

## 研究要旨

最近の発生工学的な技術の進歩にともない、霊長類のモデル動物としての重要性が高まっている。したがって、遺伝子の機能解析と医療面での遺伝子技術の利用の研究基盤として、霊長類の完全長 cDNA のクローニングとその解析の推進が必要である。国内では、実験用霊長類として カニクイザルのコロニーが確立し、疾患モデルのための多様な基礎データが蓄積している。そして本研究事業によりすでに完全長 cDNA の解析は急速に進んでいる。また、ヒトに近縁の霊長類であるチンパンジーについての研究も待たれている。このような状況を踏まえ、本研究ではカニクイザルとチンパンジーの遺伝子位置情報をゲノム・データベースに加え、機能解析の基礎データとすることを目的としている。このために以下の研究を行った。まず第一に、染色体のシンテニー関係をカニクイザルとヒト間で確立し、将来のポジショナルクローニングの基盤を整備した。第二に、従来困難であったチンパンジーについても、皮膚、脳などの cDNA ライブラリーが作製できたので、これを解析した。

### A. 研究目的

約 1 年前に、ヒト全ゲノムの塩基配列概要が公開されて以来、遺伝子の機能解析やゲノムから読み取るヒトの生物学的特性の解明に関する研究が推進されている。このようなゲノム研究の流れと呼応し、最近では、発生工学的な研究の進展も著しく、発生過程における遺伝子発現についてや再生医療についての生命科学を大きく変えようとしている。しかしながら、最近、ヒト ES 細胞作製と利用に関する一種の規制緩和があったとはいえ、ヒトに関しては、倫理面の問題やインフォームドコンセント (IC) の問題など、今後の研究推進には大きな障壁が存在する。この点で、ゲノムの相同性の高さにもとづく、モデル動物としてのサル類を対象にした研究の重要性が高まっている。サル類では、受精卵の採取などにつ

いては IC などの問題がなく実施できる。ヒトで採取困難な組織・器官での遺伝子発現の解析を行うには、サル類での cDNA の収集が有効であろう。また、ヒトでは発現が弱くサル類で発現が強いような遺伝子については、サル類での cDNA を手がかりに探索することが期待される。すでにマカクでの ES 細胞の作製が行われ、いま、チンパンジーでもその試みは始まっている。このような視点からみて、モデル動物としてのカニクイザルとチンパンジーの価値は極めて高い。本研究事業の一環として、カニクイザルのオリゴキャッピング法により得られた完全長 cDNA の解析が進んでいる。MHC を始め、その遺伝的近縁性から重要な研究リソースの一つと考えられるチンパンジーの研究については、これまで困難点があり、手がつけられなかった。しかし、昨年度末より、バイオブシーならびに病死個体の迅速処理による新鮮組織採取

が可能となり、これを用いた遺伝子解析が開始された。

サル類で得られたヒトでの未知配列に関しては、新規遺伝子の発見につながる。そしてそのポジショナルクローニングを可能とする染色体位置情報は基盤として重要である。ところが、最近では、国際コンソーシアムによるゲノムマップと、セセラ社のそれとでは、詳細に調べるとかなりの不一致があることが分ってきている。近接した1メガベース以内での位置の反転（逆位）などは、情報処理上のバグとして考えられるが、幾つかの領域については、数十メガベースを隔てて大きな領域の位置が入れ代わっている例などがある。この違いを埋める作業は進んでいる。しかし、個々のクローンの *in silico* mapping を下敷きにしてポジショナルクローニングを行うことには危険性がある。このことを踏まえ、ヒトの染色体特異的プローブを用いて、ゲノムの全体的対応関係を染色体レベルで確認することを行った。

カニクイザルは、国内で医学実験用モデル動物として確立し、十分な医学生物学的基礎データが蓄積している。しかし、代謝系や免疫系に関する多少の隔たりから、さらにヒトと近縁のモデル、すなわちチンパンジーの利用も求められてきた。従来は、希少動物であるチンパンジーの利用の困難さが指摘されてきた。本研究では、いわゆる非侵襲的な実験のみ許すという規範にのっとり、軽微なバイオプシーによる組織採取、ならびに事故や疾患で死亡した個体よりの迅速な組織採取をとおして、cDNA ライブラリーを作製し解析することも大きな目的としてきており、実際にそれを可能とした。

以上のような状況を踏まえ、本研究では、具体的には、以下の2項目について研究することを目的とした。(1) M-FISH 法

によりヒトとカニクイザルとのゲノム比較をおこなう。これにより両種の染色体構成の対応を明らかにする。これに基づきカニクイザルの新規遺伝子候補の 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。(2) チンパンジーの皮膚と脳の cDNA の解析を進める。

## B. 研究方法

(1) カニクイザルとヒト染色体のシンテニー：現在では、ヒトの塩基配列に関するデータベースには、その配列の染色体位置も含まれている。したがって、カニクイザルの塩基配列データをもとにして、その相同配列のヒト染色体上の位置を知ることには、容易である。しかしながら、カニクイザルの核型の基準が確立していないため、その配列のカニクイザル自身の染色体上の位置情報が確実ではない。したがって、cDNA をプローブとして染色体上にハイブリダイズさせて位置決めをする、FISH 法による直接的な方法を行うにせよ、ヒトとの対応を求める上では不確定要素がからんでくる。これを解決するために、染色体のシンテニー関係を明らかにすることがまず重要である。そこで本研究では、ヒト23対の染色体をそれぞれ異なった蛍光標識で色違いに検出する FISH 法 (M-FISH) 法を応用して、染色体の対応関係を求めることとした。従来の1染色体ごとの相同染色体の決定で用いられているペインティング法では、染色体特定が確実ではない。

(2) チンパンジーの皮膚と脳の cDNA の解析：昨年度、三和化学研究所保有のチンパンジー 19 歳雄 1 個体の背部の皮膚組織を得た。また 11 歳雌の病死個体について迅速に脳などの組織を得た。これを材料にして、オリゴキャッピング法により得た

全長 cDNA クローンを調べた。約 4000 配列について、5'側の 400 塩基以上についてシーケンシングを行った。その結果について、既存の塩基配列データベース (Human RefSeq mRNAs, Human ESTs, Human genome working draft sequence, Gene Ontology) と比較した。チンパンジーの遺伝子の塩基配列レベルでの近縁性を求めるため、カニクイザル (NIID 5'-ESTs)、マウス (RefSeq mRNAs) についても比較解析した。

### C. 研究結果

(1) カニクイザルとヒトの染色体のシンテニー: M-FISH法により、ヒトの第 2 番染色体にはカニクイザルの 2 対の染色体が対応すること、カニクイザルではヒト 7 番と 21 番、14 番と 15 番、20 番と 22 番が融合した染色体があること、それ以外の染色体については、両種間で 1 対 1 に対応すること、がわかった。これにより、ヒト ( $2n=46$ ) とカニクイザル ( $2n=42$ ) の染色体数の違いが説明できる。従来のペインティング法によると、介在的な再編成が示唆されていたが、それは否定され、開裂、あるいは端部融合により生じたものであり、両種間の進化過程での染色体再編成は意外に単純であることがわかった。このことは、比較マップが容易であるばかりでなく、ゲノム構成そのものの保存性を示唆するものである。

(2) チンパンジーの完全長 cDNA の解析: 皮膚ではケラチン系 (1, 2A, 5 など) のクローンが多く得られた。組織特異的発現の反映と考えられる。in silico mapping によるヒト染色体上の位置の分布をみると、ヒト RefSeq の分布と大きな隔たりはなかった。ヒト相同遺伝子との塩基配列の一致度の解析は、以下のようにした。すな

わち、1 遺伝子あたり 3 配列以上見いだされたものにつきコンセンサス配列を作成し、領域 (5'-UTR, CDS, 3'-UTR) ごとの比較を行った。最新のデータでは、230 遺伝子についての比較が可能となっている。これによれば、5'-UTR、CDS、3'-UTR での一致度は、それぞれ 98.7%、99.4%、98.31%であった。mRNA の 5'-側のヒトの相同配列との比較で、一致率を横軸にした分布を示す (図 1)。一致率が 95%以上のものがほとんどで、分布の tail は 96%程度で収束する。予測されたように、この分布はゲノム配列での場合 (Fujiyama et. Al., 2002) とは大きな対比を示す。

全体の約 1% は、データベース上一致する配列のない、未知の配列 (新規遺伝子候補) であった。これらの配列に関しては、3'-UTR までの全塩基配列を解読している。たとえば 1 クローンについては、他の霊長類 (ゴリラ、オランウータン、カニクイザル、リスザルなど) についての相同配列の比較も行ったところ、ヒトでのみ膜貫通領域が欠損する蛋白をコードしていることが予測された。

これらの情報については、データベース化して公開している (<http://pri.biol.s.u-tokyo.ac.jp/>)。

### D. 考察

最近、オリゴキャッピング法を用いた完全長 cDNA のリソースとしての重要性がますます評価され、我が国が中心となり FL (full-length) cDNA の国際解析プロジェクトが立ちあげられつつある。塩基配列データからのアノテーションを行ううえで、特に霊長類のデータは今後ますます重要になるとおもわれる。チンパンジーとカニクイザルにおける遺伝子のヒトとの塩基配列の相同性の高さは、これらサル類がヒトの

遺伝子解析の直接的なモデル動物となりうることを示すものである。すなわち、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、サルにおいてクローニングすることができれば、それをもとにヒトでのホモログ（オーソログ）を得ることが可能である。このようにして、サルの遺伝子探索を介してヒトの新規遺伝子を見出すことが期待される。また、これらの種の ES 細胞の発生における遺伝子発現の解析などに用いることも可能である。

チンパンジー cDNA の解析結果では、確かにヒトの配列と高い一致率をみている。しかし、少数ではあるが、未知の配列や、ヒトの登録配列と比較して構造変化を示すものが見い出された。その機能上の違いや生物学的意味を知る上で、さらにカニクイザルでのホモログを解析したり、逆に、カニクイザルでヒトと異なる配列が見い出されたときにはチンパンジーでのホモログを調べるという研究も可能である。

## E. 結論

カニクイザルについては、染色体レベルでみて、意外にヒトとの間での違いが単純な再編成であることが明確になった。このことは、種間の連鎖遺伝子群ならびにゲノム構成が高度に保存されていることを意味する。したがって、カニクイザルで見い出された新規遺伝子の位置をヒト染色体上に見出しポジショナルクローニングを行う上での重要な基盤となる。また、マイクロサテライトや保存的 SNPs も、ポジショナルクローニングでの有効なマーカーとなる事を示唆する。チンパンジーについては、従来、その研究の困難なことが指摘されてきたが、非侵襲的な方法（バイオプシー、オートプシー）により、良質の mRNA が得られることを確認した。全長 cDNA

ライブラリー作製については世界に先行するもので、単に種特異性の解明だけでなく、その遺伝子の発生における発現などについて、発生工学的成果とあわせて極めて有効なリソースとなることがわかった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Y. Ichikawa, J. Goto, M. Hattori, A. Toyoda, K. Ishii, S. Jeong, H. Hashida, N. Masuda, K. Ogata, F. Kasai, M. Hirai, P. Maciel, G.A. Rouleau, Y. Sakaki and I. Kanazawa: The genomic structure and expression of MJD, the Machado-Joseph disease gene. *J. Hum Genet* 46: 413-422 (2001).
- 2) L. Kawamura, M. Hirai, O. Takenaka, F. B. Radlwimmer and S. Yokoyama: Genomic and spectral analyses of long to middle wavelength-sensitive visual pigments of common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Gene* 269: 45-51 (2001).
- 3) S. Chida, H. Hojoh, M. Hirai and K. Tokunaga: Haplotype-specific sequence encoding the protein kinase, interferon-inducible double-stranded RNA-dependent activator in the human leukocyte antigen class II region. *Immunogenetics* 52: 186-194 (2001)
- 4) T. Saitoh, M. Hirai, and M. Katoh: Molecular cloning and characterization of human Frizzled-8 gene on chromosome 10p11.2. *Int. J. Oncology* 18: 991-996 (2001).
- 5) Y. Tonozaki, K. Fujio, T. Sugiyama, T. Nosaka, M. Hirai and T. Kitamura: Molecular cloning of a human novel type I cytokine receptor related to delta1/TSLPR. *Cytogenet.*

Cell Genet. 93: 23-25 (2001).

6) E. Kajita, J. Moriwaki, H. Yatsuki, K. Hori, K. Miura, M. Hirai and K. Shiokawa: Quantitative expression studies of aldolase A, B and C genes in developing embryos and adult tissues of *Xenopus laevis*. *Mechanisms of Development* 102: 283-287 (2001).

7) Y. Nomoto, M. Hirai and R. Ueshima: Cloning of Molluscan telomere DNA with (TTAGGG)<sub>n</sub> repeat and its chromosomal location in the freshwater snail *Biwamelania habei*. *Zool. Science* 18: 417-422 (2001).

8) T. Saitoh, M. Hirai and M. Katoh: Molecular cloning and characterization of human Frizzled-5 gene on chromosome 2q33.3-q34 region. *Int. J. Oncology* 19: 105-110 (2001).

## 2. 学会発表

1) 坂手龍一, 肥田宗友, 菅野純夫, 橋本雄之, 早坂郁夫, 寺尾恵治, 平井百樹: 霊長類遺伝子データベース: 日本人類学会第

55回大会(京都, 7月13-15日)

2) 長田直樹, 肥田宗友, 楠田潤, 田沼玲子, 伊関可奈子, 平田誠, 平井百樹, 数藤由美子, 橋本雄之: カニクイザル脳由来完全長 cDNA ライブラリーからの新規遺伝子の探索及び解析, 日本人類学会第55回大会(京都, 7月13-15日)

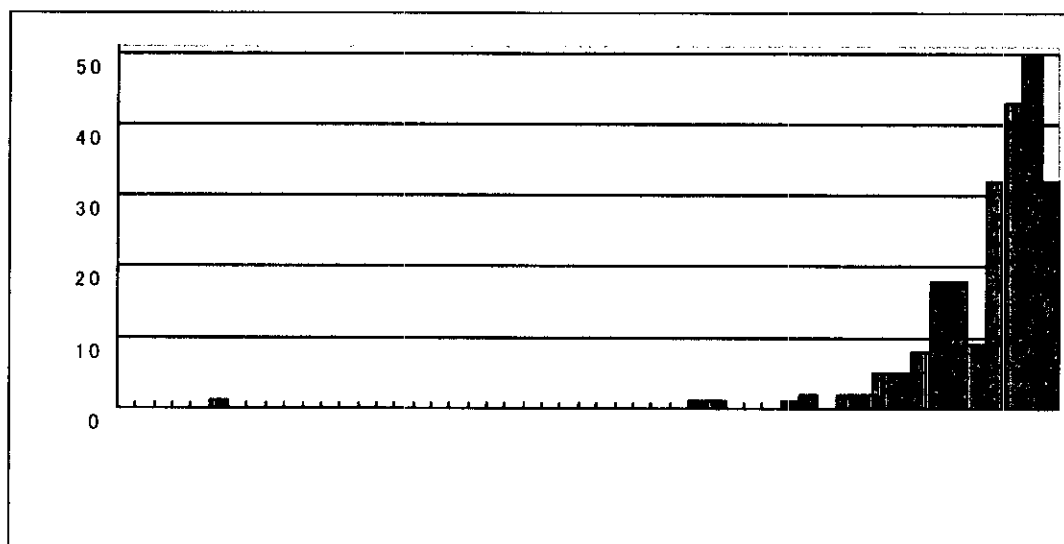
3) 竹中直美, 平井百樹, 河村正二: ヨザル赤緑視物質遺伝子の Y 染色体転座, 日本人類学会第55回大会(京都, 7月13-15日)

4) 肥田宗友, 坂手龍一, 鈴木穰, 菅野純夫, 五條堀孝, 橋本雄之, 寺尾恵治, 平井百樹: ヒトとカニクイザル m RNA 5' 領域の比較, 日本人類学会第55回大会(京都, 7月13-15日)

## G. 知的所有権の取得状況

取得なし

(図1) チンパンジー遺伝子の5'-側のヒト相同配列との一致度の分布



平成13年度分担研究報告  
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ヒトゲノム解析センター  
ゲノム構造解析分野助教授

研究要旨

本年度も、カニクイザルの脳を中心にオリゴキャップ法による完全長cDNAライブラリーの作成をおこなった。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、カニクイザル完全長cDNAライブラリーの評価を行い、ヒト完全長クローンとの5'UTRの比較を行った。

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のためには、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。カニクイザルは、大脳、小脳、肝臓、皮膚など4種のcDNAライブラリーを作製した。

2、完全長cDNAライブラリーの1パス塩基配列決定

本年度は、前年度及び今年度に作製したカニクイザルcDNAライブラリーからクローンをランダムに選んでシーケンスを行い、合計約30,000の5'端部分配列を得た。GenBankに対してホモロジー検索を行った結果、全体としては得られたESTsのうち、約60%が

既知のmRNA配列と相同性を示した。そのうち約半数が1つであり、2つのものが20%である。したがって、ライブラリーの重複度は、未だに低く、さらに多数の塩基配列決定を行っても、様々な遺伝子が分離できると期待される。今回得られた17,000を越えるESTsのうち95%以上がヒト以外の霊長類としては初めての配列であった。

今年度も、転写開始部位や翻訳開始領域について、ヒトのオーソログ遺伝子と比較を行った。735遺伝子についての検討では、その相同性は5'非翻訳領域(5'UTR)で平均94%、コード領域(CDS)とアミノ酸配列で平均98%であった。分布は、5'UTRで広く、CDSおよびアミノ酸配列で狭い。

一方、転写開始点の検討では、発現量の多い404遺伝子について検討した。全体的な傾向として、ヒトでコンパクトな転写開始点の分布を示す遺伝子は、カニクイザルでもコンパクトであり、広い分布を示すものは、広い傾向であった。しかし、約15%の遺伝子で、食い違いが起こっていた。特に、ヒトでコンパクトなのにカニクイザルで広いものが約10%存在し、注目される。

#### D. 考察

本年度は、カニクイザルの脳各部分の完全長cDNAライブラリーよりの5'端部分配列の解析を本格的に行った。さらに、チンパンジーのcDNAライブラリーについても5'配列決定を行った。

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。5'端部分配列の解析結果は、その様な遺伝子を得ることが出来る可能性を示している。さらに、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、これらの5'端部分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。

ヒトとカニクイザルのcDNAの配列比較から、5'UTR及びCDSは保存状態が高いことがわかった。また、全体的に見れば、転写開始点の分布状態についても、類似が見られる。しかし、約1割の遺伝子で分布状態の変化が見られ、こうした、微妙な差がヒトとカニクイザルの差を生みだしている可能性もある。アルツハイマー病やエイズなどヒトで見られる疾患が他の霊長類で見られないことは良く知られており、こうした、微妙な発現の差の研究も疾患の治療に貢献する可能性がある。

#### E. 結論

カニクイザル完全長cDNAライブラリーと5'端部分配列決定を組み合わせ、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ばかりでなく、ヒトのmRNA上の機能部分を推定していく場合に重要な示唆を与えると考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kato H, Tjernberg A, Zhang W, Krutchinsky AN, An W, Takeuchi T, Ohtsuki Y, Sugano S, Chait BT, Roeder RG. SYT associates with human SNF/SWI complexes and the C-terminal region of its fusion partner SSX1 targets histones. *J Biol*

Chem. In press.

2. Kurotaki N, Harada N, Yoshiura K, Sugano S, Niikawa N, Matsumoto N. Molecular characterization of NSD1, a human homologue of the mouse Nsd1 gene. *Gene*. 279: 197-204, 2001.

3. Kato M, Seki N, Sugano S, Hashimoto K, Masuho Y, Muramatsu MA, Kaibuchi K, Nakafuku M. Identification of sonic hedgehog-responsive genes using cDNA microarray. *Biochem Biophys Res Commun*. 289: 472-478, 2001.

4. Hida, M., Suzuki, Y., Sugano, S. Full-length cDNA libraries: Reagents for functional studies of the nervous system. In *Method in genomic neuroscience*. Edited by Chen, H. R. and Moldin, S. O. (CRC press FL). Pp207-227, 2001.

5. Osada N, Hida M, Kususda J, Tanuma R, Iseki K, Hirata M, Suto Y, Hirai M, Terao K, Suzuki Y, Sugano S, Hashimoto K. Assignment of 118 novel cDNAs of cynomolgus monkey brain to human chromosomes. *Gene*. 275: 31-37, 2001.

6. Date H, Onodera O, Tanaka H, Iwabuchi K, Uekawa K, Igarashi S, Koike R, Hiroi T, Yuasa T, Awaya Y, Sakai T, Takahashi T, Nagatomo H, Sekijima Y, Kawachi I, Takiyama Y, Nishizawa M, Fukuhara N, Saito K, Sugano S, Tsuji S. Early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia is caused by mutations in a new HIT superfamily gene. *Nature Genet*. 29: 184-188, 2001.

7. Nishimoto M, Fukushima A, Miyagi S, Suzuki Y, Sugano S, Matsuda Y, Hori Ta, Muramatsu M, Okuda A. Structural analyses of the utfl gene encoding a transcriptional coactivator expressed in pluripotent embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 285: 945-953, 2001.

8. Suzuki Y, Sugano S. Construction of full-length-enriched cDNA libraries. The oligo-capping method. *Methods Mol Biol*. 175: 143-153, 2001.

9. Yamaguchi R, Tanimoto N, Tateyama S, Uchida K, Hirano N, Tsuchiya K, Shimizu

H, Sugano S. Immunohistochemical study of age-dependent brain lesions in mice infected intracerebrally with Kasba (Chuzan) virus. *J Comp Pathol*. 124: 36-45, 2001.

10. Suzuki Y, Taira H, Tsunoda T, Mizushima-Sugano J, Sese J, Hata H, Ota T, Isogai T, Tanaka T, Morishita S, Okubo K, Sakaki Y, Nakamura Y, Suyama A, Sugano S. Diverse transcriptional initiation revealed by fine, large-scale mapping of mRNA start sites. *EMBO Rep*. 2: 388-393, 2001.

11. Suzuki Y, Tsunoda T, Sese J, Taira H, Mizushima-Sugano J, Hata H, Ota T, Isogai T, Tanaka T, Nakamura Y, Suyama A, Sakaki Y, Morishita S, Okubo K, Sugano S. Identification and characterization of the potential promoter regions of 1031 kinds of human genes. *Genome Res*. 11: 677-684, 2001.

12. Omori Y, Imai J, Watanabe M, Komatsu T, Suzuki Y, Kataoka K, Watanabe S, Tanigami A, Sugano S. CREB-H: a novel mammalian transcription factor belonging to the CREB/ATF family and functioning via the box-B element with a liver-specific expression. *Nucleic Acids Res*. 29: 2154-2162, 2001.

13. Mikami I, Harada H, Nagai H, Tsuneizumi M, Nobe Y, Koizumi K, Sugano S, Tanaka S, Emi M. Down-regulation in multiple human cancers of a novel gene, DMHC, from 17q25.1 that encodes an integral membrane protein. *Jpn J Cancer Res*. 92: 417-422, 2001.

14. Choi DK, Suzuki Y, Yoshimura S, Togashi T, Hida M, Taylor TD, Wang Y, Sugano S, Hattori M, Sakaki Y. Molecular cloning and characterization of a gene expressed in mouse developing tongue, mDscr5 gene, a homolog of human DSCR5 (Down syndrome Critical Region gene 5). *Mamm Genome*. 12: 347-351, 2001.

15. Harada H, Nagai H, Tsuneizumi M, Mikami I, Sugano S, Emi M. Identification of DMC1, a novel gene in the TOC region on 17q25.1 that shows loss of expression



in multiple human cancers. *J Hum Genet.* 46: 90-95, 2001.

16. Shibui, A., Sasaki, M., Sugano, S., Watanabe, J., DNA vaccine using a full-length cDNA library had adverse effects in murine malaria. *J. Med. In press*

17. Moria, S., Tanaka, K., Ohkuma, M., Sugano, S., Kudo, T. Diversification of the microtubule system in the early stage of eukaryote evolution: elongation factor 1 alpha and alpha-tubulin protein phylogeny of termite symbiotic oxymonad and hypermastigote protist. *J. Mol. Evol.* 52: 6-16, 2001

18. Yodate, H. T., Suwa, M., Irie, R., Matsui, H., Nishikawa, T., Nakamura, Y., Yamaguchi, D., Peng, Z. Z., Yamamoto, T., Nagai, K., Hayashi, K., Otsuki, T., Sugiyama, T., Ota, T., Suzuki, Y., Sugano, S., Isogai, T., Masuho, Y. HUNT: launch of a full-length cDNA database from the helix research institute. *Nucl. Acid Res.* 29: 185-188, 2001.

19. Watanabe, M., Sugano, S., Imai, J., Yoshida, K., Onodera, R., Amin, M. R., Uchida, K., Yamaguchi, R., Tateyama, S. Inhibition of cell proliferation, suppression of tumorigenicity, and induction of differentiation of the canine mammary tumour cell line by sodium phenylacetate. *Res. Vet. Sci.* 70: 27-32, 2001

20. Watanabe, J., Sasaki, M., Suzuki Y., Sugano S. FULL-malaria: a database for a full-length enriched cDNA library from human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Nucl. Acid Res.* 29: 70-71, 2001.

## 2、学会発表

1. ヒトとカニクイザルmRNA5'領域の比較 肥田宗友12、坂手龍一3、鈴木穰1、菅野純夫1、五條堀孝2、橋本雄之4、寺尾恵治5、平井百樹6  
(1東京大・医科研・ゲノム構造解析、2国立遺伝研・生命情報研究セ

ンター、3東京大・理、4国立感染研・遺伝子資源、5筑波・霊長類センター、6東京大・新領域) 第17回日本霊長類学会大会・第55回日本人類学会連合大会 2001年7月 国立京都国際会館

2. ヒトとチンパンジー、カニクイザル遺伝子の転写・翻訳開始領域の比較 肥田宗友12、坂手龍一3、鈴木穰1、橋本雄之4、寺尾恵治5、平井百樹6、五條堀孝2、菅野純夫1  
(1東京大・医科研・ゲノム構造解析、2国立遺伝研・生命情報研究センター、3東京大・理、4国立感染研・遺伝子資源、5筑波・霊長類センター、6東京大・新領域) 第24回日本分子生物学会年会 2001年12月 パシフィコ横浜
3. *Macaca* full-length cDNA libraries: comparison with human cDNAs 菅野純夫1 (東京大学・医科学研究所・ヒトゲノム解析センター) GEMINI/智の遺伝子探索計画 2001年3月 ホテルインターコンチネンタル東京ベイ。

## 分担研究報告書

### 核移植技術を用いた遺伝子機能および発現機構の解明

分担研究者

小倉淳郎

国立感染症研究所獣医科学部実験動物開発室長

昨年度に引き続き、マウスcDNA から確定した遺伝子の機能および発現機構を個体レベルで解明するための核移植クローン技術を開発した。昨年度の結果をもとに、*in vitro* で 129 F1 系の遺伝子型を持つ尾部線維芽細胞あるいは胎児線維芽細胞に green fluorescent protein (GFP) 遺伝子を導入し、核移植クローンに用いたが、*in vitro* および *in vivo* の発生は明らかに低下しており、産子を得るには至らなかった。クローン胎仔および胎盤の内在性遺伝子発現および発現型を詳細に解析した結果、体細胞核移植クローン技術は、配偶子形成時に確立したゲノム刷込み記憶には影響を与えないこと、そしてマウス体細胞クローン特有の胎盤過形成には、特定の遺伝子発現の低下が関与していることを明らかにした。クローンマウスの長期飼育実験により、早期死亡など体細胞クローン技術に起因する予期できない表現型が現れることがわかった。

#### A. 研究目的

本研究では、マウスcDNA より確定した遺伝子部分の機能および発現機構を個体レベルで解明するために、目的とする遺伝子を発現ベクターとともにマウス培養細胞ゲノムへ導入し、そして核移植クローン技術を応用し、選抜した細胞から直接、導入遺伝子をもつマウス個体を作成する。マウス核移植クローン技術は、ゲノム初期化、DNA メチル化、ゲノム刷込みなどのゲノムの改変に依存しない遺伝子機能改変についても情報を与えることから、単なる遺伝子機能だけでなく、実際の発現機構についても情報を与えると期待される。これらの技術によってヒトの疾病に関連する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、治療に結びつく研究の発展に資することを目的とする。

#### B. 研究方法

昨年度、129 系マウスの遺伝子型を用いることにより体細胞核移植クローンの効率が改善することを明らかにした。そこで今年度は主にこの遺伝子型の F1 のドナー細胞を用いて研究を実施した。方法は、一部を除き、G0/G1 期のドナー細胞を用いて細胞質内注入法に核移植を行い、サイトカラシン存在下で再構築胚を活性化をし、胚移植まで体外で培養した。

#### C. 研究結果

##### 1) ドナー細胞の種類と遺伝子型の検討

マウス核移植クローン技術の効率をさらに改善するために、唯一近交系ドナーとしてクローン産子が得られている今年度は 129 系と他の系統との F1 を作出し、さらに効率が改善するかどうか検討を行った。その結果、DBA/2 x 129/Sv-ter の遺伝子型による未成熟セルトリ細胞を用いた核移植クローンの効率が最も高く、胚移植あたり 10% の効率で出生することが明らかになった。また下に述べるように、実験用マウスと野生マウス (JF1 など) の F1 を作製することにより、発現アレルを特定することができるが、C57BL/6 と JF1 マウスの F1 ではクローン作出効率は著しく低いという問題がある。そこで、129 系と JF1 の F1 をドナーとして用いたところ、卵丘細胞、セルトリ細胞、成体線維芽細胞のいずれからも体細胞クローンを作成することができ、129 系ゲノムが核移植クローンの効率を改善することが確認できた。

##### 2) 核移植クローン技術を用いた遺伝子導入マウス作出の試み

以上の結果をもとに、*in vitro* で 129 F1

系の遺伝子型を持つ尾部線維芽細胞あるいは胎児線維芽細胞に green fluorescent protein (GFP) 遺伝子を導入し、核移植クローンに用いたが、in vitro および in vivo の発生は明らかに低下しており、産子を得るには至らなかった。途中で脱落した着床部の胎盤には明らかに GFP 陽性の細胞が存在し、ドナー細胞に導入された遺伝子が着床後にも発現していることを確認できた。

### 3) 出生クローンマウスの正常性の検討

クローン胎仔および胎盤の内在性遺伝子発現および発現型を詳細に解析した結果、体細胞核移植クローン技術は、配偶子形成時に確立したゲノム刷込み記憶には影響を与えないこと、そしてマウス体細胞クローン特有の胎盤過形成には、*Peg1/Mest*、*Meg1/Grb10*、*Meg3/Gtl2*、*Igfbp2*、*Igfbp6*、*Vegfr2/Flk1*、*Esx1* などの遺伝子発現の低下が関与していることを明らかにした。一方、これらの遺伝子は胎児での発現量は正常範囲であった。また、分娩期まで発生した胎仔の 93% (144/155) が正常に呼吸し、育つことを確認した。すなわち、過大児、呼吸不全などのES細胞由来のクローン産子の異常は、ドナーのES細胞の epigenetic な (ゲノム修飾の) 異常に起因することを示唆した。

### 4) クローンマウスの生後の正常性に関する検討

体細胞クローンマウスは、家畜のクローンに比べて、正常に生まれてくることが多い。しかし、その後の正常性について、特に臨床値や寿命についてのデータは少ない。遺伝子改変マウスをクローン技術により作出する場合、クローンに特有の発現型は無いことが望ましい。そこで、未成熟セルトリクローンマウス (遺伝子型 C57BL/6 x DBA/2) を長期飼育し、その体重変化、臨床生化学値、および寿命について検討した。対照として、同じ遺伝子型の雄マウスを用いた。その結果、体重の増加に対照と差は認められなかったが、調べた16項目の血清生化学値のうち LDH と アンモニアの有意な上昇が認められた (昨年度報告)。LDHは肝臓型アイソザイムの上昇が顕著であった。12匹すべてについて繁殖力は確認できた。800日までにクローン群は 10/12

が死亡し、これは対照 (自然交配群 1/7、顕微授精群 2/6) に比べ、有意に早期の死亡であった。死亡したクローン個体の病理学的観察から、肺炎および肝細胞壊死が多数例認められた。これらの病変は、死亡した対照群には認められなかった。別のセルトリクローン個体群の免疫能を測定した結果、抗体産生能が有意に低下していることが明らかになった。以上のように、体細胞核移植クローン技術により、長期的に予想困難な表現形が現れる可能性が示唆された。

## D. 考察

昨年度および今年度の研究により、マウス核移植クローンの効率は、さまざまな因子により左右されることが明らかになった。すなわちドナー細胞の種類、ドナー細胞のマウス系統、核移植法であり、これらを適切に選択すれば、より高い効率が期待される。実際に今年度は、1回の実験 (約200-250の卵子を使用) でほぼ確実に産子が得られるまで技術が安定した。また、分娩期まで生存した産子の大部分が正常であった。しかし、これらの正常に産まれたクローンマウスが、長期的にはクローン特有の表現形を有する可能性が高いことが明らかになった。一定の遺伝子型を持つ卵丘細胞クローンマウスは、肥満することが知られており、本研究での表現形も B6D2F1 遺伝子型のセルトリクローンに見られる特質であると考えられる。しかし得られたクローンマウスは、調べた範囲内ではすべて繁殖力は正常であり、この技術を用いて系統マウスを作出することの問題点は少ないと思われる。

安定してクローン産子を得る技術改良は達成したが、核移植クローン技術を用いて遺伝子操作動物を得るには至らなかった。この原因は、遺伝子導入のためにドナー細胞を体外で長期間培養すると、ドナー細胞に epigenetic な変異が生じるためであることが示唆された。すなわち、今後核移植クローン技術を用いて遺伝子機能解明のための遺伝子導入動物を効率的に作出するには、1) マウス体細胞の epigenetic な変異を生じさせない培養法の開発、あるいは 2) 核移植クローン技術を用いても異常な産子を出さない ES細胞の開発、のどちらかが有効な手段になるであろう。

## E. 結論

マウス核移植クローンの効率を改善するためのドナー細胞の種類およびその遺伝子型の検討を継続し、DBA/2 x 129/Sv-ter の未成熟セルトリ細胞を用いることで最善の効率を得られることを明らかにした。また、長期的にはクローン特有の表現形は生じるものの、クローンマウスは少なくとも繁殖に至るまでの期間は正常に発育することを明らかにした。しかし遺伝子導入を行ったドナー細胞では有意に産子作出の効率が落ちた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Inoue K, Kohda T, Lee J, Ogonuki N, Mochida K, Noguchi Y, Tanemura K, Kaneko-Ishino T, Ishino F, and Ogura A. Faithful expression of imprinted genes in cloned mice. *Science*, 295: 297, 2002.
- 2) Itoh M, Matsuda J, Suzuki O, Ogura A, Oshima A, Tai T, Suzuki Y, and Takashima S. Development of lysosomal storage in mice with targeted disruption of the beta-galactosidase gene: a model of human GM1-gangliosidosis. *Brain Dev.*, 23: 379-384, 2001.
- 3) Kanatsu-Shinohara M, Ogura A, Ikegawa M, Inoue K, Ogonuki N, Tashiro K, Toyokuni S, Honjo T, and Shinohara T. Adenovirus-mediated gene delivery and in vitro microinsemination produce offspring from infertile male mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 1383-1388, 2002.
- 4) Kobayashi S, Kohda T, Ichikawa H, Ogura A, Ohki M, Kaneko-Ishino T, and Ishino F. Paternal Expression of a Novel Imprinted Gene, Peg12/Frat3, in the mouse 7C Region Homologous to the Prader-Willi Syndrome Region. *Biochem Biophys Res Commun*, 290: 403-408, 2002.
- 5) Lee J, Inoue K, Ono R, Ogonuk R, Kohda K, Kaneko-Ishino T, Ogura A, and Ishino F. Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11.5 primordial germ cells. *Development*, 2002 (in press).
- 6) Mochida K, Matsuda J, Suzuki O, Nakahira M, Noguchi A, Nakayama K, Kurosawa S, Takano K, Noguchi Y, Yamamoto Y, and Ogura A. Development of reproductive biotechniques in mastomys. In: *Reproductive Biotechnology*, edited by Manabe, N. and Miyamoto, H. Kyoto:Hokuto Shobo, 2001, p. 279-284.
- 7) Nakada K, Inoue K, Chen CS, Nonaka I, Goto Y, Ogura A, and Hayashi JI. Correlation of functional and ultrastructural abnormalities of mitochondria in mouse heart carrying a pathogenic mutant mtDNA with a 4696-bp deletion. *Biochem Biophys Res Commun*, 288: 901-907, 2001.
- 8) Nakada K, Inoue K, Ono T, Isobe K, Ogura A, Goto Y, Nonaka I, and Hayashi JI. Inter-mitochondrial complementation: Mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA. *Nat Med*, 7: 934-9, 2001.
- 9) Ogonuki N, Inoue K, Yamamoto Y, Noguchi Y, Tanemura K, Suzuki O, Nakayama H, Doi K, Ohtomo K, Satoh M, Nshida A, and Ogura A. Early death of mice cloned from somatic cells. *Nat Genet*, 30: 253-254, 2002.
- 10) Ogura A. Microinsemination and nuclear transfer with male germ cells.. In: *Principles of Cloning*, edited by Cibelli, J. B., Lanza, R., Campbell, K., and West, M. D. San Diego:Academic Press, 2001, p. .
- 11) Ogura A, Ogonuki N, Takano K, and Inoue K. Microinsemination, nuclear transfer, and cytoplasmic transfer: the application of new reproductive engineering techniques to mouse genetics. *Mammalian Genome*, 12: 803-812, 2001.
- 12) Ohba Y, Ikuta K, Ogura A, Matsuda J, Mochizuki N, Nagashima K, Kurokawa K, Mayer BJ, Maki K, Miyazaki J, and Matsuda M. Requirement of C3G-dependent Rap1 activation for cell adhesion and embryogenesis. *EMBO J.*,

20: 3333-3341, 2001.

13) Yamaguchi M, Manabe N, Uchio-Yamada K, Akashi N, Yamamoto Y, Ogura A, and Miyamoto H. Localization of proliferative and apoptotic cells in the kidneys of ICR-derived glomerulonephritis (ICGN) mice. *J. Vet. Med. Sci.*, 63: 781-787, 2001.

14) 井上貴美子, 越後貫成美, 小倉淳郎. 核移植とクローン動物 分子細胞治療, 2: 380-385, 2001.

15) 越後貫成美, 井上貴美子, 小倉淳郎. 雄性生殖細胞核の移植 実験医学増刊 (幹細胞・クローン研究プロトコール), 2001.

16) 小倉淳郎 マウス体細胞核移植クローン技術. *Biology of Pregnancy (妊娠の生物学)*, 高橋迪雄 (編):永井書店, 2001, p. 374-379.

17) 小倉淳郎 顕微授精法—マウス. 卵子研究法, 佐藤英明 (編):養賢堂; 東京, 2001, p. 352-357.

18) 小倉淳郎, 井上貴美子 クローン動物—齧歯類. *バイオサイエンスの新世紀—第14巻「生命工学」*, 山村研一, 浅島 誠 (編) 東京: 共立出版, 2001, 印刷中.

## 2. 学会発表

Ogonuki N., Sankai T., Yagami K., Shikano T., Oda S., Miyazaki S., and Ogura A.: "Activity of a sperm-borne oocyte-activating factor in spermatozoa and spermatogenic cells from cynomolgus monkey and its localization after oocyte activation", *Int. Sympo. Mechanisms of cell signaling in early development, (SEIRIKEN)*, Okazaki, Japan, Nov (2000).

Inoue K., Ogonuki N., Ishino F., and Ogura A.: "Cloning mice with fetal and adult fibroblast cells and analysis of Igf2 and Igf2r expression in their term placentae", 34 th Ann. Meet. of Society for the Study of Reproduction, Ottawa, Canada, Aug (2002).

Ogura A.: "Phenotypes and epigenetic status of

mice cloned from somatic cells", *Int. Sympo. Development and Epigenetics of Mammalian Germ cells and Pluripotent Stem cells*, Kyoto, Japan, Nov (2001).

Ogonuki N., Tsuchiya H., Hirose Y., Okada H., Ogura A., and Sankai T.: "Pregnancy following round spermatid injection in the cynomolgus monkey", *Int. Sympo. Development and Epigenetics of Mammalian Germ cells and Pluripotent Stem cells*, Kyoto, Japan, Nov (2001).

Inoue K., Ogonuki N., Mochida K., Yamamoto Y., Kohda T., Ishino F., and Ogura A.: "Effects of donor cell type and genotype on the efficiency of somatic cloning in the mouse", *Int. Sympo. Development and Epigenetics of Mammalian Germ cells and Pluripotent Stem cells*, Kyoto, Japan, Nov (2001).

山海直, 土屋英明, 越後貫成美, 岡田詔子, 山田章雄: "サル類における体外受精", 哺乳動物卵子学会第41回大会, 網走, 6月 (2000).

滝本一広, 小倉淳郎, 持田慶司, 野口洋子, 笠間健嗣, 浅野敏彦: "MCC系マストミス腎に蓄積するガングリオシドの生化学的検索", 日本実験動物学会第48回大会, 横浜, 5月 (2001).

山田靖子, 矢部美機子, 滝本一広, 松田潤一郎, 小浦美奈子, 持田慶司, 山本美江, 小倉淳郎, 小野寺節, 浅野敏彦: "マウス肝炎ウイルス汚染コロニーの受精卵移植による清浄化の実例-PCR法と抗体検査の併用による汚染除去確認法の提案-", 日本実験動物学会第48回大会, 横浜, 5月 (2001).

鈴木治, 持田慶司, 野口洋子, 山本美江, 松田潤一郎, 小倉淳郎: "各種実験動物の糖蛋白質ホルモン $\alpha$ サブユニットの配列比較", 日本実験動物学会第48回大会, 横浜, 5月(2001).

中平美穂, 越後貫成美, 井上貴美子, 持田慶司, 野口章, 高野 薫, 山本美江, 鈴木治, 松田潤一郎, 小倉淳郎: "顕微授精技術を用いたトランスジェニックマウス作出の変法開発の試み", 日本実験動物学会第48回大会, 横浜, 5月

(2001).

山本美江, 越後貫成美, 井上貴美子, 高野薫, 黒沢重利, 中平美穂, 松原純子, 中山一栄, 小倉淳郎: "セルトリクローンマウスの血清生化学値, 体重変化, 生殖能力, 寿命について", 日本実験動物学会第48回大会, 横浜, 5月

(2001).

小倉淳郎: "精子細胞と精母細胞を用いた顕微授精", 日本哺乳動物卵子学会第42回大会, 東京, 6月 (2001).

宮本実, 杉本真次, 今井良悦, 西条武俊, 真鍋昇, 小倉淳郎: "ICGNマウスでみられた網膜異常", 比較眼科学会第21回大会, 広島, 7月 (2001).

井上貴美子, 越後貫成美, 小倉淳郎: "ドナー細胞種とマウス系統の組み合わせにおけるクローンマウス作製効率の比較", 日本繁殖生物学会第94回大会, 東京, 9月 (2001).

越後貫成美, 土屋英明, 広瀬良宏, 岡田浩典, 小倉淳郎, 山海直: "カニクイザル円形精子細胞を用いた顕微授精", 日本繁殖生物学会第94回大会, 東京, 9月 (2001).

小倉淳郎, 井上貴美子, 越後貫成美, Jiyoung Lee, 幸田尚, 石野史敏: "胎仔期および新生仔期の雄性生殖細胞を用いたクローン胚の発生", 日本繁殖生物学会第94回大会, 東京, 9月 (2001).

石野史敏, 横山峯介, 幸田尚, 小倉淳郎, 金児一石野知子: "マウスにおけるジェネティクスとエピジェネティクス", 日本分子生物学会第24回大会, 横浜, 12月 (2001).

小倉淳郎: "体細胞核移植による再プログラム化", 日本分子生物学会第24回大会, 横浜, 12月 (2001).

石野史敏, 李知英, 井上貴美子, 小野竜一, 越後貫成美, 幸田尚, 金児一石野知子, 小倉淳郎: "クローンマウスにおけるゲノムインプリンティング" 日本分子生物学会第24回大会, 横浜, 12月 (2001).

幸田尚, 井上貴美子, 李知英, 小西淳夫, 越後

貫成美, 脇坂紀子, 市川仁, 大木操, 山崎由起子, 若山照彦, 柳町隆造, 金児一石野知子, 小倉淳郎, 石野史敏: "マウス体細胞クローンにおける遺伝子発現の制御", 日本分子生物学会第24回大会, 横浜, 12月 (2001).

柏原真一, 庄天正, 野口純子, 小倉淳郎, 馬場忠: "精巣特異的ポリ(A)ポリメラーゼTPAP欠損マウスの解析", 日本分子生物学会第24回大会, 横浜, 12月 (2001).

李知英, 井上貴美子, 小野竜一, 越後貫成美, 幸田尚, 金児一石野知子, 小倉淳郎, 石野史敏: "PGC クローンを用いたゲノムインプリンティング消去過程の解析", 日本分子生物学会第24回大会, 横浜, 12月 (2001).

小林慎, 幸田尚, 市川仁, 小倉淳郎, 大木操, 金児一石野知子, 石野史敏: "Olygonucleotide array を用いた新規インプリンティング遺伝子の同定", 日本分子生物学会第24回大会, 横浜, 12月 (2001).

小倉淳郎: "マウス体細胞核移植技術の遺伝子発現および表現型に対する影響", 核移植技術全国検討会第6回大会, 福島, 3月 (2002).

小倉淳郎: "体細胞クローンマウスの特性: ゲノムから個体まで" 日本畜産学会 第100回大会, 東京, 3月 (2002).

研究成果の刊行に関する一覧表

(主任研究者)

- 1) Osada, N., Kusuda, J., Hirata, M., Tanuma, R., Hida, M., Sugano, S., Hirai, M., Hashimoto, K.: Search for genes positively selected during primate evolution by 5' -end sequence screening of cynomolgus monkey cDNAs.  
Genomics in press.
- 2) Tanikawa, N., Ohmiya, Y., Ohkubo, H., Hashimoto, K., Kangawa, K., Kojima, M., Ito, S. & Watanabe, K.: identification and characterization of a novel type of membrane-associated prostaglandin E synthase.  
Biochem Biophys Res Commun 291(4):884-889, 2002.
- 3) Osada, N., Hida, M., Kusuda, J., Tanuma, R., Hirata, M., Hirai, M., Terao, K., Suzuki, Y., Sugano, S., Hashimoto, K.:  
Prediction of unidentified human genes based on sequence similarity to novel cDNAs of cynomolgus monkey brain.  
Genome Biology (2001)3(1):research0006.1-0006.5,
- 4) Kato, M., Seki, N., Sugano, S., Hashimoto, K., Masuho, Y., Muramatsu, M., Kaibuchi, K., Nakafuku, M.: Identification of sonic hedgehog-responsive genes by using cDNA microarray.  
Biochem Biophys Res Commun (2001)30:289(2):472-8
- 5) Osada N., Hida, M., Kusuda, J., Tanuma, R., Iseki, K., Hirata, M., Suto, Y., Hirai, M., Terao, K., Suzuki, Y., Sugano, S., Hashimoto, K.: Assignment of 118 novel cDNAs of cynomolgus monkey brain to human chromosomes.  
Gene (2001) 275/1, 31-37.
- 6) Suzuki, Y., Tsunoda, T., Sese, J., Taira, H., Mizushima-Sugano, J. Hata, H., Ota, T., Isogai, T., Osada, N., Hashimoto, K., Tanaka, T., Nakamura, Y., Suyama, A., Sakaki, Y., Morishita, S., Okubo, K., and Sugano S.: Identification and Characterization of the Potential Promoter Regions of 1031 Kinds of Human Genes.  
Genome Res. (2001) 11: 677-684.

(分担研究者)

(平井)

- 1) Ichikawa Y, Goto J, Hattori M, Toyoda A, Ishii K, Jeong SY, Hashida H, Masuda N, Ogata K, Kasai F, Hirai M, Maciel P, Rouleau GA, Sakaki Y, Kanazawa I.:  
The genomic structure and expression of MJD, the Machado-Joseph disease gene.  
J Hum Genet. 2001;46(7):413-22.
- 2) Saitoh T, Hirai M, Katoh M.: Molecular cloning and characterization of WNT3A and WNT14 clustered in human chromosome 1q42 region.  
Biochem Biophys Res Commun. (2001) 284(5):1168-75.
- 3) Saitoh T, Hirai M, Katoh M.: Molecular cloning and characterization of human Frizzled-5 gene on chromosome 2q33.3-q34 region.  
Int J Oncol. (2001) 19(1):105-10.
- 4) Saitoh T, Hirai M, Katoh M.: Molecular cloning and characterization of human Frizzled-8 gene on chromosome 10p11.2.  
Int J Oncol. (2001) 18(5):991-6.

(菅野)

- 1) Hida, M., Suzuki, Y., Sugano, S.: Full-length cDNA libraries: Reagents for functional studies of the nervous system. In *Method in genomic neuroscience*. Edited by Chen, H. R. and Moldin, S. O. (CRC press FL). Pp207-227, 2001.
- 2) Suzuki Y, Sugano S.: Construction of full-length-enriched cDNA libraries. The oligo-capping method. *Methods Mol Biol.* 175: 143-153, 2001.
- 3) Suzuki Y, Taira H, Tsunoda T, Mizushima-Sugano J, Sese J, Hata H, Ota T, Isogai T, Tanaka T, Morishita S, Okubo K, Sakaki Y, Nakamura Y, Suyama A, Sugano S.: Diverse transcriptional initiation revealed by fine, large-scale mapping of mRNA start sites. *EMBO Rep.* 2: 388-393, 2001.

(小倉)

- 1) Ogura A, Ogonuki N, Takano K, Inoue K.: Microinsemination, nuclear transfer, and cytoplasmic transfer: the application of new reproductive engineering techniques to mouse genetics. *Mamm Genome.* 2001 Nov;12(11):803-12.
- 2) Ogonuki N, Inoue K, Yamamoto Y, Noguchi Y, Tanemura K, Suzuki O, Nakayama H, Doi K, Ohtomo K, Satoh M, Nshida A, and Ogura A.: Early death of mice cloned from somatic cells. *Nat Genet.* 30: 253-254, 2002.
- 3) Inoue K, Kohda T, Lee J, Ogonuki N, Mochida K, Noguchi Y, Tanemura K, Kaneko-Ishino T, Ishino F, Ogura A.: Faithful expression of imprinted genes in cloned mice. *Science.* 2002 Jan 11;295(5553):297.
- 4) Ogura A, Inoue K, Mochida K, Ogonuki N, Yanagimachi R.: Fertilization without spermatozoa. *Ital J Anat Embryol.* 2001;106(2 Suppl 2):3-10. Review.
- 5) Ogonuki N, Sankai T, Yagami K, Shikano T, Oda S, Miyazaki S, Ogura A.: Activity of a sperm-borne oocyte-activating factor in spermatozoa and spermatogenic cells from cynomolgus monkeys and its localization after oocyte activation. *Biol Reprod.* 2001 Aug;65(2):351-7.
- 6) Mochida K, Matsuda J, Suzuki O, Nakahira M, Noguchi A, Nakayama K, Kurosawa S, Takano K, Noguchi Y, Yamamoto Y, and Ogura A.: Development of reproductive biotechniques in mastomys. In: *Reproductive Biotechnology*, edited by Manabe, N. and Miyamoto, H. Kyoto:Hokuto Shobo, 2001, p. 279-284.



20010437

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。