

岡山細胞変換プロジェクトの研究成果

目次

1. 分裂酵母の“Start”を制御する新たな遺伝子 <i>res2⁺</i>	2
2. 分裂酵母の新しい細胞周期制御因子 <i>cyc17⁺</i>	4
3. 分裂酵母の性分化の開始に関わる遺伝子 <i>rcd1</i>	6
4. 分裂酵母におけるストレス応答と性分化に関わる MAP キナーゼカスケード	7
5. タンパク質キナーゼ <i>Cnk1</i>	8
6. 新しい有糸分裂制御因子 <i>Min1</i>	10
7. G0 期変異株(<i>zer1-C5</i>)の単離	12
8. 動物細胞における G1 checkpoint 機構の解析	14
9. G2/M 期のチェックポイント機構の解析	15
10. EGF 受容体からの癌化シグナル伝達における <i>CRK</i> の機能	16
11. cDNA のための塩基配列迅速決定システムの開発と分裂酵母の 完全長 cDNA データベースの作成	18
12. 発現遺伝子の識別表示技術	20

1. 分裂酵母の“Start”を制御する新たな遺伝子 res2+

分裂酵母の細胞周期において“Start”を制御する新たな遺伝子 res2+を単離し、その機能を解析した。

研究成果の概要

細胞周期の G1 期では外部環境の変化に反応して増殖の進行あるいは停止、もしくは分化への移行が決定される。この決定は絶対的なもので、一度 G1 期から S 期に進行してしまうとそのサイクルが終了するまで分化過程に進行することはできない。このような遷移点は酵母においては“Start”と呼ばれている。

本研究において、分裂酵母の細胞周期における“Start”の制御に関与する新たな遺伝子 res2+が単離された。Res2 は Cdc10/Res1 のファミリーに属し、特に Res1 と高い相同性を示した。種々の解析から分裂酵母の細胞周期においては Res1/Cdc10 複合体と Res2/Cdc10 複合体の 2 種類の機能的に重複したスタート機構が存在し、前者は主に有糸分裂の“Start”で、後者は主に減数分裂の“Start”で働いていることが明らかにされた。また、Res1、Res2 のコードするタンパク質について機能発現に必須の部位が明らかにされた。(図)

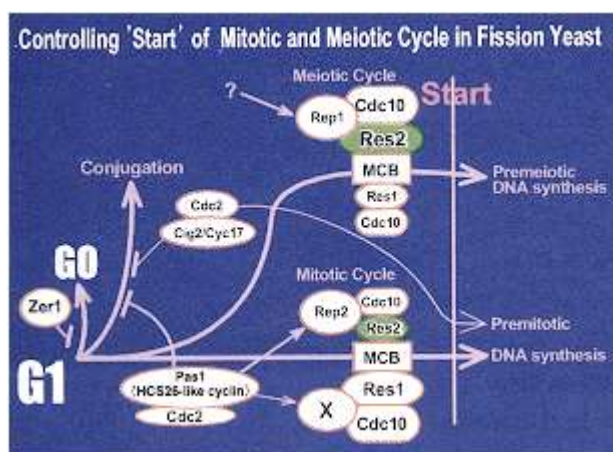


図 分裂酵母における有糸分裂及び減数分裂の“Start”の制御

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 分裂酵母の“Start”を制御する遺伝子 res2
- 2) 細胞増殖と分化の人為的制御
- 3) 癌化機構の解明
- 4) 細胞周期制御に関わる活性を有するアミノ酸配列

特許出願

特 願：平 6-93035(平成 6 年 4 月 5 日) 特開平 7-274973(平成 7 年 10 月 24 日)

出 願 人：科学技術振興事業団

請求の概要：真核生物の細胞周期第一間期から DNA 合成期への移行を制御する分裂酵母の遺伝子であって、配列表に示す塩基配列を有することを特徴とする細胞周期遺伝子。

報告書他

- 1) M.Miyamoto, K.Tanaka and H.Okayama: res2+, a new member of the cdc10+/SWI4 family, controls the “start” of mitotic and meiotic cycles in fission yeast, EMBOJ., Vol.13, 1873-1880(1994)
- 2) S.Sturm and H.Okayama: Domains determining the functional distinction of the fission yeast cell cycle “Start” molecules Res1 and Res2, Mol.Biol.Cell, Vol.7, 1967-1976(1996)
- 3) 宮本 昌明、岡山 博人「DNA 合成に関わる分裂酵母制御遺伝子の同定」第 52 回 日本癌学会総会 記事、p.310(1993)
- 4) 宮本 昌明、岡山 博人「cdc10+/SWI4 ファミリーに属する新たな細胞周期制御遺伝子 res2+の同定とその解析」第 16 回 日本分子生物学会 講演要旨集、p.432(1993)

関連文献

- 1) K.Tanaka, K.Okazaki, N.Okazaki, T.Ueda, A.Sugiyama, N.Nojima and H.Okayama: A new cdc gene required for S phase entry of Schizosaccharomyces pombe encodes a protein similar to the cdc10+ and SWI4 gene products, EMBOJ., Vol.11, 4923-4932(1992)
- 2) N.Nakashima, K.Tanaka, S.Sturm and H.Okayama: Fission yeast Rep2 is a putative transcriptional activator subunit for cell cycle “Start” function of Res2Cdc10, EMBOJ., Vol.14, 4794-4802(1995)
- 3) A.Sugiyama, K.Tanaka, K.Okazaki, H.Nojima and H.Okayama: A zinc finger protein controls the onset of premeiotic DNA synthesis of fission yeast in a Mei2-independent cascade, EMBOJ., Vol.13, 1881-1887(1994)

〔研究者名〕 宮本 昌明、Sabine Sturm

2. 分裂酵母の新しい細胞周期制御因子 *cyc17*⁺

分裂酵母の細胞周期において、増殖のスタートに働く一方、性分化の開始を制御する新しい G1 期制御因子 *cyc17*⁺ を単離し、その機能を解析した。

研究成果の概要

分裂酵母も哺乳動物と同様に、G1 期において外部環境の変化に対応して増殖の進行や停止あるいは分化への移行が決定される。

我々は細胞分化のスイッチの一つである *pat1* キナーゼの温度感受性変異株を機能相補できる遺伝子をスクリーニングし、*cyc17* 遺伝子を単離した。*cyc17* は B 型サイクリンをコードし、意外にも G2 期を制御する機能を有さず、*res1*、*res2* 蛋白質と相互作用しながら細胞増殖のスタートに働くが、他方では、酵母において性分化開始のために最も重要な因子をコードしている *ste11* に作用してその発現を抑制し、分化を負に調節する因子でもあることを明らかにした。(図 1、図 2)

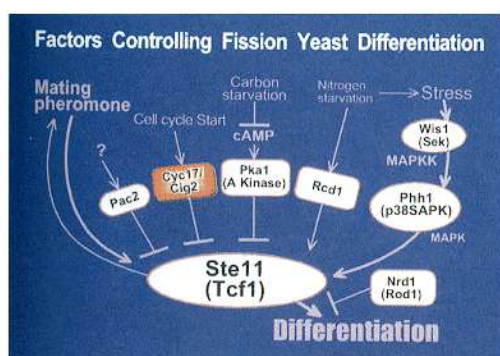


図 1 分裂酵母における分化制御因子

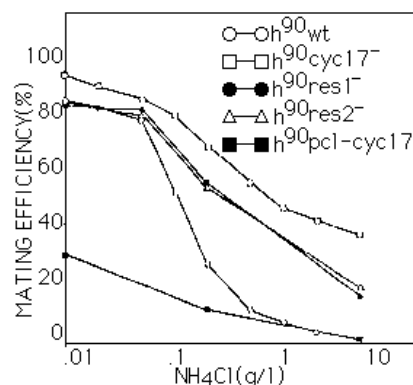


図 2 *cyc17* 破壊株及び過剰発現株の種々の窒素源濃度での接合効率

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 細胞周期 G1/S 期の新たな制御因子 *cyc17*
- 2) 細胞増殖と分化の人為的制御

特許出願

特 願：平 6-093034(平成 6 年 4 月 5 日) 特開平 7-274972(平成 7 年 10 月 24 日)

出 願 人：科学技術振興事業団

請求の概要：真核生物の細胞周期第一間期から DNA 合成期への移行を制御する分裂酵母由来の遺伝子であって、配列表に示す塩基配列およびアミノ酸配列を有することを特徴とする細胞周期遺伝子、制御因子。

報告書他

- 1) T.Obara-Ishihara and H.Okayama: AB-type cyclin negatively regulates conjugation via

interacting with cell cycle “start” genes in fission yeast, EMBOJ., Vol.13, 1863-1872(1994)

- 2) 石原(小原) 朋子、岡山 博人「分裂酵母の増殖と分化を調節する遺伝子群およびその機能解析」第 27 回 酵母遺伝学集談会 講演要旨集、p.17(1994)
- 3) 石原(小原) 朋子、岡山 博人「分裂酵母 Cyc17 の制御機構」第 28 回 酵母遺伝学フォーラム 講演要旨集、p.421(1995)
- 4) 石原(小原) 朋子、岡山 博人「分裂酵母の増殖と分化を調節する B 型サイクリンの同定」第 16 回 日本分子生物学会年会 講演要旨集、p.130(1993)
- 5) 石原(小原) 朋子、岡山 博人「分裂酵母の性分化を負に調節する B 型サイクリンの下流に存在する pac2 の同定」第 17 回 日本分子生物学会年会 講演要旨集、p.426(1994)
- 6) 石原(小原) 朋子、岡山 博人「分裂酵母の性分化を負に調節する cyc17+(cyg2+)および mcp8+の解析」第 18 回 日本分子生物学会年会 講演要旨集、p.243(1995)
- 7) T.Obara-Ishihara and H.Okayama: pac2+mediates a signal for negative regulation of sexual development originated from Cyc17 cyclin and cell cycle “START” genes 第 2 回 日英セルサイクルワークショップ 講演要旨集、p.19(1994)
- 8) 石原(小原) 朋子、岡山 博人「分裂酵母の G1/S 期を調節する遺伝子群の単離と機能解析」第 52 回 日本癌学会総会 記事、p.310(1993)

〔研究者名〕 石原 朋子

3. 分裂酵母の性分化の開始に関わる遺伝子 rcd1

分裂酵母の pat1 変異株の多コピー抑圧遺伝子をスクリーニングし、性分化開始の情報伝達に関わる遺伝子 rcd1 を単離した。

研究成果の概要

分裂酵母の pat1 温度感受性変異で誘導される半数体減数分裂による致死を多コピーで抑圧する遺伝子を検索し、多くの遺伝子を単離したが、その中で rcd1 と名付けた遺伝子は 283 アミノ酸から成る新しい蛋白質をコードし、そのアミノ酸配列は真核生物に広く、極めて高い相同性で保存されていた。その機能について解析した結果、rcd1 はフェロモン情報以前の性分化開始情報伝達に関わり、酵母における最も重要な性分化開始の調節因子である ste11 の発現を誘導する因子の一つであることが示唆された。(図 1、図 2)

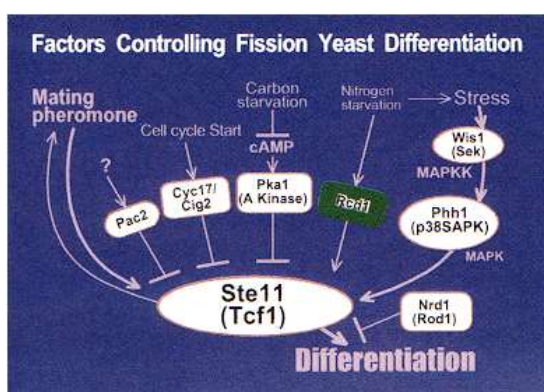


図 1 裂酵母における性分化制御因子

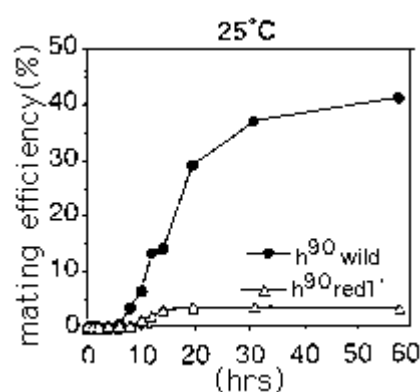


図 2 rcd1 破壊株の接合効率

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 分裂酵母の性分化開始に関わる因子 rcd1
- 2) 高等動物における分化開始因子の研究への応用

特許出願

なし

報告書他

- 1) 岡崎 規理子、岡山 博人「分裂酵母の増殖と性分化のスイッチングに関わる新規遺伝子の単理解析」第 18 回 日本分子生物学会年会 講演要旨集、p.497(1995)

〔研究者名〕 岡崎 規理子

4. 分裂酵母におけるストレス応答と性分化に関わる MAP キナーゼカスケード

分裂酵母の新規 MAP キナーゼを単離し、その機能を解析した。

研究成果の概要

MAP キナーゼ(Mitogen-activated protein kinase)カスケードは重要な細胞内情報伝達経路であり、幾つかのファミリーから成ることが知られている。本研究において、我々は分裂酵母の新規 MAP キナーゼを単離し、この MAP キナーゼが構成する MAP キナーゼカスケードが外界の様々なストレスに対する増殖応答、致死応答あるいは適応応答の調節を行う一方、性分化開始のために主要な働きをする転写因子をコードしている *ste11+* という遺伝子の発現調節を介して性分化の調節にも関与していることを明らかにした。

この新規 MAP キナーゼをコードする遺伝子 *phh1+* は酵母から動物細胞に至るまで非常によく保存されている。(図)

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) ストレス応答と分化に関わる遺伝子 *phh1+*
- 2) 細胞の環境因子に対する応答機構の解明
- 3) 環境発癌の問題解決へのアプローチ

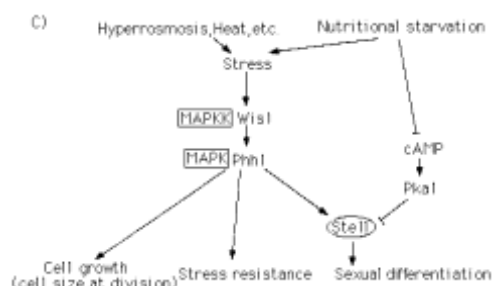


図 Wis1-Phh1 MAP キナーゼカスケード機能についての模式図

特許出願

特 願：平 8-157503(平成 8 年 8 月 15 日)

出 願 人：科学技術振興事業団

請求の概要：配列表に示すアミノ酸配列を実質的に含み、タンパク質のリン酸化をもたらす MAP キナーゼおよびその製造法、これを実質的にコードする DNA を含む遺伝子、また該遺伝子を含む組換え DNA 並びに該組換え DNA によって形質転換された形質転換体。

報告書他

- 1) T.Kato, Jr., K.Okazaki, H.Murakami, S.Stettler, P.A.Fantes and H.Okayama: Stress signal, mediated by a Hog1-like MAP kinase, controls sexual development in fission yeast, FEBS Letters, Vol.378, 207-212(1996)
- 2) 加藤 友久、岡山 博人「分裂酵母における新規 MAP キナーゼカスケードの解析」第 54 回 日本癌学会総会 記事、p.160(1995)

〔研究者名〕加藤 友久

5. タンパク質キナーゼ Cnk1

出芽酵母において S 期の進行に必要な働きをしている遺伝子 Cdc7 のラットホモログと考えられる Cnk1 を単離し、その機能を解析した。

研究成果の概要

出芽酵母(*S.cerevisiae*)の Cdc7 は、DNA 複製開始に必要なセリン/スレオニン型タンパク質キナーゼであり、生存に必要な分子として知られている。我々はラット NRK 繊維芽細胞 NRK49-F cDNA ライブラリーから MEK の cDNA 断片を単離すべくスクリーニングするうち Cdc7 に相同性の高い遺伝子 Cnk1(Cdc7-like nuclear kinase)を単離した。

Cnk1 は Cdc7 と同様の構造を有する 68KD の核型セリン/スレオニンタンパク質キナーゼであり、S 期にはタンパク質量が増加して DNA 複製点に局在し、*in vitro* で ORC1 と結合する。これらの結果は Cnk1 が Cdc7 の哺乳類ホモログであることを強く示唆する。(図)

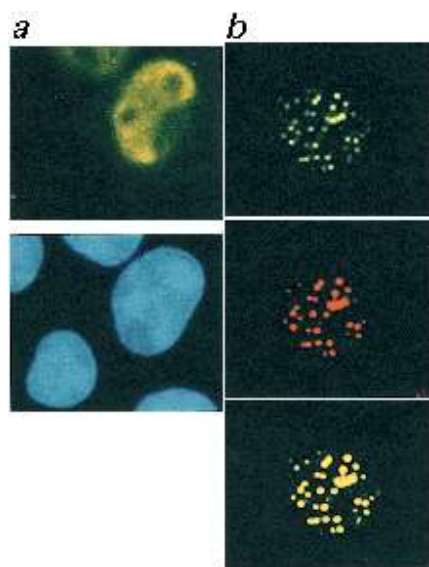


図 Cnk1 の局在と DNA 複製点

a. 核に発現している Cnk1

Cnk1 cDNA を COS-7 細胞に導入し、過剰発現させた Cnk1 を検出した。

上: Cnk1 を特異抗体で検出

下: Cnk1 を過剰発現している細胞とバックグラウンド(DAPI 染色)

b. DNA 複製点と一致する Cnk1 の局在

NRK-49F 細胞を S 期に同調させ、BrdU で 8 分間ラベルした。Cnk1 と細胞内に取り込まれた BrdU を免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

上: Cnk1

中: BrdU

下: 上中の overlapping view

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 高等真核生物における DNA 複製に必要な蛋白質キナーゼ Cnk1
- 2) 高等真核生物における DNA 複製開始機構の解明
- 3) 増殖刺激に伴う細胞表層から核へのシグナル伝達機構の解明

特許出願

特 願 : 平 7-138152(平成 7 年 6 月 5 日)

出 願 人 : 科学技術振興事業団

請求の概要: 配列表に示すアミノ酸配列を実質的に含み、プロテインキナーゼ活性をもたらすポリペプチドをコードする CNK1 遺伝子、CNK1 遺伝子を組み込んだ組換え体プラスミド。

報告書他

- 1) M.Otsu, Y.Yasuda, Y.Terada, J.Ninomiya-Tsuji, T.Matsushita, H.Takamatsu, S.Fujita and H.Okayama: CNK1, a mammalian homologue of *Saccharomyces cerevisiae* CDC7, is involved in DNA replication, EMBOJ., submitted
- 2) 大津 正之、杉野 明雄、荒木 弘之、岡山 博人「出芽酵母 Cdc7 と類似した構造を示すラット蛋白質キナーゼ cDNA の単離」第 53 回 日本癌学会総会 記事、p.292(1994)

〔研究者名〕 大津 正之

6. 新しい有糸分裂抑制因子 Min1

新たな有糸分裂抑制因子をコードする遺伝子 Min1 を単離し、その機能を解析した。

研究成果の概要

癌細胞が悪性化する過程で、染色体の脱落、転座、異数化等のいわゆる染色体異常が高頻度に観察される。このような染色体異常は G2/M 期制御機構の破綻によるものと考えられるところから G2 期制御に関わる遺伝子の単離を進めた。

本研究では分裂酵母 *wee1* 遺伝子の変異株を宿主とする異種間の機能相補による発現クローニングを行い、ヒト由来の cDNA ライブラリーから新たな有糸分裂抑制因子をコードする遺伝子 Min1 を単離した。Min1 遺伝子は G2 期において著しい発現の上昇が認められ、既知の WEE1 および MIK1 とは別の経路を介して G2 期から M 期への移行を抑制していることが明らかになった。また、正常細胞および SV40 によって癌化した細胞株から得られた Min1 遺伝子の塩基配列を比較したところ、癌細胞由来の Min1 遺伝子の中に停止コドンを生じる点突然変異が認められた。(図 1、図 2)

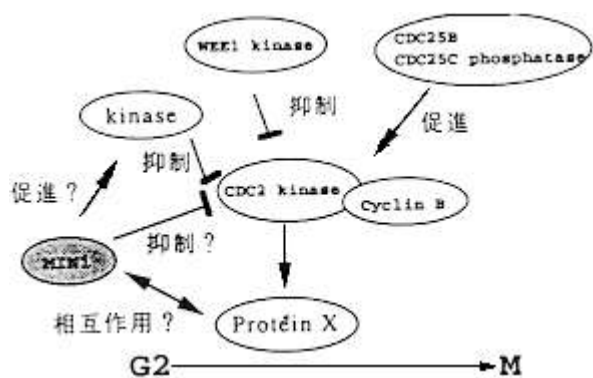


図1 Min1 遺伝子の G2 期制御

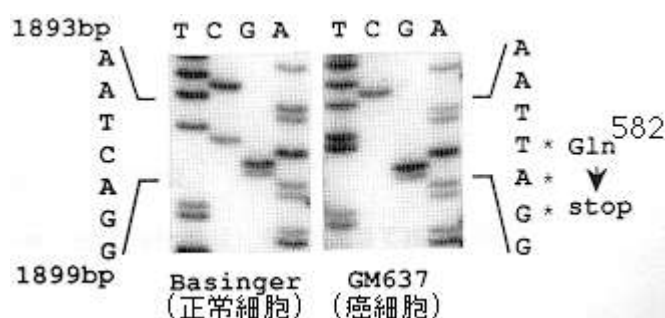


図2 癌細胞から得られた Min1 遺伝子の突然変異部位の塩基配列

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 細胞周期 G2 期制御遺伝子 Min1
- 2) 細胞周期 G2 期の制御
- 3) 癌化機構の解明

特許出願

特 願：平 6-093033(平成 6 年 4 月 5 日) 特開平 7-274971(平成 7 年 10 月 24 日)

出 願 人：科学技術振興事業団

請求の概要：細胞周期第二間期から分裂期への移行を抑制的に制御するヒト由来の遺伝子であって、配列表に示す塩基配列を有することを特徴とする細胞周期遺伝子、発現産物。

報告書他

- 1) 五十嵐 慎、永田 昭人、岡山 博人「ヒト wee1 活性化因子(ACW1)の単離と解析」第 52 回 日本癌学会総会 記事、p.292(1993)

〔研究者名〕 五十嵐 慎

7. G0期変異株(zer1-C5)の単離

許容温度では野性株と変わらず増殖可能であるが、制限温度では強制的に G0 期に移行する分裂酵母の変異株 zer1-C5 株を単離した。

研究成果の概要

zer1-C5 株は温度感受性で、許容温度の 25°Cでは野性株と変わらず増殖可能であるが、制限温度の 30°C以上では増殖できない。35°Cでは G0 期細胞様の形態を示すのに加えて複製、転写、翻訳の停止およびヒートショック耐性といった G0 期細胞の特性を示す。この変異は今までほとんどで解明されていなかった G0→G1 遷移の研究に役立つものと思われる。zer1-C5 株は制限温度である 30°Cにおくと偽菌糸を形成する。偽菌糸は一部の細胞が G0 期から脱して増殖し、残りの細胞は G0 期にある状態であり、多細胞生物の進化を考える上で興味深い表現型である。(図)

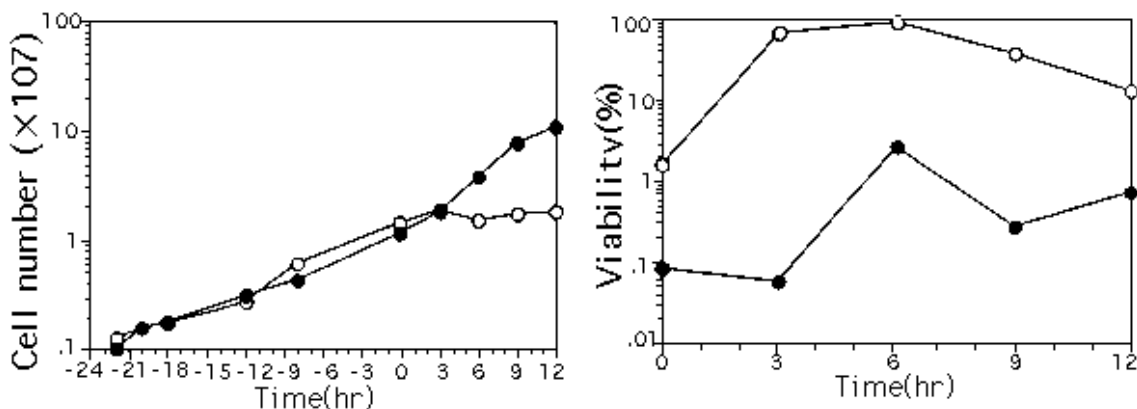


図 温度感受性 zer1-C5 株の性質

左: 23°Cで対数増殖している細胞(白丸、zer-C5 株;黒丸、野性型株)を 0 時間目で 35°Cに移す。zer1-C5 株は直ちに増殖を停止する。

右: 35°Cに移した後の細胞(白丸、黒丸:同上)に 50°C30 分のヒートショックを与え、生存している細胞の割合を示した。

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 制限温度で G0 期に強制移行する変異株 zer1-C5
- 2) 多細胞生物における増殖秩序の研究モデルとして有用

特許出願

なし

報告書他

- 1) K.Okazaki and H.Okayama: Involvement of the fission yeast zer1 TPR protein in cell cycle exit, EMBOJ., submitted.
- 2) 岡崎 孝映、岡山 博人「分裂酵母の減数分裂変異株の単離」第 26 回 酵母遺伝学集談会 講演要旨集、p.56(1993)

- 3) 岡崎 孝映「分裂酵母の減数分裂変異株の単離」基礎生物学研究所研究会「生殖細胞の増殖と分化の制御」と第3回「細胞制御」ワークショップ合同研究集会 要旨集(1993)
- 4) 岡崎 孝映「分裂酵母の減数分裂変異株の解析」第27回 酵母遺伝学集談会 講演要旨集、p.17(1994)
- 5) 岡崎 孝映、岡山 博人「分裂酵母の G0/G1 期温度感受性変異株」第67回 日本生化学会、生化学、Vol.66, No.7, p.744(1994)
- 6) K.Okazaki and H.Okayama: Regulation of G0/G1 phase transition in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, The 18th International Conference of the International Society of Differentiation, Abstracts, p.239(1994)
- 7) 岡崎 孝映「分裂酵母の偽菌糸と G0 期」第12回 イーストワークショップ 講演要旨集、p.37(1994)
- 8) 岡崎 孝映「分裂酵母の偽菌糸形成—増殖・分化・休止制御モデル系として」第17回 日本分子生物学会年会 講演要旨集、p.525(1995)
- 9) 岡崎 孝映、岡山 博人「分裂酵母の G0/G1 期と G0/G2 期の制御」細胞制御ワークショップ 講演要旨集、p.26(1995)
- 10) K.Okazaki and H.Okayama: G0 Regulation and Filamentous growth of fission yeast, The 3rd JRDC International Symposium on Cell Growth and Development, Abstracts, p.91(1995)
- 11) 岡崎 孝映、岡山 博人「分裂酵母の G0 期制御に関わる gzf1+遺伝子」第28回 酵母遺伝学フォーラム 講演要旨集、p.49(1995)
- 12) 岡崎 孝映「分裂酵母の多細胞化と細胞周期制御」第13回 イーストワークショップ 講演要旨集、(1995)
- 13) 岡崎 孝映、岡山 博人「G0 変換に働く分裂酵母 gzf1+遺伝子の解析」第18回 日本分子生物学会 講演要旨集、p.243(1995)
- 14) 岡崎 孝映、岡山 博人「G0 期変異 zer1-C5 による G2 期停止とチェックポイント」第29回 酵母遺伝学フォーラム 講演要旨集、(1996)

〔研究者名〕 岡崎 孝映

8. 動物細胞における G1 checkpoint 機構の解析

動物細胞における G1 checkpoint 機構が CDK(Cyclin dependent kinase)4 の Tyrosine リン酸化-脱リン酸化によって調節されていることを明らかにした。

研究成果の概要

放射線や紫外線によって DNA 損傷が起きた場合、細胞は G1 期あるいは G2 期で増殖を停止して損傷の修復を行う。その修復が完了するまで S 期の開始や M 期への進行を行わせないようにする機構が働いており、checkpoint 機構と呼ばれている。

本研究において我々は、従来ほとんど解明されていなかった、動物細胞における G1 期 checkpoint 機構の鍵となる反応を明らかにした。すなわち、DNA 損傷のシグナルに対応して起こる G1 期停止が CDK4 の Tyrosine リン酸化-脱リン酸化によって調節されており、この制御機構が破綻すると実際に高頻度の染色体異常が誘導されることを明らかにした。

(図 1、図 2)

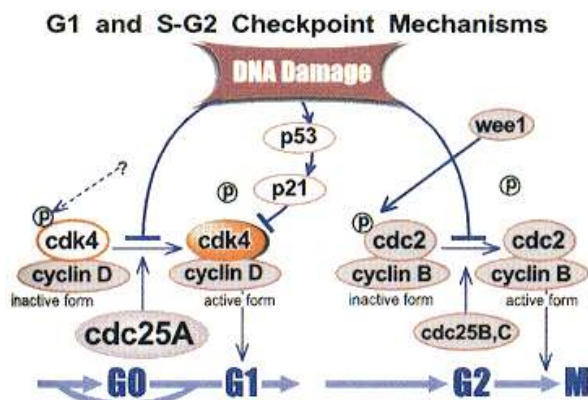


図 1 動物細胞におけるチェックポイント機構
→ 促進 ⊥ 抑制

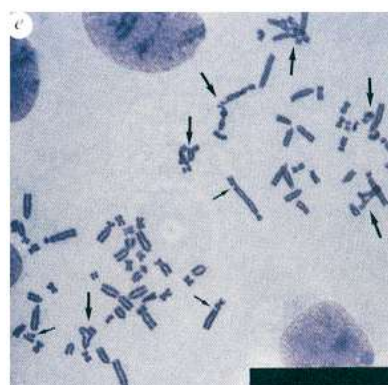


図 2 チェックポイントを無視する mutant type の CDK4(CDK 4F17)を導入した細胞では高頻度の染色体異常が誘導される。

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 癌化機構の解明
- 2) 細胞増殖と分化の人為的制御

特許出願

なし

報告書他

- 1) Y.Terada, M.Tatsuka, S.Jinno and H.Okayama: Requirement for tyrosine phosphorylation of Cdk4 in G1 arrest induced by ultraviolet irradiation, Nature, Vol.376, 358-362(1995)
- 2) Y.Terada: Ultraviolet light-induced G1 arrest is linked to CDK4 phosphorylation, Molecular Biology of Cancer, Implication for Prevention and Therapy, Abstracts, A-50(1995)

〔研究者名〕 寺田 泰比古

9. G2/M 期チェックポイント機構の解析

分裂酵母において、G2 期から M 期への移行の際に働くチェックポイント機構の一つを明らかにした。

研究成果の概要

全ての真核生物において、DNA 複製が完了して始めて染色体の分配が行われる。この過程はチェックポイント機構によって制御され、DNA の合成中または損傷を受けている時は、細胞は M 期に進行しない。チェックポイント機構は DNA の合成が進行中であることを認識するセンサーとそのシグナルを細胞周期制御因子に伝達する仲介因子、細胞周期制御因子から成り立っていると想像されているがその実体、特にセンサーと仲介因子に関しては不明な点が多い。

我々は分裂酵母において、DNA の複製を行うポリメラーゼ α と相互作用する新しいタンパク質を単離し Cds1 と命名した。さらに、Cds1 がポリメラーゼ α との相互作用によって DNA の複製中はこれを感知して M 期のスタートを支配している因子 cdc2 に信号を送り、その活性化を阻止するプロテインキナーゼであることを明らかにした。(図)

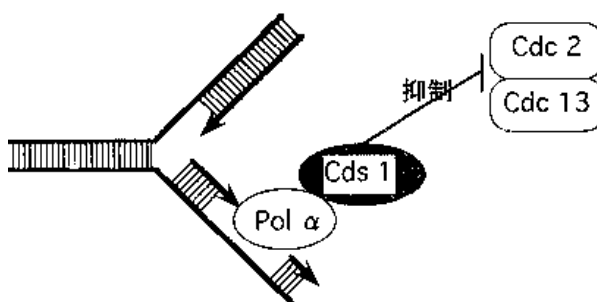


図 Cds1 による DNA 複製の監視機構

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) G2/M 期チェックポイント機構に働くプロテインキナーゼ cdc1
- 2) 細胞周期制御機構の解明
- 3) 癌化機構の解明

特許出願

なし

報告書他

- 1) H.Murakami and H.Okayama: A kinase from fission yeast responsible for blocking mitosis in S phase, Nature, Vol.374, 817-819(1995)
- 2) 村上 浩士、岡山 博人「分裂酵母のチェックポイント変異を抑圧する遺伝子の単離と機能解析」第 52 回 日本癌学会総会 記事、p.310(1993)

〔研究者名〕 村上 浩士

10. EGF 受容体からの癌化シグナル伝達における CRK の機能

EGF 受容体からの癌化シグナル伝達において CRK が重要な働きをしていることを明らかにした。

研究成果の概要

NRK 細胞はラット腎細胞由来の繊維芽細胞で、増殖因子(TGF- β +EGF)を培地に添加するという簡単な操作で癌形質を獲得するが、この変化は可逆的で、増殖因子を培地から除くことによって癌形質は失われる。我々は NRK 細胞を突然変異誘導剤で処理することによって TGF- β +EGF 存在下でも癌形質を示さない 4 種の変異株(23,14,39-1,39-3)を単離し、解析を進めてきた。その結果「23」の変異が哺乳動物で確認されているアダプター因子の一つ、Crk II 遺伝子の変異に起因することが明らかになった。このことは Crk II が EGF 受容体からの癌化シグナルを特異的に媒介していることを強く示唆している。

今後、NRK 細胞突然変異株の解析により、癌化シグナルを特異的に媒介する因子が次々に決定されていくものと期待される。(図)

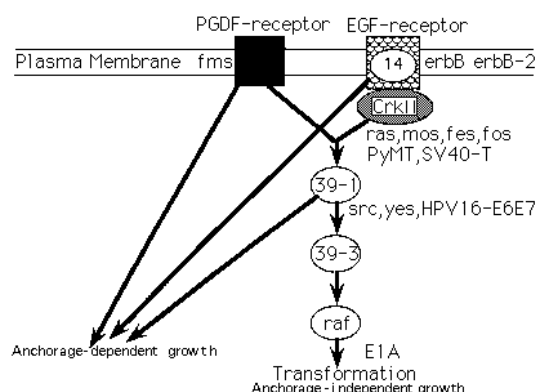


図 癌化シグナル伝達経路のモデル

14,23,39-1,39-3 は変異株が持つ変異因子の作用点を、癌遺伝子が示された位置はそれぞれの癌遺伝子からの癌化シグナルが合流する点を示している。

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 癌化シグナル伝達経路の解明
- 2) 正常増殖を阻害することなく癌細胞の増殖のみを特異的に抑制する方法の開発
より安全な癌治療への道を開く

特許出願

なし

報告書他

- 1) S.Kizaka-Kondoh and H.Okayama: Raf-1 kinase is not a major upstream regulator of MAP kinase in rat fibroblast, FEBS Letters, Vol.336, 255-258(1993)
- 2) S.Kizaka-Kondoh, M.Matsuda and H.Okayama: Crk II signals from epidermal growth factor to Ras, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, Vol.93, 12177-12182(1996)
- 3) S.Kizaka-Kondoh and H.Okayama: Role of TGF- β in epidermal growth factor-induced oncogenic transformation of NRK cells, Submitted to Oncogene

- 4) 近藤 科江「癌化のシグナル伝達経路と Raf-1 キナーゼ」最新医学、Vol.48,344-351(1993)
- 5) 近藤 科江、岡山 博人「EGF—普遍的増殖因子としての機能」nano GIGA, Vol.2, 1509-1515(1993)
- 6) 近藤 科江、岡山 博人「EGF」臨床免疫、Vol.27(Suppl.16),307-316(1995)
- 7) 近藤(木境) 科江、西田 栄介、岡山 博人「raf-1 下流因子としての MAP キナーゼの癌化シグナル伝達における機能解析」第 52 回 日本癌学会総会 記事、p.189(1993)
- 8) 近藤(木境) 科江、松田 道行、岡山 博人「癌化シグナル伝達における CRK の機能解析」第 53 回 日本癌学会総会 記事、p177(1994)
- 9) S.Kizaka-Kondoh and H.Okayama: Molecular genetic analysis of oncogenic signal transduction pathway shared by epidermal growth factor and platelet-derived growth factor, The eighth international conference of the international society of differentiation (Hiroshima) Abstracts, p.155(1994)
- 10) 近藤 科江、岡山 博人「EGF 受容体からの癌化シグナル伝達における Crk の機能」第 54 回 日本癌学会総会 記事、p282(1995)
- 11) S.Kizaka-Kondoh and H.Okayama: Molecular genetic analysis of oncogenic signal cascades: CRK II is the adapter for signaling from epidermal growth factor receptor to ras, The 3rd JRDC international symposium on cell growth and development (Osaka), Abstracts, p.90-91(1995)
- 12) 近藤 科江「イブニングセミナー“Nippon のアダプター分子、CRK”」第 69 回 日本生化学会、第 19 回 日本分子生物学会 合同年会(札幌) 講演要旨集、p.78(1996)
- 13) 近藤 科江、岡山 博人「EGF 受容体からの癌化シグナルの解析」第 55 回 日本癌学会総会 記事、p.100(1996)

〔研究者名〕 近藤 科江

11. cDNAのための塩基配列迅速決定システムの開発と分裂酵母の完全長 cDNA データベースの作成

ABI の 373A 蛍光式 autosequencer を使用する迅速な塩基配列決定法を開発し、それによって分裂酵母 cDNA の大規模な塩基配列の決定を行った。

研究成果の概要

分裂酵母は高等動物細胞の持つ性質をほぼすべて持ちながら遺伝子学的解析も可能であるという、非常に有用な実験系である。その蛋白質の一次構造の大規模なデータベースは酵母の研究に止まらず、ヒトを含む高等動物の研究すべてに大きく貢献すると思われる。

本研究では先ず、shotgun 法のためのサブライブラリーの作製および PCR による鋳型 DNA 精製の簡略化を行い、多量の鋳型 DNA を cDNA 断片より容易に調製できるようにした。これらの工夫と Perkin Elmer 社 ABI の 373A 蛍光式 autosequencer の dyeterminator 反応を組み合わせることにより cDNA の塩基配列を迅速に決定する方法を開発した。この方法を用いて分裂酵母 cDNA の塩基配列決定を進め、重複のない cDNA217 クローンの塩基配列を完全に決定した。(図)

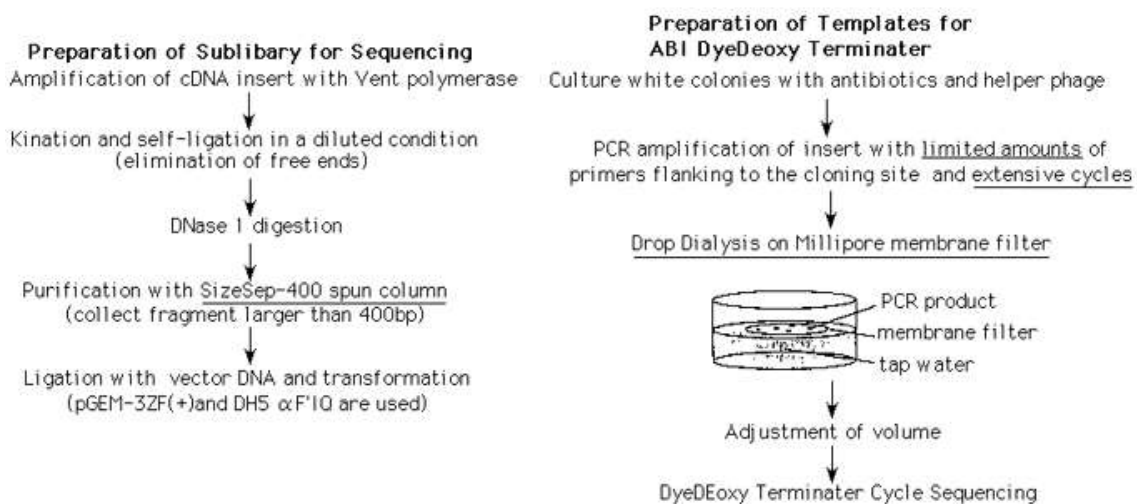


図 cDNA のための迅速塩基配列決定法プロトコールの概略

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 各種 cDNA データベースの作製
- 2) 新規遺伝子の探索

特許出願

特 願：平 5-282842(平成 5 年 11 月 11 日) 特開平 7-132087(平成 7 年 5 月 23 日)

出 願 人：科学技術振興事業団

請求の概要：DNA またはこれに由来する核酸配列を PCR 増幅するに際して、反応溶液中の各オリゴヌクレオチド・プライマー量を各々6pmol/ μ l 以下とする遺伝高分子増幅法。

報告書他

- 1) 吉岡 幸代、加藤 菊也、岡山 博人「ダイデオキシターミネーター法を中心にした塩基配列迅速決定システム」第 15 回 日本分子生物学会年会 講演要旨集、p.391(1992)
- 2) 吉岡 幸代、加藤 菊也、野島 博、岡山 博人「分裂酵母の cDNA の大規模な塩基配列の解明」第 69 回 日本生化学会 第 19 回 日本分子生物学会 合同年会 講演要旨集、p.571(1996)

決定した塩基配列は D.D.B.J に登録した。

〔研究者名〕 吉岡 幸代、加藤 菊也

12. 発現遺伝子の識別表示技術

組織で発現している遺伝子の全体像を効率よく識別表示し、解析する技術(分子索引法)を開発した。

研究成果の概要

一種類の細胞で発現している遺伝子の数は約 10000 個と推定されており、500 程度のグループに分けることができれば一つのグループに約 20 種類の遺伝子が属することになり、比較的容易にそれぞれを増幅分離することができる。

本研究では、図のように先ず 1) Class II S 制限酵素で cDNA を切断する。2) これらの酵素は 4 塩基の付着末端をつくるが、5' 末端の 3 塩基の配列は 64 通りあるため、これらに対応する 64 種類のビオチン化アダプターを作製する。それぞれのアダプターを合致した配列を持つ cDNA に結合させ、3) さらに他の 2 種の Class II S 制限酵素で cDNA を切断し、4) 3) で用いた他の Class 2S 制限酵素をそれぞれ最初の切断に用いて 1)~3) を繰り返し、5) ストレプトアビジン被覆常磁気性ビーズでライゲートサンプルを回収後、ビオチニル化アダプターに相補なオリゴヌクレオチドを除去し、6) アダプタープライマーとアンカーオリゴ(dT)プライマーを用いて cDNA を PCR で増幅し、7) 変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離する方法で遺伝子の全体像を効率よく識別表示する技術を開発した。64 種のアダプター、3 種の Class II S 制限酵素、そして 3 種のアンカーオリゴ(dT)プライマーを用いるので RNA 集団は 576 のサブ集団に分割される。

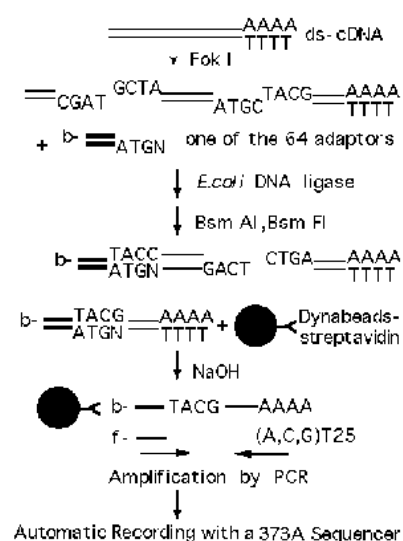


図 分子索引法概略

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 特異発現する遺伝子の同定
- 2) 新しい生理活性物質の同定
- 3) 遺伝子診断用マーカーの単離

特許出願

特 願：平 7-69695(平成 7 年 3 月 28 日)

出 願 人：科学技術振興事業団

請求の概要：前記研究の概要 1)~7)によって分離した遺伝子断片のサイズを記録することを含む DNA 分子索引法

特 願：平 7-184006(平成 7 年 7 月 20 日)

出 願 人：科学技術振興事業団

請求の概要：1)組織または細胞由来の RNA から逆転写した cDNA または DNA を Class II 制限酵素で切断し、2)切断断片の付着末端に対応する配列を含むアダプターを上記の cDNA または DNA にライゲートした後 Class II S 制限酵素による切断を行う、上記技術の変法。

特 願：平 7-234122(平成 7 年 9 月 12 日)

出 願 人：科学技術振興事業団

請求の概要：cDNA が、組織または細胞由来の RNA を、

5' OH-GGATCCT₁₆A-3'

5' OH-CAGCTGT₁₆C-3'

5' OH-CTCGAGT₁₆G-3'

でそれぞれ表されるオリゴヌクレオチドの混合物をプライマーとして逆転写することにより合成されたものであることを特徴とする改良分子索引法。

上記 3 出願を含む外国出願

アメリカ 08/621,914(平成 8 年 3 月 26 日)

ヨーロッパ 961048170(平成 8 年 3 月 26 日)

オーストラリア 50311/96(平成 8 年 3 月 27 日)

報告書他

- 1) K.Kato: Description of the entire mRNA population by a 3' end cDNA fragment generated by Class II S restriction enzymes, *Nucleic Acids Res.*, Vol.23, 3685-3690(1995)
- 2) K.Kato: RNA fingerprinting by molecular indexing, *Nucleic Acids Res.*, Vol.24, 394-395(1996)
- 3) K.Kato: Adaptor-tagged competitive PCR: a simple method to quantitate relative gene expression, *Nucleic Acids Res.*, submitted
- 4) K.Kato: Molecular indexing: a method to describe the entire mRNA population, The 3rd Annual Conference "The Human Genom Project: Commercial Implication", Abstracts(1996)
- 5) K.Kato: Molecular indexing: a method to describe the entire mRNA population, Genom Mapping and Sequencing Meeting, Cold Spring Harbor Laboratory, Abstracts, p.133(1996)
- 6) K.Kato: Molecular indexing: a novel technique for large-scale gene expression analysis, *BioJapan '96*,. Abstracts, p.123(1996)

〔研究者名〕加藤 菊也