

土居バイオアシンメトリプロジェクトの研究成果

目次

1. マウス初期発生段階特異的に発現する遺伝子の同定	2
2. Magoh (ショウジョウバエ胚極性形成に必要な mago nashi のマウス相同遺伝子) の初期胚発生過程での発現	4
3. 出芽酵母の老化に伴う遺伝子発現の非対称な分配-DNA Microarray を用いた発現プロファイリングからの解析	6
4. 「珍しさ度数」による蛋白質の分子改良	8
5. <i>M. genitalium</i> と <i>M. pneumoniae</i> のプロテオームにおけるオリゴペプチドの頻度解析	10
6. 非対称分裂に関与する線虫 C3H 遺伝子群の新たな機能	12
7. 線虫発生の顕微鏡画像処理技術の開発	13
8. In situ hybrid 形成による発現地図 細胞分裂の対称性と非対称性のメカニズムを知るために	14
9. 分裂酵母の挿入突然変異法の確立と有性生殖に関わる新規遺伝子の解析	16
10. エイズウイルス逆転写酵素の鎖特異的な DNA 認識	17
11. DNA/RNA 結合蛋白質の非対称な核酸認識機構の解析	19

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 哺乳類初期発生機構の解明

特許出願

なし

報告書他

- 1) Ko, M.S.H.; Kitchen, J.R.; Wang, X.; Threat, T.A.; Wang, X.; Hasegawa, A.; Sun, T.; Grahovac, M.J.; Kargul, G.J.; Lim, M.K.; Cui, Y.; Sano, Y.; Tanaka, T.; Liang, Y.; Mason, S.; Paonessa, P.D.; Sauls, A.D.; DePalma, G.E.; Sharara, R.; Rowe, L.B.; Eppig, J.; Morrell, C.; Doi H. Large-scale cDNA analysis reveals phased gene expression patterns during preimplantation mouse development. *Development*. 127, 1737-1749 (2000).
- 2) Tanaka, T.S.; Jaradat, S.A.; Lim, M.K.; Kargul, G.J.; Wang, X.; Grahovac, M.J.; Pantano, S.; Sano, Y.; Piao, Y.; Nagaraja, R.; Doi H.; Wood III, W.H.; Becker, K.G.; Ko, M.S.H. Genome-wide expression profiling of mid-gestation placenta and embryo using a 15K mouse developmental cDNA microarray. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 16, 9127-9132 (2000).

〔研究者名〕 洪 実、John R. Kitchen、Yushun Cui、長谷川 亜樹

2. Magoh (ショウジョウバエ胚極性形成に必要な mago nashi の マウス相同遺伝子) の初期胚発生過程での発現

当プロジェクトにおいて作成されたマウス卵割期 EST ライブラリから、ショウジョウバエの posterior group 遺伝子の一つである、mago nashi (mago) の相同遺伝子配列 (Magoh) が見いだされた。mago はショウジョウバエ胚極性形成に必要で、進化上その配列は非常によく保存されている。それにも関わらず、ほとんどわかっていない Magoh の機能を調べるため、マウス初期胚発生過程での発現パターンを調べた。

研究成果の概要

1) RT-PCR

初期胚 EST ライブラリでは、Magoh の配列は未受精卵と受精卵に見いだされたが、RT-PCR 法により、未受精卵から 3.5 日胚 (胚盤胞) までの着床前段階で、Magoh の発現を確認できた (図 1)。また、半定量 RT-PCR 法により、発生段階で発現量に変動があることが明らかになった。

2) Magoh 蛋白質の発現パターン

精製抗 Magoh ペプチド抗体を使用してイムノブロット法によりマウス初期胚 (着床前) とマウス成体組織で Magoh 蛋白質の検出を行った。胚発生では、Magoh 蛋白質は未受精卵、受精卵、2 細胞胚、8 細胞胚 (コンパクトン)、胚盤胞で検出された (図 2A)。成体では、Magoh 蛋白質は、調べた組織全て (卵巣、精巣、脳、脾臓) から検出された (図 2B)。

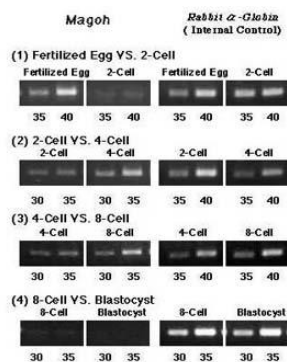


図 1 Magoh の発現パターン (RT-PCR)

半定量RT-PCR :

RNA調整時に外來mRNAを加え、これを内部標準としてRT-PCRを行い、magoの発現量を発生段階ごとに比較した。(Yokoi et al., 1993; 中山, 1998)

結果 :

- (1) 受精卵 > 2細胞胚
- (2) 2細胞胚 < 4細胞胚
- (3) 4細胞胚 < 8細胞胚
- (4) 8細胞胚 > 胚盤胞

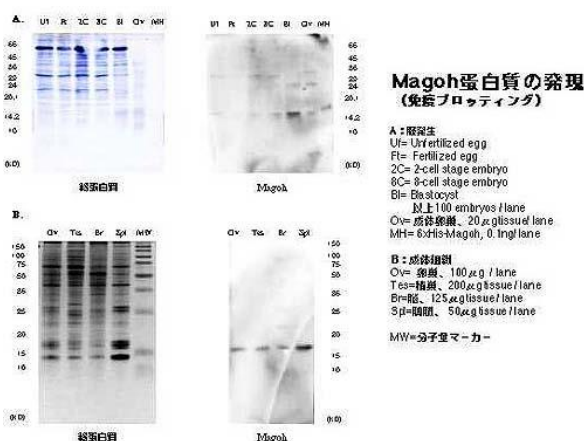


図 2 Magoh 蛋白質の発現パターン

3) GFP レポーター遺伝子による Magoh の細胞内分布の観察

Magoh 蛋白質のアミノ末端側に GFP レポーター蛋白質が位置するように Magoh 遺伝子を組み込んだ組み替えプラスミド (PyF/pEF/Mago::GFP、以後 Mago::GFP) を作製した。導入された遺伝子は 5'側にあるポリオーマ・ウィルスのエンハンサー (PyF) と EF-1 α プロモータで、駆動される。Magoh 遺伝子の 3'側には翻訳外領域と Poly(A)配列が残るよう

に導入した (図 3A)。

Magoh の細胞内分布を調べるために GFP レポーター遺伝子を受精卵に導入し、その発現を GFP の蛍光を観察することによって調べた (図 3B)。Mago::GFP を注入した胚では、2細胞期から、核に蛍光が検出できた。培養を続け、発生の様子を観察した。核の蛍光は8細胞胚まで見られたが、コンパクトーション後は蛍光は弱くなり、胚盤胞ではほとんど見られなくなった。発生率は、未処理胚と Mago::GFP 胚とで差はなく (?80%)、形態的にも差はなかった。

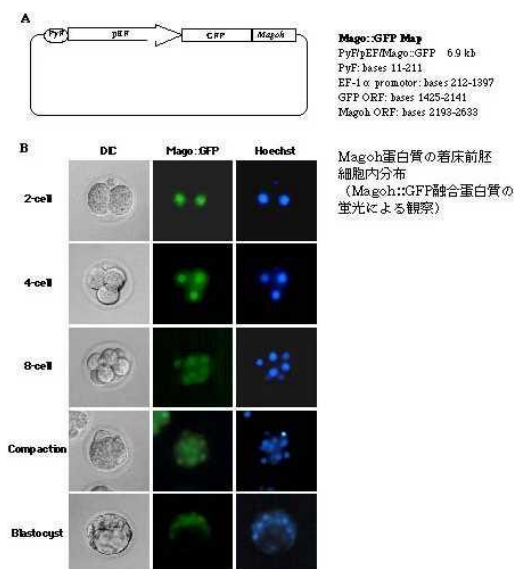


図3 GFP レポーター遺伝子を利用した Magoh の細胞内分布

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) マウス初期胚発生での遺伝子発現動態のモニタリング

特許出願

なし

報告書他

- 1) 岩井裕希子、林田扶紀子、松浦ナナ、金井昭夫、小宮透、土居洋文 (2000)。マウス胚発生初期における Mago nashi 遺伝子の発現。日本発生生物学会第 33 回大会発表要旨集、91 頁

〔研究者名〕 岩井 裕希子、林田 扶紀子

3. 出芽酵母の老化に伴う遺伝子発現の非対称な分配-DNA Microarray を用いた発現プロファイリングからの解析

研究成果の概要

有限回数しか分裂を行なわない、すなわち寿命が存在する出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を用い、数回しか分裂をしていない「若い」細胞集団と、分裂限界に近づいている「老化した細胞集団との間で遺伝子の発現プロファイリングを全ゲノムレベルで行った。まず、目的とする分裂世代の細胞を効率よく、均一な集団として単離する方法を確立した。ついで回収した細胞集団から RNA を抽出後、サブトラクション法の変法である suppression subtractive hybridization PCR 法により、若い細胞あるいは老化細胞により高い発現を示す cDNA の濃縮、及び PCR による増幅を行った。この PCR 断片からプローブを作製し、Microarray に対しハイブリダイゼーションを行った(図 1)。遺伝子発現の解析に際しては、マイクロアレイ解析用ソフトウェア、SpotEditor とデータベース化システム、SpotDB を開発し、その解析を行った。その結果、若い細胞により多く発現しているとして抽出された遺伝子は検索した総数に対して 3.9% に当たる 239 個 (うち機能不明なものが 70 個)、また老化細胞により多く発現しているとして抽出されたものは 1.3% に当たる 78 個 (うち機能不明なものが 21 個) であった(図 2)。抽出された遺伝子産物の機能から、老化細胞においては蛋白質合成能の低下、転写活性の低下、突然変異率の上昇、細胞周期の進行の遅れ、クロマチン構造の弛緩、染色体の不均衡分配などの現象が引き起こされていることが示唆された。

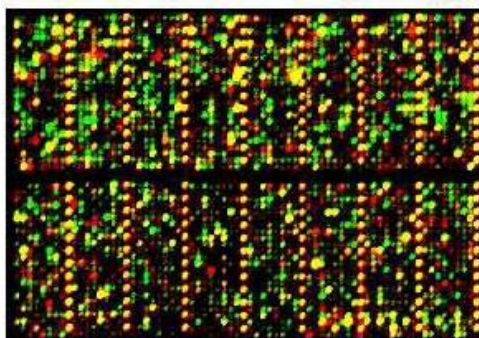


図1 DNA Microarray を用いた出芽酵母菌の老化過程における遺伝子発現プロファイル。

緑；若い細胞に発現量が多い、赤；老化細胞に発現量が多い、黄；発現量変化なし。

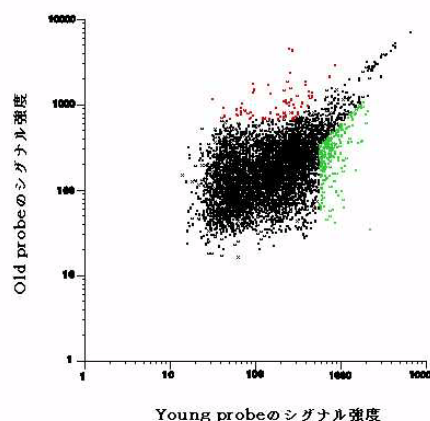


図2 発現量が変動している遺伝子の抽出

シグナル強度比が 2 以上かつシグナル強度が 650 以上のものを抽出した。

緑；若い細胞に発現量が多い、赤；老化細胞に発現量が多い

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 細胞老化過程のゲノムワイドな発現解析
- 2) 老化現象の分子レベルでの解析

特許出願

なし

報告書他

- 1) 檜原理史; 矢部智子; 金井昭夫; 土居洋文. 出芽酵母の有限分裂回数に影響を及ぼす遺伝子の探索. 第 20 回日本分子生物学会年会, 京都, Dec. 16-19, 1997, プログラム・講演要旨集 CD-ROM, 演題番号 3-J-P-428
- 2) 檜原理史; 矢部智子; 平木秀明; 金井昭夫; 土居洋文. 出芽酵母の老化に伴う変化-分裂極性の制御を中心に. 第 71 回日本生化学会年会, 名古屋, Oct. 14-17, 1998, 生化学 70, 624 (1998)
- 3) Hihara, S.; Yabe, T.; Hiraki, H.; Uemura, Y.; Kanai A.; Doi H. Micro array analysis of gene-expression during the yeast life span. Microbial Genome III: Sequencing, Functional Characterization and Comparative Genomics, Chantilly, Virginia, USA, Jan. 29-Feb. 1, 1999, Abstract C-26.
- 4) Hihara, S.; Yabe, T.; Hiraki, H.; Uemura, Y.; Kanai A.; Doi H. Analysis of gene-expression changes by micro arrays during the yeast life span. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Aging: Genetic & Environmental Influences on Life Span, Tamarron, Colorado, USA, Feb. 2-7, 1999, Abstract 32

〔研究者名〕 檜 理史、上村 泰央、矢部 智子

4. 「珍しさ度数」による蛋白質の分子改良

ゲノム情報のアミノ酸配列をオリゴペプチドの集合として捉え、頻度解析することにより、「珍しさ度数」と命名した蛋白質の機能に関わる新たな指標を提唱した。また、具体的に DNA 合成酵素をモデルとして分子改良を行った。

研究成果の概要

プロテオームにおけるオリゴペプチドの頻度解析によりアミノ酸の使われ方に非対称性があることを見出し、これに基づいてオリゴペプチドの"珍しさ"に対するアミノ酸残基の寄与度を表す新たな指標"珍しさ度数"を考案した。この指標は既知の蛋白質間の相同性に基づく従来の機能部位予測法とは異なる概念に基づくものであり、ゲノム情報の新しい利用法である。具体的には与えられたアミノ酸配列の各残基について、その残基を含んだオリゴペプチドがその残基によってどれくらい"珍しい"ものになったかを計算して求めた (図 1)。古細菌の α 型 DNA 合成酵素の解析に適用したところ、「珍しさ度数」の高くなる傾向が酵素活性を担うアミノ酸残基に対応していた (図 2)。また、実際に変異実験により DNA 鎖伸長活性との対応を検討した。

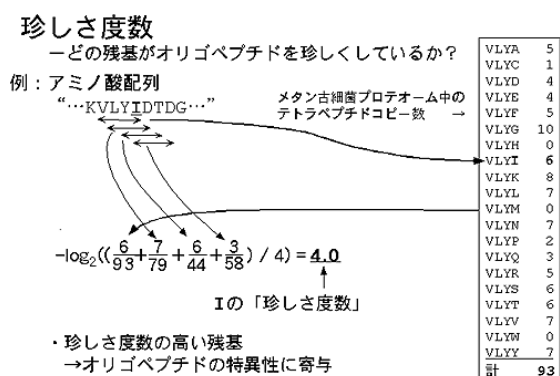


図 1 珍しさ度数の求め方

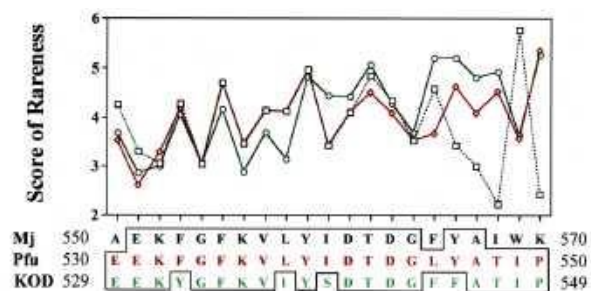


図 2 古細菌 α 型 DNA 合成酵素の機能部位における珍しさ度数

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) タンパク質の機能部位予測
- 2) タンパク質の機能改良

特許出願

なし

特許出願

- 1) 出願番号: H09-19249

発明の名称: 蛋白質の機能部位予測方法と機能部位予測装置並びに蛋白質の機能改良方法

発明者: 土居洋文、平木秀明、金井昭夫

2) 出願番号：H09-19248

発明の名称：耐熱性 DNA 合成酵素

発明者：土居洋文、金井昭夫、石野良純

3) 出願番号：H09-332100

発明の名称：DNA 合成酵素

発明者：土居洋文、金井昭夫、石野良純

4) 出願番号：H10-18699

発明の名称：蛋白質の機能部位予測方法と機能部位予測装置

発明者：土居洋文、平木秀明、金井昭夫

報告書他

- 1) Kanai, A.; Ishino, Y.; Takiguchi, K.; Kishii, M.; Doi, H. Catalytic enhancement by amino acid residues around conserved motif: Regions responsible for DNA elongation activity of thermo-stable DNA polymerase. The 1997 Miami Nature Biotechnology Winter Symposium, Miami, Florida, USA, Feb. 1-5, 1997, Miami Bio/technology Short Reports 8, 49 (1997).
- 2) Takiguchi, K.; Hiraki, H.; Kanai, A.; Doi, H. Modeling of the α -like DNA polymerase from *Pyrococcus furiosus* and prediction of amino acid residues responsible for catalytic enhancement using the genome data of *Methanococcus jannaschii*. The 1997 Miami Nature Biotechnology Winter Symposium, Miami, Florida, USA, Feb. 1-5, 1997, Miami Bio/technology Short Reports 8, 54 (1997).
- 3) 平木秀明; 土居洋文. 古細菌 *M. jannaschii* proteome のオリゴペプチド頻度解析と蛋白質の立体構造解析への応用. 第 20 回日本分子生物学会年会, 京都, Dec. 16-19, 1997, プログラム・講演要旨集 CD-ROM, 演題番号 4-157-P-319.

〔研究者名〕 平木 秀明、金井 昭夫

5. *M. genitalium* と *M. pneumoniae* のプロテオームにおけるオリゴペプチドの頻度解析

研究成果の概要

近縁な生物種である *M. genitalium* と *M. pneumoniae* のプロテオームにおけるオリゴペプチドの出現頻度を比較解析し、それぞれの種にのみ出現する特徴的な pentapeptides を発見した (図 1)。これらの種特異的な pentapeptides の多くは、細胞接着・膜タンパク質系に集中して出現していることが分かった (図 2)。

<i>M. genitalium</i>		<i>M. pneumoniae</i>	
QQFNQ:	8	LSAEL:	43
QQQFN:	7	ELSAE:	42
NQQQF:	7	SAELS:	37
KQPES:	7	AELSA:	36
YYQDP:	6	QGEQI:	35
QYYQD:	6	GEQIK:	21
PEVKQ:	6	KVDKL:	17
NPNMQ:	6	EQKAQ:	16
LKKEL:	6	AQGEQ:	16
EVKQP:	6	QKAQG:	13
DLEKL:	6	QEKIA:	12
VLSLI:	5	KAQGE:	12
RPGFN:	5	VEQKA:	11
QRPGF:	5	TKKGT:	11
QPESV:	5	SLKKS:	11
PPEVK:	5	NQGKK:	11
NYGFD:	5	NFFYK:	11
NKLNL:	5	MKEKI:	11
LPPEV:	5	KEFNE:	11
LLLEN:	5	IQEKI:	11

図 1 種特異的な pentapeptides と出現頻度

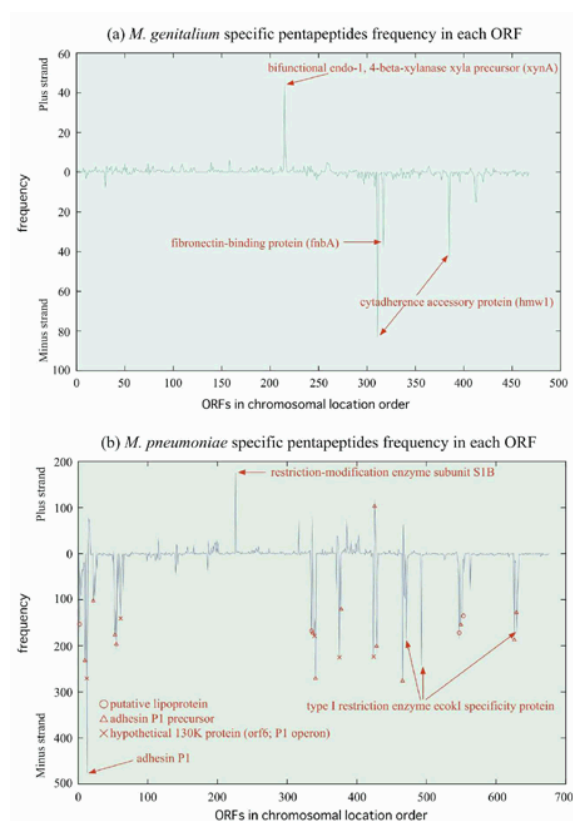


図 2 種特異的な pentapeptides の ORF 別出現頻度

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 新しい生物種の近縁関係の解析法の開発

特許出願

なし

報告書他

- 1) 上村泰央, 長谷川亜樹, 平木秀明, 土居洋文. "Mycoplasma genitalium と Mycoplasma pneumoniae の proteome におけるオリゴペプチドの頻度解析", 第 20 回日本分子生物学会年会 1997, 4-EH-P-163.

- 2) Y. Uemura, A. Hasegawa, H. Hiraki, and H. Doi. "Comparative oligopeptides analysis in the proteome between *M. genitalium* and *M. pneumoniae*", *Microbial & Comparative Genomics* 3, 90 (1998).
- 3) Y. Uemura, A. Hasegawa, H. Hiraki, and H. Doi. "Oligopeptides in proteome: Comparative analysis between *M. genitalium* and *M. pneumoniae*", *International Symposium on Functional Genomics*, 1998.
- 4) Y. Uemura, A. Hasegawa, H. Hiraki, and H. Doi. "Comparative oligopeptides analysis in the proteome between *M. genitalium* and *M. pneumoniae*", *Genome Sequencing and Analysis Conference*, 1998.

〔研究者名〕 上村 泰央

6. 非対称分裂に關与する線虫 C3H 遺伝子群の新たな機能

線虫における生殖細胞の形成に關与する新しい C3H 遺伝子群を単離し、解析を行った。

研究成果の概要

線虫ゲノム配列をもとに、総数 17 種の全長 C3H type zinc-finger 遺伝子を RT-PCR 法により単離した。これら遺伝子群の中から多重 RNAi (RNA interference) 法により、著しく産卵数が減少し、卵巣が肥大した表現型を示す一群を同定した(ここでは便宜的に C 遺伝子及び Z 遺伝子と呼ぶ、図 1)。この表現型は、染色体の配置異常が原因で生じたものと考えられる。in situ hybridization と免疫染色解析によりこれら新規 C3H type zinc-finger 蛋白質群は全て卵巣特異的に共局在し、卵形成過程において重複して機能することが示唆された(図 2)。特に、C 蛋白質は、卵成熟過程だけでなく胚発生過程においても発現していることを明らかにした。

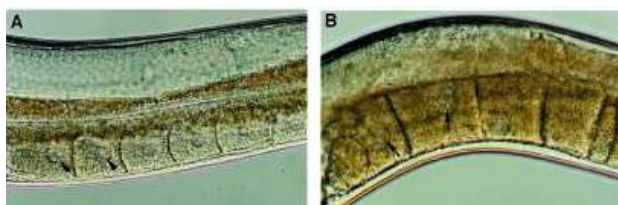


図 1 C 遺伝子と Z 遺伝子のダブル RNAi の表現型
野生型 (A) と比較して C と Z 遺伝子のダブル RNAi (B) では、卵巣が著しく肥大しており、卵母細胞の形態も様々であった。また、核の形態(矢印)は野生型(矢じり)と比較して一部、巨大化していた。

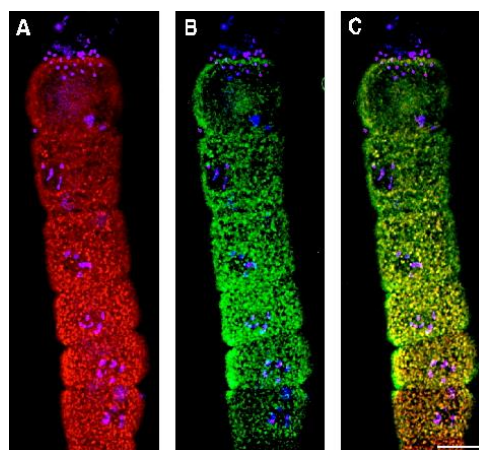


図 2 C と Z 蛋白質の共局在

C 蛋白質 (A) も Z 蛋白質 (B) も卵母細胞の細胞質に顆粒状に局在しており、両者の局在は完全に一致していた (C)。

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 線虫の卵成熟メカニズムの解明
- 2) 胚発生過程での生殖細胞分化システムの解明

特許出願

なし

報告書他

- 1) Shimada, M., Kobayashi, T., and Doi, H. Novel C3H type zinc-finger gene family involved in *C. elegans* oocyte maturation. 投稿準備中

〔研究者名〕 嶋田 益弥、小林 貴子

7. 線虫発生 of 顕微鏡画像処理技術の開発

動物の初期発生においては非対称な分裂を繰り返して適切な細胞が適切な場所にくるよう to 制御されている。細胞が透明で細胞系譜が既に解明されている線虫 *C. elegans* を材料に、この過程において細胞間の隣接関係がどのように変化しているか観察するために必要な基盤技術の開発を行った。

研究成果の概要

C. elegans 初期発生過程における細胞形状を蛍光顕微鏡で観察できるようにするため、膜に局在させるための Ras-farnesylation signal を C 末に持つ GFP が EF1 α プロモータ下流にあって構成的に発現するようなベクターを構築し、線虫に導入して株を樹立した (図 1)。三次元蛍光画像より細胞膜の形状を抽出するため、三次元的に膜状に光っている部分を強調する画像処理フィルタを開発した (図 2)。

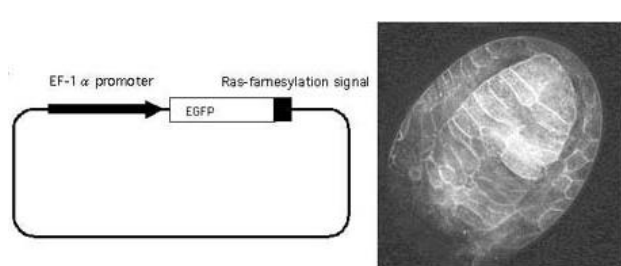


図 1 ベクター (左) を導入した線虫胚の蛍光顕微鏡画像 (右)。

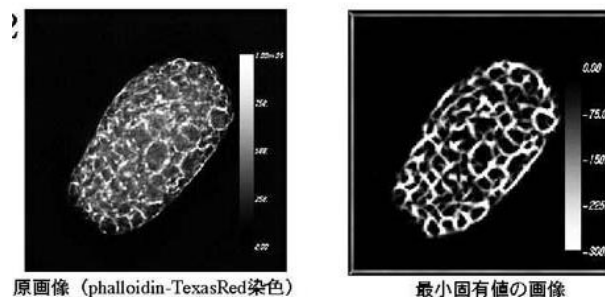


図 2 画像処理前の線虫胚の画像 (左) とヘッセ行列の最小固有値を計算する画像処理フィルタによる処理後の画像 (右)。実際の画像処理計算は三次元像に対して行われている。

成果展開可能なシーズ・用途等

- 1) 線虫の初期発生の解析

特許出願

なし

〔研究者名〕 平木 秀明

8. In situ hybrid 形成による発現地図 —細胞分裂の対称性と非対称性のメカニズムを知るために

研究成果の概要

ヒトを含めた哺乳類の遺伝子はおよそ4?10万種と見積もられている。これらの遺伝子が、組織や器官の分化の際に「いつ、どこで、どの程度」発現するのか、またガンなどの病態組織において遺伝子発現が正常組織と比べてどのように変動するのかといったような遺伝子の時間的・空間的な発現の全体像を網羅的に掌握することは、細胞分化やガン化の現象を理解する上で不可欠である。

本研究は上記目的の遂行のためのモデルとして精原細胞が精子に分化する際にどのような遺伝子が関与しているのかを高速 in situ hybrid 形成法をもちいて検討した (図1)。その結果、約600種類の遺伝子の時間的・空間的な発現を明らかにした。またこれら発現情報を必要に応じて抽出できるように発現データベースを構築した (図2)。

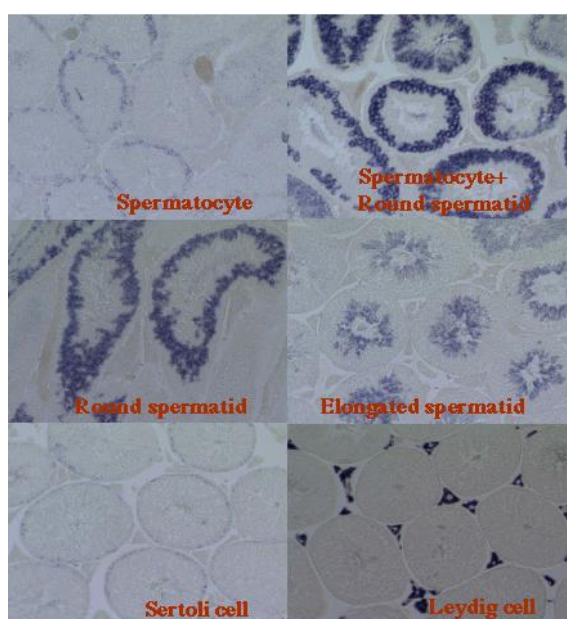


図1 マウス精巣組織に対する in situ ハイブリダイゼーションの例

G0663-342-1

Annotation

ntk

Sequence

```
TGGTGTTCACGAAAGAACTCTCTTAGAGATACCCCTAAGTCTATGAGACACTGGGAGAA
AGCGGCTACAGGATACCCGAAAGAGCCGCTGCGGGAATGATGATGAGAGATGACCTCC
TATATGATGAGATGCTCTGGGAGGAACTCTCCGAGCTCCGAGGCTGGCTGGGAGGCTTA
GAGACTCCAGATGCTCCAGGAGATAGGCTGACCCGAGGAGGCTGCTGCTGCTGCTG
ATTTGATGAGTAAAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAG
TATTCGATTAAGGCGGCTTGGATTAAGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
```

Expression

spermatogonia	-
spermatocyte	-
round spermatid	-
elongated spermatid	-
Leydig cell	-
Sertoli cell	+

Clones

[T0240E](#)

図2 遺伝子発現データベースの構築

将来への展望

モデルケースで明らかにされた知見をさらに発展させ、すべての組織や分化過程での遺伝子発現のモニタリングを進めていきたい。

特許出願

なし

報告書他

- 1) 小宮透, 96 ウェル用の DIG 標識 RNA プローブ作成法 細胞工学, 18, 125-127, (1999)
- 2) 小宮透, 96 ウェルで行う切片の in situ ハイブリダイゼーション 細胞工学, 18, 405-407 (1999).
- 3) 小宮透 in situ ハイブリッド形成による発現地図 ゲノム機能：発現プロフィールとトランスクリプトーム、シリーズポストシーケンスのゲノム科学、中山書店、102-115, (2000)

〔研究者名〕 小宮 透、谷川 葉子、是永 知子、平木 秀明、上村 泰央、長谷川 亜樹

9. 分裂酵母の挿入突然変異法の確立と有性生殖に関わる新規遺伝子の解析

研究成果の概要

分裂酵母では様々な突然変異体が単離されているが、その原因遺伝子の同定、単離には多大な時間を要する。そこで、変異原因遺伝子を容易に同定するために挿入突然変異法の確立を行った。そして分裂酵母の有性生殖に欠損のある挿入突然変異体を単離し（図）、その原因遺伝子を同定した。また、一部の遺伝子の解析を行い、それらが胞子壁の構成成分、核形態と位置の維持に必須な分子、減数第二分裂に必要な RNA 結合蛋白質などをコードする遺伝子であることを明らかにした。

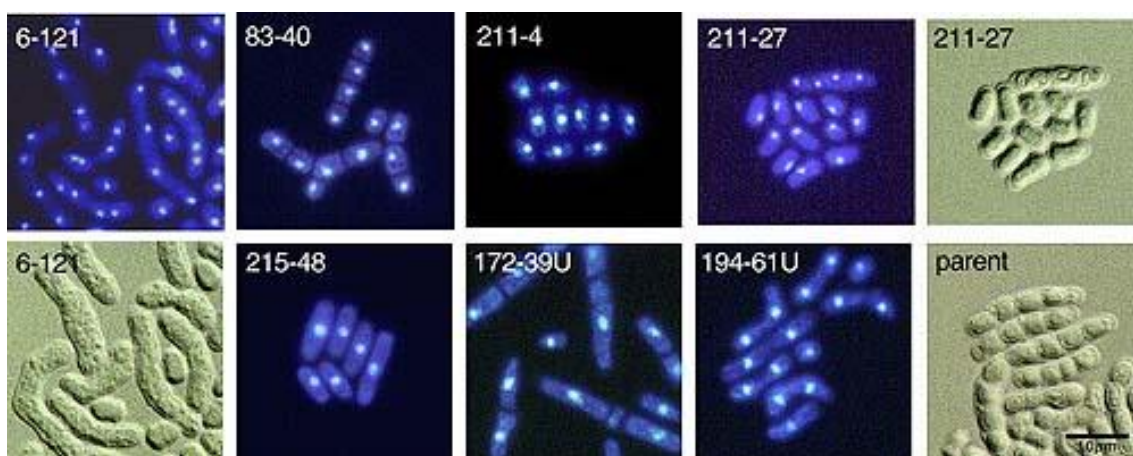


図 挿入突然変異法によって得られた有性生殖に欠損のある突然変異体

将来への展開、可能性

- 1) 分裂酵母の変異遺伝子の容易な同定
- 2) 有性生殖過程の分子レベルでの解明

特許出願

なし

報告書他

発表準備中

〔研究者名〕 饗庭 一博、中山 裕子

10. エイズウイルス逆転写酵素の鎖特異的な DNA 認識

エイズウイルスのゲノム複製を担う逆転写酵素と複製開始領域のゲノム配列との関係から、レトロウイルスのゲノム進化戦略における非対称性の意義を探ろうと試みた。

研究成果の概要

エイズウイルスの逆転写酵素はウイルスゲノム一本鎖 RNA から二本鎖の DNA を生成する。ゲノム複製における複製開始領域の配列(PPT)と逆転写酵素との結合親和性は結合の方向において非対称性を示した (図 1)。また、複製の伸長反応においても同じ方向特異性を示した (図 2) ことより、DNA 合成の変異率あるいは変異の入り方が DNA 二本鎖間で非対称性を示すことが示唆された。



図 1 PPT 配列を含むオリゴ DNA と HIV-1 逆転写酵素との解離定数
HIV-1 逆転写酵素はプラス鎖合成方向を良く認識する。

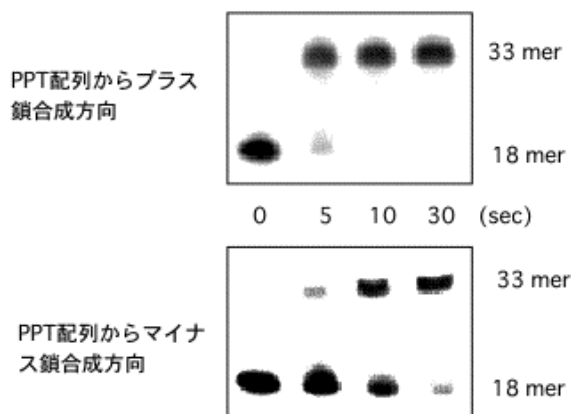


図 2 DNA 伸長速度の方向による差
PPT 配列からはプラス鎖合成の方が速い。

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) エイズ治療薬の開発

特許出願

なし

報告書他

- 1) 岩城 俊雄, Y.Chang, 皿井 明倫, 石野 良純, 品川 日出夫, 土居 洋文. HIV-1 逆転写酵素の基質結合に対する鋳型配列の影響. 第 69 回日本生化学会大会・第 19 回日本分子生物学会年会合同年会講演要旨集, 564 (1996)
- 2) Iwaki, T., Chang, Y., Sarai, A., Ishino, Y., and Doi, H. HIV-1: Structure of genomic sequence and template-primer binding specificity of the reverse transcriptase from the virus. The 1997 Miami Nature Biotechnology Winter Symposium, Miami, Florida, USA, Miami Bio/technology Short Reports 8, 48 (1997).

- 3) 岩城 俊雄, Y.Chang, 皿井 明倫, 石野 良純, 品川 日出夫, 土居 洋文. HIV-1 逆転写酵素の基質結合に対する配列特異性について. 日本生物物理学会第 35 回年会 講演予稿集, S35 (1997)
- 4) 岩城 俊雄, Y.Chang, 皿井 明倫, 石野 良純, 品川 日出夫, 土居 洋文. HIV-1 逆転写酵素の基質結合に対する G トラクトの効果について. 第 20 回日本分子生物学会年会講演要旨集, 1-EH-P-089 (1997)

〔研究者名〕 岩城 俊雄

11. DNA/RNA 結合蛋白質の非対称な核酸認識機構の解析

超好熱性古細菌の DNA 複製酵素やヘリカーゼを用いて核酸との非対称な結合様式を解析した。古細菌、線虫でアミノ酸組成に偏りのある新規の RNA 結合蛋白質を見い出した。

研究成果の概要

超好熱性古細菌 *P.furiosus* から見い出した Pfu ヘリカーゼ-1 を基軸として DNA の 2 本鎖に内在する非対称性を考察した。Pfu ヘリカーゼ-1 は DNA の複製フォーク等に見られるような 1 本鎖部分にエンターし、3'→5'に進みながら ATP 依存に 2 本鎖部分を巻き戻していくと考えられる (図 1)。この時、本ヘリカーゼが移動するのは連続鎖の鋳型となる鎖であり、この意味で Pfu ヘリカーゼ-1 は 2 本鎖 DNA の非対称性を区別していることになる。また、同古細菌の発現ゲノムライブラリーから核酸への結合を指標に新規の RNA 結合蛋白質を同定し、FAU-1 蛋白質と命名した。FAU-1 蛋白質の本来の標的 RNA を同定することを目的に RNA Binding Site Selection 法を試みた。その結果、FAU-1 蛋白質が認識する RNA は特徴的なステム及びループより構成される 2 次構造を有することが明らかとなった(結合常数: $7 \times 10^{-8} \text{ M}$)。この標的 RNA を用いて FAU-1 蛋白質の結合部位を RNase フットプリント法により求めたところ、2 次構造上のループ部分で AU 配列を含んだ領域が FAU-1 蛋白質の結合領域として同定された (図 2)。FAU-1 蛋白質の一次構造中には酸性、塩基性のクラスターが存在し、アミノ酸の使用頻度に偏り(非対称性)が見られた。この偏りを有した新規の遺伝子産物を線虫 *C. elegans* のゲノム中に見い出し、生化学的な解析をしたところ、RNA 結合蛋白質であることが明らかとなった。

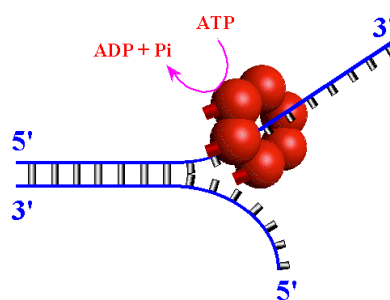


図 1 Pfu ヘリカーゼによる DNA 鎖の非対称な認識

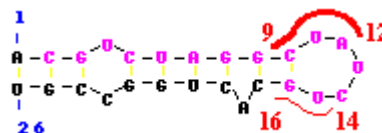


図 2 RNA 結合蛋白質 FAU-1 によって認識される基質 RNA の 2 次構造

成果展開可能なシーズ、用途等 機能未知の遺伝子産物の系統的な解析法

特許出願 なし

報告書他

- 1) 金井昭夫. 古細菌は真正細菌と真核生物の架け橋となるだろうか? 細胞工学. 18, 538-540 (1999).
- 2) Kanai, A.; Oida, H.; Doi, H. Systematic identification of novel DNA/RNA binding proteins from *Pyrococcus furiosus* by expression cloning. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Archaea: Bridging the Gap between Bacteria and Eukarya, Taos, New Mexico, USA, Jan. 9-14, 1999, Abstract 32. 論文準備中
〔研究者名〕 金井 昭夫、笈田 花子、松浦 ナナ、是永 知子、林田 扶紀子、平木 秀明