動物ゲノム情報を利用した遺伝子機能の解明

吉田健一・丸山公明

明治大学農学部生命科学科

Elucidation of gene function based on the animal genomics

Kenichi Yoshida and Kimiaki Maruyama

Department of Life Sciences, Faculty of Agriculture, Meiji University

1. はじめに

ヒト (International Human Genome Sequencing Consortium 2001)、マウス (Mouse Genome Sequencing Consortium 2002) およびラット (Rat Genome Sequencing Project Consortium 2004) でゲノム解読がほぼ完了した。これは配列の判明というゲノム科学の第一段階に過ぎない。ポストゲノム戦略として、米国立ヒトゲノム解析研究所 (NHGRI, NIH) のエンコード (ENCODE: Encyclopedia of Human DNA Elements) 計画や遺伝子ネットワークの解明を目指した国内外の取り組みから、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームさらにはフェノーム (表現型の総体) という新しい概念が次々に誕生した。ゲノム解読は単因子遺伝性疾患の原因遺伝子の同定を容易にただけでなく、一塩基多型 (SNP: Single Nucleotide Polymorphism) 解析に代表されるようないわゆる “common diseases (生活習慣病に代表される頻度の高い疾患)” の罹患性を規定する概念すら生み出した (Miller と Kwok 2001; Shastri 2002)。いまや高速シーケンサー (パイロシーケンシングなど) や高密度 SNP 連鎖不平衡マッピング (理論上、20 ～ 100 万のタグ SNP について遺伝子型を判定すれば、全ゲノムに存在する 1,000 万種類の一般的な SNP をカバーできる。全人類に対し、1 % 以上の頻度で見られる 1,000 万の一般的な多型が人類の多型の 90 % 以上を占めている) により、個々人の全ゲノムを解析の対象とした多因子疾患 (高血圧、虚血性心疾患、癌、肥満、糖尿病、喘息、精神疾患、偏頭痛、リウマチ様関節炎などの “common diseases” は、複数の遺伝的要因と環境要因の組み合わせが起因となる) 感受性遺伝子の同定やオーダーメイド医療の実現さえ現実味を帯びつつある (Ross ら 2004)。実際は、個々の SNP が疾患に関与する割合が極めて低いことが問題視されている。これを解決する目的で、多型の頻度と相互の関連性をゲ

ノムワイドに解析するための国際的な共同研究体が発足している (The International HapMap Consortium 2003)。一方、欧米の製薬企業は独自にこうした診断ツールの開発を推進している。ゲノム・プロジェクトでは人類共通の 99.9 % の配列解読を目指した。一方、ハップマップ・プロジェクトでは個々人で異なる 0.1 % の配列における共通なパターンの解明を目指している。

トランスクリプトームやプロテオームを構成するのは言うまでもなく遺伝子である。しかし、ゲノムプロジェクト開始当初の予想 (約 10 万個) に反してヒトの遺伝子数は少なく、現在では 2 万から 2 万 5,000 個程度と見積もられている (International Human Genome Sequencing Consortium 2004)。しかしながら、ゲノムプロジェクト以前から、特定の遺伝子座において判明している突然変異の発生率と X 線誘発性突然変異の発生数などから、哺乳類の遺伝子数は最大でも 3 万を超えないであろうと予測されていた。このことからスプライシングによる mRNA の多様性と細胞系譜ごとの時空間的な発現制御、クロマチン高次構造や DNA・ヒストンの修飾によるエピジェネティクス epigenetics、さらには発現後の様々な翻訳後修飾とユビキチンによるタンパク運命の決定が、細胞機能にとっていかに重要であるか今や疑う余地はない。このような生体機能情報の基盤である遺伝子をゲノム配列中で特定する際、完全長 (full-length) cDNA プロジェクトが果たした役割も見逃せない (The FANTOM Consortium and the RIKEN Genome Exploration Research Group Phase I & II

連絡先: 吉田健一、明治大学農学部生命科学科 分子発生学研究室 〒214-8571 神奈川県川崎市多摩区東三田 1-1-1
(e-mail: yoshida@isc.meiji.ac.jp)

Team 2002)。ゲノムと完全長 cDNA あるいは EST (Expressed Sequence Tag) 情報があって始めて遺伝子発現制御領域とコード領域に関する定義がなされ、細胞のダイナミックな機能を理解し記述する上でフレームワークとなるオントロジーが定義されたのである (Camon ら 2003; Fraser と Marcotte 2004)。

本ミニレビューでは、ヒトや実験動物であるマウス・ラット以降解読されつつある動物ゲノム情報による比較ゲノム解析 (O'Brien 1999) が、遺伝子物理地図作製やポジショナル・クローニングへの利用と並んで、機能ゲノム学へいかに応用可能であるかについて述べる。動物細胞 (ここでは哺乳類と鳥類を指す) の維持と増殖にとって根源的な機構である細胞周期を構成する因子が、動物ゲノムでいかに保存されているかが最近の cDNA 解析を含むゲノム情報により明らかとなりつつある。これら動物ゲノム情報を利用することで、これまでは容易に得られなかった遺伝学的解析材料がより簡便に作製される。言い換えれば、個体レベルでなく細胞レベルでのゲノム育種・改良の基本戦略を確立する基盤が揃いつつある。動物細胞における重要な遺伝子機能の解明が、今後さらに進展するであろう動物ゲノム解析により加速する可能性について考察する。

2. 動物ゲノム情報による遺伝子機能の予測

2-1. 細胞周期と DNA 複製開始制御機構

動物ゲノム情報を活用した遺伝子機能予測に関して、本章では細胞周期と DNA 複製開始を制御する遺伝子群を例に考察する。2001 年ノーベル医学・生理学賞は、細胞周期の基礎的メカニズム解明に対しであった。それは 1980 年代に Hartwell (1991) や Nurse (1994) が出芽酵母 (いわゆるパン酵母) *Saccharomyces cerevisiae* や分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の変異株から細胞周期の基本因子を次々と同定した分子遺伝学的解析と、Hunt (1989) によりウニ卵発生で変動するタンパク質としてサイクリン同定を可能とした生化学的解析が合流した成果である。酵母は単細胞生物であるが、真核細胞の代表として実験に頻用されてきた。これは世代時間が短く、ゲノムサイズが小さいため、哺乳動物細胞では考えられない単純さで分子遺伝学的・機能ゲノム学的解析が可能であったためである。この様な潮流に先立つ 1970 年代には、Masui と Markert (1971) による両生類 *Xenopus* での卵成熟の研究から MPF (M 期促進因子) が同定されていた。その後の分子生物学の勃興により、MPF の本体が実は Nurse らが酵母で同定した Cdc2 (CDK1) と Hunt が同定していたサイクリン B と

の複合体であったという事実が解明された。Cdc2 はプロテインキナーゼであり、このリン酸化活性をサイクリンが調節タンパクとして、減数分裂だけでなく体細胞を含むすべての動物細胞の分裂で制御している。

酵母から高等動物に至るまで細胞周期の制御メカニズムは、基本的な部分はよく保存されているが例外もある。細胞周期エンジンのアクセルであるサイクリン/サイクリン依存性キナーゼ (CDK) 複合体には M (Mitosis) 期と S (Synthesis of DNA) 期で機能する分子種がある。酵母では一種類の CDK に異なるサイクリンが結合する結果、M 期と S 期が区別される。一方、ヒトを含む哺乳動物では複数種の CDK が存在する。CDK1 は M 期で、CDK2 は S 期で、さらに G0-G1 移行期では CDK4, 6 が重要な役割を果たす。これら CDK はそれぞれ複合体を形成するサイクリンがある。CDK1 はサイクリン A または B と、CDK2 はサイクリン A または E と、CDK4/6 はサイクリン D と結合する。細胞周期エンジンのブレーキに関しても酵母に対して動物細胞では多くの遺伝子の存在が確認されている。癌抑制遺伝子 p53 の下流に位置し、サイクリン E/CDK2 インヒビターである p21^{Waf1/Cip1} やそのファミリー遺伝子 p27^{Kip1}、サイクリン D/CDK4, 6 インヒビターである p16^{INK4a} や p19^{ARF} など、それらの多くで発現制御あるいは遺伝子そのものの異常が何らかの形で細胞の異常増殖に関与している (Sherr と Roberts 1999)。この様に同じ真核生物であっても、酵母を代表とする単細胞生物と比較すれば、哺乳類などの多細胞生物における細胞周期制御機構の複雑性 (complexity) と重複性 (redundancy) は際立っている。

細胞周期を秩序立てて進行させるのに重要な局面として、G1-S 移行期が注目されている (Bell と Dutta 2002)。特に S 期は DNA が複製される時期であり、S 期でのみ一回限りの複製開始を許諾するライセンシング機構は G1 期に準備される (Chong ら 1996)。サイクリン/CDK 複合体以外で、このような重要なイベントに関与する遺伝子群として ORC (Origin Recognition Complex) 1-6、MCM (Minichromosome Maintenance) 2-7、CDC (Cell Division Cycle) 6、CDT1、Geminin、CDC7、MCM10、TopBP1 および CDC45 などが知られている。これらの G1 期特異的な遺伝子発現は、主として転写因子 E2F ファミリーにより制御されている (Dyson 1998; Yoshida と Inoue 2004a; Yoshida と Inoue 2004b)。転写因子 E2F1-4 は普段、癌抑制遺伝子 pRb (Retinoblastoma Protein) と結合することで不活化されている。しかし、一端サイクリン/CDK 複合体によ

り pRb がリン酸化されると結合を脱し、転写因子としての機能を発揮する (Harbour ら 1999) (図 1)。発現後これら遺伝子群は、染色体に散在するオリジンに秩序正しく結合あるいは接近し、DNA 複製開始のシグナルとなる (図 2)。この結果、細胞周期は制御点を通して再び S 期から G1 期に逆行することはない。このような制御が破綻すれば異常な DNA 複製が惹起され、ゲノムは安定性を失うと共に細胞はアポトーシスあるいは癌化へと至る (Sherr 1996)。

以上述べた重要な遺伝子群の構造について、ヒトとマウス・ラットとの比較がこれまで主であった。動物ゲノム解析の進展により、チンパンジーやイヌ、鳥類であるニワトリとの比較解析が最近可能である。

2-2. 遺伝子コード領域の比較解析

ヒトとマウスの比較ゲノム解析から新たに発見された遺伝子は、マウスゲノム解読時、ヒトで約 1,200 個、マウスで約 9,000 個に達した。哺乳類では 2004 年 7 月、Lindblad-Toh 率いるチームによりイヌ (*Boxer, Canis familiaris*) ゲノムの概要版 (ドラフト) が公開された。ゲノムサイズはヒト・マウスの約 30 億塩基対に対し、約 25 億塩基対であった。ヒトとイヌの配列比較では、全体で 25 % 以上が共通していた。また、現在わかっているヒトの遺伝子約 24,500 個のうち、約 18,500 個 (約 75 %) がイヌにも存在していた。これらヒトとイヌに共通する遺伝子のほとんどがマウスにも存在しており、哺乳類に共通する遺伝子であると考えられる。常染色体数 (2n) はヒト、マウスおよびイヌでそれぞれ、

図 1. 細胞周期 G1-S 移行制御とほぼすべての癌に関与する p53 および pRb 経路との関係。紫外線や放射線、化学薬剤などによる細胞 (DNA) ダメージは、センサーキナーゼ (ATR および ATM) を誘導し、Chk1、Chk2 あるいは p53 をリン酸化する。p53 はリン酸化されると、MDM2 による分解を逃れ細胞内に安定的に存在する。p53 は標的遺伝子 p21 の転写を活性化する。p21 や p16 は細胞周期エンジンのブレーキであり、CDK のキナーゼ活性を抑制する。抑制された CDK は pRb をリン酸化できない。結果、転写因子 E2F は pRb と結合したままとなり、標的遺伝子の転写を活性化できず細胞周期は G1 期に停止する。この間に、細胞は損傷 DNA の修復を実行する。一端、損傷が回復すると CDK により pRb はリン酸化され、E2F は標的遺伝子の転写を活性化する。標的遺伝子には細胞周期 S 期進行に必須の DNA 複製開始因子群などが含まれる。修復が果たされない程の強い DNA ダメージを細胞が受けた場合、p53 はアポトーシス関連遺伝子の転写を増強させ、細胞死へと至る。

図 2. 細胞周期 G1-S 移行期での染色体オリジンにおける DNA 複製開始および制御因子。ORC1-6 がまずオリジンに結合し、CDT1 と CDC6 が MCM2-7 のクロマチン・ローディングを促進する。MCM2-7 によりオリジン二本鎖 DNA は一本鎖となる。Geminin は M-G1 期以外で、CDT1 に結合することで、CDT1 の機能を阻害する。MCM10 と TopBP1 は、それぞれ別経路で CDC45 のオリジン会合を助ける。CDC45 は DNA ポリメラーゼのローディング促進因子である。細胞周期特異的サイクリン・CDK および CDC7 はキナーゼ活性で、DNA 複製開始および制御因子をリン酸化する。MCM8 は MCM2-7 と直接複合体を形成するという報告と、ORC2 や CDC6 と複製前複合体を形成し MCM2-7 とは直接結合しないという異なる 2 つの報告がある。

22、38 および 36 と異なるが、染色体間の構造類似性（シンテニー）は保存されている。イヌでは 400 以上の遺伝病が知られており、ヒト以外では全ての動物中で最も多い（OMIA, NCBI, NIH）。ヒトの疾患の殆どは、イヌにそれに対応する病気がある。突然深い眠りに陥るナルコレプシー Narcolepsy と呼ばれる睡眠異常のイヌモデルがその一例である。また、イヌはげっ歯類より体の大きさ、生活ぶりや寿命もヒトに近い。詳細な

イヌゲノムが解読されれば、マウスの時と同様に遺伝子の探索が加速されるだろう。一方、家畜ではニワトリに関して EST が集積されていた。しかし、公開されてはいなかった（Abdrakhmanov ら 2000； Boardman ら 2002）。2004 年 11 月、ニワトリゲノム解析により約 10 億塩基対の DNA 情報を含むドラフトが公開された（International Chicken Genome Sequencing Consortium 2004）。同時に、大量の EST および 2,000 個以上の完

表 1. 細胞周期および DNA 複製開始を制御する主用な遺伝子群のヒト・マウス・ラット・イヌ・ニワトリ間におけるアミノ酸相同性比較。
ヒトを 100 とした相対値で表示 (%)。ND は同定されていない遺伝子。右側にヒトのアミノ酸長 (aa) を表示。

	Human	Mouse	Rat	Dog	Chicken	
Cyclin A1	100	84	84	88	69	465
Cyclin A2	100	89	89	91	71	432
Cyclin B2	100	89	90	93	71	398
Cyclin D1	100	94	93	94	87	295
Cyclin E1	100	79	77	83	75	410
CDK4	100	88	88	97	ND	303
CDK6	100	96	97	97	91	326
p27Kip1	100	88	87	90	69	198
pRb	100	90	89	93	76	928
E2F1	100	86	86	93	64	437
ORC1	100	69	71	84	55	861
ORC2	100	79	78	92	69	577
ORC3	100	80	82	89	67	712
ORC4	100	90	90	94	75	436
ORC5	100	94	89	ND	84	435
ORC6	100	78	74	87	57	252
MCM2	100	96	96	94	90	904
MCM3	100	94	94	97	83	808
MCM4	100	95	95	94	90	863
MCM5	100	95	95	ND	88	734
MCM6	100	96	96	98	88	821
MCM7	100	93	94	96	ND	719
MCM8	100	90	90	93	79	840
MCM10	100	78	77	83	71	874
CDC6	100	81	81	89	ND	560
CDC7	100	81	81	90	68	574
CDC45	100	92	91	90	82	566
TopBP1	100	77	77	91	68	1435
CDT1	100	76	75	71	53	546
Gemini	100	79	77	78	55	209
ND, not determined					(%)	(aa)

全長 cDNA 配列の報告が相次いだ (Hubbard ら 2004; Caldwell ら 2005)。

DNA複製開始を制御する遺伝子群は、多くの動物でも普遍的であろうと考えられている。しかしながら、これまでヒトとマウス・ラットでの実験的比較解析が主であり、他種のオーソログ (ortholog: 進化上保存されている遺伝子セット) について詳細は不明であった。ヒト・マウス・ラット・イヌおよびニワトリを含む動物間について、Blast algorism (Altschul ら 1997; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; HomoloGene) により遺伝子コード領域を比較解析した。結果、DNA複製開始因子を含む30個の細胞周期調節遺伝子で極めて高いアミノ酸レベルでの相同性が認められた(表1)。これらの遺伝子において、相同性の平均はヒトを100とした場合、マウス86.5、ラット86.1、イヌ90.3、ニワトリ

73.9であった。ORC 遺伝子群 (ORC1-6) と比較して MCM ヘリケースファミリー (MCM2-7) はより高い種間の相同性を見せた。これは ORC が認識するオリジン配列は、酵母で同定されている複製開始点と比べ、高等動物では配列の特異性が低いブロードな領域であるためであろう。一方、染色体オリジン近傍で ATP 依存的な DNA 二本鎖巻き戻しに関与する MCM ヘリケースファミリーでは、高い特異性、即ち立体構造の保存が要求されると考えられる。新しい MCM ヘリケースファミリー遺伝子として最近同定された MCM8 は、複製前複合体に参加すると報告されている (Maiorano ら 2005; Volkening と Hoffmann 2005)。実際、種間のアミノ酸相同性比較でも他の MCM 同様、コード領域全域にわたって高い相同性を示した (図 3)。一部アミノ酸が明らかなウシ MCM8 (XM 597511) およ

図 3. ClustalW によるヒト・イヌ・マウス・ラット・ニワトリ MCM8 のアミノ酸アラインメント。
種間で保存されたアミノ酸部位を下段に示す (*)。下線部は、MCM ファミリー 2-7 で保存された MCM2/3/5
family domain を示す。

びXM_584128)とヒトMCM8との相同性は89%(113-292アミノ酸)および95%(409-840アミノ酸)に達した。一方、免疫系に重要な遺伝子の内、インターロイキンIL-6、10、12 β および17について同様の解析を実施した結果、ヒトを100とした場合、マウス61.0、ラット61.3、イヌ71.3、ニワトリ44.8であった。また、これら4つのヒト遺伝子の平均遺伝子コード長は220アミノ酸であった。インターロイキン受容体遺伝子でも、インターロイキンと同様の結果であった。平均遺伝子コード領域がインターロイキンより2倍以上長いにも関わらず、細胞周期調節遺伝子群(ヒト遺伝子で平均遺伝子コード長は597アミノ酸)が種間を超えて見せる高い相同性は、これら遺伝子群が細胞機能にとっていかに重要であることを示す。このような複数の動物間において、多くの遺伝子の相同性比較が可能になったのは動物ゲノム解析の成果である。これら以外にも、内分泌系を制御するホルモンおよびその受容体、細胞内シグナル伝達系を構成するキナーゼなど、動物間での相同性は極めて高い。

米国立ヒトゲノム解析研究所は2004年8月、ゾウやオランウータンなどの貴重な動物を含む、さらに18の生物のゲノム解析を推進すると発表している。近い将来、解析が進行しているウシ、ブタ、ヒツジやネコの配列情報と併せて、精度の高い比較ゲノム解析が可能となろう。これにより、さらに多角的なアミノ酸比較解析が可能となり、遺伝子の保存性から機能の重要性を類推できるようになろう。

2-3. 発現制御領域の比較解析

動物ゲノム情報で遺伝子コード領域のみならず、発現調節領域の解析からも遺伝子機能の保存性と重要性が検証可能である。実際、ヒトとマウスではゲノムのイントロン領域でも約2.5%が共通している。各遺伝子の機能を調整するうえで何か重要な役割を担っている可能性が高い領域である。他方、複数種ゲノムの比較解析ではこのような共通した領域のみならず、種間の多様性を生み出すような特徴的な配列の同定も期待される。具体例として、智の遺伝子探索と嗅覚に関する遺伝子について以下に紹介する。

ヒトとチンパンジーのゲノムを比較することで、ヒトがヒトであるための智の遺伝子領域を探索しようというGEMINIプロジェクト(GSC, RIKEN)が進行している。高度に発達した認知機能、直立歩行、複雑な言語の使用などの、人間に特異的な能力獲得に関係した遺伝的変異は何であるかを解明するためには、ヒトと

チンパンジーのゲノムの比較が不可欠である。22番染色体比較の結果、ヒトとチンパンジーの間には、1.44%の一塩基置換と約68,000カ所における塩基の挿入や欠損が存在した(The International Chimpanzee Chromosome 22 Consortium 2004)。比較した遺伝子(231個)のうち、83%の遺伝子でアミノ酸配列が異なっていた。挿入や欠損の頻度やこれらが生じている領域の広さは従来予想以上に大きかった。22番染色体は、チンパンジーゲノム全体のわずか1%に過ぎない。したがってゲノム全体で言えば、ヒトとチンパンジーで有意差のある遺伝子の数は数千個に達する可能性すらある。ゴリラなど、他の大型類人猿のゲノム配列との比較が待たれる。アミノ酸コードの差異が、実際、タンパク質レベルでどれくらい細胞機能に影響するかは今後の重要な課題であろう。さらに、ゲノムの比較解析から、遺伝子が発現するタイミングと発現量を規定する配列の同定も重要である。実際、ヒトとチンパンジーで比較された遺伝子の約20%において、発現パターンに有意差が見られた。ヒトとチンパンジーが500万年前に共通の祖先から分かれて以来、双方の遺伝情報に起きた変化、特にゲノムに取り込まれたレトロトランスポゾン(ゲノム中に多数存在する、数百塩基程度を単位とする繰り返し配列)が遺伝子発現に及ぼす影響も無視できないだろう。セセラ社(Celera Genomics)が短期間でヒトゲノム解読を達成した全ゲノムショットガン(WGS)方式(Venterら1996)では、このような繰り返し配列(従来はjunk DNAと称されていた)は見落とされがちであった。

2004年度ノーベル医学・生理学賞が、匂い受容体遺伝子(嗅覚受容体: olfactory (odorant) receptor)の発見と嗅覚メカニズムを解明したコロンビア大学のDr. Richard Axelとフレッド・ハッチントン癌研究所のDr. Linda Buckに贈られたのは記憶に新しい(BuckとAxel 1991)。嗅覚受容体は7回膜貫通型に特徴付けられる最大の遺伝子ファミリーで、特異的な転写制御がある。また、匂い識別以外にも軸索投射にも関わっているという知見だけでも、基礎生物学的には非常に魅力的である。嗅覚は人間でこそ退化しているが、他の生物では一番重要な感覚であり、この仕組みの全貌を解明することは、生物そのものを理解することにつながるといっても過言ではない。ヒトゲノムプロジェクトの結果、ヒト匂い受容体遺伝子は約1,000個あることが明らかにされた。しかし、多くは機能していない偽遺伝子(pseudogene)であり、実際は約350個と推定されている。このような機能遺伝子の同定には、他の動物ゲ

ノムとの比較解析 (特にエクソン・イントロン構造の比較による intron-less paralog の確認) が重要な役割を果たした (Zozulya ら 2001)。興味深い事に、嗅覚があまりよくないといわれるニワトリのゲノムにも、匂い受容体遺伝子が約 200 個存在した。一方、イヌやマウスは、ヒトやニワトリより鋭い嗅覚を有するものの、遺伝子数にさほど差はない。生理学的な差異を理解するためには、アミノ酸コード情報だけでなく、遺伝子発現領域を含めたゲノム構造の比較解析が重要であろう。嗅覚系における“1 匂いセンサー (嗅細胞)、1 受容体”ルールが保証されるためには、それぞれの細胞において、正の制御 DNA 領域による匂い受容体遺伝子の活性化と共に、活性化された匂い受容体遺伝子による残りすべての匂い受容体遺伝子活性抑制のメカニズム (negative feedback) を理解する必要がある。これはホルモンとその受容体による内分泌系の制御でも同様である。動物間での体格の違いや、種に特徴的な生理・薬理反応を理解するには、遺伝子発現のオンとオフを制御する cis 配列の同定が遺伝子コード領域同定後の急務である。将来的にはプロテオミクス解析によ

り、cis 配列に結合する trans 因子の同定とそれらが構成する転写因子複合体の全容解明が必要であろう。この様に、アミノ酸コード領域のみならず、遺伝子発現調節領域の比較解析が動物種間格差を理解する上で今後益々重要であろう。

ヒト・マウス・ラット・イヌおよびニワトリの MCM8 全長 cDNA あるいは遺伝子コード領域で Blast 検索し、MCM8 ゲノム中のプロモーターと予測される配列を比較解析した。それぞれのコンティグ contig あるいは BAC クローンの GenBank Accession Number は、ヒト (AL035461)、マウス (AL929562)、ラット (NW_047658)、イヌ (NW_139896)、ニワトリ (NW_060324) である。いくつかの動物において、MCM8 の転写開始点は決定されていない。そこで翻訳開始コドン ATG を含む現時点でエクソン 1 と考えられる周辺領域の配列を、転写因子結合予測ソフトウェア TRANSFAC (Knuppel ら 1994) で解析した (図 4)。結果、ヒト・マウス・ラットおよびイヌで、転写因子 E2F 結合配列 (consensus; 5'-TTTCGCGC-3') と CCAAT 配列が予測された。CCAAT 配列結合因子の一

図 4. ヒト・マウス・ラット・イヌ・ニワトリ MCM8 の予想されるプロモーター領域。転写因子 E2F および NF-Y (CCAAT 配列) 結合部位と TRANSFAC スコア (最大値 100 に対する相対値) を下段に表示。それぞれの染色体上の位置と、MCM8 遺伝子の近傍で逆向きに位置する CGI-09 遺伝子を図示。ラット・イヌおよびニワトリでは、翻訳開始コドン ATG が暫定的な転写開始点である。

つとして転写因子 NF-Y がある。NF-Y は MHC 主要組織適合性遺伝子複合体クラス II の発現に必須な因子として知られている (Boss 1997)。また、NF-Y は高等動物で様々な遺伝子の発現調節に関与する。しかし、転写因子 E2F と比較して、細胞周期 G1-S 移行に重要ではない。一方で、転写活性化に働く E2F1-3 が、NF-Y の結合した CCAAT 配列を介して、G2/M 特異的な遺伝子発現を制御すると報告されている (Zhu 2004)。ニワトリでは CCAAT 配列を確認できず、一方で E2F 結合配列は存在した。ヒトと鳥類は約 3 億 1,000 万年前に共通の祖先から分かれたと考えられている。哺乳類、鳥類を問わず、MCM8 のプロモーター予想領域に E2F 結合配列が保存されている事実は、E2F による MCM8 発現制御が特に G1-S 移行期において普遍的に重要である事を示唆する。これら *in silico* 情報は、将来リポーターアッセイなどで検証されなければならない。しかし、このような動物ゲノムの比較解析から、MCM8 が他の MCM2-7 同様、G1-S 移行期で DNA 複製開始制御に関与していると予想できる。G1-S 移行期以外でも、細胞周期では G2/M 期に発現上昇を示す重要な遺伝子群が同定されている。この様な遺伝子プロモーターでは、CDE/CHR (cell-cycle-dependent element/cell cycle gene homology region) と称される配列が種間を超えて保存されている (Yoshida 2005a)。このように、アミノ酸レベルでの高い保存性だけでなく、発現制御領域の配列比較解析からも遺伝子機能は推測でき、細胞内での遺伝子機能同定へ向けたその後の実験デザインを容易にする。

上述した様なアプローチをヒト、マウス、ラットおよびイヌの全ゲノムに対し比較解析した結果が報告されている (Xie ら 2005)。種間において保存されたプロモーター配列から、174 個のモチーフが同定された。注目すべきことに、プロモーター領域のみならず 3' 非翻訳領域 (3'-UTR) でも 106 個のモチーフが同定された。この領域を介したマイクロ RNA (miRNA; non-coding RNA の一部) による転写後発現調節 (翻訳阻害) は、ヒト遺伝子の約 20 % に及ぶと推察される。miRNA は一般に 19-23 塩基の短い非コード RNA であり、標的 mRNA の 3'-UTR に結合する。miRNA と並んで、RNAi (RNA 干渉: RNA interference) に関与する siRNA (small interfering RNA) が注目されている (Sontheimer 2005; Matzke と Birchler 2005)。特に 2001 年、マックスプランク研究所の Dr. Tuschl が HeLa などのヒト細胞で、21 塩基の二本鎖 siRNA により標的遺伝子の発現抑制に成功して以来、RNAi は分子生物

学実験に欠かせない手技となった (Elbashir ら 2005)。miRNA が内在遺伝子の発現調節のための抑制システムであるのに対し、siRNA は外来遺伝子に対応するための抑制システムである。例えば、ウイルスが細胞のタンパク質製造装置を乗っ取ってウイルス自身のタンパク質を作り出そうとするときなどに siRNA は始動する。最近、このような small RNA world に新しい役者が加わった。smRNA (small modulatory RNA) と名付けられた新しいクラスの small RNA は二本鎖を形成し、タンパク質と相互作用 (転写因子が本来結合する DNA と拮抗) することで、これまで知られている siRNA や miRNA (翻訳レベルでの遺伝子発現制御) と異なり、転写レベルで遺伝子発現を制御する (Kuwabara ら 2004)。

以下に miRNA と siRNA との生成過程を簡単に紹介する。miRNA は 1,000 塩基程度の長い RNA の一部として転写される。まず核内で二本鎖 RNA に特異的なリボヌクレアーゼ Drosha によって、70 ~ 100 塩基のヘアピン RNA に分解される。このヘアピン RNA は transportin-5 を介して細胞質に移動し、二本鎖 RNA 特異的リボヌクレアーゼ Dicer によって切断される。この切断によりできた 19 ~ 23 塩基の miRNA は、RNAi に関与している RISC (RNA-Induced Silencing Complex) に類似した複合体に結合する。動物の場合、複合体に結合した一本鎖 miRNA が、mRNA に結合する。miRNA は mRNA に対して完全一致ではなく部分的に相補的な配列になっている。即ち、miRNA の 5' 端と、適切な長さの、対形成していない塩基の中間部に位置するミスマッチやポリヌクレオチドのバルジ (膨らみ) の間にみられる相同性が、遺伝子サイレンシングの程度に影響を及ぼす最重要因子であると言われる (Kiriakidou ら 2004)。このような miRNA とその認識部位 (MRE) との部分的な配列一致の許諾は、まさにプロモーター配列に対する転写因子の結合性と同じである。いずれにしても、既知 miRNA の多くの標的は同定されておらず、標的の選択と標的との結合に関する規則性も多くは不明である。一方、RNAi では細胞に取り込まれた長い二本鎖 RNA (dsRNA) が、細胞内で Dicer により短い 21 ~ 25 塩基の siRNA に切断される。siRNA は RISC を構成しているタンパク質と共に、RISC に取り込まれ、取り込まれた二本鎖 siRNA はほどこけて一本鎖となる。活性化された RISC は、siRNA のアンチセンス鎖と mRNA 間の塩基対相互作用により、完全に相補的な転写物に結合する。RISC が結合した mRNA は切断され、配列特異的な mRNA の分解

により、ジーンサイレンシング(遺伝子の発現抑制)が起こる。つまり、miRNAはRNAiのようにmRNAの分解には関与せず、miRNAが結合したmRNAは翻訳されないままであるため、対応する遺伝子の発現量が低下する。線虫 *Caenorhabditis elegans* において lin-4、let-7 と称される最初の miRNA が発生のタイミングを制御すると報告された (Pasquinelli と Ruvkun 2002)。その後、数百種類の miRNA が線虫、ショウジョウバエ *Drosophila*、マウス、ヒト (200-250 個と概算されている) で確認されている。miRNA レベルは組織間と発生過程で違っている。また、いくつかの miRNA が、初期発生 (Reinhart ら 2000)、細胞増殖と細胞死 (Brennecke ら 2003)、アポトーシスと脂肪代謝 (Xu ら 2003) を含む様々なプロセスに影響することが報告されている。さらに、miRNA と癌の関連も報告されている (Calin ら 2002)。動物細胞における遺伝子発現を制御する転写因子のように、miRNA も生物種間で保存され重要であると推測される。

以上より、動物ゲノムの比較解析から浮き彫りにされる配列相同性や特異性は、遺伝子の時空間的な発現制御に関する情報をもたらす、遺伝子機能を解析する上で不可欠である。しかしながら、個々の遺伝子・遺伝子産物の機能を調節している機構の数は多い。例えば、クロマチン構造の開放の程度とそれに伴う転写活性は、ヒストンと DNA の酵素的な修飾に関与する蛋白質複合体によって制御されている。このような事象は、cis 配列の同定やゲノム比較解析だけでは到底理解できない。次章では、動物ゲノム情報から遺伝子機能を理解するための細胞アッセイ系構築について述べる。

3. 遺伝子破壊による動物細胞での機能解析

3-1. 背景

家畜ゲノム解析は、有用遺伝子を探索するのが主目的である。ウシやブタ、ニワトリなどでは、ヒト、マウスなどのゲノム解析が進んでいる生物との比較地図作製へ向けた研究が取り組まれてきた (Edwards 1994; Womack と Kata 1995)。家畜個体において、ある形質に関連する遺伝領域を調べる方法として、連鎖解析 (質的な形質) や QTL (quantitative trait loci) 解析 (量的な形質) がある。これらを利用して、ウシなどで数々の遺伝疾患関連領域や有用形質関連領域が発見されている (Rocha ら 2002; Grisart ら 2002)。最終的には原因遺伝子が同定され、塩基配列やアミノ酸配列から遺伝子の機能を推測し、実際の形質への関わりが解明される。このような代表例として、Belgian Blue と

Piedmontese 家系のダブルマッスル (double-muscling) 責任遺伝子同定が挙げられる。同定された遺伝子は TGF β スーパーファミリーに属する Myostatin と命名された分泌タンパクで、Belgian Blue では C 末端の 11 bp 欠損によるフレームシフトが機能ドメインの欠損を招いた。Piedmontese でも Belgian Blue 変異が検出された同領域内に存在するシステインのチロシン変換が筋肉過形成を引き起こした (Grobet ら 1997; Kambadur ら 1997; McPherron と Lee 1997)。

このような解析手法 (Forward Genetics) に対して、遺伝子情報から個体での表現型を直接解明しようとする Reverse Genetics がある。現状でこのような遺伝子機能の解析法はノックアウトマウス作製である (Yoshida ら 2001)。実際、Myostatin の生物学的な意義の解明でも、遺伝子同定後のノックアウトマウス作製による機能解析が果たした役割は大きい (McPherron と Lee 2002)。今日では動物ゲノム情報の解析から新規遺伝子を発見し、バイオインフォマティクス Bioinformatics でおおよその機能予測が可能である。それは既存の遺伝子あるいは種間との相同性、または何らかのモチーフ構造を Blastp、PROSITE あるいは Pfam などのアルゴリズムで *in silico* 解析することから始まる (Yoshida 2005b)。さらに創薬のターゲットになるかなどを検証するには、発見した遺伝子について生細胞レベルでの機能解析が必須である。このようなニーズがノックアウトマウス作製を含めた Reverse Genetics の原動力となってきた。疾病に関わる遺伝子では、その約 90 % がヒトとマウスで同じであり、マウスの実験動物としての価値は依然大きい (Smithies 1993)。遺伝子機能の解析は、ノックアウトマウス作製に頼るのが現状である。しかし、研究に使用されるマウスの数は、年間 2,500 万匹以上にのぼると見られ、倫理的な問題も提起されている。マウス胚性幹 (ES: Embryonic Stem) 細胞における標的遺伝子の遺伝子破壊後、マウス個体でのヘテロおよびホモマウス作製に要する時間は長く、維持に要するコスト面でも効率が悪い。生体機能に重要な遺伝子をマウスで破壊し、それらから初代細胞を得ることで化合物のスクリーニングに使用する試みもある。しかし、個体由来の初代培養細胞はいろいろな系列の細胞が混在している上に、増殖能が限られているので、細胞内の現象を解析することが困難である。

マウスの代替モデルとして、魚が注目されている。脊椎動物の主要な系統はいずれも魚型の動物であり、その一つがヒトを含む四肢動物となっている。今から 4 億 5,000 万年前の古生代に生きていた、ヒトと魚類

に共通する祖先のゲノムの構造が解明された。フグの一種であるミドリフグ (*Tetraodon nigroviridis*) の遺伝子マップ作製とヒトとの比較ゲノム解析から、新たに900個近くのヒト遺伝子が明らかとなった (Jaillon ら 2004)。ミドリフグのゲノムサイズは知られている脊椎動物中、最も小さく約3億塩基対である。いわゆるジャンクDNAが少なく、ヒト遺伝子の大半に対応するものが、ミドリフグゲノムには2つずつ存在する。このような全ゲノム重複は魚の特徴であり、そのことが進化に有利に作用してきたと言えよう。さらに、小型硬骨魚類であるゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) やメダカ (*Oryzias latipes*) のゲノム解読も21世紀に入り急速に進行している。これらは、大量の個体数を比較的容易に維持できるため、大規模突然変異作成の系として優れている。また、マウスではできない大規模スクリーニングが可能で、開発した薬剤の影響も容易に発生段階の遺伝子発現パターンを指標として観察できる。ゲノム情報を活用した新しい薬剤開発系と言える。特にメダカは、ゲノムサイズが小さい (ヒトの1/4、ゼブラフィッシュの1/2)、多型に富む近交系が存在する、性染色体が確定している、温度感受性変異体の単離が容易であるなどのメリットがある。変異体の中には、メダカに特有なものからヒト疾患モデルとなるものまで多様である。また、メダカは環境変異原・内分泌攪乱物質のモニターとして有効である。メダカにおける変異体作製は、変異誘発剤がゲノムへのトランスポゾン挿入によるランダムミュータジェネシスによる。そして、形態変化を生ずるような変異体について、破壊された遺伝子を同定する。従って、目的の遺伝子機能をピンポイントで解析するには問題がある。また、必ずしもすべての研究室で汎用できるモデル動物ではない。

遺伝子産物の機能解析をどのように行うかは、従来の生化学解析による再構成実験や、単離した遺伝子を細胞に導入し発現させるのが一般的である。しかし、多くの種類の遺伝子とそれらが関与する生化学反応の解析はしばしば困難である。また、トランスジーンの強発現では、生理反応以上の効果 (pleiotropic effect) を検出してしまう可能性がある。これらの欠点を補完するアッセイ法として、標的遺伝子産物のみを阻害するインヒビターや中和抗体が考えられるがこれとて万能ではない。最近では、動物細胞でも前述したRNA干渉による簡便なノックダウンが主流となりつつある。しかし、抗ウイルス応答 (インターフェロン様反応) の惹起や非特異的な抑制、さらには抑制効果の程度を制

御できないなど、未だ解決すべき問題は多い (Huppi ら 2005)。これに対して、体細胞を直接の出発材料とし、内在性遺伝子をゲノムレベルで改変することで遺伝子機能を解析するメリットは計り知れない。様々な実験手法の問題点を解決する手法として、体細胞を出発材料とした標的相同組み換えによる遺伝子破壊法を紹介する。最近、動物ゲノム情報を有効に利用することで、マウスES細胞以外の株化された体細胞で遺伝子破壊が実施されている。特にニワトリ DT40 細胞とヒト体細胞を用いた取り組みについて現状を紹介する。

3-2. ニワトリ DT40 細胞

ニワトリ B リンパ球由来 DT40 細胞 は、Avian leukosis virus (ALV) 感染により樹立されたニワトリ B 細胞腫 (Baba ら 1985) で細胞バンクから入手可能である (RCB1464, RIKEN)。ニワトリ DT40 細胞で遺伝子破壊を企図する際、従来はマウスでのノックアウトマウス作製がそうであったように標的とする遺伝子近傍のゲノム配列情報が必要であった。これはゲノムライブラリーのスクリーニングと塩基配列決定といった面倒なプロセスを意味する。しかし最近、ニワトリゲノムおよびcDNA情報が急増しこの問題は解決されつつある。

標的組み換えは、導入したDNAコンストラクトがそれと相同な塩基配列を持った染色体DNAとの間で相同組み換えすることによって起こる。この原理はノックアウトマウス作製におけるマウスES細胞での相同組み換えと同様である (Smithies ら 1985; Mansour ら 1988)。マウスES細胞での相同組み換え効率は、組み換え標的部位の構造に依存し、約5%前後と言われる。ニワトリ DT40 細胞を使用するメリットとして、このような組み換え効率が高い事があげられる (Buerstedde と Takeda 1991; Arakawa H と Buerstedde 2004)。それ以外でも細胞の生存に必須である遺伝子をノックアウトする際は、レスキューシステムにより遺伝子発現のオン・オフが可能 (Wang ら 1996)、Cre-LoxP システムによるマーカーリサイクルとコンディショナル・ノックアウトが可能 (Arakawa ら 2001)、ネオマイシン (G418) やハイグロマイシン、ピューロマイシンなどの薬剤耐性マーカーの組み合わせにより同一細胞内で複数個の遺伝子を破壊可能、などが挙げられる。これらに加えて、変異遺伝子を有する DT40 細胞がカタログ化され Web (<http://pheasant.gsf.de/DEPARTMENT/dt40.html>) 上で検索できる (Buerstedde

ら 2002)。また、トランスクリプトーム解析が進み DT40 細胞による多角的な機能解析が見込める (Wahl ら 2004) など、枚挙にいとまがない。

欠点として、DT40 細胞はアウトブレッドのニワトリ由来なので対立遺伝子間で多くの多型が存在する。したがって、ノックアウトコンストラクト DNA と染色体 DNA との間のミスマッチで標的組み換え効率が大きく低下する可能性がある。これはヘテロ接合体 (+/-) 細胞の (+) アレルより再度ノックアウトコンストラクト DNA を作成し直す必要が生ずることを意味する。しかし、この欠点も最近明らかにされた 280 万ヶ所にも及ぶニワトリ 3 系統 (食肉用のブロイラー、食卵用のレイヤー、ウコッケイ) と原種 (キジ目キジ科) である赤色野鶏 (Red Jungle Fowl, *Gallus gallus*) との SNP 情報を活用する事で解決されるだろう (International Chicken Polymorphism Map Consortium 2004)。

ニワトリでは、遺伝子の機能解析に有用な DT40 細胞の開発と実験的困難さを軽減させるに足るゲノム情報の充実が相乗効果を示した好例である。歴史的に見ても、ニワトリは胚成長モデルとして発生生物学で重用されてきた。DT40 細胞における遺伝子破壊株のカタログ化も徐々に進行しており、ポストゲノム解析における遺伝子機能解明へ向けた一つのモデルを提示している (Brown ら 2003)。

3-3. ヒト体細胞

マウスを用いた遺伝学的解析は近交系で行われている。ノックアウトマウス作製では主に 129Sv 由来 ES 細胞が用いられ、この際全く同一の (isogenic) DNA を用いることが標的相同組み換え成功の鍵と言われる (te Riele ら 1992)。ノックアウトマウスの代替として、ヒト細胞での遺伝子破壊法は重要である。特に個体での初期発生といった生理機能ではなく、細胞周期など細胞増殖の根幹を成すようなメカニズムの解析にはヒト細胞が最適である (Brown ら 1997)。しかし、ヒトは実験動物と異なりヘテロな集団である。約 500-1,000 bp に一ヶ所の多型が存在する (Wang ら 1998)。

ヒト体細胞での標的相同組み換えを目指した研究は、約 10 年前に始まった。予想に反して不死化されていない繊維芽細胞を始め、多くの癌由来細胞で non-isogenic DNA でも標的相同組み換えが成功している (Hanson と Sedivy 1995)。癌抑制遺伝子 p53 では、異なる 4 種類のヒト細胞で G418 をクローン選択に使用した標的相同組み換え実験が行われた。その効率 (相

同組み換え体 / G418 耐性非相同組み換え体) は、ヒト大腸癌細胞 HCT116 (1/600)、ヒトリンパ芽球 TK6 (1/120)、ヒト胚由来皮膚繊維芽細胞 LL1 (1/87)、ヒト胚由来肺繊維芽細胞 LF1 (4/33) であった (Bunz ら 1998; Sedivy ら 1999)。p53 の標的遺伝子である p21^{Waf1/Cip1} では、HCT116 (37/100)、LF1 (3/20)、ヒト大腸癌細胞 DLD-1 (5/157) であった。G418 選択によるヘテロ細胞同定後、ハイグロマイシン選択下での同一ベクター DNA による (+) アレルの相同組み換えでもほぼ一致した組み換え効率が得られた (Waldman ら 1995; Polyak ら 1996; Brown ら 1997)。HCT116 細胞ではミスマッチ修復系が欠損しており、それが isogenic DNA を要求しないのではという理由から初期の実験に多用された。しかし、現在では多くのヒト細胞で isogenic DNA を要求しない事実が確認されている。HCT116 細胞は ATCC (CCL-247) から入手可能である。

p53 下流に位置する p21^{Waf1/Cip1} の細胞内機能解析を巡っては、Leder 研究室 (Harvard Medical School) によるノックアウトマウス作製 (Deng ら 1995) と、Vogelstein 研究室 (Johns Hopkins University) での HCT116 細胞における遺伝子破壊株 (Waldman ら 1995) の作製競争が演じられた。その後も HCT116 細胞を用い、14-3-3 σ (Chan ら 1994)、Securin (Jallepalli ら 2001)、DNA methyltransferase (Rhee ら 2002)、 β カテニン (Chan ら 2002)、CDC4 (Rajagopalan ら 2004) を始めとした重要な遺伝子がノックアウトされ、細胞周期やゲノム安定性、シグナル伝達機構の詳細なメカニズム解明に貢献している。以上から、ヒト体細胞での遺伝子破壊は十分実験ベースにかなう。我々は、HCT116 細胞において、DNA 複製開始因子である ORC2、Geminin および MCM7 の機能ドメインを含むエクソンのみを相同組み換えにより破壊する事に成功した (図 5)。相同組み換え効率を高めるため、薬剤選択マーカーであるネオマイシン耐性遺伝子にはプロモーターを与えず、標的遺伝子部位に正確に組み込まれた時にのみ発現させる工夫を加えた (プロモーター選択)。通常、HCT116 細胞は G418 濃度 400 μ g/ml で一週間培養すると死滅する。ネオマイシン耐性遺伝子が非相同領域にランダムに組み込まれた細胞でも、偶然に近傍のプロモーターで G418 耐性となる場合がある。しかし、G418 濃度を 1,000 ~ 5,000 μ g/ml にすることで、多くの非相同組み換え体は死滅し、相同組み換え体同定の効率は上昇した。この様な技術的改良の結果、ヒト体細胞での遺伝子破壊効率はニワトリ DT40 細胞とならば遜色がな

図5. ドメイン・ノックアウト HCT116 細胞作製のフロー・チャート。
標的ヒト遺伝子の機能ドメイン(灰色で表示)を相同組み換えにより、ターゲティング・ベクターと置換する(+/-)。(-)アレルより発現されるタンパクは、ドメインより前のN末端領域とネオマイシン耐性遺伝子(Neo)との融合タンパクである。次に、Cre リコンビナーゼにより LoxP 配列で挟まれたネオマイシン(Neo)と poly(A)を取り除く。バクテリオファージ P1 由来の配列特異的組換え酵素 Cre は特異的組換え配列 LoxP を認識する。LoxP 配列は 34bp と長いので、偶然この配列と一致した配列がゲノムに存在することは無い。一個の LoxP 配列はゲノム上に残るが、LoxP 前後でタンパクの読み枠は合致する (+/LoxP)。従って、(LoxP) アレルより発現するタンパクはドメイン領域のみ失ったタンパクである。2 回目の相同組み換えで、残った正常アレルをノックアウトする。この結果、片方のアレルのみから変異タンパクが産生される。変異タンパクは、ドメイン領域以外は正常タンパクと変わらない。野生型 (+/+) 細胞と変異細胞 (-/LoxP) を比較解析することで、標的遺伝子の機能ドメインに関する情報が得られる。

図6. Geminin のユビキチンリガー APC/C 認識配列 destruction box ノックアウト HCT116 細胞における細胞周期異常。野生型細胞 (+/+) (a, c) と変異細胞 (-/LoxP; b, d) をヌードマウス皮下に移植後 (4 週間)、ヘマトキシリン・エオジン染色 (H&E; a, b) および細胞増殖マーカー Ki-67 による免疫組織染色 (c, d) を施し鏡検 (400 倍)。+/+ 細胞で明瞭に観察された細胞分裂像 (a で白矢印、c で黒矢印) は、-/LoxP 細胞で有意に減少した。

い。変異細胞株を用いた一連の解析から、DNA 複製開始因子による細胞周期 G1-S 移行のメカニズムと癌化との関連を解明した (Dhar と Yoshida ら 2001; Yoshida と Inoue 2003; Yoshida ら 2004)。Geminin のユビキチンリガーゼ APC/C (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome) 認識部位である破壊ボックス Destruction box を相同組み換えでノックアウトした細胞 (−/LoxP) では、野生型細胞で明瞭に確認された細胞分裂像が減少した (図 6)。ユビキチン・プロテアソーム経路では、ユビキチン活性化酵素、ユビキチン結合酵素、ユビキチンリガーゼにより、76 個のアミノ酸よりなるユビキチンが基質タンパク質のリジン残基に共有結合される。反応は繰り返され、基質はマルチユビキチン化される (モノユビキチン化の場合もある)。ユビキチン化されたタンパク質は 26S プロテアソームにより特異的に認識され、分解される。ユビキチンリガーゼは、どのタンパク質をいつ、どこでユビキチン化し、いかにプロテアソームに搬入するかという重要な役割を担う。この様なタンパク質の分解反応に関与するユビキチンの研究に対して 2004 年度のノーベル化学賞が授与された。ユビキチン化については、G1/S 期で働く SCF (Skp1/Cullin/F-box) 並びに Mdm2 (p53 を分解)、および G2/M で働く APC/C 各複合体がよく知られている。実際、それらによって細胞周期エンジンを調節する各期特異的サイクリンの運命も支配されている。Geminin 以外でも、サイクリン A、B、および D、CDC6、Securin で Destruction box の存在が知られている (Page と Hieter 1999; Castro ら 2005)。Geminin が APC/C により M 期特異的にタンパク分解される結果、Cdt1 は開放され G1 期に複製前複合体の形成を可能とさせる。−/LoxP 細胞では、細胞周期を通じて Geminin が常に安定的に存在する結果、Cdt1 ひいては MCM ファミリーによる複製前複合体の形成を部分的に阻害し、細胞の増殖と癌化を抑制した。ユビキチン機能異常と癌化との関連が注目されているが、Geminin は抗癌剤の分子標的の一つとして興味深い遺伝子と言える。

HCT116 細胞は癌由来細胞としては珍しく、カリオタイプが正常細胞とほぼ同等 (diploid) で、維持しやすい。我々の研究目標の一つは、この様なヒト細胞株で効率的な遺伝子破壊技術の精度を高め、ゲノム情報により同定される新規遺伝子の機能を生細胞で解明することである。この様な遺伝子破壊細胞株をカタログ化することで、以下に挙げる 5 つの研究が展開可能である。1) 遺伝子破壊により生ずる遺伝子ネットワークを

システムとして解析できる。即ち、標的遺伝子が単一のシグナル伝達に関与するのか、あるいは複数のシグナルが交差し合流するような下流域に位置するのか決定できる。2) 臨床由来の遺伝子を遺伝子破壊細胞に導入することで、多型と突然変異を区別できる。3) 機能ドメインのみを破壊する際、GFP (Green fluorescent Protein) などのタグマーカーを上下流のエクソンとフレームが合うようにノックインすれば、内在性遺伝子産物の細胞内分布を可視化し、経時的に解析できる。また、4) タグを利用した免疫沈降により、特異的な結合タンパクを回収できプロテオーム解析に応用できる。さらには、5) 薬剤候補、特に抗癌作用を示す化合物の作用機序解明や化合物ライブラリーのヒト細胞スクリーニング系として利用価値が高い。

今後は、標的遺伝子相同組み換えの誘導技術を含めた、より制御可能なゲノム改変技術の開発が期待される。真核生物 RecA ホモログである Rad51 は、動物細胞で相同組み換えに関与する十数種類の遺伝子産物 (Rad52 エピスタシスグループ) の中でも最も重要な働きをする (West 2003)。Rad51 を利用した組み換えの人工的誘発法や、染色体レベルでの組み換えホットスポットの同定と構造解明などが今後の課題として挙げられる。

4. おわりに

これまでヒトとマウスのゲノムを比較することで、どこが重要な領域かすばやく特定できた。およそ 7,500 万年も前に 2 つの種が分かれてから、変化していない DNA 配列の存在する事実がその領域の重要性を物語っている。今後はチンパンジーやニワトリ、イヌを始め、ウシ、ブタ、ウマなどについてもゲノム解読により、さらに多くの比較解析が可能となろう。分子進化以外の研究として、ゲノム創薬、疾患原因遺伝子の特定と治療・診断への応用、家畜の形質改良による経済的付加価値の向上など、どの目的をとってもゲノム情報を有効に活用することで遺伝子機能を生細胞内で詳細に解明しなければならない。系統的な遺伝学的解析ができる酵母やショウジョウバエでは、変異クローンを多く持っている研究室が圧倒的優位に研究を進めることができた (Chasse と Dohlman 2004; Adams と Sekelsky 2002)。このような優位性を将来に得るため、ヒトを含めた動物細胞株でも遺伝子破壊株の体系的なコレクション作成を開始すべき時期に来ている。

アミノ酸と発現調節領域の比較解析から、細胞周期関連遺伝子は動物間において極めて高い保存性を見せ

た。これは動物間における遺伝子機能の等価性を明瞭に示す。ヒト・マウス・ラットやニワトリ以外でも、公的な細胞バンク (JCRB など) にはサル、イヌ、ウシ、ブタ、ヤギ、ネコ、ウサギ、シカなどの株化細胞が存在する。ニワトリ DT40 細胞に匹敵するか、より有用な家畜由来細胞が存在あるいは今後開発される可能性は高い。ニワトリ DT40 細胞では主に DNA 修復系遺伝子 (Sonoda ら 1998) が、一方、ヒト HCT116 細胞では細胞周期制御に関する遺伝子の変異株が作製されてきた。このような相互に補完し合う状況は、動物ゲノム情報の蓄積により他の動物種との間でも可能であろう。体細胞での相同組み換え技術は、ヒト生殖系列細胞での相同組み換えが倫理上困難であるため、今後も重要であろう。家畜においては体細胞クローン技術の利用により、形質に関わる候補遺伝子を破壊した体細胞を作製後、そこからゲノム DNA を抽出し個体レベルでの解析も可能になるかもしれない。今後大量に供給される動物ゲノム情報とそれを利用した遺伝子破壊細胞における機能解析により、機能ゲノム学は新しい展開を見せるだろう。

謝辞

本稿をまとめるにあたり、病理組織学的解析で助言を頂いた小柳津直樹部長 (東京大学医科学研究所付属病院検査部) にお礼申し上げます。

引用文献

- Abdrakhmanov I, Lodygin D, Geroth P, Arakawa H, Law A, Plachy J, Korn B, Buerstedde JM. 2000. A large database of chicken bursal ESTs as a resource for the analysis of vertebrate gene function. *Genome Research*, 10: 2062–2069.
- Adams MD, Sekelsky JJ. 2002. From sequence to phenotype: reverse genetics in *Drosophila melanogaster*. *Nature Reviews Genetics*, 3: 189–198.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25: 3389–3402.
- Arakawa H, Lodging D, Buerstedde JM. 2001. Mutant lox vectors for selectable marker recycle and conditional knock-outs. *BMC Biotechnology*, 1: 7.
- Arakawa H, Buerstedde JM. 2004. Immunoglobulin gene conversion: insights from bursal B cells and the DT40 cell line. *Developmental Dynamics*, 229: 458–464.
- Baba TW, Giroir BP, Humphries EH. 1985. Cell lines derived from avian lymphomas exhibit two distinct phenotypes. *Virology*, 144: 139–151.
- Bell SP, Dutta A. 2002. DNA replication in eukaryotic cells. *Annual Review of Biochemistry*, 71: 333–374.
- Boardman PE, Sanz-Ezquerro J, Overton IM, Burt DW, Bosch E, Fong WT, Tickle C, Brown WR, Wilson SA, Hubbard SJ. 2002. A comprehensive collection of chicken cDNAs. *Current Biology*, 12: 1965–1969.
- Boss JM. 1997. Regulation of transcription of MHC class II genes. *Current Opinion in Immunology*, 9: 107–113.
- Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM. 2003. bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell*, 113: 25–36.
- Brown JP, Wei W, Sedivy JM. 1997. Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science*, 277: 831–834.
- Brown WRA, Hubbard SJ, Tickle C, Wilson SA. 2003. The Chicken as a model for large-scale analysis of vertebrate gene function. *Nature Reviews Genetics*, 4: 87–98.
- Buck L, Axel R. 2001. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*, 65: 175–187.
- Buerstedde JM, Takeda S. 1991. Increased ratio of targeted to random integration after transfection of chicken B cell lines. *Cell*, 67: 179–188.
- Buerstedde JM, Arakawa H, Watahiki A, Carninci PP, Hayashizaki YY, Korn B, Plachy J. 2002. The DT40 web site: sampling and connecting the genes of a B cell line. *Nucleic Acids Research*, 30: 230–231.
- Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW, Vogelstein B. 1998. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science*, 282: 1497–1501.
- Caldwell RB, Kierzek AM, Arakawa H, Bezzubov Y, Zaim J, Fiedler P, Kutter S, Blagodatski A, Kostovska D, Koter M, Plachy J, Carninci P, Hayashizaki Y, Buerstedde JM. 2005. Full-length cDNAs from chicken bursal lymphocytes to facilitate gene function analysis. *Genome Biology*, 6: R6.

- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. 2002. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99: 15524–15529.
- Camon E, Magrane M, Barrell D, Binns D, Fleischmann W, Kersey P, Mulder N, Oinn T, Maslen J, Cox A, Apweiler R. 2003. The Gene Ontology Annotation (GOA) project: implementation of GO in SWISS-PROT, TrEMBL, and InterPro. Genome Research, 13: 662–672.
- Castro A, Bernis C, Vigneron S, Labbe JC, Lorca T. 2005. The anaphase-promoting complex: a key factor in the regulation of cell cycle. Oncogene, 24: 314–325.
- Chan TA, Hermeking H, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. 1994. 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. Nature, 401: 616–620.
- Chan TA, Wang Z, Dang LH, Vogelstein B, Kinzler KW. 2002. Targeted inactivation of CTNNB1 reveals unexpected effects of beta-catenin mutation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99: 8265–8270.
- Chasse SA, Dohlman HG. 2004. Identification of yeast pheromone pathway modulators by high-throughput agonist response profiling of a yeast gene knockout strain collection. Methods in Enzymology, 389: 399–409.
- Chong JP, Thommes P, Blow JJ. 1996. The role of MCM/P1 proteins in the licensing of DNA replication. Trends in Biochemical Sciences, 21: 102–106.
- Deng C, Zhang P, Harper JW, Elledge SJ, Leder P. 1995. Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. Cell, 82: 675–684.
- Dhar SK*, Yoshida K*, Machida Y, Khaira P, Chaudhuri B, Wohlschlegel JA, Leffak M, Yates J, Dutta A. 2001. Replication from oriP of Epstein-Barr virus requires human ORC and is inhibited by geminin. Cell, 106: 287–296. (*Co-first-authors)
- Dyson N. 1998. The regulation of E2F by pRB-family proteins. Genes and Development, 12: 2245–2262.
- Edwards JH. 1994. Comparative genome mapping in mammals. Current Opinion in Genetics and Development, 4: 861–867.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature, 411: 494–498.
- Fraser AG, Marcotte EM. 2004. A probabilistic view of gene function. Nature Genetics, 36: 559–564.
- Grisart B, Coppieters W, Farnir F, Karim L, Ford C, Berzi P, Cambisano N, Mni M, Reid S, Simon P, Spelman R, Georges M, Snell R. 2002. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. Genome Research, 12: 222–231.
- Grobet L, Martin LJ, Poncelet D, Pirottin D, Brouwers B, Riquet J, Schoeberlein A, Dunner S, Menissier F, Massabanda J, Fries R, Hanset R, Georges M. 1997. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. Nature Genetics, 17: 71–74.
- Hanson KD, Sedivy JM. 1995. Analysis of biological selections for high-efficiency gene targeting. Molecular and Cellular Biology, 15: 45–51.
- Harbour JW, Luo RX, Dei Santi A, Postigo AA, Dean DC. 1999. Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. Cell, 98: 859–869.
- Hartwell LH. 1991. Twenty-five years of cell cycle genetics. Genetics, 129: 975–980.
- Hubbard SJ, Grafham DV, Beattie KJ, Overton IM, McLaren SR, Croning MD, Boardman PE, Bonfield JK, Burnside J, Davies RM, Farrell ER, Francis MD, Griffiths-Jones S, Humphray SJ, Hyland C, Scott CE, Tang H, Taylor RG, Tickle C, Brown WR, Birney E, Rogers J, Wilson SA. 2004. Transcriptome analysis for the chicken based on 19,626 finished cDNA sequences and 485,337 expressed sequence tags. Genome Research, 15: 174–183.
- Hunt T. 1989. Maturation promoting factor, cyclin and the control of M-phase. Current Opinion in Cell Biology, 1: 268–274.
- Huppi K, Martin SE, Caplen NJ. 2005. Defining and assaying RNAi in mammalian cells. Molecular Cell, 17: 1–10.
- International Chicken Genome Sequencing Consortium.

2004. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature*, 432: 695–716.
- International Chicken Polymorphism Map Consortium. 2004. A genetic variation map for chicken with 2.8 million single-nucleotide polymorphisms. *Nature*, 432: 717–722.
- International Human Genome Sequencing Consortium. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409: 860–921.
- International Human Genome Sequencing Consortium. 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 431: 931–945.
- Jaillon O, Aury JM, Brunet F, Petit JL, Stange-Thomann N, Mauceli E, Bouneau L, Fischer C, Ozouf-Costaz C, Bernot A, Nicaud S, Jaffe D, Fisher S, Lutfalla G, Dossat C, Segurens B, Dasilva C, Salanoubat M, Levy M, Boudet N, Castellano S, Anthouard V, Jubin C, Castelli V, Katinka M, Vacherie B, Biemont C, Skalli Z, Cattolico L, Poulain J, De Berardinis V, Cruaud C, Duprat S, Brottier P, Coutanceau JP, Gouzy J, Parra G, Lardier G, Chapple C, McKernan KJ, McEwan P, Bosak S, Kellis M, Volff JN, Guigo R, Zody MC, Mesirov J, Lindblad-Toh K, Birren B, Nusbaum C, Kahn D, Robinson-Rechavi M, Laudet V, Schachter V, Quetier F, Saurin W, Scarpelli C, Wincker P, Lander ES, Weissenbach J, Roest Crollius H. 2004. Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature*, 431: 946–957.
- Jallepalli PV, Waizenegger IC, Bunz F, Langer S, Speicher MR, Peters JM, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C. 2001. Securin is required for chromosomal stability in human cells. *Cell*, 105: 445–457.
- Kambadur R, Sharma M, Smith TP, Bass JJ. 1997. Mutations in myostatin (GDF8) in double-musced Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Research*, 7: 910–916.
- Kiriakidou M, Nelson PT, Kouranov A, Fitziev P, Bouyioukos C, Mourelatos Z, Hatzigeorgiou A. 2004. A combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets. *Genes and Development*, 18: 1165–1178.
- Knuppel R, Dietze P, Lehnberg W, Frech K, Wingender E. 1994. TRANSFAC retrieval program: a network model database of eukaryotic transcription regulating sequences and proteins. *Journal of Computational Biology*, 1: 191–198.
- Kuwabara T, Hsieh J, Nakashima K, Taira K, Gage FH. 2004. A small modulatory dsRNA specifies the fate of adult neural stem cells. *Cell*, 116: 779–793.
- Maiorano D, Cuvier O, Danis E, Mechali M. 2005. MCM8 is an MCM2-7-related protein that functions as a DNA helicase during replication elongation and not initiation. *Cell*, 120: 315–328.
- Mansour SL, Thomas KR, Capecchi MR. 1988. Disruption of the proto-oncogene *int-2* in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature*, 336: 348–352.
- Masui Y, Markert CL. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *Journal of Experimental Zoology*, 177: 129–145.
- Matzke MA, Birchler JA. 2005. RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nature Reviews Genetics*, 6: 24–35.
- McPherron AC, Lee SJ. 1997. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94: 12457–12461.
- McPherron AC, Lee SJ. 2002. Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. *Journal of Clinical Investigation*, 109: 595–601.
- Miller RD, Kwok PY. 2001. The birth and death of human single-nucleotide polymorphisms: new experimental evidence and implications for human history and medicine. *Human Molecular Genetics*, 10: 2195–2198.
- Mouse Genome Sequencing Consortium. 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420: 520–562.
- Nurse P. 1994. Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell*, 79: 547–550.
- O'Brien SJ, Menotti-Raymond M, Murphy WJ, Nash WG, Wienberg J, Stanyon R, Copeland NG, Jenkins NA, Womack JE, Marshall Graves JA. 1999. The promise of comparative genomics in mammals. *Science*, 286: 458–462, 479–481.
- Page AM, Hieter P. 2005. The anaphase-promoting complex: new subunits and regulators. *Annual Review of Biochemistry*, 68: 583–609.
- Pasquinelli AE, Ruvkun G. 2002. Control of

- developmental timing by microRNAs and their targets. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 18: 495–513.
- Polyak K, Waldman T, He TC, Kinzler KW, Vogelstein B. 1996. Genetic determinants of p53-induced apoptosis and growth arrest. *Genes and Development*, 10: 1945–1952.
- Rajagopalan H, Jallepalli PV, Rago C, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C. 2004. Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability. *Nature*, 428: 77–81.
- Rat Genome Sequencing Project Consortium. 2004. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature*, 428: 493–521.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403: 901–906.
- Rhee I, Bachman KE, Park BH, Jair KW, Yen RW, Schuebel KE, Cui H, Feinberg AP, Lengauer C, Kinzler KW, Baylin SB, Vogelstein B. 2002. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature*, 416: 552–556.
- Rocha JL, Pomp D, Van Vleck LD. 2002. QTL analysis in livestock. *Methods in Molecular Biology*, 195: 311–346.
- Ross JS, Schenkein DP, Kashala O, Linette GP, Stec J, Symmans WF, Pusztai L, Hortobagyi GN. 2004. Pharmacogenomics. *Advances in Anatomic Pathology* 11: 211–220.
- Sedivy JM, Vogelstein B, Liber HL, Hendrickson EA, Rosmarin A. 1999. Gene targeting in human cells without isogenic DNA. *Science*, 283: 9a.
- Shasstry BS. 2002. SNP alleles in human disease and evolution. *Journal of Human Genetics*, 47: 561–566.
- Sherr CJ. 1996. Cancer cell cycles. *Science*, 274: 1672–1677.
- Sherr CJ, Roberts JM. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes and Development*, 13: 1501–1512.
- Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, Koralewski MA, Kucherlapati RS. 1985. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature*, 317: 230–234.
- Smithies O. 1993. Animal models of human genetic diseases. *Trends in Genetics*, 9: 112–116.
- Sonoda E, Sasaki MS, Buerstedde JM, Bezzubova O, Shinohara A, Ogawa H, Takata M, Yamaguchi-Iwai Y, Takeda S. 1998. Rad51 deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. *EMBO Journal*, 17: 598–608.
- Sontheimer EJ. 2005. Assembly and function of RNA silencing complexes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6: 127–138.
- te Riele H, Maandag ER, Berns A. 1992. Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89: 5128–5132.
- The FANTOM Consortium and the RIKEN Genome Exploration Research Group Phase I & II Team. 2002. Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs. *Nature*, 420: 563–573.
- The International Chimpanzee Chromosome 22 Consortium. 2004. DNA sequence and comparative analysis of chimpanzee chromosome 22. *Nature*, 429: 382–388.
- The International HapMap Consortium. 2003. The International HapMap Project. *Nature*, 426: 789–796.
- Volkening M, Hoffmann I. 2005. Involvement of human MCM8 in prereplication complex assembly by recruiting hcdc6 to chromatin. *Molecular and Cellular Biology*, 25: 1560–1568.
- Venter JC, Smith HO, Hood L. 1996. A new strategy for genome sequencing. *Nature*, 381: 364–366.
- Wahl MB, Caldwell RB, Kierzek AM, Arakawa H, Eyraas E, Hubner N, Jung C, Soeldenwagner M, Cervelli M, Wang YD, Liebscher V, Buerstedde JM. 2004. Evaluation of the chicken transcriptome by SAGE of B cells and the DT40 cell line. *BMC Genomics*, 5: 98.
- Waldman T, Kinzler KW, Vogelstein B. 1995. p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Research*, 55: 5187–5190.
- Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, Ghandour G, Perkins N, Winchester E, Spencer J, Kruglyak L, Stein L, Hsie L, Topaloglou T, Hubbell E,

- Robinson E, Mittmann M, Morris MS, Shen N, Kilburn D, Rioux J, Nusbaum C, Rozen S, Hudson TJ, Lipshutz R, Chee M, Lander ES. 1998. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science*, 280: 1077–1082.
- Wang J, Takagaki Y, Manley JL. 1996. Targeted disruption of an essential vertebrate gene: ASF/SF2 is required for cell viability. *Genes and Development*, 10: 2588–2599.
- West SC. 2003. Molecular views of recombination proteins and their control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4: 435–445.
- Womack JE, Kata SR. 1995. Bovine genome mapping: evolutionary inference and the power of comparative genomics. *Current Opinion in Genetics and Development*, 5: 725–733.
- Xie X, Lu J, Kulbokas EJ, Golub TR, Mootha V, Lindblad-Toh K, Lander ES, Kellis M. 2005. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature*, 434: 338–345.
- Xu P, Vernooy MG, Guo M, Hay BA. 2003. The *Drosophila* microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Current Biology*, 13: 790–795.
- Yoshida K, Kuo F, George EL, Sharpe AH, Dutta A. 2001. Requirement of CDC45 for postimplantation mouse development. *Molecular and Cellular Biology*, 21: 4598–4603.
- Yoshida K, Inoue I. 2003. Conditional expression of MCM7 increases tumor growth without altering DNA replication activity. *FEBS Letters*, 553: 213–217.
- Yoshida K, Oyaizu N, Dutta A, Inoue I. 2004. The destruction box of human Geminin is critical for proliferation and tumor growth in human colon cancer cells. *Oncogene*, 23: 58–70.
- Yoshida K, Inoue I. 2004a. Regulation of Geminin and Cdt1 expression by E2F transcription factors. *Oncogene*, 23: 3802–3812.
- Yoshida K, Inoue I. 2004b. Expression of MCM10 and TopBP1 is regulated by cell proliferation and UV irradiation via the E2F transcription factor. *Oncogene*, 23: 6250–6260.
- Yoshida K. 2005a. Cell-cycle-dependent regulation of the human and mouse Tome-1 promoters. *FEBS Letters* 579: 1488–1492.
- Yoshida K. 2005b. Identification and characterization of human ZNF18 gene *in silico*. *International Journal of Molecular Medicine*, 15: 545–548.
- Zhu W, Giangrande PH, Nevins JR. 2004. E2Fs link the control of G1/S and G2/M transcription. *EMBO Journal*, 23: 4615–4626.
- Zozulya S, Echeverri F, Nguyen T. 2001. The human olfactory receptor repertoire. *Genome Biology*, 2: RESEARCH0018.