

# 遺伝子レベルで細胞から個体まで研究出来る線虫モデル

香川 弘 昭

岡山大学大学院 自然科学研究科 生命分子科学専攻 (理学部 生物学科)

岡山実験動物研究会の40回記念大会で講演出来ることを光栄に存じます。線虫 *C.エレガンス* を扱った研究についての話が、参加しておられる広い分野の先生方に、多少とも御役に立てればと願っております。モデル生物には2つの役割があり、ヒト研究のモデルとしてのマウス等の哺乳動物と、発生過程を研究するのに好都合なショウジョウバエ等の飼育容易な生物です。線虫は後者として選ばれ、遺伝学、生化学の研究成果に続いて全ゲノム配列が決定され、ヒトの遺伝子との相関性が解ってきたので、近頃は前者のモデルにもなってきました。初めに線虫関連の参考書3冊とデータベースのアドレスを示します<sup>1-4)</sup>。ここでの話は3つの部分からなり、まず線虫 *C.エレガンス* について概略し、我々がやっている筋肉遺伝子についての研究<sup>5-9)</sup>を紹介して、最後に現在行われている研究<sup>11-13)</sup>の動向を述べます。

## 1. *C.エレガンス*は3日で成虫になり200個の卵を産む

センチュウと言えばマツノザイセンチュウ、根こぶ線虫、回虫、糸状虫等があり寄生性として良く知られているようです。我々が使っている *C.エレガンス* は自活性で、大腸菌を餌にして、摂氏20度、3日で成虫になり、遺伝解析が行えるので突然変異体が多数単離されています。*C.エレガンス* は培養細胞と同じく液体窒素で永久保存出来るのでモデル生物として最適です。1967年イギリスのMRC分子生物学研究所でF.クリックとS.ブレナーが討論の末、セントラルドグマ成立以後の生物学の研究テーマは「発生と神経系」であると定めて選ばれたモデル生物が線虫 *C.エレガンス* (以下線虫) です。

私がケンブリッジから帰国して岡山で線虫の研究を始めたのは1985年秋で、S.ブレナーは、1987年1月に林原国際フォーラム「自動及び高速DNA塩基配列決定法」についての国際ワークショップに来岡され、一般市民に対しても講演しておられます。余談ながら、この企画は東大教授の

和田昭允先生(当時)が主催され、ハーバード大学のギルバード教授やオックスフォード大学のザン教授も参加されました。ブレナー博士はカリフォルニアの分子生物学研究所長として現在でもフグゲノムの研究を中心に現役で活躍されています。日本が大変好きで年に数回は渡日されており、2001年秋の第73回遺伝学会(東京)にも特別講演されます。

線虫は全細胞系譜、全神経網に続いて全塩基配列も1998年末に決定されました。97,000 Kbpに19,000遺伝子がコードされ、ヒトと相同な遺伝子も40%ほど見つかっています。2001年2月に発表された30億塩基対あるヒトの遺伝子数が35,000で意外と少ないのが話題になっています。線虫は、細胞死、神経、発生、老化(加齢)等の研究においても先導的役割を果たしております。細菌からヒトまで解読された生物の全ゲノムと遺伝子数をまとめてみました。

表1 各種ゲノムの全塩基対と遺伝子数

生物種	全塩基対 x Kbp	遺伝子数	決定された年	Kbp/遺伝子
<b>原核生物</b>				
大腸菌 <i>Escherichia coli</i>	4,636	4,803	1997	0.96
	4,639	4,288	1997	1.08
胃内細菌 <i>Helicobacter pylori</i>	1,667	1,590	1997	1.04
インフルエンザウイルス <i>Haemophilus influenzae</i>	1,830	1,743	1995	1.05
枯草菌 <i>Bacillus subtilis</i>	4,214	4,100	1997	1.03
結核菌 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4,411	4,000	1998	1.10
<b>真核生物</b>				
酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12,068	5,885	1996	2.05
線虫 <i>Caenorhabditis elegans</i>	97,000	19,000	1998	5.10
シロイヌナズナ <i>Arabidopsis thaliana</i>	125,000	25,948	2000	4.80
ショウジョウバエ <i>Drosophila melanogaster</i>	120,000	13,600	2000	8.82
ヒト <i>Homo sapiens</i>	3,000,000	35,000	2001	85.7

大腸菌、酵母は単細胞で、ゲノムサイズも小さく、増えるという特性から、分裂増殖の研究に用いられています。線虫は1,000細胞からなり簡単ですが、皮膚、筋肉、神経などを持った高等動物です。遺伝子も多細胞に特徴的な、転写制御因子、膜在性受容体/イオンチャンネル、神経関連分子、リン酸化酵素などの情報伝達関連分子、細胞骨格が大部分を占めております。3日で成虫になるのでマウスやショウジョウバエよりも遺伝学が簡単で、色々な変異体が単離されています。最近では学習や記憶の研究も盛んに行われています。生物が細胞からなり、細胞には遺伝子産物の蛋白質が働いているという普遍性から、線虫の研究結果がマウスやヒトにもすぐ適用できるからです。

飼育は大腸菌を生やした寒天培地の上で行い、通常は雌雄同体で、自家受精により、1匹から数百個の卵が産まれ虫になります。1,000匹に1匹の割合で現れる雄を使えば簡単に遺伝子を一方に伝えることも出来ます。メンデルの法則により、ヘテロのF1からF2では1:2:1の割合で分離するので、変異遺伝子をホモに持つ個体が1/4の割合で出現します。体が透明なので、受精、細胞分裂から胚発生の過程を光学顕微鏡で観察出来ます。

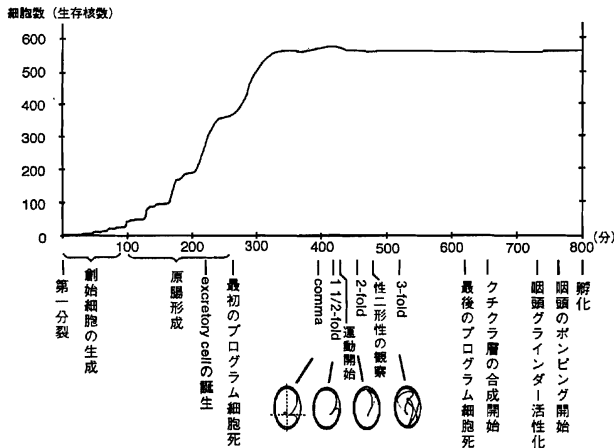


図1 細胞分裂と細胞数

受精してからの時間を横軸に細胞数を縦軸に示してある。筋肉は細胞分裂終了後、形態形成期から作られる<sup>1,2)</sup>。

受精からの時間を横軸に細胞数を縦軸にグラフにしたものです。発生は厳密に時間で決まっているので、何度も繰り返して観察することにより、全細胞系譜が1983年に決定され、今では多くの教科書にも掲載されています。細胞分裂期に続いて形態形成、組織分化が起こります。後期に細胞数が減少しているのは、神経系などにおける計画的

細胞死によるものです。運動不良や形態異常の変異体と正常な線虫の細胞系譜を比較して、計画的細胞死の変異体では死ぬべき細胞が死んでないことが解りました。

次に我々が研究している筋肉についての概略を示します<sup>5)</sup>。

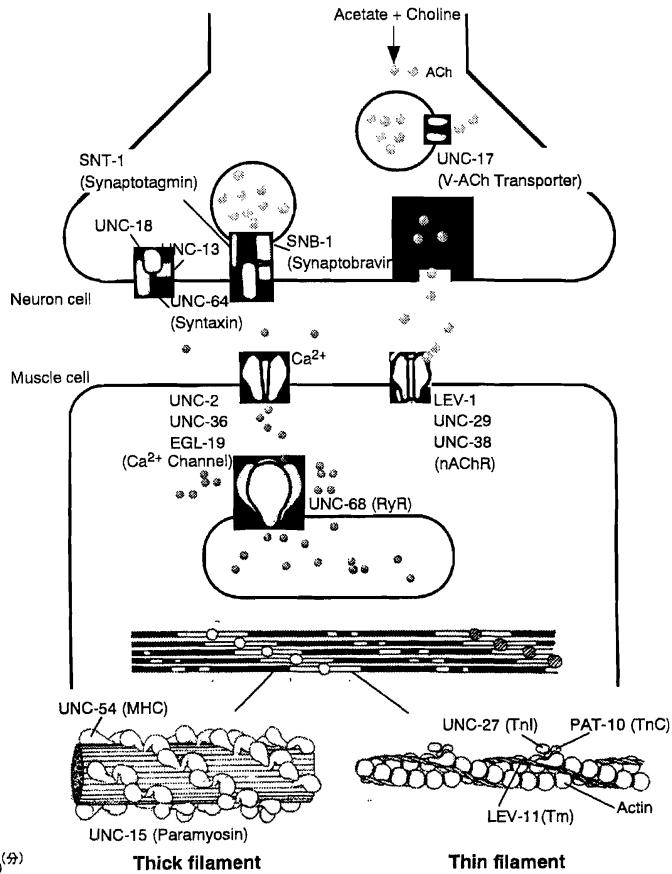


図2 神経筋接合部と興奮収縮連関に関する遺伝子 神経前膜のアセチルコリン遊離から、神経後膜のアセチルコリン受容体、カルシウムチャンネル、筋小胞体のリアノジン受容体および筋繊維のタンパク質について示してある。

線虫の筋肉には餌を食べるために使われる咽頭筋と刺激に応じた動きに働く体壁筋があり、それぞれ、ほ乳類の心筋と骨格筋類似と考えられています。ミオシン重鎖のモノクローナル抗体で両組織のアイソフォームが染め分けられたことから、咽頭筋と体壁筋では異なる遺伝子産物が筋肉を構成していることが解りました。それ以外に産卵の時に使われる陰門筋、脱糞に使われる肛門筋があり、雄特有の雄尾筋は交配時に使われます。

我々が筋肉蛋白質遺伝子のクローニングに用いた方法を簡単に説明します。単離した筋肉蛋白質の抗体を使って、ゲノム断片と *lacZ* 遺伝子を

読み枠を揃えてつないで大腸菌で発現させたプラスミドライブラリーを選択することで、遺伝子の断片をクローン化しました。線虫のゲノムはイントロンが少なく DNA 断片と *lacZ* 遺伝子との融合プラスミドによる発現プラスミドライブラリーを作ると、形質転換した大腸菌は  $\beta$ -ガラクトシダーゼと目的蛋白質断片との融合蛋白質を作ります。我々はこの方法で、パラミオシン<sup>4)</sup>、トロポミオシン<sup>6,7)</sup>、トロポニン<sup>9)</sup>、トロポニン I 遺伝子をクローン化しました。これらとは別に筋小胞体にあるカルシウム濃度依存性カルシウム放出チャンネルなど、興奮収縮に係わるリアノジン受容体の研究もしております<sup>5,8)</sup> (図2)。

図には示してありませんが、筋肉には幾つかの蛋白質があり多数のアイソフォームが知られています。ミオシン重鎖、パラミオシン(無脊椎動物の太い繊維の芯)等の変異体の運動不良の原因は体壁筋の太い繊維を構成するアイソフォームの繊維形成不良でした。これらについてはすでに正書に解説したので<sup>3)</sup>、今回は運動異常をおこす筋肉タンパク質、特にトロポニン C やトロポミオシンを用いた筋肉遺伝子の研究成果を述べます<sup>5,7,9)</sup>。トロポニン C 変異の原因は、カルシウム及びトロポニン I と結合出来ないことでした。さらにトロポニン C 変異体は胚発生致死なので、線虫は変異遺伝子をヘテロにして生育継体させます。トロポニン C 変異体の解析は全動物で初めての解析例です。トロポミオシン変異による個体はレバミソール耐性のもとの胚発生致死のものが有りました。以下詳しく解説します。

## 2 筋肉遺伝子の変異は筋繊維形成のみならず筋発生にも影響する

### 2.1 トロポニン C 遺伝子 *tnc-1/pat-10* について<sup>5, 9)</sup>

トロポニン C は 4 つの  $Ca^{2+}$  結合部位をもつ、筋収縮の制御に関わるタンパク質で N 末端側のサイト I, II は  $Ca^{2+}$  が特異的に結合し、C 末端側のサイト III, IV は  $Ca^{2+}$  又は  $Mg^{2+}$  が結合します。トロポニン C は筋収縮制御における  $Ca^{2+}$  濃度による構造変化や、トロポニン I との結合性、また、カルモジュリンの筋肉型として、進化的興味から組織特異性や生物種による違いについて多くの生化学者が取り扱って来ました。

我々は線虫のトロポニン C 遺伝子 *tnc-1* を、抗回虫トロポニン C 抗体を用いてクローン化し、第 1 染色体上に位置づけ、同じ座位の *pat-10* 変異はトロポニン C 遺伝子の変異であることを証明しました。ショウジョウバエやザリガニなどの無脊椎動物、脊椎動物の心筋のトロポニン C の順で高い相同性を示します。*pat-10* 変異体は、胚発生が

2-fold 期で停止する *Pat* (paralyzed, arrested elongation at two-fold stage) 変異の一つで<sup>10)</sup>、2-fold 期以降の胚は体壁筋の伸長が止まって、虫は到死になります。*pat-10* 変異体ではトロポニン C 遺伝子内で 2ヶ所の塩基置換が起こり、サイト II の 64 番目のアスパラギン酸がアスパラギンに置換し (D64N), 153 番目のトリプトファンが停止コドンになる (W153\*) ことで C 末端ヘリックスの欠失が生じていました。遺伝子操作法により、*pat-10* 変異のそれぞれ 1 つずつの変異をもつトロポニン C を大腸菌内で産生させて、 $Ca^{2+}$  結合能とトロポニン I との結合能を調べたところ、正常なトロポニン C は  $Ca^{2+}$  の存在下では  $Ca^{2+}$  不在下よりも SDS-PAGE での泳動度が大きくなりました。これに対して、D64N の置換が生じた変異トロポニン C では  $Ca^{2+}$  の濃度差による泳動度の差がなくなりました。W153\* の欠失が生じた変異トロポニン C では  $Ca^{2+}$  の濃度差による泳動度変化は見られましたが、欠失に相当して分子量が減少していました。別途クローン化した cDNA を用いてトロポニン I を大腸菌内で産生させ、トロポニン C との結合性を調べたところ、この欠失トロポニン C はトロポニン I と結合しませんでした。トロポニン C の C 末端 H ヘリックスは、トロポニン I との結合に必須であることがわかりました。

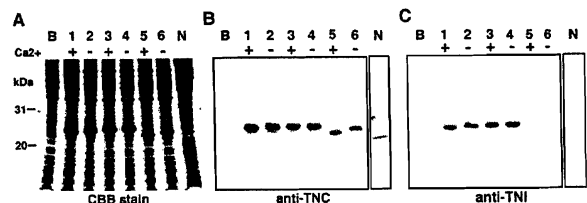


図3 変異トロポニン C のカルシウムとトロポニン I との結合

野生型(1, 2)及びカルシウム結合不良(3, 4), C 末端欠失のトロポニン C(5, 6)を大腸菌で産生してメンブレンにプロットした後、抗トロポニン C 抗体、抗トロポニン I 抗体と反応させた。奇数番号はカルシウム存在、偶数番号は 5mM EDTA 存在下で泳動した<sup>9)</sup>。

これらの結果は、ウサギ骨格筋トロポニン C と N 末端側トロポニン I (1-47) 複合体の X 線結晶構造解析とも一致しています。

*pat-10* 変異体は抗トロポニン C 抗体で染色されないことから、筋線維上にトロポニン C が存在しないことがわかります。変異トロポニン C がトロポニン I と結合しないため、C-I 複合体が形成

されていないのだろうと推定されます。トロポニンCが機能しないと、体壁筋が形成されず、体の伸長が出来なくなり、やがて致死になると考えられます。これはトロポニンCが筋収縮の調節のみならず、筋線維形成にも関わり、胚発生にも必須であることを示しています。*pat-10* 変異体の解析はトロポニンC変異を持つ生物として初めての解析例です。なぜこれまでトロポニンCの変異体が単離されなかったのでしょうか。従来は成虫の表現型を指標にして単離していたので、胚発生致死 *Pat* 個体を見落としていたのでしょうか。今後は改変トロポニンCを線虫に導入して、遺伝子の変化が個体の表現型にどう影響するかを調べます。

## 2.2 トロポミオシン遺伝子 *tmy-1/lev-11* について<sup>5-7)</sup>

トロポミオシンは筋肉型と細胞骨格型の2つに分けられ、さらに筋肉型は骨格筋型と平滑筋型に分けられます。トロポミオシンは7アミノ酸残基の繰り返しをもち、 $\alpha$ -helix によるコイル-コイル構造の二量体を形成して、アクチンの二重らせんの溝に沿ってアクチン-トロポニン複合体の相互作用を調節しています。

線虫のトロポミオシン遺伝子 *tmy-1* は14個のエクソンからなり、2つのプロモーターと択一的スプライシングにより作られ、少なくとも3つのアイソフォーム (CeTM I, II, III) をコードしています。アイソフォーム特異的なプロモーターとエクソンを読み枠を揃えて *lacZ* につないだ融合遺伝子を線虫に微注入し、得られた形質転換体を解析したところ、CeTM I と II は体壁筋で、CeTM III は咽頭筋で発現しました。抗線虫トロポミオシン抗体による抗体染色の結果からも、CeTM I, II は体壁筋特異的なアイソフォームで、CeTM III は咽頭筋特異的なアイソフォームであることが明らかになりました。

*tmy-1* は第1染色体上のミオシン重鎖遺伝子 *unc-54* の隣りに位置しており、同じ座位に *lev-11* が位置づけられていました。レバミゾールはニコチン性アゴニストで、野生型の線虫に作用させると筋肉は強縮をおこし、最終的には麻痺します。*lev-11* 変異はレバミゾール耐性変異であり、その中でトロポミオシン遺伝子に変異をもつ *st557* 株と *x12* 株が単離されています。*st557* 株は胚致死 (*Pat*) 表現型を示し、スプライス異常によりイントロン1の中でストップコドンが生じています。*st557* 株の胚が抗線虫トロポミオシン抗体で染色されないことから、*st557* 株はトロポミオシンが存在しないため、細い繊維が形成されず、致死になると考えられます。この表現型はトロポニンCの *pat-10* 変異体と類似しています。なお *st557* 株

の胚では咽頭筋が動いているので、CeTM III が咽頭筋で正常に機能していると思われます。他方 *x12* 株は *Unc* 表現型を示し、234番目のグルタミン酸がリジンに置換し (E234K)、側鎖の電荷がマイナスからプラスに変わっていました。図2から分かるようにレバミゾールによって励起された筋収縮の信号は、トロポニン複合体までは正常に伝わるが、変異トロポミオシンの所で止まると考えられます。234番目のグルタミン酸はトロポミオシンの二量体形成に必要な部分ではないため、変異の原因はトロポニン複合体とトロポミオシンの間、又はトロポミオシンとアクチンの間の分子間相互作用の異常だろうと考えられます。このグルタミン酸はトロポニン複合体あるいはアクチンとの相互作用に必要な部分だと考えられます。また、この領域は3つのアイソフォームに共通のエクソンであり、他の動物種でも保存されているので機能的に重要であると推定されます。

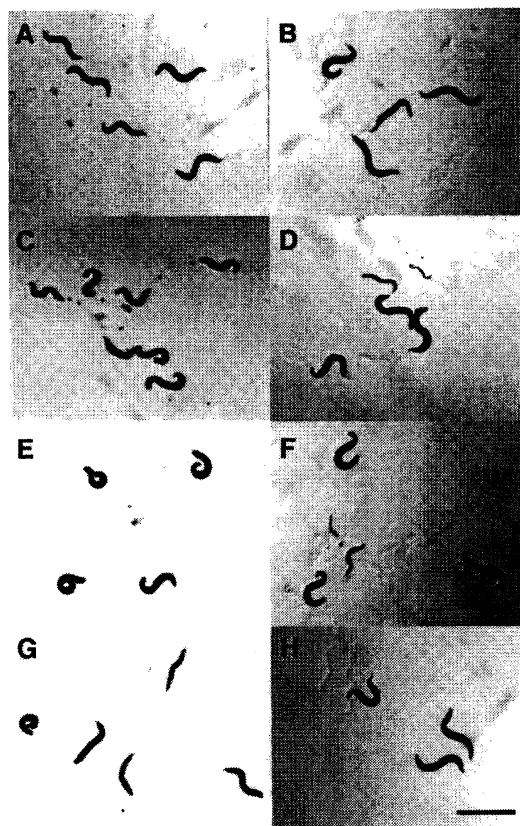


図4 野生型と *lev-11* 線虫のレバミゾールに対する反応

野生型 (A) と *lev-11* 線虫 (B) に 1mM レバミゾールを加えると、野生型は 10 秒後 (C)、30 秒後 (E) に強縮して 5 分後 (F) に殆どの虫が動かなくなるが変異体 (D, F, H) では殆ど影響されない<sup>7)</sup>。

ほとんどのレバミゾール耐性変異は、作用から予測されるようにアセチルコリン受容体の変異です。レバミゾール耐性変異の1つとしてトロポミオシンの変異体が単離されたことは、注意深い変異体の単離が新しい機能解析のきっかけをもたらした点で面白い結果です。神経後膜は興奮してもトロポミオシンが変化することで分子間相互作用が変化し、筋肉が収縮しなくなると考えられます。今後 *x12* 株の変異分子を生化学的あるいは物理化学的に解析すれば、筋収縮における細い繊維の動的構造変化を分子レベルで解明する手がかりがつかめます。

以上、トロポニンCとトロポミオシンの変異体の遺伝子から行動まで述べましたように、線虫では分子から個体レベルまでの詳細な解析が可能です。従来の手法では生化学的に精製したタンパク質を物理化学的に測定測定することは可能ですが、生物個体での機能を直接測定することは困難でした。線虫を使うことにより、分子から個体までを段階的に解析できます。

### 3. 線虫を用いた最近の研究

#### 3.1 ポストゲノムの研究

線虫では DNA 断片をプローブとしてコスミドライブラリーをスクリーンして、得られたクローンをデータベースの物理的染色体上に位置づけ、遺伝子地図と対応させることが出来ます。逆に変異体を単離して遺伝子地図上に位置づけると、対応するコスミドクローンが分かり、その DNA を変異体に導入して変異機能が回復するかどうかを調べることで、遺伝子を同定することも出来ます。今では途中の実験を省いて任意の塩基配列が分かればコンピューターによるデータベースを解析して、標的遺伝子についての答えを得る事もできます (<http://www.wormbase.org/>)。cDNA の 5' 端は少し欠けている場合もありますが、殆どの cDNA がクローン化されており、データベースのゲノム配列から遺伝子上流配列も推定出来ます。したがって近頃は線虫以外の研究者が、遺伝子塩基配列の相同性から、線虫ホモログを見いだして、線虫個体での発現場所や突然変異体の表現型を調べる研究が増えてきました。

#### 3.2 RNAi 法による遺伝子の機能解析および *lacZ* や *gfp* 融合プラスミドを用いた発現組織の同定

今盛んに行われているのは全ての遺伝子の欠失突然変異体を単離するノックアウトプロジェクトです。化学薬剤により突然変異体を誘発し、PCR 法により欠失部位を決め、順次全ての遺伝子の欠

失変異体を単離するプロジェクトで、日米英蘭等の国際的協同研究が進められています。従来行われてきた、トランスポゾン挿入による突然変異体の単離と合わせて網羅的解析が進行しています。アンチセンスの2重鎖RNAを線虫に導入してタンパク質合成を妨げる事で特定遺伝子の機能喪失による表現型を調べるプロジェクトも複数のグループで進められており、これまでに5つの常染色体と一つの性染色体のうち、第1, 第3染色体の全ての遺伝子の解析結果が報告されています<sup>12, 13)</sup>。ニューロンで発現する遺伝子や germ line ではこの方法が使えないという制限が有りながら、取りあえず全ての遺伝子について解析するという方法が次々に進められています。

細胞系譜が分かっているのも、どの遺伝子が何時何処でどの細胞で働いているかを特定できます。*lacZ* や *gfp* などの標識遺伝子を目的の遺伝子のプロモーター下流につないで線虫に微注入して、形質転換体の操作した遺伝子産物の分布を解析することにより、各遺伝子の発現場所を調べる仕事も進められており、結果が順次データベースに公開されています。合わせると、線虫の遺伝子は塩基配列、発現場所、欠失株も表現型が全てデータベース上で分かるようになります。

#### 3.3 遺伝病の線虫モデル

細胞死が線虫の正常発生過程で起こっていることが分かって、ヒトやマウスでの細胞死に類似の反応機構が見いだされ飛躍的に研究が進みました。引き続きヒト遺伝病として知られるアルツハイマー病やハンチントン病等の原因遺伝子が線虫でも見いだされ、これまで線虫を扱っていた人のみならず生化学、医学からの研究参加が増加しています。最近では肥満や寿命等についても線虫を用いた研究が多数行われています。病状そのものはヒトと異なるのですが、相同遺伝子の働く反応が線虫でも見られ、ヒトの遺伝病解析の手がかりが得られるということです。病状(表現型)は多数の素過程の積み重ねですから、関係する分子の数は異なっても、個々の分子反応はヒトから線虫まで同じと考えられるからです。

#### 3.4 これからの線虫モデル研究

生物の特性は“分裂と増殖”に加えて“自ら動く”ことである。細胞分裂異常は“ガン”として、特異性については“免疫”として詳しく調べられてきました。運動あるいはモータータンパク質についても分子1ヶの運動が可視化されています。我々の結果は分子機械の部品が機械を作る過程にも深く関わっていることを示したので、これからは分子機械を作る過程と分子機能を合わせて

理解することが可能です。これまでも言われてきたように、“生物は積み木細工”で作られています。初めから理想的な分子機械があるのではなく、すでに有る構造に付け足して新しいものを作り、不都合があれば除くという加減方式で作られているようです。線虫のゲノム解析結果は一つの生き物をくわしく解析する方向と、細菌、ハエからヒトまで他の生物との比較研究する方向があります。下等生物の分子は未分化ですが多機能で、分化すると何かを除かれことで特殊機能が加わっているようです。比較研究することで分子機械のからくりがよりくわしく理解出来ます。線虫からヒトまで全ゲノムの塩基配列が決まったことで、コード領域のみならず非コード領域の意味も解かなければならないでしょう。分子機械の部品が時間と場所に依じて如何に準備され組み立てられるかも興味ある問題です。これまで困難であった“何故”あるいは“どうして”という疑問も解けるようになってきました。線虫をモデルとした研究は、初めに指摘した、飼育しやすさ、短い生活環に加えて遺伝子や細胞関連情報の蓄積があるので、加速度的に増えていくでしょう。

## 謝 辞

内容については岡山大学理学部の分子生物学研究室での学生達との研究をもとにまとめ、図は大学院学生の濱田智代、寺見浩美の二人に作製してもらった。

## 文 献

線虫についての総説

1. Wood, W.B. ed. The nematode *Caenorhabditis elegans* CSH Laboratory Press(1988)
2. Riddle, D.L., Blumenthal, T., Meyer, B. J., Priess, J. R., ed *C. elegans* II CSH Laboratory Press(1997)
3. 小原雄治編 線虫 [1000細胞のシンフォニー] ネオ生物学シリーズ 5, 共立出版, 東京 (1997)

線虫についてのデータベース

<http://www.wormbase.org/>

我々研究

4. 安藤恵子, 香川弘昭「線虫の筋肉発生における組織特異的遺伝子発現と分子集合」細胞工芸学 10, 687-694(1991)
  5. 濱田智代, 寺見浩美, 香川弘昭 「線虫 *C. elegans* を用いた興奮収縮連関の解析」生物物理 22713-19(2000)
  6. Kagawa, H, et al. Genome structure, mapping and expression of the tropomyosin gene *tmy-1* of *Caenorhabditis elegans* *J. Mol. Biol.* 251, 603-613(1995)
  7. Kagawa, H. et al. Mutations and expressions of the tropomyosin gene and troponin C gene of *Caenorhabditis elegans*. *Cell Struct. Funct.* 22, 213-218(1997)
  8. Sakube, Y., et al. An abnormal ketamine Response in mutants defective in the ryanodine receptor gene *ryr-1(unc-68)* of *Caenorhabditis elegans* *J. Mol. Biol.* 267, 849-864(1997)
  9. Terami, H. et al. Genomic organization, expression, and analysis of the troponin C gene *pat-10* of *Caenorhabditis elegans* *J. Cell Biol.* (1999)
- 胚発生致死についての突然変異体単離
10. Williams, B. D. and Waterston, H. R. Genes critical for muscle development and function in *Caenorhabditis elegans* identified through lethal mutations *J. Cell Biol.* 124, 475-490(1994)
- 線虫の全ゲノム配列決定と RNAi
11. *C. elegans*: Sequence to Biology. *Science* 282, 2011-2046. (1998)
  12. Fraser A. G. et. al., Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature* 408: 325-330(2000)
  13. Gonczy, P. et.al. Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on chromosome III. *Nature* 408: 331-336(2000)