

吉里再生機構プロジェクトの研究成果

目次

1. 肝細胞の培養法	2
2. 動物細胞の 3 次元培養法	5
3. 毛包組織の分化に関わる毛乳頭の特徴	7
4. ハイブリッド型人工皮膚を用いた遺伝子治療	10
5. フィブロネクチンのコラーゲンゲル収縮への関与	12
6. 細胞のプロテオーム解析	14
7. 遺伝子 DNA の機能発現法	16
8. 変態期のカエル皮膚で発現が変化するケラチン遺伝子	17
9. cDNA の 5' 末端を用いた新しいサブトラクション法の開発	18
10. アフリカツメガエル高分子タウ遺伝子の単離	19
11. 四肢の再生	20

1. 肝細胞の培養法

小型肝細胞の培養法の確立ならびに新たな肝細胞増殖活性化因子プレイオトロフィンの発見

研究成果の概要

肝細胞の中に幹細胞様のコロニー性増殖をする小型肝細胞があることを明らかにして、その培養法を確立した。小型肝細胞は成熟肝細胞にも胆管上皮細胞にも分化できることを証明するとともに、肝細胞の分化・増殖におけるマトリックス成分や細胞間相互作用の重要性を示した。また、Swiss 3T3 細胞由来の新しい肝細胞増殖活性化因子を単離し、その内の1つがプレイオトロフィンであることを明らかにした。(図1、図2)

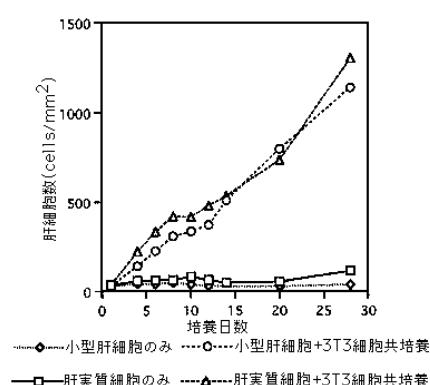


図1 肝細胞と Swiss 3T3 細胞の共培養

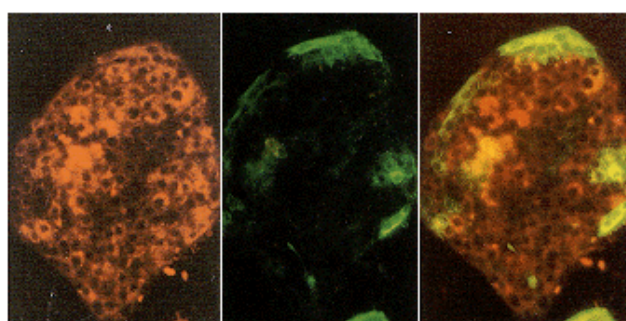


図2 小型肝細胞の成熟肝細胞および胆管上皮細胞への分化

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 人工肝臓やバイオリアクターの開発
- 2) 医薬品のスクリーニングや安全性試験のための動物代替法
- 3) 肝細胞をターゲットとする遺伝子治療

特許出願

- 1) 初代培養肝細胞の継代培養系

特 願：平 6-98056(平成 6 年 4 月 11 日)特開平 7-274951(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：ニコチンアミドならびにアスコルビン酸等が添加されている培地を用いた肝細胞の培養方法。

- 2) クローン性増殖能を有する肝実質細胞とその取得方法、並びにその継代培養方法

特 願：平 7-213686(平成 7 年 8 月 22 日)

出 願 人：科学技術振興事業団

請求の概要：肝前駆細胞を含むとみられるクローン性増殖能を持つ小型肝細胞の分取方法とそれらの細胞を継代的に培養する方法。

3) 小型肝細胞の培養方法

特 願：平 8-133985(平成 8 年 5 月 28 日)

出 願 人：科学技術振興事業団

請求の概要：3T3 細胞の培養上清を用いた、クローン性増殖能を持つ小型肝細胞の効率的な継代培養方法。

4) ヒト小型肝細胞の取得方法と、この細胞の初代培養および継代培養方法

特 願：平 8-348898(平成 8 年 12 月 26 日)

出 願 人：科学技術振興事業団

請求の概要：肝前駆細胞を含むとみられるクローン性増殖能を持つヒト小型肝細胞の分取方法とそれらの細胞を効率よく継代培養する方法。

5) 肝細胞の培養方法

特 願：平 9-149708(平成 9 年 6 月 6 日)

出 願 人：科学技術振興事業団

請求の概要：3T3 細胞由来の肝細胞増殖活性化因子を用いた肝細胞の効率的な培養方法。

報告書他

- 1) 立野 知世、吉里 勝利「初代培養肝細胞の継代培養」日本発生生物学会第 27 回大会 発表要旨集 p.131(1994)
- 2) 立野 知世、吉里 勝利「初代培養肝細胞の増殖および肝機能長期維持を伴う継代法の確立」第 1 回肝細胞研究会 研究発表会抄録 p.27(1994)
- 3) 立野 知世、吉里 勝利「ラット肝臓の非実質細胞分画に含まれる小型肝細胞のクローン性増殖と分化」第 47 回日本細胞生物学会大会 予稿集 p.221(1994)
- 4) C.Tateno and K.Yoshizato: Clonal growth of adult rat hepatocytes, International Symposium on Wound Healing and Tissue Regeneration Abstracts p.10(1995)
- 5) 立野 知世、吉里 勝利「クローン性増殖能を持つラット初代培養肝細胞の培養系の確立」日本発生生物学会第 28 回大会 要旨集 p.257(1995)
- 6) 佐藤 玄、立野 知世、吉里 勝利「成体ラットから採取した小型肝細胞のコロニー形成の条件」第 2 回肝細胞研究会 研究発表会抄録 p.23(1995)
- 7) 立野 知世、吉里 勝利「成体ラット肝臓から採取した培養小型肝細胞の性質」第 2 回肝細胞研究会 研究発表会抄録 p.23(1995)
- 8) C.Tateno, K.Kajihara, K.Yoshizato: Long-term culture of clonogenic diploid hepatocytes with bipotential lineage generation capacity, Experimental Biology '96 Abstracts P.A405(1996)
- 9) C.Tateno and K.Yoshizato: Long-term cultivation of adult rat hepatocytes that undergo multiple cell divisions and express normal parenchymal phenotypes, American Journal of Pathology 148:383-392(1996)

- 10) C.Tateno and K.Yoshizato: Growth and differentiation in culture of clonogenic hepatocytes that express both phenotypes of hepatocytes and biliary epithelial cells, American Journal of Pathology 149:1593-1605(1996)
- 11) 梶原 薫、立野 知世、井上 圭三、吉里 勝利「ラット小型肝細胞の分化に伴うタンパク質及び mRNA 発現レベルの変化」第 29 回日本発生生物学会 発表要旨集 p.111(1996)
- 12) 立野 知世、井上 圭三、吉里 勝利「クローン性増殖能を持つラット初代培養小型肝細胞の性質」第 29 回日本発生生物学会 発表要旨集 p.315(1996)
- 13) 梶原 薫、立野 知世、井上 圭三、吉里 勝利「ラット小型肝細胞の分化に伴うタンパク質及び mRNA 発現レベルの変化」第 3 回肝細胞研究会 抄録集 p.23(1996)
- 14) 立野 知世、井上 圭三、吉里 勝利「DMSO,Sodium butyrate による小型肝細胞の分化誘導」第 3 回肝細胞研究会 抄録集 p.39(1996)
- 15) 日野 裕史、立野 知世、佐藤 玄、梶原 薫、吉里 勝利、福田 敏勝、浅原 利正、土肥 雪彦「ヒト小型肝細胞の採取と培養」第 3 回肝細胞研究会 抄録集 p.34(1996)
- 16) 梶原 薫、立野(向谷) 知世、吉里 勝利「星細胞および ECM の肝細胞に対する増殖効果」第 4 回肝細胞研究会 プログラム抄録集(1997)
- 17) 佐藤 玄、船橋 亮、立野(向谷) 知世、吉里 勝利「肝細胞の増殖に対する 3T3 細胞の効果」第 4 回肝細胞研究会 プログラム抄録集 p.36(1997)
- 18) C.Tateno-Mukaidani, K.Kajihara, H.Sato, K.Yoshizato: Effect of nonparenchymal cells on the growth of small hepatocytes and parenchymal hepatocytes, 第 4 回肝細胞研究会 プログラム抄録集 p.17(1997)
- 19) C.Tateno-Mukaidani: Heterogeneity in replicative potential of rat hepatocytes, International Symposium on Mechanisms of Metamorphosis and Regeneration Abstracts p.23(1997)

〔研究者名〕 立野(向谷) 知世、佐藤 玄、日野 裕史、梶原 薫

2. 動物細胞の3次元培養法

培養担体を用いた3次元培養法の確立ならびに高強度コラーゲンハイドロゲル薄膜の作製

研究成果の概要

従来動物細胞を3次元培養する方法として知られてきたスフェロイド培養法では、細胞塊の凝縮によって培養液の内部への浸透が阻害されるために起こる細胞の壊死が問題であった。イネの繊維状根やガーゼを培養担体として細胞を培養することにより、3次元再構築体を作ることができた。この構築体では細胞同士が密に凝集することが防がれ、特にガーゼを用いた場合には培養体の内部まで培養液が浸透するため内部構成細胞の長期生存率を高めることが可能になった。また、針金や通液性材料などを支持体として固化させたコラーゲンを乾燥させたのち、再び水和することによりコラーゲンハイドロゲル薄膜を作製することができた。この薄膜は従来のコラーゲンゲルに比べて、より薄くかつ高い強度を持っている。(図1、図2)

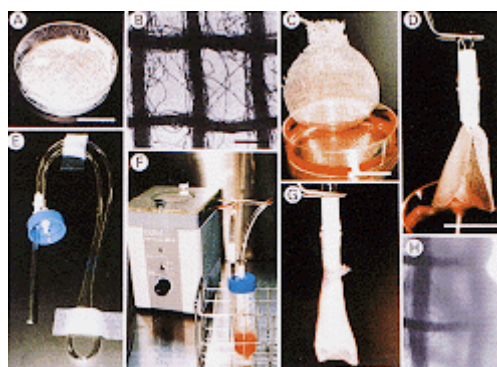


図1 綿製ガーゼを導入した通液型細胞培養装置

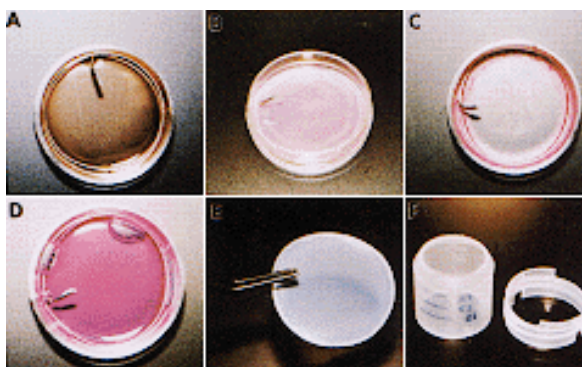


図2 コラーゲンハイドロゲル薄膜の作製

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 人工臓器の開発
- 2) 動物実験代替法となる薬効または毒性評価系
- 3) ガン細胞などの細胞の浸潤性・転移性の評価系
- 4) 臓器癒着を防ぐ医療材料開発

特許出願

- 1) 動物細胞の培養担体と、この担体を用いる動物細胞の培養方法

特 願：平 5-185340(平成 5 年 7 月 27 日)特開平 7-67626(平成 7 年 3 月 14 日)

出 願 人：科学技術振興事業団

請求の概要：3 植物由来の繊維状分岐体からなる培養担体上に動物細胞を培養し、3 次元構造を持つ細胞凝集塊を構築する方法。

2) 通液性細胞培養担体と、この担体を用いる培養方法および培養装置

特 願：平 6-339979(平成 6 年 12 月 29 日)特開平 7-298876(平成 7 年 11 月 14 日)

出 願 人：科学技術振興事業団

請求の概要：天然又は合成の通液性培養担体上に細胞を接着させる培養方法。およびこの通液性培養担体を用いた培養装置。

3) 細胞外マトリックス成分含有ハイドロゲル薄膜

特 願：平 7-35176(平成 7 年 2 月 23 日)特開平 8-228768(平成 8 年 9 月 10 日)

出 願 人：科学技術振興事業団

請求の概要：細胞培養基質や臓器癒着防止などに有用な、コラーゲン等の細胞外マトリックス成分を含有するハイドロゲル薄膜の作成方法。

報告書他

- 1) 竹澤 俊明、吉里 勝利「毛細血管代替物を導入した線維芽細胞の三次元再構築体培養」第 16 回日本バイオマテリアル学会大会 予稿集 p.58(1994)
- 2) T.Takezawa and K.Yoshizato: A new culture method of biohybrid organs, International Symposium on Wound Healing and Tissue Regeneration Abstracts p.18(1995)
- 3) T.Takezawa and K.Yoshizato: A new culture method of three-dimensionally reconstituted multicellular mass utilizing cotton-gauze(V-1012), Congress on In Vitro Biology In Vitro Vol.31 No.3 p.33A(1995)
- 4) 竹澤 俊明、吉里 勝利「培養液で通液できる人工環境(マトリックス)を有したオルガノイドの開発」第 24 回器官形成研究会 講演要旨集(1996)
- 5) T.Takezawa and K.Yoshizato: Reconstitution of organoid with capillary networks, Cell & Tissue BioProcessing 1st Annual Meeting Abstracts(1996)
- 6) T.Takezawa and K.Yoshizato: Development and Characterization of Novel Cell Scaffolds with Branched Capillary-Like Networks Which Are Useful for Cell-Incorporated Tissue Engineering, Tissue Engineering Society Inaugural Meeting Abstracts (1996)
- 7) T.Takezawa and K.Yoshizato: Mass transport via naturally branched scaffolds maintains viability of a reconstituted model of connective tissue, Tissue Engineering(in press)

〔研究者名〕 竹澤 俊明

3. 毛包組織の分化に関わる毛乳頭の特性

毛乳頭細胞の長期継代培養法の確立ならびに毛包組織を見分ける抗体の作製

研究成果の概要

毛乳頭細胞は、毛髪のもとである毛母細胞の増殖と分化を支えている。毛乳頭細胞の持つ毛髪形成能力を保ったまま長期継代培養することはこれまで不可能であったが、表皮細胞の培養上清を加えて培養することにより可能となった。また、毛包分化における遺伝子やタンパク質の作用を解明する上で、毛包組織の分化段階を見分けるマーカーが必要になるが、このようなマーカーとして有用である毛包組織を見分ける抗体を効率よく作製する方法を考案した。(図1、図2)

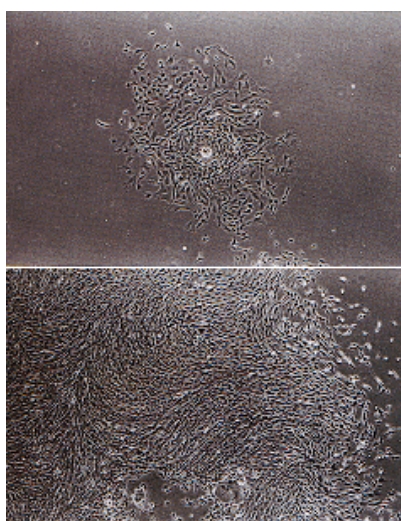


図1 表皮細胞培養上清による毛乳頭細胞の増殖活性化

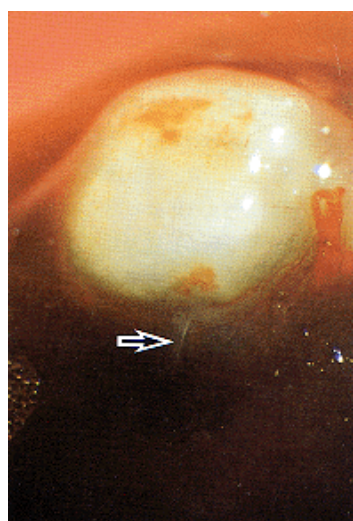


図2 培養毛乳頭細胞によって足裏皮膚に誘導された毛

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 毛髪の分化・伸長メカニズムの解明
- 2) 毛乳頭細胞の移植による毛髪再生
- 3) 脱毛剤・育毛剤・脱毛剤の開発
- 4) 脱毛症の診断

特許出願

- 1) 毛包組織に対するモノクローナル抗体と、この抗体を産生するハイブリドーマ、およびこのハイブリドーマの作成法

特 願：平5-283007(平成5年11月12日)特開平7-132083(平成7年5月23日)

出 願 人：科学技術振興事業団、(株)特殊免疫研究所

請求の概要：毛包から単離した毛球部を直接マウスに免疫し、毛包組織に対するモノクローナル抗体を作成する方法。

2) 毛乳頭細胞の長期継代培養法

特 願：平 6-98055(平成 6 年 4 月 11 日)特開平 7-274950(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：表皮細胞またはその培養上清を用いた毛乳頭細胞の長期継代培養方法。

報告書他

- 1) 松崎 貴、稲松 睦、吉里 勝利「ラット毛包を構成する各組織に対するモノクローナル抗体の作製」日本動物学会第 64 回大会 予稿集 p.117(1993)
- 2) 稲松 睦、松崎 貴、吉里 勝利「ラット頬髭毛包より単離した毛乳頭細胞の長期継代培養法の確立」日本発生生物学会第 27 回大会 発表要旨集 p.129(1994)
- 3) 松崎 貴、稲松 睦、吉里 勝利「毛乳頭細胞は毛包の再生に必要なか？」日本発生生物学会第 27 回大会 発表要旨集 p.130(1994)
- 4) 松崎 貴、稲松 睦、吉里 勝利「長期継代培養したラット毛乳頭細胞にみられる毛包誘導能」日本動物学会第 65 回大会 予稿集 p.50(1994)
- 5) 松崎 貴、稲松 睦、吉里 勝利「長期継代後も毛包誘導能を維持するパピラ細胞培養法の確立」第 2 回毛髪科学研究会 要旨集 p.2(1994)
- 6) 松崎 貴、稲松 睦、吉里 勝利「培養ラット胚皮膚を用いた毛包分化因子アッセイ法の検討」日本発生生物学会第 28 回大会 要旨集 p.253(1995)
- 7) 稲松 睦、松崎 貴、吉里 勝利「ラット頬髭毛乳頭を免疫して得られたユニークなモノクローナル抗体の特性」日本発生生物学会第 28 回大会 要旨集 p.144(1995)
- 8) T.Matsuzaki, M.Inamatsu, K.Yoshizato: Establishment of dermal papilla cell lines with the activity to induce a hair follicle, International Symposium on Wound Healing and Tissue Regeneration Abstracts P.12(1995)
- 9) 稲松 睦、松崎 貴、吉里 勝利「表皮細胞培養上清中に存在するラット毛乳頭細胞増殖活性化因子の検索」第 29 回日本発生生物学会 発表要旨集 p.247(1996)
- 10) T.Matsuzaki, M.Inamatsu, K.Yoshizato: The upper dermal sheath has a potential to regenerate the hair in the rat follicular epidermis, Differentiation 60: 287-297(1996)
- 11) 松崎 貴、稲松 睦、吉里 勝利「PCR-サブトラクション法によるラット毛乳頭細胞特異的遺伝子の単離」日本動物学会第 67 回大会 予稿集 p.110(1996)
- 12) T.Matsuzaki, M.Inamatsu, K.Yoshizato: Hair induction by dermal papilla cells cultured with conditioned medium of keratinocytes, Hair Research for the Next Millenium, Elsevier Science, 447-451(1996)
- 13) 松崎 貴、稲松 睦、吉里 勝利「ラット頬髭パピラ細胞に特異的に発現する遺伝子の単離」第 4 回毛髪科学研究会 プログラム・抄録集 p.27(1996)
- 14) 稲松 睦、松崎 貴、吉里 勝利「パピラ細胞の増殖に対する FGF の効果」第 4 回毛髪科学研究会 プログラム・抄録集 p.28(1996)

- 15) T.Matsuzaki, M.Inamatsu, K.Yoshizato: Isolation of hair dermal papilla-specific genes,
19th Int.Congress of Dermatology Abstracts p.19(1997)
- 16) T.Matsuzaki: Roles of Dermal Papilla Cells on Differentiation and Regrowth of Hair,
International Symposium on Mechanisms of Metamorphosis and Regeneration Abstracts
p.22(1997)

〔研究者名〕 松崎 貴、稲松 睦

4. ハイブリッド型人工皮膚を用いた遺伝子治療

インスリン遺伝子を導入したハイブリッド型人工皮膚による糖尿病動物の実験的治療

研究成果の概要

皮膚線維芽細胞にプラスミッドベクターを用いてインスリン遺伝子を組み込むことによりインスリンの前駆体であるプロインスリンを分泌する細胞を得た。この細胞をハイブリッド型人工皮膚の真皮層に導入して、糖尿病を惹起したヌードマウスに移植したところ、糖尿病特有の体重減少および血糖値の上昇が有意に抑制された。(図1、図2)

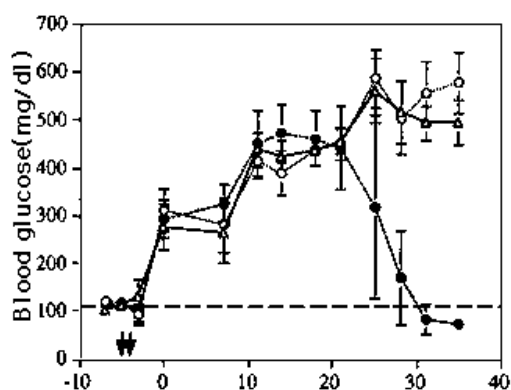


図1 ハイブリッド型人工皮膚を移植したヌードマウスにおける血糖値の変化

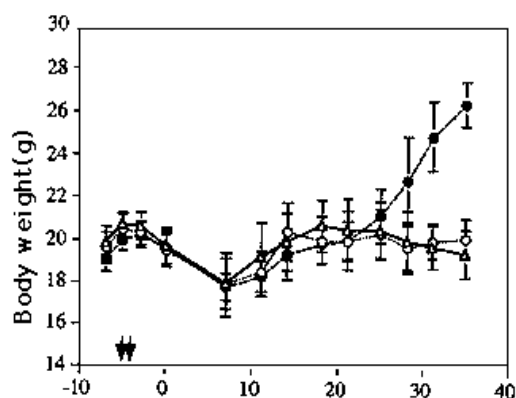


図2 ハイブリッド型人工皮膚を移植したヌードマウスにおける体重の変化

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) ハイブリッド型人工皮膚を用いた遺伝子治療
- 2) 経皮的薬剤投与による遺伝子発現の人為的調節

特許出願

- 1) 生理活性物質分泌性のハイブリッド型ゲル

特 願：平7-101475(平成7年4月25日)特開平8-196271(平成8年8月6日)

出 願 人：科学技術振興事業団、湧永製薬

請求の概要：生理活性物質の遺伝子を組み込んだ組換え体細胞からハイブリッド型人工皮膚を作成し、遺伝子治療に応用する方法。

報告書他

- 1) 吉田 進、吉里 勝利「遺伝子治療—皮膚細胞への遺伝子導入」日本培養組織学会第67回大会 細胞工学シンポジウム「遺伝子導入研究の新しい展開」要旨集 p.21(1994)
- 2) 吉田 進、吉里 勝利「皮膚細胞への遺伝子導入—ハイブリッド型人工皮膚を用いた遺伝子治療」組織培養研究 13:129-135(1994)

- 3) 吉田 進、吉里 勝利「遺伝子導入により膵機能を付与したハイブリッド型人工皮膚の構築」第 32 回日本人工臓器学会大会 予稿集 p.S8(1994)
- 4) 吉里 勝利、吉田 進「インスリン分泌性ハイブリッド型人工皮膚の構築」第 30 回日本移植学会総会 移植 Vol.29, p.122(1994)
- 5) 吉田 進、ロバート・A・カスバートソン、吉里 勝利「インスリン分泌能を有するハイブリッド型人工皮膚の構築」器官形成研究会第 23 回大会 講演要旨集 p.23(1995)
- 6) S.Yoshida, R.A.Cuthbertson, K.Yoshizato: Reconstruction of Insulin Secreting Biohybrid Skin, International Symposium on Wound Healing and Tissue Regeneration Abstracts p.16(1995)
- 7) S.Yoshida, C.Yamasaki, K.Yoshizato: Proinsulin-Secreting Hybrid Skin Which Can Be Used to Treat Diabetic Animals, Tissue Engineering 3, 243-255(1997)
- 8) S.Yoshida, C.Yamasaki, R.A.Cuthbertson, K.Yoshizato: Insulin Secreting Hybrid Artificial Skin for Treating Diabetic Animals, 19th International Meeting of Hair Research Societies Abstracts p.228(1997)

〔研究者名〕 吉田 進

5. フィブロネクチンのコラーゲンゲル収縮への関与

コラーゲンと相互作用するフィブロネクチンの新規ドメインの発見とコラーゲンゲルの収縮を阻害するペプチドの作成

研究成果の概要

フィブロネクチンを抗原とし、コラーゲンゲル収縮を阻害する抗体(A3A5)のエピトープ解析を行った結果、コラーゲン線維との結合に関わるフィブロネクチンの新しいドメイン配列を見つけた。このドメイン配列に相当する6アミノ酸から成るペプチドは、予想通りコラーゲンゲルの収縮を特異的に阻害した。(図1)

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 創傷治癒の人為的調節
- 2) ケロイドによる瘢痕形成の治療
- 3) 人工皮膚を用いた外来遺伝子発現の調節

特許出願

- 1) ペプチドとコラーゲン収縮阻害剤

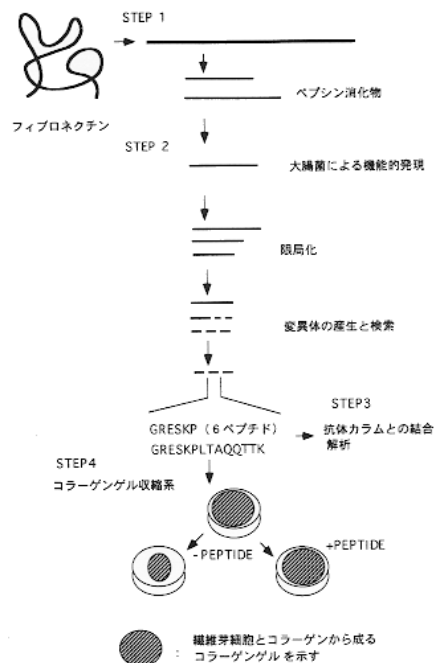
特 願：平7-261902(平成7年10月9日)特開平9-104697(平成9年4月22日)

出 願 人：科学技術振興事業団

請求の概要：コラーゲンとフィブロネクチンとの結合に拮抗的に作用して両者の結合を特異的に阻害する新規なペプチドと、このペプチドを有効成分とするコラーゲンゲル収縮阻害剤。

報告書他

- 1) 小原 政信「細胞外マトリックスによる細胞機能調節の解析—コラーゲンゲル培養法の利用—」第21回器官形成研究会 要旨集 p.52(1993)
- 2) M.Obara, K.Yoshizato: Possible Involvement of the Interaction of the $\alpha 5$ Subunit of $\alpha 5 \beta 1$ Integrin with the Synergistic Region of the Central Cell-Binding Domain of Fibronectin in Cells to Fibronectin Binding, Experimental Cell Research 216:273-276(1995)
- 3) 小原 政信、吉里 勝利「フィブロネクチンを介するコラーゲンと細胞との新しい結合様式の解析」第42回マトリックス研究会 抄録集 p.19(1995)
- 4) M.Ono, M.Obara, K.Yoshizato: A 250KD PHA finding glycoprotein involved in the fibroblast-mediated collagen gel contraction, International Symposium on Wound Healing and Tissue Regeneration Abstracts p.74(1995)



- 5) M.Obara, K.Yoshizato: A new domain of fibronectin which is directly involved in fibroblast-mediated collagen gel contraction, International Symposium on Wound Healing and Tissue Regeneration Abstracts p.25(1995)
- 6) 小野 雅昭、小原 政信、吉里 勝利「コラーゲンゲル収縮に關与する 250KDa の PHA 結合蛋白質の解析」第 68 回日本生化学会大会 生化学 Vol.67 No.7 p.806(1995)
- 7) 小野 雅昭、小原 政信、吉里 勝利「コラーゲンゲル収縮に關する蛋白質の機能解析」第 43 回マトリックス研究会 抄録集 p.59(1996)
- 8) 小野 雅昭、小原 政信、吉里 勝利「コラーゲンゲル収縮に關与する 250KDa の PHA 結合蛋白質の解析」第 69 回日本生化学会:第 19 回日本分子生物学会合同年会 発表抄録集 p.1166(1996)
- 9) 小原 政信、小野 雅昭、吉里 勝利「コラーゲンマトリックス—細胞間相互作用におけるフィブロネクチンの役割」第 24 回器官形成研究会 講演要旨集 p.7(1996)
- 10) 小原 政信、小野 雅昭、吉里 勝利「コラーゲンゲル収縮に關与するフィブロネクチンの機能ドメインの解析」第 69 回日本生化学会:第 19 回日本分子生物学会合同年会 発表抄録集 p.1166(1996)
- 11) M.Obara, M.Ono, K.Yoshizato: The Gly-Arg-Glu-Ser-Lys-Pro sequence of the fibronectin type II4 repeat is required for the fibroblast-mediated collagen gel contraction, 6th International Congress on Cell Biology Abstracts p.65(1996)
- 12) M.Obara, K.Yoshizato: A novel domain of fibronectin revealed by epitope mopping of a monoclonal antibody which inhibits fibroblasts-mediated collagen gel contraction, FEBS Letters 412: 48-52(1997)

〔研究者名〕 小原 政信、小野 雅昭

6. 細胞のプロテオム解析

プラクティカルデータベースによる微量迅速タンパク質同定法の開発

研究成果の概要

高解像度二次元電気泳動法によって細胞の全タンパク質を分離し、個々のタンパク質を酵素消化したのち消化断片のアミノ酸配列をプロテインシーケンサーで決定した。同時に消化断片を飛行時間型質量分析装置で分析して得られたスペクトルプロファイルを登録してデータベース(プラクティカルデータベース)化した。このプラクティカルデータベースを使って、試料タンパク質を微量かつ迅速に同定するための検索ソフトを開発した。(図1)

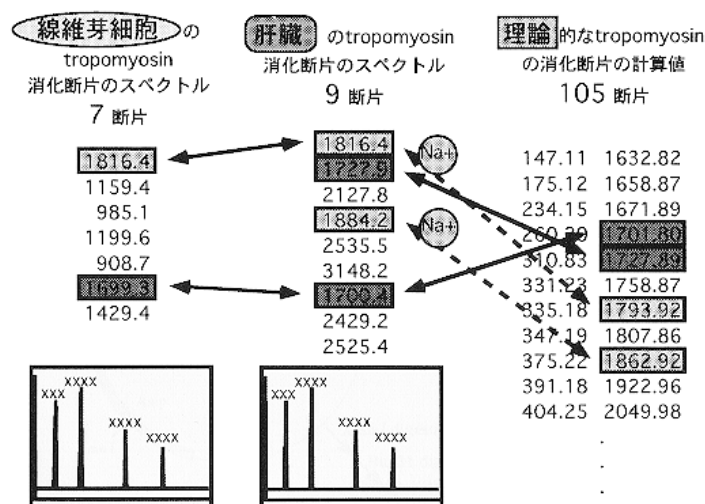


図1 プラクティカルデータベースを用いたペプチドマスフィンガープリント法

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 微量タンパク質の迅速な同定法
- 2) 疾患原因遺伝子の同定と診断応用

特許出願

- 1) タンパク質同定方法

特 願：平9-253986(平成9年9月18日)

出 願 人：科学技術振興事業団

請求の概要：細胞や組織を構成する多数のタンパク質を微量、簡便、かつ高精度で同定する方法。

報告書他

- 1) 船橋 亮、佐藤 玄、吉里 勝利「TOF-MSによる動物細胞タンパク質のアミノ酸配列決定」1995年度質量分析連合討論会 p.2-P-5(1995)

- 2) 佐藤 玄、船橋 亮、吉里 勝利「動物細胞を構成するタンパク質のカタログづくり」
1995 年度質量分析連合討論会 p.2-P-6(1995)
- 3) Dan Bach Kristensen, M.Inamatsu, T.Matsuzaki, K.Yoshizato: Analysis of the rat dermal papilla cell proteome, First International Meeting of Hair Research Societies Abstracts p.56(1997)
- 4) Dan Bach Kristensen, M.Inamatsu, K.Yoshizato: Elution-concentration of proteins cut from two-dimensional polyacrylamide gels using Pasteur pipettes, Electrophoresis 18: 2078-2084(1997)

〔研究者名〕 佐藤 玄、ダン・クリステンセン、船橋 亮

7. 遺伝子 DNA の機能発現法

クローニングベクターに保持された遺伝子 DNA を発現ベクターに組み換える簡便法

研究成果の概要

クローニングベクターに保持された遺伝子 DNA を発現させてその機能を解析するためには、制限酵素による消化と電気泳動等による遺伝子 DNA の回収ののち改めて発現ベクターに組み換える必要がある。この組み換えを簡便に行え、また PCR 法によって得られた短い遺伝子断片でも効率よく組み換えられる法を考案した。クローニングベクターの薬剤耐性遺伝子内の制限酵素サイトを切断後、DNA 分解酵素によって薬剤耐性遺伝子を分解する。これを発現ベクターと混ぜ合わせ、目的の遺伝子 DNA を切り出しかつ発現ベクターに組み込める適当な制限酵素で処理したのち、ライゲーションによって組み換える。(図 1)

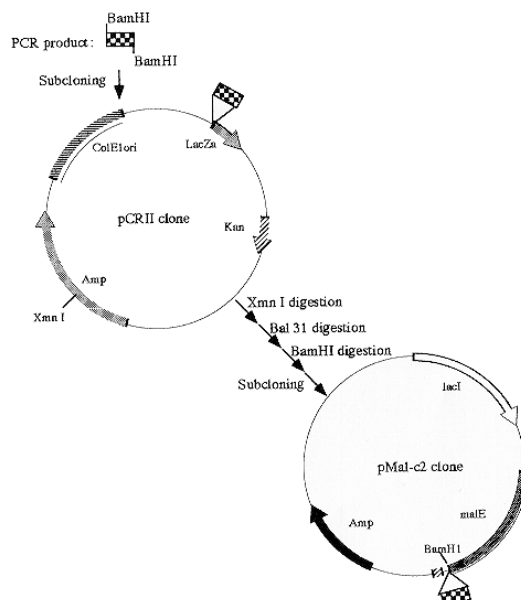


図 1 ベクタースワップ法の原理

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 有用遺伝子の迅速かつ効率的発現キット

特許出願

- 1) 遺伝子 DNA の機能発現方法

特 願：平 7-134463(平成 7 年 5 月 31 日)特開平 8-322567(平成 8 年 12 月 10 日)

出 願 人：科学技術振興事業団

請求の概要：薬剤耐性遺伝子を有するクローニングベクターに保持された遺伝子 DNA を、同一の薬剤耐性を有する発現ベクターに組み換えるための簡便な方法。

報告書他

- 1) M.Obara, K.Yoshizato: Vector swapping strategy with an exonuclease in cloning and high expression of small PCR products, Bio Techniques(in press)

〔研究者名〕小原 政信

8. 変態期のカエル皮膚で発現が変化するケラチン遺伝子

アフリカツメガエル変態期の皮膚において発現が変化するケラチンの同定

研究成果の概要

変態前期と変態期の皮膚組織タンパク質を二次元電気泳動によって解析し、発現変化がみられたタンパク質として数種のケラチンを同定した。さらに成体皮膚および幼生尾のcDNA ライブラリーをスクリーニングし、4 種類の新規ケラチン遺伝子(XAK-A、XAK-B、XAK-C、XLK)を同定した。XAK-A と XAK-B は変態期になって発現し始めるのに対し、XLK は変態前期まで発現を続け変態期には消失した。これらの遺伝子のプロモーター領域を解析したところ、いくつかの特徴的なモチーフが見つかり、甲状腺ホルモンにより間接的に発現調節されている可能性が示唆された。(図 1)

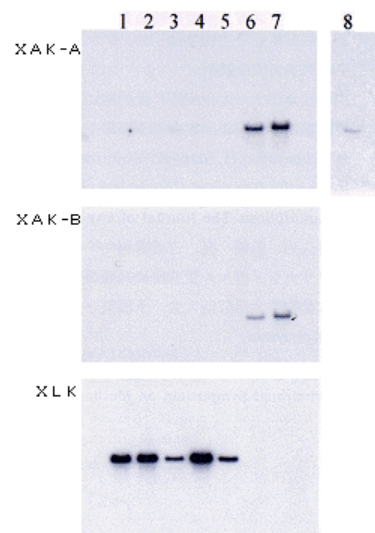


図 1 ケラチン遺伝子のノーザン
ブロット解析

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) ケラチンによる細胞分化の制御機構の解明
- 2) 甲状腺ホルモンによる遺伝子発現調節メカニズムの解明

特許出願

なし

報告書他

- 1) 小林 久男、吉里 勝利「アフリカツメガエル変態時のタンパク質の変化」第 16 回日本分子生物学会年会 プログラム講演要旨集 p.344(1993)
 - 2) 小林 久男、吉里 勝利「アフリカツメガエル皮膚の変態期におけるタンパク質の変化」日本動物学会第 65 回大会 予稿集 p.155(1994)
 - 3) H.Kobayashi, H.Sato, K.Yoshizato: Regionally Regulated Conversion of Protein Expression in the Skin During Anuran, Metamorphosis The Journal of Experimental Zoology 274: 181-192(1996)
 - 4) 小林 久男、船橋 亮、吉里 勝利「アフリカツメガエル変態期に発現が変動する皮膚ケラチンの cDNA クローニング」日本動物学会第 67 回大会 予稿集 p.87(1996)
 - 5) H.Kobayashi: Regionally Regulated Gene Expression in the Skin during Anuran Metamorphosis, International Symposium on Mechanisms of Metamorphosis and Regeneration Abstracts p.39(1997)
- 〔研究者名〕 小林 久男、野呂 信弘

9. cDNA の 5' 末端を用いた新しいサブトラクション法の開発

組織や細胞、発生段階などで差次的に発現している遺伝子の単離法の改良

研究成果の概要

差次的に発現する遺伝子の単離法である SSH (Suppression Subtractive Hybridization) 法を改変して、cDNA の 5' 末端フラグメントに対して効率よくサブトラクトすることを可能にした。改変点は、アダプター1 を付加するテスト cDNA で、制限酵素(RsaI)処理とアダプター付加反応の順序を入れ換えたことである。この変更によってテスト cDNA の 5' 末端にのみアダプター1 を付加することができたため、アダプター1 とアダプター2 の両方を持つ 5' 末端 cDNA 断片を優先的に増幅できるようになった。5' 末端の同定は、完全長 cDNA を単離するためにたいへん有効であることから、応用範囲が広いと考えられる。(図 1)

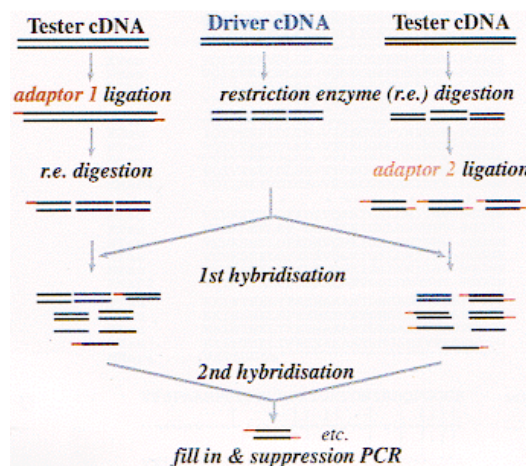


図 1 5' 末端を用いるサブトラクション法の原理

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 差次的に発現する遺伝子の効率的単離法
- 2) 完全長 cDNA の簡単な単離法

特許出願

なし

報告書他

- 1) 天野 寿一、吉里 勝利「アフリカツメガエルオタマジャクシ変態期小腸の組織再構築に
関与する遺伝子の検索」日本発生生物学会第 30 回大会 要旨集 p.123(1997)
- 2) T. Amano: Isolation of Genes Involved in Intestinal Remodeling of *Xenopus* Tadpoles,
International Symposium on Mechanisms of Metamorphosis and Regeneration Abstracts
p.5(1997)

〔研究者名〕天野 寿一

10. アフリカツメガエルのタウ遺伝子

アフリカツメガエル高分子タウ遺伝子の単離ならびに構造解析

研究成果の概要

アフリカツメガエル尾部より単離された高分子タウ遺伝子 XTau は、4 回のタンデムリピートを分子内に持っていた。アミノ末端領域の配列は哺乳類のタウタンパク質と著しく異なっていたが、それ以外の領域はたいへん類似していた。さらに、アミノ末端領域に 124bp の挿入配列を持つ別な XTau 遺伝子も存在することが分かった。XTau はカエルの変態過程における尾の運動ニューロンの変性に関わっているものと見られる。その神経変性メカニズムの解明は、アルツハイマー病などにおける神経変性を理解する手掛かりになると考えられる。(図 1)

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) アルツハイマー病の病因解明
- 2) タウタンパク質の機能解明

特許出願

なし

報告書他

- 1) 野呂 信弘、川端 広美、吉里 勝利「アフリカツメガエル高分子タウタンパク質の解析」日本発生物学会第 29 回大会 発表要旨集 p.87(1996)
- 2) N.Noro: Tail Resorption Program in *Xenopus laevis* Tadpole, International Symposium on Mechanisms of Metamorphosis and Regeneration Abstracts p.43(1997)

〔研究者名〕野呂 信弘



図 1 XTau タンパク質のタンデムリピート構造

11. 四肢の再生

イモリの四肢再生過程に関与する遺伝子の同定

研究成果の概要

四肢の再生芽においても、発生過程の肢芽において *shh* 遺伝子が発現する場所に相当する場所に *shh* 遺伝子が発現することが分かった。また、肢芽の発生や分化に関わるホメオボックス遺伝子が再生芽においても働いていることが明らかになった。四肢再生の初期過程に見られる組織の分解と再構築に、複数の MMP 遺伝子が関わっていることが分かった。過剰肢を誘導した再生芽における *shh* 遺伝子の発現から、四肢再生メカニズムが極性帯モデルに基づいていることを示した。(図 1、図 2)

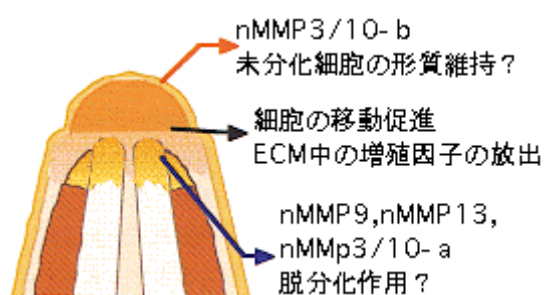


図1 イモリの四肢再生過程における MMP の役割

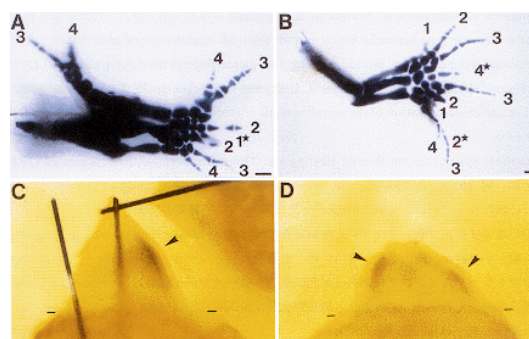


図2 過剰肢を誘導した再生芽における *shh* 遺伝子の発現

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 四肢再生の人為的誘導・制御

特許出願

なし

報告書他

- 1) 芋川 浩、内山 孝司、関口 敬子、吉里 勝利「イモリの四肢再生における Sonic hedgehog 及び Wnt 遺伝子発現の解析」日本動物学会第 66 回大会 予稿集 p.111(1995)
- 2) 芋川 浩、内山 孝司、関口 敬子、吉里 勝利「アカハライモリの四肢再生に関わる遺伝子ネットワークの検索」日本発生生物学会第 28 回大会 要旨集 p.268(1995)
- 3) 内山 孝司、芋川 浩、小林 好江、川端 広美、関口 敬子、吉里 勝利「イモリ正常肢及び再生肢で発現するホメオボックス遺伝子の単離」日本発生生物学会第 28 回大会 要旨集 p.101(1995)
- 4) 宮崎 歴、内山 孝司、芋川 浩、吉里 勝利「再生過程におけるマトリックスメタロプロテアーゼの発現」日本発生生物学会第 28 回大会 要旨集 p.102(1995)

- 5) Y.Imokawa, K.Uchiyama, K.Sekiguchi, K.Yoshizato: A trial to uncover gene networks which control the limb regeneration of newt, International Symposium on Wound Healing and Tissue Regeneration Abstracts p.30(1995)
- 6) K.Uchiyama, Y.Imokawa, Y.Kobayashi, H.Kawabata, K.Sekiguchi, K.Yoshizato: Isolation and characterization of the morphogenesis related homeobox genes expressed in the adult limb of the newt, International Symposium on Wound Healing and Tissue Regeneration Abstracts p.35(1995)
- 7) 芋川 浩、関口 敬子、吉里 勝利「イモリの四肢再生における Sonic hedgehog 及び Wnt 遺伝子発現の解析」第 18 回日本分子生物学会 プログラム講演要旨集 p.300(1995)
- 8) 宮崎 歴、小林 好江、内山 孝司、芋川 浩、吉里 勝利「イモリマトリックスメタロプロテアーゼ遺伝子のクローニングと解析」第 18 回日本分子生物学会 プログラム講演要旨集 p.338(1995)
- 9) Y.Imokawa, K.Sekiguchi, K.Yoshizato: Analysis of genes which are involved in newt limb regeneration, The 15th Symposium of the Singer Society for Regeneration and Development Abstracts p.16(1996)
- 10) Y.Imokawa, K.Sekiguchi, K.Yoshizato: Analysis of genes which are involved in newt limb regeneration, The 5th international limb development and regeneration conference Abstracts p.W8(1996)
- 11) 芋川 浩、関口 敬子、吉里 勝利「アカハライモリの四肢再生に関わる遺伝子の解析」第 29 回日本発生生物学会 発表要旨集 p.292(1996)
- 12) 宮崎 歴、小柴 和子、芋川 浩、吉里 勝利「イモリ四肢再生に関わるマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)のクローニングとその遺伝子発現」第 29 回日本発生生物学会 発表要旨集 p.112(1996)
- 13) 小柴 和子、芋川 浩、吉里 勝利「イモリ四肢再生芽と再生芽培養細胞における Myf5, Cart-1 遺伝子の発現」日本動物学会第 67 回大会 予稿集 p.112(1996)
- 14) K. Miyazaki, K. Uchiyama, Y. Imokawa, K. Yoshizato: Cloning and Characterizing of cDNAs for Matrix Metalloproteinases of Regenerating Newt Limbs, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 6819-6824(1996)
- 15) 宮崎 歴、小柴 和子、小林 好江、吉里 勝利「イモリ四肢再生に関わるマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)のクローニングと解析」第 43 回マトリックス研究会 抄録集 p.33(1996)
- 16) Y.Imokawa, K.Miyazaki, K.Yoshizato: Expression of Genes Associated with the Newt Limb Regeneration, The 38th NIBB Conference Abstracts p.26(1997)
- 17) 芋川 浩、吉里 勝利「アカハライモリの四肢再生に関わる遺伝子の解析」日本発生生物学会第 30 回大会 要旨集 p.103(1997)
- 18) 宮崎 歴、小柴 和子、安達 栄治郎、芋川 浩、吉里 勝利「イモリ再生肢における

コラーゲンの分解とそれに関わるマトリックスメタロプロテアーゼの発現部位の解析」
日本発生物学会第 30 回大会 要旨集 p.101(1997)

- 19) Y.Imokawa and K.Yoshizato: Expression of sonic hedgehog gene in regenerating newt limb blastemas recapitulates that in developing limb buds, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94, 9159-9164(1997)
- 20) Y.Imokawa: Expression of Genes Associated with the Newt Limb Regeneration, International Symposium on Mechanisms of Metamorphosis andRegeneration Abstracts p.52(1997)
- 21) K.Miyazaki: Matrixmetalloproteases Involved in the Regeneration of Newt Limbs, International Symposium on Mechanisms of Metamorphosis and Regeneration Abstracts p.10(1997)

〔研究者名〕 芋川 浩、宮崎 歴、内山 孝司、小柴 和子