

好熱性藍色細菌のDNAマイクロアレイの開発と生物時計研究への応用

●石浦 正寛¹⁾ ◆杉山 康雄¹⁾ ◆山田 雅雄²⁾

1) 名古屋大学遺伝子実験施設 2) 株式会社モリテックス

〈研究の目的と進め方〉

多くの生物で様々な生理現象の活性が約24時間周期で変動することが知られている。この概日リズムの発振機構を生物時計と呼んでいる。生物時計は地球の自転に伴い24時間周期で繰り返される光や温度などの外部環境の周期的変化に適応するために生物が進化させてきた機構と考えられ、真核生物にほぼ普遍的に存在する。

我々は、バクテリアである藍色細菌にも生物時計が存在することを明らかにし (Kondo et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 90:5672-5676)、24時間の発現リズムを生み出す分子機構の中核遺伝子クラスターkaiABCのクローニングに成功した (Ishiyama et al., 1998, Science 281:1519-1523)。kaiABCは発現がきれいな概日リズムを示すこと、生物時計の本質はkaiABCの遺伝子産物である3つの時計タンパク質KaiA、KaiB、KaiCによるkaiABC自体の概日発現自己制御であることを明らかにした。すなわち、KaiAはkaiABCオペロンの発現を促進し、逆にKaiCはその発現を抑制する (図1)。これらは常温性藍色細菌 *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 (以後 *Synechococcus* と呼ぶ) で得られた成果である。

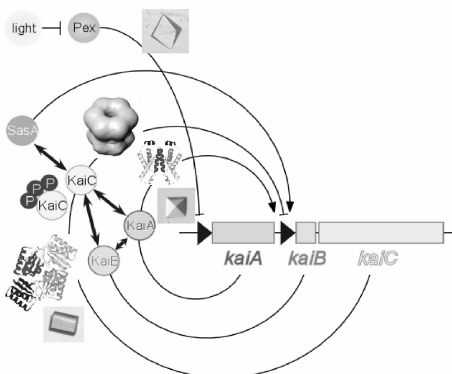


図1. 藍色細菌の生物時計のモデル

本研究計画は、時計遺伝子クラスターkaiABCの発信する振動情報がどのような発現制御ネットワークを介して下流の遺伝子群へと伝達されて行くのかの全体像とその機構を解明することを目的とする。

第一に、かずさDNA研究所で全ゲノム配列が決定されており (Kaneko et al., 1996, DNA Res. 30:109-136)、グルコース添加によって暗所でも生育できる常温性藍色細菌 *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 (以後 *Synechocystis* と呼ぶ) を生物材料に用いて、宝酒造製の市販の *Synechocystis* DNAアレイを活用して、生物時計による遺伝子発現制御をゲノムワイドに網羅的に解明する。

第二に、かずさDNA研究所によって全ゲノム配列が決定されており (Nakamura et al., 2002, DNA Res. 9:123-130)、タンパク質の研究に適している別府温泉産の好熱性藍色細菌 *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (以後 *T. elongatus* と略す) で生物時計の実験系を確立し、さらに新規オリゴDNAアレイを作製し、そのアレイを活用し

て生物時計による遺伝子発現制御の全体像を解明する。そのために、簡便かつ安価に作製することができ、遺伝子特異性の高い非修飾オリゴDNAを用いた新規オリゴDNAマイクロアレイを開発する。

〈研究開始時の研究計画〉

当初生物材料としては、宝酒造製の市販のDNAアレイが利用できる *Synechocystis* と当時日本でゲノムプロジェクトが進行していた *Synechococcus* を用いる予定であった。しかしながら、*Synechococcus* のゲノムプロジェクトが遅れていたため、もう一つの生物材料は本研究計画推進の途中でかずさDNA研究所によってゲノム配列が決定されつつあり、タンパク質研究に適した耐熱性タンパク質が利用できる好熱性藍色細菌である *T. elongatus* に切り替えることにした。

〈研究期間の成果〉

1. 新規オリゴDNAアレイの開発

Synechocystis のkai遺伝子群 (kaiA、kaiB1、kaiC1、kaiB2、kaiB3、kaiC3) のDNAアレイを作製し、以下のことを検討した (成果公表13)。i)オリゴDNAアレイでは、通常HPLC精製された5'末端修飾オリゴDNAが用いられるが、非修飾でHPLC精製しなくてもシグナル強度の低下はほとんど見られなかった。以後5'末端修飾もHPLC精製も省略することにした。ii)オリゴDNA鎖長を70塩基から23塩基まで段階的に減少させて、シグナル強度の変化を検討した。シグナル強度が、鎖長の減少に伴い減少する遺伝子と、45塩基で最大となる遺伝子の2種類が見つかった。前者でも45塩基で十分なシグナル強度が得られたので、オリゴDNAの鎖長は45塩基に決定した。iとiiの改良により、DNAアレイの製作コストを4分の1に削減できた。iii)クロスハイブリダイゼーションは、塩基配列の相同性が70%以下であればほとんど起こらず、GC含量が高いと起こりやすかった。iv)そこで、以下の5つの条件で最適のプロープ配列が検索できるプログラムを開発した。a)ゲノムの他の遺伝子に対して70%以上の相同性を示さない。b)GC含量が35-55%、c)T含量が22%以下、d)分子内で安定な2次構造をとらない ($\Delta G > -10.5$ kcal/mol)、e)繰り返し配列を含まない。

2. *T. elongatus* オリゴDNAアレイの開発と生物時計への応用

開発したプログラムを用いて *T. elongatus* の全遺伝子について最適な配列を持つ45塩基のオリゴヌクレオチドプローブを検索し、90%の遺伝子においてそのようなプローブが見つかった。これらのプローブを用いて、2397遺伝子 (全遺伝子の95%) を含むマイクロアレイを作製した (成果公表11)。*T. elongatus* のゲノム上に含まれない配列を持つネガティブコントロールプローブでは、非常に低いシグナルしか検出されず、特異的なハイブリダイゼーションが起こっていることが確認できた。このオリゴヌクレオチドマイクロアレイで得られた測定値の信頼性を評価するために、概日リズム同調2時間後 (LL2, 主

観的昼の初期) および14時間後 (LL14, 主観的夜の初期) の細胞からRNAを抽出し、マイクロアレイ実験を行った。2枚の独立したマイクロアレイ実験から得られた測定値は非常に似通っており (相関係数0.8以上)、再現性が高いことが示された。20遺伝子についてはノザンプロットによる確認を行い、アレイ実験から得られた結果は正しいことが確認できた (相関係数=0.832)。さらに、LL2とLL14との間で発現量に有意差がある143の遺伝子を同定した。これらは概日発現リズムを示す候補遺伝子である。そのうち69遺伝子はLL14で高い発現量が見られ、逆に74遺伝子はLL2に高い発現量を示した。これらの遺伝子の生理機能は多様であり、代謝や転写翻訳、輸送、DNA複製、細胞の増殖などに関連していた。

藍色細菌における概日遺伝子発現ネットワークの解明のために、時計遺伝子kaiCの誘導直後に発現変動を示す遺伝子を作製したオリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いて同定した (土谷ら、未発表)。kaiC誘導30分後、1時間後でそれぞれ73遺伝子、33遺伝子が統計的に有意な発現変動を示した。そのなかにはmRNAの転写に重要な役割を担う2つのシグマ因子が含まれており、これらが概日遺伝子発現ネットワークの上流に位置することが示唆された。

3. DNAアレイ・リズムデータ解析プログラムの開発

DNAアレイを使って得られる膨大な遺伝子発現プロフィールデータから概日リズムを示す遺伝子を同定するプログラムを開発した (特許出願: 成果公表26,32)。このプログラムは遺伝子発現量の変動パターンをフーリエ変換によりコサイン曲線に近似し、その情報を元に概日リズムを示す遺伝子を同定することができる。SynechocystisのDNAアレイ実験において、このプログラムを用いて発現データを解析し、妥当な結果を得ることができた (下記8参照)。

4. 生物発光リアルタイム測定・連続培養・サンプリング装置の開発

DNAアレイ実験などのための試料調製に使用する目的で、生物発光をリアルタイム測定しながら藍色細菌や藻類を液体培地中で連続培養し、一定時間毎に細胞をサンプリングできる装置を開発した (特許出願: 成果公表25)。

5. *T. elongatus*における生物時計の分子遺伝学的実験系の開発

DNAアレイ実験でスクリーニングされる生物時計に関与した遺伝子や生物時計によって制御されている遺伝子などの候補を詳細に解析するために、以下の5つを達成した。i) 自然形質転換の発見による形質転換系の確立、選択マーカー遺伝子やターゲティングベクターの開発 (成果公表19; 特許出願: 成果公表28,29)、ii) 耐熱性発光タンパク質をコードする生物発光遺伝子の開発と生物発光リアルタイム測定系の開発 (成果公表15)、iii) 生物発光測定装置の開発 (成果公表4,7; 特許出願: 成果公表27,31)、iv) 生物発光データ・リズム解析プログラムの開発 (成果公表8; 特許出願: 成果公表30)。これによって好熱性藍色細菌*T. elongatus*においても、常温性藍色細菌である*Synechococcus*や*Synechocystis*と同様に生物時計の運行を生物発光としてリアルタイム測定し、詳細に解析できるようになった (図2)。

なお、この成果は好熱性生物種にも生物時計が存在することを証明した初の例である。

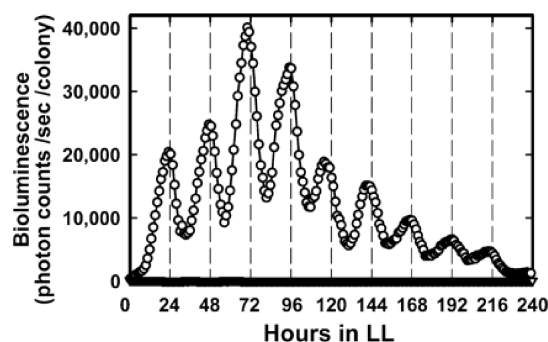


図2. *T. elongatus*の生物発光リズム

6. *T. elongatus*の生物時計分子装置の実験系の開発

生物時計遺伝子クラスターkaiABCや時計関連遺伝子sasAなどをクローニングして大腸菌で発現させ、時計タンパク質や時計関連タンパク質を大量発現させて高度に精製した。これらの耐熱性タンパク質を用いて、時計タンパク質や時計関連タンパク質の構造と機能を生化学的、生物物理学的、X線結晶構造解析などによって解析した。これまでに、時計タンパク質KaiAに関しては、結晶構造を解明し、その構造に基づいて機能残基を同定し (図3)、さらに構造-機能相関を原子レベルで解明した (成果公表16)。同様にKaiBでは、結晶構造を解明し、機能残基と機能サブ構造を同定し、さらに構造-機能相関を原子レベルで解明した (成果公表2,17)。なお、これらの成果は時計タンパク質の構造-機能相関を原子レベルで詳細に解明した初の例である。KaiCでは、電子顕微鏡像の単粒子解析により立体構造を解明し (成果公表20)、さらにATP結合活性や6量体活性、熱安定性などの生化学的・生物物理学的特性を詳細に解析した (成果公表12,18,20)。

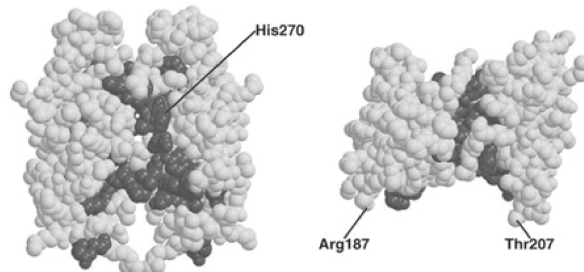


図3. KaiAの立体構造. 右図は左図を上から見たもの

7. *Synechocystis*における生物時計による遺伝子発現のDNAアレイを用いた網羅的解析

*Synechocystis*において宝酒造製らん藻DNAアレイを用いて、*Synechocystis*の遺伝子発現をゲノムワイドに網羅的に解析し、時計制御下で概日発現する遺伝子を同定した (10)。厳しい条件で54個 (全体の2%)、甘い条件で237個 (9%) の遺伝子が概日発現リズムを示した。呼吸や貯蔵炭素源であるpoly(3-hydroxyalkanoate)の合成に関与する遺伝子を含む多くの遺伝子は主観的夕方から晩にかけて発現のピークを示した (図4)。この結果から、*Synechocystis*においては、概日リズムの主な機能は夜間の環境に備えて予め細胞の生理的な状態を最適化することだと思われる。また、似たリズムパターンを示す遺伝子が集団で存在する染色体領域がいくつか見つかった。このことは、染色体の局所的な構造変化が生物時計による転写制御に関与する可能性を示唆している。さらに転写や翻訳に関与するいくつかの遺伝子が概日発現した。

これらの遺伝子は時計遺伝子が生み出す振動情報を下流の遺伝子に出力する役割を担う可能性がある。

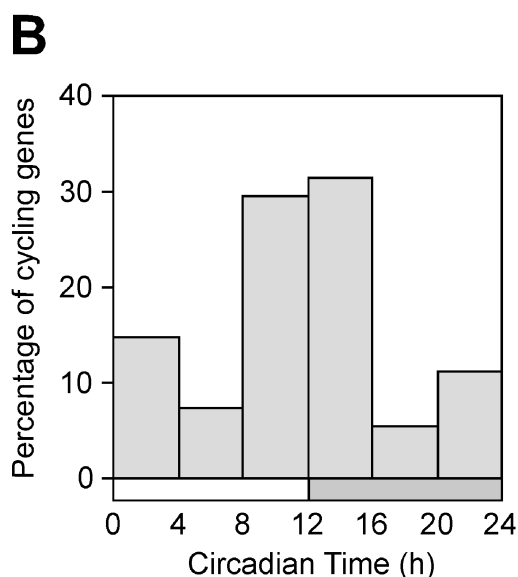
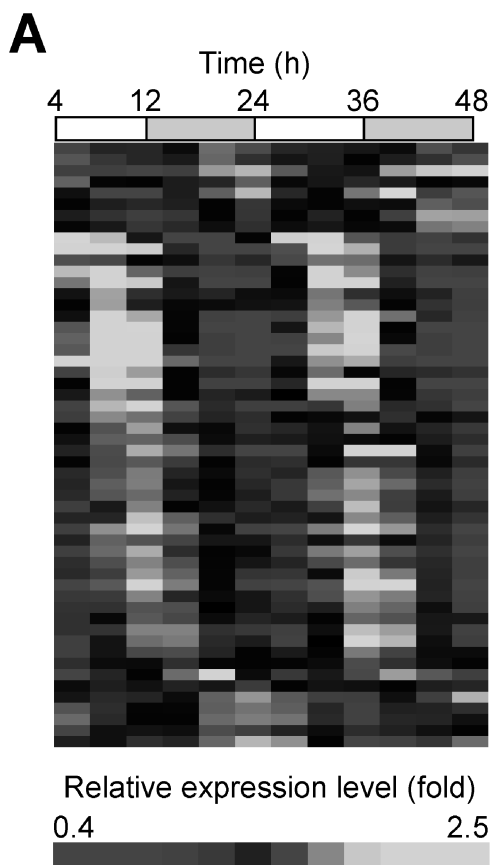


図4. *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 株のマイクロアレイ解析で同定された概日リズムを示す遺伝子の発現プロファイル (A) とピーク位相のヒストグラム

8. *Synechocystis*における生物時計の実験系の確立

*Synechocystis*でも生物時計の実験系を確立する目的で以下の2つを達成した。i)以前に開発した*Synechocystis*生物発光リアルタイム測定系では、生物発光レベルが低すぎる欠点があった (Aoki et al., 1995, J. Bacteriol. 177:5606-5611; 成果公表22)。そこで *Synechocystis*用生物発光レポーター遺伝子を改変し、発光レベルをこれまでの10倍に向上させることができた (成果公表25)、 ii) *Cry*は高等植物では時計入力系の光受容体として機能し、

動物では時計タンパク質として機能することが知られている。*Cry*は藍色細菌にも存在するが、その機能はまだ不明である。そこで*Synechocystis*の時計関連タンパク質 *Cry*の結晶構造を解明し、構造に基づいてその機能について考察した (成果公表21)。

9. 単細胞性緑藻クラミドモナスにおける生物時計の実験系の開発

クラミドモナスでは古くから概日リズムが知られており、リズム変異体も分離されている。しかしながら時計の本体に関しては全く分かっていない、そこで時計遺伝子のクローニングを目指して、生物時計の新たな実験系を開発した。i)クラミドモナスにおいて、10,000のESTクローンのDNAを貼り付けたDNAマクロアレイを作製し、生物時計に制御されて概日発現する遺伝子を網羅的に同定した (成果公表6)。69個の遺伝子が概日発現し、その全てが主観的昼と夜の移行期に発現のピークを示した。8つの葉緑体リボソームタンパク質遺伝子が主観的昼の初期に発現ピークを示し、葉緑体における翻訳が概日制御を受けている可能性が示唆された。ii)葉緑体で発現するホタルルシフェラーゼ遺伝子を全合成し、葉緑体に組み込んで葉緑体遺伝子の発現をリアルタイム測定できる発光株を作製し、葉緑体生物発光リズム測定系を開発した (成果公表1; 特許出願: 成果公表24)。この葉緑体生物発光リズムが概日リズムであることを証明した。さらに、既存のゲノム上のリズム突然変異がこのリズムに及ぼす影響を調べることにより、核の時計遺伝子 (あるいは時計関連遺伝子) によって制御されていることを明らかにした。

10. シロイヌナズナにおけるリズム変異体の網羅的分離と時計遺伝子の網羅的クローニング

モデル高等植物であるシロイヌナズナでは、生物時計に関連する遺伝子がクローニングして解析されているが、それらの遺伝子を破壊してもリズムは消失しないので、真の時計遺伝子とは言えない。そこで真の時計遺伝子のクローニングを目指して、シロイヌナズナで生物時計の新たな実験系を開発した。先ずGI遺伝子とFT遺伝子のそれぞれの発現を生物発光リアルタイム測定できる生物発光株を2種類作製した。これらの株を親株に用いて種子を突然変異源EMSで処理して突然変異を誘発し、合わせて10万個体の芽生えをスクリーニングして、多種多様な新規のリズム表現形を示す35個のリズム突然変異体を分離した (成果公表14)。5個の無周期変異体は3つの相補性群に分類された。3つの相補性群に属するどの変異体においても、生物発光リズムと葉の就眠リズムが共に無周期であった。さらにこれらの変異体では花芽形成における日長感受性が失われていた。したがってこれらの変異は3つの「真の時計遺伝子」上の変異であることが示唆された。そこで先ず1つの相補性群の原因遺伝子PCL1をマッピングクローニング法でクローニングした (成果公表3)。PCL1はゲノムプロジェクトが完了あるいは進行中の植物種で相同遺伝子が存在した。PCL1は新規のGARPタンパク質 (DNA結合タンパク質) の一種であり、実際に核に局在した。pcl1変異は2つ見つかっており、いずれもGARPモチーフを欠失させており、タンパク質機能をほぼ完全に消失させていると思われるナンセンス変異であった。PCL1は概日発現し、PCL1によって負のフィードバック制御を受けていることが判明した。pcl1変異体では、これまでクローニングされている時計関連遺伝子TOC1、CCA1、LHYの発現を無周期にし、逆にPCL1遺伝

子を過剰発現するとこれらの遺伝子は最終的に無周期になった。以上の結果は、PCL1が高等植物の真の時計遺伝子であることを示している。

〈国内外での成果の位置づけ〉

1. 生物時計による遺伝子発現のDNAアレイを用いた網羅的解析は、シロイヌナズナとショウジョウバエでなされているが、藍色細菌では世界初であった。
2. 市販のオリゴDNAアレイは依然高価であり、我々が開発した新規オリゴDNAアレイは安価で簡便なので、自作アレイの作製に最適と思われる。T. elongatusのDNAアレイに関しては、国内外から問い合わせがある。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

1. 当初はSynechococcusにおいてもDNAアレイを作製する予定であったが、ゲノムプロジェクトの遅れから、研究期間中にはアレイ作製に着手できなかった。
2. 研究員や大学院生の異動により、T. elongatusにおいては生物時計による遺伝子発現のDNAアレイを用いた網羅的解析がまだ達成できていない。

〈今後の課題〉

1. T. elongatusにおいては、生物時計による遺伝子発現制御のDNAアレイを用いた網羅的解析を早急に達成したい。
2. Synechocystisにおいては、生物時計による遺伝子発現制御のDNAアレイを用いた網羅的解析が完了し、既に価値ある膨大なデータが得られている。今後はこのデータを活用して、鍵候補となる遺伝子を破壊したり、過剰発現したりすることにより、生物時計による遺伝子発現の制御機構に迫りたい。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. Matsuo, T., Onai, K., Okamoto, K., Minagawa, J., and Ishiura, M. (2005) Real-time monitoring of the circadian gene expression in the chloroplast. *Mol. Cell. Biol.* 26:863-870.
2. Iwase, R., Imada, K., Hayashi, F., Uzumaki, T., Morishita, M., Onai, K., Furukawa, Y., Namba, K., and Ishiura, M. (2005) Functionally important substructures of circadian clock protein KaiB in unique tetramer complex. *J. Bio. Chem.* 280:43141-43149.
3. Onai, K., and Ishiura, M. (2005): PHYTOCLOCK 1 encoding a novel GARP protein essential for the Arabidopsis circadian clock. *Genes Cells.* 10:963-972.
4. Okamoto, K., Onai, K., Furusawa, T., and Ishiura, M. (2005) A portable integrated automatic apparatus for the real-time monitoring of bioluminescence in plants. *Plant Cell Environ.* 28:1305-1315.
5. Kutsuna S, Nakahira Y, Katayama M, Ishiura M, Kondo T. (2005): Transcriptional regulation of the circadian clock operon kaiBC by upstream regions in cyanobacteria. *Mol. Microbiol.* 57:1474-84.
6. Kucho, K., Okamoto, K., Tabata, S., Fukuzawa, H., and Ishiura, M. (2005) Identification of novel clock-regulated

- genes by cDNA macroarray analysis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol. Biol.* 57:889-906.
7. Okamoto, K., Onai, K., Ezaki, N., Ofuchi, T., and Ishiura, M. (2005) An automated apparatus for the real-time monitoring of bioluminescence in plants. *Anal. Biochem.* 340:187-192.
8. Okamoto, K., Onai, K., and Ishiura, M. (2005) RAP, an integrated program for monitoring bioluminescence and analyzing circadian rhythms in real time. *Anal. Biochem.* 340:193-2000.
9. Kucho, K., Aoki, K., Itoh, S., and Ishiura, M. (2005) Improvement of the bioluminescent reporter system for real-time monitoring of circadian rhythms in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Genes Genet. Syst.* 80:19-23.
10. Kucho, K., Okamoto, K., Tsuchiya, Y., Nomura, S., Nango, M., Kanehisa, M., and Ishiura, M. (2005) Global analysis of circadian expression in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* 187: 2190-2199.
11. Kucho, K., Tsuchiya, Y., Okamoto, Y., Harada, M., Yamada, M., and Ishiura, M. (2004) Construction of unmodified oligonucleotide-based microarray in the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *Genes Genet. Syst.* 79: 319-329.
12. Hayashi, F., Ito, N., Uzumaki, T., Iwase, R., Tsuchiya, Y., Yamakawa, H., Morishita, M., Onai, K., Itoh, S., and Ishiura, M. (2004) Roles of two ATPase-motif-containing domains in cyanobacterial circadian clock protein KaiC. *J. Biol. Chem.* 279: 52331-52337.
13. 0501151118
Kucho, K., Yoneda, H., Harada, M., and Ishiura, M. (2004) Determinants of sensitivity and specificity in spotted DNA microarrays with unmodified oligonucleotides. *Genes Genet. Syst.* 79: 189-197.
14. 0501151152
Onai, K., Okamoto, K., Nishimoto, H., Morioka, C., Hirano, M., Kami-ike, N., and Ishiura, M. (2004) Large-scale screening of Arabidopsis circadian clock mutants by a high-throughput real-time bioluminescence monitoring system. *Plant J.* 40: 1-11.
15. 0408090953
Onai, K., Morishita, M., Itoh, S., Okamoto, K., and Ishiura, M. (2004) Circadian rhythms in the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus*: compensation of period length over a wide temperature range. *J. Bacteriol.* 186: 4972-4977.
16. 0501151214
Uzumaki, T., Fujita, M., Nakatsu, T., Hayashi, F., Shibata, H., Itoh, N., Kato, H., and Ishiura, M. (2004) Crystal structure of the C-terminal clock-oscillator domain of the cyanobacterial KaiA protein. *Nature Struct. Mol. Biol.* 11: 623-631.
17. 0403301116
Iwase, R., Imada, K., Hayashi, F., Uzumaki, T., Namba,

- K., and Ishiura, M. (2004) Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the circadian clock protein KaiB from the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *Acta Cryst. D* 60: 727-729.
18. 0403301123
Hayashi, F., Ito, H., Fujita, M., Iwase, R., Uzumaki, T., and Ishiura, M. (2004) Stoichiometric interactions between cyanobacterial clock proteins KaiA and KaiC. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316: 195-202.
19. 0403291832
Onai, K., Morishita, M., Kaneko, T., Tabata, S., and Ishiura, M. (2004) Natural transformation of the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1: a simple and efficient method for gene transfer. *Mol. Genet. Genomics* 271: 50-59.
20. 0303250926
Hayashi, F., Suzuki, H., Iwase, R., Uzumaki, T., Miyake, A., Shen, J.-R., Imada, K., Furukawa, Y., Yonekura, K., Namba, K., and Ishiura, M. (2003) ATP-induced hexameric ring structure of the cyanobacterial circadian clock protein KaiC. *Genes Cells* 8: 287-296.
21. 0303250920
Brudler, R., Hitomi, K., Daiyasu, H., Toh, H., Kucho, K., Ishiura, M., Kanehisa, M., Roberts, V.A., Todo, T., Tainer, J.A., and Getzoff, E.D. (2003) Identification of a new cryptochrome class: structure, function, and evolution. *Mol. Cell* 11: 59-67.
22. 0204181803
Aoki, S., Kondo, T., and Ishiura, M. (2002) A promoter-trap vector for clock-controlled genes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Microbiol. Methods* 49: 265-274.
23. 0204181821
Taniguchi Y., Yamaguchi, A., Hijikata, A., Iwasaki, H., Kamagata, K., Ishiura, M., Go, M., and Kondo, T. (2001) Two KaiA-binding domains of cyanobacterial circadian clock protein KaiC. *FEBS Lett.* 496:86-90
24.
発明名称：葉緑体で機能するホタルルシフェラーゼ遺伝子とそれを用いた葉緑体遺伝子発現のリアルタイムモニタリング；出願年月日：2005.02.4；出願国：日本；出願番号：特願2005-029217；発明者：石浦正寛、松尾拓哉、小内清；出願人：国立大学法人名古屋大学
25.
発明名称：制御プログラム及び培養装置；出願年月日：2004.12.28；出願国：日本；出願番号：特願 2004-380651；発明者：石浦正寛、岡本和久；出願者：国立大学法人名古屋大学
26.
発明名称：DNAアレイ法の時系列データとデータ中に含まれるリズム成分とを解析するためのプログラム；出願年月日：2004.02.27；出願国：日本（外国出願手続き中：アメリカ、イギリス、フランス、ドイツ）；出願番号：特願2004-53743；発明者：石浦正寛、岡本和久；出願者：名古屋大学長
27.
発明名称：生物試料の生物発光測定装置；出願年月日：2003.11.14；出願国：日本；出願番号：特願2003-384577（海外出願 Case:U2003P71）；特開2005-143371；発明者：石浦正寛、岡本和久、小内清、古澤孝良；出願者：名古屋大学総長
28.
発明名称：遺伝子移入ベクター、好熱性藍色細菌へ遺伝子を移入する方法とその応用、および好熱性藍色細菌の凍結保存法；出願年月日：2003.10.06；出願国：日本；出願番号：特願2003-347339；公開番号：特開2005-006640；発明者：石浦正寛、小内清、森下めぐみ；出願者：名古屋大学総長
29.
発明名称：遺伝子移入ベクターおよび好熱性藍色細菌へ遺伝子を移入する方法；出願年月日：2003.05.29；出願国：日本；出願番号：特願2003-152472；公開番号：特開2005-006640；発明者：石浦正寛、小内清、森下めぐみ；出願者：名古屋大学総長
30.
発明名称：生物発光測定・解析プログラム。該プログラムを記憶したコンピュータ読み取り可能な記録媒体並びに該プログラムおよび該コンピュータを含む生物発光測定・解析装置；出願年月日：2003.03.07；出願国：日本、アメリカ；出願番号：特願2003-06120；公開番号：特開 2004-271302（海外出願 Case:U2002P99US）；アメリカ合衆国特許出願第10/79173号；発明者：石浦正寛、岡本和久；出願者：名古屋大学総長
31.
発明名称：生物試料発光測定装置用生物試料培養・搬送装置；出願年月日：2003.03.06；出願国：日本、アメリカ；出願番号：特願2003-060069；公開番号：特開2004-267058；発明者：石浦正寛、岡本和久；出願者：名古屋大学総長
32.
発明名称：DNAマイクロアレイ、及びそれを用いたスクリーニング方法；出願年月日：2002.09.30；出願国：日本；出願番号：特願2002-285710；公開番号：特開2004-121009；発明者：石浦正寛、九町健一；出願者：名古屋大学総長