蛍光を利用した遺伝子発現解析 —ボンビキシン遺伝子の脳神経分泌細胞特異的発現—

本 賢一・吉田 郁代・Salah Eldin Abdel Salam
桜井 勝・岩見 雅史*

クローニングされた遺伝子の特徴付けるうえで、遺伝子発現の組織特異性や時期特異性、あるいは転写調節機構を調べることは非常に重要である。筆者らが研究対象としているカイコガ (*Bombyx mori*, 以後カイコと略) ボンビキシン (bombyxin) 遺伝子は、インスリン様遺伝子でありながら多重遺伝子族を形成しているなどインスリン遺伝子との相違点が多く興味深い。特に筆者らはボンビキシン遺伝子の脳神経分泌細胞における特異的発現に注目しているが、これまでカイコではトランスジェニック体を作成することができず、転写調節機構の解析がままならない状態であった。そこで筆者らは脳に遺伝子を直接導入することにより、カイコボンビキシン遺伝子の神経分泌細胞における発現調節の解析を行うことを試みた。本稿では GFP (Green Fluorescent Protein) レポーター遺伝子を利用した *in vitro* エレクトロポレーションによる昆虫脳への遺伝子導入法について紹介する。

1. はじめに

個体への遺伝子導入法は近年著しく発展しており、ウイルスベクターなどを用いた有用な方法が多く開発されている。しかしこれらの方法が確立されているのはごく一部の生物に限られており、カイコをはじめとして多くの生物では遺伝子導入のためには物理的方法あるいは電気的方法などで直接導入する必要がある。エレクトロポレーションはその代表的な遺伝子導入法であり、エレクトロポレーションは導入時の最適条件を決定することができれば簡単な操作で繰り返し遺伝子導入を行え、しかも導入効率が高いという利点を持っている。この方法によって導

入された遺伝子は染色体に組み込まれることもなく細胞内で徐々に壊されていくが、GFP のように検出感度の良いレポーター遺伝子さえ用いれば、一過性の遺伝子発現を検出するには十分な感度を持っている。

2. ボンビキシン

ボンビキシンは無脊椎動物で最初に見いだされたインスリン様分子として注目をあびた¹⁾が、その後多くの研究者によりインスリンとの類似点及び相違点が徐々に明らかにされてきた。残念ながらボンビキシンの生理作用については糖代謝、卵巣成熟あるいは細胞分裂への関与などが示唆されているもののまだまだ不明瞭な点が多い一方で、遺伝子レベルでは多くの知見が得られてる。まずボンビキシンの遺伝子構造はインスリンと全く同じで、シグナルペプチド、B鎖、Cペプチド、A鎖から構成される前駆体をコードしている²⁾。しかしボンビキシン遺伝子はゲノムあたり少なくとも32コピー存在し^{11, 19, 21, 22)}、インスリン遺伝子が1コピー(マウスやラットなどでは例外的に2コピー)しか存在しないのとは対照的である。これら32コピーの遺伝子はその塩基配列の相同性からA~Gの7ファミリーに分類されており、カイコゲノム中には、Aファミリー遺伝子は10コピー、Bファミリー遺伝子は12コピー、Cファミリー遺伝子は6コピー、D、E、F、Gの各ファミリー遺伝子はそれぞれ1コピーずつ存在している。またこれらの遺伝子はゲノム中でトリプレット、ペア、シングルを単位とする独特の構造様式をとり、クラスターを形成している¹¹⁾(図1)。

インスリンの主要産生部位は消化管(膵臓のランゲルハンス島β細胞)であるが、ボンビキシンの主

*Ken-ichi MOTO, Ikuyo YOSHIDA, Salah Eldin ABDEL SALAM, Sho SAKURAI, Masafumi IWAMI, 金沢大学大学院自然科学研究科(〒920-1192 金沢市角間町)

図1 ポンビキシン遺伝子群の地図 四角はポンビキシン遺伝子の位置を、矢印は遺伝子の転写方向を、英数字は遺伝子名を示している。ポンビキシン遺伝子はペア、トリプレットを基本構成単位とするクラスターを形成している。2つのセグメント間の位置関係、およびEファミリー遺伝子の位置は現在のところ不明。kbpはキロ塩基対を示している。

要産生部位は脳であり(他の組織では微量の遺伝子発現しか見られない⁶⁾), すべてのファミリー遺伝子が脳背側中央部の4対(両半球で計8個)の神経分泌細胞で特異的に転写されている^{19, 21, 22)}(図2)。またその転写様式は脳内の mRNA の解析結果により次のことが明らかにされている。まずAファミリー遺伝子ではペアを構成する遺伝子では発現が見られるが、トリプレットを構成する遺伝子では発現が見られない。一方Bファミリー遺伝子では、ペア、トリプレットといった遺伝子構成に関係なく特定の遺伝子だけが発現している。またCファミリー遺伝子は、ペアを構成する遺伝子では発現しているが、トリプレットを構成する偽遺伝子では発現が見られない^{7, 8)}。しかし現在までのところ、ポンビキシン遺伝子の脳神経分泌細胞特異的転写調節機構は不明で、筆者らはその解析のための実験系の確立を試みた。

3. GFP

GFPは北大西洋のシアトル近海に生息するオワンクラゲ(*Aequorea victoria*)体内に存在する約27 kDaの緑色蛍光タンパク質である。クラゲ体内でのGFPが発光する過程は、まず別の蛍光分子であ

図2 カイコ5令4日目の幼虫脳の whole-mount *in situ* hybridization によるポンビキシン遺伝子発現細胞の同定 ポンビキシン遺伝子は脳背側中央部の左右4対、計8個の大型の神経分泌細胞(濃い灰色で示されている)のみ特異的に発現している。図は G ファミリー遺伝子の特異的に認識するプローブを用いた結果であるが、A ~ F ファミリーについても同様の結果が得られている。スケールバーは50 μm である。

るエクオリン内で生じた蛍光エネルギーの GFP 分子内への転移よりの発色団を励起し、それが基底状態に戻るときのエネルギー放出時に光として発光するというものである。また単離した GFP でも長波長の紫外線を照射するだけで他の補助因子などを必要とせずに安定に発光し、さらに多くの生物種において cDNA から発現させた GFP が紫外線照射により細胞内で発光することから、新たな生体蛍光マーカーとして注目を集めている^{1, 2, 17)}。GFP が生体内マーカーとして有効である点として次のようなことがあげられる。1) 蛍光による検出感度が比較的高い[CLONTECH(<http://www.clontech.com>)社から販売されている GFP 変異体である EGFP (enhanced GFP)の蛍光強度は野生型のものより35倍強く、蛍光顕微鏡下で十分に観察可能である]。2) 成熟分子は非常に安定なタンパク質であり¹⁸⁾、例えば4%パラホルムアルデヒドなどで固定しても蛍光を検出することができる。3) 比較的退色が少ないことから長時間の観察も可能である¹⁶⁾。4) 抗体を用いる時のような特別な固定を必要としないので、生きた細胞で直接観察することも可能である。つまり目的のタンパク質と融合させることにより蛍光タグとして、顕微鏡下でそのタンパク質の細胞内での局在あるいは移動をリアルタイムで観察することができる^{4, 16)}。

このように GFP はレポーター遺伝子として非常に優れている面を持つ一方で、他のレポーター遺伝子に比べて劣っている点もある。まず GFP は翻訳してから実際に蛍光を発するまで、つまり成熟分子になるまで時間を要する(野生型で2~4時間、変異体の S65T で約30分、ただし低酸素条件下では更に遅くなる³⁾)ので遺伝子発現時期を特定するには不向きな場合がある。特にキイロショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)の胚発生のように短時間で著しく形態変化が起こるような場合はとても使うことはできない(細胞系譜を調べたい場合には使える²⁰⁾のだが)。また GFP の蛍光強度はその分子数に比例するので、間接蛍光抗体法などに比べ正確に定量できることが期待されるが、前述のように実際に蛍光を検出できるのは成熟分子であり、翻訳直後の分子は検出できないという欠点がある。また GFP は非常に安定な分子であるために導入後時間が経過するにつれて細胞内に蓄積される。つまり発現量が一定であっても導入後の時間が長くなるほど蛍光強度が増加することになる。さらに1細胞あ

たりの GFP 分子数が無限に増加することはありません、ある程度時間が経過すれば飽和状態になることが予想される。以上のようなことから、GFP を用いて遺伝子発現量を定量するためには、遺伝子導入から蛍光の検出までの時間を固定するなどの工夫が必要である。

最近 CLONTECH 社から d2EGFP と名付けられた EGFP の変異体をコードするベクターが販売された。EGFP の半減期は普通24時間以上であるが、この d2EGFP のそれは約2時間と非常に短い。つまり、EGFP の場合は遺伝子導入後時間が経過するにつれ蛍光強度が増加するのに対して、d2EGFP の場合は発現量が一定であればある程度蛍光強度も一定であり、より正確な定量に適していると言える。今後さらに半減期の短い変異体ができることも予想され、遺伝子発現の定量のためのマーカーとして GFP がルシフェラーゼにとって変わる日も来るのではないかと思われる。

4. エレクトロポレーションによる昆虫脳への遺伝子導入

現在までに細胞内への遺伝子導入法に関して様々な方法が開発されているが、エレクトロポレーションはそれらの中でも最も簡易に行える方法の一つである。原理はいたって簡単で、まず遺伝子を導入したい細胞あるいは組織の周囲に適当な濃度の DNA が存在する条件下でパルスを与える。このパルスにより生じた電場により一部の細胞膜に一瞬穴が生じ、この穴を通して DNA が細胞内へと移動するという仕組みである。真核生物の場合なら、細胞内に入った DNA は何らかの機構により核内に移行し、ゲノム DNA と同様に転写が開始される。

エレクトロポレーションで遺伝子導入を行う上で最も重要であり、最も苦勞するのが DNA 導入時の諸条件の決定である。まず電極であるがこれは導入したいサンプルに合わせて選ぶ必要がある。一般的には *in vivo* でキャピラリーなどを用いて DNA を目的の細胞付近に注入後、ニードル型、あるいはピンセット型などの電極を用い、組織を電極で挟むような状態でパルスを与えることにより導入する方法と、*in vitro* でキュベット型あるいはディッシュ型などの電極を用い、DNA と細胞(あるいは卵など)の混合液にパルスを与えることにより導入する方法がある。ここで紹介したもの以外にもいろいろなタ

イブの電極を使い分けることにより、種々な導入法が可能である(電極は特注も可能である)。筆者らが実際に用いている電極は、2 mm ギャップのマイクロスライド型(BTX 社, 450-20BG)である。このタイプの電極はカタログには浮遊細胞への導入用と記載されているが、カイコの脳は十分に小さいので問題なくエレクトロポレーションを行える。またこのタイプであれば、調整する DNA 量が80 μ l と少なくすむという利点がある。具体的には、前もって20 μ g/80 μ l になるように DNA を培養液に溶解させておく。一般的には DNA 濃度は濃い方が導入効率は良い¹⁵⁾が、筆者らの場合にはこれよりも低濃度の DNA 溶液でもうまくいくことがある。また導入する DNA は環状より直鎖状の方が導入効率¹⁵⁾や翻訳効率が良いと言われている。筆者の場合は環状のまま使用しているが、直鎖状 DNA であれば DNA 濃度はもっと低濃度でもうまくいくと思われる。次に昆虫脳を外科的に摘出し、これらを必要な数(筆者らの場合12個)が揃うまで適当な緩衝液中に溜めておく(そのまま DNA 溶液に浸していくと脳を摘出している間に DNA 溶液が蒸発し、液量が減少する可能性がある)。必要数の脳が揃えば DNA 溶液を電極の間に流し込み、これに摘出した昆虫脳を浸す。この時に標的細胞が電極のマイナス極側にくるように向きを整えるのがうまく遺伝子導入するためのこつである。これは電気泳動の場合と同じで、パルスを与えた瞬間 DNA 分子が電極のマイナス極からプラス極に移動するからであり、また浮遊した細胞の場合と違い組織に対するエレクトロポレーションでは組織のマイナス極側の数層の細胞にしか導入されないからである。またこれらの過程で重要なことは、脳の数や、DNA 溶液量などの条件を常に一定にすることである。これらの条件が一定でなければ当然再現性に問題がでてくるであろう(筆者らの場合、全く同じタイプの電極であるにもかかわらず、古いものから新しいものに換えただけでうまくいかなかったことがあった。電極の抵抗などに違いがあったようである)。

次にエレクトロポレーションの条件であるが、一般的に動物細胞は電気ショックに弱いのでエレクトロポレーターはスクウェアパルス波型のものを使用する。それ以外にエレクトロポレーターの方で設定する条件としては、電圧、パルス幅、パルス回数、パルス間隔があげられる。筆者らが使用しているエレクトロポレーター(BTX 社の T820)の場合、パル

ス間隔は約 1 秒間で固定されているので残りの 3 つの条件を自分で設定する必要がある。とりあえず、標的細胞で発現するような強力なプロモーターにレポーター遺伝子をつないだコンストラクトをコントロールとして用い、様々な条件でエレクトロポレーションを行ってみるのが一番手取り早いように思える。電圧100~500V/cm, パルス幅50~99msec, パルス1~5 回ぐらいを目安として、発現効率が良かつ細胞のダメージ(細胞内のタンパク質などが不可逆的に変性してしまうなど)が極力少なくなるように条件を設定する¹⁵⁾。一般的に発生熱(電圧の 2 乗と負荷時間に比例し、抵抗に反比例する)が高いほど遺伝子導入効率が良いと言われているが、当然細胞へのダメージも多くなり、場合によっては細胞そのものが死んでしまうこともあるので、このあたりの選択が難しいところである。ちなみに筆者らが現在カイコ脳に対して行っている条件は、電圧40 V(ギャップ 2 mm), パルス幅50msec, パルス 5 回である(図 3)。エレクトロポレーション時の温度は、一般的には低温の方がサンプルの熱によるダメージが少なくかつ導入効率も良いとされている。そこで、筆者らは脳を DNA 溶液中に浸した後、エレクトロポレーションの直前直後の10分間ずつ電極ごと氷上に置くという処理を行っていた時期があったが、カイコ脳の場合低温処理した方が蛍光顕微鏡での観察時にバックグラウンドが高くなる傾向があった(理由はわからない)ので、現在では室温のままエレクトロポレーションを行っている。

図 4 A はボンビキシン B12 遺伝子のプロモーターと GFP 遺伝子からなるレポーター(図 3)をエレクトロポレーションにより 5 令 3 日のカイコ脳に導入後、2 日間(一晚の培養でも充分である)25℃で培養液(Grace's Insect Cell Culture Medium, GIBCO BRL, 100U/ml ペニシリンと100 μ g/ml ストレプトマイシンを含む)中において *in vitro* 培養して GFP を発現させ、これを蛍光顕微鏡(OLYMPUS, BX50, ミラーユニットは U-MNIBA を使用)で観察した結果である。この図から、ボンビキシン遺伝子のプロモーターを持つレポーター遺伝子が脳中央部の大型の神経分泌細胞で特異的に発現しているのがわかる。ただしこの結果からだけでは、レポーターが偶然にボンビキシン産生細胞だけに導入されたという可能性を否定できない。そこでエレクトロポレーションでは DNA はランダムに細胞に導入されることを証明すべく、すべての細胞で発現すると考えら

図3 レポーター 遺伝子の構造とエレクトロポレーションの模式図 A : ポンピキシン B12 遺伝子とその周辺領域を含むプラスミドをテンプレートとし, B12 遺伝子内部の一部を欠失させるように PCR を行い, この PCR 産物に GFP 遺伝子コード領域断片を連結させた。B : エレクトロポレーションの模式図。矢印は DNA 分子の移動方向を示す。ポンピキシン B12 遺伝子が導入されれば, 図中の脳中央部の 4 対の神経分泌細胞のいずれかが緑色の蛍光(図では白色で示されている)を発するはずである。

レーションの模式図。矢印は DNA 分子の移動方向を示す。ポンピキシン B12 遺伝子が導入されれば, 図中の脳中央部の 4 対の神経分泌細胞のいずれかが緑色の蛍光(図では白色で示されている)を発するはずである。

図4 カイコ脳神経細胞での GFP の発現 A~D は蛍光顕微鏡を用いて GFP の蛍光を観察した結果と模式図を, E と F は抗 GFP 抗体を用いて免疫組織化学的に GFP を検出した結果である。蛍光像は白色で, 免疫組織像は黒色で示される。A : ポンピキシン B12 遺伝子プロモーター・GFP レポーター遺伝子を導入した場合。B : A の模式図。C : アクチン A4 遺伝子プロモーター・GFP レポーター遺伝子を導入した場合。脳上層部の多くの細胞で GFP の発現が見られる。D : C の模式図。E : ポンピキシン B12 遺伝子プロモーター・GFP レポーター遺伝子を導入した場合。ポンピキシン産生細胞でのみ染色が見られる。F : アクチン A4 遺伝子プロモーター・GFP レポーター遺伝子を導入した場合。上層部の多くの細胞で GFP の発現が見られる。

れるアクチン A4 遺伝子プロモーター¹²⁾ と GFP 遺伝子からなるレポーターを作成し, これをポンピキシン遺伝子のレポーターの場合と同様にエレクトロポレーションを行った。この場合, 脳上層部に位置する多数の細胞が蛍光を発しており(図 4 C), レポ-

ーター遺伝子がこれら不特定多数の細胞で発現していることがわかる(前にも述べたが, エレクトロポレーションの場合 DNA は脳の側面の表面付近の細胞にしか導入されない)。このように DNA はエレクトロポレーションにより組織のマイナス電極側の細

胞にランダムに導入される。一方ポンピキシン遺伝子のレポーターの場合も同様にランダムに導入されているはずであるが、実際にレポーターが発現しているのは4対のポンピキシン産生細胞のいずれかである。よってポンピキシン遺伝子プロモーター領域にはポンピキシン産生細胞での特異的発現に関与するエレメントが存在すると言える。

以上、エレクトロポレーションによる遺伝子導入および蛍光顕微鏡による遺伝子発現解析について述べた。エレクトロポレーションの優れているところは誰にでも(筆者らにでも)簡単に遺伝子導入が行えることであるが、幾つか問題点もあるのでここで触れたいと思う。

1) GFPのように蛍光により遺伝子発現を検出する場合、細胞のダメージが激しいとバックグランドが高くなる傾向がある。これを防ぐためにはなるべく発生熱が低くなるような条件を設定しなければならない。筆者らの場合においてもまだまだ改善の余地があると考えている。

2) 1)で述べたようにバックグランドがどうしても高くなり、作成したコンストラクトが本当にGFPを発現しているかどうか見分けにくいことがある。ここで言いたいことは、せっかく作成したコンストラクトがうまくGFPを発現しない(転写に必要なエレメントを欠いているなど)、あるいは発現していても融合タンパク質の場合では蛍光強度が弱いことがある¹⁰⁾ということである。GFPのシグナルが検出できなければ、発生熱のより高い条件でエレクトロポレーションを行う必要があるが、前述のようにそのような条件ではバックグランドも高くなりがちである。幸い抗GFP抗体がCLONTECH社から販売されているので、GFPのシグナルが検出しにくいようであれば免疫組織化学的に検出してみると良い(図4 E F)。万一それでも検出できないようであれば、コンストラクトを少し変えて作成し直した方が成功への近道であると思われる(ベクターに組み込む上流配列部分を変える。あるいは遺伝子の下流領域も組み込むなど)。またもし免疫組織化学的に検出できる場合は、バックグランドが低くなるようにエレクトロポレーションの条件あるいはその後の培養条件などを再検討すべきであろう。

5. おわりに

昆虫の脳は発生・成長を最上位で支配する高次機

能器官でありながら、それを構成する細胞数はわずか数万であり、高等動物のそれが数億から数十億であるのにくらべてかなり少ない。もちろん昆虫には感情などのような高度な神経機能はないが、様々な情報を受け入れ処理する入力系と行動や分泌を調節する出力系は持ち合わせている。つまり脳におけるこれらの機能に関する研究材料として昆虫の脳は非常に適していると言えるであろう。筆者らが研究の対象としているポンピキシンは、カイコの脳神経分泌細胞で産生・分泌される神経ペプチドの一つである。幸い筆者らの研究室ではポンピキシン遺伝子に関する多くの知見をすでに得ており、今後脳神経分泌細胞における遺伝子発現調節機構を解析するに当たり十分な情報を蓄積している。しかし多くの生物にも言えることであるが、カイコの場合トランスジェニック体の作成法は未だに確立されていない。それゆえ個体への遺伝子導入には、本稿で紹介したようなエレクトロポレーションなどのように組織へ直接導入するような方法が必要であった。

エレクトロポレーション法は簡易で非常に導入効率の高い遺伝子導入法であるが、今のところその利用目的の多くは培養細胞への導入であり、組織への導入に関して参考となるような文献はまだ少ない。またそのような文献が手に入ったとしても、生物種やターゲットとなる組織あるいはその組織中の細胞が異なれば、当然導入時の最適条件などが異なってくるため、全く同じ条件で行うというわけにはいかない。つまり本文でも述べたように、適当なプロモーターを持ったレポーターを用いて様々な条件でエレクトロポレーションを行うことにより、最も良いと思われる条件を見つける必要がある。この作業は非常に地味で時間もかかるが、その後の研究成果を大きく左右する筈であり念入りに行うべきである。また目的によっては導入効率・生存率・再現性などの優先順位が異なるので、これらも考慮に入れて最適条件を決める必要がある。つまり組織中の多少奥まったところにある細胞がターゲットである場合、生存率にこだわれば導入効率は低くなるはずであり、多少生存率が低くても発生熱が高くなるような条件を選択した方が良いかもしれない。また筆者らのように将来的にGFPの蛍光強度によってその遺伝子の発現強度を検証しようとする場合には、多少導入効率が低くなくても細胞のダメージがより少なくなるような条件、つまり発熱量を抑えるような条件を選択すべきであろう。

今回紹介した実験系において、幸いにも筆者らはボンビキシン産生細胞におけるレポーター遺伝子の細胞特異的な発現を確認する事ができた。しかし蛍光によりレポーター遺伝子の発現を確認する際にまだまだバックグランドが高く、蛍光強度により発現度を求めようとするには納得のいかない状態であるが、少なくとも遺伝子発現の有無を確認するうえでは優れた実験系である。特にボンビキシン遺伝子は多重遺伝子族であるが故に、すべての遺伝子について *in situ* hybridization のような比較的簡単な方法で遺伝子の発現を確認するという訳にはいかない (*in situ* hybridization ではファミリー間での遺伝子発現の有無を確認できても、同一ファミリー内で各遺伝子の発現の有無を確認することはできない)。そのため各々の遺伝子についてその発現の有無を厳密に決定するにはかなりの労力が必要であったが、この実験系により発生中のどのステージの脳に対しても、32コピーのボンビキシン遺伝子すべてについてその発現の有無を比較的容易に確認することが可能となった。しかし筆者らの本来の目的はボンビキシン遺伝子の細胞特異的な転写調節にかかわるエレメントを見出すことであり、そのためには GFP のより正確な蛍光強度を知る必要がある。今後エレクトロポレーションあるいはその後の培養の条件も含めて、バックグランドが減少するように実験系を改善していく予定である。

本稿ではエレクトロポレーションを用いた昆虫脳への遺伝子導入法について述べたが、筆者らの研究室ではマイクロインジェクションを用いても同様の試みを行っている。マイクロインジェクションはエレクトロポレーションに比べ技術的に非常に難しいが、ある程度の経験を積みかつ導入時の最適条件を決定することができれば、繰り返し高い導入効率で遺伝子導入が可能である。また筆者らの経験上エレクトロポレーションに比べて細胞のダメージが少ないため、蛍光顕微鏡による観察時にバックグランドが非常に低いという利点を持っている。

謝辞

本研究は、文部省科学研究費補助金特定領域研究「昆虫の変態・休眠の分子機構」ならびに加藤記念バイオサイエンス振興財団の支援により行われました。

文 献

- 1) Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., & Prasher, D.C.: Science 263: 802-805 (1994)
- 2) 舟橋淳一: 細胞工学 16: 1666-1675 (1997)
- 3) Heim, R., Prasher, D.C., & Tsien, R.Y.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 12501-12504 (1994)
- 4) Htun, H., Barsony, J., Renyi, I., Gould, D. L., & Hager, G.L.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 4845-4850 (1996)
- 5) Iwami, M., Kawakami, A., Ishizaki, H., Takahashi, S.Y., Adachi, T., Suzuki, Y., Nagasawa, H. & Suzuki, A.: Dev. Growth Differ. 31: 31-37 (1989)
- 6) Iwami, M., Tanaka, A., Hano, N., & Sakurai, S.: Experientia 52: 882-887 (1996)
- 7) 岩見雅史: 生化学 70: 305-308 (1998)
- 8) 岩見雅史, 本 賢一: 化学と生物 36: 8-10 (1998)
- 9) Kawakami, A., Iwami, M., Nagasawa, H., Suzuki, A., & Ishizaki, H.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 6843-6847 (1989)
- 10) 木俣行雄, 河野憲二: 実験医学 15: 563-567 (1997)
- 11) Kondo, H., Ino, M., Suzuki, A., Ishizaki, H. & Iwami, M.: J. Mol. Biol. 259: 926-937 (1996)
- 12) Mange, A., Couble, P. & Prudhomme, J. C.: Gene 183: 191-199 (1996)
- 13) 村松達夫, 朴熙万: 実験医学 15: 265-268 (1997)
- 14) Nagasawa, H., Kataoka, H., Isogai, A., Tamura, S., Suzuki, A., Ishizaki, H., Mizoguchi, A., Fujiwara, Y. & Suzuki, A.: Science 226: 1344-1345 (1984)
- 15) Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., & Hofschneider, P.H.: EMBO J. 1: 841-845 (1982)
- 16) Ogawa, H., Inouye, S., Tsuji, F.I., Yasuda, K., & Umesono, K.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 11899-11903 (1995)
- 17) 小川英知, 井上 敏, Tsuji, F.I., 安田國雄,

- 梅園和彦：実験医学 14：495-501 (1996)
- 18) Perozzo, M.A., Ward, K.B., Thompson, R. B., & Ward, W.W.: J. Biol. Chem. 263 : 7713-7716 (1988)
- 19) Tsuzuki, S., Masuta, T., Furuno, M., Sakurai, S. & Iwami, M.: Comp. Biochem. Physiol. 117B : 409-416 (1997)
- 20) Yeh, E., Gustafson, K., & Boulianne, G.L.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 : 7036-7040 (1995)
- 21) Yoshida, I., Tsuzuki, S., Abdel Salam, S. E., Ino, M., Korayem, A., Sakurai, S. & Iwami, M.: Zool. Sci. 14 : 615-622 (1997)
- 22) Yoshida, I., Moto, K., Sakurai, S., & Iwami, M.: Dev. Genes Evol. 208 : 407-410 (1998)