

5

ncDNA

N E W S L E T T E R

「ゲノムを支える非コード DNA 領域の機能」

文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究（研究領域提案型）

2013
December





contents

巻頭言	2
研究成果の紹介	
□ ファンconi貧血コア複合体とATR-ATRIPキナーゼとの機能相関	4
□ DNA二重鎖切断の修復と 染色体動態制御の連携に関わるキープレイヤー	6
□ ACAT1遺伝子のMLPA法確立と Alu配列による遺伝子内欠失例の解析	8
□ 染色体断裂は、いつもDNA二重鎖切断が原因とは限らない	10
□ ヒトの構造変異ホットスポットの進化	12
□ Sir2は非コードの転写を抑制して酵母の寿命を維持している	14
学会・シンポジウム「国際シンポジウム」「第5回領域会議」	16
コラム	17
編集後記	19

巻頭言

ご報告 —中間評価を終えて—

当研究領域は折り返し点（3年目）を迎え、先日文部科学省で中間評価を受けて参りました。結果はおかげさまで「期待どおりの進展が認められる」という褒めの言葉を頂きました。残りの2年半も期待に添うように班員一同全力投球で研究に励んで参ります。引き続きご支援、ご指導のほど、どうぞよろしくお願いいたします。

中間評価の際にまとめた資料では2013年6月現在で当領域発表論文は135報、共同研究は37件にのぼり、内4件は既に論文として発表いたしました。総括班で購入した次世代シーケンサーもフル稼働中で次々に新しい非コード機能性配列（インターメア）の候補をはじき出しています。後半ではそれらの機能と配列間の関係、最終的に染色体統御の全体像を解明したいと考えています。

新しい概念の芽

成果としての論文発表はもちろん重要ですが、当班設立の理念の1つは共同研究による「新しい概念の創出」です。個別研究では解析が難しい「染色体機能の連係の実体」を明らかにしようというものです。非コードDNA領域が担っていると予想される配列間の相互作用を染色体全体に渡って解明したいと考えています。既に大変興味深いいくつかの新事実が判ってきております。これらは、**個別に研究されていた染色体機能を結びつけるものは何か?**という問いをもってはじめて見えてきたものです。いずれもまだ「芽」の段階で詳しい解析はこれからですが、セントロメア、テロメア、インターメアを繋ぐネットワークの実体が姿を現し始めています。乞うご期待です。

日本の共同研究の再発見

新学術領域研究も前身の特定領域研究も欧米では一般的ではないグループを対象としたグランティング（研究費分配）制度です。一昔前の特定領域研究は、名前の通り特定の分野（領域）を育てるのに有効に機能し

たと思います。私も若かりし頃、ボスにつれられて特定領域研究の班会議に行くのが楽しみでした。そこで個性豊かな先生方と知り合いになり、いろんなお話も聞けて大変勉強になりました。そのときの先生方には今でも時々助けて頂いています。特定領域研究では共同研究というより、専門家集団によるピアレビュー（査読）的な要素が濃かったと思います。そのため激しい議論で切磋琢磨し、個々の研究レベルは著しく向上したと思います。次に、正確には6年前に、登場したのが新学術領域研究です。こちらは規模が小さく、分野の活性化というより融合研究や問題解決試行の研究が多いように感じます。専門分野が違う研究者が共同研究を如何にうまく進めていくかが成功の鍵だと思います。つまりお互いのコミュニケーションと信頼関係が非常に重要です。3年間この制度に関わってきて、新学術領域研究は日本的ないいシステムだと思い始めました。日本人は控えめですがその分相手の意見をよく聞いて長所を引き出すのが得意です。またグループ目標を設定するとそれに向かって努力するチームプレーの能力も高いです。リーダーの気質は、強いリーダーシップというより、私欲の少ない調整能力ある人がうまくグループをまとめているように思います。目標の設定さえ適切になれば一流の成果が期待できる制度です。

専門の審査機関の必要性

ただ問題はまだあると思います。どういうテーマ（目標）を採択するのか、その判断にはかなりの専門性を要すると思います。現在の文科省や学振がやっているような審査のシステムではどうしても過去の業績に頼ってしまい、真の意味での融合研究や新分野創造的なテーマは見逃されてしまう可能性があります。また、新しい業績が出にくい基盤的な研究の評価も難しいかもしれません。ですので、できれば審査する側とされる側の人間をきちんと分けて、審査する側にはそれに特化した専門性の高い人材の育成が必要だと思います。現在は審査する側とされる側が同じ母集団に属しているため、ブレイクスルーと

なるような新奇性の高いテーマの発掘は困難のように思います。グランティングのシステムをピアレビューのできる研究者コミュニティ（研究所や学会）を基盤としたものに改変すべき時が近づいているように感じます。

捨てればゴミ、拾えばインターメア

当領域の後半の課題は、貯まってきた配列情報から如何に効率よくインターメアを拾いだせるかです。「捨てればゴミ、拾えば資源」という標語がありますが、元々ジャンク（ゴミ）といわれた非コードDNAから機能のある配列（インターメア）を1つでも多く拾い集めたいです。その配列資源を元にこれまでの染色体構築の概念を書き換えたいと考えています。そのためにはスコープならぬ情報学を駆使するのはもちろんのこと、「拾い上手」的な研究者の参画にも期待しています。

私たちは、非コードDNA領域は「ゴミの山」ではなく「宝の山」だと思っております。ここから「いいお宝」をどんどん発掘してお見せできれば幸いです。



領域代表
小林 武彦
国立遺伝学研究所

研究成果の紹介

ファンconi貧血コア複合体と
ATR-ATRIP キナーゼとの
機能相関

富田 純也

京都大学放射線生物研究センター
(現所属：米国 MD Anderson
Cancer Center, Rick Wood 研究室)

A novel interplay between the Fanconi anemia core complex and ATR-ATRIP kinase during DNA cross-link repair
J Tomida, A Itaya, T Shigechi, J Unno, E Uchida, M Ikura, Y Masuda, S Matsuda, J Adachi, M Kobayashi, AR Meetei, Y Maehara, K Yamamoto, K Kamiya, A Matsuura, T Matsuda, T Ikura, M Ishiai, and M Takata
Nucleic Acids Res, 41: 6930–6941 (2013)



文章の書き始めというのは、いつも悩みます。今回の研究報告についても悩み抜いたあげく、論文に行き着く過程をふまえて書く事にしました。また、ファンconi貧血 (Fanoconi anemia: FA) 研究の現状については、数あるレビューを読んで頂いた方が分かりやすいと思います。

研究成果のポイントは、ATR(Ataxia teleangiectasia and Rad3 -related) キナーゼ活性化機構に Rad17-Rad9-TopBP1 依存的な経路（よく知られている Chk1 のリン酸化など）以外に、FA コア複合体依存的な経路があったことを示したことです。(図2 モデル図)

当初この研究を始めるにあたって、ちょうど僕が研究室に入っすぐ高田研から FANCD2 のモノユビキチン化には FANCI のリン酸化が重要である⁽¹⁾という事が報告されました。また、当時論文になっていないデータとして *ATM* や *rad17* のノックアウト細胞 (DT40 細胞) で FANCD2 のモノユビキチン化は正常に起こるという現象は突き止めていました。そこで、まず *rad17* のノックアウト細胞で FANCI のリン酸化が起こっている事を示しました。また FANCD2 のフォーカスも MMC 処理下で WT と変わらず出来るという事が分かりました。この事から、FANCI のリン酸化は RAD17-Rad9-TopBP1 依存的な経路では起こっていない事が示唆されました。

そこで、FANCD2 のモノユビキチン化にはコア複合体が重要であることから、コア複合体のノックアウト細胞を用いて

FANCI のリン酸化を調べた所、FANCI のリン酸化は検出できませんでしたが、CHK1 のリン酸化は、WT と比較して大差なく起こっている事が確認出来ました。この結果から、コア複合体のノックアウト細胞では、RAD17-Rad9-TopBP1 の経路は動いてはいるが、FANCI のリン酸化に至る経路は動いていないという事が分かりました。

RAD17 は ATR の活性化に必要な因子ですが、FANCI をリン酸化するキナーゼとして ATR はやはり捨てがたいという結論に達し、ATRIP(ATR-interacting protein) のコンディショナルノックアウト細胞を作成し、詳細な解析は当時学生だった茂地さんが担当し、やはり FANCI のリン酸化には ATR が関与している⁽²⁾という事が分かりました。ATRIP と FANCD2 はきれいに共局在します (図1：ATRIP-GFP を発現する A549 細胞は千葉大松彰教授にご恵いただきました)。しかしながら、FA コア複合体が、FANCI のリン酸化にどのように影響しているのか？が謎のままでした。

ももんとした日々を過ごす中、ちょうどその頃、放射線生物研究センターに井倉毅先生が赴任され、井倉先生に蛋白質複合体の取り方を直接ご教授して頂ける機会に恵まれました。この機会は、僕にとってまさに救いの手でした。そこで、FA コア複合体の因子である FANCL の複合体を単離し、解析して行くと、FANCL の複合体の中に ATR が存在し、しかも HU 処理下でわずかながら増加している事が分かりました (未発表)。この時までには Yeast two-hybrid 法で FANCL

と ATRIP が結合している事や免疫沈降法で FANCL と ATRIP が共沈してくる事が示唆されていたのですが、DNA 損傷下で ATR/ATRIP と FA コア複合体の結合が増えるとは、思っても見ませんでした。また、この頃、FA 経路のレビューでは FA 複合体は ATR/ATRIP の下流に位置しているモデル図が書かれていたのですが、何処にもその証拠となる実験はされていませんでした。

そこで、真夜中の実験室で、一緒に実験していた板谷さんと長々と議論し、DNA 損傷下で FA コア複合体が ATR/ATRIP をコントロールしている（フォーカス形成やクロマチン移行など）のではないかと仮説をたてました。そこでまず、FA コア複合体の因子である FANCA の患者細胞と FANCA を相補した細胞に ATRIP-GFP をトランスフェクションし MMC 処理後、ATRIP-GFP のフォーカスを見える事にしました。板谷さんに、顕微鏡で見てもらい、僕は映し出されるコンピューター画面を手汗握る思いで見っていました。すると、FANCA を相補した細胞では ATRIP-GFP のフォーカスが出来るのに対し、患者細胞では ATRIP-GFP のフォーカスがほとんど検出できませんでした。これはまさに仮説通りの結果がやっとでた瞬間でした。

ここからは、もう何をしたらいいかが分かったので、内在性の ATRIP のクロマチン移行を、患者細胞や siRNA 処理した細胞で観察したりと、がむしゃらに実験をする日々でした。ただ、僕自身、現在所属している MD Anderson Cancer

Center の Rick Wood 研に留学が決まっていました。また、板谷さんのお腹には、お子さんがおられ、以前の様な超ハードワークは出来ない状態でしたが、それでも、無理をしてでも実験を助けてくれました。また技官の内田さんも高田教授（先生に手伝って頂いて本当に恐縮です）と一緒に DT40 の *fancd2/rad17* のダブルノックアウト細胞を作ってくれて、シスプラチン感受性に相乗関係がある事や、その関係を in vitro で証明してくれたりと、感謝もしきれないくらいです。

僕自身、留学を決めてしまっていた以上は仕方なく、後ろ髪を引かれる思いでしたが、論文にめどが立った所で（正直、留学を決める時には、こんな仮説が立てられ、面白いなと思いながら実験できるとは思っていなかったんですが）、日本を去る事になりました。

ちょうど僕と入れ替わりで、海野君が高田研にくる事になり、申し訳ない気持ちで一杯でしたが、論文のリバイス等を茂地さんと一緒にやらしてもらえる事になり、留学して論文を投稿するにあたって、英語の添削等を今のボスである Wood 先生に見てもらう事ができ、非常に助かりました。実際、アクセプトを貰う迄、非常に苦労しましたが、これも根気よく助けて頂いた高田教授のおかげだと思っています。この場を御借りして、感謝申し上げます。

1) Ishiai, M., et al. *Nat Strut Mol Biol.* 15 (11), 1138-46 (2008)

2) Shigechi, T., et al. *Cancer Res.* 72 (5), 1149-56 (2012)

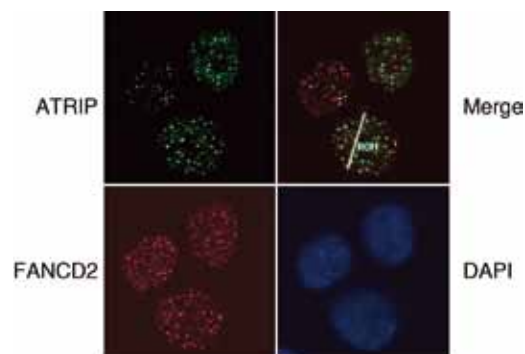


図1：A549-ATRIP-GFP cells MMC 100ng/ml, 24h

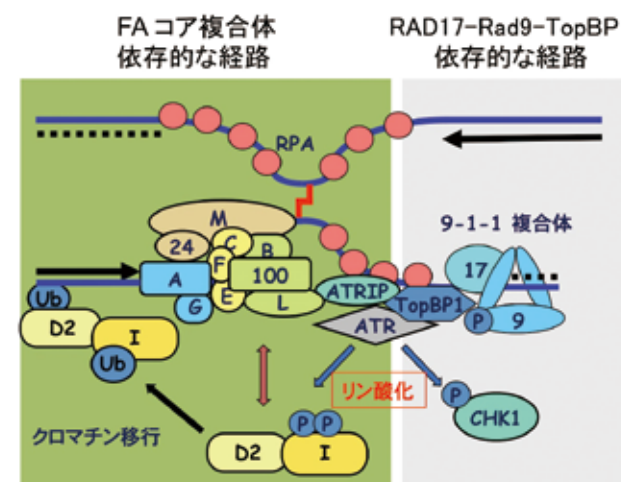
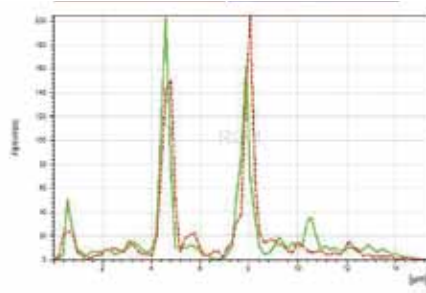


図2：モデル図

研究成果の紹介

DNA 二重鎖切断の修復と
染色体動態制御の連携に関わる
キープレイヤー

毛谷村 賢司

学習院大学大学院自然科学研究科



菱田 卓

学習院大学大学院自然科学研究科

RecA protein recruits structural maintenance of chromosomes (SMC)-like RecN protein to DNA double-strand breaks
K Keyamura, C Sakaguchi, Y Kubota, H Niki, and T Hishida
J Biol Chem, 41: 29229–29237 (2013)



はじめに

電離放射線や DNA 複製阻害などの外的、内的要因によって引き起こされるゲノム DNA の二重鎖切断（DSB; DNA double strand break）は、細胞に致死的な影響を及ぼします。そのため、生物はこれを修復する機構を備えています。DSB を修復する機構には、DNA 相同組換えや非同末端結合などの経路が働くことが知られており、それらの反応メカニズムはよく解析されています。一方、DNA 二重鎖切断部位周辺の染色体構造は極めて不安定であるため、DSB 修復機構と連携した染色体動態制御機構が重要な役割を果たしていることが考えられますが、そのようなメカニズムはよくわかっていません。本稿では、大腸菌の DSB 修復における染色体構造維持の分子メカニズムについて明らかにしたことを解説します。

DNA 相同組換えタンパク質 RecA と
SMC タンパク質 RecN について

大腸菌では DNA の二重鎖切断が起こると、まず RecBCD ヌクレアーゼ複合体による DNA 二本鎖末端の削り込みにより一本鎖 DNA が形成されます。DNA 相同組換え反応において中心的な役割を果たす RecA は、この一本鎖 DNA に結合してヌクレオプロテインフィラメントを形成した後、相同鎖検索及び DNA 鎖交換反応を促進します。また、一本鎖 DNA への結合で活性化した RecA は、LexA リプレッサーの自己プロテアーゼ活性を促進するため、SOS 誘導と呼ばれる DNA 修復や細胞分裂阻害に関わる遺伝子群の発現誘導にも関与しています。今回紹介する *recN* 遺伝子も SOS 誘導により発現する遺伝子群の一つで、SMC（structural maintenance of chromosomes）ファミリーに属するタンパク質をコードしています。SMC ファミリー群は、原核・真核生物を問わず存在し、染色体構造の制御に重要な役割を果たしています。これまでの解析から、*recN* 遺伝子欠損株はガンマ線や DNA クロスリンク剤であるマイトマイシン C（MMC）に高感受性を示す一方で、紫外線に対しては耐性を示すことから、DSB 修復に特異的に関与すると考えられています。さらに、DNA 損傷時において、RecN は核様体と細胞質（特に細胞の極側）

に集積し、細胞質に集積した RecN の凝集体は ClpXP プロテアーゼにより分解されます（Nagashima et al., 2006）。また、このプロテアーゼによる分解が DNA 損傷からの速やかな回復に重要であることがわかっています。しかしながら、核様体への局在に関しては、その制御機構や働きについてほとんど明らかになっていませんでした。

RecN のリクルーターは RecA である

先述のとおり RecN は DNA 損傷に依存して核様体上に局在します。そこで、核様体上での RecN の動態を可視化するため、アラビノース誘導により GFP-RecN を細胞内で発現させて解析を行いました。その結果、MMC 処理した細胞において、核様体上に GFP-RecN のフォーカスが形成されました。一方で、*recA* 遺伝子を欠損した細胞では、核様体上でのフォーカス形成が著しく低下することがわかりました。この結果は、RecN の核様体上への局在には RecA が必要であることを示しています。しかしながら、*recA* 欠損株では SOS 遺伝子群の発現が起こらないため、RecN の RecA に依存した核様体への局在は、SOS 誘導による間接的な影響の可能性が考えられました。そこで私たちは、RecN との相互作用が欠損した RecA 変異体の単離を試みることにしました。

recA 欠損株は、*recN* 欠損株とは異なり、MMC に加えて紫外線にも高感受性を示します。この表現型の違いを利用して、*recA* の変異体ライブラリーから *recN* 欠損株と同様に MMC に高感受性を示し、紫外線に耐性を示す変異株のスクリーニングを行いました。約 2,000 クローンから目的の表現型を示す *recA* 変異体が複数得られ、いずれも C 末端の 300 番目のグルタミンがアルギニンに置換していました（図 1）。この *recA* Q300R 変異体は野生型と同レベルの SOS 誘導活性を保持していることがわかりました。そこで、*recN* 遺伝子の SOS プロモーターを用いて、MMC 存在下での GFP-RecN の観察を行ったところ、*recA* Q300R 変異体では核様体上での GFP-RecN のフォーカス形成が著しく低下することがわかりました（図 2）。さらに、I-SceI によって部位特異的な DNA 二重鎖切断を起こした場合に観察される GFP-RecN フォーカスの形成も、*recA* Q300R 変異体では観察

されませんでした。これらの結果から、RecA が直接的に RecN の DNA 損傷部位への局在に関与していることが示されました。

RecN は核様体構造の安定化に関与する

DNA 損傷時に RecN が核様体構造をどのように制御しているかを知らるために、MMC 処理した大腸菌の核様体を観察しました。その結果、*recN* 欠損株では一細胞あたりの核様体の数が有意に増加することがわかりました。また、同様の結果が *recA* Q300R 変異体でも得られました。さらに、複製起点 *oriC* の近傍に *lacO* 配列を持つ大腸菌株を用いて、LacI-EGFP の局在を観察した結果、野生型では MMC 処理後もすべての核様体上でフォーカス形成が観察される一方で、*recN* 欠損株ではフォーカス形成が観察されない核様体が相当数存在していました。このことは、細胞内に *oriC* を含まない断片化した核様体の一部が遊離していることを意味しており、RecN は切断された DNA 間を安定に繋ぎ止めることで核様体の断片化を防ぐ働きをしていることが示唆されました。

RecN の損傷部位からの
解離には ATP の加水分解が必要である

RecN は、ATP の加水分解に関与する Walker A/B モチーフを持ちます。Walker A モチーフ変異体である *recN* K35A は、*recN* 欠損株と同様に MMC に対して高感受性を示します。GFP-RecN K35A 変異体は、野生型 RecN と同様に DNA 損傷依存的な核様体上のフォーカス形成が観察されました。しかしながら、MMC を除いた培地でさらに培養すると、野生型では約 2 時間で GFP フォーカスが消失する一方で、変異体ではほとんど消失せず、核様体上に留まったままであることがわかりました。さらに、変異体では分裂阻害に起因したフィラメント状の細胞および断片化した核様体が高頻度に観察され、組換え修復反応の中期以降に阻害が生じていることわかりました。これらの結果から、RecN の ATP 加水分解は、RecA による DNA 相同組換え反応の促進と

RecN 自身の損傷部位からの解離に重要な役割を果たしていると考えられます。

まとめ

DNA 二重鎖切断は、染色体構造の不安定性を引き起す原因となりうるため、細胞内という三次元空間において、染色体構造の動態がどのように組換え反応と連携しているかは極めて興味深い問題です。今回、私たちは、染色体の構造維持に関与する SMC タンパク質である RecN の解析を通じて、DSB 修復と染色体動態制御との連携の一端を明らかにすることができました。これまでの結果に基づいて、私たちは以下のような反応モデルを提唱しています；①まず DNA 二重鎖切断に由来する一本鎖 DNA 上に RecA が結合することで、RecN の発現誘導と損傷部位へのリクルートが促される、②次に、RecN が切断された DNA を安定化することで RecA によるホモロジー検索や鎖交換反応が進行する、③さらに、RecN は ATP 加水分解により損傷部位より解離し、その後 ClpXP プロテアーゼにより分解される。今後、このモデルを検証し、さらに詳細な分子メカニズムを明らかにするためには、精製タンパク質を用いた生化学的な解析が欠かせません。これまで、RecN タンパク質は非常に精製が困難であったため、大腸菌の Rec と名前のついたタンパク質の中で唯一生化学的な解析が行なわれていませんでした。しかしながら、最近、私たちは、活性を保持した RecN タンパク質の精製に成功しています。今後、精製した RecN を解析することで更なる問題を解決できるのではないかと期待しています。

最後に、様々な大腸菌株の提供とバクテリアの蛍光顕微鏡観察のノウハウをご教授頂いた国立遺伝学研究所の仁木先生、研究内容のディスカッションやテクニカル面でご協力頂いた菱田研究室の皆様にお礼申し上げます。

1) Nagashima, K. et al. *J. Biol. Chem.*, 281, 30941–46 (2006)

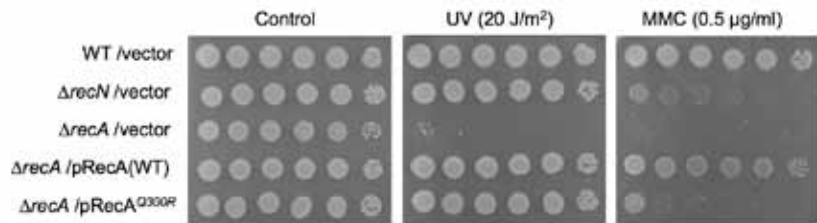


図 1 : *recA* Q300R 変異体は、*recN* 欠損株と同様に MMC に対して高感受性だが UV には耐性を示す。

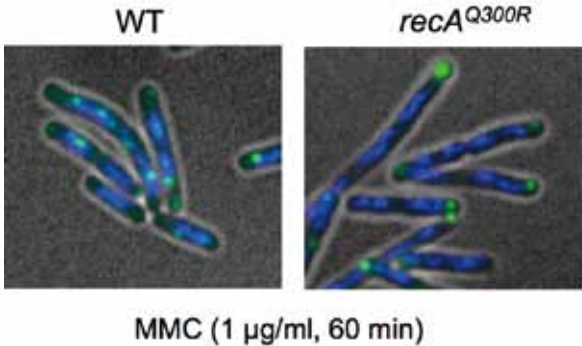


図 2 : GFP-RecN は MMC 処理後に核様体及び細胞質の両方でフォーカスを形成する。一方、*recA* Q300R 変異株においては、核様体上にはフォーカス形成がほとんど観察されず、細胞質のフォーカス形成のみが観察される。

研究成果の紹介

ACAT1 遺伝子の MLPA 法確立と
Alu 配列による遺伝子内欠失例の解析

深尾 敏幸

岐阜大学大学院
医学系研究科小児病態学

Development of MLPA for human ACAT1 gene and identification of a heterozygous Alu-mediated deletion of exons 3 and 4 in a patient with mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase (T2) deficiency
T Fukao, Y Aoyama, K Murase, T Hori, RK Harijan, RK Wierenga, A Boneh, N Kondo
Mol Genet Metab, 110: 184–187 (2013)



霊長類になってゲノムに組み込まれてきた非コード DNA の代表的反復配列である Alu 配列は、ヒトゲノムの 10% を占め、100 万コピーも存在する。この Alu 配列は 300 塩基ほどの長さの SINEs(short interspersed nuclear elements) に属する配列である。最初は "junk DNA" として扱われていたが、進化において重要な役割を果たし、今も果たしつつあることが明らかにされつつある。一方で Alu 配列がヒトにおいて遺伝性疾患を引き起こす事も明らかにされてきている。筆者らはその両面から非コード DNA の代表である Alu 配列についてこの新学術領域において研究をさせていただいている。

Alu 配列の挿入が重要な役割を果たしてきた事として、ヒトにおける遺伝子発現の多様性への貢献が考えられる。まず Alu 配列が変異の蓄積によりエクソン化する事が知られている。また 1 遺伝子が複数の mRNA を作る Alternative splicing に Alu 配列も関与しているといういくつかの報告がある。筆者らは Alu 配列がイントロンに存在する事で、suboptimal なプライス部位をもつ近傍エクソンの認識に影響し、alternative spliced exon になるという仮説をたて、mini-gene splicing 実験を行っている。また北海道大学の遠藤俊徳教授と共同研究で alternative splicing をきたすエクソン近傍には Alu 配列が多く存在するのではないかと解析を行っている。こちらについては今後ぜひまた報告できる機会がえられたらと思っている。

遺伝性疾患の病因としての Alu 配列の 1 つの例としては、

Alu 配列がその相同性から、相同組み換えにおいて非同部位において組み換えを引き起こし、遺伝子の一部の欠失、挿入が起こる事である。この数年間で多くの疾患においてこのような異常が報告されてきており、筆者らもいくつかの例を報告している。

筆者らの臨床における研究テーマはケトン体代謝異常症という疾患群である。ケトンは脳においては唯一のグルコースの代替エネルギーとして肝臓において産生される。このケトン体が産生できないと血糖を維持できず非ケトン性の低血糖を引き起こし、脳にダメージを与えてしまう。その代表的疾患が HMG-CoA 合成酵素欠損症と HMG-CoA リアーゼ欠損症であり、逆に肝外組織がケトンを利用できないと著しくケトンが血中に蓄積しケトアシドーシスをきたす。その代表的疾患は β -ケトチオラーゼ欠損症とサクシニル-CoA:3-ケト酸 CoA トランスフェラーゼ欠損症である。これらの遺伝子内にも多くの Alu 配列が存在している。今回は β -ケトチオラーゼ欠損症という疾患において Alu 配列によって引き起こされる遺伝子異常について解析した。

患者はオーストラリア在住の白人女児で、血縁関係のない両親から出生し、9 ヶ月まで全く正常に育っていたが、9 ヶ月時に著しいケトアシドーシスを来し、その時の検査から β -ケトチオラーゼ欠損症が疑われ、酵素診断により本症と診断された。その遺伝子解析を行うと A201V 変異が一方

のアレルで同定されたが、もう一方のアレルの変異は同定できなかった。このことから一方のアレルにおける遺伝子内の欠失の可能性が考えられた。これまでの解析から原因遺伝子 ACAT1 は 33 個の Alu 配列をわずか 27 kb 中に持ち、Alu 配列が多く存在する遺伝子である。イントロン 1 とイントロン 4 に存在する Alu 配列間での非同一致相同組み換えによるエクソン 2-4 を含む欠失のホモ接合体の例、イントロン 7 とイントロン 9 に存在する Alu 配列間での非同一致相同組み換えによるエクソン 8-9 の重複のホモ接合体例をこれまで同定している。

ホモ接合体で遺伝子内の欠失や重複を同定するのは cDNA 解析をする事で比較的容易であるが、ヘテロ接合で欠失等があると通常の方法では同定が難しい場合が多い。そのため Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) という手法を用いて、各エクソンのコピー数を調べる事がこの症例のもう一方の変異を同定するためには必要であった。

そのためまず ACAT1 遺伝子に MLPA 法を確立する事にした。方法は Human MLPA probe design program を用いてエクソン 1-12 に対して 4 塩基ずつ異なる長さになるように左右のプローブを作成した。それらを各エクソンにハイブリダイズして左右のプローブをライゲーションし、すべてのプローブを同一ペアの蛍光プライマーで PCR 増幅した。キャピラリー電気泳動システム (ABI 3130XL) で蛍光ラベルした各エクソンの相当する DNA 断片を分離し、Gene Mapper V.4.0 にてフラグメント解析を行った。各エクソンの増幅断片が示すピーク面積値は、目的とするエクソンのコピー数を反映する。この方法で、まず正常コントロール、エクソン 2-4

欠失ホモ接合体症例、エクソン 8-9 の重複ホモ接合体症例の DNA、そしてこの 2 症例の DNA を 1:1 で混合したエクソン 2-4 欠失とエクソン 8-9 の仮想重複ヘテロ接合 DNA を解析したところ、十分に欠失、挿入のヘテロ接合体が同定可能であることが明らかになった (図 1A)。

このように確立できた MLPA 法を患者に適用すると、患者ではエクソン 3、4 が 1 コピーしかなく、エクソン 3-4 を含む欠失を疑う事が出来た (図 1A)。そこでイントロン 2 とイントロン 5 にプライマーを置き (図 1B)、long range PCR を行う事でコントロールでは 3.1kb の断片が増幅するのに対して患者においては 1.2kb の断片を増幅する事ができ (図 1C)、そのシーケンスを決定した。その結果イントロン 2 の Alu Y とイントロン 4 の Alu Sc 間での非同一致相同組み換えが生じている事を明らかにした。このイントロン 2 の Alu Y とイントロン 4 の Alu Sc と患者における結合部配列を比較すると 35 塩基対の完全一致部位が存在し (図 2)、この配列内で組み換えが生じたと結論した。

このように ACAT1 遺伝子について MLPA 法を確立し、その応用によって通常の解析ではきわめて同定が困難であるヘテロ接合での遺伝子再構成を明らかにする事が出来た。

現在このような MLPA 法をサクシニル-CoA:3-ケト酸 CoA トランスフェラーゼ欠損症、HMG-CoA リアーゼ欠損症、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ 2 欠損症、カルニチンアシルカルニチントランスロカーゼについても確立し、遺伝子診断に適用可能にしている。

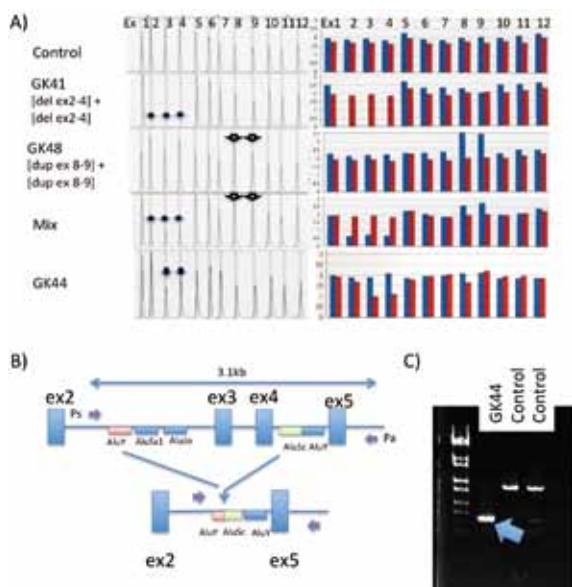


図 1
A) MLPA 解析結果：矢印のシグナルがコントロールより低下もしくは増強している。右のパネルはコピー数表示で赤が同時泳動コントロール、青が解析検体である。GK44 でエクソン 3、4 の赤いバーが 1 コピーを示している。
B) エクソン 2-エクソン 5 における Alu 配列の位置と患者における組換え部位。
紫の矢印が増幅に用いたプライマーを示す。
C) PCR 結果：患者においては正常の 3.1Kb の断片は見えず代わりに 1.1 kb の断片が増幅された。

```
Intron 2 AluY  GGCCGGGTGCGGTGGCTCACACTGTAATCCAGCACTTTGGGAGGCCGA
Junction      GGCCGGGTGCGGTGGCTCACACTGTAATCCAGCACTTTGGGAGGCCGA
Intron 4 AluSc GGCCGGGTGCGGTGGCTCATGCTGTAATCCAGCACTTTGGGAGGCCGA

Intron 2 AluY  GGCAGGTGGATCACGAGGTCAAGAGATCGAGACCATCTGGCTAACACGG
Junction      GGCAGGTGGATCACGAGGTCAAGAGATCGAGACCATCTGGCTAACACATGG
Intron 4 AluSc GGCAGGTGGATCACGAGGTCAAGAGATCGAGACCATCTGGCTAACACATGG

Intron 2 AluY  TGAAACCCCATCTCCACTAAAAATACAAAAATTAGGTGGCATGGTG
Junction      TGAAACCCCGTCTCTACTAAAAATACAAAAATTAGCCAGGTGTGGTG
Intron 4 AluSc TGAAACCCCGTCTCTACTAAAAATACAAAAATTAGCCAGGTGTGGTG

Intron 2 AluY  GCAGGCACCTGTAGTCCAGCTACTCGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATGCG
Junction      -----GTGCACTAATCCAGCTACTTGGGAGGCTGAGGCAGGAGCATCGC
Intron 4 AluSc -----GTGCACTAATCCAGCTACTTGGGAGGCTGAGGCAGGAGCATCGC

Intron 2 AluY  GTGAATCCGGGAGGCGGAGTTGTCAGTGAGTTGAGATCACGTGCGCTG
Junction      TTGAACCCAGGAGGCGGAGTTGTCAGTGAGCCAGATTGCACCATTTG
Intron 4 AluSc TTGAACCCAGGAGGCGGAGTTGTCAGTGAGCCAGATTGCACCATTTG

Intron 2 AluY  CACTCTAGCCTGGGCAACAGAGCAAACTCCATCTCAAAAGAAAAA
Junction      CACTCCAACTGGGCGACAGAGTGAGATTCTGTCTGAAAGAAAAA
Intron 4 AluSc CACTCCAACTGGGCGACAGAGTGAGATTCTGTCTGAAAGAAAAA
```

図 2
イントロン 2 の Alu Y、患者のジャンクション配列、イントロン 4 の Alu Sc 配列のアライメント：紫の配列が 3 配列で一致する領域を示す。赤の塩基は他の 2 つの配列と異なる塩基を示す。

研究成果の紹介

染色体断裂は、いつも
DNA 2重鎖切断が原因とは限らない

廣田 耕志
首都大学東京理工学研究科



論文筆頭著者の
藤田 真梨さん
京都大学医学研究科



Interference in DNA replication can cause mitotic chromosomal breakage unassociated with double-strand breaks
M Fujita, H Sasanuma, KN Yamamoto, H Harada, A Kurosawa, N Adachi, M Omura, M Hiraoka, S Takeda, K Hirota
PLoS ONE, 8: e60043 (2013)



私たちは新学術領域研究プロジェクトの一環として、複製ポリメラーゼ停止のトランス機構やその破綻による染色体異常の研究を行っており、最近その成果の一部を論文発表しましたので、ご報告致します (Fujita et al. *PLoS ONE* 8(4):e60043 2013)。

染色体を光学顕微鏡観察する分析法（染色体検査）は、先天性の疾患（例、ダウン症）、白血病の診断や過去の被曝線量の推定に広く使われています。被曝線量の推定では、染色体断裂（図1）の数を測定します。放射線はDNAを切断し、ちぎれたDNAの箇所が染色体断裂として目に見えていると考えられており、その染色体断裂の数が被曝放射線量に比例する、というのがこの検査の背後にある原理となっています。すなわち、染色体断裂はいつもDNA 2重鎖切断 (DSB) を伴っているという考えが、これまでの放射線生物学の常識でした。

ヒドロキシ尿素 (HU) や5-フルオロウラシル (5-FU) は、DNA合成代謝経路に影響し、その結果、複製ポリメラーゼの進行を停止させることが知られています。これらの薬品は、抗がん治療薬品として、細胞増殖を阻害しない程度の低濃度で使用されています。HUや5-FUで細胞を処理すると、たくさんの染色体断裂が見えることから、放射線治療と同じように染色体DNAを損傷することで、ガン細胞を殺傷すると考えられています。

私たちは、ニワトリ DT40 細胞における遺伝学を毒物評価に応用した「遺伝毒物学」の手法を使って、米国 NIH の Chemical Genomic Center において、ハイスループットに化合物ライブラリーの毒性検査を行っていました。遺伝毒物学手法について簡単に説明します（図2）。遺伝毒物学手法

では、野生型細胞を陰性対照におき、様々な変異体を解析します。例えば、化学物質の中に、(i)DNAを損傷してガンや細胞死を誘導するもの、(ii)小胞体を損傷して細胞死を誘導するもの、(iii)ミトコンドリアを損傷して細胞死を誘導するものがあるとしています。DNA修復欠損細胞で野生型細胞よりも顕著に細胞死が誘導された場合、その原因はDNAが損傷された事によると結論できます。この手法では、陰性対照が存在する故に高い特異性を確保でき、様々な変異体を用いることで、様々な毒性を包括的に評価できます (Evans et al, *DNA repair* 2010)。NIHでは1000種を超える化合物ライブラリーの中から、DNAを損傷する可能性のあるものを探索しました。その結果、DNAを損傷する化合物を多数同定でき、さらに遺伝毒物学手法のメリットの1つである、「化合物の性質を遺伝子名で記述する」ことが出来ました。例えば、ある化合物がDSB修復の遺伝子破壊体（例えば *Rad54-/Ku70-* など）を殺せば、化合物Aと遺伝子名aのリンクが出来ます。このように、DNA損傷を誘導するということが評価できるだけでなく、どの変異体が反応するのかを知ることで、どのような損傷が出来たのか類推することが出来るのです。このスクリーニングの成果は2011年に発表することが出来ました (Yamamoto et al. *EMM* 2011)。

このスクリーニングで私たちは、興味深い現象に出会いました。いくつかの複製を阻害するといわれる化合物が、野生型細胞とDSB修復の変異体 (*Rad54-/Ku70-*) を「同程度」に殺すことが判ったのです。遺伝毒物学手法では、このような場合は2重鎖切断を入れない化合物と判断するのですが、あまりに効果的に両細胞を殺すので、細胞が死んだ理由が本当に2重鎖切断でないのか、染色体試験で再評価することになりました。我々の予想に反して、染色体を調べてみると、複

製を阻害する薬品 (HU や 5-FU) で細胞増殖を阻害しない濃度で処理すると、大量の染色体断裂が誘導されることが判りました。しかしながら、野生型細胞とDSB修復の変異体 (*Rad54-/Ku70-*) とで、「同程度」に断裂が増加することが明らかとなったのです（図3）。ここから、結論できるのは染色体断裂にはDNA 2重鎖切断を伴わないものもある、というこれまでの常識では考えられないものでした。実際に様々なDSBを検出するアッセイで、DSBを検出することは出来ませんでした。

ニワトリだけでなくヒト細胞でも同じように低濃度の複製阻害薬品の暴露によって、DSBを伴わない染色体断裂が現れることが確認でき、この現象が種を超えて存在することが示唆できました。そこで次に私たちは、このような新しいタイプのDSBを伴わない染色体断裂を防ぐ機構について、調べることにしました。ニワトリ DT40 細胞で作製した複製ストールトランスに関わる因子の遺伝子破壊体の中から、低濃度のHU暴露により今度は野生型よりも死にやすい細胞を探しました。するとPIF1という複製脆弱部位（高次構造を作るなどしてストールが頻発する部位）での複製を促進するヘリカーゼ酵素に行き着きました。低濃度のHU暴露により *PIF1-* の細胞では、野生型よりも顕著に多くの染色体断裂が誘導されました。これらの結果から私たちは、複製全体を停止しなくても局所的に複製に影響するような低濃度のHU暴露では、これまで考えられていなかった「2重鎖切断を伴わない染色体断裂」が作られることと、PIF1ヘリカーゼ蛋白質がその発生を防いでいると結論し、2013年にPLOS ONE誌より論文発表致しました (Fujita et al *PLoS ONE* 2013)。

この研究の筆頭著者の藤田真梨さん（京大医学部生）は、MD研究者育成コースに所属しています。MD研究者育成コースとは、近年医学部出身の基礎医学研究者数が著しく減少してきた現状を解決することを目的として2012年に開始されたプログラムで、長期的視点で基礎医学研究者の育成をしています。本論文はMD研究者養成コースによる初めての論文発表となりました。私たちの教室では武田俊一教授が中心となって、このプログラムが開始される10年以上前から医学生に基礎医学研究のおもしろさを実感してもらう為に医学部生の短期海外派遣をおこなってきました。藤田さんも入学直後から私たちの教室に通って、研究を基礎から学び、スイスやイタリアへの短期留学をしました。藤田さんは、本研究を通して大きく成長したように思います。研究を自分でデザインし、何をするべきかを自分から提案できるようになりました。論文や反論のレターの執筆も自分で出来るようになりました。一教官としては、指導してきた学生が自分で考えながら実験を楽しんでくれて、その成果を論文という形にまで仕上げられたことをたいへん喜んでいますが、感心もしています。

本研究では、低濃度の複製阻害薬品（複製全体を止めない濃度）がDSBを伴わない染色体断裂につながるという、興味深い現象を報告しました。私たちは、複製ストールの部位で複製再開のためにクロマチンが脱凝縮し、その結果ギムザ染色により染色体を観察したときに、脱凝縮クロマチン部位が染色から抜けてみえて、染色体断裂として見えていたのではないかと考えています。今後、複製停止による染色体異常の形成メカニズムやその制御機構の実体を明らかにして行きたいと思っています。

- 1)T. J. Evans et al. *DNA repair* 9, 1292-1298 (2010).
- 2)K. N. Yamamoto et al. *Environmental and molecular mutagenesis* (2011).
- 3)Fujita M et al. *PLoS ONE* 8(4):e60043 (2013)

図1

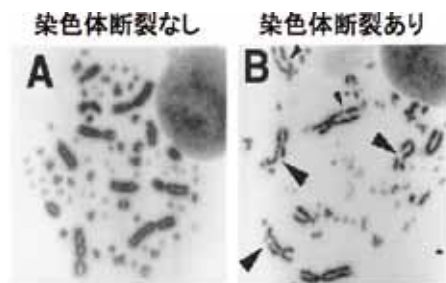


図2

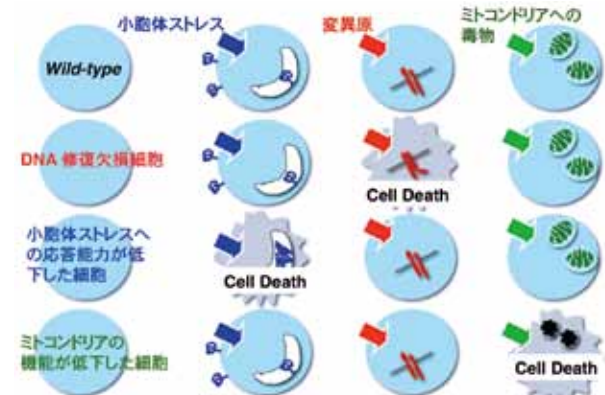
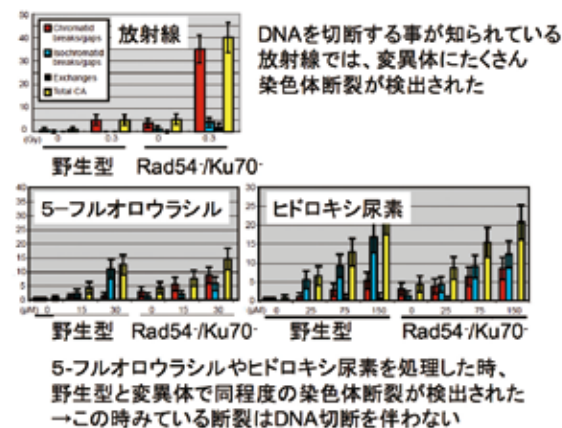


図3



研究成果の紹介

ヒトの構造変異
ホットスポットの進化

Jeffrey A. Fawcett
総合研究大学院大学 先端科学研究科



The role of gene conversion in preserving
rearrangement hotspots in the human genome
JA Fawcett and H Innan
Trends in Genet., 29: 561-568 (2013)



ゲノムが持つ遺伝情報を読み解いていくには進化的なアプローチが非常に有効である。例えば、哺乳類全体で保存されている領域は哺乳類に共通する重要な役割を担っている可能性が高いといえるだろう。また、ヒトでのみ変異が集中して起こっている領域は、ヒトの適応進化の過程で獲得したヒト特異的な機能に関与していると予想できる。このように、近年爆発的に増加している種間・種内のゲノムデータから「普通ではない、ランダムでは説明できない」進化のパターンを示す領域を見つけ出し、その進化の過程を明らかにすることによって非コード領域をはじめとするゲノムの未知の機能の解明に迫ろうというのが我々の研究のアプローチである。本稿ではその中から、ヒトの構造変異ホットスポットの進化に関する研究の成果を紹介する。

あるゲノム領域が表現型とどう結びついているかを知るには、その領域の変異を集団内で検出することが、とくにヒトのように「壊して調べる」ことのできない種では重要となる。例えば、ある遺伝病の原因を特定するにはその遺伝病患者に共通して変異が見られる領域の検出が必要である。ところが近年シーケンシング等のコストが下がったとはいえ、ヒトでゲノムが解読されているのは1000個体といった単位である。多くの遺伝病の原因となる変異は1万人に1人といった頻度で起きている。また有害であるため集団内に広まりにくい。さらに変異を検出するうえでの技術的な問題もある。つまり、現在の集団調査ではこういった変異を全て網羅するのは困難だといえる。このため、変異の起きやすい領域に見られる特徴をもとに多型のある領域を予測するアプローチが有効だと考えられる。実際、ヒトでは重複配列間での相同組換えによってその間のゲノム領域の重複、欠失、逆位等の構造変異が頻繁に生じるホットスポットが多数存在する（図1a）。このような構造変異のホットスポットはヒトの表現型の多様性に大

きく寄与しており、多くの遺伝病の原因であると同時に進化の大きな原動力になっている (Marques-Bonet et al. 2009)。よって、ホットスポットの特徴や進化の過程を理解することがヒトの遺伝病や様々な表現型に関与している変異の発見につながると思える。

近年のヒト及び霊長類での集団調査の結果、多くのホットスポットがヒトとチンパンジー、オランウータン、マカクなどの霊長類との間で保存されている（つまりヒトとこれらの霊長類の共通祖先より維持されている）可能性が高いことがわかってきている (Gazave et al. 2011)。ではこれらのホットスポットはどのようにして維持されてきたのだろうか。どんな進化モデルでホットスポットの維持を説明できるだろうか。重複配列のホットスポットとしての「活動期間」は、重複配列が組換えを起こしうだけの相似性をどれだけ長く維持できるかによって決まってくると言える。そこでまず、一般的によく使われる一番シンプルなモデルを考える（図1b）。このモデルでは、重複配列の双方のコピーが塩基置換を独立に蓄積していくことにより相似性が時間に比例して減少する。そこで、任意の新しく生じた重複配列をこのモデルに従って進化させるというシミュレーションを行ったところ、重複配列が組換えを起こしうだけの相似性を2500万年（ヒトとマカクの分岐年代にあたるおおよその時間）維持し続ける可能性は極めて低いという結果が得られた。すなわち、報告されているホットスポットの長期間にわたる維持をこのモデルで説明することは非常に困難である。そこで次に、重複配列間での gene conversion（遺伝子変換）と呼ばれる機構を組み込んだモデルを考える（図1c）。Gene conversion とは、相同配列間で起きる組換えに似た機構であるが、組換えのように双方の配列が入れ替わるのではなく、片方の配列がもう片方の配列に置き換わり、このため双方の配列が同じになる (Fawcett and Innan 2011)。つまり重複配列間で

gene conversion が繰り返し起きれば、結果として、相似性が長期間維持されることになる。そこで gene conversion を組み込んだ重複配列の進化のシミュレーションを行ったところ、ホットスポットの活動期間が大きく伸びることが確認できた。すなわち、gene conversion を組み込んだ進化モデルによってホットスポットの長期間にわたる維持を説明することができる。

では、ヒトゲノムの構造変異ホットスポットとなっている重複配列で、gene conversion を組み込んだモデルに合致するような gene conversion の痕跡が見られるだろうか。そこで、ヒトゲノムでホットスポットであると思われる重複配列を調べてみた。Gene conversion がなければ、重複配列上のランダムな位置に変異が蓄積するはずである。ところが実際にはほとんどの重複配列間でランダムより有為に長い同一（100% identical）な領域が見られた（図2）。さらに、他の種と共有している重複配列を調べたところ、同種のパラログ（重複配列）間のほうがオーソログ間より相似性が高い領域が数多く見られた。いずれも gene conversion の非常に強い痕跡である (Mansai and Innan 2010)。すなわち、ゲノムデータからも gene conversion が構造変異ホットスポットの維持に大きく貢献していることが強く示唆された。

これまでの研究で、構造変異が多くの遺伝病の原因となっていることがわかっている (Liu et al. 2012)。こういった遺伝病と関連している構造変異ホットスポットでも gene conversion によって重複配列の相似性が維持されている例が複数報告されており (Hurles et al. 2004, Forbes et al. 2004, Bagnall et al. 2005)、本研究でも新たに数例確認できた。つまり、gene conversion によって、病気につながる構造変異が起きやすい状態が進化の過程上維持されてきたといえる。こういったホットスポットは、遺伝病のリ

スク以上に gene conversion が高頻度で起こることで維持されてきたのではないかと我々は考えている。その一方で、構造変異ホットスポットは進化の原材料となる遺伝的多様性を産み出すのに大きく貢献している。実際、構造変異ホットスポットにはヒトの適応進化に関与してきたと考えられている遺伝子が数多く見られる。つまり、gene conversion によるホットスポットの維持が、ヒトの適応進化における重要な役割を果たしてきたといえる。

遺伝病をはじめとする表現型の差異の原因領域の同定はゲノム生物学における最も重要な課題の一つだといえるだろう。そのカギとなるのがそういった領域の多型の検出である。本研究で我々は、重複配列間の gene conversion が構造変異ホットスポット、つまり遺伝病とリンクしている多型が存在する可能性の高い領域の重要な特徴であることを示した。本研究の成果がそういった多型の検出、さらには未知の遺伝病の同定につながることを期待している。本研究はさらに「ゲノム進化」という分野の大きなポテンシャルを示している。今後も、さらに増加するであろう様々なゲノム関連のデータを有効に活用し、引き続き「進化」という観点から非コード領域をはじめとするゲノムの解明に取り組んでいきたいと考えている。

References
Bagnall et al. (2005) *Genome Res.* 15,214-223
Fawcett and Innan (2011) *Genes* 2,191-209
Forbes et al. (2004) *Genes Chromosomes Cancer* 41,12-25
Gazave et al. (2011) *Genome Res.* 21,1626-1639
Hurles et al. (2004) *Genome Biol.* 5,R55
Liu et al. (2012) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 22,211-220
Mansai and Innan (2010) *Genetics* 184,517-527
Marques-Bonet et al. (2009) *Trends Genet.* 25,443-454

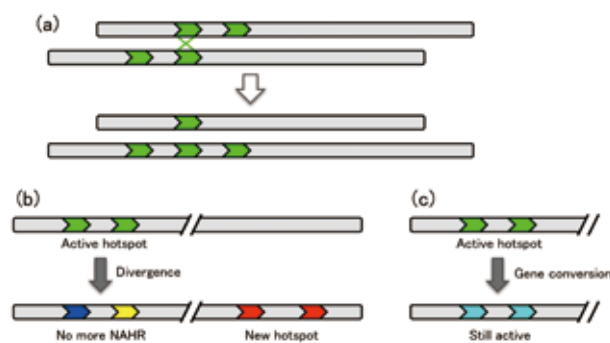


図1 重複配列間の相同組換えによって生じる構造変異ホットスポットの進化モデル。(a) 同方向の重複配列間（緑の矢印）での組換えの結果、間の領域の重複、あるいは欠失が生じる。(b) 重複配列の2つのコピーがそれぞれ時間に比例して独立に変異を蓄積し、それとともに重複配列間の相似性が低くなる。結果として、比較的早い段階で組換えが起こらなくなり、重複配列がホットスポットでなくなる。(c) 重複配列間で gene conversion が起こることによって相似性が保たれる。その結果、重複配列間で組換えが起こりうる状態、つまりホットスポットである状態がより長い期間維持されることになる

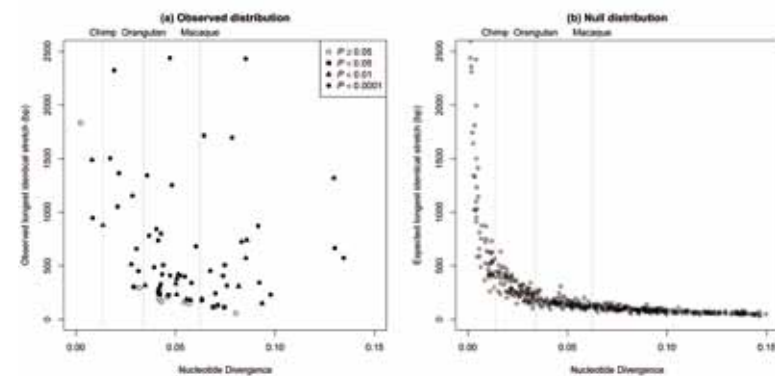


図2 重複配列の2コピー間で最も長い変異のない（2コピーの配列が同一である）領域の長さの分布。(a) ヒトの構造変異ホットスポットとなっている重複配列における長さの分布と、(b) 変異がランダムに重複配列上にランダムに分布していると仮定した場合の長さの分布。ほとんどの重複配列がランダムな場合と比較して非常に長いミスマッチのない領域を持っている。

研究成果の紹介

Sir2 は非コードの転写を抑制して酵母の寿命を維持している

小林 武彦
国立遺伝学研究所



Cellular senescence in yeast is regulated by rDNA noncoding transcription
K Saka, S Ide, ARD Ganley, and T Kobayashi
Curr Biol, 23: 1794–1798 (2013)



我々の体を構成する細胞の多くは分裂を繰り返しやがて老化し死んでいきます。皮膚の細胞の「垢」は死んだ細胞に相当します。この当たり前のように起こっているできごとでも、実はその「老化」メカニズムはほとんどわかっていません。老化研究で一番有名でよく研究されているのはサーチュインと呼ばれる遺伝子のグループです。サーチュインは単細胞の酵母菌からヒトの細胞に至まで広く存在する遺伝子の総称で、いくつかの生物で老化の抑制に関わっていると考えられています。例えばサーチュイン遺伝子の1つ SIRT6 を大量に発現させたマウスはふつうのマウスより長生きになります。またサーチュインの機能を高める化学物質としてポリフェノールの一種、リスベラトロールが発見され、健康補助食品として売られていることはご存知の方も多いことでしょう。しかしサーチュインがどのように老化を抑制しているのかは、よく判っていませんでした。今回我々のグループの研究によりそのメカニズムの一端が解明されました。

サーチュインは元々酵母菌の老化抑制遺伝子 (*SIR2*) として発見されました。この遺伝子は NAD に依存したヒストン脱アセチル化作用をもち、染色体の構造変換や遺伝子の発現抑制に働いています。面白いことに酵母菌で *SIR2* を破壊すると寿命が半分に短縮し、逆に発現量を増やすと寿命が顕著に延長します。また様々な生物で食べる量を減らす食餌制限(カロリー制限)をすると寿命を延長することが知られています。最近の研究では、サルで食餌制限をすると健康寿命が延長することが報告されています。食餌制限が *SIR2* の活性を高めることも知られています。

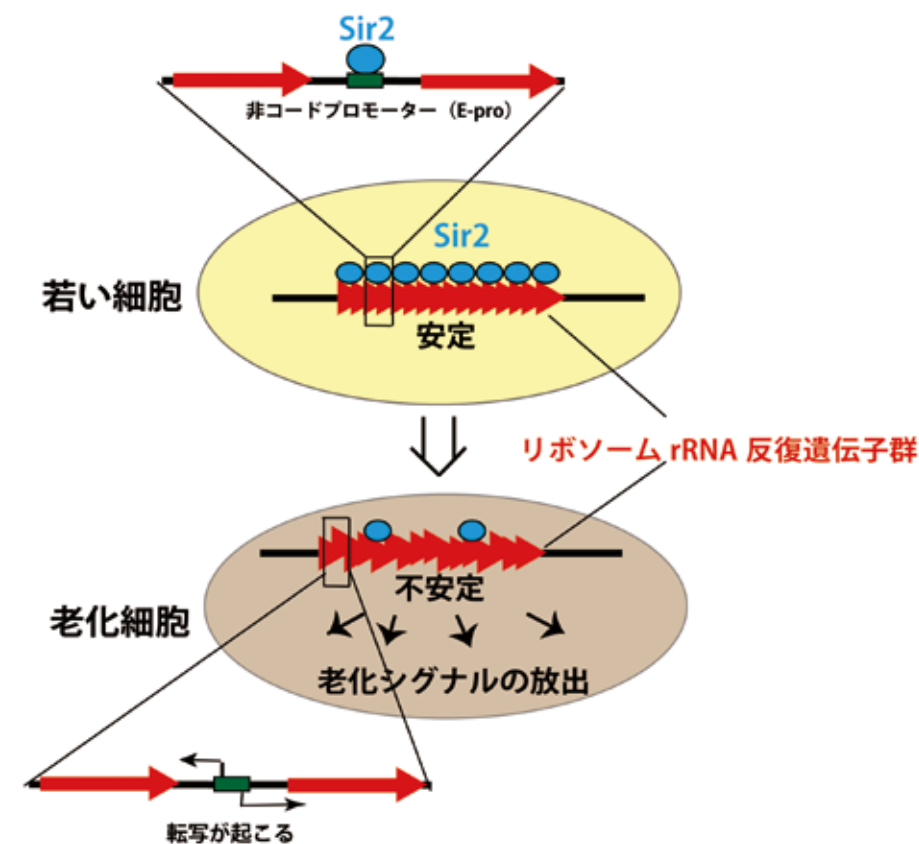
一方老化の促進にはゲノムの不安定化が関わっていることが知られています。ヒトの遺伝病の1つ、ヒト早期老化症(ワナー症候群等)では寿命がおおよそ46才に短縮しますが、その原因となる遺伝子は大腸菌の RecQ 遺伝子のホモログ遺伝子で、ゲノムの安定性維持に関わる作用を持っています。また酵母でもヒト早期老化症の遺伝子に相当する *SGS1* 遺伝子を破壊すると寿命が短縮することが知られています。そのためゲノムの不安定化が引き起こす寿命の短縮は酵母もヒトも基本的に同じメカニズムによるもの考えられていますが、詳細は判っておりませんでした。

今回我々の研究で *SIR2* とゲノムの安定性と細胞老化の三者の関係を解明しました。鍵となるのはリボソーム RNA 反復遺伝子群です。この遺伝子群は非常にユニークな構造をしており、同じ遺伝子が100回以上繰り返して存在します。細胞の老化が進むとその不安定化(リピート数の激しい変動)が観察されることから以前より両者の因果関係が指摘されていました。興味深いことに *SIR2* の機能が低下するとリボソーム RNA 反復遺伝子群で特に顕著な不安定化が観察されます。また私たちのこれまでの研究で *SIR2* はリボソーム RNA 遺伝子間にある非コードの転写プロモーター (E-pro) 転写を抑制しており、その抑制が低下すると不安定化が促進することが判っております。今回、リボソーム RNA 反復遺伝子群の安定性と老化、そして *SIR2* の関係を調べるため、E-pro を人為的に誘導可能な GAL プロモーターに置き換えた変異株を作成し、リボソーム RNA 反復遺伝子の安定性を人為的に変化させました。その結果大変興味

深い結果が2つ得られました。1つ目はリボソーム RNA 反復遺伝子群を不安定化させると寿命が短縮し、逆に安定化させると寿命は最大限まで延長しました。これはリボソーム RNA 反復遺伝子の安定性が老化速度に直接影響を与えていることを示すはじめての結果です。2つ目は、リボソーム RNA 反復遺伝子群を逆に安定化すると、寿命は最大限に延長し、面白いことに *SIR2* をつぶしても寿命は長いまま変化しませんでした。このことは非常に重要な意味を含んでいます。つまりリボソーム RNA 反復遺伝子群が安定であるならば、*SIR2* はあってもなくても寿命に影響を与えないということです。別の言い方をすれば *SIR2* は E-pro の発現抑制によってのみ寿命の維持に関わっており、他の経路(例えばテロメアや他の老化促進に関わる要因)とは

全く関係しないか、あるいは非常に関係が薄いことを意味しています(図)。

私たちの今回の成果により、今まで謎だった *SIR2* とゲノムの安定性と寿命との関係が一気に解明されました。次の課題は、ではなぜリボソーム RNA 反復遺伝子群が不安定化すると老化が促進されるのか、つまりリボソーム RNA 反復遺伝子から発せられる老化シグナルの解明です。これが判ればヒトの老化機構の解明あるいは健康寿命を延ばすような薬剤の開発に繋がる研究になります。乞うご期待下さい。



若い細胞では Sir2 タンパク質が非コードプロモーター (E-pro) の発現を抑えています。細胞分裂を繰り返すとその抑えが徐々に弱くなり、E-pro からの転写が起こり、リボソーム RNA 遺伝子の安定性が低下します。その結果 rDNA から何らかの老化シグナルが発せられ、細胞が老化します。

国際シンポジウム 「インターメアと進化」

新学術領域 「ゲノムを支える非コード DNA 領域の機能」第5回領域会議

平成 25 年 8 月 16 ～ 19 日（於 湘南国際村センター）

本新学術領域の第5回領域会議と国際シンポジウム「インターメアと進化」が8月に湘南国際村センターで開催されました。

最初の2日間は、各班の代表と分担者、合計 27 名がそれぞれの進捗状況を発表し、今後の方針など相談しました。後半の2日間は第1回国際シンポジウム「Evolution of non-coding DNA」を開催しました。今回の国際シンポジウムでは海外から3人の演者、Peter Andolfatto 博士（プリンストン大学）、Hermit Malik 博士（フレッドハッチソンがん研究所）、John Moran 博士（ミシガン大学）を招待し、また国内からは石野史敏先生（東京医科歯科大）を招待して、領域内の4名の演者とともに、非コード DNA の進化とトランスポゾンに関する最新の研究について発表してもらいました。



参加者全員での集合写真



湘南国際村センターの会議・宿泊場



会場から撮影した朝霧の中の富士山

※写真は班員の丁大橋さん（情報通信研究機構）に提供していただきました

モチベーション？

中山 潤一 名古屋市立大学システム自然科学研究科

はじめに

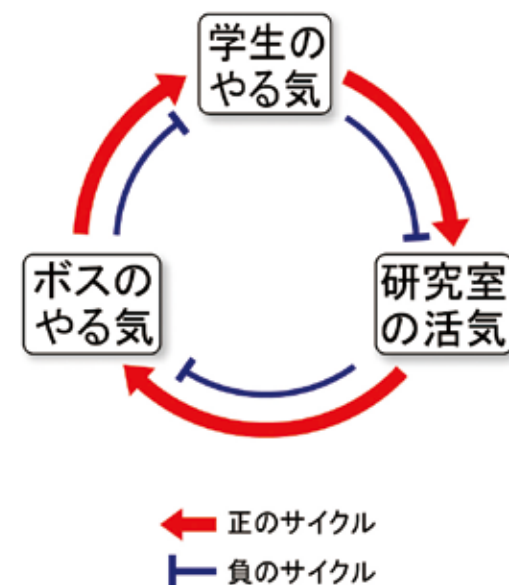
これまで他の班員に、「是非コラムを寄稿して下さい」とお願いして原稿を書いてもらっていましたが、皆さん普段忙しくしているので安易に願うのは躊躇され、かといって、自分で身の回りのことを書くと、つまらないと（一部読者から）批判され、このタイトルではないですが、コラムを続けるのはなかなか大変です。折角紙面を割くのであれば、少しでも皆の役に立つようなものが載せられればと思い、以前 Molecular Cell 誌に、「Forum」という形で掲載された、イスラエルの Uri Alon 教授の「How to Build a Motivated Research Group（やる気に満ちた研究グループを作る方法）」というエッセイを紹介してみようと思います。なかなか良くまとめられたエッセイだと思うので、興味のある方は是非原文を読んでいただければと思います（注：原文の翻訳を載せるのは、著作権上問題があるそうなので、私の言葉で簡単に内容を紹介させていただきます）。

このエッセイでは、モチベーション、いわゆる学生のやる気をいかに高めて、自身の研究グループ全体の士気向上につなげるかについて、心理学者の実験や自身のラボでの出来事などを紹介しながら分かりやすく説明しています。学生が高いモチベーションを持っているか持っていないかは、そもそも学生自身の問題であって、指導教官が何とかできるような問題ではない、という考えがあるのも事実です。しかしこのエッセイでは、学生のやる気は指導方法によって生み出すことができ、しかも学生がやる気を高めることが、指導者やグループ全体のやる気につながる、という考えに基づいて書かれています。やる気（モチベーション）を高める要因として、このエッセイでは、「能力（competence）」、「自主性（autonomy）」、そして「社会的つながり（social connectedness）」という3つのキーワードを使って説明しています。

まず「能力」とは、学生自身の持つ経験や知識のことを意味しています。例を挙げると、研究室に所属したばかりの4年生の学生に、「それでは、細胞から mRNA を精製して cDNA を合成し、ベクターに組み込んで培養細胞に入れてレポーター遺伝子の発現を調べてみましょう」という指示を与えて実験をさせても、このように唐突な指示では逆に学生は自信を失ってしまい、その結果モチベーションを下げると言っています。つまり、その学生が、どの程度分子生物学的な実験に関する経験や知識を持っているか、まずはそれを見極めて、小さな目標を一つずつこなしながら自身を着けさせていく、と言うステップが重要だということです。上の例えで言えば、mRNA の取り方から始まって、cDNA の合成、クローニング、培養細胞への導入方法まで、多くのステップがあり、これの一つずつ教えステップを踏ませることで、学生は自信をつけ、これがモチベーションを引き出すきっかけになると説明しています。

もちろん個々の学生には必ず一つのテーマを与え、それを独りでやらせるという指導スタイルもあると思いますが、最初はシニアな大学院生やポスドクの手伝いをさせつつ、徐々にオリジナルな研究テーマを与えるというような研究室も多いのではないかと思います。「小さなステップで学生にまず自信をつけさせる」というのは、学生のやる気を引き出すにはとても有効な手段になるというのは納得できます。

次に挙げているキーワードは「自主性」です。エッセイの中では、パズルを被験者に解かせる際に何か報酬がある場合と何も無い場合で、被験者の自主性がどう変わるかという心理学の実験を紹介しています。自主性とはつまり、その研究を自発的に行っている感覚を



学生自身が持っているかと言うことで。そのような自主性を引き出す指導方法として、このエッセイでは、一から十まで事細かに指示して管理する指導方法と、完全な放任の指導方法の間くらいで指導するがちょうど良く、そのポイントは学生によってまちまちだと言っています。例えば研究を始めただけの学生であれば、細かい事を指示して教える必要があるし、経験を積んだ大学院生であれば、そこまで事細かく指示する必要はなく、半ば放任でも大丈夫と言うことだと思います。このように指導の仕方に気をつけることで、学生がその研究を自主的に進めているという自覚を持ち、それがモチベーションを高めるきっかけになると言っています。

自分がどのように学生を指導してきたか振り返ってみると、どうも放任していた度合いの方が高かったように思います。本人の自主性を意識してそのような指導を心がけてきたわけではないですが、ある程度自主性を引き出す効果はあったのかもしれません。

エッセイで挙げている3つめの要素は「社会的つながりです」。学生が一人でその研究を行っているのではなく、何らかの形でラボの他のメンバーとつながっているような環境を作る事が大事だと言っています。つながり方としては、指導するシニアなポストクや大学院生であったり、研究の進捗状況を発表するセミナーの形式であったり、様々なつながり方があります。学生自身が孤立せず、何らかの形で他のメンバーとつながっているという環境を指導教官が作ることで、それが本人のモチベーションを高めることにつながると説明しています。ちなみにAlon教授の研究室では、2時間のラボセミナーの最初の30分を雑談にあてて、メンバーの会話を通じてそのような環境作りを行っているということです。また実際の研究紹介では、投稿する直前とか始めたばかりの仕事とか、その発表の内容に合わせて、ラボメンバーがレビューアーのように批判したり、あるいはざっくばらんに意見を述べた

りしているそうです。

自分自身のこれまでの経験に照らして考えると、ラボのメンバーがそれぞれどのような研究を行っているのか、皆の前で発表してディスカッションする機会はとても重要だと考えています。また、出たばかりのデータを他のラボメンバーに見せて、お互いあれこれ議論するような環境が本当は望ましいと思っています。反対に、ラボセミナーの際、指導教官が一人であれこれ質問して、周りのメンバーが萎縮して全く発言しないような環境は、おそらくラボメンバー同士の関係を築く上で逆効果になってしまうと思います。あれこれ質問したいというのはPIの常ですが、メンバー同士のディスカッションを促進する役目を果たすというのも重要な責務かもしれません。

Alon教授はこのエッセイの中で、学生のモチベーションを指導によって高めることで、PI自信のモチベーションが上がると考えているようです。指導者が鬱屈としていれば、グループ全体の士気にマイナスの影響があるのは分かりますが、逆に学生のやる気が指導者のやる気につながるというのは、なかなか興味深い考えだと思います。今思い返せば、私自身前職からの異動先がなかなか決まらず、モチベーションが上がらないような時に、学生やポストクの出すデータで救われていたことがあったようにも思います。指導方法一つで、それがラボ全体や自分自身のやる気に反映されると考えると、なかなか研究室運営は奥が深いと考えさせられます。

最後にこのエッセイでは、TOPモデル (T: talent, O: objective, P: passion) という概念と、今回モチベーションを左右するとして挙げている3つのファクターとの関連を説明しています。要するに、能力 (competence) は才能 (talent) につながり、自発性 (autonomy) は情熱 (passion) に、また社会的つながり (social connectedness) はそのグループの目的 (objective) とそれぞれ関連

していると説明しています。さらにAlon教授は、このTとOとPの共通集合にこそ、優れた研究プロジェクトがある、と言っています。例えば、新しく所属した学生や新しくラボを立ち上げるシニアなスタッフが何を始めるかアドバイスする際、このTOPモデルに従ってアドバイスを与えるそうです。まず自分自身を省みて何を得意として (T)、何に興味を持っているのか (P)、この2つをまずリストにしてその共通項を探る。そして次に研究グループの目的や方向性 (O) とオーバーラップするテーマがあるかどうか探ることで、プロジェクトに関するアドバイスを与えるということです。実際の成功例は紹介されていませんが、このように手順でプロジェクトが考えられれば面白いと思いました。

これまで私自身が指導してきた学生には、確かに本人の意向を聞きながら決めることはしていましたが、ここまで体系的にプロジェクトを考えて与えたことはありません。むしろ他の学生やスタッフが、以前手を着けて止まっているプロジェクトを引き継いでもらったりしたような場合が多いように思われます。それぞれ皆研究成果を発展させて形にして、研究室を卒業していきましたので、特に失敗だったとは思いませんが、今後新たに研究プロジェクトを与えるときには、是非参考してみたいと思います。

おわりに

今回一つのエッセイを紹介し、学生の指導方法とやる気について書いてみました。皆さん、自分自身の指導方法や学生の関係に照らして何か得るものがあつたでしょうか？少しでも参考にいただければ幸いです。Alon教授は他にもエッセイを書いているようなので、次回機会があればまた紹介してみたいと思います。

新学術領域研究「ゲノムを支える非コード DNA 領域の機能」今後の予定

2014年	1月	公開シンポジウム「インターメアによる染色体制御機構」第6回領域会議 (担当：菱田)
	2月	市民公開講座「ゲノムの調べ」(担当：小林・須賀・有吉)
	4月	第2期公募班員の決定
	7月	第7回領域会議 (担当：舩本)
2015年	2月	第8回領域会議 (担当：加納)
	7月	国際シンポジウム「インターメアによる染色体制御機構」(担当：中山・高田・加納)
	7月	第9回領域会議 (担当：中山)
2016年	3月	終了国内シンポジウム「インターメアによる染色体制御機構」(担当：小林)
	3月	第10回領域会議 (担当：小林)

(実施月は目安)

編集後記

領域代表の巻頭言でも触れられていますが、中間評価では全体の評価に加え「非常に魅力的なニュースレターを作り、領域内外に向けた情報発信を充実させている点も評価できる」とのコメントを頂きました。これもひとえに原稿を寄稿して下さった領域関係者と、表紙のデザイン (株式会社トライスさん) のおかげと皆に感謝したいと思います。話は変わりますが、今回コラムのためにきちんと英文のエッセイを自分で翻訳していたところ、どうも単純に論文を読むのとは頭の違う部分を使っているような感覚をおぼえました。おそらくこれは、単純な事務作業と創造的な作業でも言えるような気がします。何かに飽きたら別のタイプの作業、という風にできたら効率的な作業につながるかもしれません。こんなアイディアで啓蒙本でも書けたら良いのですが、まあ無理でしょうね (J.N.)

ncDNA

N E W S L E T T E R



「ゲノムを支える非コード DNA 領域の機能」

文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究（研究領域提案型）

新学術領域研究

「ゲノムを支える非コード DNA 領域の機能」 ニュースレター 第 5 号

2013 年 12 月 発行

編集人 中山 潤一

発行人 小林 武彦

発行所 名古屋市立大学大学院 システム自然科学研究科

中山研究室

TEL / FAX : 052-872-5866

E-mail : jnakayam@nsc.nagoya-cu.ac.jp

領域ホームページ

<http://www.cdb.riken.jp/cmd/ncDNA.html>