動物ゲノムの構造と複製に関する分子細胞遺伝学的研究[†]

(1996 年度農芸化学奨励賞受賞)

奥 村 克 純

(三重大学生物資源学部)

Key words : fluorescence *in situ* hybridization (FISH) ; genome structure ; DNA replication ; mammalian genome ; genomic imprinting

はじめに

現在、種々の生物について世界規模でゲノム計画が進行し、数多くの遺伝子や DNA 配列が同定され明らかにされつつある。生命活動を維持するこれらの遺伝子(群)がいかにうまく、しかも決まった時期にその機能を発揮しているかを知り、我々がこれらをいかに効率よく発現させて利用するか、さらに、細胞や動物個体のもつ機能を遺伝子レベルでいかに都合よく改良するかといった課題に取り組むためには、標的遺伝子(群)が存在するゲノムの構造やゲノムとこれを取りまく種々の因子との相互作用、さらにそれらが遺伝子やゲノムの機能発現のために細胞核内でいかにダイナミックな構造変化を起こしているかというゲノムの動的挙動に関する知見が必要不可欠である。細胞核内の一コピーの各遺伝子を多色で検出できる技術として開発・改良されてきた蛍光 *in situ* hybridization (FISH) 法は、このような要望に応え得る可能性をもつ一つの技術である。筆者らは、FISH 法を利用して社会的にも最も重要視され、研究の進展が著しいヒト・ゲノムを哺乳類ゲノムの代表例として研究を進めている。この複雑ではあるが極めて精妙に制御を受けている動物細胞ゲノムの、様々な局面での構造やその変化を視覚的に描き出し、ゲノムの構造と DNA 複製や遺伝子発現、細胞内で起こっている様々な現象や個体レベルでの表現型とゲノム構造との関連性を明らかにすることを目標と

している。ここでは、筆者らがここ数年間行ってきた研究を中心に FISH による動物ゲノムの解析について最新の情報をおりませて紹介する。

1. FISH 法によるゲノム構造の解析

DNA を検出する FISH 法は、その開発以来、遺伝子やゲノム断片のマッピングを中心にヒト・ゲノム計画を支える基本的技術としてその有効性をいかに発揮してきた⁽¹⁾。ゲノム解析における FISH に対するニーズがその技術開発を促し、検出し得る最小サイズとして数百塩基対 (bp)、解像度としては数千 (kb) から数百万塩基対 (Mb) におよぶ範囲で解析できる系、さらに、種々の色で各 DNA を識別するマルチカラー FISH が確立している。FISH 法は、その開発当初から予想されたように、疾患の診断や、種々の生物学的研究への応用が可能となり、その技術と応用性については、成書⁽²⁾等を参照されたい。

FISH 法とは、まず検出したい遺伝子 DNA を、例えばビオチンで標識する。これを一本鎖にして、スライドガラスに固定した染色体 DNA (予め一本鎖にする) に *in situ* でハイブリダイゼーションさせる。これをさらに蛍光標識アビジンや標識抗体と結合させ、顕微鏡下一コピーの遺伝子を点状のシグナルとして検出するという方法で、DNA の標識法と蛍光色素の組み合わせを変えることにより、多色で視覚化することができる方法である。

FISH 法のヒト・ゲノム計画への貢献は、もちろん、遺伝子・ゲノムの染色体マッピングであり、これについても様々な技術開発・改良がなされてきた。なかでも、高橋らのダイレクト複製 R バンド法は、日本を代表する技術開発の一例である⁽³⁾。以来、ゲノムプロジェクトの急進展と共に FISH においても解像度における改良もなされてきた。伸展染色体⁽⁴⁾、DNA ファイバーなど⁽⁵⁾、標本作製法の改良も進み、現在のところ目的に

[†] Molecular Cytogenetics of the Genome Organization and the DNA Replication in Animal Cells
Katsuzumi OKUMURA (Laboratory of Biological Chemistry, Faculty of Bioresources, Mie University)

応じて数 kb から数 Mb の範囲での解析が可能である。筆者らも、これらの技術改良を進める一方、FISH 法の効率化と応用性に特に有効な高感度冷却 CCD カメラシステムを導入して FISH データをデジタルイメージ化し、研究を進めてきた。まず、ゲノム解析の例として、ヒト 16 番染色体上に散在する DNA クローンのマッピングを行った。すなわち、計 8.6 Mb にもおよぶゲノム領域について DNA クローンの整列化と染色体上の位置決定を行うことにより、ヒト 16 番染色体ゲノム構造解析の基盤となるデータを提示した⁽⁶⁾。また、この過程で、急性非リンパ球性白血病 (ANLL) 細胞に頻発する染色体転座領域付近に 16 番染色体特異的反復配列が存在することを発見した⁽⁷⁾。さらに、機能的に関連する数多くの遺伝子、すなわち、DNA 複製関連遺伝子群やプロテアソームのサブユニット群等のゲノム上の存在位置を決定した⁽⁸⁻¹¹⁾。この結果、なかにはカゼイン遺伝子のようにゲノム上でクラスターを形成するものもあるが⁽¹²⁾ (図 1)、機能発現時には協調して役割を果たす遺伝子が、全く異なる染色体に存在して発現調節を受けることが明らかで、これらがいかに制御を受けているかという問題も今後の研究課題として大変興味深い。

この他、Mb にもおよぶゲノム DNA をクローン化できる酵母人工染色体 (YAC) の作製時に問題となるキメラクローンの検出や⁽¹³⁾、マウス由来の遺伝子の遺伝子座の決定、transgene の検出、遺伝子の増幅様式に関する研究にも FISH 法を活用した⁽¹⁴⁾。このようにヒ

ト・ゲノム解析を中心に進展した FISH 法はマウスや他の家畜、ニワトリ、イネを代表とする植物、酵母等のゲノム解析にも活用されている^(15,16)。FISH 法はいわゆるゲノム計画の発展に貢献してきたが、一方で細胞核内のゲノムのダイナミックな挙動を描き出し、種々の現象を視覚的に証明する可能性をもつ有力なツールでもある⁽¹⁷⁾。以下に応用例を述べる。

2. FISH 法による DNA 複製タイミングの判定法

動物細胞のゲノム DNA の複製は細胞周期の S 期に起こり、しかも個々の DNA セグメントは S 期の中で決まった複製時期 (複製タイミング) をもつことが知られている⁽¹⁸⁾。DNA 複製タイミングの決定には、従来、セルソーターによる S 期の細胞分画、密度勾配超遠心、サザンブロッティング、オートラジオグラフィ等を用いられていたが、我々は FISH 法による単純な方法を提示した⁽¹⁹⁾。すなわち、調べたい DNA 断片を蛍光検出できるように標識して核標本に対して FISH を行くと、二倍体細胞ではそのゲノム領域が複製していない場合には、二つのシングルドット (SS) 既に複製を終えている場合には二つのダブルドット (DD) として検出される。表 1 に示すように、細胞周期の進行に伴い、核内の FISH シグナルはシングレットからダブルレットに変化する。この割合を比較すれば、個々のゲノム断片の相対的な複製タイミングを知ることができる。DNA 複製タイミングに大きな差がある DNA 間で比較する場合は、その判定は容易であるが、細胞周期の非常に遅い細胞や、複製タイミングの似ている DNA 間で比較する場合には、単純ではない。一つの方法として、細胞培養時、固定直前に 10 分ほどプロモデオキシウリジン (BrdU) を添加して取り込ませ、FISH の検出ステップ

図 1 FISH によるヒト・カゼイン遺伝子のマッピング
β-, κ-Casein 遺伝子を含む約 1.5 Mb の YAC クローンを FISH で検出し、4 q 21.1 にマップした。

表 1 細胞周期の進行に伴う核内 FISH シグナルの変化

S 期における 複製の時期	細胞周期				doublet 率 (%) [*]
	G ₁ (G ₀)	S _E	S _L	G ₂	
早い遺伝子					高い
遅い遺伝子					低い

$$* \text{ doublet 率} = \frac{[\text{doublet の核の数}]}{[\text{doublet の核の数}] + [\text{singlet の核の数}]} \times 100$$

で、例えばローダミン標識した抗 BrdU 抗体で S 期にある細胞のみを選択し、これについて SS, DD を判定すれば、より正確なデータが得られる。

遺伝子発現と複製タイミングについては、一般にある遺伝子を発現している細胞では、その遺伝子は早い複製タイミングをもち、逆に眠っていると遅く複製するといわれている。例えば β -globin 遺伝子は K 562 細胞では早く、HL 60 細胞では遅く複製する⁽¹⁸⁾。一方で、マクロなレベルではあるが、R バンド領域は遺伝子密度が高く、複製も S 期の前半に起こり、G バンド領域は、S 期の後半に複製することがわかっており、個々の遺伝子の複製タイミングが細胞の種類によって変化することがあるので、遺伝子発現と複製タイミングが常に相関するとは考えにくい。構造的要因を含め、種々の因子が影響を与えるのであろう。

遺伝子の複製タイミングの持つ意味、およびこれを規定する要因について一定の見解を示すには現在のところあまりにも情報量が少ない。以下に、これらに対する解答を得るための初歩的なステップとして、DNA 複製タイミングとゲノムの構成、遺伝子発現、クロマチンの修飾などの関連性について検討した結果を、他のグループの結果をおりまぜて紹介する。

3. 嚢胞性線維症 (cystic fibrosis; CF) 原因遺伝子領域の複製タイミング

上述の FISH による DNA 複製タイミングの判定法をまず、CF 原因遺伝子 (*CFTR*) 領域の複製タイムゾーンを描き出すために利用した⁽¹⁹⁾。CF 原因遺伝子領域はヒト 7 番染色体長腕 (7 q 31) に存在する。従来法による解析から、*CFTR* 遺伝子上流に複製タイミング

の変化する領域が存在することが推定されたが、正確な変化領域を決定するには至らなかった。そこで、*CFTR* の近傍領域の DNA クローンを用いて、FISH 法

図 2 *CFTR* 遺伝子発現細胞 (Caco 2) でのこの遺伝子領域の複製の進行過程

(上図) *CFTR* 遺伝子ゲノム領域の複製タイムゾーンモデルおよびマップ(黒い部分は *CFTR* 遺伝子)。SE/M: S 期前中期, SE: S 期初期, SL: S 期後期。ゲノム領域が複製タイミングに応じたゾーンとなっていることを示す。(下図) S 期における複製の順序。破線ではさんだ部分で複製タイミングがスイッチする。SE に一時的に“replication time zone bubble”が形成される。

図 3 マルチカラー FISH による CF 原因遺伝子領域の複製順序の描出

CFTR 遺伝子を発現する Caco 2 細胞核に対し、cM 58, cW 44, λW 31 の各クローンを異なる色で検出した。*CFTR* 遺伝子がこの領域内で先に複製することを描出し、図 2 のモデルを検証した。

表 2 CF 原因遺伝子領域の各細胞における複製タイミング

DNA クローン	doublet 率(%), 複製タイミング		
	K 562	Manca	Caco 2
cM 58	47 SE/M	46 SE/M	46
cW 7-26	20	16	44
cNH 24	27	14	47
cJ 21	26	13	66
cW 44	21 SL	13 SL	62 SE
λTE 26/27	18	13	67
λW 30/46	nd	nd	25 SL
λW 31	19	9	31
<hr/>			
β -globin	61 SE	4 SL	15 SL
PYGM	68 SE	77 SE	64 SE

による複製タイミングの解析を行った。表2に示した結果から、*CFTR* 遺伝子を発現しない細胞 (K 562, Manca) では、この遺伝子上流域が先に複製するが、これを発現する Caco 2 細胞では、*CFTR* 遺伝子を含む領域がまず複製し、続いて上流域、さらに下流域の順に複製することがわかった。また、*CFTR* 遺伝子上流域の複製タイミングの変化領域をマップすることもできた。すなわち、図2に示すように、*CFTR* 遺伝子自体は約 500 kb にわたる複製タイムゾーンにあり、この遺伝子がアクティブな細胞では早く複製するが、眠っている細胞では逆に遅く複製し、発現細胞では一時的に、“replication time zone bubble” が形成される。この両側のゾーンに存在する DNA クローンを併用することで、マルチカラー FISH 法により、これを描き出すことに成功した (図3)。このタイムゾーンは複製における染色体構造の基本単位を示していると考えられる。

4. ゲノムの構造と DNA 複製タイミングの解析

哺乳類のゲノムは G+C 含量に基づく“isochore”というモザイク構造から成り立っていることが示されてきた^(20,21)。これらのモザイク構造は染色体の G, R というバンド構造と密接な関連があり、BrdU でラベルした細胞から調製した中期染色体にみられる一連の DNA 複製バンドパターンとも関連している。すなわち、ヒト・ゲノムの R バンドの大部分は G+C rich であり、これらの領域は細胞分裂周期における S 期の前半に複製する。それぞれのバンドは数 Mb におよぶ DNA からなり、おそらくは統括的に制御を受けて複製するレプリコン群で構成されていると考えられる。免疫応答系の遺伝子が多数存在しているヒト主要組織適合抗原複合体遺伝子群 (MHC) 領域は、約 4 Mb の長さを持ち、R, G バンドの複合ゾーンよりなっている。また、G+C 含量に基づくゲノムモザイク構造の境界が、MHC ClassII と ClassIII の境界領域に存在することを国立遺伝学研究所の池村らが見出している⁽²²⁾。DNA 複製とゲノムの構造の関係に関する知見を得るために、この領域のうち入手し得る 2 Mb 以上にわたる領域に存在する DNA クローンをを用いて、上述の FISH 法による DNA 複製タイミング決定法により解析した。DNA プローブ間のより詳細な複製時期の比較をするために、DNA クローンを 2 個ずつ併用し、異なる色で検出するマルチカラー FISH で精密な解析を行った。HL 60 細胞につ

図4 ヒト MHC 領域のゲノムの G+C%組成と複製タイミング

SE: S 期初期, SM: S 期中期。下部の G+C%組成は文献 22 の図を一部変更して使用した。

いて、約 2 Mb にわたる MHC 領域の相対的な DNA 複製のタイミングを比較し、池村らによって示されたゲノム上のこの領域の G+C%の構成と共に図4に示した。その結果、調べた領域内で DNA 複製のタイミングが最も遅い領域が、ClassII と ClassIII の境界領域に見出された。図から明らかなようにゲノムの G+C%の変化のパターンと DNA 複製タイミングの順序のパターンが密接に関連していることも明らかとなった。これは、ゲノムの G+C%組成と DNA 複製タイミングとの関連がミクロなレベルで示された最初の例である。また、これらの結果は ClassII と ClassIII の境界領域は DNA 複製過程における replicon cluster⁽²³⁾ の境界に相当する可能性を示唆している⁽²⁴⁾。

さらに、遺伝子発現の複製タイミングへの影響を見るために ClassII の遺伝子群を発現するリンパ芽球細胞について同様に MHC 領域の複製タイミングを解析した結果、複製タイミングの最も遅い領域が、ClassII と ClassIII の境界領域に存在する点は変わらないものの、ClassII の遺伝子群を発現しない HL 60 細胞と比較して、ClassII 領域の全体的な複製タイミングが相対的に早くなっていた。両者の細胞で発現していないがん壊死因子遺伝子 (*TNF*) 領域が調べた領域で最も早く複製することを考慮に入れると、DNA 複製のタイミン

グは、少なくともゲノムの構成、遺伝子発現の両者の影響を受けるが、その影響の受け方は、ゲノム領域によって異なることを意味している。

5. インプリント遺伝子領域の複製タイミングと核内ゲノム構造

ゲノムインプリンティングは、特定の遺伝子(領域)が父母の何れに由来するかを記憶する現象であり、父方、母方由来の一对のアレル(対立遺伝子)のうち、特定的一方だけが発現する。これは、配偶子形成過程に何らかの刷り込み機構が働くため、その機構の一部としてDNAのメチル化がよく研究されている。最近の研究からインプリンティングを受ける遺伝子(以下、インプリント遺伝子)がクラスターを形成していることが明らかになり、染色体ドメインレベルの研究が展開されつつある。一方で、インプリント遺伝子が存在する領域は、DNA複製タイミングにおいても、アレル間で異なる。文献(25)でも紹介したように、これまでにFISHで調べられたインプリント遺伝子領域は、すべてアレル間で非同調的複製を示す。表3にヒト11番染色体短腕に存在するインスリン様成長因子II型遺伝子(*IGF2*)のゲノムクローンの複製タイミングをFISHで検討した結果を同調的に複製する遺伝子とともに示した。これらの結果は、BrdUの取り込みを検出してS期の核のみを選択したものであるが、表から明らかのように、アレル間で異なる複製タイミングを示すSDパターンが多く、一方のアレル(父方)が、S期前半に複製するのに対し、もう一方のアレル(母方)がS期後半に複製する。他の同調的に複製するクローンはSDパターンは高々10%以下(クローンによっては15%前後となる場合がある)と明らかに低い。さらに、マウス*Igf2*についてはアレル特異的なマーカーを併用したFISHにより、発現している父方のアレルが複製においても早く、非発現の母方のアレルは遅く複製することが示されている⁽²⁶⁾。

表3 インプリント遺伝子のアレル間での非同調的複製

DNA クローン	S期核におけるFISHシグナルのパターン(%)		
	SS	SD	DD
<i>EGF2</i>	28.3	53.0	18.7
<i>TNF</i>	20.2	6.7	73.1
<i>KS43</i>	46.3	8.1	45.6
<i>RFC5</i>	36.2	6.0	57.8

それでは、インプリント遺伝子の発現とそのゲノムの複製タイミングは相関するのだろうか? 答えは、ノーである。*Igf2*の約90 kb テロメア側に存在する*H19*は、母方が発現するのに、複製タイミングについては*Igf2*と同様に父方が早く複製する⁽²⁶⁾。さらに、*Igf2*ゲノムの周辺領域は発現においては、インプリンティングを受ける、受けない点で細かい調節を受けているが、DNA複製タイミングについてはもうすこし広い範囲で同じ一方のアレルが複製するようである。一方、ヒトsmall nuclear ribonucleoprotein-associated polypeptide N (*SNRPN*) 領域のように早い複製タイミングが父方から母方へスイッチするゲノム領域もある⁽²⁷⁾。このようにインプリント遺伝子が存在するゲノム領域は、少なくともMb以上にわたってアレル間で非同調的な複製制御を受け、遺伝子発現と同様に複雑な調節を受け、ゲノム上で複製タイミング制御ドメインともいべき領域を形成していると考えられる。

マウスにおけるインスリン様成長因子II型/マンノース6リン酸受容体遺伝子(*Igf2/Mpr*)領域の複製タイミングも同様である。この遺伝子領域はマウス17番染色体に存在し、アレル間で広大な領域にわたって非同調的複製を示すことが明らかにされている^(23,26)。筆者らは、パラホルムアルデヒドを用いて立体構造を保持するように固定した核についてFISHを行い、細胞周期に依存した核内ゲノムの配置や伸縮を解析しており、このゲノム領域がアレル間でどのような伸縮の相違を示すかを検討した。立体的に固定した線維芽細胞核に対してこの領域に散在するDNAをプローブとしてFISHを行ったところ、個々の核内には父方、母方由来の一对のそれぞれのFISHシグナルが一团となって観察されるが、一方のFISHシグナルはコンパクトにまとまっているのに対し、もう一方のシグナルは広い範囲に伸展している場合が多く観察された。一方のアレルが複製し、もう一方が複製していないときには明らかにアレル間の相違が観察されると予想されるが、両者が複製していないときにゲノムの伸縮に違いがあるのだろうか。この答えを得るために、細胞を同調培養し、マルチカラーFISHを用いて各クローンを描出した。*Igf2/Mpr*を含むG2とセントロメア側の119/6およびテロメア側の9Gの3クローンを用いてFISHを行った結果を図5に示した。119/6、G2間は約2-3 Mb、G2、9G間は0.7-1.1 Mbである(D. P. Barlow,

図5 マウス *Igf 2/Mpr* ドメインのゲノムの伸縮を示す FISH イメージ
一方のアレルがコンパクトな領域を占める。

未発表データ)。これは細胞周期の G_1/S 期の細胞の核の典型的な FISH イメージである。核を立体的に固定しているので、このイメージは数枚のフォーカス面のイメージを合成したものであり、実際の距離を直接的に反映するものではないが、用いた3点の間隔がアレル間で明らかに異なることがわかる。種々の検討により、 S 期の早い時期に複製するアレルが伸展状態にあり、遅い方はコンパクトな領域を占めることを示唆する結果を得ている。また、このようなアレル間の複製タイミングの非同調性、ゲノムの伸縮状態の相違は、ヒストンの脱アセチル化阻害により消失することを見出している⁽²⁴⁾。これは遺伝子発現に影響を与えるヒストンのアセチル化が染色体ドメインレベルの核内ゲノムのダイナミックな構造や複製タイミングにも影響することを意味する。

おわりに

本稿では、FISH による動物ゲノムの構造と DNA 複製の解析例について筆者らの研究を中心に解説した。FISH のゲノム解析計画や生物学への貢献については上述の通りであるが、さらにその応用性を広げるべく技術開発が進められている。例えば、ヒトやマウスの全染色体を異なる色で見分けるマルチカラー FISH、検出感度を上げるための新しい検出系の開発などは、今後のこの技術の応用性をますます高めることになろう^(28,29)。

一方で、細胞核内でのゲノムの動態に関する研究も FISH を駆使して研究が進められ、三次元解析システムの改良、RNA、タンパク質の同時検出なども行われている。また、生きた細胞でのゲノムの動態をみる技術も開発、改良されつつあり、FISH をはじめとする検出系はますます複雑なメカニズムの検証に活用されることになろう。筆者は、動物細胞の核内でゲノムがいかに精妙に構造変化をし、遺伝子(群)の機能を引き出しているか、遺伝子間で如何なる相互作用が可能であるか、また、それらは個体レベルでの表現型といかに関連しているかを明らかにすることを当面の目標としている。このような研究は、極めて基礎的であるにもかかわらず、多面的な応用性も含んでいる。ゲノムの配列が次々に決められ、遺伝子の機能を明らかにすることが目標とされる現在、遺伝子のダイナミックな挙動を視覚化して種々のメカニズムを一つでも多く明らかにしたい。

本研究は、Yale 大学医学部の David C. Ward 教授の指導のもとに開始し、三重大学生物資源学部生物化学研究室において展開したもので、同教授ならびに、有益な助言とご指導を賜りました三重大学名誉教授・嶋林幸英先生、同生物資源学部教授・田口 寛先生に厚く感謝申し上げます。また、共同研究によりご指導いただいた国立遺伝学研究所教授・池村淑道先生、東海大学医学部教授・猪子英俊先生をはじめ、他研究機関の諸先生方、ならびに様々な支援を賜りました三重大学生物資源学部の先生方に心から御礼申し上げます。

最後に、本研究を遂行するにあたって、終始、激励を賜りました京都大学名誉教授・千葉英雄先生に厚く御礼申し上げます。

- (1) P. Lichter and D. C. Ward : *Nature*, **345**, 93-95 (1990).
- (2) 松原謙一・吉川 寛(編) : FISH 実験プロトコル, 秀潤社 (1994).
- (3) E. Takahashi, T. Hori, P. O'Connell, M. Leppert and R. White : *Hum. Genet.*, **86**, 14-16 (1990).
- (4) J. Inazawa, T. Ariyama, T. Tokino, A. Tanigami, Y. Nakamura and T. Abe : *Cytogenet. Cell Genet.*, **65**, 130-135 (1994).
- (5) H-U. G. Weier, M. Wang, J.C. Mullikin, Y. Zhu, J-F. Cheng, K. M. Greulich, A. Bensimon and J. W. Gray : *Hum. Mol. Genet.*, **4**, 1903-1910 (1995).
- (6) K. Okumura, J. Menninger, R. L. Stallings, N. A. Doggett and D. C. Ward : *Cytogenet. Cell*

- Genet.*, **67**, 61-67 (1994).
- (7) R. L. Stallings, N. A. Doggett, K. Okumura and D. C. Ward : *Genomics*, **13**, 332-338 (1992).
- (8) K. Okumura, M. Nogami, H. Taguchi, F. B. Dean, M. Chen, Z.-Q. Pan, J. Hurwitz, A. Shiratori, Y. Murakami, K. Ozawa and T. Eki : *Genomics*, **25**, 274-278 (1995).
- (9) H. Akioka, N. E. Forsberg, N. Ishida, K. Okumura, M. Nogami, H. Taguchi, C. Noda and K. Tanaka : *Biochem. Biophys. Res. Commn.*, **207**, 318-323 (1995).
- (10) K. Okumura, M. Nogami, H. Taguchi, H. Hisamatsu and K. Tanaka : *Genomics*, **27**, 377-379 (1995).
- (11) A. Shiratori, K. Okumura, M. Nogami, H. Taguchi, T. Inoue, T. Ando, M. Izumi, H. Miyazawa, F. Hanaoka, Y. Murakami and T. Eki : *Genomics*, **28**, 350-353 (1995).
- (12) Y. Fujiwara, M. Miwa, K. Okumura, T. Suzuki and M. Ueda : *Hum. Genet.*, in press.
- (13) M. Wada, K. Abe, K. Okumura, H. Taguchi, K. Kohno, F. Imamoto, D. Schlessinger and M. Kuwano : *Nucleic Acid Res.*, **22**, 1651-1654 (1994).
- (14) H. Kusaba, K. Kohno, K. Asakuno, M. Kuwano, K. Okumura, E. D. Green, D. Schlessinger and M. Wada : *Genome Res.*, **5**, 245-258 (1995).
- (15) Y. Matsuda, Y.-N. Harada, S. Nakatsuune-Sakai, K. Lee, T. Shiomi and V. M. Chapman : *Cytogenet. Cell Genet.*, **61**, 282-285 (1992).
- (16) Y. Mukai : Multicolor Fluorescence In Situ Hybridization : A New Tool for Genome Analysis, "Methods of Genome Analysis in Plants", CRC Press, Boca Raton, p.181-192 (1996).
- (17) 奥村克純 : 蛋白質核酸酵素, **37**, 1546-1554 (1992).
- (18) G. P. Holmquist : *Am. J. Hum. Genet.*, **40**, 151-173 (1987).
- (19) S. Selig, K. Okumura, D. C. Ward and H. Cedar : *EMBO J.*, **11**, 1217-1225, および表紙の写真 (1992).
- (20) G. Bernardi, B. Olofsson, J. Filipski, M. Zerial, J. Salinas, G. Cuny, M. Meunier-Rotival and F. Rodier : *Science*, **228**, 953-958 (1985).
- (21) T. Ikemura : *Mol. Biol. Evol.*, **2**, 13-34 (1985).
- (22) T. Fukagawa, K. Sugaya, K. Matsumoto, K. Okumura, A. Ando, H. Inoko and T. Ikemura : *Genomics*, **25**, 184-191 (1995).
- (23) H. Nakamura, T. Morita and C. Sato : *Exp. Cell Res.*, **165**, 291-297 (1986).
- (24) 奥村克純 : 蛋白質核酸酵素, **41**, 2191-2201 (1996).
- (25) 奥村克純 : 組織培養, **21**, 131-134 (1995).
- (26) D. Kitsberg, S. Selig, M. Brandeis, I. Simon, I. Keshet, D. J. Driscoll, R. D. Nicholls and H. Cedar : *Nature*, **364**, 459-463 (1993).
- (27) M. Nakao and H. Sasaki : *J. Biochem.*, **120**, 467-473 (1996).
- (28) M. R. Speicher, S. G. Ballard and D. C. Ward : *Nature Genet.*, **12**, 368-375 (1996).
- (29) E. Schrock, S. du Manoir, T. Veldman, B. Schoell, J. Wienberg, M. A. Ferguson-Smith, Y. Ning, D. H. Ledbetter, I. Bar-Am, D. Soenksen, Y. Garini and T. Ried : *Science*, **273**, 494-497 (1996).