

平成18年度 学術創成研究費 研究終了報告書（事後評価用）

平成18年3月31日

ふりがな	こくぼ てつろう		②所属研究機関・ 部局・職		横浜市立大学・ 大学院国際総合科学研究科・教授			
①研究代表者 氏名	古久保 哲朗							
③研究課題名 (英訳名)	新規 <i>in vivo</i> 可視化技術を用いた真核細胞における遺伝情報発現機構の解析 (Studies on the regulatory mechanisms of eukaryotic gene expression using novel magnetic microimaging techniques)							
④研究経費 (千円未満切捨)	年度	研究経費(千円)		使用内訳(千円)				
		交付額	支出額	設備備品費	消耗品費	旅費	謝金等	その他
	平成13年度	69,800	69,802	48,849	14,138	23	891	5,899
	平成14年度	69,800	69,800	11,215	26,994	86	1,112	30,390
	平成15年度	69,800	69,800	13,715	29,877	726	1,081	24,398
	平成16年度	61,600	61,600	12,552	17,572	1,116	23,685	6,672
	平成17年度	60,500	60,500	9,801	19,547	965	20,837	9,347
	総計	331,500	331,502					
⑤研究組織(研究代表者及び研究分担者)								
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担(研究実施計画に対する分担事項)					
研究代表者 古久保哲朗	横浜市立大学・大学院 国際総合科学研究科・ 教授	分子生物学	ポリリン酸合成系遺伝子をレポーターとする新規遺 伝子発現モニタリングシステムの構築(主に遺伝学、 分子生物学実験を担当)					
研究分担者 白川昌宏	京都大学・ 工学研究科・教授	構造生物学	³¹ P-NMR を用いて <i>in vivo</i> において変化するポリリン 酸蓄積量をリアルタイムに可視化するための装置及 び手法の開発					
計 2 名								

⑥当初の研究目的

発生／分化から細胞分裂／DNA複製に至るまで、すべての生命現象は必要な遺伝情報がプログラム通りに正しく発現することにより支えられている。従って個々の生命現象を分子レベルで解明していくためには、情報発現の初発段階である転写反応の制御機構を正確に理解することが必要不可欠と考えられる。*in vitro* 転写系により得られる結果が必ずしも転写因子の生体内機能を反映するとは限らないことから、近年特に組織中の遺伝子発現を細胞レベルで簡便にモニタリングできる非破壊計測法の開発が急務となっている。これまでも GFP タンパク質等の蛍光を利用する方法が報告されてはいるものの、この方法には蛍光を外部から観測できる透明な生体試料のみにしか適用できないという問題点がある。マウスの深部組織のような不透明試料を細胞レベル（～10 μm 分解能）でモニタリングしようとするれば現時点ではマイクロ MRI（磁気共鳴イメージング）の利用が最も有効であると考えられる。しかしながらマイクロ MRI の場合も利用できるレポーター遺伝子の種類に制限があることや、可視化のための基質の生細胞への分配が困難である等の理由から、転写研究の *in vivo* モニタリング法として一般化するには至っていない。

本研究ではまずレポーター遺伝子を工夫し、既存の NMR 装置に改良を加えることによって、時間分解能、空間分解能に優れた簡便な *in vivo* モニタリング法（新規 *in vivo* 可視化技術）の開発を試みる（目標 1：新規レポーターシステムの開発）。この手法は可視化のための基質が生体内に遍在するため、人工的に分配する必要が無いことが最大の利点である。次にその技術を応用し、真核生物において精緻な転写制御を可能とする物質的基盤ならびにそれらの作動原理について全容解明を目指す（目標 2：出芽酵母を用いた転写制御の基本原理の解明、ならびに目標 3：高等真核生物への応用）。さらには昨今急展開を見せるゲノムプロジェクトをさらに発展させるべく、細胞レベルの発現プロファイルデータベース構築の可能性を探りたい（目標 3：高等真核生物への応用）。

⑦研究成果の概要

研究目的に対する研究成果を必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。

【1】 出芽酵母細胞において遺伝子発現の可視化を可能とする新規レポーター遺伝子の探索

本研究では、外来基質を一切投与することなく遺伝子発現を高感度かつリアルタイムにモニタリングし得る非侵襲的な新規計測技術の開発を目標とした。本研究を開始するにあたり我々は、全ての生物に存在するポリリン酸を $^{31}\text{P-NMR}$ を用いて可視化することが最も有効な方法論であろうと考えた。この目的を実現するためには、ポリリン酸の蓄積を定量的に誘導できるレポーター遺伝子の探索と、高解像度でポリリン酸の蓄積を検出できるイメージング技術の確立が必要不可欠となる。出芽酵母は液胞中に 120mM ものポリリン酸を蓄積することが知られ、遺伝的改変も容易なことから、本研究には最適のモデル生物であろうと考えられた。そこでまず出芽酵母細胞において最も有効なレポーター遺伝子を探索する目的で、33 種類の候補遺伝子[VTC 遺伝子群(4 種類), VMA 遺伝子群(14 種類), PHO 遺伝子群(7 種類), その他の関連遺伝子(8 種類)]について、各欠失変異株におけるポリリン酸蓄積量を *in vivo* $^{31}\text{P-NMR}$ spectroscopy ($^{31}\text{P-MRS}$)を用いて非侵襲的に計測し、野生株の蓄積量と比較することによって、通常の培養条件下におけるポリリン酸合成への関与の有無を調べた。その結果、液胞の形成やその機能に関与する VTC/VMA 遺伝子群がレポーター遺伝子として有望であることが示された。そこで次に、染色体上の VTC1, VTC3, VTC4, VMA2 遺伝子のプロモーターをそれぞれガラクトース誘導性プロモーターに置換し、転写誘導に伴うポリリン酸蓄積のキネティクスを調べたところ、いずれの場合も mRNA の蓄積に伴い速やかにポリリン酸の蓄積が誘導されることが明らかとなった。一方、転写を停止した際のポリリン酸減少のキネティクスに関しては、VTC1/VTC3/VTC4 の場合、転写停止 24 時間後においてもほとんどポリリン酸の減少が見られなかったのに対し、VMA2 の場合は転写停止 6 時間後においてポリリン酸の蓄積量が約半分に低下することが明らかとなった。すなわち転写の ON から OFF へのプロセスを追跡するためには、VTC1/3/4 よりも VMA2 の方が有用なレポーター遺伝子であろうと考えられる。また VTC1, VMA2 については発現強度の異なる 6 種類の非誘導性プロモーターを連結し、定常状態において mRNA 量とポリリン酸蓄積量の間には強い相関が見られることを明らかにした。以上の結果は、少なくとも出芽酵母において VTC1, VMA2 が定量的なレポーター遺伝子として利用可能であることを示している。

【2】 出芽酵母細胞におけるポリリン酸の蓄積を定量的に可視化するイメージング技術の開発

前項で述べたように、出芽酵母細胞内の遺伝子発現レベルを非侵襲的・定量的にモニタリングし得る新規レポーター遺伝子を同定することに成功した。そこで次に、多種類の酵母株を同時に測定することができ、多細胞生物にも応用可能なイメージング手法の開発を行った。まず $\phi 8\text{ mm}$ の直径を持つ NMR 測定管内に酵母のコロニーを効率よく配置するための器具を数種類考案し、これらの器具を用いて測定管内に野生株、 $\Delta vtc1$ 株のコロニーを配置した。化学シフト選択的な $^{31}\text{P-NMR}$ シグナルによるイメージング手法 ($^{31}\text{P-MRI}$, CHESS) を適用することにより、ポリリン酸のシグナルのみを極めて高いコントラストで可視化することに成功した（図 1）。さらに発現強度の異なる 6 種類の非誘導性プロモーターの支配下に VMA2, VTC1 レポーター遺伝子を組み込んだ酵母株、及びそのコントロール株（野生株、 $\Delta vma2$ 株、 $\Delta vtc1$ 株）をそれぞれ $\phi 0.8\text{ mm}$ の極細キャピラリー管に移送し、計 16 種類の酵母株全てを同時に測定する方法論の開発にも成功した（図 2）。この方法で測定したポリリン酸蓄積量と mRNA 量との間にはやはり強い相関が見られたことから、出芽酵母細胞における遺伝子発現を非侵襲的・定量的にイメージングするための基盤技術として、本システムは極めて有用と考えられる。

⑦研究成果の概要 つづき

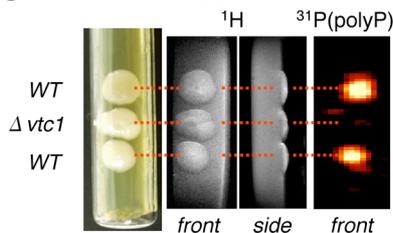


図1. 出芽酵母株の¹H-, ³¹P-MRI画像。
³¹P-MRI(CHESS)法によって、ポリリン酸を選択的に可視化することができる(右, front)。野生株(WT)ではポリリン酸のシグナルがはっきりと観察されるが、 $\Delta vtc1$ 株では観察されない。また¹H-MRI法では水の¹Hシグナルを観測しているため、全ての酵母株が同じように見える(左, front; 中, side)。

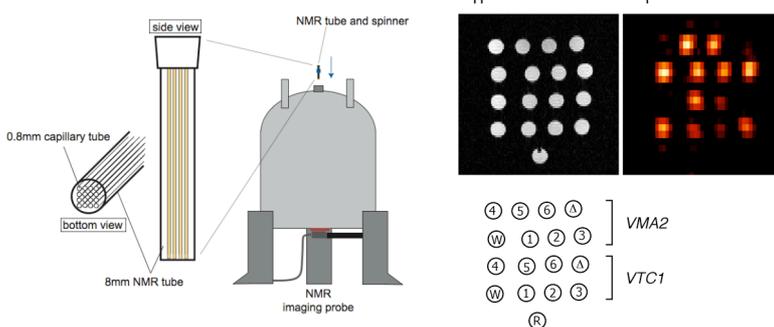


図2. 多検体を定量的に可視化した¹H-, ³¹P-MRI画像。
 ϕ 0.8mmのキャピラリー管にレポーター遺伝子(VMA2, VTC1)の発現レベルが異なる酵母株を移送し、検体16種類について同時測定を行った(左は用いた器具・装置の模式図; 右は実際の画像データ)。³¹P-MRIのシグナルを¹H-MRIのシグナルで補正することによって、より正確にポリリン酸蓄積量を見積もることができる。

【3】ポリリン酸の蓄積を高感度に検出し、定量化する新たな方法論の開発

³¹P-MRIにより遺伝子発現をモニタリングすることは可能となったが、直径1mm以下のマイクロコロニーのように細胞数が少ない場合には検出感度が十分とはいえず、新たな方法論の開発が必要と思われた。そこで検出感度の上昇を図るため、水の¹H-NMRシグナルを用いる計測手法の開発を目指すこととした。ポリリン酸は細胞内において二価金属イオンのリザーバーとして機能することが知られている。また常磁性の金属イオンは近傍の水の¹H-NMRシグナルの縦緩和(T1)時間の短縮をもたらすので、T1強調画像法によりポリリン酸蓄積量の違いを可視化できるのではないかと考え、測定条件の検討を行った。その結果、野生株と $\Delta vtc1$ 株のようにポリリン酸蓄積量の異なる二種類のマイクロコロニーを通常の培地上で短時間の測定で明瞭に区別できる測定条件を決定することに成功した(図3)。また6種類の強度の異なるプロモーターの支配下にレポーター遺伝子を組み込んだ酵母株を用いて、mRNA量とT1短縮効果を比較したところ、両者間には強い相関が認められた。すなわち肉眼で観察できる程度の細胞集団(ϕ 0.5-1mmのコロニー)であれば、数百種類の検体を同時に測定し、それらの遺伝子発現量を定量的に比較することも十分可能と考えられる。

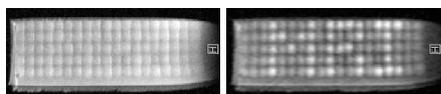


図3. ポリリン酸蓄積量の違いを示す二種類の¹H-MRI画像。
 プロトン密度を反映した通常の¹H-MRI画像(左)では全てのコロニーが均一に見えるのに対し、T1の違いを強調した¹H-MRI画像(右)では[MRI]の文字の位置に配置したコロニーとそれ以外の位置に配置したコロニーのポリリン酸蓄積量の違いを反映して、文字が浮かび上がって見える。この図に示すコロニーはいずれも ϕ 1mm以下のマイクロコロニーである。

【4】動物細胞において遺伝子発現の可視化を可能とする新規レポーター遺伝子の探索

前項までに述べたポリリン酸合成に関与すると考えられるVTC遺伝子群は出芽酵母に特異的であり、高等真核生物にはオルソログが存在しない。一方、VMA遺伝子群の場合には明らかなオルソログが認められるものの、これらの遺伝子を欠くマウスは胚性致死となることが知られている。そこで原核細胞に広く分布するポリリン酸合成酵素であるポリリン酸キナーゼ(PPKI)に着目し、動物培養細胞における本酵素の発現とポリリン酸の蓄積量について検討を行った。その結果、調べた限り全ての動物培養細胞(ヒトHEK293T細胞、ヒトHeLa細胞、サルCOS7細胞 etc)において大腸菌由来の活性型PPKI遺伝子を発現させた場合のみポリリン酸の蓄積が認められ、その細胞当たりの蓄積量はほぼ出芽酵母細胞と同等(~120mM)であることが示された。また薬剤誘導性プロモーターの下流にPPKI遺伝子を連結し、ルシフェラーゼ(現在最も感度が高いとされるレポーター遺伝子)との比較を行ったところ、両者はほぼ同等の検出感度を有することが明らかとなった。蓄積したポリリン酸を指標とするPPKI発現細胞の2次元(2D)、3次元(3D)イメージングにも成功したことから(図4)、動物細胞の場合には、PPKI遺伝子が極めて有効なレポーター遺伝子になり得ると考えられる。

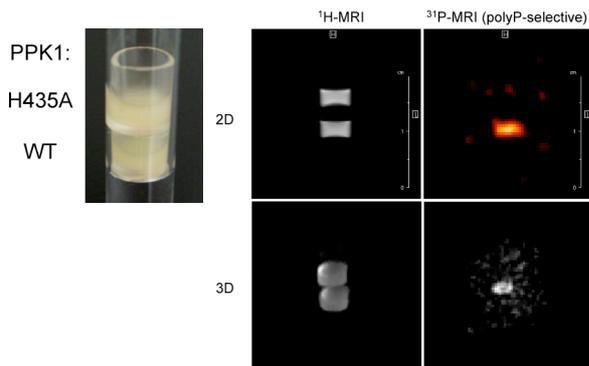


図4. ³¹P-MRIを用いた動物細胞における遺伝子発現の非侵襲的・定量的な可視化(2D-, 3D-imaging)。
 HEK293T細胞に大腸菌PPKI遺伝子(野生型WT)と[不活性型変異体H435A]を形質転換した後、 ϕ 6mmのガラスカップにつめ(左)、¹H-, ³¹P-MRIにより二次元的(2D; coronal plane)に沿ってスキャン)、三次元的(3D; オリジナルファイルはQuickTime Movie)なイメージングを行った。¹H-MRIでは両細胞間に差が見られないが、³¹P-MRIではPPKI[WT]を形質転換した細胞のみがポリリン酸を蓄積していることが分かる。

⑧特記事項

この研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。

【1】 出芽酵母における非侵襲的遺伝子発現モニタリングシステムの確立とその応用

本研究の最終的な目標は、真核生物において精緻な転写制御を可能とする物質的基盤ならびにそれらの作動原理を明らかにすることである。出芽酵母は、ゲノムの全塩基配列が明らかにされておりばかりでなく、全ての遺伝子について発現レベルを調べることができ、プロモーターに結合している転写因子の種類と量を簡便に知ることができる唯一の真核生物である。しかしながら「転写制御の作動原理」に関しては、いまだほとんど研究がなされておらず、未解明の課題が山積している。例えば、基本転写因子 TFIID は、真核生物において唯一、転写開始点を直接認識し、転写調節因子からの信号に応答して転写量を決定するという極めて重要な役割を担う転写因子であるにもかかわらず、その機能を支える分子基盤についてはまだ何も明らかにされていない。TFIID や転写調節因子の結合部位がゲノムワイドに同定されてもその後の解析が進まない最大の原因は、ハイスループット (ex. >1000 sample/day) なプロモーター解析系がこれまで存在しなかったことにあると考えられる。例えば、リボソームタンパク質 (RP) をコードする 138 個の遺伝子群は、細胞の増殖速度とリンクし、TFIID 機能に依存した共通の制御システムの支配下にあると考えられるが、コアプロモーター配列を単純に比較しただけではその特徴を抽出することは困難であり、相当数のプロモーター配列について実際の応答を調べる必要がある。出芽酵母において遺伝子発現を調べるために従来最もよく用いられてきたレポーター遺伝子は *lacZ* (β -ガラクトシダーゼ) であるが、この方法は感度が低い上に発色に時間がかかるため、遺伝子発現をリアルタイムにモニタリングするには適していない。最近出芽酵母においても GFP が利用されるようになってきたが、富栄養培地で培養した細胞は自家蛍光が強く、感度上昇のためにはあらかじめ測定用バッファーで洗浄しておかなければならない。一方、今回我々が開発したポリリン酸を ^1H - or ^{31}P -MRI で定量する方法は、ノザンブロッティングとほぼ同等の感度を有し、通常の培地で培養したコロニーを前処理無しにそのまま測定できるという利点を持つ。また測定深度に制限がないため、サンプルを縦方向に積層し、高密度・集積化を図ることができる (図 5)。出芽酵母では、PCR 断片を直接形質転換することによりプロモーター領域を容易に置換することができるため、植菌プレートからコロニーを自動的にピックアップして NMR 測定用デバイス上に整列させるロボット (図 6) を製作することにより、ハイスループットにプロモーター活性を測定することが初めて可能となった。本法を用いれば、ランダム化したプールの中から、任意の発現様式を付与する配列を実験的に選び出すことも十分に可能であり、DNA チップ、プロテインチップに続く第三のチップテクノロジー (発現細胞チップ) として、その応用範囲は多岐に渡ると考えられる。現在我々はこの手法を用いて、①基本転写因子 TFIID の作動原理の解明、②転写調節因子のリガンド検索等、従来の方法論では達成が困難であった課題の解決に向けて努力を続けている。

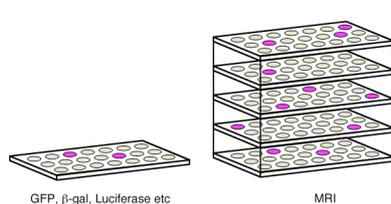


図5. ^1H - ^{31}P -MRI法のメリット。従来の測定方法 (GFP, β -gal, luciferase等) ではサンプルを二次元的に配置しなければならないのに対し、MRI法では縦方向に積み重ねることができるため、飛躍的なハイスループット化が見込める。



図6. コロニーをカメラで自動的に認識してピックアップし、NMR測定用デバイス上に整列させるロボット。この機器を開発したことにより、極めて高密度に酵母を植菌することができるようになった。

【2】 動物個体・植物個体における遺伝子発現の可視化

動物細胞において、*PPK1* 遺伝子が極めて有効なレポーター遺伝子として機能することが示されたため (研究成果の概要 4 を参照)、小脳プルキンエ細胞のみに特異的に発現する L7 プロモーターの下流に *PPK1* 遺伝子を組み込んだトランスジェニック (Tg) マウスを作成し、 ^{31}P -MRI によるイメージングを試みた。あらかじめ ^1H -MRI により観察部位 (voxel=5 mm³) を決定し、localized ^{31}P -NMR spectroscopy を行ったが、ポリリン酸のシグナルを検出することはできなかった。In situ hybridization や免疫染色により *PPK1* 自身の発現は確認できていることから、 ^{31}P -MRS によりポリリン酸を検出できなかった原因は、観察対象部位に含まれるポリリン酸の総量が測定に使用した機器の検出限界以下であったためと思われる (特異性の高いプロモーターを用いたため、発現細胞の数がかなり少ない)。そこで現在、CAG プロモーターの下流に loxP-stuffer-loxP 配列と *PPK1* 遺伝子を組み込んだ Tg マウスを作製し、アルブミン遺伝子プロモーターの下流に *cre* 遺伝子を組み込んだ Tg マウスと交配することによって肝臓組織全体で *PPK1* を高発現させ、 ^{31}P -MRS/MRI によるポリリン酸の検出・イメージングを目指して準備を進めている (現在交配のための Tg マウスが得られた段階である)。

一方、本測定手法を植物個体にも適用するため、薬剤誘導性プロモーター及び構成的プロモーターの下流に *PPK1* 遺伝子を連結したコンストラクトをシロイヌナズナに導入し、形質転換個体を得た。*PPK1* mRNA と *PPK1* タンパク質の発現、ポリリン酸の蓄積に関しては、プロモーターの性質を反映する予想通りの結果 (薬剤を塗布した組織における特異的な発現・蓄積など) となったが、動物細胞に比べて in vivo ^{31}P -MRS によるポリリン酸の検出感度が低く、ポリリン酸の蓄積を確認できたにもかかわらず、 ^{31}P -MRI による発現組織のイメージング画像を得るまでには至らなかった。おそらく主な原因は、ポリリン酸の貯蔵形態の差によるものと考えられるが、詳細については今後の検討課題である (*PPK1* を特定のオルガネラへ送り込むことにより、改善される可能性も考えられる)。

⑨研究成果の発表状況

この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（投稿中の論文を記入する場合は、掲載が決定しているものに限ります。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会等における発表状況について、3頁以内に収めて記入してください。

A. 原著論文

- 1: Ki S, Sugihara F, Kasahara K, Tochio H, Okada-Marubayashi A, Tomita S, Morita M, Ikeguchi M, Shirakawa M, Kokubo T.; A novel magnetic resonance-based method to measure gene expression in living cells.; *Nucleic Acids Res.* 2006 Apr 5;34(6):e51.
- 2: Mal TK, Liu D, Masutomi Y, Zheng L, Nakatani Y, Kokubo T, Ikura M.; Resonance assignments of 30 kDa complexes of TFIID subunit TAF1 with TATA-binding protein.; *J Biomol NMR.* 2005 Sep;33(1):76.
- 3: Takasu H, Jee JG, Ohno A, Goda N, Fujiwara K, Tochio H, Shirakawa M, Hiroaki H.; Structural characterization of the MIT domain from human Vps4b.; *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Aug 26;334(2):460-5.
- 4: Auesukaree C, Tochio H, Shirakawa M, Kaneko Y, Harashima S.; Plc1p, Arg82p, and Kcs1p, enzymes involved in inositol pyrophosphate synthesis, are essential for phosphate regulation and polyphosphate accumulation in *Saccharomyces cerevisiae.*; *J Biol Chem.* 2005 Jul 1;280(26):25127-33.
- 5: Baba D, Maita N, Jee JG, Uchimura Y, Saitoh H, Sugasawa K, Hanaoka F, Tochio H, Hiroaki H, Shirakawa M.; Crystal structure of thymine DNA glycosylase conjugated to SUMO-1.; *Nature.* 2005 Jun 16;435(7044):979-82.
- 6: Ohno A, Jee J, Fujiwara K, Tenno T, Goda N, Tochio H, Kobayashi H, Hiroaki H, Shirakawa M.; Structure of the UBA domain of Dsk2p in complex with ubiquitin molecular determinants for ubiquitin recognition.; *Structure.* 2005 Apr;13(4):521-32.
- 7: Shiozawa K, Maita N, Tomii K, Seto A, Goda N, Akiyama Y, Shimizu T, Shirakawa M, Hiroaki H.; Structure of the N-terminal domain of PEX1 AAA-ATPase. Characterization of a putative adaptor-binding domain.; *J Biol Chem.* 2004 Nov 26;279(48):50060-8.
- 8: Tenno T, Fujiwara K, Tochio H, Iwai K, Morita EH, Hayashi H, Murata S, Hiroaki H, Sato M, Tanaka K, Shirakawa M.; Structural basis for distinct roles of Lys63- and Lys48-linked polyubiquitin chains.; *Genes Cells.* 2004 Oct;9(10):865-75.
- 9: Kasahara K, Kawaichi M, Kokubo T.; *In vivo* synthesis of Taf1p lacking the TAF N-terminal domain using alternative transcription or translation initiation sites.; *Genes Cells.* 2004 Aug;9(8):709-21.
- 10: Mishima M, Sakai Y, Itoh N, Kamiya H, Furuichi M, Takahashi M, Yamagata Y, Iwai S, Nakabeppu Y, Shirakawa M.; Structure of human MTH1, a Nudix family hydrolase that selectively degrades oxidized purine nucleoside triphosphates.; *J Biol Chem.* 2004 Aug 6;279(32):33806-15.
- 11: Mal TK, Masutomi Y, Zheng L, Nakata Y, Ohta H, Nakatani Y, Kokubo T, Ikura M.; Structural and functional characterization on the interaction of yeast TFIID subunit TAF1 with TATA-binding protein.; *J Mol Biol.* 2004 Jun 11;339(4):681-93.
- 12: Takahata S, Kasahara K, Kawaichi M, Kokubo T.; Autonomous function of the amino-terminal inhibitory domain of TAF1 in transcriptional regulation.; *Mol Cell Biol.* 2004 Apr;24(8):3089-99.
- 13: Auesukaree C, Homma T, Tochio H, Shirakawa M, Kaneko Y, Harashima S.; Intracellular phosphate serves as a signal for the regulation of the PHO pathway in *Saccharomyces cerevisiae.*; *J Biol Chem.* 2004 Apr 23;279(17):17289-94.
- 14: Goda N, Tenno T, Takasu H, Hiroaki H, Shirakawa M.; The PRESAT-vector: asymmetric T-vector for high-throughput screening of soluble protein domains for structural proteomics.; *Protein Sci.* 2004 Mar;13(3):652-8.

⑨研究成果の発表状況

この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（投稿中の論文を記入する場合は、掲載が決定しているものに限ります。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会等における発表状況について、3頁以内に収めて記入してください。

15: Fujiwara K, Tenno T, Sugasawa K, Jee JG, Ohki I, Kojima C, Tochio H, Hiroaki H, Hanaoka F, Shirakawa M.; Structure of the ubiquitin-interacting motif of S5a bound to the ubiquitin-like domain of HR23B.; *J Biol Chem.* 2004 Feb 6;279(6):4760-7.

16: Takahata S, Ryu H, Ohtsuki K, Kasahara K, Kawaichi M, Kokubo T.; Identification of a novel TATA element-binding protein binding region at the N terminus of the *Saccharomyces cerevisiae* TAF1 protein.; *J Biol Chem.* 2003 Nov 14;278(46):45888-902.

17: Kato Z, Jee J, Shikano H, Mishima M, Ohki I, Ohnishi H, Li A, Hashimoto K, Matsukuma E, Omoya K, Yamamoto Y, Yoneda T, Hara T, Kondo N, Shirakawa M.; The structure and binding mode of interleukin-18.; *Nat Struct Biol.* 2003 Nov;10(11):966-71.

18: Kobayashi A, Kokubo T., Ota Y, Yokoyama S.; Promoter-specific function of the TATA element in undifferentiated P19 cells.; *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Oct 17;310(2):458-63.

19: Mishima M, Takayama S, Sasaki K, Jee JG, Kojima C, Isogai A, Shirakawa M.; Structure of the male determinant factor for *Brassica* self-incompatibility.; *J Biol Chem.* 2003 Sep 19;278(38):36389-95.

20: Ohdate H, Lim CR, Kokubo T., Matsubara K, Kimata Y, Kohno K.; Impairment of the DNA binding activity of the TATA-binding protein renders the transcriptional function of Rvb2p/Tih2p, the yeast RuvB-like protein, essential for cell growth.; *J Biol Chem.* 2003 Apr 25;278(17):14647-56.

21: Kobayashi A, Miyake T, Kawaichi M, Kokubo T.; Mutations in the histone fold domain of the TAF12 gene show synthetic lethality with the TAF1 gene lacking the TAF N-terminal domain (TAND) by different mechanisms from those in the SPT15 gene encoding the TATA box-binding protein (TBP).; *Nucleic Acids Res.* 2003 Feb 15;31(4):1261-74.

22: Kobayashi A, Akasaka K, Kawaichi M, Kokubo T.; Functional interaction between TATA and upstream CACGTG elements regulates the temporally specific expression of Otx mRNAs during early embryogenesis of the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus.*; *Nucleic Acids Res.* 2002 Jul 15;30(14):3034-44.

23: Jee JG, Ikegami T, Hashimoto M, Kawabata T, Ikeguchi M, Watanabe T, Shirakawa M.; Solution structure of the fibronectin type III domain from *Bacillus circulans* WL-12 chitinase A1.; *J Biol Chem.* 2002 Jan 11;277(2):1388-97.

24: Tsukihashi Y, Kawaichi M, Kokubo T.; Requirement for yeast TAF145 function in transcriptional activation of the RPS5 promoter that depends on both core promoter structure and upstream activating sequences.; *J Biol Chem.* 2001 Jul 13;276(28):25715-26.

B. 国際会議・シンポジウム等

Sakai T, Tochio H, Sugihara F, Kokubo T., Ito Y, Hiroaki H, Shirakawa M.
A novel strategy for protein structural study under intracellular environment by using *Xenopus* Oocyte.
1st Asia-Pacific NMR Symposium/44th Annual NMR Meeting of the NMR Society of Japan,
November 9, 2005, Yokohama, Japan

Takahata S, Takahashi H, Kasahara K, Kokubo T.
BAS1 activation of the HIS4 core promoter requires BAS2, MED9, and the TAF N-terminal domain (TAND) of TAF1.
Mechanisms of eukaryotic transcription, September 3, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA

Sugihara F, Ki S, Kasahara K, Serizawa K, Kobayashi A, Watanabe K, Shirakawa M., Kokubo T.
Development of a novel reporter system using NMR and MRI to measure gene expression in living cells.
8th International Conference on Magnetic Resonance Microscopy, August 23, 2005, Utsunomiya, Japan.

⑨研究成果の発表状況

この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（投稿中の論文を記入する場合は、掲載が決定しているものに限ります。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会等における発表状況について、3頁以内に収めて記入してください。

Sugihara F, Kobayashi A, Tochio H, Ki S, Kasahara K, Serizawa K, Watanabe K, Shirakawa M, Kokubo T
The development of a novel reporter system using NMR/MRI to measure gene expression in living cell.
46th Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference
April 10-15, 2005, The Asilomar Conference Center, Pacific Grove, California, USA

Shirakawa M, Kokubo T, Sugihara F, Ki S, Sakai T, Ito Y, Yoshinari Y
In vivo observations of gene expression and protein structures by magnetic resonance.
The Keio Medical Award Symposium on “Seeing when, where and why-Advances in mechanistic molecular probing-”,
November 30, 2004, Tokyo

Sugihara F, Tochio H, Morita M, Ki S, Okada A, Kokubo T, Shirakawa M
In vivo ³¹P MRI monitoring of gene expression in yeast cells.
7th International Conference on Magnetic Resonance Microscopy, September 24, 2003, Snowbird, Utah, USA

Tochio H, Sugihara F, Morita M, Ki S, Okada A, Kasahara K, Kokubo T, Shirakawa M
In vivo ³¹P MRI monitoring of gene expression in yeast cells.
Second Annual Meeting of the Society for Molecular Imaging,
August 15-18, 2003, Hyatt Regency, San Francisco, CA USA

C. 学会（国内）

酒井智美, 朽尾豪人, 杉原文徳, 古久保哲朗, 伊藤隆, 廣明秀一, 白川昌宏
「NMRによる細胞内タンパク質の直接測定」
第28回日本分子生物学会, 2005年12月8日, 福岡

渡邊 清, 杉原文徳, 笠原浩司, 白川昌宏, 古久保哲朗
「出芽酵母のストーク分化とその分子基盤」
第27回日本分子生物学会, 2004年12月10日, 神戸

芹沢香織, 奇 世媛, 杉原文徳, 笠原浩司, 平山隆志, 白川昌宏, 古久保哲朗
「シロイヌナズナにおいて遺伝子発現を可視化するための新規レポーターシステムの開発」
第27回日本分子生物学会, 2004年12月10日, 神戸

杉原文徳, 朽尾豪人, 奇世媛, 笠原浩司, 渡邊清, 古久保哲朗, 白川昌宏
「NMRを用いた新規レポーターシステムによる遺伝子発現可視化技術の開発と応用」
第27回日本分子生物学会, 2004年12月8日, 神戸

杉原文徳, 朽尾豪人, 奇世媛, 岡田あずさ, 渡邊清, 笠原浩司, 古久保哲朗, 白川昌宏
「MRIを用いた遺伝子発現解析システムの構築」
第43回NMR 討論会, 2004年11月10日-12日, 東京

杉原文徳, 朽尾豪人, 奇世媛, 岡田あずさ, 芹沢香織, 渡邊清, 笠原浩司, 古久保哲朗, 白川昌宏
「ポリリン酸レポーターシステムを用いた遺伝子発現のイメージング技術の開発」
第9回マイクロイメージング研究会, 2004年7月22日-23日, 筑波

奇世媛, 笠原浩司, 岡田あずさ, 富田節子, 杉原文徳, 森田将史, 朽尾豪人, 白川昌宏, 古久保哲朗
「NMRを用いた新規レポーターシステムによる遺伝子発現可視化技術の開発と応用」
第26回日本分子生物学会, 2003年12月10日, 神戸

杉原文徳, 朽尾豪人, 森田将史, 奇世媛, 岡田あずさ, 笠原浩司, 古久保哲朗, 白川昌宏
「MRIを用いた遺伝子発現解析システムの構築」
第42回NMR 討論会, 2003年11月26日-28日, 大阪