



グループ研究「放射線の生物影響に関連する
ヒトゲノム領域の解析・遺伝情報解析研究」

(平成8～12年度)

最終報告書

平成13年10月

放射線医学総合研究所

目 次
{ CONTENTS }

1. 序	2
{ Preface }	
2. 研究組織	5
{ Organizatin of Research Teams }	
3. 研究成果	6
{ Research Reports }	
1. 遺伝情報解析システムの開発・改良に関する調査研究 (三田和英、菅谷公彦、市村幸子、根井 充、辻 秀雄)	6
(Genome Sequencing and Informatics)	
2. モデル生物ゲノムの構造と機能解明に関する調査研究 (森明充興、東 智康、本郷悦子、味村正博)	14
{ Genome Analysis on Model Organisms }	
3. 放射線感受性に関連する特定ゲノム領域の同定に関する調査研究 (今井高志、伊藤 子、相良雅司、二宮康晴)	23
(The Genome Analysis on the Specific Chromosomal Region Related to Radiation-sensitivity)	
4. ヒト特定ゲノム領域の構造及び機能解明に関する解析研究 (齋藤俊行、山内正剛、辻さつき、林昭子、子妻澄枝、寺田美奈子、堀雅明)	29
(Molecular Analysis on the Structure and Function of Particular Regions of Human Genome)	
5. 遺伝子改変技術の開発と疾患モデルマウスの作成に関する調査研究 (塩見忠博、原田良信、小池 学、岡本正則、塩見尚子)	34
(Generation and Characterization of DNA Repair -deficient Model Mice)	

序

本グループ研究は、平成7年に開始された「放射線の生物影響に関連するヒトゲノム領域の解析・遺伝情報解析研究（H7～H12）」を強力に推進するため、放医研の組織改革の一貫として推進された。

本グループ研究の目的は、ヒトへの放射線影響のリスク評価を向上させるために、放射線の生物影響に関連するヒト及びマウス遺伝子群についてのゲノム解析を実施すること、そのために必要な遺伝情報解析システムをモデル生物のゲノム解析を進めることで確立することである。さらに、染色体地図作成とDNA塩基配列決定データを国際的なデータベースであるGDB（ゲノム・データ・ベース）やDDBJ（日本DNAデータバンク）に登録し、DNA資材の配布および開発技術の公表を通してヒトゲノムプロジェクトに貢献することを目的としている。

本グループ研究を推進する背景として（1）米国DOE（エネルギー省）とNIHの提案によるヒトゲノム解析プロジェクトが開始されたこと。その中で、「広島・長崎の原爆被爆者の遺伝的影響を科学的に評価するには、ヒトゲノム解析とそのための技術開発が必要である」という認識があった。（2）UNSCEARも1993年の報告書で、ヒトゲノム解析やそれを利用した解析の必要性を提案している。さらに、（3）生体が低線量の放射線を受けると、障害としてではなく刺激として対応し、応答現象（細胞増殖や細胞周期制御関連遺伝子の発現）や適応応答現象（放射線体制の獲得）、放射線誘発ゲノム不安定性等の新しい現象を示すことが知られてきた。低線量放射線の生体影響を解明するには、これらの現象や機構の解明が必要であり、それにはゲノム解析を始めとした詳細で網羅的な解析が必要な段階に来ている。

本グループ研究では上の目的を達成するために2つの中課題をもうけ研究を実施した。研究の内容と成果は、各サブグループの報告に詳しいので省略し、概略を紹介する。

（1）遺伝情報解析研究

最も単純な真核生物である分裂酵母から発現している遺伝子cDNAを網羅し、放射線感受性に関連する遺伝子を同定して機能を解析する。また、ゲノム解析により大量DNA塩基配列決定に必要なサンプルの調整、シーケンシング反応、塩基配列解読のゲル電気泳動を効率的に運転する一貫体制を確立する。さらに、DNAデータを編集、分類、検索、登録するためのデータ解析システムの総合的検討を行う。

これらの研究の結果、①分裂酵母全遺伝子の40%に相当するcDNAデータを登録し世界に公開すると共に、世界で唯一のcDNAデータベースを構築し放医研ホームページで公開した。また、②分裂酵母第3染色体のゲノム解析で2.5MbのDNA塩基配列を決定した。さらに、③多細胞生物のモデルとしてカイコのcDNAカタログ化を行い、cDNAデータベースを構築して世界に公開した。これらの解析により大量DNA塩基配列決定一貫システムを構築し、年間10万サンプルの処理を可能とする体制を確立し、所内の研究者にも利用され、多くの研究成果をもたらした。これらの成果は当初目的をほぼ達成している。特に、cDNAデー

タの登録と公開は、DDBJへの登録数で第4位を記録し、文部省科研費のゲノムサイエンスグループに相当する成果と言える。他方、DNAデータ解析システムの構築はポストゲノム時代を迎え益々必要性の高まる分野であるが、高度な専門性を必要とすることもあり今後の対策が必要である。

(2) 放射線感受性に関連するヒト及びマウス・ゲノム領域の解析研究

放射線感受性培養細胞および細胞周期関連突然変異細胞を研究材料として、放射線によるゲノム損傷の防護・修復及び感受性機構に関わるヒト及びマウス遺伝子群を分離し、その構造と機能を解析することにより、放射線感受性機構に関連するゲノム機能を明らかにし、リスク評価の精度向上に資する。さらに、これら遺伝子群の知見を基に放射線の生物影響を鋭敏に検出し、解析することの出来る放射線高感受性モデルマウスを作成する。

これらの研究の結果、①放射線感受性遺伝子ATMの構造決定と新規細胞周期調節遺伝子NPATの発見、およびATM/NPAT遺伝子の特殊な構造とその遺伝子発現調節、②ヒトゲノムの不安定性に関与する動的変異の原因が特殊な5塩基や35塩基のリピート構造であることやゲノム不安定性突然変異株の原因がmRNA合成酵素 RPIILS 遺伝子の変異に由来すること、③ヒトゲノム解析で得られたDNA塩基配列中の新規遺伝子発見のプログラム開発とPCRによる実証による新規ヒト遺伝子の資源化、④紫外線高感受性のヒト色素性乾皮症G群のモデルマウスを作成し、個体でも紫外線高感受性を示すこと、等を明らかにした。これらの成果は期待以上のものである。特に、NPAT遺伝子の発見は全く予想しないものであり、放射線感受性遺伝子と細胞周期調節遺伝子の隣接が一部では普遍性を持つことを示した。また、mRNA合成酵素 RPIILS 遺伝子がゲノム不安定性に関与する初めての成果を発表した。更に、G群モデルマウスでは、誕生後の運動能力異常と寿命の短縮が観察され、紫外線感受性遺伝子機能欠損マウスとしては予測されない全く予想外の結果を得た。この結果は、当該遺伝子が脳や神経系の形成や生理機能の維持、また新規修復機能への関与を示唆しており、修復遺伝子機能の新たな展開が期待できる。

これらの成果は、基礎的ライフサイエンスの研究とその基盤整備が放射線生物影響の研究に不可欠であることを示すものである。ポストゲノムの21世紀を迎え、放医研で行う低線量放射線の生物影響研究にとっても不可欠な基盤を築く一石を投じたものと信ずる。

関係各位のご批判を頂ければ幸いである。

第2研究グループ総合研究官 森明 充興

Preface

To cope with the increasing social needs of safe nuclear power development, the continual improvement of our knowledge of radiation hazard and its risk is of great importance. This institute has organized inter-divisional teams of researchers and carried out a successive series of experimental research projects since 1973, and has resulted in much success in radiation-induced carcinogenesis and mutagenesis and some radiotoxicological studies.

The better understanding of the mechanisms by which radiation induces cancers and genetic disorders is important to improve the extrapolation of epidemiological data to derive estimates of radiation risk. UNSCEAR report 1993 suggested that studies in human and mouse of genomic damages due to radiation should be carried out at the molecular level. The information from a worldwide research effort on the Human Genome Project initiated by DOE and NIH will be especially helpful in this regard.

This eight years group research project entitled "Genome Analysis on the Biological Effects of Radiation" has been conducted in 1993-2001. The project consists of two major research groups aimed to study the human and mouse genomic regions involved in radiation sensitivity and to study the mechanism of radiation-sensitivity by doing the genome analysis on model organisms with developing a systematic genome analysis system.

The mapping and sequencing data obtained in this project have been deposited with GDB (Genome Data Base) and DDBJ (DNA Data Bank of Japan), respectively. The cDNA data was also opened on the WWW homepage of NIRS. The significant results were published in international journals listed in this report. These mapping and DNA data bases and findings will contribute for better understanding of the genes functioning radiation-sensitivity and also biodefence mechanism against radiation and other environmental stress.

Mitsuoki Morimyo
Supervising Researcher

2) 研究組織

第2研究グループ：放射線の生物影響に関連するヒトゲノム領域の解析・遺伝情報解析研究

総合研究官；森明充興

第1サブグループ：遺伝情報解析システムの開発・改良に関する調査研究

三田和英、菅谷公彦

第2サブグループ：モデル生物ゲノムの構造と機能解明に関する調査研究

森明充興、東智康、本郷悦子、平岡秀一

第3サブグループ：放射線感受性に関連する特定ゲノム領域の同定に関する調査研究

今井高志、伊藤綽子、相良雅史、二宮康晴

第4サブグループ：特定ゲノム領域の構造と機能解明に関する調査研究

斉藤俊行、山内正剛、辻さつき

第5サブグループ：遺伝子改変技術の開発と疾患モデルマウスの作成に関する調査研究

塩見忠博、原田良信、小池学

Organization of Research Group

Genome Research Group

Supervising Researcher: Mitsuoki Morimyo

1) Genome Sequencing and Informatics

Kazuei Mita, Kimihiko Sugaya

2) Genome Analysis on Model Organisms

Mitsuoki Morimyo, Tomoyasu Higashi, Etsuko Hongo, Shuichi Hiraoka

3) Human and Mouse Genome Mapping

Takashi Imai, Hiroko Ito, Masashi Sagara, Yasuharu Ninomiya

4) Human and Mouse Genome Function

Toshiyuki Saito, Masatake Yamauchi, Satsuki Tsuji

5) Mouse Gene Targeting

Tadahiro Shiomi, Yoshinobu Harada, Manabu Koike

1. 遺伝情報解析システムの開発・改良に関する調査研究
三田和英、菅谷公彦、市村幸子（生物影響）、根井 充
（生物影響）、辻 秀雄（第5研究グループ）

Genome sequencing and informatics

Kazuei Mita, Kimihiko Sugaya, Sachiko Ichimura*, Mitsuru
Nenoi*, Hideo Tsuji**

Genome Research Group, *Division of Biology and Oncology,
**Low Dose Radiation Risk and Carcinogenesis Research
Group

In order to identify radiation sensitive genes and to characterize genomic region corresponding to those genes, we have developed comprehensive analysis system coupled with large-scale (mega-base level) sequencing. Based on this system, the following four investigations were carried out: 1) cDNA and genome (focused on chromosome III) analysis project of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, 2) ESTs and genome analysis of silkworm *Bombyx mori* to reveal genes responsible for multi-cellular functions, 3) Analysis on temperature-sensitive mutations of RNA polymerase II, 4) Mechanism of ubiquitin gene activation by UV and X-ray irradiation.

1) Our purpose in cDNA project using fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* is to compile a comprehensive list of the house-keeping genes of eukaryotes. Since most of the house-keeping genes are conserved throughout eukaryotes and the fission yeast is the simplest eukaryote with a minimum number of essential genes of a eukaryotic cell, we chose fission yeast as a model organism to understand the function of house-keeping genes. We have, thus far, sequenced more than 12,000 clones and identified more than 2,500 independent clones. In the course of this project, we enumerated all the members of translation elongation factors of *S. pombe*.

2) Aiming at the genome analysis of *Bombyx mori*, we have started to construct the EST database through the analysis of cDNA libraries. Since the gene expression patterns deeply

depend on tissues as well as developmental stages, we took the following strategy: cDNA libraries of various tissues (and different stages) were constructed by the directional cloning method. 1000 cDNA clones were chosen at random from each library and cDNA sequences were determined from the 5' end, followed by gene identification with protein homology search in public protein databases. So far, we determined over 15,000 cDNAs derived from 20 cDNA libraries, and identified 6,000 independent ESTs. We initiated the construction of *Bombyx* BAC contigs by hybridization using independent ESTs as probes.

3) RNA polymerase II (pol II) is a multi-subunit enzyme responsible for the transcription of most genes in higher eukaryotes. It forms enormous complexes, or holoenzymes, that associate with other proteins involved in related function like the repair of damage in DNA. At the heart of each individual polymerizing complex lies the catalytic subunit, RPB1; this is the largest subunit found in the core enzyme. In order to reveal various functions of pol II, some temperature-sensitive mutants of RPB1 have been characterized. A temperature-sensitive mutant of the CHO-K1 line known as tsTM4 contains a mutation in *RPB1* that also interferes with progression through the cycle; these cells arrest in S phase at the non-permissive temperature, and have increased levels of sister chromatid exchanges. Genomic fragments containing the entire coding region of the human *RPB1* gene – as well as the corresponding cDNA tagged with green fluorescent protein – complement the temperature sensitive defect in tsTM4.

This defect results from a point mutation (a C-to-T transition) that changes the amino acid residue at position 1006 from a pro to a ser. Proline¹⁰⁰⁶ proves to be highly conserved throughout eukaryotes, and substituting the homologous residue in *Schizosaccharomyces pombe* with a serine also led to genome instability and defects in cell cycle progression. The other temperature-sensitive mutant, tsAF8, of the Syrian hamster cell line, BHK21, arrests at the non-permissive temperature in mid-G₁ phase. We show that RPB1 in tsAF8 – which is found exclusively in the nucleus at the permissive temperature – is

also found in the cytoplasm at the non-permissive temperature. Comparison of the DNA sequences of the *RPB1* gene in the wild-type and mutant shows the mutant phenotype results from a (hemizygous) C-to-A variation at nucleotide 944 in one *RPB1* allele; this gives rise to an ala-to-asp substitution at residue 315 in the protein. Aligning the amino acid sequences from various species reveals that ala³¹⁵ is highly conserved in eukaryotes.

4) Through its covalent conjugation to various intracellular protein substrates, ubiquitin has been shown to be involved in diverse cellular processes, such as ATP-dependent proteolysis of abnormal or short-lived proteins, chromatin organization, stress response, DNA repair, cell cycle control and programmed cell death. In order to investigate the mechanism of ubiquitin gene activation, we isolated human polyubiquitin gene, UbC, from HeLa cells and hamster counterpart, CHUB2, from V79 Chinese hamster cells, and determined their gene structures in this study. Northern analysis revealed that the expression of the CHUB2 gene is not inducible by UV light or TPA treatment, whereas the human UbC is activated. The 5' upstream region of the CHUB2 gene is distinct from that of the UbC gene in containing low recognition sites for binding of transcription factors. The absence of AP-1 sites in the promoter of CHUB2 gene was likely to be responsible for the very dissimilar regulation of the two genes by UV and TPA, despite the fact that these genes are evolutionarily equivalent.

1. 緒言

放射線の生物影響の機構解明には放射線感受性遺伝子や発ガン関連遺伝子の解析及びそれら遺伝子周辺の構造の情報が不可欠であり、メガベース単位の大量 DNA シーケンシングが必要である。放射線の生物影響研究を分子レベルで進めるため大量 DNA シーケンシングとデータ解析の一貫システムを構築した。このシステムを用いて、高等真核生物のゲノム解析を行い放射線感受性機構などの高次生命現象を解明する。更に放医研発信の DNA データを登録して、国際協力に貢献する。

2-1. 分裂酵母 cDNA カタログ化と 3 番染色体ゲノム

解析に関する研究

(1) 目的

大量 DNA シーケンシングシステムの構築の手始めとして、分裂酵母の cDNA カタログ化を行い、真核生物に必須のハウスキーピング遺伝子を網羅する。また 3 番染色体のゲノムシーケンシングを行う。

(2) 方法

分裂酵母 972h 株より RNA を調製し oligo dT ビーズを用いて mRNA を分離した。定法に従いこの mRNA より cDNA ライブラリを作成した。任意に選択した 12000 以上のクローンより DNA を調製し、塩基配列を決定した。

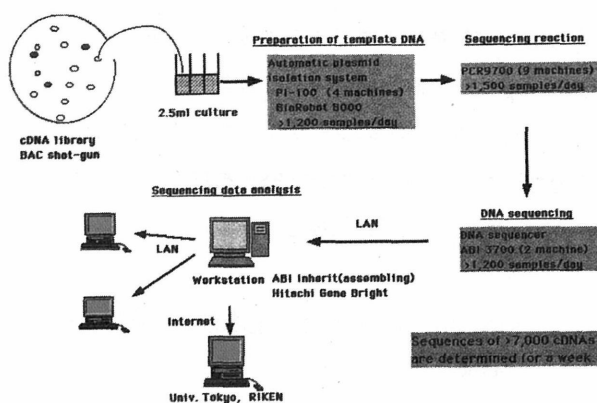


図 1 DNA Sequencing system

(3) 結果と考察

分裂酵母を高等生物の最も単純なモデル生物として位置付け、その cDNA カタログ化や 3 番染色体のゲノム解析を通して大量ゲノムシーケンシングシステムの構築を行い、最大 600 サンプル/日のシーケンシング能力を確立した (図 1)。cDNA カタログ化では、12000 以上のクローンのシーケンスを決め、2500 以上の遺伝子を分類した。特に翻訳伸長因子に関しては、すべての遺伝子を網羅的に解析することができた。米国 Peter deJong 博士と共同で分裂酵母 BAC ライブラリーを作成し、cDNA カタログ化から得られた 3 番染色体の EST マーカーを用いて、3 番染色体由来の BAC クローンを分離し、3 番染色体の BAC コンテイングを完成した。またこれらの BAC クローンをショットガン法でサブクローニングし、塩基配列を決定して 3 番染色体のシーケンシングを行った。

2-2. カイコの EST s データベース構築とゲノム解析

(1) 目的

多細胞生物系モデル生物カイコの cDNA カタログ化を行い、多細胞生物系特有の遺伝子を網羅する。

(2) 方法

異なる発達段階のカイコ組織より RNA を調製し oligo dT ビーズを用いて mRNA を分離した。定法に従いこの mRNA より cDNA ライブラリを作成した。各々の cDNA ライブラリより任意に選択した 1000 個のクローンより DNA を調製し、塩基配列を決定した。得られた塩基配列の相同性検索を行い、分類して EST s データベースを構築した。

(3) 結果と考察

多細胞生物型特有の遺伝子を網羅する目的でカイコの EST データベース構築を進め、31 組織の cDNA ライブラリから約 24000 EST のシーケンスを決め、約 8500 遺伝子を分類した。このうち 14500 EST を日本データバンク (DDBJ) に登録し、世界に公開した。

2-3. RNA ポリメラーゼ II の温度感受性変異の解析

(1) 目的

細胞周期に異常のあるハムスター培養細胞の温度感受性変異をつきとめ、その作用機構を解析する。

(2) 方法

野生株および変異株の RNA ポリメラーゼ II (RPB1) の塩基配列を決定し、比較することによって変異部位を同定した。このアミノ酸変異部位は酵母からヒトに至るまで保存されていたので、分裂酵母の RPB1 遺伝子に相同変異を導入し変異株を樹立し (図 2)、その表現型を解析した。また遺伝的相補を利用して、GFP を結合した RNA ポリメラーゼ II を安定に発現する哺乳類細胞株を分離した。

	1001	1006	1012
Hamster	P S D L H P I K V Y E G		
Human	P S D L H P I K V Y E G		
Yeast	P T D L H P S D I I D G		

図 2 Comparison of hamster RpIIIS amino acid sequence (position 1001-1012) with those of human and fission yeast. The target Pro (position 1006) is boxed.

(3) 結果と考察

細胞周期と染色体の安定保持に異常を示す CHO-K1 細胞の温度感受性変異株 (tsTM4) の遺伝的欠陥が、RNA ポリメラーゼ II 遺伝子上に存在することを同定した。この変異を分裂酵母の相同遺伝子に導入し、その表現型を解析することにより本変異の影響を確認した (図 3)。

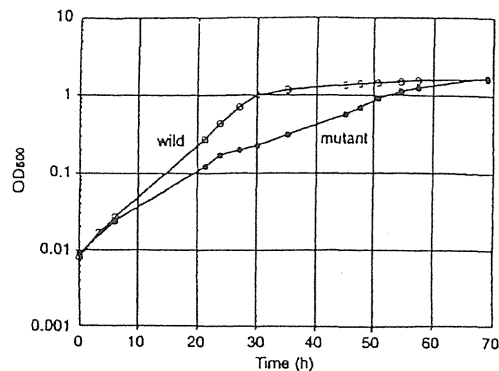


図 3 Effect of incubation at nonpermissive temperature (37°C) on haploid cell growth. All growth was measured by monitoring the optical density at 600 nm after a shift (at time 0) from 30°C to 37°C. Cells precultured at 30°C for 48 h (stationary phase) were used. Similar results were observed in tetrads.

また表現型の相補を利用して、GFP を結合した RNA ポリメラーゼ II を安定に発現する哺乳類細胞株を分離した。さらに G1 期での細胞周期停止に因する RNA ポリメラーゼ II の温度感受性変異を、BHK21 細胞由来の tsAF8 株の RPB1 遺伝子上に同定した。この変異は RPB1 分子の 315 番目のアラニンをアスパラギン酸に置換する。また、変異株における RPB1 分子の分布は、非許容温度下では細胞質にまで広く分布するように変化することも明らかとなった。

2-4. ストレス応答ユビキチン遺伝子の構造と機能

(1) 目的

ユビキチン化経路は放射線を含む様々な外界からのストレスに応答する生体防御の重要な機構の一つである。特に、ユビキチン分子は全真核生物に存在し、そのアミノ酸配列は極めてよく保存されているので、その機構は真核生物において普遍的なものである。また、ユビキチンはクロマチン構造形成にも重要な役割を担っている。さらに、細胞周期制御機構にもユビキチン経路は利用されている。本研究では、ヒト、ハムスターのユビキチン

遺伝子の遺伝子構造を決め、それらの紫外線や放射線、強力な発ガンプロモーターとして知られているホルボールエステル (TPA) のストレスに対する応答機構を明らかにする。

(2) 方法

V79 ハムスター培養細胞および HeLa 細胞を使用した。遺伝子活性化はノーザン解析で調べた。ヒトおよびハムスターのユビキチン遺伝子は各々のゲノムライブラリーからユビキチン cDNA をプローブとしてスクリーンした。ユビキチン遺伝子はユビキチンタンパク質をコードする 228 bp のユニットが1つだけのモノユビキチン遺伝子と幾つかのユニットがタンデムにつながったポリユビキチン遺伝子が存在するが、ストレス応答をするのはポリユビキチン遺伝子であるので、本研究ではポリユビキチンのみを対象とした。ヒトではポリユビキチン遺伝子としてユニットが3リピートと9リピートの2つがあり、それぞれ UbB, UbC と名付けられている。これに対応するハムスターのポリユビキチン遺伝子は CHUB1, CHUB2 である。

(3) 結果と考察

本研究ではヒトのポリユビキチン遺伝子 UbC (DDBJ/EMBL/GenBank accession No. D14565) とハムスターのポリユビキチン遺伝子 CHUB2 (accession No. D63791) および CHUB1 (accession No. X60390) の塩基配列を決定した。表 1 にヒトとハムスターのポリユビキチン遺伝子の熱ショック、TPA 処理、UV, X-線照射による応答性の結果をまとめた。熱ショックに対してヒト UbC およびハムスター CHUB2 遺伝子は応答を示すが、TPA

Table 1 Summary of inductions of human polyubiquitin genes (UbC and UbB) and hamster polyubiquitin genes (CHUB2 and CHUB1) with various stresses.

Stress	UbC	UbB	CHUB2	CHUB1
Heat shock	+++	+	+++	+
TPA	++	-	+/-	-
UV	++	-	+/-	-
X-ray	+	+/-	+/-	+/-

The degree of induction is given by -, +/-, +, ++ or +++. - denotes no induction, whereas +++ means an intense induction. The gene activation was estimated by Northern analysis.

処理、UV, X 線照射に対してはヒト UbC 遺伝子は応答を示すが、そのカウンターパートのハムスター CHUB2 遺伝子は応答を示さなかった。この遺伝子活性化の違いを明らかにするために、両遺伝子の 5' 上流調節領域を各々 4 kb 以上にわたって塩基配列を決定し、その構造を比較した (図 4)。ヒト UbC では HSF, AP-1, NF-kB,

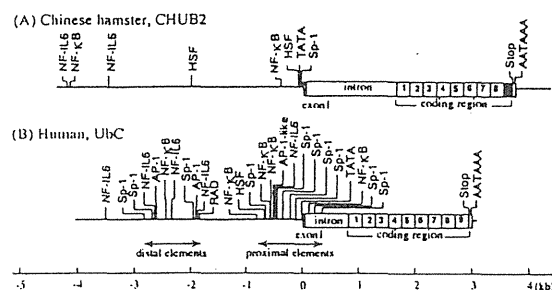


図 4 Schematic representation of overall structure of the UbC and CHUB2 genes. Sites of a perfect match to the consensus sequences for transcription factors AP-1, NF-kB, SP-1, NF-IL6, HSF and RAD sequence in the upstream region and around the transcription initiation site of each gene are indicated, together with the TATA box. The numbers given in the hatched coding region boxes indicate the individually encoded ubiquitins.

SP-1, NF-IL6 の転写因子の認識配列がクラスターのように多数存在するが、ハムスター CHUB2 の 5' 上流域にはそのようなサイトは非常にまれで、特に AP-1 が全くなく、SP-1 も NF-kB サイトも非常にまれである。HSF (Heat shock factor) サイトは両者に見られるので両者とも熱ショック応答性を示した。紫外線やホルボールエステルによって発現が活性化される遺伝子としてヒト コラゲナーゼ遺伝子、メタロチオネイン遺伝子、spr 2 遺伝子などがあるが、これら遺伝子における UV や TPA に応答する調節領域のエレメントは転写活性化因子 AP-1 の結合サイトであることが知られている。AP-1 サイトがハムスター CHUB2 の調節領域にないことが UV や TPA に対する応答を示さない原因であると推定される。このように CHUB2 遺伝子 5' 上流域には転写因子結合サイトが非常に少なく、結果として CHUB2 5' 上流域は UbC のそれに比較してかなり AT-rich となっていることが分かった。これらの遺伝子は進化的に同等のものであるということはコーディング領域の塩基配列比較から結論できた。従って、遺伝子周辺のゲノム環境の差が

遺伝子発現の差として表われており、ゲノム環境と遺伝子発現の相関関係を明確に示している。

3. 結論

(1) 大規模シーケンシングシステムの構築を行い、最大 600 サンプル/日のシーケンシング能力を確立した。

(2) 分裂酵母の cDNA カタログ化より翻訳伸長因子を網羅的に解析した。また分裂酵母のゲノム BAC ライブラリを構築し、3 番染色体をカバーするコンティグを作成した。

(3) 多細胞生物型特有の遺伝子を網羅する目的でカイコの EST データベース構築を進め、31 組織の cDNA ライブラリから約 24000 EST のシーケンスを決め、約 8500 遺伝子を分類した。

(4) 細胞周期の進行に影響を与える RNA ポリメラーゼ II の温度感受性変異を 2 種類同定した。

(5) 外界の様々なストレスに応答するヒトおよびハムスターのポリユビキチン遺伝子の構造を決定した。

(6) ヒトのポリユビキチン遺伝子 UbC は UV, TPA, X-ray に応答するが、そのハムスター同等遺伝子である CHUB2 はこれらのストレスに応答しないことを見つけた。

(7) ヒト UbC およびハムスター CHUB2 遺伝子の 5' 上流調節域の塩基配列を決定し、比較したところ、UbC では多数の転写調節因子結合サイト、AP-1, NF- κ B, NF-IL6, HSF, が存在するが、CHUB2 では非常に少なく、特に AP-1 は全くなかった。AP-1 が UV や TPA の遺伝子活性化に関与していることをあきらかにした。遺伝子活性化とゲノム環境の相関関係も明らかにできた。

4. 研究発表

- 1) Morimyo, M. and Mita, K.: A simple and rapid amplification procedure for cDNA cloned in dephosphorylated plasmid. *Nucleic Acids Res.* 21, 1679-1680, 1993.
- 2) Mita, K., Morimyo, M. and Hongo, E.: One step DNA sequencing of single-stranded DNA with reverse dye-primer. *Nucleic Acids Res.* 22, 1507-1508, 1994.
- 3) Neno, M., Mita, K., Ichimura, S. and Cartwright, I.L.:

Novel structure of a Chinese hamster polyubiquitin gene.

Biochim. Biophys. Acta 1204, 271-278, 1994.

- 4) Mita, K., Ichimura, S. and James, T.C.: Highly repetitive structure and its organization of the silk fibroin gene. *J. Mol. Evol.* 38, 583-592, 1994.

- 5) Ichimura, S., Mita, K. and Numata, M.: Protein ubiquitination in the posterior silk glands of *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24, 717-722, 1994.

- 6) Hongo, E., Morimyo, M., Mita, K., Machida, I., Hamanaba, H., Tsuji, H., Ichimura, S. and Noda, Y.: The methyl viologen-resistance-encoding gene smvA of *Salmonella typhimurium*. *Gene* 148, 173-174, 1994.

- 7) Sugaya, K., Fukagawa, T., Matsumoto, K., Mita, K., Takahashi, E., Ando, A., Inoko, H. and Ikemura, T.: Three human MHC class III genes near the junction with the class II locus. *Genomics* 23, 408-419, 1994.

- 8) Mita, K., Tsuji, H., Morimyo, M., Takahashi, E., Neno, M., Ichimura, S., Yamauchi, M., Hongo, E. and Hayashi, A.: The human gene encoding the largest subunit of RNA polymerase II. *Gene* 159, 285-286, 1995.

- 9) Mita, K., Neno, M., Morimyo, M., Tsuji, H., Ichimura, S., Sawai, M. and Hamana, K.: *Bombyx mori* beta-tubulin gene specifically expressed in Testis. *Gene* 162, 329-330, 1995.

- 10) Neno, M., Mita, K., Ichimura, S., Cartwright, I.L., Takahashi, E., Yamauchi, M. and Tsuji, H.: Heterogeneous structure of the polyubiquitin gene UbC of HeLa S3 cells. *Gene* 175, 179-185, 1996.

- 11) Muto, M., Chen, Y., Kubo, E. and Mita, K.: Analysis of early initiating event(s) irradiation-induced thymic lymphomagenesis. *Jpn. J. Cancer Res.* 87, 247-257, 1996.

- 12) Ptushkina, M., Fierro-Monti, I., van den Heuvel, J., Vasilescu, S., Birkenhager, R., Mita, K. and McCarthy, J.E.G.: *Schizosaccharomyces pombe* has a novel eukaryotic initiation factor 4F complex containing a cap-binding protein with the human eIF4E C-terminal motif KSGST. *J. Biol. Chem.* 271, 32818-32824, 1996.

- 13) Neno, M., Cartwright, I.L., Mita, K. and Ichimura, S.: Comparison of the 5' upstream region of the evolutionarily

- equivalent polyubiquitin gene of humans and Chinese hamsters. *Gene* 179, 297-299, 1996.
- 14) Araki, R., Fujimori, A., Hamatani, K., Mita, K., Saito, T., Mori, M., Fukumura, R., Morimyo, M., Muto, M., Itoh, M., Tatsumi, K. and Abe, M.: Nonsense mutation at Tyr-4046 in the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit of severe combined immune deficiency mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 2438-2443, 1997.
 - 15) Mita, K., Morimyo, M., Ito, K., Sugaya, K., Ebihara, K., Hongo, E., Higashi, T., Hirayama, Y. and Nakamura, Y.: Comprehensive cloning of *Schizosaccharomyces pombe* genes encoding translation elongation factors. *Gene* 187, 259-266, 1997.
 - 16) Sugaya, K., Sasanuma, S., Nohata, J., Kimura, T., Fukagawa, T., Nakamura, Y., Ando, A., Inoko, H., Ikemura, T. and Mita, K.: Gene organization of human NOTCH4 and (CTG)_n polymorphism in this human counterpart gene of mouse proto-oncogene *Int3*. *Gene* 189, 235-244, 1997.
 - 17) Sugaya, K., Sasanuma, S., Nohata, J., Kimura, T., Hongo, E., Higashi, T., Morimyo, M., Tsuji, H. and Mita, K.: Cloning and sequencing for the largest subunit of Chinese hamster RNA polymerase II gene: identification of a mutation related to abnormal induction of sister chromatid exchanges. *Gene* 194, 267-272, 1997.
 - 18) Fujimori, A., Araki, R., Fukumura, R., Saito, T., Mori, M., Mita, K., Tatsumi, K. and Abe, M.: The murine DNA-PKcs gene consists of 86 exons dispersed in more than 250 kb. *Genomics* 45, 194-199, 1997.
 - 19) Ichimura, S., Mita, K. and Sugaya, K.: A major non-LTR retrotransposon of *Bombyx mori*, L1Bm. *J. Mol. Evol.* 45, 253-264, 1997.
 - 20) Neno, M., Mita, K., Ichimura, S. and Kawano, A.: Higher frequency of concerted evolutionary events in rodents than in man at the polyubiquitin gene VNTR locus. *Genetics* 148, 867-876, 1998.
 - 21) Suzuki, G., Nakata, Y., Dan, Y., Uzawa, A., Nakagawa, K., Saito, T., Mita, K. and Shirasawa, T.: Loss of SDF-1 receptor expression during positive selection in the thymus. *Int. Immunol.* 10, 1049-1056, 1998.
 - 22) Sugaya, K., Ajimura, M., Tsuji, H., Morimyo, M. and Mita, K.: Alteration of the largest subunit of RNA polymerase II and its effect on chromosome stability in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Gen. Genet.* 258, 279-287, 1998.
 - 23) Nishimura, M., Wakana, S., Kakinuma, S., Mita, K., Ishii, H., Kobayashi, S., Ogiu, T., Sado, T. and Shimada, Y.: Low frequency of ras gene mutation in spontaneous and gamma-ray-induced thymic lymphoma of scid mice. *Radiat. Res.* 151, 142-149, 1999.
 - 24) Fujimori, A., Matsuda, Y., Takemoto, Y., Hashimoto, Y., Kubo, E., Araki, R., Fukumura, R., Mita, K., Tatsumi, K. and Muto, M.: Cloning and mapping of Np95 gene which encodes a novel nuclear protein associated with cell proliferation. *Mamm. Genome* 9, 1032-1035, 1998.
 - 25) Saito, T., Matsuda, Y., Ishii, H., Mori, M., Araki, R., Fujimori, A., Fukumura, R., Watanabe, F., Hayashi, A., Mita, K., Morimyo, M., Tatsumi, K., Hori, T. and Abe, M.: Mouse *Cdc21* only 0.5kb upstream from *Dna-pks* in a head-to-head organization. *Mamm. Genome* 9, 769-772, 1998.
 - 26) Ohbayashi, F., Shimada, T., Sugasaki, T., Kawai, S., Mita, K., Oshiki, T. and Abe, H.: Molecular structure of the copia-like retrotransposable element Yokozuna on the W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori*. *Genes Genet. Syst.* 73, 345-352, 1998.
 - 27) Mita, K., Morimyo, M., Okano, K., Shimada, T. and Maeda, S.: The construction of EST database for genome analysis of *Bombyx mori*. *RIKEN Review* 22, 63-67, 1999.
 - 28) Lee, A.J., Hahn, Y., Yun, J.H., Mita, K. and Chung, J.H.: Characterization of JDP genes, an evolutionarily conserved J domain-only protein family, from human and moths. *Biochim. Biophys. Acta* 1491, 355-363, 2000.
 - 29) Yoshiga, T., Okano, K., Mita, K., Shimada, T. and Matsumoto, S.: cDNA cloning of acyl-CoA desaturase homologs in the silkworm, *Bombyx mori*. *Gene* 246, 339-345, 2000.
 - 30) Kawano, A., Neno, M., Matsushita, S., Matsumoto, T.

- and Mita, K.: Sequence of 16S rRNA gene of rat-origin cilia-associated respiratory (CAR) *Bacillus* SMR strain. *J. Vet. Med. Sci.* 62, 797-800, 2000.
- 31) Neno, M., Ichimura, S. and Mita, K.: Interspecific comparison in the frequency of concerted evolution at the polyubiquitin gene locus. *J. Mol. Evol.* 51, 161-165, 2000.
- 32) Abe, H., Ohbayashi, F., Shimada, T., Sugasaki, T., Kawai, S., Mita, K. and Oshiki, T.: Molecular structure of a novel gypsy-Ty3-like retrotransposon (Kabuki) and nested retrotransposable elements on the W chromosome of the silkworm *Bombyx mori*. *Mol. Gen. Genet.* 263, 916-924, 2000.
- 33) Hahn, Y., Lee, Y.J., Yun, J.H., Yang, S.K., Park, C.W., Mita, K., Huh, T.-L., Rhee, M. and Chung, J.H.: Duplication of genes encoding non-clathrin coat protein gamma-COP in vertebrate, insect, and plant evolution. *FEBS Lett.* 482, 31-36, 2000.
- 34) Uchiumi, T., Nomura, T., Shimizu, T., Katakai, Y., Mita, K., Koike, Y., Nakagaki, M., Taira, H. and Hachimori, A.: A covariant change of the two highly conserved bases within the GTPase-associated center of ribosomal 28S rRNA in silkworms and other moths. *J. Biol. Chem.* 273, 35116-35121, 2000.
- 35) Ohbayashi, F., Suzuki, M.G., Mita, K., Okano, K. and Shimada, T.: A homologue of the *Drosophila* doublesex gene is transcribed into sex-specific mRNA isoforms in the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol. Ser. B* 128, 145-158, 2001.
- 36) Abe, H., Ohbayashi, F., Sugasaki, T., Kanehara, M., Terada, T., Shimada, T., Kawai, S., Mita, K., Kanamori, Y., Yamamoto, M.-T. and Oshiki, T.: Two novel Pao-like retrotransposons (Kamikaze and Yamato) of the silkworm *Bombyx mori* and *B. mandarina* and the common structural feature of Pao-like element. *Mol. Gen. Genet.* 265, 375-385, 2001.
- 37) Yamauchi, M., Tsuji, S., Mita, K., Saito, T. and Morimyo, M.: A novel minisatellite repeat expansion identified at FRA16B in a Japanese carrier. *Genes Genet. Syst.* 75, 149-154, 2000.
- 38) Quan, G.-X., Mita, K., Okano, K., Shimada, T., Ugajin, N., Goto, N., Kannke, E. and Kawasaki, H.: Isolation and particular expression of ecdysteroid-inducible angiotensin-converting enzyme-related gene in wing discs of *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.* 31, 97-103, 2001.
- 39) Okano, K., Shimada, T., Mita, K. and Maeda, S.: Comparative expressed-sequence-tag analysis of differential gene expression profiles in BmNPV-infected BmN cells. *Virology* 282, 916-924, 2001.
- 40) Suzuki, M. G., Ohbayashi, F., Mita, K. and Shimada, T.: The mechanism of sex-specific splicing at the doublesex gene is different between *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. in press, 2001.
- 41) Shimada, Y., Nishimura, M., Kakinuma, S., Takeuchi, T., Ogiu, T., Suzuki, G., Nakata, Y., Sasanuma, S., Mita, K. and Sado, T.: Characteristic association between *K-ras* gene mutation with loss of heterozygosity in X-ray-induced thymic lymphomas of the B6C3F1 mouse. *Int. J. Radiat. Biol.* 77, 465-473, 2001.
- 42) Matsumoto S, Yoshiga T, Yokoyama N, Iwanaga M, Koshiba S, Kigawa T, Hirota H, Yokoyama S, Okano K, Mita K, Shimada T, Tatsuki S.: Characterization of acyl-CoA-binding protein (ACBP) in the pheromone gland of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol.* 31, 603-609, 2001.
- 43) Landais, I., Pommet, J.-M., Mita, K., Nohata, J., Gimenez, S., Fournier, P., Devauchella, G., Duonor-Cerutti, M. and Ogliastro, M.H.: Characterization of the 90-kDa heat shock protein coding genes in the Lepidoptera *Bombyx mori* and *Spodoptera frugiperda*. *Gene* 271, 223-231, 2001.
- 44) Neno, M., Ichimura, S., Mita, K., Yukawa, O. and Cartwright, I.L.: Regulation of the catalase gene promoter by Sp1, CCAAT-recognizing factors, and a WT1/Egr-related factor in hydrogen peroxide-resistant HP100 cells. *Cancer Research*, in press, 2001.
- 45) Nirmala, X., Mita, K., Vanisree, V., Zurovec, M. and Sehna, F.: Identification of four small molecular mass proteins in the silk of *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.* 10, in press, 2001.

- 46) Gan, H., Wang, Y., Jiang, H., Mita, K. and Kanost, M.R.:
A bacteria-induced, intracellular serpin in granular hemocytes
of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 887-898,
2001.

2. モデル生物ゲノムの構造と機能解明に関する調査研究

森明充興、東智康、本郷悦子（第2研究グループ）、味村正博（重点研究支援協力員）

Genome Analysis on Model Organisms

Mitsuoki Morimyo, Tomoyasu Higashi, Etsuko Hongo and ¹Masahiro Ajimura

Genome Research Group, ¹Priority Research Supporting Staff

In a study of the structure and function of the housekeeping genes of eukaryotic cells, we chose *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) as a model organism. It is assumed to have 6,000 genes and 14 megabases (Mb) compared to 40,000 genes and 3,000 Mb for humans. In spite of the greater numbers for humans, *S. pombe* can be used as a model organism for humans. Because, its genes are similar to human genes which can be normally expressed in yeast, its housekeeping genes are considered to be conserved through eukaryotic evolution and many of its genes have introns which make cDNA sequences essential to determine physical organization of genes from the genomic DNA sequence. Moreover, the functions of *S. pombe* genes are easily identified by disrupting them with homologous recombination.

1) As the cDNA analysis and its application for gene function analysis, we have analyzed 12,000 cDNA clones made by mRNA prepared from late log phase cells of *S. pombe* and identified over 2,500 genes (900 similar clones with known genes and 1800 newly found clones). Among the cDNA

clones, 8,118 were deposited with the DDBJ and opened on the WWW homepage of NIRS (<http://133.63.36.123/~dclust/index.html>). We obtained various kinds of cDNAs without bias. To learn gene functions of these genes, cDNA were spotted on a membrane filter and gene expression was examined by Northern hybridization with mRNA extracted from stress-treated cells. Many candidate genes were identified by stresses such as X-ray radiation, hydrogen peroxide, UV, and heat treatments. Among them, c492 clone was induced by X-ray radiation.

2) Genome analysis of chromosome III of *S. pombe* was finished and revealed the structure and function of various genes related to radiation-sensitivity. By using cDNA clones mapped on the chromosome III of *S. pombe*, we determined DNA sequence of chromosome III by a BAC library of *S. pombe* prepared by Osoegawa (Children's Hospital Oakland Research Institute). First, we made a BAC contig map by Southern hybridization of BAC clones with cDNA clones mapped on chromosome III. Then, we selected a minimum set of 20 BAC clones covering the chromosome III, followed by a shotgun sequencing. The DNA sequence determined was confirmed to be more than 99.99 % accurate. We identified an ORF found in an assembled DNA sequence as a gene by a gene-finding program and by homology search in public and our cDNA databases. We finished sequencing 20 BAC clones covering 2,482.668 kb at a redundancy of 8. By these analyses, genes were identified to number 1162 and an average protein-coding region was estimated to be 2,137 bp. About half

genes identified were hit by homology search in cDNA database, which had information how frequently a gene is expressed. Integrating these information about gene location on the chromosome and its relative gene expression into the genetic map made the gene expression map of *S. pombe* chromosome III. A systematic disruption of 10 genes related to radiation sensitivity was done and *mutS* mutant exhibited an increased mutation frequency except *rad8*, *recQ* and *Ku70* genes, an indication that there are some unknown pathways related to radiation sensitivity. *S. pombe* will provide a very useful system to identify genes related to radiation sensitivity, to clone human homologues and to know their functions.

1. 緒言

生命現象を解明するために、一つの生物が持つ全遺伝情報の解明を目指すゲノム計画が大腸菌、出芽酵母、線虫、ショウジョウバエ、マウス及びヒトといった種々の生物種で進められている。分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) も例外ではない。分裂酵母は最も単純な真核生物の仲間で、ゲノムサイズ14 Mb、遺伝子総数6000で、その殆どは増殖に必要な housekeeping gene と考えられている。遺伝子発現の調節はヒトに類似しているため、細胞分裂に関わるヒト *CDC2* 遺伝子が分裂酵母にヒト遺伝子を導入する種間相補の方法で分離されている。また、遺伝子破壊による機能解析も容易で、新規遺伝子の機能解析にも適している。最近の出芽酵母ゲノム解析から、遺伝子のうち約半数は機能不明であることが解ってきた。一方、ヒト疾患遺伝子のホモログが酵母で同定されていることな

どを考えると、分裂酵母はヒト遺伝子機能を解析できる大変有利な性質を持つと言える。また、分裂酵母遺伝子の30~40%はイントロンを持ち、出芽酵母の場合の2%に比べヒトなどほ乳類に近い事を示している。その半面、ゲノム解析から遺伝子を同定するにはcDNAデータが必須である。これらの理由から、我々は分裂酵母をヒト細胞のモデルとして捉えながら遺伝子のカタログ化やゲノム解析を進めて、真核生物の housekeeping gene の構造と機能の解明を目的とした研究を行った。DNA修復や細胞周期の調節といった放射線感受性に最も関連の深い遺伝子群は、生物が誕生以来保持している最も基本的な生体防御遺伝子であり重要な housekeeping gene である。本研究はこれら放射線感受性に関連する遺伝子の構造と機能の解明を目指した。

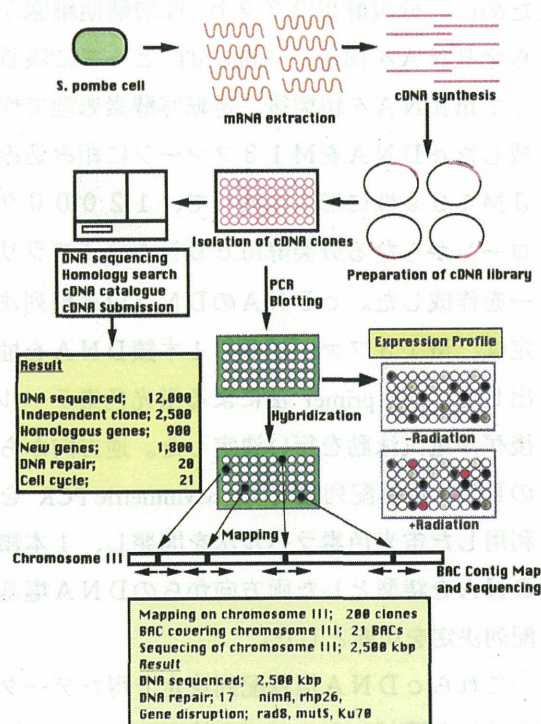


Fig. 1. *S. pombe* cDNA, genome sequence and gene expression analyses.

In a study of the structure and function of housekeeping genes of *S. pombe*, analyses of cDNA, genome sequence and gene expression were done. We extracted mRNA from *S. pombe* cells, prepared cDNA by a reverse transcriptase and made a cDNA library of 12,000 clones. All the cDNA clones were sequenced by a single run and classified into 2,500 independent groups by homology search among them.

Independent clones searched in public databases revealed 21 DNA repair genes, 21 cell cycle genes, 20 protein kinase genes, etc. Those cDNA clones were deposited with DDBJ and opened on the NIRS web site (<http://133.63.36.123/~dclust/index.html>). By using these independent clones mapped on chromosome III as an anchor site, the genome sequencing of chromosome III was done and revealed that it contained 2,482,668 kb and 1162 genes except both ends carrying tandem repeats of rDNA gene. A high-density cDNA filter spotted with cDNAs was used to analyze gene expression by various stresses such as X-ray radiation, hydrogen peroxide, heat and UV.

2-1. 分裂酵母 cDNA 解析

(1) 目的

真核生物の生存に必須な housekeeping gene の網羅を目指し、最も単純な真核生物である分裂酵母をモデルとして cDNA 解析を進め、放射線感受性に関連する遺伝子群をカタログ化すると共に高密度 cDNA フィルターを作成して遺伝子発現解析を行い、新規放射線感受性遺伝子の同定と機能解明を目指す。

(2) 実験方法

分裂酵母で発現している遺伝子を網羅するために、分裂酵母 972h⁻株増殖期細胞から全 RNA を抽出、oligo dT ビーズに吸着して mRNA を精製後、逆転写酵素処理で作成した cDNA を M13 ファージに組み込み JM109 株に形質転換して、12000 クローンからなる分裂酵母 cDNA ライブラリーを作成した。cDNA の DNA 塩基配列決定は、M13 ファージから 1 本鎖 DNA を抽出して、dye primer 法による蛍光色素ラベル後ゲル電気泳動を行い決定した。逆方向からの DNA 塩基配列決定は、asymmetric PCR を利用した蛍光色素ラベル法を開発し、1 本鎖 DNA を鋳型とした両方向からの DNA 塩基配列決定を可能とした。

これら cDNA 塩基配列決定で得たデータを基に公開データベースを検索し、アミノ酸配列で 30% 以上の類似性を持つ時有効な類似性を持つ遺伝子と定義して整理し、分裂酵母 cDNA データベースを作成し、DDBJ

への登録と放医研ホームページ (<http://133.63.36.123/~dclust/index.html>) での公開を行った。

cDNA の半数以上は新規で機能未知な遺伝子のため、cDNA をスポットした高密度 cDNA フィルターを作成し、放射線や活性酸素等のストレスに应答する遺伝子の同定と機能解明を目指した遺伝子発現解析を行った。

(3) 結果と考察

分裂酵母 cDNA の解析及びそれらを利用したゲノム解析と遺伝子発現解析全体の概略を図 1 に示した。分裂酵母 cDNA ライブラリー 12000 クローン全ての DNA 塩基配列を決定し、公開された DNA や蛋白質のデータベースとの類似性を調べた結果を図 2 に示す。機能既知遺伝子と同一か類似している遺伝子が約半数の 4700 クローンで、既知遺伝子と全く類似性を持たない新規遺伝子が同じく半数の 4700 クローンであった。c

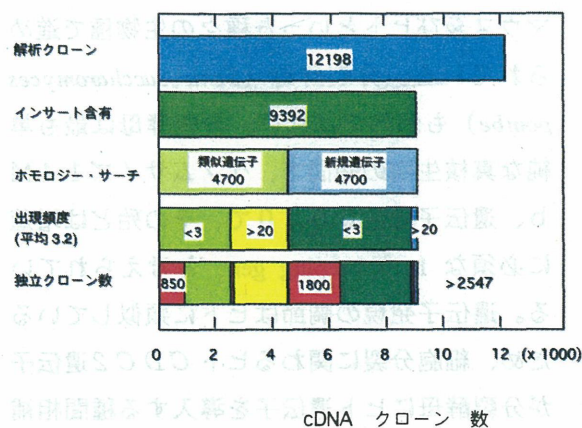


Fig. 2. Homology search analysis of *S. pombe* cDNA clones.

S. pombe cDNA clones of 12,198 were sequenced and 9,392 clones containing insert DNA were used for homology search. About half clones were identified homologous clones to have more than 30% homology with proteins deposited in public databases and the rest were new without homology with known proteins. By homology search among cDNA clones, we classified them into 2,500 independent clones with an average redundancy of 3.2.

DNA 同志の類似性を検索した結果、相互に類似性を持たない独立の cDNA クローンの

数が2500以上得られた。分裂酵母の全遺伝子数は6000程度と推定されているので、約40%の遺伝子を網羅した事になる。遺伝子発現量との関係を見ると、発現量の多いクローンではほとんどの遺伝子が既知であるが、発現量の低い遺伝子はかなり数の部分が新規遺伝子であった。発現量の多い遺伝子や蛋白質は分離・解析しやすく既知となるため、当然の結果といえる。インサートを持つクローン総数は約9000だったので平均出現頻度は3.2となる。最も高い出現頻度を示したのはグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子で133クローン得られ、cDNA全体の1.5%がこの遺伝子であった。この蛋白質は酵母細胞の10~20%を占める程多量に生産されていることが知られている。この解析では、cDNAライブラリーに含まれる総てのクローンを解析したので、クローン出現頻度がその遺伝子の発現頻度を反映していると考えられ、多数の同一クローン解析の結果は、増殖期の遺伝子発現プロフィールという意味のあるデータになった。これらcDNAを公開データベースと比較した結果、機能既知の遺伝子は約900クローンで、蛋白質合成に関連する転写因子、翻訳因子、リボソーム蛋白質遺伝子群や、修復、組換え、細胞分裂、熱ショック蛋白質、プロテイン・カインース、ヘリケース、構造蛋白質、ミトコンドリア関連遺伝子等あらゆる遺伝子群を網羅していた。放射線感受性に関連する遺伝子を表1に示した。これらcDNA解析のな

Yeast	Gene	Function	S. pombe	Mouse	Human
DNA Repair					
YPL022w	RAD1	UV endonuclease/processor of the nucleotide excision repair system	RAD1(6325)SPC0370_12	ERCC1(4291)	ERCC1(4291)
YDL164c	CDG3	DNA ligase I	DNL1(4498)SPC017_1	DNL1(4284)MAM19504_1	DNL1(4141)HUM164A_1
YER162c	RAD4	nucleotide excision repair protein	*SPC043_1(102%)	XPC(2736)MAM17399_1	XPC(2009)
YKR095w	MLP1	protein kinase	*SPC0165_1(521%)	PRB(4106)MAM17399_1	PRB(4106)MAM17399_1
YBR114w	RAD12	nucleotide excision repair protein	SPC0313_1(104%)	AF101316_1(102%)	AF101316_1(102%)
YJR055w	RAD7	nucleotide excision repair protein	SPC0309_1(22%)	SPC0309_1(22%)	SPC0309_1(22%)
YDL101c	DUN1	DNA damage response protein kinase	SPC0188_1(100%)	CHQ2(2834)MAM19504_1	CHQ2(2834)MAM19504_1
YPL153c	RAD52	homologous recombination protein	CDR1(2834)SPC0188_1(100%)	CHQ2(2834)MAM19504_1	CHQ2(2834)MAM19504_1
YAL015w	FLN30	negative regulatory element in the process of UV damage repair	*SPC01235_1(527%)	MMETL1A_1(143%)	MMETL1A_1(143%)
YLR059w	SSLT	transcription initiation factor TFIIB subunit, factor 2	TFIIB(4746)SPC0188_1(100%)	TFIIB(4746)SPC0188_1(100%)	TFIIB(4746)SPC0188_1(100%)
Recombination and Repair					
YDL164c	CDG3	DNA ligase I	DNL1(4498)SPC017_1	DNL1(4284)MAM19504_1	DNL1(4141)HUM164A_1
YJR055w	RAD26	DNA repair and recombination protein	SPC0313_1(104%)	RAD26(2131)MAM17399_1	ERCC1(4291)
YMR284w	YKU70	DNA binding protein	SPC0128_1(22%)	KU70(2131)MAM17399_1	KU70(2131)
YBR114w	RAD12	nucleotide excision repair protein	SPC0313_1(104%)	AF101316_1(102%)	AF101316_1(102%)
YLR385w	RFC1	replication fork protein	RFC1(2834)SPC0165_1(521%)	RFC1(2834)MAM19504_1	RFC1(2834)MAM19504_1
YDR097c	MSH6	DNA mismatch repair protein	MSH6(2131)MAM17399_1	MSH6(2131)MAM17399_1	MSH6(2131)MAM17399_1
YML021c	UNG1	uracil-DNA glycosylase	UNG1(4746)SPC0188_1(100%)	UNG1(4746)SPC0188_1(100%)	UNG1(4746)SPC0188_1(100%)
Cell Cycle and Mitosis					
YFL029c	CAK1	cell cycle activating protein kinase	SPC0188_1(100%)	CDK2(2834)	CDK2(2834)
YOL225c	QCS1	ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein	SPC0309_1(22%)	QCS1(2834)MAM19504_1	QCS1(2834)MAM19504_1
YMR095w	TAP42	cytoskeletal protein	SPC0309_1(22%)	MLL(4106)MAM17399_1	MLL(4106)MAM17399_1
YPL010c	PHO85	cytoskeletal protein kinase	SPC0188_1(100%)	MLL(4106)MAM17399_1	MLL(4106)MAM17399_1
YKL017c	IKC1	DNA ligase I	SPC0128_1(22%)	IKC1(2834)	IKC1(2834)
YDR175w	SUP35	nucleotide excision repair protein	SPC0128_1(22%)	SPC0128_1(22%)	SPC0128_1(22%)
YFL087c	UCP7	involved in cell cycle	SPC0128_1(22%)	UCP7(2834)MAM17399_1	UCP7(2834)MAM17399_1
YLL018w	SDC25	GTP/GDP exchange factor (GEF)	SPC0128_1(22%)	SDC25(2834)	SDC25(2834)
YNL007c	SIS1	histone protein	SPC0128_1(22%)	SIS1(2834)	SIS1(2834)
YJL080c	SCP160	involved in maintenance of yeast ploidy	*SPC0309_1(22%)	SCP160(2834)	SCP160(2834)
YML104c	MLM1	histone protein	SPC0128_1(22%)	MLM1(2834)	MLM1(2834)
YDR292c	SSD1	involved in the tolerance to high concentration of Ca ²⁺	SPC0128_1(22%)	SSD1(2834)	SSD1(2834)
YNL189w	SRP1	involved in alpha chain	SPC0128_1(22%)	SRP1(2834)	SRP1(2834)
YMR294w	JNM1	involved in protein, involved in nuclear migration	SPC0128_1(22%)	JNM1(2834)	JNM1(2834)
YKR048c	NAP1	nucleosome assembly protein	SPC0128_1(22%)	NAP1(2834)	NAP1(2834)
YOL047w	STB4	histone protein	SPC0128_1(22%)	STB4(2834)	STB4(2834)
YDR047w	STB4	histone protein	SPC0128_1(22%)	STB4(2834)	STB4(2834)
YDR055c	DBF4	DNAI2: regulatory subunit for Cdc12 protein kinase	DBF4(2834)SPC0128_1(22%)	DBF4(2834)SPC0128_1(22%)	DBF4(2834)SPC0128_1(22%)
YGR098c	ESP1	involved in regulation of spindle pole body duplication	ESP1(2834)SPC0128_1(22%)	ESP1(2834)SPC0128_1(22%)	ESP1(2834)SPC0128_1(22%)
YGR188c	BLU1	chromatin-associated protein	BLU1(2834)SPC0128_1(22%)	BLU1(2834)SPC0128_1(22%)	BLU1(2834)SPC0128_1(22%)
YML048w	SAP155	histone protein	SPC0128_1(22%)	SAP155(2834)	SAP155(2834)
YFL200c	PLP1	histone protein	SPC0128_1(22%)	PLP1(2834)	PLP1(2834)
YMR104c	YPK2	histone protein	SPC0128_1(22%)	YPK2(2834)	YPK2(2834)
YPL153c	RAD52	homologous recombination protein	CDR1(2834)SPC0188_1(100%)	CHQ2(2834)	CHQ2(2834)
YJL153c	SHW1	histone protein	SPC0128_1(22%)	SHW1(2834)	SHW1(2834)
YML001w	DMG4	involved in mitosis and meiosis	DMG4(2834)SPC0128_1(22%)	DMG4(2834)SPC0128_1(22%)	DMG4(2834)SPC0128_1(22%)
YKL178c	HMT1	histone protein	SPC0128_1(22%)	HMT1(2834)	HMT1(2834)
YDL125c	HMT1	histone protein	SPC0128_1(22%)	HMT1(2834)	HMT1(2834)
YFR040w	SAP155	histone protein	SPC0128_1(22%)	SAP155(2834)	SAP155(2834)
YKR040w	SAP155	histone protein	SPC0128_1(22%)	SAP155(2834)	SAP155(2834)
YGL229c	SAP4	histone protein	SPC0128_1(22%)	SAP4(2834)	SAP4(2834)
YJL098w	SAP155	histone protein	SPC0128_1(22%)	SAP155(2834)	SAP155(2834)
YMR188w	CK1	histone protein	SPC0128_1(22%)	CK1(2834)	CK1(2834)
YGR047c	CDG3	DNA ligase I	SPC0128_1(22%)	CDG3(2834)	CDG3(2834)
YJL013c	MLM1	histone protein	SPC0128_1(22%)	MLM1(2834)	MLM1(2834)
YGR231c	PHB2	histone protein	SPC0128_1(22%)	PHB2(2834)	PHB2(2834)
YLR321c	SPH1	histone protein	SPC0128_1(22%)	SPH1(2834)	SPH1(2834)
YDL165w	CDG3	DNA ligase I	SPC0128_1(22%)	CDG3(2834)	CDG3(2834)
YDL058w	CDG3	DNA ligase I	SPC0128_1(22%)	CDG3(2834)	CDG3(2834)
Stress Response					
YGR088w	CTT1	CATALASE	SPC0128_1(22%)	MUSCATAL_1(141%)	HSCATG1_1(141%)
YEL059c	CYC7	cytochrome c, hsp-2	SPC0128_1(22%)	MMCYC7_1(161%)	HUMCYC7A_1(160%)
YER062c	HOR2	(5L)-glycerol-3-phosphate	SPC0128_1(22%)	HOR2(2834)	HOR2(2834)
YGR021c	HSP90	heat shock protein	SPC0128_1(22%)	HSP90(2834)	HSP90(2834)
YJL016c	MDJ1	heat shock protein	SPC0128_1(22%)	MDJ1(2834)	MDJ1(2834)
YGR103w	SSA4	heat shock protein of HSP70 family, cytosolic	SPC0128_1(22%)	SSA4(2834)	SSA4(2834)
YDR283c	SSD1	involved in the tolerance to high concentration of Ca ²⁺	SPC0128_1(22%)	SSD1(2834)	SSD1(2834)
YOL044c	MET22	histone protein	SPC0128_1(22%)	MET22(2834)	MET22(2834)
YOL000w	PTC1	histone protein	SPC0128_1(22%)	PTC1(2834)	PTC1(2834)
YBR052w	MDJ1	heat shock protein	SPC0128_1(22%)	MDJ1(2834)	MDJ1(2834)
YGR027w	STB1	histone protein	SPC0128_1(22%)	STB1(2834)	STB1(2834)

Table 1. *S. pombe* cDNA clones related to radiation sensitivity

Analysis of 12,000 cDNA clones of *S. pombe* revealed cDNA clones related to DNA repair, cell cycle, protein kinase, protein synthesis, etc. This table shows the clones related to radiation sensitivity and their homology with known genes of *S. cerevisiae*, mouse and human.

かで、予想外の発見も散見された。例えば、発現量の多い遺伝子は総て網羅していると思われるが、50回以上出現する翻訳伸長因子EF I- α の3つのアイソマーA, B, Cが3本の染色体各々に存在する事が確認された。特に、EF I- α Bは紫外線照射で遺伝子発現が増加し、DNA修復との関連が示唆された。また、100を越すリボソーム遺伝子は総て網羅していた。特に、リボソームS32遺伝子では多数のcDNAのなかにスプライシングの中間体が存在し、mRNA前駆体ができ、polyA tailが付加され、イントロンが切り出されてmRNAが完成するという順序

が確立できた。

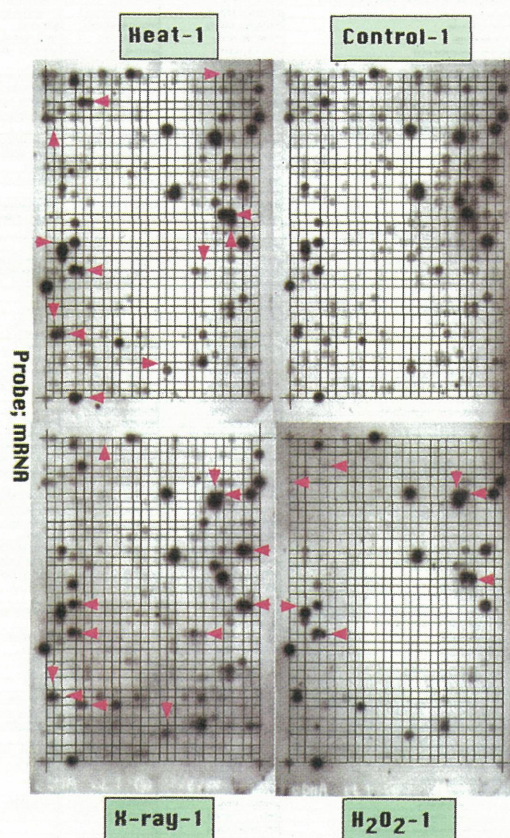


Fig. 3. Gene expression by various stresses.

A high-density cDNA filter prepared by spotting cDNA amplified with PCR was hybridized with 32 P-labeled mRNA extracted from cells treated with various stresses such as X-ray radiation, heat shock, hydrogen peroxide and UV. Arrows indicate the increase or decrease of gene expression compared with control.

残りの1800クローンは、機能未知の遺伝子群やORF (open reading frame) が得られないため3'-UTRや5'-UTR等の非翻訳領域を含むクローンと考えられる。これら新規遺伝子の機能解析を目指し、高密度cDNAフィルターを作成して遺伝子発現解析を行った。図3には、放射線や活性酸素、紫外線等のストレス処理後に得られたmRNAを用いた遺伝子発現解析の結果を示す。約5%の遺伝子に顕著な遺伝子発現の変化が見られた。ストレス非処理細胞での遺伝子発現量は、発現の多少で約300倍の開きがある。cDNA解析の結果では約150倍であり、相対的

にも良い一致を示していた。放射線応答遺伝子としてc492クローンが発見されたが、Northern hybridizationで放射線誘導性が確認できた。

2-2. 分裂酵母ゲノム解析

(1) 目的

分裂酵母全遺伝子のカタログ化を目指したcDNA解析で、推定6000遺伝子の約40%強となる2500個の独立のcDNAを同定してきた。発現遺伝子であるcDNA解析だけでは、全遺伝子のカタログ化は不可能であることから、ゲノム解析で全遺伝子網羅を目指すと共にそれら遺伝子機能の解析を遺伝子破壊法で検討する。

(2) 方法

分裂酵母は3本の染色体を持つ。第1、第2染色体はすでに世界でゲノム解析に着手していたため、3.5Mbと最小である第3染色体のゲノム解析を行った。方法は、第3染色体にマップされるcDNAクローンを同定し、対応するゲノムクローンを得て物理地図を作成し、ゲノム全体のDNA塩基配列決定を目指すものである。パルスフィールドゲル電気泳動で分離した第3染色体DNAをプローブとして、cDNAをスポットした高密度cDNAフィルターでSouthern hybridizationを行い、第3染色体にマップされる200cDNAクローンを同定した。また、分裂酵母のゲノムライブラリーは小副川博士（オークランド小児病院研究所）との共同研究として作成した分裂酵母のBACライブラリー（33倍ゲノム量）と入ファージで作成したゲノムライブラリー（11倍ゲノム量）を用いた。DNA塩基配列の決定は、DNAをDNase I

で部分分解後、蔗糖密度勾配遠心で約2 kbのDNA断片を回収してサブクローニングするショットガン法で行った。平均8倍の重複度でサブクローンのDNA塩基配列決定を行い、primer walkingやreverse sequencingで非連続部分を補完して完成させた。ゲノムDNA塩基配列から遺伝子の予測・同定は、分裂酵母の遺伝子予測プログラムと公開データベース及び我々のcDNAデータベースとの一致から決定した。

(3) 結果と考察

分裂酵母の第3染色体にマップされるcDNAクローン等を用いて、第3染色体をカバーするBACクローンを分離し、contig mapを作成すると共に、最少数で全体をカ

バーする20個のBACクローンを選出した(図4)。これら20個のBACクローンのDNA塩基配列をショットガン法で決定した。BACクローンは160~180 kbの分裂酵母DNAを含み、各BACクローンからサブクローン2000個を取り、6~15倍の重複度でDNA塩基配列を決定した。現在、20個全てのBACクローンのDNA塩基配列を終了し、両端rDNA領域を除く連続2,482,668 bpを決定した。遺伝子予測プログラムと公開及びcDNAデータベース検索により、1162遺伝子を同定した結果を表2に示す。第3染色体

Table 2. Genome sequencing of *S. pombe* chromosome III.

BAC clone	DNA sequence determined (bp)	Protein coding gene No
8P13	113,742	35
4A24	153,458	56
5D6	156,368	52
1F4	195,071	67
7J10	155,362	68
5L20	173,263	59
4A4	175,965	63
6H17	150,554	57
5A3	164,655	71
8H15	139,891	28
5M3	168,228	63
5M6	176,582	69
2D16	153,309	56
2O21	173,757	67
5N15	185,986	77
7M4	160,447	55
6D2	138,701	53
7D22	157,487	69
3J10	171,027	63
6A22	118,268	34
Sum	3,182,121	
	2,482,668 (-overlap)	1162 (-overlap)

Table 2. Genome sequencing of *S. pombe* chromosome III.

The nucleotide sequence of minimum set of BAC clones carrying *S. pombe* chromosome III was determined by a shotgun sequencing and genes were identified by homology search of ORFs deduced from DNA sequences in public and cDNA databases and by a gene-finding program specific for *S. pombe*. Except both end regions containing tandem repeats of rDNA gene, it contained 2,482,668 kb and 1162 genes, thus 2137 bp/gene.

では平均2137 bp/遺伝子、ゲノム全体の予測である2~2.5 kb/遺伝子と一致する。これら遺伝子の位置情報とcDNA解析の遺伝子発現量の情報及び遺伝子

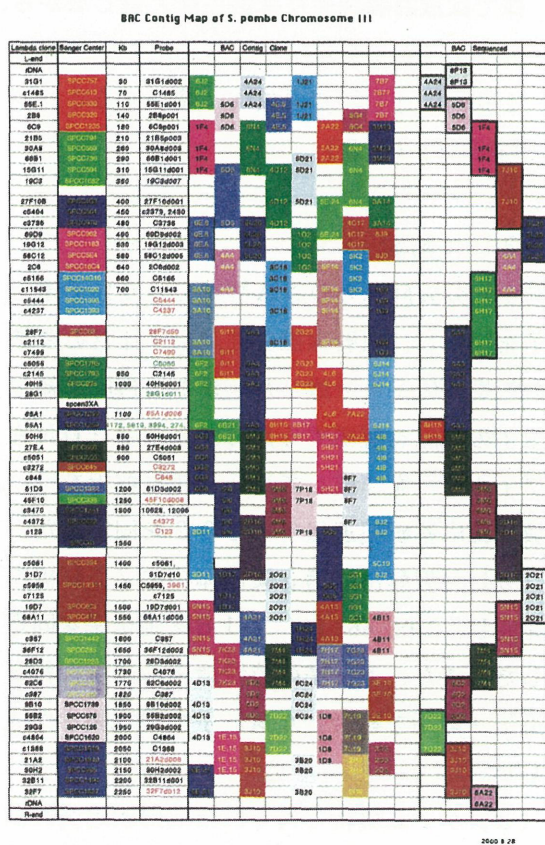


Fig. 4. BAC contig map of *S. pombe* chromosome III.

S. pombe BAC genomic library carrying about 160 kb insert DNA was used to make a physical map of chromosome III. A high-density filter spotted with BAC clones was hybridized with cDNA clones mapped on chromosome III and a contig map was made. A minimum set of 20 BAC clones covering chromosome III was selected for a shotgun DNA sequencing.

地図情報を組み込んだ遺伝子発現地図を作成した(図5)。

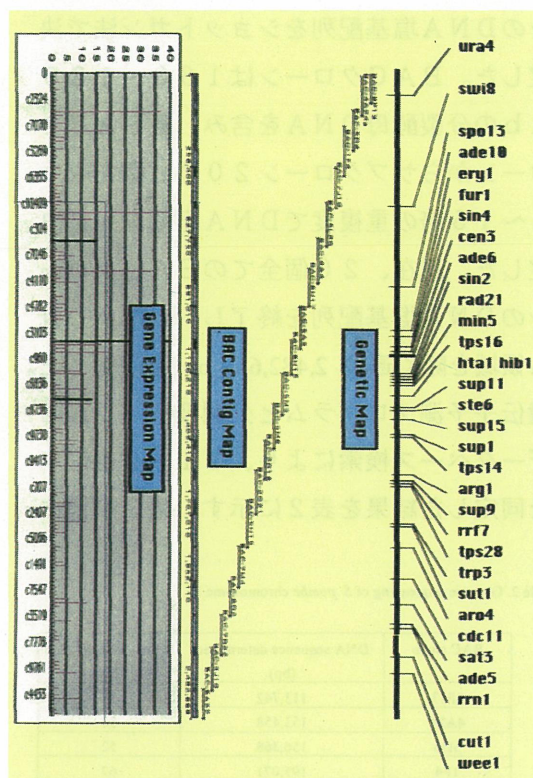


Fig. 5. Gene expression map of *S. pombe* chromosome III.

Genome sequencing of *S. pombe* chromosome III was done by a shotgun sequencing of BAC clones and genes were identified by the use of gene-finding program specific for *S. pombe* and by homology search in public and cDNA databases. Analysis of cDNA clones brought information about the relative expression frequency of genes. Combining these two information with the genetic map of *S. pombe* chromosomes, we made a gene expression map of *S. pombe* chromosome III.

ゲノム解析で同定した遺伝子機能の解明のためには、系統的な遺伝子破壊法を確立する必要がある。分裂酵母は出芽酵母より相同組換え頻度が低いため、ターゲット遺伝子領域を含むサブクローンを選び、この中に遺伝子破壊用マーカー遺伝子 *ura4neo* を組み込んだプラスミドを作成して相同組換えを行い遺伝子破壊株を作成した。放射線感受性既知遺伝子と類似する10個の遺伝子を対象に遺伝子破壊を試みた。4個の遺伝子、*rad8*, *recQ*, *Ku70*, *mutS* で遺伝子破壊株を作成し、放射線感受性やカナマイシン耐性突然変異頻度を調べた。3種類の遺

Plate	Wild	RAD8	Ku70	MutS
YE	4.8×10^{-6}	3.1×10^{-6}	3.0×10^{-6}	2.7×10^{-6}
CAN	5	4	10	81
CAN ^R freq	1.0×10^{-6}	1.2×10^{-6}	3.3×10^{-6}	30×10^{-6}

YE; 5 g yeast extract, 30 g glucose and 20 g agar per liter
CAN; 20 µg/ml canamycin in YE agar

Table 3. Spontaneous mutation frequencies of gene disruptants.

From homology search of ORFs deduced from DNA sequences determined, we found 10 candidate genes related to DNA repair and disrupted them by a homologous recombination. We introduced a *ura4neo* gene to disrupt a target gene *in vitro* and transformed it in a wild-type strain. The gene disruption was confirmed by Southern hybridization and PCR. This table shows the result of 3 candidate genes related to radiation-sensitivity. None of these mutants showed radiation-sensitivity and only a *mutS* mutant exhibited a reduced frequency of spontaneous mutation.

伝子破壊変異株 (*rad8*, *recQ*, *Ku70*) では放射線感受性や突然変異性に変化は見られなかった。これら遺伝子はそれぞれ他の類似機能を持つ遺伝子が、*recQ* は、機能的に相補することが示唆されている。*mutS* 変異株では放射線感受性は野生株と同じながら、カナマイシン耐性突然変異頻度が野生株の10倍に達し、変異生成に関与することが判明した(表3)。

3. 結論

(1) 分裂酵母 cDNA 解析で 40% の遺伝子を網羅し、放射線感受性遺伝子を含む多数の新規遺伝子を分離した。また、機能未知遺伝子の機能を解明するために高密度 cDNA フィルターを作成して遺伝子発現解析を行い、放射線応答新規遺伝子 c 492 を同定した。

(2) 分裂酵母の第3染色体のゲノム解析を完成し、2,482.668 kb、1162 遺伝子を同定した。また、遺伝子の位置情報、発現情報と遺伝子地図を統合した遺伝子発現地図を作成した。

(3) ゲノム解析で得られた放射線感受性候補10遺伝子の遺伝子破壊により、*Ku70*, *rad8*, *mutS* 突然変異株を作成した。*Ku70*, *rad8*, *mutS* 共に放射線感受性に変化はなく、別の遺伝子

と共通の機能を持つと推定された。*mutS* の自然突然変異率は明瞭に上昇し、ミスマッチ修復に関与することが判明した。

4. 研究発表

1. Morimyo, M., & Mita, K. (1993). A simple and rapid amplification procedure for cDNA cloned in dephosphorylated plasmid. *Nucleic Acids Res.*, **21**(7), 1679-1680.
2. Morimyo, M., Machida, I., Hongo, E., & Hama-Inaba, H. (1993). The radM12 gene of *S. pombe* encoding a new ubiquitin conjugating enzyme. In 17th International Congress of Genetics, Birmingham.
3. Mita, K., Morimyo, M., & Hongo, E. (1994). One step DNA sequencing of single-stranded DNA with reverse dye-primer. *Nucleic Acids Res.*, **22**(8), 1507-1508.
4. Hongo, E., Morimyo, M., Mita, K., Machida, I., Hama-Inaba, H., Tsuji, H., Ichimura, S., & Noda, Y. (1994). The methyl viologen-resistance-encoding gene *smvA* of *Salmonella typhimurium*. *Gene*, **148**, 173-174.
5. Morimyo, M., Hongo, E., Mita, M., Hama-Inaba, H., & Machida, I. (1994.12). Cloning of stress-inducible genes of *S. pombe*. In American society for Cell Biology 34th Annual Meeting, San Francisco.
6. Morimyo, M., Mita, K., Hongo, E., Sugaya, K., Higashi, T., Yamauchi, M., Tsuji, S., Park, W., & Hirayama, Y. (1995.12). cDNA catalog of fission yeast *S. pombe*. In 34th Annual Meeting of American Society for Cell Biology, Washington DC.
7. Morimyo, M., Mita, K., Hongo, E., Yamauchi, M., Tsuji, S., Park, W., & Yoneda, K. (1995.9). Cloning of DNA repair genes of *S. pombe*. In 10th ICRR, Wurzburg.
8. Morimyo, M., Mita, K., Hongo, E., Sugaya, K., Higashi, T., Yamauchi, M., Tsuji, S., & Park, W. (1995.9). *S. pombe* cDNA project. In The Molecular Biology Conference, San Diego
9. 森明充興, 三田和英, 東友康, 菅谷公彦, 本郷悦子, 味村正博, 笹沼俊一, 野畑順子, 木村輝美, 井上広美, 石原よし江, 小池淑子 (1997). 分裂酵母. 蛋白質核酸酵素, **42**, 2920-2926.
10. Mita, K., Morimyo, M., Ito, K., Sugaya, K., Ebihara, K., Hongo, E., Higashi, T., Hirayama, Y., & Nakamura, Y. (1997). Comprehensive cloning of *Schizosaccharomyces pombe* genes encoding translation elongation factors. *Gene*, **187**, 259-266.
11. Mita, K., Morimyo, M., Hongo, E., Higashi, T., Sugaya, K., Ishihara, Y., Sasanuma, S., Nohata, J., Kimura, T., Ito, K., & Nakamura, Y. (1997.12.). Distinct differences in intron structure of ribosomal protein genes between fission and budding yeasts. In 37th American Society for Cell Biology, Washington DC.
12. Morimyo, M., Mita, K., Hongo, E., Higashi, T., Sugaya, K., Ajimura, M., Yamauchi, M., Tsuji, S., Sasanuma, S., Nohata, J., Kimura, T., Inoue, H., & Ishihara, Y.: Identification of ESTs and their application for the genome sequencing of chromosome III of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **13**, S258. (1997.4).
13. Morimyo, M., Mita, K., Hongo, E., Higashi, T., Sugaya, K., Ajimura, M., Yamauchi, M., Tsuji, S., Park, W.-Y., Sasanuma, S., Nohata, J., Kimura, T., Inoue, H., & Ishihara, Y. (1998). cDNA catalog of fission yeast (*Schizosaccharomyces*

- pombe) and its application for cloning of mammalian DNA repair gene. In T. Ozawa Hori, T., Tatsumi, K. (Ed.), Biodefence mechanisms against environmental stress (pp. 115-123). Tokyo and Heiderberg: Kodansha and Springer-Verlag.
14. Krien, M., Bugg, S., Palatsides, M., Asouline, G., Morimyo, M., & O'Connell, M. (1998). A NIMA homologue promotes chromatin condensation in fission yeast. *J. Cell Sci.*, **111**(7), 967-976.
15. Yasuhira, S., Morimyo, M., Yasui, A.: Transcription dependence and the roles of two excision repair pathways for UV damage in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe.*, *J. Biol. Chem.* **274**, 26822-26827 (1999).
16. Masatake Yamauchi, Satsuki Tsuji, Kazuei Mita, Toshiyuki Saito, Mitsuoki Morimyo. A novel minisatellite repeat expansion identified at FRA16B in a Japanese carrier. *Genes Genet Syst.*, (2000) **75**, 149-154.
17. Morimyo, M.: Genome science of fungi., *Schizosaccharomyces pombe*. *UNESCO-EOLSS*, (in press).

3. 放射線感受性に関連する特定ゲノム領域の 同定に関する調査研究

今井高志、伊藤綽子、相良雅史、二宮康晴
第2研究グループ第3サブグループ

The Genome Analysis on the Specific Chromosomal Region Related to Radiation-Sensitivity

Takashi Imai, Hiroko Ito, Masashi Sagara, Yasuharu
Ninomiya

The 3rd Subgroup, Genome Research Group

To isolate and characterize genes associated with the surveillance and repair systems that find and repair the damaged DNA after irradiation, we have taken mainly two different approaches: genome analysis of the ataxia telangiectasia (AT) locus and expression analysis of genes of human normal cells exposed to ionizing radiation.

AT is an autosomal recessive disease associated with cerebellar ataxia, oculocutaneous telangiectasia, immunodeficiency, and hypersensitivity to ionizing radiation. In the course of positional cloning of candidate genes expressed from the major AT locus, we identified a new gene, called NPAT, and determined the structural organization of the gene. The gene encodes a 1,427-amino acid protein containing nuclear localization signals and phosphorylation target sites by cyclin-dependent protein kinases associated with E2F. Our analysis on the promoter region of the NPAT gene revealed that the gene existed only 0.5 kb apart from the 5' end of the ATM gene transcript with opposite transcriptional direction. The luciferase reporter assay with series of the deletion and substitutional mutants of the upstream region of the NPAT gene exhibited bi-directional promoter activity towards both the ATM and NPAT genes. As to the function of the NPAT gene, we showed that proviral

inactivation of the Npat gene in the Mpv20 transgenic mouse strain resulted in an early embryonic arrest at uncompact eight-cell stage, indicating an essential function of the gene for cell division. We also found that the NPAT associated with cyclin E-CDK2 in vivo and can be phosphorylated by this CDK and that the overexpression of NPAT accelerated S-phase entry.

The measurement of RNA levels for the complete set of transcripts of a cell under physiological conditions and in response to irradiation is useful to understand the complex mechanism of the surveillance and repair systems that find and repair the damaged DNA. Using SAGE (serial analysis of gene expression) approach, we analyzed gene expression patterns of human normal cells exposed to ionizing radiation. The partial expression patterns of a total of 19,000 tags (6,900 species) have been constructed. So far, more than ten new tag-sequences that are expressed at significantly different levels at different stages of the cell cycle (from G1 to S phase) after irradiation have been identified. These data would be effective as a step towards understanding gene function and interactions in response to DNA damage. The new tag-sequences would also be useful for isolation of new genes involved in DNA surveillance and repair systems.

緒言

ヒト・ゲノムには放射線誘発の DNA 損傷に対する防護・修復機構が備わっており、この機構に関わる遺伝子群に欠損が生じると放射線高感受性となる。この DNA 損傷に対する防護・修復機構の解明は個々の遺伝子解析を中心としたボトムアップ式のアプローチだけでは非効率であり、ゲノム全体、即ち全ての遺伝子の働きを系統的に眺めながらトップダウン的に、解明していくことが必要である。

本研究開始時においては、世界的にヒト全ゲノムの染色体地図作製（マッピング）と DNA 塩基配列決定（シーケンシング）を目指したヒト・ゲノム解析プロジェクトが始まり、その成果が出始めた頃であって、遺伝病の原因遺伝子のように機能未知である遺伝子を染色体上のマッピング部位から単離することは、大変な労力を必要とした。本研究ではヒトゲノムのマッピング技術の開発を行うとともに、電離放射線高感受性と高発がん性を示すヒト遺伝性疾患（毛細血管拡張性運動失調症 ataxia telangiectasia, AT）が座位するヒト 11 番染色体をモデルケースとして、詳細な染色体地図を作製して、11 番染色体の AT 座位特定ゲノム領域の解析を行うことを目的とした。また、グループ研究開始時には予想できなかったヒトゲノム解析の急速な進展により、DNA 損傷に対する防護・修復機構に関わる遺伝子を同定するためには、染色体マッピングを用いた遺伝子解析法よりも細胞内の mRNA を網羅的に解析する発現解析法が効果的と考えられ、SAGE 法を中心に放射線応答遺伝子の発現解析を行うことを目的とした。

研究経過

1. AT 遺伝子座の解析

細胞は放射線照射等によって DNA に損傷が与えられた場合、この DNA の傷を娘細胞に伝えないため、細胞分裂の進行を停止させて DNA 修復を行うチェックポイント機構を持つ。DNA 損傷の認識、修復には複数の遺伝子産物が関わっておりこれらの遺伝子に欠損があると癌や遺伝病となる場合も知られている。Ataxia telangiectasia (AT) は名前の通り小脳性運動失調と毛細血管拡張を主な症状とする常染色体劣性の遺伝病であり、発生率はアメリカ及びイギリスでの調査では出生 10 万人に 1 人、保因者は 1% 程度と考えられている。AT 患者では歩行開始頃にふらつきが観察され、身体の各部、特に眼球

結膜において血管拡張が見られる。発癌頻度が非常に高く、特にリンパ球性白血病や、B 細胞性悪性リンパ腫、胃癌、乳癌などの発症が報告されている。保因者においても一般集団に比べ 3-4 倍の発癌リスクがあることなどから注目されている遺伝病である。ところで、この遺伝病患者由来の細胞は放射線に高感受性である。最初に述べたように細胞は本来放射線等による DNA 損傷を修復する機構があるが、AT 細胞ではこの機構に欠陥があるため、細胞は DNA 損傷を修復できず、間違った遺伝情報を娘細胞に伝え、分裂の繰り返しによって致命的なエラーが蓄積すると考えられている。したがって AT 原因遺伝子の解析はチェックポイント機構の理解に繋がることが期待される。

(1) NPAT 遺伝子の単離

1994 年頃 AT は、A、C、D、E 群の 4 つの相補群に分類されていたが、不思議なことに何れも 11 番染色体 q22-23 領域にマップされていた。そこで本研究ではこの領域をカバーする YAC、コスミドコンティグを作成し、遺伝子の検索を行った。1994 年に UCLA の Gatti 博士らを中心とする世界的な規模の AT 解析コンソーシアムによって A 群 C 群の原因遺伝子は D11S1818 と D11S1819 に挟まれた約 850kb の範囲にあるというリンケージ解析の結果が報告された。私共はこの領域の中から Northern プロットにおいて調べた全ての組織において発現が見られ、また Zoo プロット解析においても少なくともニワトリ以上の脊椎動物において非常に保存された配列をもった、即ちハウスキーピングと思われる遺伝子(NPAT)を単離し、解析を行っていたが、1995 年にイスラエルの Shiloh 博士らが AT 患者において変異(mutation)がある遺伝子という意味で ATM と名付けた遺伝子を報告した。

そこで本研究において作成していた YAC、コスミドコンティグに ATM 遺伝子をマップしてみたところ NPAT 遺伝子の 5'側より僅かに 0.5kb

離れた位置に ATM 遺伝子の 5' 端を見い出した。2つの遺伝子の転写方向は NPAT がテロメアからセントロメア方向、ATM がセントロメアからテロメア方向であって互いに逆向きであり、これら2つの遺伝子のプロモーター領域は重なっている可能性が考えられた。そこで両遺伝子に挟まれた領域と各々の 5'側を含む DNA 断片をルシフェラーゼレポーター遺伝子に繋げて転写活性を調べたところ、この領域は両方向性(bi-directional)プロモーター活性を持つことが明らかとなった。

ATM はその後多くの研究室から全ての相補群において変異が見つかることが報告され、また我々も九州大学林博士のグループを中心とした共同研究によって日本人家系を中心に ATM の変異を同定した。

ところで、これまでに両方向性プロモーターは高等動物においてはプリンヌクレオチド合成に関わる GPAT と AIRC 遺伝子、コラーゲン α 1(IV)と α 2(IV)遺伝子、TAP1 と LMP2 遺伝子などが報告されている。多くの場合両方向性プロモーターによって制御されている遺伝子は関連した機能を持っているので、ATM とプロモーター領域が重なっている NPAT についても ATM と関連した機能を持っている可能性を考えさらに解析を行った。

(2) NPAT の構造

NPAT cDNA をプローブとして Northern プロット解析を行うと、6.2kb と 5.4kb の2本のバンドが調べた全ての組織において検出された。単離した cDNA はポリ A を除いて 5.9kb であったがこの中で最も長いオープンリーディングフレームは 4281bases、1,427 アミノ酸に相当した。

NPAT のアミノ酸配列は既存のタンパク質と明確なホモロジーを示さないが、Cdk によるリン酸化標的配列 Ser/Thr-Pro-X-Lys/Arg に一致する配列が5箇所存在した。NPAT 遺伝子は 18 エクソンに分断されているが、予測される Cdk に

よるリン酸化標的配列5箇所の内4箇所は同一エクソン(エクソン 13)にコードされており、もしこれらの配列が実際に Cdk によってリン酸化されるのであればこのエクソンは進化的によく保存されているかもしれない。また、NPAT の C 端には2箇所の塩基性アミノ酸のストレッチがあり、これらが核局在シグナルとして働いている可能性が考えられた。そこで NPAT を GFP(green fluorescence protein)と繋いで培養細胞に導入すると GFP の蛍光を核のみにて検出することができるのでこのタンパク質は核タンパク質と考えられた。

(3) NPAT 遺伝子の不活性化

ポジショナルクローニングによって単離された遺伝子産物の機能は不明であり、このような場合ターゲットティング法によってノックアウトマウスを作成し、機能を解析することがよく行われている。一方遺伝子の活性化あるいは不活性化を狙ったウイルスのランダムインテグレーションによるがん遺伝子や発生に必須の遺伝子のスクリーニング法もある。Jaenisch、Gray 博士らにより作成されたウイルスのインテグレーションによって劣性致死となるマウスクローンの中に正常な Npat 遺伝子産物が作成されなくなったクローン Mpv20 が存在することが分った。Mpv20 ではヘテロでは正常に発生するが、ホモにすると8細胞期に卵割が停止する。ウイルスのインテグレーションサイトはヒト NPAT のイントロン7に対応するイントロンで(マウスのゲノミック構造は未だ決まっていない)NPAT の転写方向とは逆方向であった。このヘテロマウスの脳、腎臓、肺の RNA を Npat 3' 側の配列をプローブとして Northern プロット法で解析した結果、Npat mRNA の発現量は野生型に比べ減少しており、また Npat 5' 側の配列をプローブとすると正常な長さの mRNA に加え新たに約 1kb の短い mRNA を検出した。同じサイズの RNA が、導入したウイルスにある LTR 配列をプロー

ブとしても検出されることなどから、ウイルスがインテグレートされたアレルではウイルス DNA の配列がスプライシングの過程で Npat mRNA に繋がり、その中にある配列で転写が停止して短い mRNA が産生されてしまうと、考えられた。上で述べたようにインテグレーションサイトより 3'側の Npat 配列をプローブにした場合にはこの短い RNA は検出されない。また、Npat の 5'側にある Atm 遺伝子の発現はヘテロマウスにおいて全く変化は見られなかった。以上の結果から、正常な Npat 遺伝子産物が全くできない場合は発生は 8 細胞期において停止する、と結論付けられ、Npat 遺伝子産物は細胞が分裂していく上で必須であると考えられる。

(4)NPAT 遺伝子の機能

MGH の Zhao 博士らとの共同研究で NPAT は CDK のリン酸化基質であり、NPAT タンパク質の発現量は G_1/S 期でピークとなることを示した。また、NPAT 発現ベクターを U2OS 細胞に導入して NPAT 産物を過剰発現させたところ、S 期の細胞が増加し、 G_1 期の細胞が減少することを示した。M 期において細胞周期を停止させるノコダーゾールを用いて細胞を処理すると、NPAT 発現ベクターを導入した細胞もコントロール群と同様 M 期において停止するので、NPAT の過剰発現の結果 S 期の細胞が増加するのは S 期における細胞周期の停止が起こっているわけではない、即ち NPAT は G_1 期から S 期へ移行を促進することに働いている、ということが示された。また細胞周期の進行に従った NPAT の発現はどのステップで制御されているかを調べるために、我々は正常 2 倍体繊維芽細胞を同調し、mRNA とタンパク量を測定したところ、NPAT mRNA、タンパク質共に細胞周期の各ステージを通して発現が見られたが、細胞周期を通して多きな、発現量の変化は見られなかった。

in vitro において各種 cyclin / CDK 複合体による NPAT のリン酸化部位を解析したところ、

cyclin A/ CDK2 と cyclin B2 / cdc2 は cyclin E/CDK2 と同じく 1359 番目のスレオニンをリン酸化することを明らかにした。またこれらの cyclin / CDK 複合体は NPAT タンパク質の N 側もリン酸化した。この結果は当初示した NPAT の機能するステージが G_1/S 境界期というだけではなく、S 期や G_2/M 期においても G_1/S 期とは異なる機能を有することを示唆している。

2. 放射線照射に応答する発現遺伝子の系統的解析

(1)正常ヒト繊維芽細胞 における G_1-S 期特異的な放射線応答遺伝子の解析

放射線によって生じた DNA 障害の修復メカニズムを詳細に解析するために、未だ同定されていない細胞周期制御蛋白質を系統的に単離することを目的として、ヒト培養細胞を同調し、放射線照射後発現遺伝子群を時間毎に SAGE 法によって解析し、放射線照射によって新たに発現誘導する遺伝子の同定を試みた。まず G_1-S 期における放射線応答遺伝子に焦点を充て、正常ヒト繊維芽細胞を血清飢餓状態にして G_0/G_1 期に同調し、放射線照射後、血清再添加によって細胞周期をスタートさせた。0、6、15 時間後に polyA⁺RNA を抽出し、cDNA 合成を行って合計 19,000 タグ (6,900 種類) を同定し、これらの発現パターンから放射線照射によって新たに発現誘導する遺伝子候補を単離した。

(2) 転写ネットワークの解析を目的とした新生 RNA ターゲット作製法の開発

遺伝子の発現状態を体系的に解析する方法として、DNA マイクロアレイや(1)で用いた SAGE 法などが開発され、迅速に数千 - 数万種類の mRNA の発現量 (比) を解析することが可能となっている。これらの方法では、遺伝子の転写活性を細胞中の全 mRNA 分子の量比によって解析しているが、mRNA 分子各々の安定性は互いに異なっており、必ずしも mRNA の細胞内存在

量がその時点での遺伝子の活性化状態を正確に示しているとは限らなかった。そこで細胞が放射線を受けた場合に起こる転写状態の変化を、時間軸に沿って直接調べるために、新たに転写される新生 RNA 鎖をプロモウリジンを用いて *in vivo* で標識し、これを直接 DNA マイクロアレイ解析のターゲットとして用いる方法を開発した。その結果、細胞内に mRNA は存在するが、転写は停止していると考えられる遺伝子、逆に細胞内では mRNA を検出できないが転写は活性化されていると考えられる遺伝子を新たに検出した。したがって本法は遺伝子の活性化状態をより直接的にモニターでき、転写ネットワークの解析に有効な方法であると考えられた。

結論

電離放射線高感受性好発癌性の常染色体劣性遺伝病である毛細血管拡張性運動失調症遺伝子座(AT)の解析を通して単離した新規遺伝子NPATはAT遺伝子とプロモーター領域を共有するという希な構造をしており、この遺伝子を破壊すると受精卵の発生は進行しない、またcyclin/CDK複合体によるリン酸化の基質であることを示し、少なくとも細胞周期のG1からS期への移行に重要な役割を果たすことを明らかにした。

放射線照射によって変動する遺伝子発現パターンを解析し、放射線応答の転写ネットワークを明らかにすることを目的としてSAGE法による6,900種類のヒト遺伝子の発現解析を行い、さらに転写活性を直接測定する新しい、DNA マイクロアレイのターゲット調製法を開発した。

研究発表

1. Takashi Imai, Naohiko Seki, Toshiyuki Saito, Masatake Yamauchi, Yoichi Matsuda, Hiroko Ito, Atsushi Ogiwara, Nobuo Nomura, and Tada-aki Hori: Construction of YAC contigs at human

chromosome 11q22.3-q23.1 region covering the *ataxia telangiectasia* locus. *DNA Research* **2**, 113-121, 1995.

2. Hiroyuki Miyoshi, Miki Ohira, Kimiko Shimizu, Kinuko Mitani, Hisamaru Hirai, Takashi Imai, Kazushige Yokoyama, Eiichi Soeda and Misao Ohki: Alternative splicing and genomic structure of the AML1 gene involved in acute myeloid leukemia. *Nucleic Acids Res.* **23**, 2762-2769, 1995.
3. Takashi Imai, Masatake Yamauchi, Naohiko Seki, Takehiko Sugawara, Toshiyuki Saito, Yoichi Matsuda, Hiroko Ito, Takahiro Nagase, Nobuo Nomura and Tada-aki Hori: Identification and characterization of a new gene physically linked to ATM gene. *Genome Res.* **6**, 439-447, 1996.
4. Yoichi Matsuda, Takashi Imai, Tadahiro Shiomi, Toshiyuki Saito, Masatake Yamauchi, Toshiyuki Fukao, Yukihiro Akao, Naohiko Seki, Hiroko Ito, and Tada-aki Hori: Comparative genome mapping of the ataxia telangiectasia region in mouse, rat, and Syrian hamster. *Genomics*, **34**, 347-352, 1996.
5. Tada-aki Hori, Naohiko Seki, Miki Ohira, Toshiyuki Saito, Masatake Yamauchi, Masashi Sagara, Akiko Hayashi, Satsuki Tsuji, Hiroko Ito, and Takashi Imai: A distamycin A-inducible fragile site, FRA8E, is located in the hereditary multiple exostoses gene and not involved in HPV16 DNA integration and amplification. *Cancer Genet. Cytogenet.* **99**, 1-11, 1997.
6. Yoko Kawana, Akira Komiya, Takeshi Ueda, Naoki Nihei, Hiroaki Kuramochi, Hiroyoshi Suzuki, Ryuichi Yatani, Takashi Imai, Jing-Tang Dong, Toshio Imai, Osamu Yoshie, J. Carl Barrett, John T. Isaacs, Jun Shimazaki, Haruo Ito, and

- Tomohiko Ichikawa: Location of KAI1 on the short arm of human chromosome 11 and frequency of allelic loss in advanced human prostate cancer. *The Prostate* **32**, 205-213, 1997.
7. Marco Di Fruscio, Hans Weiher, Barbara Vanderhyden, Takashi Imai, Tadahiro Shiomi, Tada-aki Hori, Rudolf Jaenisch, and Douglas A. Gray: Mpv20 proviral inactivation of the Npat gene results in early embryonic arrest. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 4080-4086, 1997.
 8. Takashi Imai, Takehiko Sugawara, Akiyo Nishiyama, Ryoko Shimada, Reiko Ohki, Naohiko Seki, Masashi Sagara, Hiroko Ito, Masatake Yamauchi, and Tada-aki Hori: The structure and organization of the human NPAT gene. *Genomics*, **42**, 388-392, 1997.
 9. Eiko Kitamura, Fumie Hosoda, Michiyo Fukushima, Shuichi Asakawa, Nobuyoshi Shimizu, Takashi Imai, Eiichi Soeda, and Misao Ohki: A 3-Mb sequence ready contig map encompassing the multiple disease gene cluster on chromosome 11q13.1-q13.3. *DNA Research*, **4**, 281-289, 1997.
 10. Jiyong Zhao, Brian Dynlacht, Takashi Imai, Tada-aki Hori, Ed Harlow: Expression of NPAT, a novel substrate of cyclin E-CDK2, promotes S-phase entry. 1998 *Genes & Dev.* **12**, 456-461, 1998.
 11. Tomonari Sasaki, Huaize Tian, Yoji Kukita, Masakazu Inazuka, Tomoko Tahira, Takashi Imai, Masatake Yamauchi, Toshiyuki Saito, Tada-aki Hori, Tomoko Hashimoto-Tamaoki, Kenshi Komatusu, Osamu Nikaido, and Kenshi Hayashi: ATM mutations in patients with ataxia telangiectasia screened by a hierarchical strategy. *Human Mutation* **12**: 186-195, 1998.
 12. Takashi Imai, Masataka Yamauchi, Naohiko Seki, Takehiko Sugawara, Masashi Sagara, Toshiyuki Saito, Yoichi Matsuda, Hiroko Ito, Takahiro Nagase, Nobuo Nomura and Tada-aki Hori: Genome analysis of the AT region of human chromosome 11 and identification of a new gene (NPAT) physically linked to the ATM gene. in "Biodefence against environmental stress" eds. by Ozawa, Tatsumi, and Hori, Kodansha (Tokyo) and Springer-Verlag (Heidelberg), 1998.

4. ヒト特定ゲノム領域の構造及び機能解明に関する解析研究

齋藤俊行、山内正剛、辻さつき、林昭子、子妻澄枝、寺田美奈子、堀雅明

第2研究グループ・第4サブグループ

Molecular analysis on the structure and function of particular regions of Human genome

SAITO Toshiyuki, YAMAUCHI Masatake, TSUJI Satsuki, HAYASHI Akiko, KOZUMA Sumie, TERADA Minako, HORI Tada-aki

Fourth Subgroup in Genome Research Group

We employed two approaches to investigate the molecular system maintaining the human genome. One used "fragile site (FRA)", a model system of *cis* factors for genetic instability, and the other utilized genes concerning genetic stability as *trans* factors. FRAs are structurally unstable region of chromosomes and were considered to provide useful information for understanding the maintenance of genome structure. The genes responsible for diseases of genetic instability will be clue to the issue.

A microsatellite repeat of (AAAAT)_n was identified in FRA8E harboured on chromosome 8 and an AT-rich minisatellite repeat of 35 bases long was also isolated from the break point region of FRA16B on chromosome 16.

Ataxia Telangiectasia (AT) is a human genetic disease that is genetically recessive and

manifests cerebellar ataxia and dilation of blood vessels. AT patient also shows immunodeficiency, genomic instability, and high incidence of tumours, as well as hypersensitivity to ionizing radiations.

The restriction map of the cosmid contig of the AT gene locus was constructed to provide useful information for the molecular genetical analysis, including gene transfer experiments for functional complementation of the AT phenotypes using each of genomic genes as well as mutation analyses of AT patients and heterozygotes. *ATM* gene was a possible candidate responsible for AT phenotype, since point mutations that would give truncated products were identified in *ATM* genes of AT patients. To establish the functional basis of *ATM* gene for the progression of AT phenotype, we constructed a plasmid vector expressing neo gene as a selection marker as well as anti-sense *ATM* cDNA, and introduced it into HeLa cells. Transfectant cells were selected and isolated as G418-resistant colonies. While the radiosensitivity of the control G418 colonies without *ATM* cDNA insert was not different from wild type HeLa cells, transfectants with anti-sense *ATM* cDNA were hypersensitive to ionizing radiation such as X rays. This suggested that the reduced activity of *ATM* gene was responsible for radiosensitive phenotype of AT patients.

はじめに

本研究課題は「放射線の生物影響に関連するヒトゲノム領域の解析・遺伝情報解析研究」という第 2 研究グループ大課題の元に設定されており、他の小課題と総合して、電離放射線を含む諸要因によるゲノム DNA 損傷の監視・修復機構の理解を目指すものである。「ヒト特定ゲノム領域の構造及び機能解明に関する解析研究」という小課題に基づき、ゲノムの不安定化をきたす疾患材料を手がかりに、ゲノムの安定性維持に重要な役割を担う DNA 損傷監視機構について、分子レベルでの理解を企図した。

ゲノムという構造物の維持や変異に関与する特定ゲノム領域の構造（シス因子）と機能（トランス因子）について検討し、放射線による悪性腫瘍や突然変異の発生機構について理解を深めることを目指して、シス因子として遺伝性染色体脆弱部位（FRA）、トランス因子として DNA 代謝関連遺伝子群を研究材料に、本研究課題に取り組んだ。

研究結果と考察

1. シス因子としての遺伝性染色体脆弱部位（FRA）の構造解析

ヒト染色体上の脆弱部位の構造解析ならびに集団解析を実施した。ヒト 8 番染色体の長腕 24 領域に、fluorescence in situ hybridization (FISH) 法により遺伝性の染色体脆弱部位 FRA8E を同定した。この染色体位置解析により、FRA8E が、癌抑

制遺伝子として報告されている遺伝性多発性外骨腫（exostosis: EXT）原因遺伝子である EXT1 の遺伝子座に存在していることが判明した。さらに当該領域に対応するゲノム DNA クローンを収集し、FRA8E の詳細な構造解析へ供する研究資源整備を進めた。

FRA8E 領域のゲノムクローンのショットガン塩基配列決定から、(AAAAT)_n のマイクロサテライトリピートを同定した。また、平行して研究資源整備を行ってきた FRA16B でも同様の解析により、アデニンとチミンに富む 35 塩基を単位とするミニサテライトリピートを同定した。

独立家系から由来する日本人 50 人のゲノム DNA 試料から、FRA8E の新しい多型 4 タイプを発見し、同様に FRA16B についてもこの試料内で著しい多型の存在を確認した。これらの多型に関し、頻度情報と subpopulation への関連づけ可能性について引き続き調査を進めている。

2. トランス因子としての DNA 代謝関連遺伝子群の解析

ゲノムの不安定化、高発癌性、免疫不全、電離放射線高感受性などの多様な表現型を示す毛細血管拡張性運動失調症（ataxia telangiectasia, AT）の原因遺伝子として報告された ATM とその類縁遺伝子、その他の修復・複製・細胞周期関連遺伝子群の同定と、検討をおこなった。

アタキシア・テランジェクタシア (Ataxia Telangiectasia, AT) は劣性の遺伝性疾患

であり、患者自身や患者由来の細胞は電離放射線に対する高感受性を示す。第 2 研究グループではヒト 11 番染色体ゲノム解析の一環として、AT 原因遺伝子が位置する 11q22-24 領域をまず酵母人工染色体 (YAC) コンティグとして分離し、次いで YAC クローンから作成したコスミドコンティグを用いて同染色体領域における遺伝子の同定を試みた。この領域には当研究グループの研究結果を含め、ATM、NPAT、ACAT などの遺伝子が同定されたが、AT 患者において突然変異が発見されたのは ATM 遺伝子だけであり、ATM 遺伝子が放射線感受性にどのように関わるのかが、当該研究課題において重要な設問でとなった。そこで、G418 耐性形質をもたらすネオ遺伝子を持つプラスミドにアンチセンス鎖が発現する方向で ATM 遺伝子 cDNA を組み込んだプラスミドベクターを作成し、HeLa 細胞に導入した。得られた G418 耐性コロニーを解析した結果、アンチセンス ATM を導入した細胞は AT 患者由来細胞と同様の X 線に対する高感受性を示した。ここで対照としたアンチセンス ATM 遺伝子を組み込まなかった同様の G418 耐性クローンは X 線に対する高感受性を示さず、その感受性は野生株である HeLa 細胞と同様であった。この結果から、AT 患者における放射線感受性形質の原因は ATM 遺伝子の機能不全であることが強く示唆された。

独自にクローン化した ATM 完全長 cDNA を用いて、ATM 蛋白質アミノ末端

およびカルボキシ末端領域の組み換え蛋白質を作成し、家兔免疫によって抗血清を得た。多様なヒト組織を材料としていわゆるウエスタンブロット解析を実施し、ハウスキーピング遺伝子と考えられる ATM 遺伝子が、蛋白質のレベルでは組織間で存在量に開きがあり、胸腺およびリンパ節では総蛋白質あたりの ATM 蛋白質量が高いことを見出した。同様の解析から ATM ファミリーメンバーである DNA 依存性蛋白質キナーゼ (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit, DNA-PKcs) も胸腺およびリンパ節で存在量が多いことが判明した。高い発現を示す組織が一致するという事実は、両蛋白質が共通の生化学過程に参与している可能性を示唆する。

DNA 依存性蛋白質キナーゼ (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit, DNA-PKcs) と相互作用する因子を、west-western 法により探索した。陽性クローン中、リン酸化によるシグナル伝達系に参与する可能性のあるものとして、カルシニューリン B と類似性を示すカルシウム結合性新規蛋白質をコードするものを見出したので、その cDNA およびゲノムの全構造 (遺伝子データベース登録 AB006463、AB012955、AB017361、AB021866) と染色体上の位置を明らかにした。

AT と臨床スペクトラムが大きく重なりやはり電離放射線感受性を示す遺伝性疾患ナイミーヘン染色体不安定症候の群原因遺伝子 NBS1 の cDNA クローニングと塩基

配列決定を実施した。予想蛋白質は 751 アミノ酸残基からなり、アミノ端側約 350 残基とカルボキシ端側およそ 110 残基が、ヒト蛋白質と特に高い類似性を示した。このことから、NBS1 蛋白質の両側には、一次構造の保存を促す選択圧がかかるふたつのドメイン構造の存在が示唆された。

臨床像と疾患患者由来細胞の細胞遺伝学的解析の状況証拠から、ATM と NBS1 の両蛋白質がひとつの複合体に含まれる可能性が考えられたため、組み換え蛋白質を利用していわゆる West-western 解析を実施したが、両蛋白質の相互作用を確認することはできなかった。後日、他研究者により複合体同定が報告されたが、両蛋白質の相互作用には他の因子が必要とされるのかもしれない。

ATM 遺伝子座で見出された隣接 NPAT 遺伝子との近距離 head-to-head 配置が、DNA-PKcs 遺伝子と CDC21 遺伝子との間でも見出された。両遺伝子のゲノム上での近接した配置から、両遺伝子の転写が互いに影響を及ぼし合う可能性を考え、放射線照射後に各々の転写量をリアルタイム PCR 法により厳密な定量をおこなった。その結果、どちらの遺伝子も放射線による発現量の変動は検出されなかった。

癌抑制遺伝子は、ゲノムの安定化に大きく寄与する遺伝子（トランス因子）の研究素材としての価値を持つが。上記染色体脆弱部位に存在する EXT1 と有意な構造類似性を示す 2 種類の新規遺伝子 EXTR1 と EXTR2 を単離し、両者の構造・発現組織・

染色体上での位置を明らかにし、このふたつの癌抑制遺伝子ファミリーメンバーが、alpha1,4N-acetylglucosaminyltransferase であることを示した。

3. 今後の研究展開

本課題に取り組む過程で、ゲノムの安定性維持に重要な役割を担う DNA 損傷監視機構をより深く理解するためには、遺伝子個々の機能解析を積み上げるだけでなく、電離放射線曝露前後の細胞の生理状態を「多数の」遺伝子集団の発現量と蛋白質産物の変動という観点から検討する必要性を痛切に感じた。そこでこうした包括的解析の前提となる遺伝子リストの作成手法について考察した。状況は、想定される全遺伝子に対して資源化の完了した遺伝子集団が完全ではなく、遺漏の少ない遺伝子発現モニタリングのためには、情報が大いに不足していた。ヒトゲノムシーケンシングプロジェクトから提供されるゲノム DNA 塩基配列データからの *ab initio* な遺伝子予測と引き続く高感度な転写産物の検出手順を組み合わせることで、発現に大きく依存する遺伝子カタログ化手法の限界を押し広げられることを示した。現行の EST データベースに記載された遺伝子タグが実在遺伝子数の約半分程度と推定されること、遺伝子予測から出発するカタログ化手法を利用することで、およそ 5 千から 1 万の未知遺伝子を同定・検出できる見通しが立った。

研究発表

- 1) Yamauchi, M., Tsuji, S., Mita, K., Saito, T., Morimyo, M. Genes Genet Syst., (2000) 75, 149-154.
- 2) Yamauchi, M., Seki, N., Mita, K., Saito, T., Tsuji, S., Hongo, E., Morimyo, M., Shiomi, T., Koyama, H., Ayusawa, D., Hori, T. : DNA Research, 2: 269-275, 1995
- 3) Hori, T., Seki, N., Ohira, M., Saito, T., Yamauchi, M., Sagara, M., Hayashi, A., Tsuji, S., Ito, H. and Imai, T. (1998) Cancer Genet. Cytogenet. 101: 24-34.
- 4) Saito, T., Seki, N., Yamauchi, M., Tsuji, S., Hayashi, A., Kozuma, S., Hori, T. (1998) Biochem. Biophys. Res. Commun. 243:61-66.
- 5) Saito, T., Matsuda, Y., Watanabe, F., Ishii, H., Mori, M., Araki, R., Fujimori, A., Fukumura, R., Morimyo, M., Tatsumi, K., Hori, T. and Abe, M. (1998) Mammalian Genome 9; 769-772.
- 6) Seki, N., Hattori, A., Hayashi, A., Kozuma, S., Ohira, M., Hori, T. and Saito, T. (1999) Biochem. Biophysica Acta 1444: 143-147.
- 7) Saito, T., Seki, N., Hattori, A., Hayashi, A., Abe, M., Araki, R., Fujimori, A., Fukumura, R., Kozuma, S. and Matsuda, Y. (1999) Mamm. Genome 10: 315-317.

5. 遺伝子改変技術の開発と疾患モデルマウスの作製に関する調査研究

塩見忠博、原田良信、小池学、(第2研究グループ)、岡本正則(人材・研究基盤部)、塩見尚子(重点研究協力員)

Generation and characterization of DNA repair-deficient model mice

Tadahiro Shiomi, Yoshinobu Harada, Manabu Koike, Masanori Okamoto*, Naoko Shiomi**

Genome Research Group, *Division of Education and Scientific Services, **Priority Research Supporting Staff

XPG encodes a structure-specific DNA endonuclease that functions for nucleotide excision repair (NER). XP-G patients show various symptoms from mild cutaneous abnormalities to severe dermatological impairments. In some cases, patients exhibit growth failure, life shortening and neurological dysfunctions, which are characteristics of Cockayne syndrome (CS). The known XPG function as the 3' nuclease in NER, however, cannot explain the development of CS in certain XP-G patients. To gain an insight into the functions of XPG protein, we have generated and examined mice lacking *Xpg* (the mouse counterpart of human *XPG* gene) alleles. The *Xpg*-deficient mice exhibited post natal growth failure and underwent premature death. Since the XPA-deficient mice, which is totally defective in NER does not show such symptoms, our data indicate that XPG performs an additional function(s) beside its role in NER. Our in vitro studies showed that primary embryonic fibroblasts isolated from the *Xpg*-deficient mice underwent premature senescence, and exhibited the early onset of immortalization and accumulation of p53, which implies that lack of XPG causes genetic instability. Thus, our data indicate that XPG, in addition to its role in excision repair, performs a second function which is essential for genomic stability.

Recent studies showed that human XPG, in addition to its function in NER, was involved in the repair of oxidative base damages such as thymine glycol and 8-oxo-guanine, and this may explain the genetic instability observed in *Xpg*-deficient cells. To clarify this point, we determined spontaneous mutation frequencies and the type of spontaneous base

substitution mutations in cells obtained from normal and *Xpg*-deficient mice using the supF shuttle vector (pNY200) for mutation assay. The spontaneous mutation frequency of the supF gene in pNY200 propagated in the *Xpg*-deficient cells was about three times higher than that in normal cells, indicating the importance of Xpg in reducing the frequency of spontaneous mutations. The frequency of spontaneous base substitution mutations at A:T sites, particularly that of the A:T-to C:G transversion, increased markedly in the *Xpg*-deficient cells.

緒言

紫外線はDNA(遺伝子)に損傷を誘発し、それが原因となって細胞死、突然変異の誘発、発癌等の影響を生物にもたらす。従って、地球上に生命が誕生して以来、生物は太陽からの紫外線の脅威にさらされ続けているといえる。生物は生命誕生のごく初期からDNAに書き込まれた遺伝情報を紫外線の影響から守るための防御系すなわちDNA損傷修復系を発達させてきた。このような修復系は現存するほぼすべての生物に保存されるようになったと考えられる。ヒトも生物の一種であるからにはその例外ではあり得ない。紫外線により誘発されるDNA損傷の修復能を欠損したヒト遺伝性疾患が知られている。それには、色素性乾皮症(xeroderma pigmentosum, XP)、コケイン症候群(Cockayne syndrome, CS)等がある。XP患者は、日光露出部において急性皮膚炎などの臨床症状を示す。さらにこれら皮膚病変部位で正常人の約2000-5000倍の高頻度で皮膚癌を発症する。これらの症状に加えて、知能低下などの精神神経症状を合併する症例もある。XP患者は日光過敏症を示し、その細胞はDNA損傷の除去修復の初期過程に異常があることが知られている。コケイン症候群(CS)患者はXPと同様日光過敏症や種々の神経症状を呈する。しかしながらXPの様な

高発癌性は認められない。CS細胞も紫外線に対して正常細胞より高い感受性を示す。細胞融合法を用いた遺伝学的相補性試験の結果、XPはA群からG群それにバリエーションの8つの相補性群に分けられており、CSはAとBの二つの相補性群に分けられている。それぞれの相補性群の患者では、それぞれ異なった遺伝子の欠損が原因となり発症したと考えられている。これらの遺伝病細胞はDNA損傷の修復能が欠損していることから、これらで欠損している遺伝子は損傷修復に関与する遺伝子であると考えられた。従ってこれらの疾患の原因遺伝子がクローニングされたならば、それは修復の分子機構を明らかにするための有用な情報を提供してくれるであろうし、さらにマウス胚性(ES)幹細胞と遺伝子ターゲティング方を組み合わせ用いることにより修復欠損を示すヒト遺伝性疾患の疾患モデルマウスを作製することが可能になると期待された。

結果と考察

1) XPG cDNAの塩基及びアミノ酸配列

色素性乾皮症G群患者細胞で欠損している遺伝子XPGのクローニングに成功し、塩基配列を決定し、その構造の解析を行った。XPG cDNAはポリA部位の19塩基上流に典型的なポリAシグナル(AAT AAA)を有していた。XPG遺伝子は、塩基配列から類推して、1185アミノ酸からなる分子量132、519の蛋白質をコードしていた。データベースをホモロジーサーチして、出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)の除去修復関連遺伝子RAD2のコードする蛋白質と有意に相同性が高いことがわかった。特にRAD2の1-110番目と、767-866番目のアミノ酸配列とERCC5の1-110番目と764-863番目のアミノ酸配列が特に相同性が高く、51%のアミノ酸残基が同一であった。さらに86%のアミノ酸残基が相同であった。XPGには二つの核移行シグナルらしいアミノ酸配列が認められた。XPGの生化学的機能はDNA損傷修復過程(NER)において損傷の3'側にニックを入れるエンドヌクレアーゼであることが明らかにされた。

2) XPG遺伝子のマウス相同遺伝子のクローニング
ヒトXPG cDNAをプローブとし、マウスcDNAライブラリーをスクリーニングし、マウスホモログのフラグメント数個を得た。これらのcDNAフラグメントはそれぞれ単独では完全長ではなかったが、得られたフラグメントを組み換えることによりほぼ完全長のcDNA (3.6 kb)を得ることができた。このcDNAの塩基配列を決定し解析したところ、XPGの

マウスホモログcDNAは、1170個のアミノ酸をコードし、アミノ酸配列に翻訳した場合、ヒトXPGと比較して68.9%が同一、91.1%が相同であることがわかった。さらに、これをSV40のプロモーターを持つ発現ベクターに挿入しG群XP細胞に導入すると、XP細胞の修復欠損をほぼ完全に相補し、また紫外線に対しても抵抗性にした。これらのことから単離したマウスcDNAがヒトXPGのマウスホモログであるとの結論を得た。クローニングしたマウス遺伝子は色素性乾皮症G群原因遺伝子のマウスホモログとしてXpgと命名された。

3 Xpg遺伝子の染色体マッピング

Xpg遺伝子の染色体上の位置を明らかにするため、染色体マッピングを行った。物理的な染色体上の位置を決定するためR-band-FISH法を用いてマッピングを行ったところ、Xpg遺伝子はマウスの第1番染色体Bバンドに位置した。マイクロサテライトマーカーを用いた遺伝子連鎖法によるマッピングを行ったところ、Xpg遺伝子は、マイクロサテライトマーカーのD1Mit20とD1Mit18の間に位置した。それぞれのマーカーからの遺伝的距離はそれぞれ6.1センチモルガン及び2.3センチモルガンであった(図1)。

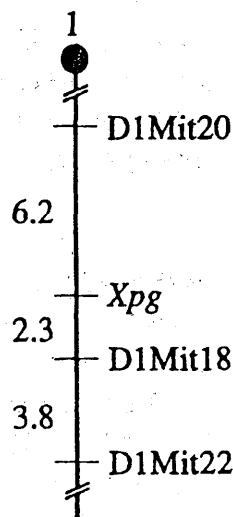


Fig. 1 A partial chromosome linkage map showing the location of the Xpg locus on mouse chromosome 1.

4) Xpg遺伝子ターゲティングベクターの構築とES細胞の遺伝子ターゲティング

Xpg遺伝子を欠損したマウス系統を樹立するため、マウス胚幹(ES)細胞のXpg遺伝子を遺伝子ターゲティング法を用いて破壊することを試みた。マウスES細胞(D3)から単離したXpg遺伝子の第8エクソン、第3エクソン、あるいは第15エクソンにneo遺伝子を挿入した三種類のターゲティングベクターを構築し、それぞれをTV1, TV2, TV3と名付け

た。TV2及びTV3を用いた場合かなりの頻度で相同組み換えによるXpg遺伝子のノックアウトができた。

5) 生殖系列キメラの作製

ターゲティングベクターTV2,を用い遺伝子ターゲティングによりES細胞のXpg遺伝子に変異を導入した。変異を導入したES細胞クローンより、細胞形態及び核型が正常なクローンを選び、C57BL/6(B6)マウスの初期胚に微量注入した。このような初期胚から得られたマウス個体のうち、1/3-1/2はES細胞とB6由来の細胞からなるキメラ個体であった。これらキメラ個体のキメラ率は50-80%であった。次に生殖系列キメラを選び出すため、キメラ個体とB6とを掛け合わせた。その結果調べたすべてのキメラ個体でES細胞が生殖細胞に分化していることが確認できた。

6) Xpg 遺伝子ノックアウトマウス系統の樹立

TV2を用いXpg遺伝子の第3エクソンをノックアウトしたES細胞由来のキメラ個体とB6とを掛け合わせ変異をトランスミットしたヘテロ個体を得た。ヘテロ個体は外見上は正常個体と見分けがつかなかった。ヘテロ個体の遺伝的バックグラウンドをB6にそろえるため、さらにB6との掛け合わせをおこなった。バックグラウンドをB6にそろえたヘテロ個体同士を掛け合わせるによりホモノックアウトマウス(ホモ)個体を得ることができた(xpg/2系統と名付ける)。

7) xpg/2 マウスの成長と寿命

ヘテロ個体同士の掛け合わせにより生まれた個体の遺伝子型を調べると-/- (ホモ): +/- (ヘテロ): +/+ (正常)は35:89:39であった。これはメンデル性の遺伝様式に当てはまりホモ個体は胎仔期において死亡することなくすべて生まれてきていることを示している。ホモ個体の体重は出生時には正常個体あるいはヘテロ個体とほとんど差がなかったが、それ以後の成長が抑制され体重の増加は非常に遅れ(図2B)、離乳期前までにはすべてのホモ個体は死亡した(図2A)。誕生後16日あるいは20日目に体重及び各臓器重量を計量したところホモ変異マウスでは、体重及びほとんどの臓器重量は正常個体の約半分位であったが、脾臓は極端に小さくまた一部の肝臓細胞の小型化が認められた。これらの症状は、飢餓による栄養失調状態にマウスをおいたときに認められる症状に酷似している。このような症状を引き起こす初発影響部位を特定するため、誕生後、経時的に各種臓器の形態を調べた。誕生後すぐ

に正常個体とホモ変異個体で顕著な差異が認められたのは小腸で、ホモ変異個体では腸管が細くかつ絨毛突起の形成も不十分であった。そのためホモ個体は飢餓状態に陥り死にいたるものと考えられる。おそらく小腸以外の臓器・器官においてもある程度の異常があると考えられるが個体が死に至る直接原因は小腸など(消化器官)の形成不全による栄養失調であると思われた。

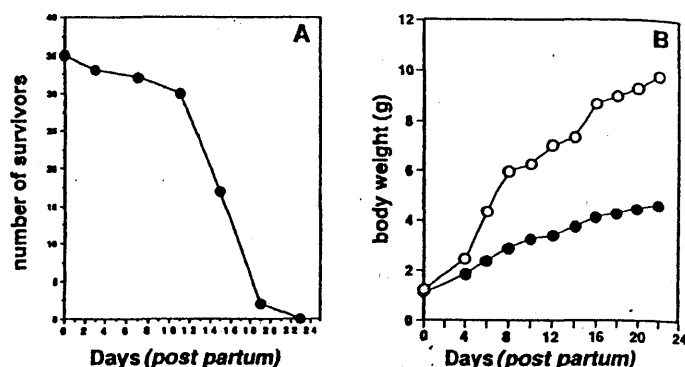


Fig. 2 Growth characteristics and life span of the *xpg* mutant mice. (A) Survival curve of mutant mice postpartum. (B) Average body weights of the *xpg* mutant mice (solid circles). The body weights of males and females from the normal group (ie., wild-type and heterozygous mice) were combined (open circles).

8) ホモノックアウトマウス由来細胞の紫外線感受性

Xpg遺伝子はマウスの紫外線高感受性変異株細胞や紫外線高感受性ヒト遺伝病の修復欠損G群XP細胞の修復欠損ならびに紫外線高感受性を相補する遺伝子として単離されてきた。従って、この遺伝子をノックアウトしたマウス由来の細胞は紫外線に高感受性になっているものと考えられる。この点を明らかにするため、正常、ヘテロ、及びホモマウス胎児由来の線維芽細胞をとり出し、それら細胞の紫外線に対する生存曲線を求めた(図3)。正常細胞に比べ、ホモ個体を形成する細胞は紫外線に対して非常に高感受性になっていた。

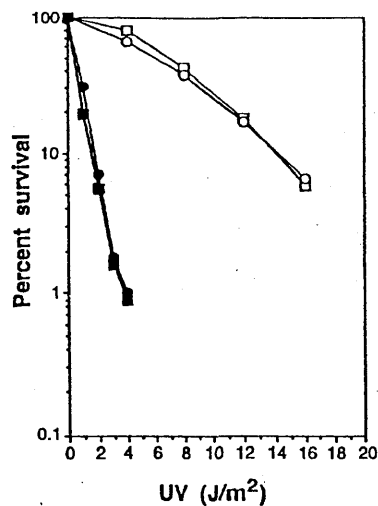


Fig. 3 UV survival curves for cells derived from *xpg*-deficient mice. The experiments were carried out with the embryonic fibroblasts from the wild type (open circles) and heterozygous (open squares) mice and from two homozygous *xpg* mutant mice (solid symbols).

9) *xpg/2* マウス由来細胞の分裂寿命と不死化
xpg/2 ヘテロマウス同士を掛け合わせるにより得た3種類の遺伝子型 (+/+, +/-, -/-) の同腹胎児より線維芽細胞を得た。これら3種類の初代培養細胞を連続培養することによりホモ変異マウス由来細胞は、細胞の分裂寿命が短縮していること、早期に不死化すること (図4 A)、さらに変異型の p53 が早期に蓄積される (図4 B) ことがわかった。これらの変化には遺伝的变化がともなうことが知られているのでホモマウス由来細胞は遺伝的变化を起こしやすい、即ち、遺伝的不安定性を示すと考えられる。これらの結果は、*Xpg* 遺伝子産物がゲノム安定性に重要な役割を果たしていることを示唆している。

10) *xpg/2* マウス細胞の X 線及び過酸化水素に対する感受性

この遺伝的不安定性の要因として、最近、*Xpg* 遺伝子はヌクレオチド除去修復以外にも酸化的 DNA 損傷修復にも重要な働きをしているとの生化学的実験結果が報告された。このことを確認するため、*Xpg* 欠損モデルマウスの胎児由来の線維芽細胞の電離放射線や過酸化水素に対する感受性について調べたが、正常マウス個体由来細胞と *Xpg* 欠損マウス由来細胞で感受性に差は認められなかった (図5)。このことから、*Xpg* 遺伝子は致死的に働く酸化的損傷の修復には関与しないと思われた。恐らく、変異誘発的に働く酸化的損傷の修復に関与するのであろう。あるいは、細胞の生存曲線では差が見られなくともわずかの修復能の差が長期的培養 (あるいは発生) を続けるうちに大きな差となって影響が現れてく

かもしれない。いずれにせよ、*Xpg* 欠損ホモ個体では腸管形成時に細胞内に生じた酸化的 DNA 損傷が蓄積され、その結果腸管形成不全を示すと考えられる。

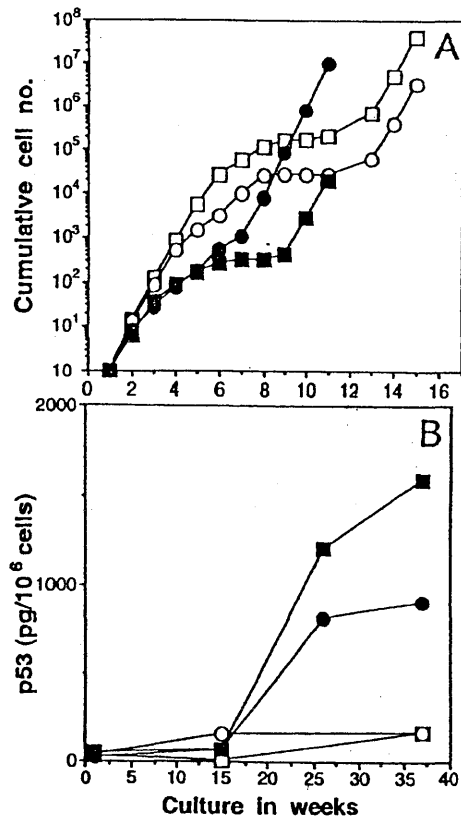


Fig. 4 Growth properties of embryonic fibroblasts (A) and accumulation of p53 in embryonic cells (B). The experiments were carried out with the embryonic fibroblasts from the wild type (open circles) and heterozygous (open squares) mice and from two homozygous *xpg* mutant mice (solid symbols).

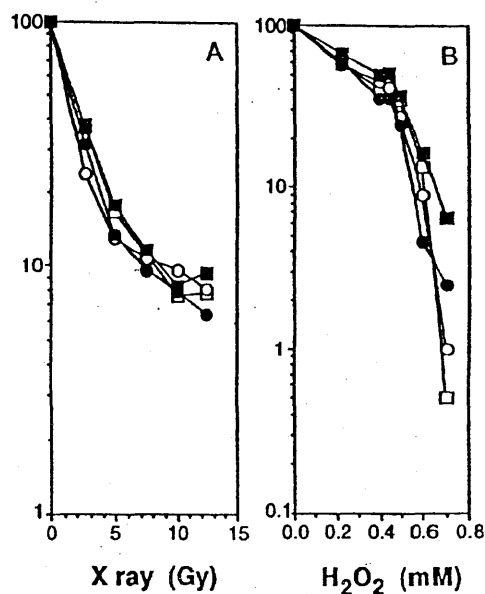


Fig. 5 X-ray (A) and H_2O_2 (B) survival curves for cells derived from *xpg*-deficient mice. The experiments were carried out with the embryonic fibroblasts from the wild type (open circles) and heterozygous (open squares) mice and from two homozygous *xpg* mutant mice (solid symbols).

1 1) *Xpg* 欠損マウス由来細胞における自然突然変異頻度の測定

Xpg 遺伝子発現がまったく見られない *xpg/2* マウス由来の初代培養細胞は、早期老化や不死化を示すなど遺伝的不安定性を示唆する結果が得られた。このような遺伝的不安定性が、試験管内の再構成実験で示されたような酸化的 DNA 損傷の修復欠損の結果生じるものであるか否かを調べるため、*supF* の突然変異検出系を用いて、正常マウス由来細胞と *xpg/2* マウス由来細胞の自然突然変異頻度および突然変異スペクトラムを解析した。*supF* 遺伝子の自然突然変異頻度は、*xpg/2* マウス由来細胞では正常マウス由来細胞に比べ約 3 倍高く、このことが遺伝的不安定性の原因の一つであろうと考えられた。さらに *xpg/2* マウス由来細胞では、A:T 部位での突然変異、特に A:T から C:G へのトランスポージョンが増加していた。*xpg/2* マウス由来細胞の遺伝的不安定性の原因が酸化的 DNA 損傷の修復欠損であるとする、8-oxoG のような G:C 部位での突然変異を誘発するような損傷よりむしろ A:T 部位に変異が誘発される酸化的損傷の修復に欠損があるのかもしれない。

研究発表 原著論文

- 1) Harada, Y., Matsuda, Y., Shiomi, N. and Shiomi, T.: Complementary DNA sequence and chromosomal localization of *xpg*, the mouse counterpart of human repair gene XPG/ERCC5. *Genomics*, 28, 59-65, 1995.
- 2) Miura, M., Nakamura, S., Sasaki, T., Takasaki, Y., Shiomi, T. & Yamaizumi, M.: Role of XPG and XPF/ERCC1 endonucleases in UV-induced immunostaining of PCNA in fibroblasts. *Exptl. Cell Res.* 226, 126-132, 1996.
- 3) Matsuda, Y., Imai, T., Shiomi, T., Saito, T., Yamauchi, M., Fukao, T., Akao, Y., Seki, N., Ito, H., Hori, T.: Comparative genome mapping of the ataxia-telangiectasia region in mouse, rat and syrian hamster. *Genomics* 34, 347-352, 1996.
- 4) Itoh, T., Shiomi, T., Shiomi, N., Harada, Y., Wakasugi, M., Matsunaga, T., Nikaido, O., Friedberg, E. C. and Yamaizumi, M.: Rodent complementation group 8 (ERCC8) correspond to Cockayne syndrome complementation group A. *Mutat. Res.* 362, 167-174, 1996.
- 5) Koike, M., Matsuda, Y., Mimori, T., Harada, Y., Shiomi, N. & Shiomi, T.: Chromosomal localization of the mouse and rat DNA double-strand break repair genes Ku p70 and Ku p80/XRCC5 and their mRNA expression in various mouse tissues. *Genomics* 38, 38-44, 1996.
- 6) Fruscio M. D., Weiher, H., Vanderhyden, B. C., Imai, T., Shiomi, T., Hori, T., Janish, R. & Gray, D. A.: Proviral inactivation of the *Npat* gene of Mpv 20 mice results in early embryonic arrest. *Mol. Cell. Biol.* 17, 4080-4086, 1997.
- 7) Koike, M., Miyasaka, T., Mimori, T. & Shiomi, T.: Subcellular localization and protein-protein interactions of Ku proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252, 679-685, 1998.
- 8) Harada, Y., Shiomi, N., Koike, M., Ikawa, M., Okabe, M., Hirota, S., Kitamura, Y., Kitagawa, M., Matunaga, T., Nikaido, O. & Shiomi, T.: Post-natal growth failure, a short life span, and early onset of cellular senescence and subsequent immortalization in mice lacking the xeroderma pigmentosum group G gene. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2366-2372, 1999.
- 9) Koike, M., Ikuta, T., Miyasaka, T. & Shiomi, T.: Ku80 can translocate to the nucleus independent of the translocation of Ku70 using its own nuclear localization signal, *Oncogene*, 18, 7495-7505, 1999.
- 10) Koike, M., Awaji, M., Kataoka, M., Tsujimoto, G., Kartasova, T. & Shiomi, T.: Differential subcellular localization of DNA-dependent protein kinase components Ku and DNA-PKcs during mitosis, *J. Cell. Sci.* 112, 4031-4039, 1999.
- 11) Koike, M., Ikuta, T., Miyasaka, T. & Shiomi, T.: The nuclear localization signal of the human Ku70 is recognized by the two components of nuclear pore-targeting complex. *Exptl. Cell Res.* 250, 401-413, 1999.
- 12) Koike, M., Shiomi, T. & Koike, A.: Ku70 can translocate to the nucleus independent of Ku80 translocation and DNA-PK autophosphorylation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276, 1105-1111, 2000.
- 13) Sun, X.-Z., Harada, Y.-N., Takahashi, S., Shiomi, N. & Shiomi, T.: Purkinje cell degeneration in mice lacking the xeroderma pigmentosum group G gene. *J. Neurosci. Res.* 64(4), 348-354, 2001.
- 14) Koike M, Kuroiwa A, Koike A, Shiomi T, & Matsuda Y.: Expression and chromosome mapping of hamster Ku70 and Ku80. *Cytogenetics and Cell Genetics* 93, 52-56, 2001.
- 15) Koike M, Shiomi T, Koike A.: Dimerization and nuclear localization of Ku proteins. *J. Biol. Chem.* 276, 11167-11173, 2001.
- 16) Shiomi, N., Hayashi, E., Sasanuma, S., Mita, K. & Shiomi, T.: Disruption of *Xpg* increases spontaneous mutation frequency, particularly A:T-to-C:G transversion. *Mutation Res.* (in press).

平成13年10月刊行
放射線医学総合研究所
研究交流・情報室

千葉県稲毛区穴川4丁目9番1号（〒263-8555）
電話 千葉（043）206-3027（ダイヤルイン）
<http://www.nirs.go.jp> E-mail : kouryu@nirs.go.jp