

# 遺伝子材料開発室

## Gene Engineering Division

室長 横山 和 尚  
YOKOYAMA, Kazunari K.

国内外のライフサイエンス研究の動向を踏まえ、研究推進に必要な遺伝子材料を収集、管理、保存および提供するとともに、自ら新しい材料や関連技術の開発を行い、国内外の官、学、民の研究者に広く普及させることを目的とする。更に最近の遺伝子工学技術を習得し、次世代ライフサイエンス研究に必要な遺伝子資源の整備および自己開発研究を行い、中核機関としてのバイオリソースセンターの業務を遂行する。

### 1. 遺伝子材料の開発およびバンキング技術の開発

宿主、ベクター、組換え DNA クローン、YAC、BAC、フォスミド、コスミド、cDNA クローン化ライブラリー等の遺伝子材料のバンキング技術の開発と変異同定法の技術開発（横山、村田、鶴飼、井鍋<sup>\*1</sup>、寺島<sup>\*1</sup>、久次米<sup>\*2</sup>、渡辺<sup>\*2</sup>、広瀬<sup>\*2</sup>、川嶋<sup>\*2</sup>、上野<sup>\*2</sup>、浜田<sup>\*2</sup>）

宿主 76 株、ベクター 371 株、DNA クローン 1,145 株、STS マーカー 53 株、ヒト、哺乳類などの cDNA ライブラリー 22、ヒト SEREX 抗原クローン 200 株、ヒト HLA クローン 25 株、中村& White RFLP マーカークローン 123 株、YAC クローン 35,712 株、マウス cDNA 整列化クローンライブラリー 45,216 株、マウス cDNA 整列化クローンライブラリー 22,407 株、マウス BAC 整列化クローンライブラリー 20,000 株の複製および保存、検定、管理技術の開発を行い、遺伝子材料を整備した。次世代型分譲業務システムの開発を継続し、遺伝子材料の保存、輸送中の品質管理のための変異検出法の技術開発も行った。また毎月メールニュースを発行した。

### 2. マウス発生段階特異的の整列クローン化 cDNA ライブラリーの保存、検定、管理技術の開発（横山、村田、鶴飼、久次米<sup>\*2</sup>、井鍋<sup>\*1</sup>）

マウス胚発生の各ステージに特異的な独立の整列化クローン化 cDNA ライブラリー 7,407 株を米国 NIA/NIH より受け入れ、これらのライブラリーの品質、検査、レプリカ作成を行った。

### 3. 組換えウイルス・コアバンク創設のための組換えウイルス作成と高感度検出法の開発研究（横山、村田、鶴飼、潘<sup>\*1</sup>、寺島<sup>\*1</sup>、井鍋<sup>\*1</sup>、渡辺<sup>\*2</sup>、川嶋<sup>\*2</sup>、福田<sup>\*3</sup>、瀬尾<sup>\*3</sup>、若山<sup>\*3</sup>、濱田<sup>\*4</sup>、斎藤<sup>\*4</sup>、安部井<sup>\*4</sup>）

DNA バンク寄託完全長 cDNA クローンの組換えウイルス化を行い、現在までに 342 株を作成、管理、保存した。現在もこの作業を継続中である。組換えウイルスのプロモーターの改変、キメラ組換えウイルスの作成、ヒト p53 組換えウイルス変異部位の検出を DNA フィンガー法で解析し、その変異部位の決定を行った。また共同研究として ES 細

胞への遺伝子導入や胆道がんの遺伝子治療のための基礎研究を筑波大学医学部と共同で行っている。

### 4. 遺伝子材料 DNA 大量調製業務に関する共同研究（横山、孫<sup>\*5</sup>、金<sup>\*4</sup>）

寄託遺伝子材料の大量調製業務の一部を中国医科大学（中国瀋陽市）、復旦大学・遺伝学研究所（中国上海市）や中国科学院・生化学研究所（中国上海市）と共同で行い、その評価を行った。

### 5. 機能性核酸、ウイルスベクターを用いた遺伝子治療法の技術開発と医薬品開発のための開発研究（横山、村田、鶴飼、潘<sup>\*1</sup>、久次米<sup>\*2</sup>、渡辺<sup>\*2</sup>、広瀬<sup>\*2</sup>、川崎<sup>\*4</sup>、井鍋<sup>\*1</sup>、寺島<sup>\*1</sup>）

アンチセンス、リボザイムベクター・SiRNA を用いた遺伝子の機能研究および医薬品開発のための基礎研究のためにその作用機序の解析とレセプタータンパク質の同定を行った。

### 6. 遺伝機能解析、ライブラリーセット化技術に関する開発研究とその発現システムの評価研究（横山、村田、鶴飼、岸川<sup>\*1</sup>、畠間<sup>\*1</sup>、川崎<sup>\*4</sup>、金<sup>\*4</sup>、蔡<sup>\*4</sup>、平野<sup>\*6</sup>）

胚性幹細胞の分化誘導や胚性腫瘍細胞の脱がん化、分化療法を目指した研究開発を目標にする。アデノウイルス E1A 結合タンパク質 p300/CBP による c-jun のトランス活性化に ATF-2 が必要であり、この ATF-2 の抑制因子 JDP2 を同定した。JDP2 のクロマチンを介した転写制御機構と分化制御に焦点をあて解析中である。また、ショウジョウバエの poly A ポリメラーゼ hiiragi がアポトーシス反応に関係していることを明らかにした。

### 7. モデル動物由来 ES 細胞への遺伝子導入法と個体発生の技術開発（横山、村田、鶴飼、渡辺<sup>\*2</sup>、広瀬<sup>\*2</sup>、畠間<sup>\*1</sup>、岸川<sup>\*1</sup>、齋藤<sup>\*4</sup>、山本<sup>\*4</sup>、南橋<sup>\*4</sup>）

ラット、ウシ、ウマの ES 細胞を in vitro で神経系、血球系の細胞に分化させることに成功した。またウシの ES 細胞由来クローン化個体の作成に成功した。

<sup>\*1</sup> 研究協力員、<sup>\*2</sup> 業務委託、<sup>\*3</sup> 研修生、<sup>\*4</sup> 共同研究員、<sup>\*5</sup> 客員研究員、<sup>\*6</sup> 訪問研究員

The Gene Engineering Division (DNA Bank) is organized under the supervision of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of JAPAN (MEXT) as unique, non-profit resource center dedicated to the isolation, preservation, and the distribution of the

cloned DNAs, the gene libraries (cDNA, Phage, Cosmid, BAC, Phosmid, YAC library), vectors, hosts, recombinant viruses and the ordered library-sets from human, mouse, microorganisms, viruses, and other animal cells. Our division performs and sponsors research to improve and standardize the technologies of characterization, preservation, and distribution of such genetic materials. We also play a vital role in bioscience to teach the recombinant technology and educate the scientists and the students of bioscience.

### Research Subjects and Members of Gene Engineering Division

1. Development of banking system of DNA resources
2. Large-scale preparation of ordered mouse cDNA cloned library
3. Construction of recombinant virus-core bank and study of "virome"
4. Collaborative sites work for large-scale preparation of DNA resources
5. Therapeutic use of antisense, ribozyme and siRNA technologies
6. Study of "transcriptome" for DNA banking
7. Epigenetic molecular study of ES cells and generation of cloned animals

### Head

Dr. Kazunari K. YOKOYAMA

### Members

Dr. Takehide MURATA  
Mr. Hideyo UGAI  
Dr. Shotaro KISHIKAWA  
Dr. Shinichi HATAMA  
Dr. Jianzhi PAN  
Ms. Kumiko INABE  
Ms. Miho TERASHIMA

### Visiting Members

Dr. Masato ABEI (Med. Sch., Univ. Tsukuba)  
Dr. Wei CAI (China Med. Univ., China)  
Dr. Hirofumi HAMADA (Sapporo Med. Univ.)  
Ms. Yuko HAMADA (Science Service Inc.)  
Dr. Tetsuo HIRANO (Hiroshima Univ.)  
Ms. Megumi HIROSE (Science Service Inc.)  
Dr. Chunyuan JIN (China Med. Univ., China)  
Dr. Hiroaki KAWASAKI (Univ. Tokyo)  
Ms. Rika KAWASHIMA (Science Service Inc.)  
Ms. Yukari KUJIME (Science Service Inc.)  
Mr. Akira MINAMIHASHI (Hokkaido Animal Res. Cen.)  
Dr. Izumu SAITO (Inst. Med. Sci., Univ. Tokyo)  
Dr. Shigeo SAITO (Saito Lab. Cell Technol.)  
Dr. Kailai SUN (China Med. Univ., China)  
Ms. Kazuko UENO (Science Service Inc.)

Ms. Sanae WATANABE (Science Service Inc.)  
Dr. Yusuke YAMAMOTO (Hokkaido Animal Res. Cen.)

### Trainees

Mr. Kuniaki FUKUDA (Med. Sch., Univ. Tsukuba)  
Ms. Emiko SEO (Med. Sch., Univ. Tsukuba)  
Ms. Mariko WAKAYAMA (Med. Sch., Univ. Tsukuba)

### 誌 上 発 表 Publications

#### [ 雑 誌 ]

( 原 著 論 文 ) \* 印 は 査 読 制 度 が ある 論 文

- Ugai H., Li H., Komatsu M., Tsutsui H., Song J., Shiga T., Fearon E., Murata T., and Yokoyama K.: "Interaction of Myc-associated zinc finger protein with DCC, the product of a tumor-suppressor gene, during the neural differentiation of P19 EC cells", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286**, 1087–1097 (2001). \*
- Kishikawa S., Murata T., Kimura H., Shiota K., and Yokoyama K.: "Regulation of transcription of the *Dnmt1* gene by Sp1 and Sp3 zinc finger proteins", *Eur. J. Biochem.* **269**, 2961–2970 (2002). \*
- Saito S., Ugai H., Sawai K., Yusuke Y., Minamihashi A., Kurosaki K., Kobayashi Y., Murata T., Obata Y., and Yokoyama K.: "Isolation of embryonic stem-like cells from equine blastocysts and their differentiation in vitro", *FEBS Lett.* **531**, 389–396 (2002). \*
- Takahashi N., Kawada T., Yamamoto T., Goto T., Taimatsu A., Aoki N., Kawasaki H., Taira K., Yokoyama K., Kamei Y., and Fushiki T.: "Overexpression and ribozyme-mediated targeting of transcriptional coactivators CREB-binding protein and p300 revealed their indispensable roles in adipocyte differentiation through the regulation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ", *J. Biol. Chem.* **277**, 16906–16912 (2002). \*
- Cui Y., Mirkia K., Fu F. Y., Zhu L., Yokoyama K., and Chiu R.: "Interaction of the retinoblastoma gene product, RB, with cyclophilin A negatively affects cyclosporin-inhibited NFAT signaling", *J. Cell. Biochem.* **86**, 630–641 (2002). \*
- Ugai H., Watanabe S., Suzuki E., Nakata H., Yokoyama K., and Murata T.: "Stability of a recombinant adenoviral vector: Optimization of conditions for storage, transport and delivery", *Jpn. J. Cancer Res.* **93**, 598–603 (2002). \*
- Jin C., Li H., Murata T., Sun K., Horikoshi M., Chiu R., and Yokoyama K.: "JDP2, a repressor of AP-1, recruits a histone deacetylase 3 complex to inhibit the retinoic acid-induced differentiation of F9 cells", *Mol. Cell. Biol.* **22**, 4815–4826 (2002). \*
- Jin C., Li H., Ugai H., Murata T., and Yokoyama K.: "Transcriptional regulation of the *c-jun* gene by AP-1 repressor protein JDP2 during the differentiation of F9 cells", *Nucleic Acids Res. Suppl.*, No. 2, pp. 97–98 (2002). \*

Kishikawa S., Ugai H., Murata T., and Yokoyama K.: "Roles of histone acetylation in the Dnmt1 gene expression", *Nucleic Acids Res. Suppl.*, No. 2, pp. 209–210 (2002). \*

Murata T., Ugai H., and Yokoyama K.: "Function of poly(A) polymerase in eukaryotes", *Recent Res. Dev. Biochem.* **3**, 85–97 (2002). \*

Ugai H., Suzuki E., Inabe K., Murata T., Hamada H., and Yokoyama K.: "Spontaneous mutations in the human gene for p53 in recombinant adenovirus during multiple passages in human embryonic kidney 293 cells", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**, 448–456 (2003). \*

横山和尚, 斉藤成夫: "胚性幹細胞の多分化能の改変とクロマチン制御", *細胞工学* **20**, 88–96 (2001). \*

(総説)

斉藤成夫, 横山和尚: "胚性幹細胞細胞工学的応用と多分化能の分子機構", *化学と生物* **40**, 82–89 (2002).

長曾秀幸, 村田武英, 横山和尚: "タンパク質と RNA の *in situ* 同時検出法", *実験医学* **20**, 915–920 (2002).

#### 口頭発表 Oral Presentations

(国際会議等)

Fukuda K., Abei M., Ugai H., Seo E., Todoroki T., Hamada H., Yokoyama K., and Tanaka N.: "Gene therapy for gallbladder cancer using replication-competent E1 mutant adenovirus vectors", 5th World Congr. of the Int. Hepato-Pancreato-Biliary Assoc., Tokyo, Apr. (2002).

Fukuda K., Abei M., Ugai H., Yokoyama K., and Tanaka N.: "Experimental gene therapy using tumor-specific replicating adenovirus vectors", *Digestive Disease Week-2002*, San Francisco, USA, May (2002).

Yokoyama K., Song J., Jin C., Li H., Ugai H., and Murata T.: "Regulation of the transcription of a housekeeping gene by two different zinc-finger proteins", *Cold Spring Harbor Laboratory Meet. on Cancer Genetics & Tumor Suppressor Genes*, Cold Spring Harbor, USA, Aug. (2002).

Jin C., Li H., and Yokoyama K.: "Role of a repressor of Ap-1, JDP2, in the control of retinoic acid-induced differentiation of F9 cells", *Cold Spring Harbor Laboratory Meet. on Cancer Genetics & Tumor Suppressor Genes*, Cold Spring Harbor, USA, Aug. (2002).

Kishikawa S., Murata T., and Yokoyama K.: "Regulation of transcription the *Dnmt1* gene by Sp1 and Sp3 zinc finger proteins", *Cold Spring Harbor Meet. on Dynamic Organization of Nuclear Function*, Cold Spring Harbor, USA, Sept. (2002).

(国内会議)

岸川昭太郎, 横山和尚: "Regulation of transcription DNMT1 gene by Sp1 and Sp3 zinc finger proteins", 第 11 回マクロファージ分子細胞生物学研究会, 新潟, 6 月 (2002).

金春元, 横山和尚: "Transcriptional regulation of the c-jun

gene by the JDP2/HDAC3 complex during the differentiation of F9 cells", 第 6 回がん分子標的治療研究会総会, 札幌, 6 月 (2002).

岸川昭太郎, 横山和尚: "Sp3 及び Sp1 による DNA メチル化酵素 Dnmt1 遺伝子の転写調節機構の解析", 第 6 回がん分子標的治療研究会総会, 札幌, 6 月 (2002).

福田邦明, 安部井誠人, 鶴飼英世, 瀬尾恵美子, 濱田洋文, 田中直見, 横山和尚: "Experimental gene therapy for gallbladder cancer using tumor-specific replicating E1 mutant adenoviral vectors", 第 8 回日本遺伝子治療学会, 東京, 7 月 (2002).

村田武英, 渡辺早苗, 久次米夕佳里, 広瀬めぐみ, 鶴飼英世, 鈴木恵理香, 横山和尚: "Establish of operation procedure to detect adenovirus E1A and E1B", 第 8 回日本遺伝子治療学会, 東京, 7 月 (2002).

鶴飼英世, 鈴木恵理香, 久次米夕佳里, 渡辺早苗, 広瀬めぐみ, 村田武英, 横山和尚: "Virus core-bank projects: recombinant adenoviral vectors as a tool for functional research", 第 8 回日本遺伝子治療学会, 東京, 7 月 (2002).

金春元, 李紅杰, 横山和尚: "Direct inhibition of p300 histone acetyltransferase activity by AP-1 repressor protein JDP2", 第 61 回日本癌学会総会, 横浜, 10 月 (2002).

金春元, 李紅杰, 鶴飼英世, 村田武英, 横山和尚: "Modulation of histone acetylation state by AP-1 repressor protein JDP2", 第 61 回日本癌学会総会, 横浜, 10 月 (2002).

岸川昭太郎, 横山和尚: "DNA メチル化酵素 Dnmt1 遺伝子の転写調節機構の解析", 第 61 回日本癌学会総会, 横浜, 10 月 (2002).

福田邦明, 安部井誠人, 瀬尾恵美子, 鶴飼英世, 村田武英, 轟健, 濱田洋文, 田中直見, 横山和尚: "E1 変異アデノウイルスの胆嚢癌に対する腫瘍融解効果とヒト正常細胞に対する安全性の実験的解析", 第 61 回日本癌学会総会, 横浜, 10 月 (2002).

鶴飼英世, 村田武英, 濱田洋文, 横山和尚: "ファイバー修飾型組換えアデノウイルスの遺伝子変異とその不安定性", 第 61 回日本癌学会総会, 横浜, 10 月 (2002).

李紅杰, 畠間真一, 金春元, 鶴飼英世, 村田武英, 横山和尚: "マウス JDP2 プロモーターのクローニングと同定", 第 61 回日本癌学会総会, 横浜, 10 月 (2002).

村田武英, 鶴飼英世, 鈴木恵理香, 横山和尚: "組換えアデノウイルスに混入する自律増殖可能アデノウイルス検出手法", 第 61 回日本癌学会総会, 横浜, 10 月 (2002).

村田武英, 長曾秀幸, 横山和尚: "A mutation reduced enzymatic activity of Drosophila poly(A) polymerase", 第 75 回日本生化学会大会, 京都, 10 月 (2002).

岸川昭太郎, 横山和尚: "DNA メチル化酵素 Dnmt1 遺伝子の転写調節機構の解析", 第 75 回日本生化学会大会, 京都, 10 月 (2002).

金春元, 李紅杰, 鶴飼英世, 村田武英, 横山和尚: "AP1 リプレッサー JDP2 による胚性腫瘍細胞 F9 の分化制御機構", 第 29 回核酸化学シンポジウム, 京都, 11 月 (2002).

岸川昭太郎, 鶴飼英世, 村田武英, 横山和尚: "DNA メチル化酵素 Dnmt1 転写制御におけるヒストンアセチル化の影響", 第 29 回核酸化学シンポジウム, 京都, 11 月 (2002).

村田武英, 鶴飼英世, 横山和尚: "Identification of dom-

inant negative mutation of poly (A) Polymerase of Drosophila”, 第 25 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 (2002).

金春元, 李紅杰, 鵜飼英世, 村田武英, 横山和尚: “Mechanism of Jun dimerization protein 2-mediated modulation of histone acetylation”, 第 25 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 (2002).

潘建治, 村田武英, 鵜飼英世, 横山和尚: “RIKEN DNA Bank プロモーターバンク構築の戦略及び手法”, 第 25 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 (2002).

久次米夕佳里, 渡辺早苗, 広瀬めぐみ, 井鍋久美子, 鵜飼英世, 村田武英, 横山和尚: “クローンセットバンクの設立とその品質管理のための技術開発”, 第 25 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 (2002).

岸川昭太郎, 塩田邦郎, 横山和尚: “ヒストンアセチル化による DNA メチル化酵素 Dnmt1 遺伝子の転写調節機構の解析”, 第 25 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 (2002). 鵜飼英世, 井鍋久美子, 広瀬めぐみ, 渡辺早苗, 久次米夕佳里,

村田武英, 濱田洋文, 横山和尚: “ファイバー修飾型組換えアデノウイルスの遺伝子変異の解析”, 第 25 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 (2002).

横山和尚, 金春元, 畠間真一, 鵜飼英世, 村田武英: “レチノイン酸による細胞分化とクロマチン制御”, 第 25 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 (2002).

畠間真一, 李紅杰, 金春元, 鵜飼英世, 村田武英, 横山和尚: “癌抑制遺伝子 p53 による Ap-1 リプレッサー JDP2 遺伝子の転写制御機構の解析”, 第 25 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 (2002).

井鍋久美子, 鵜飼英世, 広瀬めぐみ, 渡辺早苗, 久次米夕佳里, 村田武英, 濱田洋文, 横山和尚: “組換えアデノウイルスの遺伝子変異検出法の確立”, 第 25 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 (2002).

広瀬めぐみ, 渡辺早苗, 久次米夕佳里, 井鍋久美子, 鵜飼英世, 村田武英, 横山和尚: “組換えアデノウイルスの品質管理と輸送時の安定性”, 第 25 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 (2002).