

葉山高等研究センター研究プロジェクト研究報告書

研究課題名「遺伝子進化の実験的試み」

申請研究プロジェクト：人間生命科学

研究期間：平成18年度～平成21年度

プロジェクト代表者：堀内 嵩：総合研究大学院大学 先導科学研究科 生命体科学専攻 教授（分子生物学）

チーム代表者

堀内 嵩：同上

田辺秀之：総合研究大学院大学・先導科学研究科・生命体科学専攻・准教授（細胞生物学）

チーム編成

堀内チーム

堀内 嵩

定塚勝樹 総合研究大学院大学・生命科学研究科・基礎生物学専攻・助教（分子遺伝学）

渡邊孝明 総合研究大学院大学・生命科学研究科・基礎生物学専攻・助教（ゲノム動態学）

児玉顕一 基礎生物学研究所・研究員（ゲノム動態学）

板津昌子 総合研究大学院大学・生命科学研究科・基礎生物学専攻（ゲノム動態学）

岡本治子 総合研究大学院大学・生命科学研究科・基礎生物学専攻（ゲノム動態学）

田辺チーム

田辺秀之

千葉磨玲 総合研究大学院大学・先導科学研究科・生命共生体進化学専攻（分子細胞生物学）

研究の目的

生物進化の問題は、ゲノム配列の決定や分子生物学的手法の進歩にも関わらず、未解決の魅力あるものとして残されている。我々にとって生物進化の問題は余りにも大きく、取っ掛かりさえ見いだせないが、遺伝子進化に限れば、大いに魅力的なテーマとなる。少なくとも、それは生物進化の一部であろうし、攻める方法も皆無では無さそうである。

本プロジェクトではテーマを遺伝子のマイクロ進化と遺伝子増幅の問題に絞った。具体的に話そう。例えば殺虫剤を畑に散布しても、それにたいして抵抗性を有する害虫が出てくる。それらを調べると、本来の昆虫は殺虫剤を分解する酵素は持っていないものの、僅かに分解する酵素を保有し、それが変化して抵抗性を示すことが分かってきた。それには3種あり、その酵素自身が質的に変化（構造遺伝子内の変異）し、殺虫剤を効率良く分解できるようになったもの、その遺伝子のプロモーター部分に変異が入り、その酵素が多量に生産された結果抵抗性を獲得したもの、その遺伝子が増幅し、同じく抵抗性を獲得したものである。非常にマイクロな進化ながら、興味ある結果である。我々はここでは、(1) 大腸菌を用い、この昆虫と同様の条件を設定し、マイクロな進化実験を行うこと（マイクロ進化実験と呼ぶ）、(2) 酵母や動物細胞を用いて遺伝子増幅の機構を明らかにし、それを利用して実験的な遺伝子進化（遺伝子増幅実験と呼ぶ）を試みることを目指した。

(1-A) ミクロ進化実験の概要

大腸菌を用いたマイクロ進化実験

大腸菌K12株は、糖基質であるキシリトールやリビトールを資化することができない。しかし、C株は、キシリトールと構造的に類似する糖、リビトールを資化する酵素群（遺伝子群）を有するため、C株をキシリトール培地で選択すると、リビトール資化遺伝子群に変異或いは増幅が起こり、キシリトールを弱いながら資化できるクローンを得ることが出来る。この系を解析の容易なK12株に構築

し、遺伝子増幅と変異導入のモデル系にした。まずリビトール資化酵素

Pentitol pathways of *E. coli* C

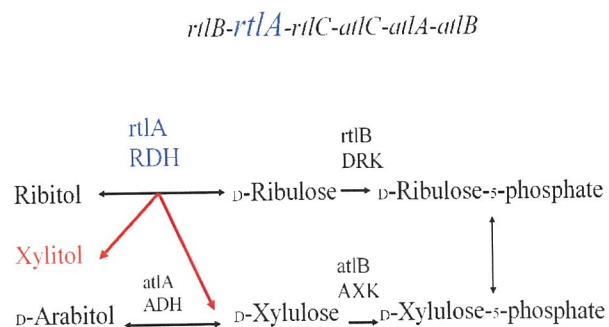


図 1 大腸菌 C 株の糖アルコール分解酵素、活性と遺伝子と構造

群遺伝子をC株からK12株へ移した。この株を使って以下の実験を行った。(1) 移した遺伝子群の一つの遺伝子 $rtlA$ (ribitol dehydrogenase) は、図1のように本来リビトールを分解し、リブロースとするが、この酵素はキシリトールを僅かに分解し、キシルロースとする活性を有する。この酵素をコードする $rtlA$ 遺伝子を、以前我々が開発した遺伝子増幅系で増幅し、それがキシリトール培地で生育するかどうかを調べ、さらにそこに変異が入り、より効率良く分解する酵素に変化するかどうかを調べる、(2) リビトール資化酵素遺伝子群を有するK12株をキシリトール培地で培養することで、キシリトールを資化出来るように変化した株を分離し、そのゲノム上の変化を調べ、マイクロ進化のゲノム動態を明らかにしようとした。

(1-B) ミクロ進化実験の結果

大腸菌 C 株が有する糖アルコール分解酵素遺伝子群 (前ページの図) を、ページ P1 の形質導入を利用して、K12 株に移した。C 株のこの遺伝子群の領域は、この遺伝子群を除くと他は全く K12 株と同じであることから、容易に移すことが出来る。この遺伝子群は、Ribitol と D-Arabitol を分解する4つ酵素コードする遺伝子 ($rtlA$ と B と $atlA$ と B) と2つの抑制遺伝子 ($rtlC$ と $atlC$) をコードし、その遺伝子構造は図1の上部に示した。これら2グループの遺伝子は鏡像関係にあり、転写はいずれも中央から外側へ向かう。これらの遺伝子は、それらの糖アルコールが存在しないと、2つの抑制遺伝子 $rtlC$ と $atlC$ により抑制される。 rtl と atl 遺伝子群は、Ribitol と D-Arabitol をそれぞれ分解し、リン酸化する。問題の Xylitol は資化

されないが、 $rtlA$ のコードする Ribitol 脱水素酵素は、僅かに Xylitol を脱水素化し、D-xylulose とする。

(i) $rtlA$ の増幅株の作成と性質：この K12 株の $rtlA$ 部分を以前我々が見出した遺伝子増幅の系を利用して、増幅させたところ、親株は殆ど生育出来な

大腸菌選択 (キシリトール) 培地における連続培養

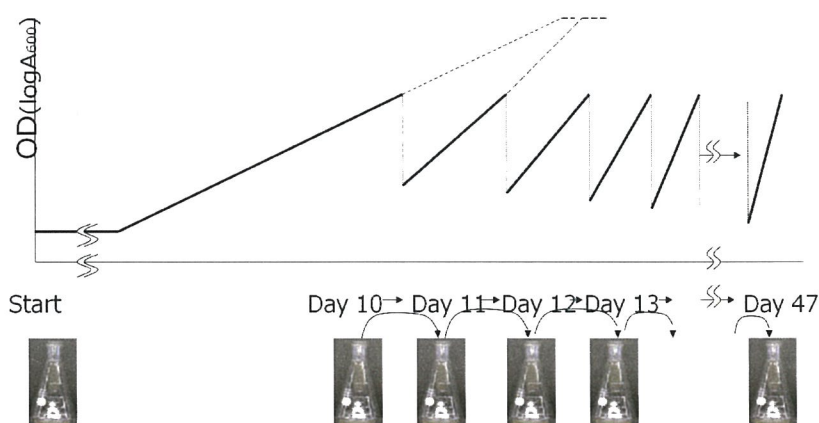


図 2 ミクロ進化実験系

いものの、増幅株は予想通り Xylitol の寒天培地上で生育できた。生育は予想したほど良くなく、期待していたような増幅遺伝子の一部に変異が入り、より生育の良いクローンの出現は少なくとも短期間の培養では見られなかった。

(ii) 親株を xylitol 液体培地で連続培養し、生育してくる株のゲノム構造解析: 連続培養は図 2 に示した。 図のように、Xylitol 培地に親株を接種し培養を開始する。開始後しばらくは全く増殖が見られないが、一週間から 10 日程経過後、

培地が濁りだし生育が認められるようになる。一定の OD (濁り単位) 毎に植え次いで 1~2 ヶ月培養を継続し解析を行う。図のように、最初生育は悪いが、徐々に良くなっていく。経時毎に試料を回収し、目的の領域の変化を PCR や塩基配列決定等で決定する。

上述したように Xylitol の代謝は、Ribitol 脱水素酵素 (*rtlA*) が最初に関与する。

そのため、Xylitol 培地で生育するためには、これまでの解析から (1) *rtlA* 遺伝子の発現を抑制する *rtlC* が不活化され *rtlA* の発現を高めるか、(2) *rtlA* 自身が質的に変化して Xylitol を分解するようになるかのどちらかである。それらの変化を追ったデータの一例を図 3 に示す。これは、C 株と K12 株をそれぞれキシリトール培地で連続的に 5 つの培養液で培養し、生育してきた株について、配列決定と PCR

を用いて 2 種類の遺伝子の変化を追ったものである。数字は、一つのフラスコ

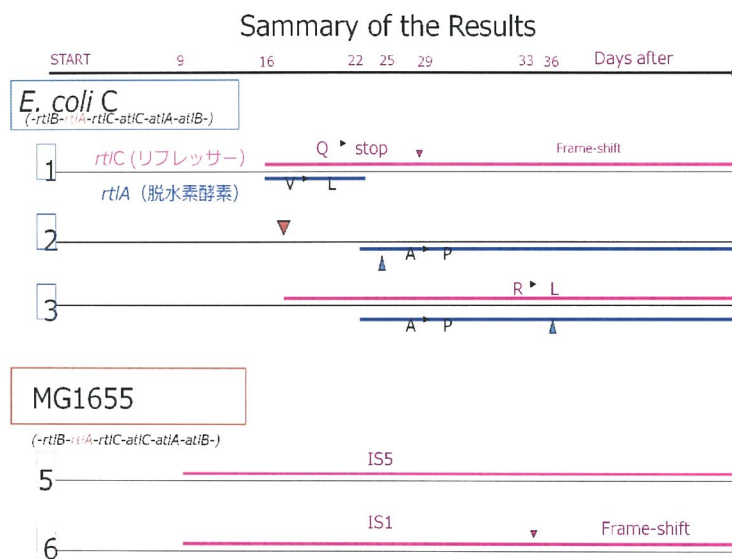


図 3 キシリトール培地で生育してきた株の変化

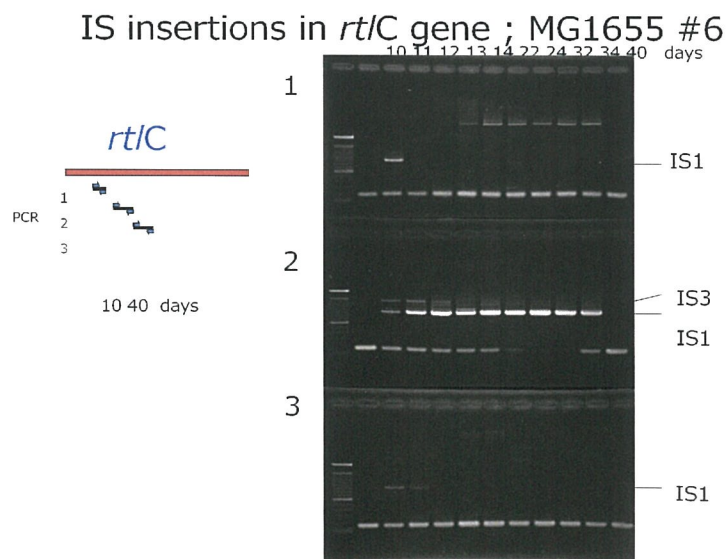


図 4 *rtlC* 遺伝子内に挿入された IS の計時的変化

内での変化を示し、赤線は、*rtlC* の失活変異、*rtlA* の質的変異（点突然変異）が起こることが示されている。*rtlC* の不活化は、点変異による停止コドンへの変化、フレームシフト、IS（挿入配列）の挿入が起こる。一方、*rtlA* の質的変異は勿論、点変異に依っていた（A→P による質的変化は報告あり）。一つの培養液で同時に、或いは連続的に、独立に複数の変化が起こることが分かった。

別の実験の例を挙げる。*rtlC* 遺伝子を、3つの領域に分け、それぞれについてPCRの結果を図4に示した。興味深いことに、独立に複数のIS配列が、初期にこの遺伝子への挿入が起こり、失活が起こっていることが分かる（未同定の挿入有り）。配列決定の結果と合わせた結果を図5に示した。ごく初期に多数のISが*rtlC* 遺伝子内に挿入され、その中から、恐らく増殖速度の速いクローンが選択されるが、最終的には、後から起こったフレームシフト変異による株が、他よりも優勢になることが分かる。恐らく、生育速度が最も早いと想像される。

その他の例としては、図6に示したように、同じISがこのオペロンに2ヶ、しかも direct repeat 構造を有した形で挿入された結果、*rtlC* が失活すると共に、*rtlA* 遺伝子が倍化することから、選択されてきたクローンもあった。

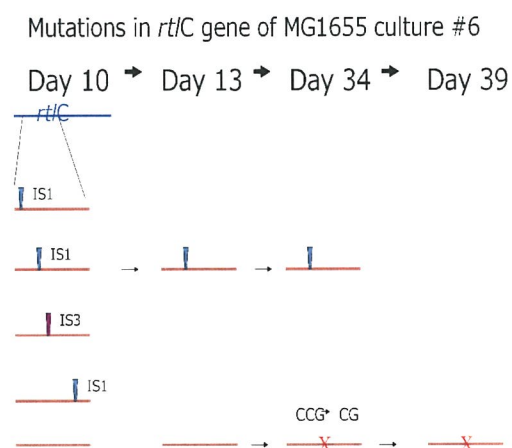


図5 図4の変化を図示した図

(1-C) まとめ

- (1) 一つの培養液内においても、独立した複数の変化が起きる。
- (2) 変化は、ISの挿入、変異、増幅が起こる。
- (3) C株は点変異が起き、K12株はISの挿入が優勢である。
- (4) *rtlA* 発現のリプレッサー*rtlC* に挿入されるISは多様であり、選択により生育の良いのが生き残ると予想される。
- (5) 系により異なるクローンが選択される。
- (6) 少なくともこの期間では、変化が継続している。
- (7) ISの転移が、菌がキシリトール培地に植えられると、活性化される可能

Genes duplication observed

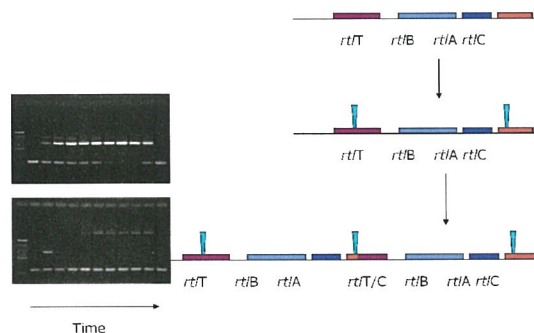


図6 挿入された2ヶのISを介した遺伝子の倍化

性がある。

一つの少量の培養液の中においても、ゲノムに予想以上に多種多様な変化がダイナミックに起こり、それらの間に生存競争が起こり、その中の最適なものが選択される様子が垣間見えた。この系がミクロな実験的進化系として、十分利用できることが分かった。

(2-A) 遺伝子増幅実験の目的

上述したように、生物は多種多様な酵素遺伝子を有しており、様々な低分子物質に対して効率は悪いものの、わずかに分解できる酵素をコードした遺伝子を保有し、その遺伝子が増幅することによって、未経験の生育阻害物質の攻撃にも対応していける能力を有すると考えられる。我々はこの遺伝子増幅を一つの進化と考え、ここでは、まずその機構を明らかにしようとした。増幅には、大きく分けて2種類ある。rRNA (リボソーム RNA) 遺伝子型と薬剤耐性遺伝子 (がん遺伝子) 型である。前者の特徴が遺伝子のダイレクトリピート構造 (DR: →→→→) であるのに対し、後者はインバトリピート構造 (IR: →←→←) を有する。どちらの増幅機構もごく最近まで不明であった。我々は、まず前者の機構に突破口を開き (Genes Dev. 1998 他)、その後詳しい解析を行い成果を得てきたが、それと共に、後者の機構解明に挑戦した。本研究がそれである。後者の遺伝子増幅は、(1) 新しい性質、例えば薬剤耐性を生物に新たに付与する機構であること (事実)、(2) さらに増幅した多数の遺伝子特異的に変異が導入されれば、新たな機能を有する遺伝子が生まれる可能性があり (仮説)、それを明らかにするのが本研究の目的である。

このタイプの遺伝子増幅の機構は、以前から非常に複雑であることが予想されて来た。というのは、がん遺伝子の増幅はがんの悪性化に関与することから、医学分野で30年以上ヒトを中心に徹底的に解析されてきたにも関わらず、その機構を今もって解明出来ていないからである。そのため、我々はこれまでとは全く異なる解析方法を採用した。材料にはゲノム構造の簡単でその操作が容易な酵母を用い、こちらがデザインした増幅を試みた。このタイプの遺伝子増幅の特徴は、高速で増幅すること、増幅した遺伝子はインバトリピート構造を採ることである。そこで我々は、それらの特徴を満足させると予想されるダブルローリングサークル複製 (DRCR) を、遺伝子増幅に直接関与するプロセスと仮定した。そこで DRCR を誘導するため、人工的にゲノムの特異的な2箇所にも2本鎖切断を導入したところ、おそらく DRCR を誘導によって生じたと思われる、動物培養細胞で見られる2種類の遺伝子増幅産物 (HSR と DM と呼ぶ) に酷似した産物を得ることができた¹⁾。

ここではさらに DRCR がガン遺伝子タイプの遺伝子増幅反応であることをよ

り確かめるために、上述した方法と全く異なる方法（Cre-lox と呼ばれる特異的組換え）により DRCR を誘導した場合についての実験結果をここで報告する。

(2-B) 研究成果

(i) 酵母における Cre-lox による DRCR の誘導

Cre-lox は、いかなる生物においても効率良く部位特異的組換えを起こすことから、多用されている組換えシステムの一つである。一般には、図7に示したように、一对の lox 配列をダイレクトリピート (DR) に配置すると Cre タンパクにより挟まれた領域が欠失するし、インバトリピート (IR) の場合は、挟まれた領域が反転する。ここでは後者の配置だが、複製との共役した場合を考えてほしい。図8のように、複製

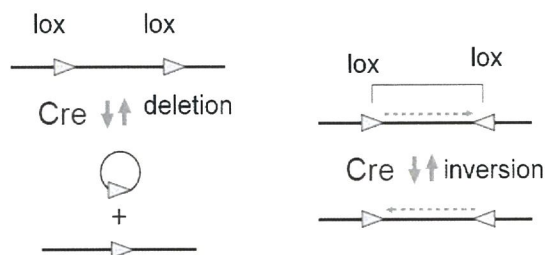


図3 Cre-lox による部位特異的組換え

フォークが一对の lox 間を通過中に組換えが起こると、複製フォークの進行が逆転し、これまで複製してきた部分を再度複製しだし、最終的には、一本の完全な染色体と、IR 構造を有するミニ線状染色体が生じるはずである。この反応を組換え的テンプレート変換：Recombinational template switching (RTS) と名付けた。

これを調べるために以下の実験を行った。ロイシン要求性の出芽酵母の特定の染色体の末端近傍にある複製開始点 (ARS) の近くに一对の lox を配置し、その間に *lue2d* 遺伝子を挿入した株を用意した。*lue2d* 遺伝子のプロモーターは部分欠損しているため、この遺伝子が増幅して始めてロイシン要求性が消失する。この株に Cre 発現プラスミドを導入したところ、コントロールプラスミドに比べ、約7000倍多くの *Lue*⁺ コロニーが出現した。その株を直接パルスフィールド電気泳動 (PFGE) で解析したところ、予想通り全てが同じ IR 構造の *lue2d* を有するミニ線状染色体を有していた。コピー数は15~20程であった。

同様の反応が2対の lox で起こった場合の予想される反応を図9に示した。この場合、2対の lox は複製開始点 (ARS) を挟むように配置した。両方向に進んだ複製が2対の lox 間に来た時、組換えが同時に起こると、図3のようにシスとトランス2種類の組換え反応が起こるだろう。トランスの場合は図3左に示したように、生じた二つのフォー

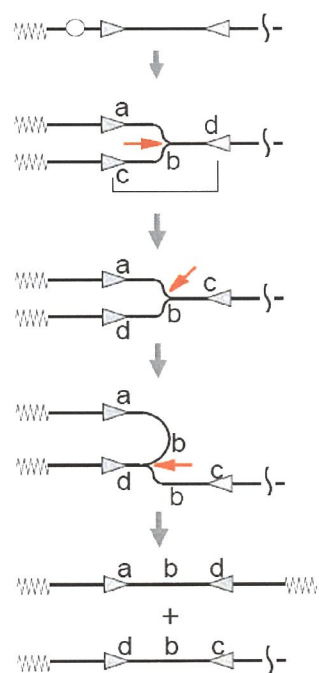
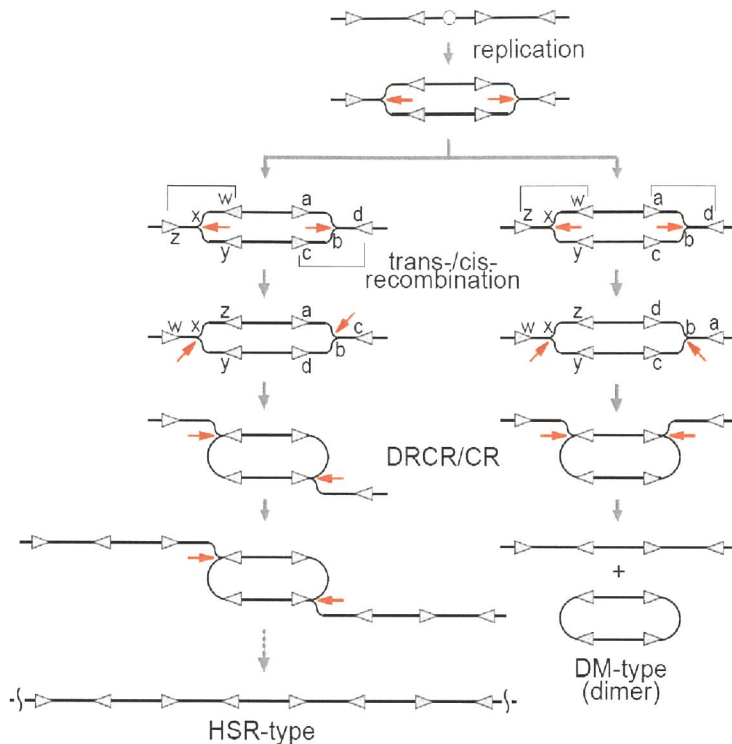


図4 複製と共役した Cre-lox 組換え反応

クは互いに追い掛け合いになり、DRCR が起こり、HSR (homogeneous staining region) タイプの産物が得られると予想される。一方シスの場合、収斂性の複製 (convergent replication: CR) が起こり、IR 構造を有する 2 量体の環状ミニ染色体、つまり DM (double minutes) タイプのプラスミドが生まれることが予想される。

実際、既知の ARS を挟むように 2 対の *lox* を配置し、この場合も上と同じように増幅選択遺伝子 *lue2d* 遺伝子を ARS 近傍に挿入した。この株で Cre タンパクを発現したところ、同じくコントロールに比べ約 7000 倍の *Lue*⁺コロニーが出現し、それらの染色体をパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) で解析したところ、2 種類に分かれ、一つは線状の IR 構造を有



するミニ染色体 (DM タイプ) を多コピー有するクロ

図 5 複製と共役した 2 対の *lox* 間の組換え反応

ーンと、*lox-lue2d* 部分が染色体上で 50~100 コピー増幅した HSR タイプのクロオンであった。後者は、予想通りの構造を有していたが、前者は環状ではなく、線状ミニ染色体であった。これについては後に考察する。

(ii) CHO (チャイニーズハムスター卵巣細胞) を用いた遺伝子増幅

(1) の後半で行った実験を、CHO を用いて行った。CHO 細胞は、酵母とは進化的には進化的には離れているが、基本的には酵母で構築したと同様に、2 対の *lox* を複製開始点を挟むように配置し、その間に増幅選択マーカーとして DHFR を配置した。DHFR は増幅すると、細胞の生育阻害剤であるメトキシレート (MTX) 耐性を与え、CHO を用いた遺伝子増幅に多用されている。CHO から段階的に MTX の濃度を上げながら、その中から MTX 耐性クローンを分離することで、最終的に多数の耐性クローンを得た。目的の DHFR 遺伝子の増幅を見るために、FISH (fluorescence in situ hybridization) 法を用いた。その結果、確

かに図10のように、DHFR 遺伝子の増幅が起こっており、それらは3種類に分類された。(1) HSR タイプ、(2) DM タイプ、(3) 分散タイプ (スキッタータイプ) である。(3) は酵母ではなかったが、ガン遺伝子の増幅等で良く観察されているタイプである。(1) を構造解析した結果、DHFR 遺伝子は増幅するも周りの染色体に著しい構造変化を起こしていた。この FISH を用いた解析には、同じ研究グループの田辺グループの貴重なアドバイスが助けとなった。

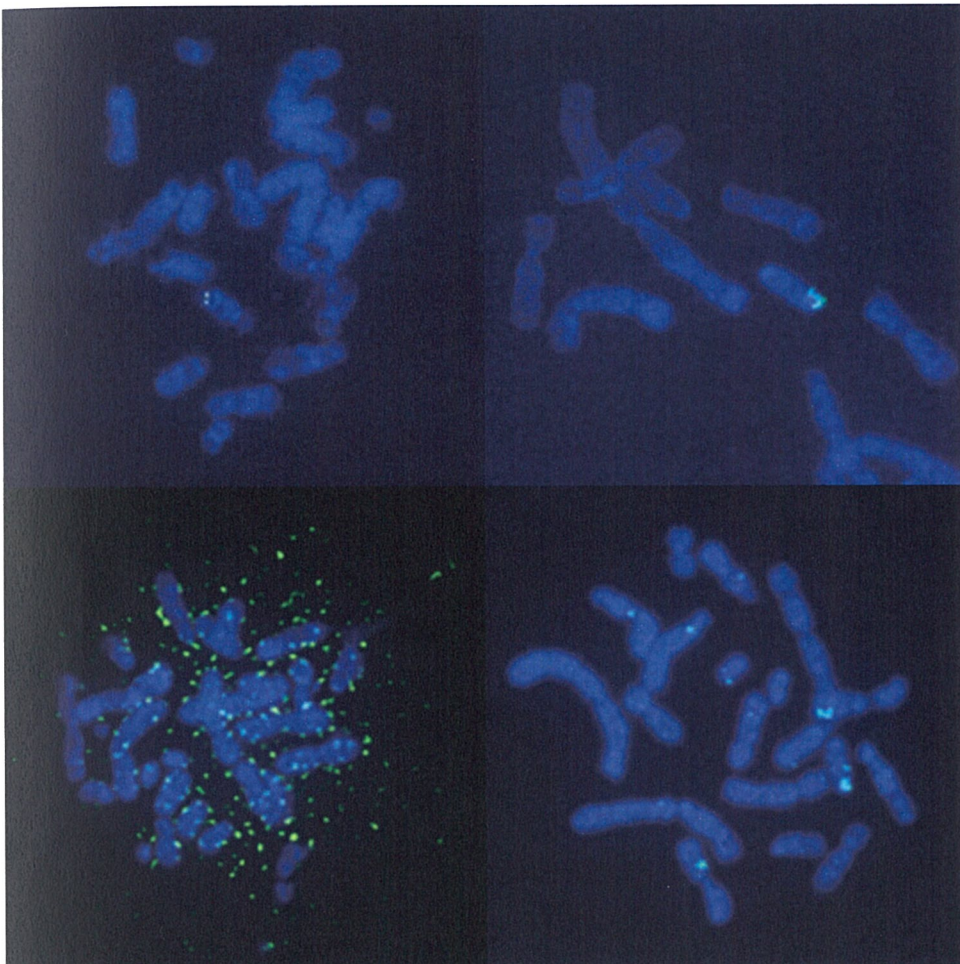


図 6 CHO 親株 (左上) と HSR(右上)-、DM(左下)-、Scattered(右下)-タイプの増幅像

(2-C)

(i)これまでの結果から言えること

上述したように、Cre-lox という人工的な系であるものの、その組換え系を用いることで、DRCR が誘導され、それによって HSR と DM タイプの産物を得ることが出来た。しかも酵母ばかりでなく、CHO を用いても同様の結果を得たこと、さらに自然において見いだされるスキッタータイプの増幅も認められたことから、自然界においても DRCR によってガン遺伝子や薬剤耐性遺伝子の

増幅が起こっていることは、ほぼ間違い無いであろう。

これまでの培養細胞における薬剤耐性遺伝子の増幅では、幾つの特徴が知られている。(1) 増幅産物には、HSR と DM とがある。(2) HSR と DM の両タイプを有するクローンは殆どない、(3) HSR は inverted repeat 構造を有する、(4) DM は多コピーの環状で inverted repeat 構造を有し、セントロメアは有しない、(5) 増幅初期での HSR タイプは、長い領域の inverted repeat ユニットからなるが、急速にユニットの短小化が起こり、コピー数が増加する。

(1) ~ (3) については、我々の Cre-lox の系から説明できる。(4) に関しては、我々のモデルでも環状ミニ染色体が予想された。しかし実際得られた DM タイプは IR 構造を有するものの、線状のミニ染色体であった。これはおそらく、産物の生まれやすさによるものと思われる。つまり、Cre-lox 系を染色体の末端付近に構築したが、この場合、図 9 のように、1 回の RTS によって inverted repeat 構造を有する線状のミニ染色体が容易に生じるからだと思われる。その後の同様の実験から、環状のミニ染色体も得られた。さらにこれまで酵母を用いた他の研究者のミニ染色体の報告から、得られた増幅産物の環状ミニ染色体に乗っている遺伝子は染色体内部にあり、線状の場合の遺伝子は末端近傍であるとの報告がある。これは上の実験結果と一致する。

(5) に関しては、詳細には解析していないが、CHO の増幅産物の解析から、これまで報告されてきたように、かなり激しいゲノムの再編が起こっているようだ。何故このような再編が起こるかについては、現在解析中だが、後に述べるように DRCCR 依存的な inversion が起こることから、inversion ばかりでなく欠失等も起こることがあれば、この増幅に伴うゲノム再編もうまく説明出来る。

ここでは、Cre-lox を用いて DRCCR を誘導することで、遺伝子増幅を効率よく起こすことに成功した。残された最大の問題は、自然状態で DRCCR をどのように誘導されるのか？である。自然状態では、勿論部位特異的組換え系などあるわけもなく、相同組換えによって起こることは間違いない。現在この機構を解きつつあり、近い将来自然条件下で、相同組換えにより DRCCR を誘導する機構が解ければ、ガン遺伝子の増幅機構解明はじめ、極めてインパクトの大きい成果が期待できる。

(ii) 増幅時に起こる高頻度 Inversion について

以前の実験でも観察したことだが、DRCCR によって得られた HSR タイプの産物の構造には、著しい特徴がある。HSR 産物は、予想通り inverted repeat 構造を有しているが、その inverted repeat 間で高頻度の inversion が起こっていることである。しかも極端な場合ではその頻度が 50%、つまり向きがランダムとなる。

この現象は大変驚くべきことである。何故なら、例えば相同組換えがよく起こることで知られる大腸菌でさえ、後に出てくる Tn5 の inversion 頻度は 10^{-3} である。このように通常の組換え体の生じる頻度は余りにも低いため、寒天ゲル電気泳動法などではとても検出不能なのに、HSR 内で起こる inversion は容易に検出出来る。

現在この組換え機構については不明であるが、おそらく DRCR のプロセス中あるいはその後起こる組換えの活性化によるものと思われる。この現象を DRCR 依存性組換えと名付け、現在解析中である。その一つとして、酵母が有する 2 ミクロプラスミドを用いて解析している。2 ミクロプラスミドは自然界で唯一 DRCR による複製をおこなうゲノムとして知られている。面白いことに、このプラスミドは通常の複製と共に DRCR でも複製することが出来る。以前から、このプラスミド上では、Tn5 と呼ばれるトランスポゾン[両端に一对の IS50 (約 1.5kb) と呼ばれる inverted repeat 構造を有する]が高頻度で inversion を起こすことが知られていた。そこでこの Inversion の原因を探るべく、我々は Tn5 を有する 2 ミクロプラスミドを構築し、調べたところ確かに通常の複製では Tn5 の inversion は起こらないが、DRCR によって高頻度の inversion が起こることを見いだした。DRCR に依存した組換えの活性化がある可能性を示すものである。

(iii) 終わりに

我々は、Cre-lox 系を利用した遺伝子増幅システムを構築することに成功した。Cre-lox 系は、動植物問わず、生物界全般に機能することが知られていることから、この増幅系は生物全般に利用できよう。

(1) 近年盛んに用いられるようになったタンパク質の医療薬、検査薬、人工抗体など、医療の分野では必須のものになりつつあり、今後益々その需要は高まっていく。しかしながら、これらタンパク質の生産に関しては、CHO を用いた旧来の経験に基づいた遺伝子増幅系が現在も用いられている。我々の系は、その機構が明らかな Cre-lox に依存した増幅機構であり、制御可能な系であることから、今後、短時間で高効率の新タンパク質増産系の候補の一つにはなることは間違い無い。

(2) 本遺伝子増幅機構は、自然に起こるガン遺伝子や薬剤耐性遺伝子の増幅機構に非常に近いものであり、現在自然に起こる増幅機構を明らかにしつつある。これが解明されれば、ガンの悪性を具体的にブロックすることが始めて可能になる。ガン悪性化進行阻止を願い、鋭意その解明を進めているところである。

(3) はじめに触れたように、この実験系の一つの目的は、遺伝子進化の実験

の試みである。おそらく、遺伝子増幅自身が、遺伝子進化の役割を果たしていると思われる。さらに、最初に触れたように、増幅遺伝子特異的に変異を導入することが出来れば、選択圧に対し、その遺伝子間での競争が起こり、最適な遺伝子が生き残り、最終的に最も適した遺伝子が選択されるに違いない。面白いことに、アカパンカビでは、雌雄の核がヘテロカリオン状態の時、雌雄どちらであろうとも、2ヶ以上ある遺伝子特異的に高頻度に変異を導入し、その遺伝子を失活させる RIP (Repeat induced point mutation) と呼ばれる現象が起こることが知られている。なんと驚くべき能力であろうか！恐らく変異の導入はタンパク質によって行われるであろうから、変異頻度は制御可能となろう。そうなれば、そのまま遺伝子進化マシンとして働き出しても不思議ではない。もしこのような機構が減数分裂期から受精への過程で働くことがあれば、これまでの進化学を揺るがす大問題となろう。我々は、細胞内で遺伝子増幅を可能にする系を世界に先駆けて構築することが出来た。これらの系を組み合わせることで、実験的に遺伝子進化を起こすことを試すことも夢では無くなった。

今後も本テーマを強力に推進し、遺伝子進化の謎に挑戦していきたい。

本研究の成果は、論文にまとめ現在投稿中である。

業績 (2006-2009)

堀内 グループ

- (1) Watanabe, T and Horiuchi, T. (2010) Double rolling circle replication is central to oncogene amplification (submitted).
- (2) Johzuka, K., and Horiuchi, T.(2009) The cis-element and factors required for condensin recruitment to chromosomes. *Mol Cell* 34. 26-35.
- (3) Johzuka, K. and Horiuchi, H. (2007) RNA polymerase I transcription obstructs condensin association with 35S rRNA coding regions and can cause contraction of long repeat in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells* 12:759-771
- (4) Cui, T., Moro-oka, N., Ohsumi, K., Kodama, K., Ohshima, T., Ogasawara, N., Mori, H., Wanner, B., Niki, H., and Horiuchi, T. (2007) *E. coli* with a linear genome. *EMBO Rep* 8:181-187.
- (5) Inagaki, S., Suzuki, T., Ohto, M., Urawa, H., Horiuchi, T., Nakamura, K., and Morikamid, A. (2006) Arabidopsis TEBICHI, with Helicase and DNA Polymerase Domains, Is Required for Regulated Cell Division and Differentiation in Meristems. *Plant Cell* 18: 879-892
- (6) Johzuka, K., Terasawa, M., Ogawa, H., Ogawa, T., and Horiuchi, H. (2006) Condensin loaded onto the replication fork barrier site in ribosomal DNA (rDNA) repeats during S-phase in a *FOBI*-dependent fashion to prevent contraction of a long repeats in *S.cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 26:2226-36
- (7) Hayashi, K., Morooka, N., Yamamoto, Y., Fujita, K., Isono, K., Choi, S., Ohtsubo, E., Baba, T. Wanner, B. L., Mori H., and Horiuchi, T.(2006) Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110. *Mol. Systems Biol.* doi:10.1038/msb100049:E1-E5
- (8) Riley, M., Abe, T., Arnaud, M. B., Berlyn, M. K., Blattner, F. R., Chaudhuri, R R., Glasner, J. D., Horiuchi, T., Keseler, I. M., Kosuge, T., Mori, H., Perna, N. T., Plunkett III, G., Rudd, K. E., Serres, M. H., Thomas, G. H., Thomson, N. R., Wishart, D., and Wanner, B. L. (2006) *Escherichia coli* K-12: a cooperatively developed annotation snapshot – 2005. *Nucleic Acids Res.* 34:1-9.

田辺グループ

- (1) Amano T, Sagai T, Tanabe H, Mizushima Y, Nakazawa H, Shiroishi T. (2009) Chromosoma dynamics at the Shh locus: limb bud-specific differential regulation of competence and active transcription. *Dev Cell*. 16, 47-57
- (2) Oikawa K, Yoshida K, Takanashi M, Tanabe H, Kiyuna T, Ogura M, Saito A, Umezawa A, Kuroda M.(2008) Dioxin interferes in chromosomal positioning through the aryl hydrocarbon receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 19, 361-364.
- (3) Nishida C, Ishijima J, Kosaka A, Tanabe H, Habermann FA, Griffin DK, Matsuda Y.(2008) Characterization of chromosome structures of Falconinae (Falconidae, Falconiformes, Aves) by chromosome painting and delineation of chromosome rearrangements during their differentiation. *Chromosome Res*. 16, 171-81.
- (4) Seki M, Nakagawa T, Seki T, Kato G, Tada S, Takahashi Y, Yoshimura A, Kobayashi T, Aoki A, Otsuki M, Habermann FA, Tanabe H, Ishii Y, Enomoto T.(2006) Bloom helicase and DNA topoisomerase IIIalpha are involved in the dissolution of sister chromatids. *Mol Cell Biol*. 26, 6299-307.