

古沢発生遺伝子プロジェクトの研究成果

目次

1. ゲル内 DNA 競合再結合法	2
2. 不死化細胞株の樹立	3
3. 遺伝子発現調節機構の解析	4
4. 均一化 cDNA ライブラリーの作製	5
5. 原腸陥入に関与するタンパク質および遺伝子の探索	7
6. 生殖質特異的なタンパク質の遺伝子クローニング	8
7. 生殖細胞特異的なタンパク質の遺伝子クローニング	10
8. Lone-linkerPCR 法の開発	11
9. マウス始原生殖細胞の制御因子遺伝子の発見	13
10. FGF と中胚葉分化	15
11. 新しい遺伝子トラップ法の開発	16
12. 新しい進化仮説の提唱	18

1. ゲル内DNA競合再結合法

僅かな構造変化を有する未知 DNA を選択的にクローニングできる方法(ゲル内 DNA 競合再結合法:In-gel competitive reassociation:IGCR 法)を開発し、医学、生物学の分野に応用し始めた。

研究成果の概要

哺乳動物のゲノムにおいて 1 コピー/ゲノムの構造変化を有する未知の DNA をクローニングできるゲル内競合再結合法(IGCR 法)を開発した。

IGCR 法を用いてラット脳で増幅していると考えられる DNA(BL-1)をクローニングすることができた。(図 1)

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 生物のゲノムの動的挙動の研究
- 2) 癌、老化などの疾患に関連した DNA のクローニング

特許出願

- 1) ゲノム DNA のクローニング方法

特 願：平 1-255031(平 1.9.29) 特開平 3-117488(平 3.5.20)

出 願 人：新技術事業団、横田博

請求の概要：ゲル中での競合的再結合を利用した一次構造の異なるゲノム DNA をクローニングする方法

報告書他

- 1) H.Yokota,T.Iwasaki,M.Takahashi and M.Oishi, A tissue-specific change in repetitive DNA in rats., Proc.Natl.Acad.Sci.USA.Vol.86,p.9233-9237(1989).
- 2) H.Yokota, M.Takahashi,T.Iwasaki and M.Oishi, Possible alteration of genomic DNA in specific rat tissues., Cell.Str.Func.Vol.14,p.759-767(1989)
- 3) H.Yokota and M.Oishi, Differential cloning of genomic DNA:Cloning of DNA with an altered primary structure by in-gel competitive reassociation., Proc.Natl.Acad.Sci.USA.Vol.87,p.6398-6402(1990)

〔研究者名〕横田 博、大石道夫、菊屋恵理子、遠藤千香子

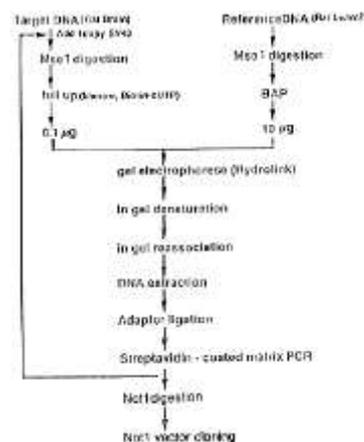


図 1 ゲル内 DNA 競合再結合法 (IGCR 法)の概略

2. 不死化細胞株の樹立

tsSV40largeT 遺伝子導入マウスからの不死化細胞株の樹立。

研究成果の概要

温度感受性突然変異株 SV40largeT 抗原遺伝子 (tsSV40largeT-antigen gene) をマイクロインジェクション法によりマウス受精卵に導入して外来遺伝子導入(トランスジェニック)マウスを作製した。(図1)

作製したトランスジェニックマウスより、肝細胞、腎尿細管細胞、骨髄間質細胞、胃粘膜上皮細胞などの細胞株が樹立された。これら細胞はいずれも、温度依存性の増殖能をもち、形態的にもまた機能的にも固有の分化形質をもつことが分かった。

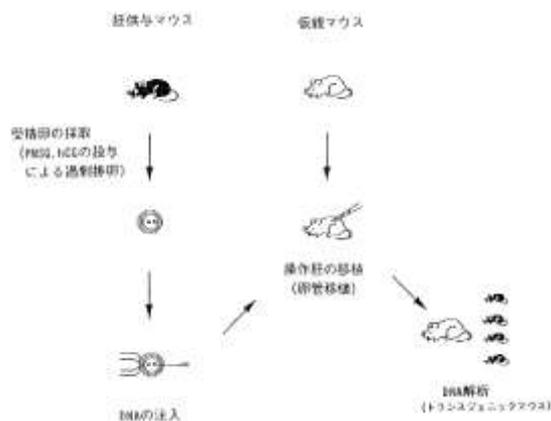


図1 マイクロインジェクション法によるDNA注入の概略

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 細胞分化、増殖、細胞死の制御の研究
- 2) 毒性研究
- 3) 実験動物代替法の研究

特許出願

- 1) 不死化細胞株の樹立方法とその細胞株

特 願：平 3-217578(平 3.8.28)

出 願 人：新技術事業団、古沢満

請求の概要：tsSV40largeT 抗原遺伝子導入マウスからの不死化細胞株の樹立方法とその細胞株

報告書他

- 1) N.Yanai, M.Suzuki, and M.Obinata, Hepatocyte cell lines established from transgenic mice harboring temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen gene., Exp.Cell Res.,197,50-56,1991
- 2) N.Yanai, Y.Satoh, S.kyo, K.Abe, M.Suzuki, and M.Obinata, A tubule cell line established from transgenic mice harboring temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen gene., Jpn.J.Cancer Res.,82,1344-1348,December 1991

他

〔研究者名〕 鈴木 操

3. 遺伝子発現調節機構の解析

遺伝子一分子の発現動態を、ステロイドホルモンで誘導のかかるマウス乳癌ウイルスの発現調節領域を用いて解析した。

研究成果の概要

マウス乳癌ウイルス(MTV)の発現調節領域に beta-galactosidase 遺伝子をついなどものを作製し、マウス L 細胞に導入した。細胞のゲノム中に、この発現ベクターが、一分子入ったものを選別し、GL27、GL19、GL21 という三種類の細胞株を樹立した。(図 1)

様々な濃度のグルココルチコイドホルモンで、誘導をかけた後、enzyme histochemistry, cell sorter の二種類のテクニックを使って、細胞一個ずつの beta-galactosidase の発現を調べた。その結果、従来認められてきた考えとは異なり、遺伝子一分子の発現は、誘導剤の濃度によって、一義的に決まるものではなく、非常にストカスティックであることを示唆する結果がえられた。この結果をもとに遺伝子誘導の確率的モデルを提案した。

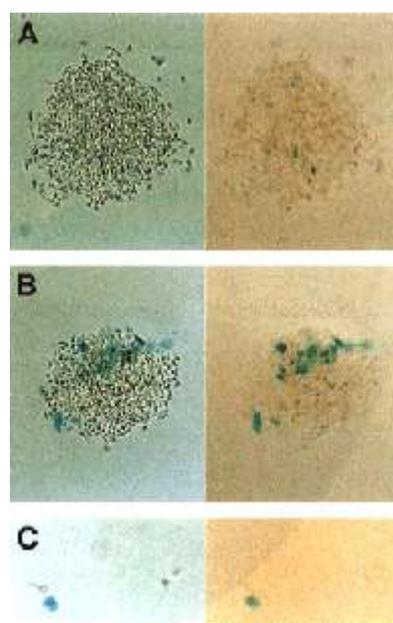


図 1 ゲノム中に発現ベクターが導入された細胞株(GL27)

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 単一分子レベルでの遺伝子発現機構の解明
- 2) 発生における形態形成のモデル構築

特許出願

なし

報告書他

- 1) Ko, M.S.H., Nakauchi, H., and Takahashi, N., The dose-dependence of glucocorticoid-inducible gene expression results from changes in the number of transcriptionally active templates., EMBO J. 9:2834-2882(1990).
- 2) Ko, M.S.H., A stochastic model for gene induction., Journal of theoretical biology 153:181-184(1991).
- 3) Ko, M.S.H., Induction mechanism of a single gene molecule: Stochastic or Deterministic?, BioEssays 14:341-346(1992).

〔研究者名〕 洪 実、高橋直美

4. 均一化 cDNA ライブラリーの作製

cDNA クローンの重複を除き、すべてのクローンが同じ割合で含まれているような cDNA ライブラリーを開発、作製した。

研究成果の概要

通常、重複して存在している cDNA 種を均一化するために、次のような三つの工夫をした。

- 1) 二本鎖 cDNA を変性再会合した後、一本鎖で残った cDNA 種を集めてくること。
- 2) 遺伝子ファミリー内での、クロスハイブリダイゼーションを防ぐために、cDNA の 3 非翻訳領域が遺伝子に特異的であることを利用する。
- 3) cDNA 集団を全体として増やすために“Lone-linkerPCR”法を使用する。

これらのアイデアより、図 1 のストラテジーを組み立て、マウスの L 細胞を材料として、均一化 cDNA ライブラリーの作製を行った。最初、約 20,000 倍あった重複指数が、三回均一化後には、約 40 倍となって、本法の有効性が示された。その後、マウスの胎児を出発材料として、同様のストラテジーにて、均一化 cDNA ライブラリーの作製を行った。

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 発現遺伝子のカタログ化による医学、生物学での広範囲の応用
- 2) ヒト、マウスゲノムプロジェクト

特許出願

- 1) 均一化 cDNA ライブラリーの作製法

特 願：平 2-224627(平 2.8.27) 特開平 4-108385(平 4.4.9)

出 願 人：新技術事業団、洪 実

請求の概要：mRNA を鋳型として、合成した二本鎖 cDNA を変性させ、さらに任意の時間内で、再会合させた後、二本鎖に再会合した cDNA と一本鎖のままの cDNA を分離し、この一本鎖の cDNA を二本鎖 cDNA に合成して各々クローン化してなることを特徴とする均一化 cDNA ライブラリーの作製法。

報告書他

- 1) Ko, M.S.H. An equalized cDNA library by the reassociation of short double-stranded cDNAs. Nucl. Acids Res. 18:5705-5711 (1990).
- 2) Ko, M.S.H., Ko, S.B.H., Takahashi, N., Nishiguchi, K., and Abe, K. Unbiased amplification of a

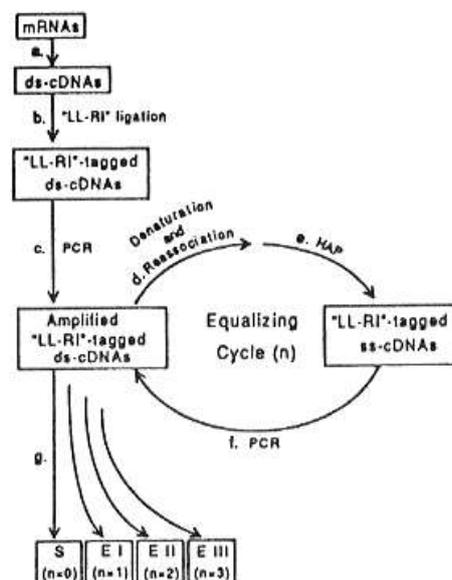


図 1 均一化のためのストラテジー

highly complex mixture of DNA fragments by 'lone linker'-tagged PCR. *Nucleic Acids Res.*18:4293-4294(1990).

- 3) Takahashi,N. and Ko,M.S.H.The short3'-end region of complementary DNAs as PCR-based polymorphic markers for an expression map of the mouse genome.*Genomics* 16:61-168(1993).
- 4) Ko,M.S.H.Equalized cDNA libraries.In:Larrick,J.W.and Siebert,P.D.(eds).Reverse transcriptase PCR.Simon and Schuster Publisher,Inc.,in press.
- 5) Ko,M.S.H.An equalized cDNA library and its application. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 38:420-428(1993).
- 6) Ko,M.S.H.Strategy for the construction of an equalized cDNA library.*Jikken-Igaku*, in press.

〔研究者名〕 洪 実、高橋直美

5. 原腸陥入に関与するタンパク質および遺伝子の探索

原腸陥入ほか形態形成に重要な役割を果たすタンパク質および遺伝子の探索をおこなった。

研究成果の概要

原腸陥入が異常なアフリカツメガエルの突然変異体で欠損している 38K タンパクを精製し、アミノ酸配列の決定を試みた。また抗体により 38K タンパクの cDNA クローンの単離を試みた。

弱い細胞接着をになっているセレクトインのファミリーの cDNA クローンを、ツメガエル胚から分離した。(図 1)

X-sel 5	DLVAIQNKKEEIEHLNKTLPYNPTYYWIGIRKLNQAWTWVG
X-sel 8	DLVAIQNKEENDYLNETHFNKAYYWIGIRKLNDFWTRVT
H-E-sel	HLVAIQNKKEEIEYLNSILSYSESYYWIGIRKVNNVVWVVG
M-L-sel	DLVAIQNKREIEYLENTLEKSPYYWIGIRKIGKMMWTWVG
H-L-sel	DLVAIQNKAEIEYLEKTLRFSRSYWIGIRKIGGIWTWVG
H-P-sel	DLVAIQNKNEIEYLNKVLPLYSSYYWIGIRKNNKTWTWVG
X-sel 5	TNKTLTTEEVKNWQKGEFN-NKKNKEDCVELY
X-sel 8	TOKAITTEVENWAPGEFNIAQKVSSEDCVELY
H-E-sel	TQKPLTEEAENWAPGEFN-NRQKDEDCVELY
M-L-sel	TNKTLTKAENWQAGEFN-NKKSKEKDCVELY
H-L-sel	TNKSLTEEAENWQDGEFN-NKKNKEDCVELY
H-P-sel	TNKTLTNEAENWADNEFN-NKRNNEDCVELY

図 1 X-sel と他の selectin のアミノ酸配列の比較

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 弱い細胞接着の発生における役割の理解—ガン転移、神経ネットワークの形成

特許出願

なし

報告書他

なし

〔研究者名〕 小林久男、野呂知加子、池西厚之

6. 生殖質特異的なタンパク質の遺伝子クローニング

アフリカツメガエル初期胚において生殖細胞の分化に関係していると考えられている生殖質(germplasm, 図 1)に存在するタンパク質及びその遺伝子を解析した。

研究成果の概要

1) 生殖質の単離

アフリカツメガエル初期胚(32 細胞期)(図 1)より不連続シヨ糖密度勾配遠心法により生殖質に富む分画を得ることができた(図 2)。

2) 生殖質及び生殖顆粒に対するモノクローナル抗体の作製

単離した生殖質分画を免疫原として生殖質に対するモノクローナル抗体を得た(図 3)。さらに生殖質中に存在する生殖質特有の構造体(生殖顆粒)に対するモノクローナル抗体も得られた(図 4)。

3) 生殖顆粒特異的な遺伝子クローニング

アフリカツメガエル卵巣の cDNA ライブラリーを生殖顆粒に対するモノクローナル抗体によってスクリーニングを行ない、卵巣のみに発現しているクローン(No.48-3,-5,6B5-1)を得た(図 5)。

4) 生殖顆粒中の DEAD タンパク質の同定

ATP 依存性の RNA Helicase ファミリーである DEAD タンパク質が生殖顆粒に存在することを DEAD 配列に対する抗体を用いた免疫染色によって同定した。

5) 始原生殖細胞に対するモノクローナル抗体の作製

将来卵や精子となる始原生殖細胞の表面を認識するモノクローナル抗体(No.14-5)を得た(図 6)。この抗体は移動能を持つ始原生殖細胞が生殖隆起部に定着する発生段階にのみ反応する。

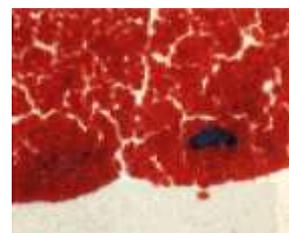


図 1 アフリカツメガエル初期胚(32 細胞期)の植物極細胞質に存在する生殖質



図 2 単離された生殖質

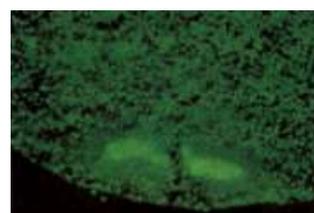


図 3 生殖質に対するモノクローナル抗体(A20G8)による生殖質の間接蛍光抗体法

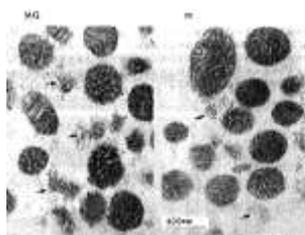


図 4 生殖質に対する免疫電顕

ミトコンドリアの間に生殖顆粒(矢印)が散在している。ミトコンドリアと生殖顆粒に反応する抗体(MG)とミトコンドリアのみに反応する抗体(M)。抗体の反応は金粒子で見ることができる。

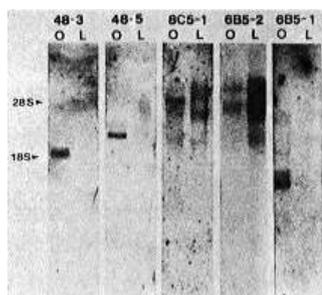


図 5 成体の卵巣(O)と肝臓(L)より調整した RNA に対するノザンプロットティングプローブに用いた cDNA クローンは、抗体(No.48,8C5,6B5)によりスクリーニングして得られたものである。



図 6 アフリカツメガエル始原生殖細胞表面と反応するモノクローナル抗体(No.14-5)

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 生殖細胞への分化のメカニズムの解明
- 2) 細胞の接着、移動、分化に関わる細胞表面分子の解明

特許出願

なし

報告書他

- 1) Watanabe.M.,K.Itoh,K.Abe,T.Akizawa, K.lkenishi and M.Furusawa, Immuno-Localization of DEAD Family Proteins in Germ Line Cells of Xenopus Embryos., Develop. Growth & Differ.,34(2),223-231(1992)

他

〔研究者名〕 渡辺雅尚、伊藤啓二

7. 生殖細胞特異的なタンパク質の遺伝子クローニング

アフリカツメガエルおよびマウスの生殖細胞で特異的に発現する遺伝子を単離し解析を行った。

研究成果の概要

アフリカツメガエル卵巣 cDNA ライブラリーから生殖細胞で特異的に発現する遺伝子(Xvasa2)を単離した。抗体を用いた解析からその蛋白質が生殖細胞形成の比較的初期から発現することを見いだした(図 1)。この遺伝子はショウジョウバエの生殖細胞形成に重要な役割を演じている遺伝子と相同性が高く、同様な機能をもっている可能性が考えられる。作製したモノクローナル抗体は生殖細胞の特異的なマーカーとして、あるいは生化学的な解析のための道具として利用できる。またこの遺伝子は哺乳類にも存在することが判明し、マウスの始原生殖細胞の cDNA ライブラリーから Xvasa2 の相同遺伝子を単離した(MVH)。その発現も生殖細胞に限定され、発生の比較的初期から発現することが明らかになった(図 2)。現在この遺伝子の染色体 DNA を単離中である。この遺伝子が種を越えて存在しているという結果は生殖細胞の決定あるいはその形成にこの遺伝子が重要な役割を演じている可能性を示唆している。

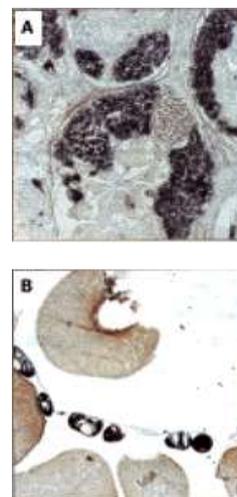


図1 Xvasa2蛋白質の局在。抗Xvasa2抗体で、精巣(A)および卵巣(B)を染色した。生殖細胞が特異的に紫色に染色された。

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) この遺伝子の機能を明らかにし、またこの遺伝子産物と相互作用する因子を検索することによって、生殖細胞の決定、あるいは形成のメカニズムを解明することができる。
- 2) この遺伝子の発現にかかわる染色体 DNA の制御領域を同定することによって、生殖細胞にマーカーを導入することができ、生殖細胞の操作選択、選別が容易になる。

特許出願

なし

図2 MVH mRNA の局在。精巣の切片に対して、MVH をプローブとして in situ hybridization を行った。生殖細胞が特異的に染色された。



報告書他

- 1) Komiya,T.,Itoh,K.,Ikenishi.K.,and Furusawa,M. Isolation and characterization of a novel gene of the DEAD box protein family which is expressed in germ cells of *Xenopus laevis*. *Developmental Biology*, Vol. 162, Issue 2, April 1994, p. 354-363
- 2) Fujiwara,Y.,Komiya,T.,Nose,T.,and Furusawa,M. A novel DEAD protein family gene, MVH,specifically expressed in germ cell lineage in mice.投稿準備中

〔研究者名〕 小宮 透、藤原裕子

8. Lone-linker PCR 法の開発

微量材料よりの未知 DNA 配列の増幅、取得。
液相スクリーニングによる遺伝子単離の効率化。

研究成果の概要

微量未知 DNA 配列の PCR 増幅を行なうため、非対称的な約 20 塩基長の合成リンカーを結合させ増幅を行なう方法を開発した(図 1)。さらに、この DNA 集団中から特定配列を持つ DNA の単離を効率よく行なうため、液相中でのスクリーニング法を考案した(RARGIP 法、図 2)。この方法により、従来の方法と比較し、希少な遺伝子の単離が容易に行なえるようになった(表 1)。

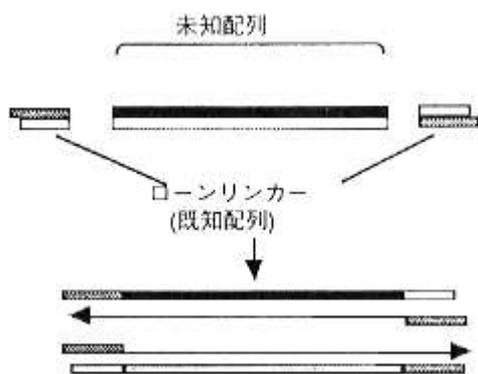


図 1 LL-PCR 法による未知 DNA の増幅

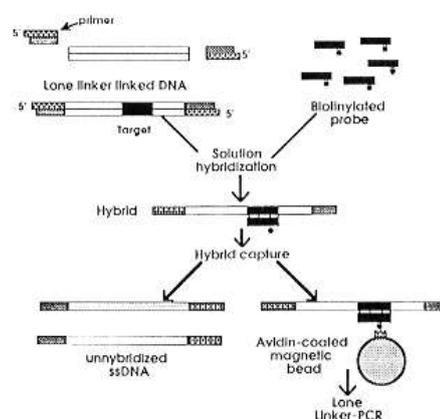


図 2 RARGIP 法による標的 DNA の単離

POSITIVE CLONES

	RARGIP		Conventional Testis cDNA libraries
Actin	436/445	98%	-----
Tctex-3	66/820	8%	none in 4×10^5
Tctex-7	230/610	38%	2 in 4×10^5

表 1 PARGIP 法と従来法の比較

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 分子生物学の基本的技術の効率化
- 2) 従来解析不可能であった微量材料における遺伝子発現様式の解明

特許出願

1) 遺伝子クローニング方法

特 願：平 2-224626(平 2.8.27) 特開平 4-108384(平 4.4.9)

出 願 人：新技術事業団

請求の概要：合成リンカーを結合した 2 本鎖 DNA 断片を、液相中でプローブ DNA と会合させ、ハイブリッドを形成した DNA 断片のみを分離、クローン化することを特徴とする遺伝子クローニング法。

報告書他

- 1) Ko,M.S.H.,Ko,S.B.H.,Takahashi,N.,Nishiguchi,K.and Abe, K.(1990), Unbiased amplification of a highly complex mixture of DNA fragments by 'lone linker'-tagged PCR. Nucleic Acids Research 18,4293-4294.
- 2) Abe,K.(1990) Random access retrieval of genetic information through modified PCR.Abstract,Mouse molecular genetics meeting, pp174.
- 3) Abe,K.(1992) Rapid retrieval of desired sequences from lone linker PCR amplified cDNA mixtures:application to identification and recovery of expressed sequences in cloned genomic DNA. Abstract, 2nd international workshop on the identification of transcribed sequences.pp3.
- 4) Abe,K.(1992) Rapid isolation of desired sequences from lone linker PCR amplified cDNA mixtures:application to identification and recovery of expressed sequences in cloned genomic DNA. Mammalian Genome 2,252-259.

〔研究者名〕 阿部訓也、洪 実

9. マウス始原生殖細胞の制御因子遺伝子の発見

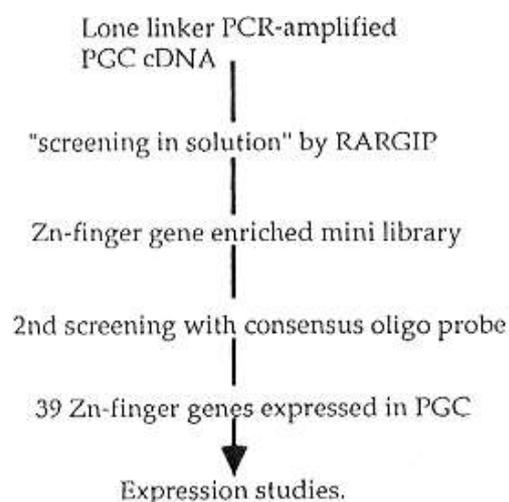
生殖細胞令化の初期過程における発現遺伝子の研究。

研究成果の概要

マウス 12.5 日胚の生殖隆起より、約 1 万個の始原生殖細胞を精製、単離し、cDNA を合成、ローンリンカー-PCR により増幅を行なった。これから液相スクリーニング法により Zinc finger 配列を持つ遺伝子を多数単離した(図 1)。

発現解析を行ない、生殖系列に特異性の高い遺伝子を選択(表 1)、さらに in situ hybridization 法により、発現のみられる細胞を特定した。

Pz69、及び Pz114 クローンは、始原生殖細胞及び、精母細胞、精原細胞でそれぞれ発現することが判明した。



クローン	ES	testis	liver	brain	PGC
Pz#1	+	+	+	+	+
Pz#69	-	+	-	-	+
Pz#83	+	+	+	+	+
Pz#106	+	+	+	+	+
Pz#114	-	+	-	-	+
Pz#116	+	+	-	+	+
Pz#201	+	+	+	+	+
Pz#203	±	-	-	±	+
Pz#205	+	+	+	+	+

図 1 始原生殖細胞(PGC)に発現する遺伝子研究の方法

表 1 RT-PCR による発現解析

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 細胞特異的発現を示す遺伝子群単離の方法論の確立
- 2) 生殖細胞初期分化過程の解明

特許出願

なし

報告書他

- 1) Fujiwara, Y., Noce, T., Furusawa, M. and Abe, K. (1992) Abstract, Mouse molecular genetics meeting, pp72. An attempt to identify genes specifically expressed in mouse primordial germ cells: microcloning of zinc finger protein genes from amplified PGC cDNA.
- 2) 阿部訓也、藤原裕子、野瀬俊明、古沢満。(1992)。マウス始原生殖細胞より単離した Zn-

finger 蛋白遺伝子 Pz#114 の発現、構造解析。第 15 回日本分子生物学会年会講演要旨集。
pp381。

- 3) Fujiwara, Y., Furusawa, M., Noce, T., and Abe, K. (1993). PGC-derived Zn-finger protein gene, Pz#114, is exclusively expressed in germ cell lineage but not in embryonic stem cells. Abstract, Mouse molecular genetics meeting, pp148.

〔研究者名〕 阿部訓也、藤原裕子

10. FGF と中胚葉分化

アフリカツメガエルの初期発生の中胚葉分化に FGF が強く関与していることを明らかにした。

研究成果の概要

塩基性、及び酸性 FGF の抗体を用いて胚の切片を染色し、FGF が中胚葉形成領域に前もって存在することをつきとめた。即ち、桑実胚では塩基性 FGF が周辺域と植物極の細胞の核内に、mid-blastula transition 期には酸性 FGF が核内に存在することを発見し、FGF が中胚葉誘導に強く関わっていることを示した(図 1)。さらに、mid-blastula transition 期の animal cap から単離した 1 個の細胞は試験管の中で上皮に分化するが、周辺域の単離細胞は筋肉に分化することを明らかにした(図 2)。この筋肉への自立分化能は内在性の FGF 量に比例すること、及び培養器に FGF を添加すると筋肉の分化が促進されるという事実から、FGF の中胚葉分化への関与の可能性がさらに確かめられた。

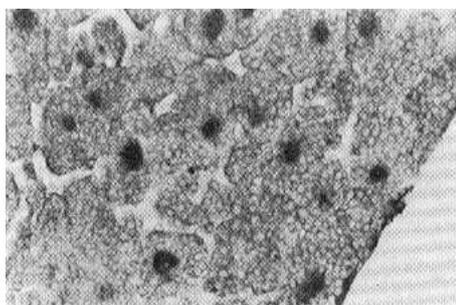


図1 アフリカツメガエル stage10 胚の塩基性 FGF 抗体による染色

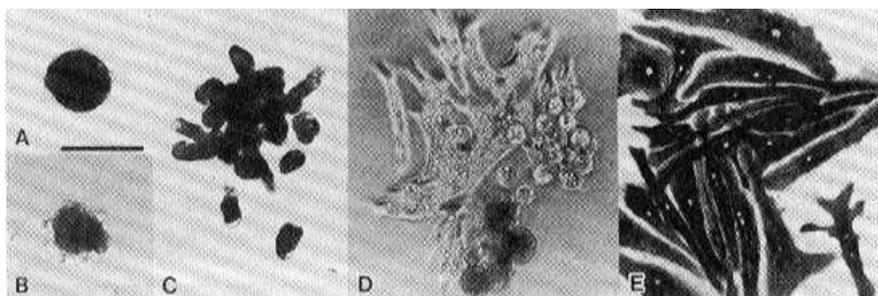


図2 アフリカツメガエル stage12 胚の単離した 1 個の細胞(A)からの筋肉細胞の分化 (E はオタマジャクシ stage)

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 脊椎動物の中胚葉分化の分子レベルでの解明

特許出願

なし

報告書他

- 1) R.A.Shiurba, N.Jing, T.Sakakura and S.F.Godsave, Nuclear translocation of fibroblast growth factor during *Xenopus* mesoderm induction. *Development*, Vol.113, p.488-493(1991).
- 2) S.F.Godsave and R.A.Shiurba, *Xenopus* blastulae show regional differences in competence for mesoderm induction: correlation with endogenous basic fibroblast growth factor levels. *Develop. Biol.*, Vol.151, p.506-515(1992).

〔研究者名〕 Susan F.Godsave

11. 新しい遺伝子トラップ法の開発

マウス受精卵に DNA をインジェクションする、いわゆるトランスジェニックマウスの方法を用い、新しい遺伝子トラップ法の開発を試みた。(図 1)

研究成果の概要

- 1) マウス受精卵を 2 細胞期より胚盤胞まで 125myu g/ml 以上の G418 存在下で培養するとすべて死滅してしまうことを示した。(図 2)
- 2) マウス受精卵に neo 遺伝子を導入することによって、マウス受精卵が G418 により選択培養できることを示した。(図 3)
- 3) プロモーターを持たない neo 遺伝子をマウス受精卵に導入することによって、遺伝子トラップができる可能性を示した。(図 4)

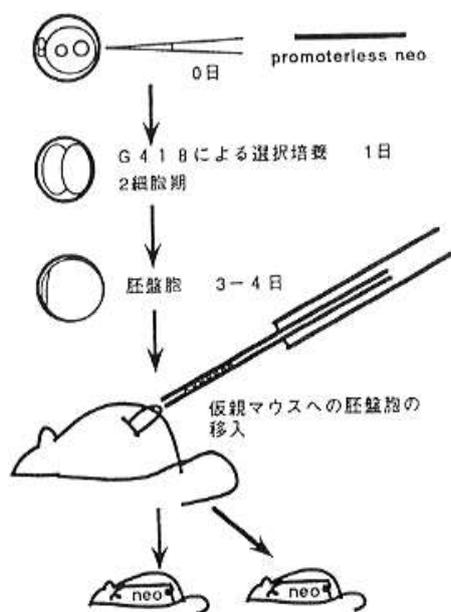


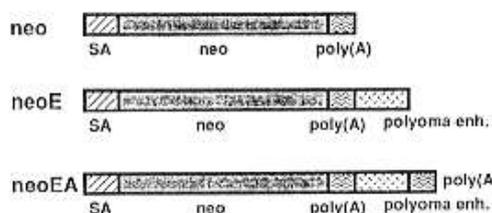
図 1 マウス受精卵を用いた遺伝子トラップ

G 4 1 8 濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	胚盤胞 (blastocyst) (%)
0	7.7
5.0	4.7
7.5	3.7
10.0	8
12.5	0
15.0	0
20.0	0

図 2 マウス初期胚の G418 存在下での培養による生存率

	受精卵	2細胞	胚盤胞	仔マウス	トランスジェニックマウス	TM/pups
選択培養	969	904	278	34	17 (1.8%)	50%
コントロール	308	260	—	26	6 (2.0%)	23%

図 3 MC1neo 遺伝子を導入したマウス初期胚の G418 存在下での選択培養



	受精卵	2細胞	胚盤胞	仔マウス	トランスジェニックマウス
neo	680	645	1	0	0
neoE	1910	1765	229 (12%)	15	14 (93%)
neoEA	1032	962	150 (14.5%)	19	17 (89%)

図 4 マウス受精卵を用いた遺伝子トラップ

上段はマウス受精卵にインジェクションした DNA のマップを示す。下段はそれぞれの DNA をインジェクションして得られた結果を示す。

SA: スプライスアクセプター部位、neo: ネオマイシン耐性遺伝子、poly(A): ポリ A 添加シグナル、polyoma enh.: ポリオマエンハンサー

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 哺乳類に特長的な胚盤胞形成に関与する遺伝子の単離
- 2) その他哺乳類の発生に関与する遺伝子の単離

特許出願

なし

報告書他

- 1) 若杉正司、要匡、須貝智司、山本玲子、山村研一、マウス初期胚での選択法による遺伝子トラップマウス作製の試み, 第 50 回日本癌学会総会予稿集、P125(1991)
- 2) 若杉正司、要匡、須貝智司、石原寿光、山村研一、マウス初期胚での G418 による選択法の開発, 第 36 回日本人類遺伝学会予稿集、p80(1991)
- 3) S.Wakasugi,A.Mantani,S.Sugai,T.Kaname and K.Yamamura, An attempt of gene trap by microinjecting promoterless neo gene into fertilized mouse eggs., First China-Japan Human Genetics Symposium,p33(1992)
- 4) 若杉正司、萬谷昭夫、須貝智司、木村重美、要匡、山村研一、マウス受精卵を用いた遺伝子トラップ法の開発, 第 37 回日本人類遺伝学会予稿集、p107(1992)
- 5) 若杉正司、萬谷昭夫、須貝智司、木村重美、要匡、山村研一、マウス受精卵を用いた遺伝子トラップ法の開発, 第 15 回日本分子生物学会年会予稿集、p258(1992)

〔研究者名〕 若杉正司、宮田堅司

12. 新しい進化仮説の提唱

DNA の複製機構に着目し進化の不均衡説を提唱した。

研究成果の概要

DNA 複製の際の連続鎖(leading strand)と不連続鎖(lagging strand)の複製機構の差に注目し、両者間でのエラー頻度の差異がある程度以上あると、子孫に永久に野性型が保証されると同時に、エラー頻度の差がないモデルに比べて、より多くの変異を蓄積した個体が出現することを示した(図 1)。

即ち、DNA 型生物は両鎖間のエラー頻度の差を利用して適応能力を上げて積極的に進化を促進しているといえることができる。さらに、進化の不均衡説に基づき、ネオ・ダーウイニアンアルゴリズムを発明し、生物進化の過程で不均衡モデルの優位性を予測するとともに(図 2)、進化時間短縮実験の可能性を示した。

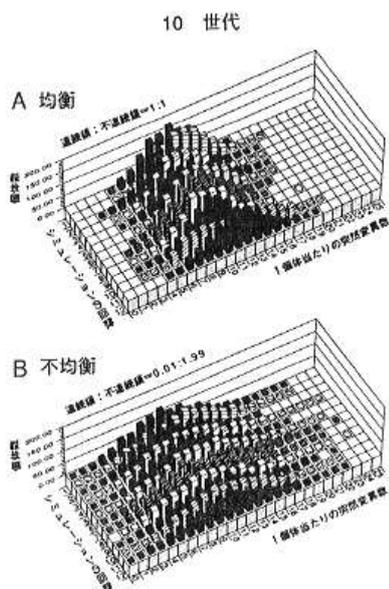


図 1 10 世代目における均衡モデルと不均衡モデル間の突然変異の確率論的分布

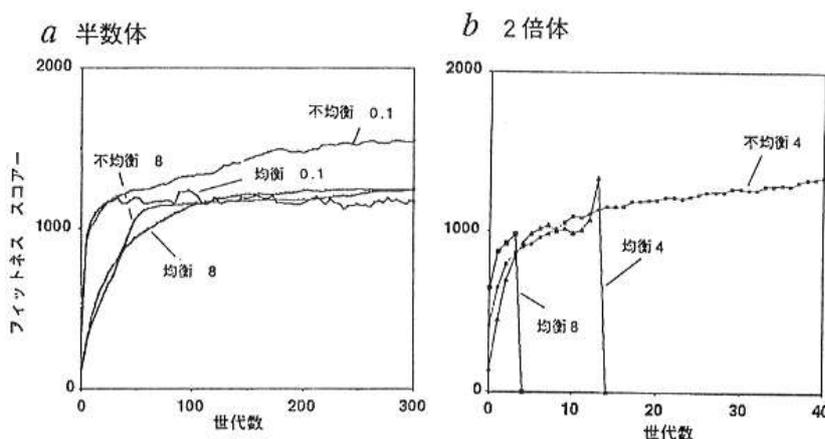


図 2 ネオ・ダーウイニアンアルゴリズムを用いてナップザック問題を解いた場合の、均衡モデルと不均衡モデル間の適応能力の比較

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 進化時間の短縮
- 2) 生物、及び生物生産物質の改良
- 3) DNA 型遺伝アルゴリズムによる最適化問題の解と応用

特許出願

- 1) 環境適応の認知方法

特 願：平 4-120897(平 4.5.13)

出 願 人：新技術事業団、古沢 満

請求の概要：DNA 複製の際の突然変異の非対称性に基づく、DNA 型遺伝アルゴリズムの発明と最適化問題への応用。及び、上記遺伝アルゴリズムの原理を応用した進化時間の短縮による生物の改良法。

2) 要素列もしくはその集合の最適化方法

特 願：平 5-111960(平 5.5.13)

出 願 人：新技術事業団、古沢 満

請求の概要：同上

3) A process for preparing a set of various of an organization or a group.

米国出願：US.081059,589(1993.5.13)

出 願 人：新技術事業団、古沢 満

請求の概要：同上

報告書他

1) M.Furusawa and H.Doi, Promotion of evolution:disparity in the frequency of strand-specific misreading between the lagging and leading DNA strands enhances disproportionate accumulation of mutations.J.theor.Biol.Vol.157,p.127-133(1992).

2) K.Wada,H.Doi,S.Tanaka,Y.Wada and M.Furusawa, A neo-Darwinian algorithm:a symmetrical mutations due to semi-conservative DNA-type replication promotes evolution.Proc.Natl.Acad.Sci.,U.S.A.Vol.90,p.11934-11938(1993).

3) 古沢 満、土居洋文、「進化の不均衡説」:進化の時間は短縮できるか? 第 16 回日本分子生物学会シンポジウム(平 5.12.16-19、千葉)

4) 岩城俊雄、加納康正、川村 啓、五島直樹、河野享子、石野良純、古沢 満、今本文男 大腸菌ゲノム DNA の両鎖複製における点突然変異発生頻度の解析、第 16 回日本分子生物学会(平 5.12.16-19、千葉)

〔研究者名〕古沢 満、土居洋文 (和田健之助、今本文男)