of a novel human voltage-gated sodium channel alpha subunit gene, *SCN12A*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 267: 262-270 (2000).
- 2) J. Koike, A. Takagi, T. Miwa, M. Hirai, M. Terada and M. Katoh: Molecular cloning of *Frizzled-10*, a novel member of the *Frizzled* gene family. *Biochim. Biophys. Res. Com.* 262: 39-43 (1999)
- 3) K. Tominaga, H. Morisaki, Y. Kaneko, A. Fujimoto, T. Tanaka, M. Ohtsubo, M. Hirai, H. Okumura, K. Ikeda, M. Nakanishi: Role of human Dds1(Chk2) kinase in DNA damage checkpoint and its regulation by p53. *J. Biol. Chem.* 274: 31467-31467 (1999).
- 4) N. Ikematsu, Y. Yoshida, J. Kawamura-Tsuzuki, M. Ohsugi, M. Onda, M. Hirai, J. Fujimoto and T. Yamamoto: Tob2, a novel anti-proliferative Tob/BTG1 family member, associates with a component of the CCR4 transcriptional regulatory complex capable of binding cyclin-dependent kinases. *Oncogene* 18: 7432-7441 (1999).
- 5) J. Koike, A. Takagi, T. Miwa, M. Hirai, M. Terada and M. Katoh: Molecular cloning of *Frizzled-10*, a novel member of the *Frizzled* gene family. *Biochim. Biophys. Res. Com.* 262: 39-43(1999) .
- 6) H. Kirikoshi, N. Sagara, J. Koike, K. Tanaka, H. Sekihara, M. Hirai and M. Katoh: Molecular cloning and characterization of human *Frizzled-4* on chromosome 11q14-q21. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 264: 955-961(1999).
- 7) M. Kim, T. Tezuka, Y. Suzuki, S. Sugano, M. Hirai and T. Yamamoto: Molecular cloning and characterization of a novel *cbl*-family gene, *cbl-c*. *Gene* 239:145-154 (1999) .

2. 学会発表

- 1) F. Kasai and M. Hirai: The evolution of human chromosome 2. *British Human Genetics Conference* 1999. (York University, York, Sept. 27-29, 1999)
- 2) 平井百樹：遺伝子研究とチンパンジー、第2回 SAGA シンポジウム「日本のチンパンジーの将来像」(犬山国際観光センター、犬山、1999.11.16)
- 3) 伊関可奈子、肥田宗友、鈴木穰、数藤由美子、菅野純夫、平井百樹：カニクイザルのcDNAをヒトの染色体上にマップする、日本人類学会第53回大会(東京都立大学、東京、1999.11.6-7)
- 4) 笠井文生、平井百樹：ヒト第2番染色体の進化、第15回日本霊長類学会大会(宮崎大学、宮崎、1999.6.18-20)
- 5) 肥田宗友、鈴木穰、菅野純夫、平井百樹：ヒトと他の霊長類の違いをもとめて一全長cDNA配列に基づいたヒトとカニクイザルとの比較研究、日本人類学会第53回大会(東京都立大学、東京、1999.11.6-7)
- 6) 肥田宗友、鈴木穰、日尾有宏、寺尾恵治、平井百樹、菅野純夫、：ヒトとの5'UTRの比較を中心としたカニクイザルの脳部位特異的cDNAライブラリーの解析、日本霊長類学会第50回大会(佐賀医科大学、佐賀、1999.6.19-20)
- 7) 小池潤、森脇淳也、相良憲彦、安彦行人、桐越博之、高木敦司、三輪剛、平井百樹、塩川光一郎、加藤勝：新規*Frizzled*ファミリー遺伝子*Frizzled-10*(*FZD10*)のクローニング、第22回日本分子生物学会年会(福岡ドーム、福岡、1999.12.7-10)
- 8) 肥田宗友、鈴木穰、平井百樹、日尾有宏、伊関可奈子、菅野純夫：オリゴキャッピング法を用いたサル脳部位特異的cDNAライブラリーの作製、およびヒト、マウスとの比較、第22回日本分子生物学会年会(福岡ドーム、福岡、1999.12.7-10)
- 9) 肥田宗友、鈴木穰、平井百樹、寺尾恵治、菅野純夫、：オリゴキャッピング法を用いたサル脳領域特異的cDNAライブラリーの作製および解析、日本人類遺伝学会第44回大会(東北大学、仙台、1999.11.16-18)

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

埼玉医科大学 第二生化学 講師 奥田晶彦

昨年クローン化した性腺刺激ホルモン放出ホルモンをコードする遺伝子をサブクローニングし、その遺伝子の詳細な制限酵素地図を作成した。さらに、新規クローン分離の一環として 129 マウスゲノムライブラリーから、初期胚特異的転写因子である Sox-2 をコードする遺伝子をクローン化し、サブクローニングの過程を経て、制限酵素地図を作製した。また、この遺伝子が初期胚を反映する胚性幹細胞で発現する遺伝子なので、その発現を規定しているエンハンサーを同定することはターゲティングベクター、特に enhancer-less のターゲティングベクター作製において重要な情報になると考えられる。それ故、その方針で研究を進め、転写開始点より上流約 4kb の位置にエンハンサーを同定した。また、今年も、これらの研究と並行して、既に 129 マウスゲノムライブラリーより各種遺伝子をクローン化されている研究者をコンピューターを用いて検索し、それら、クローン化された遺伝子を供給していただけるように依頼し、現在までに heat shock factor 3 等 3 つのクローンを入手した。

A 研究目的

ヒトの全ゲノムの塩基配列を決定しようとするヒトゲノム計画がもう間もなく完了しようとしている。そのことにより、30 億塩基の配列及び、その中に含まれる約 10 万個の遺伝子のカタログが出来上がることになる。但し、それで、ヒトに関する全ての生命現象が明らかにされるわけではない。事実、私たちは酵母の全ゲノム配列を既に知っているのである。この酵母ゲノムプロジェクトにより新たに見つかった遺伝子が約 3000 個あったわけだが、その中の約半数は遺伝子の塩基配列という情報だけでは全く機能の予想さえ付かない状況に留まっている。酵母でさえ、こんな状況なのだから、ゲノムのサイズが約 20 倍大きいヒトの場合だとさらに複雑な状況に陥ること

が容易に想像できる。従って、ヒトゲノム全体の塩基配列決定されても、その情報を有効に利用するための相当な努力が必要であると考えられる。その為には分子生物学的あるいは生化学的な遺伝子、あるいは遺伝子産物の機能解析が重要になる。それと同時に、ある特定の遺伝子を破壊し、そのことにより生ずる異常を観察することによりその遺伝子の本来の役割を知ろうとするジーンターゲティング法が今にもまして威力を発揮すると考えられる。そこで、私は、この手法で用いられる 129SV マウスのゲノム遺伝子をできる限り多くクローン化し、多くの研究者に供給するという体制を作るということを目的に研究を行うことにした。

B 研究方法

- 1) 昨年、転写因子 UTF1 と EFP をコードするゲノム遺伝子の制限酵素地図を作製したのと同様に今年は性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 遺伝子の制限酵素地図を作製する。
- 2) 初期胚特異的転写因子 Sox-2 をコードする遺伝子をクローン化し、その遺伝子の制限酵素地図を作製する。
- 3) Sox-2 遺伝子の発現を規定するエンハンサーを胚性腫瘍細胞を用いたトランスフェクション法により同定する。
- 4) 昨年同様、既に、129SV マウス由来の各種ゲノム遺伝子をクローン化している研究者をコンピューター検索によりリストアップし、それらの研究者の方々にゲノム遺伝子を供給していただけるように依頼し、かつ、実際に送られてくるクローン DNA を管理する。

C 研究結果

- 1) 昨年分離した GnRH 遺伝子を含むファージから DNA を大量に調製し、インサート部分をプラスミドベクターに組み込み、さらに、個々のプラスミドの制限酵素地図を作製することにより GnRH 遺伝子全体の制限酵素地図を作製した。
- 2) Sox-2 cDNA をプローブとして、129 マウスゲノムライブラリーをスクリーニングし、50万個のプラークの中から2つ

シグナルを与えるクローンを分離した。ファージ DNA の調製、インサートのプラスミドベクターへのサブクローニングの後、塩基配列を決定することにより得られた2つのクローンいずれも Sox-2 遺伝子を含むものであることがわかった。さらに、それぞれのクローンに関して詳細な制限酵素地図を作製した。

- 3) Sox-2 遺伝子の 5'及び3'領域の一部をルシフェラーゼ遺伝子上流にチミジンキナーゼ遺伝子プロモーターを持つレポーターに挿入し、それぞれの DNA 断片の遺伝子発現レベルにおける影響を胚性幹細胞を用いたトランスフェクション/レポーターアッセイにより検討した。すると、それらの解析により、遺伝子上流約 4kb 付近にプロモーターを活性化する能力を有する領域があることが明らかになった。しかも、その活性化は胚性幹細胞の未分化な状態に特異的に機能し、それらの細胞に分化を誘導すると機能を失うことから、同定した領域が Sox-2 遺伝子の in vivo での発現を規定しているエンハンサーである可能性が高いと考えられる。
- 4) 昨年同様、ノックアウトマウスを用いた研究で既に成果を挙げられている国内 22 の研究グループにその時に用いたゲノム遺伝子を供給していただけるよう依頼した。現在のところ、3つのクローン：HSF3, PD-1, RBP-J が送られてき

た。昨年送付されてきた IL-6 遺伝子と等5つのクローンと共にそれらの DNA を管理している。

D 考察

ポストゲノム時代を向かえようとしている現在、ジーンターゲット法を用いた解析が今にもまして威力を発揮するようになると考えられる。それ故、私は、全国の研究者にとってそのような解析が少しでもスムーズにできるように、私自身、新規のゲノム遺伝子をクローン化すると同時に、他の研究者によって既にクローン化されているゲノム遺伝子に関して供給していただくということによりできる限り多くの遺伝子を収集し、将来的にはそれらの方法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ということを目標に研究を着手した。私自身がクローン化したのは UTF1, EFP, GnRH, Sox-2 の4クローンであり、この他、DNA ポリメラーゼ α 等の遺伝子をクローン化することを試みたが失敗に終わってしまった。また、1998年、1999年とコンピューターによる検索により、129マウス由来のゲノム DNA を既にクローン化している研究グループにそれらの DNA クローンを供給していただけるように依頼したが、合計8クローン入手するにとどまってしまった。その原因として考えられることは私の始めたプロジェクトの主旨がうまく伝わらなかったからであろうと考えられる。但し、私がクローン化したも

のと入手したものの合計12の遺伝子に関してはこのプロジェクト終了後も保管していこうと考えている。

E 結論

この班の3年間の間、新規ゲノム遺伝子として転写因子である UTF1, EFP, 及び Sox-2 を、また、ホルモンをコードする GnRH を 129SV ゲノムライブラリーよりクローン化した。また、全国の研究者より heat shock factor 3 等全8遺伝子を入手した。これら全ての DNA に関して今後も管理していこうと考えている。

F 研究発表

1 論文発表

Nishimoto, M., Fukushima, A., Okuda, A., Muramatsu, M. The gene for the embryonic stem cell coactivator UTF1 carries a regulatory element which selectively interacts with a complex composed of Oct-3/4 and Sox-2. *Mol. Cell. Biol.* 19, 5453-5465, 1999

Fukushima, A., Okuda, A., Nishimoto, M., and Muramatsu, M. Carboxy-terminally truncated form of a coactivator UTF1 stimulates transcription from a variety of gene promoters through the TATA box. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258, 519-523, 1999

Yogosawa, S., Kakuyama, K., Kawata, T., Makino, Y., Inoue, S., Okuda, A., Muramatsu, M., and Tamura, T. Induced

expression, localization, and chromosome mapping of a gene for the TBP-interacting protein 120A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266, 123-128, 1999

2 学会発表

マウス初期胚特異的転写コアクティベーター-UTF1 は Oct-3/Sox-2 複合体の下流に位置する。

西本正純、村松正實、奥田晶彦

第58回日本癌学会 平成11年9月29日から10月1日

UTF1 遺伝子のエンハンサーエレメントにおける Oct-3 の特異的結合能は POU-homeo domain により規定される。

西本正純、福島亜紀子、村松正實、奥田晶彦

第22回日本分子生物学会 平成11年12月7日から12月10日

初期胚特異的転写因子 oct-3 における認識配列の多様性とその生理的意義

福島亜紀子、西本正純、村松正實、奥田晶彦

第22回日本分子生物学会 平成11年12月7日から12月10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、これまでに作製した、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 細胞に加え、6 番、7 番、19 番、21 番染色体クローンを作製した。さらに、これらのライブラリーから 6 番、7 番、11 番、21 番染色体及びその種々の断片を ES 細胞へ導入した。21 番に関しては、ES 細胞より 100% 近くのキメラマウスも作製できたことより、ダウン症などトリソミー症候群のモデルマウス作製やトリソミーになることによる二次的な組織特異的遺伝子発現の変化などを検索する系として応用できると考えられる。

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。ローターを用い室温で 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。同様の技術を用いて、ES 細胞へヒト染色体移入を 6 番、7 番、11 番、21 番について行

い 21 番についてはキメラマウスの作製を行った。ヒト染色体がマウス組織中において組織特異的発現パターンを示すことも明らかにした。

C. 研究結果

表 1 にこれまでに作製した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, 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, ヒト 21 番染色体を ES 細胞に導入し, 種々の 21 番染色体領域を含む ES 細胞を作製した (図 2)。これらの ES 細胞を用いキメラマウスを作製できることも示された。

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
#7	A9(nwo6M)-2	Maternal	ND
	A9(bsr7P)-1	Paternal	7q22
#8	A9(bsr7P)-2	Paternal	7q21.2-q21.3
	A9(bsr7P)-3	Paternal	7q32
	A9(neo7M)-1	Maternal	ND
	A9(bsr8M)-1	Maternal	8p22
#10	A9(bsr8M)-2	Maternal	8q24.3
	A9(bsr8M)-3	Maternal	8q23.3
	A9(bsr10P)-1	Paternal	10q22
#11	A9(bsr10P)-2	Paternal	10q21.2-q21.3
	A9(bsr10M)-1	Maternal	10q15.3
#14	A9(bsr11P)-1	Paternal	11q25
	A9(bsr11P)-2	Paternal	11q22.3-q23.2
#15	A9(bsr11M)-1	Maternal	11q14.3-q22.2
	A9(neo14P)-1	Paternal	ND
#18	A9(neo14M)-1	Maternal	ND
	A9(bsr15P)-1	Paternal	15q21.3-q22.2
#19	A9(bsr15M)-1	Maternal	ND
	A9(neo18P)-1	Paternal	ND
#20	A9(bsr18M)-1	Maternal	ND
	A9(neo19P)-1	Paternal	ND
#21	A9(neo19M)-1	Maternal	ND
	A9(bsr20P)-1	Paternal	20q11.23-q12
X	A9(neo21M)-1	Maternal	21q22.2
	A9(bsrXM)-1	Maternal	Xp11.2

D. 考察

3 年間で 16 種の染色体について, 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。これらの, 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ダウン症などトリソミー症候群の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。さらに *in vitro* 分化系などを用いて染色体トリソミーによって生じる遺伝子変化を検索することができると考えられる。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ため, 我々はトリ pre-B 細胞中でヒト染色体改変を用い, それを ES 細胞へ導入する技

術も確立した。

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料になると考えられる。これらの資料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料となること考えられる。

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 16 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料である。また、トリソミー症候群のモデルマウスの作製やトリソミーになることによって間接的に発現の変化が生じる遺伝子の検索に応用できると考えられる。

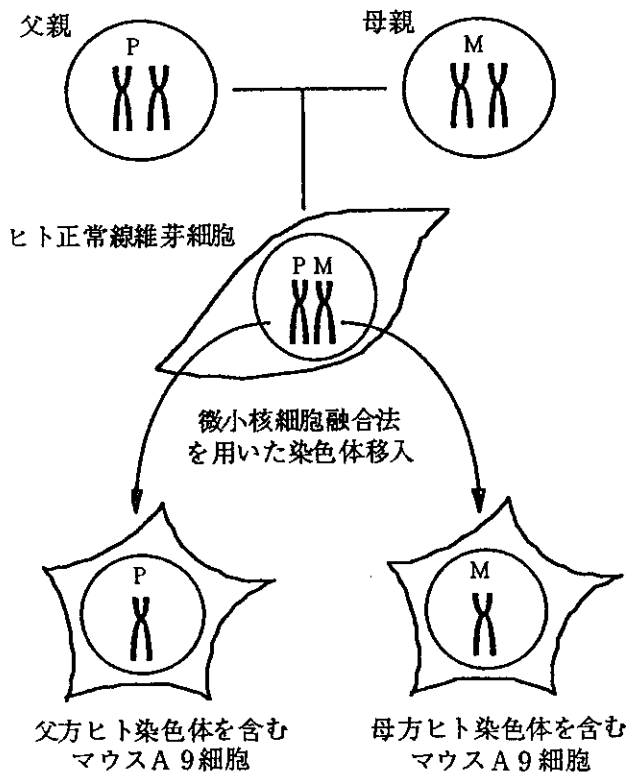
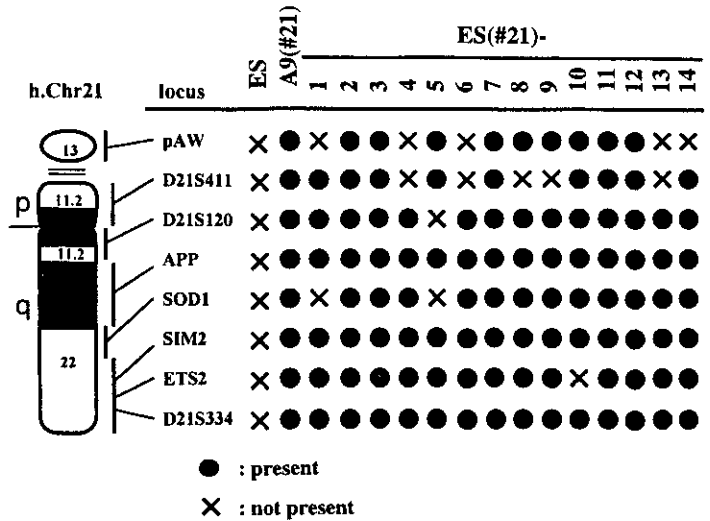


図 1

図 2. PCR解析を用いたES細胞へ導入されたヒト21番染色体領域の同定



F. 研究発表

論文発表

- ① 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. DNA Res., 6: 165-172, 1999
- ② Mitsuya, K., Meguro, M., Lee, M.P., Katoh, M., Schulz, T.C., Kugoh, H., Yshida, M.A., Miikawa, N., Feinberg, A.P. and Oshimura, M.: LIT1, an imprinted antisense RNA in the human KvLQT1 locus identified by screening for differentially expressed transcript using monochromosomal hybrids. Hum. Mol. Genet., 8:1209-1217, 1999
- ③ Lee, M.P., DeBaun, M.R., Mitsuya, K., Galonek, H.L., Brandenburg, S., Oshimura, M. and Feinberg, A.P. : Loss of imprinting of a paternally expressed transcript, with antisense orientation to KVLQT1, occurs frequently in Beckwith-Wiedemann syndrome and is independent of IGF2 imprinting. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 96: 5203-5208, 1999
- ④ Tomizuka, T., Shinohara, T., Yoshida,

trans-chromosomal mice: Maintenance of two individual human chromosome fragments containing immunoglobulin heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 97: 722-727, 2000

学会発表

①ゲノムリプログラミング・ゲノムインプリンティング・ES細胞, 日本遺伝学会 熊本 平成10年5月, 多田政子, 多田高, 前川真治, 押村光雄

②マウス EG: embryonic germ 細胞はヒト PEG1/MEST 遺伝子のインプリント書き換えに必要な因子を持っている, 日本分子生物学会 横浜 平成10年12月, 多田高, 岡村大治, 多田政子, 前川真治, 井上純, 押村光雄

③ニワトリ pre-B 細胞株 DT40 を用いた染色体改変, 日本分子生物学会 横浜 平成10年12月, 野津智美, 堀家真一, 田中宏美, 久郷裕之, 清水素行, 押村光雄

④トリ DT40 細胞を用いたヒト染色体の高効率断片化, 日本分子生物学会 横浜 平成10年12月, 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

⑤導入費と染色体および安定性の検索, 日本分子生物学会 横浜 平成10年12月, 嵩原昇子, 山内香織, 富塚一磨, 石田功, 押村光雄

⑥有袋類及び鳥類細胞株における父型ヒト H19 遺伝子の可逆的な活性化, 目黒牧子, 三ツ矢幸造, 福原武志, 久郷裕之, 押村光雄

⑦新規のヒト染色体を含む A9 ライブラリーの作製, 日本分子生物学会 横浜 平成10年12月, 井上純, 前川真治, 三ツ矢幸造, 目黒牧子, 門田満隆, 篠原徳之, 岡村大治, 嵩原章子, 西原茂樹, 吉岡広陽, Thomas C. Schulz, 久郷裕之, 押村光雄

⑧DT40 細胞を用いたヒト3番染色体の改変, 第58回日本癌学会 広島 平成11年9月, 野津智美, 田

中宏美, 久郷裕之, 清水素行, 押村光雄

⑨Chimeric mice containing a human chromosome 21, American Association of Human Genetics Annual Meeting, San Francisco, Oct. 1999, Oshimura, M., Shinohara, T., Tomizuka, K., Miyabara, S., Takehara, S., Kazuki, Y., Funaki, K., Ohguma, A. and Ishida, I.

⑩ヒト11番染色体を保持するマウスA9細胞内でのヒトインプリント遺伝子の複製タイミングの解析, 第44回日本人類遺伝学会 仙台 平成11年11月 前川真治, 久保田智香, 難波栄二, 押村光雄

⑪A novel in vitro system for genomic imprinting studies, International Genomic Imprinting Meeting, Dublin, Aug., 1999, Mitsuya, K., Meguro, M., Kohda, M., Kashiwagi, A., Shinohara, T., Schulz, T.C., Kugoh, H. and Oshimura, M.

⑫Towards mouse transgenesis using a translocated human chromosomal fragment, 日本分子生物学会 福岡 平成11年12月, Schulz, T.C., Takehara, S., Kotobuki, N., Uejima, H., Niwa, H. and Oshimura, M.

**「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」
総合研究報告書**

主任研究者・橋本雄之

(国立感染症研究所)

平成12年3月

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）総合研究報告書
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

課題番号：H10-ゲノム-041

主任研究者：橋本 雄之 国立感染症研究所遺伝子資源室長

1) ヒト完全長 cDNA として 1,377 クローンをバンクに登録し、供給可能とした。また、マウス脳 cDNA 5,323 クローンのシーケンスを DNA データベースに登録し、供給可能とした。2) カニクイザル脳ライブラリーから約 6,000 クローンの 5'側部分配列決定を行い、完全長及び新規のものを選択しつつある。3) カニクイザル脳 cDNA クローン約 100 について染色体上にマップし、ヒトとのシンテニー関係を確定した。4) 129SV マウスのゲノム DNA ライブラリーから転写因子 EFP 及び UTF1 など 5 遺伝子のゲノム DNA をクローン化した。5) 微小核細胞融合法により ES 細胞へも移入できる形にしたヒト単一染色体保持雑種細胞として 1500 マウス A9 細胞クロンを分離し、15 種類の染色体の含むクロンを同定した。また、4 種については各々を導入したマウス ES 細胞を樹立した。

分担研究者

平井 百樹 東京大学大学院理学系 教授
奥田 晶彦 埼玉医科大学 講師
菅野 純夫 東京大学医科学研究所 助教授
押村 光雄 鳥取大学医学部 教授
榊 佳之 東京大学医科学研究所 教授
(第 1, 2 年度のみ)

A. 研究目的

ヒトゲノム解析プロジェクトとその一環として発現遺伝子部分 (cDNA 断片、expressed sequence tag, EST) のクローン化が大規模に進められ、130 万以上がデータベースに登録され、約 8-10 万といわれる遺伝子数に匹敵するクロンが分離されている。また、ヒト全塩基配列決定は 2003 年には完了することが計画されている。しかし、遺伝子機能解明は並行して進められたとしても、全体としては残された課題となる。したがって、これまでに日本でも分離された数万の EST クロンを収集し、保存・供給することは依然としてゲノムの遺伝子部分の確定とその機能解明のために必要である。そこで新たに完全長 cDNA クロンの分離を試みるとともに、それら

を細胞で発現できる形として、産物の機能、発現制御等の研究の資源とする。また、個体レベルで機能を探るために必要な遺伝子を選択し、129SV 系統のマウス ES 細胞のゲノム DNA をクローン化して、供給できるようにする。さらに、遺伝子群が連関して発現することにより、その機能が発揮されるような染色体領域について、ES 細胞などへも特定染色体断片を移入するための材料を開発する。これによって疾病関連遺伝子の同定から機能解明、さらにその疾病の成因解明そして診断、治療に結び付く研究の発展に資することを目的とする。これにより遺伝子治療など先端的医療の基盤づくりの一翼を担い、もって国民の保健・医療の一層の向上をめざす一環をなす。

B. 研究方法

1) 各種 cDNA ライブラリーからの多数クロンを増幅・保管し、必要なものは部分塩基配列を決定する。シーケンスのホモロジーサーチを自動的に行えるプログラムを利用して、その結果をデータベースに登録し、バンクから供給可能とする。

2) ヒト消化管粘膜、サル脳 各部などの組織について、オリゴキャップ法により完全長 cDNA ライブラリーの作製を行う。その cDNA クローンの1パス塩基配列決定を行い、得られた完全長 cDNA クローンの登録をめざす。3) 染色体上の位置の未確定なヒト及びマウスクローンについて蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) により、その位置を決定する、また、霊長類 cDNA のマッピングを行ない、ヒトでの相同遺伝子のポジショナル・クローニングの基盤とする。4) マウス 129SV 系統のゲノム DNA ライブラリーを作製し、転写関連因子や DNA の複製に関与している多くの遺伝子のゲノム DNA クローンを分離する。

5) 効率良く染色体を細胞移入するために、微小核細胞融合法によりヒト単一染色体保持細胞を作製し、これまでにヒト単一染色体を含む 1500 マウス A9 細胞クローンを得た。それぞれから DNA を抽出するとともに、FISH 法により染色体種を確認し、導入可能な染色体を選択する。

(倫理面への配慮)

cDNA ライブラリー原材料は医療機関に属する医師により、本人または遺族の書面による許諾を得て、採取されたもので、コード化され個人識別情報は研究申請者に開示されない。さらに、作製に当たって複数の材料を使用するなどの手段で保護を行う形を取っている。

C. 研究結果

1) 成人心臓由来の EST 約 3,000 のホモロジー検索及び完全長となる 298cDNA を選別した。5'側部分配列決定をしたヒト小腸粘膜由来 cDNA クローン 3,253 を収集し、完全長 cDNA として 569 クローンおよびヒト大腸粘膜由来完全長 cDNA クローン 3,505 からの 510 をあわせてバンクに登録

し、供給可能とした。2) マウスについて脳 cDNA ライブラリーからの約 6,000 コロニーの寄託を受け、5'側シーケンシングを行い、5323 クローンを公共 DNA データベースに登録した。そのうち、新規のものを中心に全長シーケンシングを行い、約 50 クローンについて完了している。このマウス脳 cDNA クローンはここ1年で100人以上の国内外の研究者に200クローンを分与した。また、マイクロアレイ作成のため、4グループに2-3,000クローンをセットで供与した。さらに、米国でシーケンスされている菅野マウス腎臓、肝臓、胚 cDNA クローン約 24,000 を収集し、マイクロアレイ用にクラスター分類を行った。3) オリゴキャップ法により作製したヒト消化管粘膜や骨格筋の cDNA ライブラリー由来のクローン約 8,000 の5'側部分配列決定を行った。4) カニクイザル脳を材料として、以下の11種類の完全長 cDNA ライブラリーを作製した。すなわち、全脳、大脳皮質、頭頂葉、側頭葉1, 2, 前頭葉、中脳、脳幹、小脳皮質、延髄、下垂体である。各ライブラリーよりクローンを分離し、現在までに約 5,000 部分配列決定を行い、約 100 の新規遺伝子候補を見いだした。さらに、三和化学研究所保有のチンパンジー1個体の背部の皮膚組織を、健康に影響ないように注意して切除し、オリゴキャップ法により cDNA ライブラリーを作製した。5) FISH 法により、ヒト心臓、小腸由来の完全長 cDNA 約 80 をマップした。カニクイザルの脳の部位特異的完全長 cDNA のうち、ヒトゲノムデータベースにある相同遺伝子 66 について非翻訳領域(5' UTR)と翻訳領域のうちの5'側塩基配列を比較した。また、未知の約 100 クローンを選び、FISH 法によりカニクイザルとヒト染色体上にマップした。6) 129SV 系統のマウスのゲノム

DNA ライブラリーを作製した (2×10^6 primary pfu)。ライブラリーから転写因子 EFP 及び UTF1 など 4 マウス遺伝子を分離し、EFP と UTF1 についてはターゲティングベクターを作製した。さらに、ノックアウトマウスを作製した国内の 59 研究グループに寄託依頼をし、IL6, Stat6, XP, VDR, CAFA1 など 8 クローンを入手した。7) マウス ES 細胞で強い発現を示すプロモーターを有する neo あるいは bsr 遺伝子をヒト繊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、マウス ES 細胞への導入可能であり、ヒト染色体の親起源を明らかにすることができることにある。作製したライブラリーより染色体特異的 STS マーカー及び染色体 FISH を用いて 1、2、4、5、6、7、8、10、14、15、18、19、20、21 番および X 染色体を含む A9 細胞を同定した。さらに、これらのライブラリーから 6、7、11 及び 21 番染色体及びその種々の断片を導入した ES 細胞を樹立した。

D. 考察

完全長 cDNA はそれぞれ千のオーダーであり、目標とすべき遺伝子数からすると本研究での設定を限定する必要があった。新規のものはマウス、サルで 600 を越え、全長決定されればこの数でも意味があるといえる。マウスでは約 120 を年度内に終える。ヒト単一染色体保持雑種細胞は全種には及ばないが、ほぼ目標を達成した。

本研究ではポストシーケンス時代に向けて、重要な研究資材を提供する基盤をつくりつつある。特に、完全長 cDNA クローンを整備して、機能を探ることは疾患の成立を研究するうえで有効であり、EST のク

ラスター数が遺伝子数に匹敵するようになった現段階でも世界的に注目されているものである。さらに、個体レベルの機能解析に向けて、マウスの DNA クローン、ES 細胞にも導入しうるヒト染色体材料を作製しつつあることは細胞レベルの解析の限界を越える研究資材を提供する点で重要である。

我々はマウスおよびサルでデータベースにない完全に新規の cDNA クローンを 500 以上得ており、これらの全長を決定すれば新規の遺伝子機能を調べる上で価値のあるものとなる。また、既知のものを含め、サル完全長 cDNA をカタログ化すればヒトのモデルとして機能を探る上で有用であるので、数万のクローン分離をめざして今後も続ける予定である。

E. 結論

1) ヒト完全長 cDNA として 1,377 クローンをバンクに登録し、供給可能とした。また、マウス脳 cDNA ライブラリーからの 5,323 クローンのシーケンスを DNA データベースに登録し、供給可能とした。2) カニクイザル脳ライブラリーから約 5,000 クローンの 5'側部分配列決定を行い、完全長のものをバンクから供給可能としつつある。3) カニクイザル脳 cDNA クローン約 100 について染色体上にマップし、ヒトとのシンテニー関係を確定した。4) 129SV マウスのゲノム DNA ライブラリーから転写因子 EFP 及び UTF1 など 4 遺伝子のゲノム DNA をクローン化した。5) 微小核細胞融合法により ES 細胞へも移入できる形にしたヒト単一染色体保持雑種細胞として 1500 マウス A9 細胞クローンを分離し、16 種類の染色体の含むクローンを同定した。

F. 研究発表

1. 論文発表

*原著論文による発表 2 2

*それ以外の（レビュー等）の発表 1 2

*そのうちの主なもの

1) 橋本雄之：JCRB 遺伝子バンク、pp.26-30, pp71-77. 「細胞バンク・遺伝子バンク」情報検索と研究資源の入手法（日本組織培養学会細胞バンク委員会編）、1998年、共立出版

1) Suzuki, Y., Yoshitomo, K., Maruyama, K., Suyama A., Sugano, S.: Construction and characterization of a full length-enriched and a 5'-end-enriched cDNA library. *Gene* 200: 149-156, 1997.

2) Kusuda, J., Hirai, M., Toyoda, A., Tanuma, R., Kitabayashi, A., & Hashimoto K.: Cloning and chromosomal localization of a paralogue and a mouse homologue of human transaldolase gene. *Gene* 209, 13-21 (1998).

3) Kugoh, H., Mitsuya, K., Meguro, M., Shigenami, K., Schulz, T.C. and Oshimura, M.: Mouse A9 cells containing single human chromosomes for analysis of genomic imprinting. *DNA Res.*, 6:165-172, 1999

2. 学会発表

*口頭発表（国内） 5 4

*口頭発表（海外） 4

G. 知的所有権の出願・取得状況

なし