

8

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）

2015
J u n e





contents

巻頭言	2
研究成果の紹介	
□ 哺乳動物細胞rDNAにおける Replication fork barrierのメカニズムと意義	4
□ HACベクターの特性を利用した トランスジェニックマウスの作製	6
□ 非コードDNA領域を介して機能する 2種類のモーター分子による 効率的な染色体整列機構	8
□ グルコース飢餓ストレス適応時の 非コードRNAの転写制御	10
□ 肝内胆管癌の全ゲノムシーケンスにより 明らかになった塩基置換のパターンと ドライバー遺伝子	12
市民公開講座	
□ 高校生向け公開講座「ゲノムの調べ」開催を終えて	14
コラム	
□ 2015年夏、ゴードン会議に行ってきます	15
編集後記	19

巻頭言

いよいよ最後の年となりました

さて、今年度は当領域の最終年です。2011年、東北大震災の年に少し遅れて本新学術領域はスタートしました。それからあっという間の4年間。ここまでを振り返ると驚きの連続でした。やはりグループ研究では個人研究では見つけることが出来ないような、ユニークな「発見」がたくさんでできます。

ゲノムの「超～変な配列」の発見

我々の領域は非コードDNA配列が一体何をやっているのかを解明すべく日々研究しています。最近の興味深い成果を1つ紹介いたしましょう。

非コードDNA配列にあるインターメア（非コード機能性DNA配列）検出のモデルケースとして、分裂酵母を用いた研究をいくつかの研究班で共同して行っています。まず中山班、太田班、小林班で分裂酵母野生株32種のゲノム配列を決めました。これは次世代シーケンサーを持っている研究室なら、大変ですがその気になればできます。次に印南班を中心にそれらのゲノムを比較して保存あるいは変異の多い領域を見つけ出しました（プレスリリース、PLOS ONEに昨年発表）。非コードDNA領域中で、株間で保存されている配列は何らかの機能を持っており、そのため進化の過程で変化しなかったと考えられます。つまり「インターメア」です。それらの中から有望なものについては、ノックアウト等により機能解析を行います。逆に配列が株間で変化しているところは、不安定になりやすい、いわゆる「組換えのホットスポット」の可能性あります。なぜ、それらの配列が変化しやすいのかが判れば、がんの発生や進化のメカニズムの解明に繋がるかもしれません。さらに面白いのは印南班が、これは私には真似できないのですが、ゲノムに均一あるいは不均一に存在する配列を検索するソフトを開発しました。この解析ソフトを使うと、どこにどういう配列が集中しているのか、逆に必要以上に均一に分布しているような配列も見つけ出すことができます。画期的なものです。我々が探しているインターメア（非コード機能性配列）は染色体中でユニークな存在位置を示す可能性があります。例えばあるものは複製開始点のそばにあったり、セントロメアのそばにあったりといった

具合です。そのような存在場所に特徴のある配列を見つけ出すこともこのソフトでは可能です。実はすでに興味深い領域もでてきています。そこではほぼ同じ配列が200回以上繰り返しています。今のところ海のものとも山のものともつかない存在ですが、新しい発見の予感がします。乞うご期待下さい。もう1つ紹介したい面白い発見がありますが、それは次回に回します。

異動しました

私事で恐縮ですが、異動しました。この場が初めてのご報告になる方もおられるかもしれません。ご無礼をお許し下さい。

8年3ヶ月間お世話になった遺伝研を3月に退職し、4月1日より縁あって東京大学分子細胞生物学研究所に務めています。遺伝研の前は岡崎の基礎生物学研究所に約10年間、留学先もロッシュ研究所とNIHでしたので、大学院生以来の「大学」通いということになります。余談ですが、定期券を持つのは高校以来！です。研究者稼業、どこに務めていても基本的にやることは一緒、研究して論文を書くことですが、周りに若い学部学生が溢れているのは、研究所では感じられない刺激があります。

またショックなこともありました。研究所にいと、若い方はあまり入ってこず、よく知った仲間が自分と同じペースで年を取っていくので研究所内での「相対的な若さ」はあまり変わらない気がします。しかし、ここ東大に来て、若者に囲まされると、なんだか自分が急に年をとったような気分になります。止まっていた時間の針が一気に回りだした感じです。少し落ち込みました。

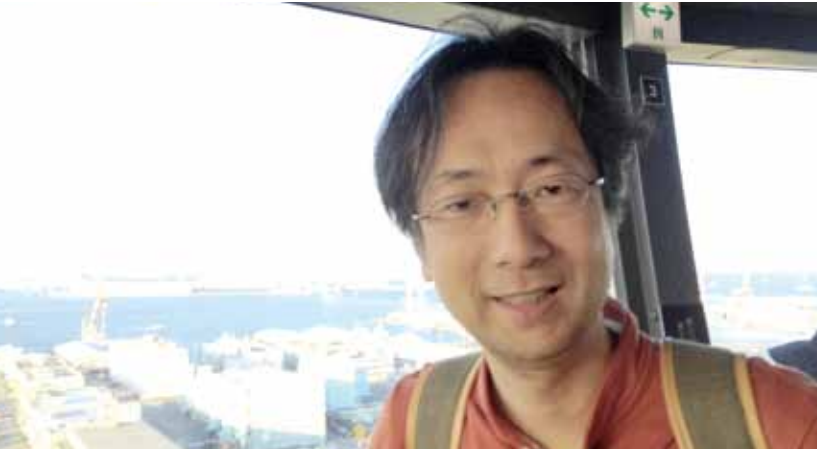
ひとの流動化が研究者社会には必要！

私は異動することは基本的にいいことだと思っています。異動して新しい環境に行くことは、自分も周りも活性化するためです。また適材適所が実現できますし、うまくやれば遠距離結婚、遠距離子育て、遠距離介護も回避できるかもしれま

せん。ですので、異動を奨励するような「政策」は条件付きで賛成です。条件の1つは異動先が容易に見つかるように、できるだけ多くの機関が足並みを揃えて人材の流動化に積極的に取り組んでもらうこと。異動先が確保できなければ話になりません。流動化反対論の1つに事業や研究の継続性が損なわれる、というのがあります。ただ毎年半分を入れ替わるわけではないので、あまり心配はないと思います。条件の2つ目は、学生も含めた異動者が不利益にならないように就労条件等を整備することです。異動することで条件が悪くなるようでは、ただでも引越しまは大変なのに、誰も動きません。あまり知られていませんが、異動すると給与が減ることがあります。理由はそれまでもらっていた特別手当や報償が無くなる場合があるからです。人材の流動化は研究者社会の活性化に繋がることなので、異動時の雇用条件は考えるべきですね。

それとこれは研究者社会のみの話ではないのですが、日本人はいい意味では「和」を重んじる、悪い意味ではよそ者に対する警戒心が強くなる傾向があります。こ

れが異動者にとっては、新しいグループに入り込む精神的なバリアーとなり、なかなか難しいようです。でもここはなんとか理性溢れる研究者ですから異動する側も、受け入れる側も広い心で、産みの苦しみに耐えて新しい「知の融合」を達成してもらいたいです。若い方は、異動＝プロモーションの場合が多いので、皆さんどんどん異動してください。私は特にもう少しシニアの方に異動をお勧めしたいです。「あと10年で退職だから」といわないで、「最後の10年、新しいことにチャレンジする!」という考え方もありだと思います。シニアの異動者に対して、定年年齢に柔軟性を持たせるような政策も効果的だと思います。というのはこれはシニアの異動の問題だけにとどまらず上が硬直している状態はより若い世代の流動性にも悪影響を与え、結果的にもっと若いつまり学生が研究者への道を選ばなくなるという「負の連鎖」を引き起こしかねないからです。またシニア層の固定化は組織の透明性という意味でもあまりよくありません。そうならないためにも、世代を超えた適度な「シャッフル」が望まれます。



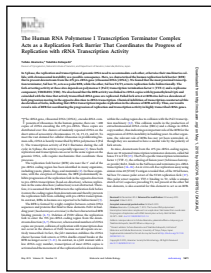
領域代表
小林 武彦
東京大学
分子細胞生物学研究所

ゴールデンウィークの横浜マリンタワー

研究成果の紹介

哺乳動物細胞 rDNA における
Replication fork barrier の
メカニズムと意義

赤松 由布子

東京大学
分子細胞生物学研究所
エビゲノム疾患研究センター
ゲノム再生研究分野The Human RNA Polymerase I Transcription Terminator Complex Acts as a Replication Fork Barrier That Coordinates the Progress of Replication with rRNA Transcription Activity
Yufuko Akamatsu and Takehiko Kobayashi
Mol. Cell. Biol. May 2015 vol. 35 no. 10 1871-1881

転写と複製は、どちらも同じゲノム DNA を鋳型として、それぞれ新生 RNA 鎖と新生 DNA 鎖を合成します。同じ遺伝子上でこれらの装置が衝突したとき、DNA 損傷が起こりゲノム不安定性の原因になると考えられていますが、細胞周期 S 期に転写の活発な遺伝子では、どのように正常な複製が保障されているのでしょうか。本研究では、細胞内で非常に転写活性が高いリボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) に着目し、酵母からヒトまで現象として進化的に保存されている DNA 複製阻害 (Replication fork barrier: RFB) の分子機構とその意義を、哺乳動物細胞を用いて解析したのでご報告いたします。

rDNA はゲノム中に数百コピー存在する多重遺伝子で、タンデムリピートからなるクラスターを形成しています。私の所属する小林武彦研究室では、これまで出芽酵母が rDNA のコピー数を維持するメカニズムについて研究を行ってきました。出芽酵母 rDNA の非コード DNA 部分、35S pre-rRNA コーディング領域の 3' 側には RFB が存在し、Fob1 タンパク質が結合して下流から転写領域に侵入する DNA 複製フォークの進行を阻害します。この Fob1 による DNA 複製フォーク進行阻害は、DNA 二重鎖切断を誘導し、rDNA コピー間の組換えを介してコピー数を増減します。この機構は非常にユニークで、小林研究室では出芽酵母の分裂寿命とも関係していることを明らかにしています。

私は小林研究室に所属して哺乳動物の rDNA を研究するにあたり、出芽酵母のように rDNA の構造やコピー数の再編成が分化した細胞の機能と関係しているかもしれないとの仮説を立てて実験を行っていましたが、哺乳動物細胞の rDNA は思ったよりも安定な構造を維持しており、また実験の検出感度の問題もあり、芳しい結果は得られませんでした。そこでまずは、哺乳動物での研究の切口として、RFB の分子機構を明らかにすることにしました。

出芽酵母の RFB に結合して働く Fob1 は、他の生物では保存されておらず、哺乳動物細胞では分裂酵母の Reb1 のホモログ TTF-1 (Transcription termination factor-1) が RFB での DNA 複製フォーク進行阻害に関与すると考えられていました。TTF-1 はもともとその名の通り rDNA の転写を行う RNA polymerase I の転写終結因子として同定されました。45S pre-rRNA コーディング領域の下流には Sal-box と呼ばれる転写のターミネーターエレメントが存在し、TTF-1 は Sal-box に結合して rDNA の転写終結を担います。これまでに、F. Grummt のグループが SV40 複製系を利用した生化学実験を行い、マウスでは複数の Sal-box T1 ~ T10 のうち T2

のみがその近傍に存在する配列とともに転写の下流からコーディング領域に侵入する DNA 複製フォークの進行を阻害するモデルを提唱していました。これは 1997 年の報告でしたが、それ以後、哺乳動物細胞で RFB の研究はほとんど進んでおらず、このモデルにしても、1998 年の P. Hernandez のグループの実験結果と RFB の位置や個数について矛盾があるが検証されていないという状況でした。そこで私は、哺乳動物の培養細胞を用いて、二次元電気泳動法で DNA 複製フォーク中間体を検出して、RFB の位置、数、向き (転写と逆方向から進行する DNA 複製フォークのみ阻害するのか、転写と同方向でも阻害されるのか) を詳細に調べることになりました。出てきた結果は、二次元電気泳動初心者の私にはとても複雑に見えました。図に HeLa 細胞の結果を示しますが、1. ヒト細胞は RFB を含む領域に制限酵素断片長多型 (RFLP) があるが、HeLa では 2 種類の RFLP がある。2. Y-arc 上に複数回の DNA 複製フォークの進行阻害 (RFB 活性) が検出される。3. しかしなぜか、一方の多型 (Class I) には RFB 活性が見られるが、他方 (Class II) では検出されない。ことが分かりました。

RFB の活性に必要な cis エLEMENTとその機能的方向性は、293EBNA 細胞中で DNA 複製を開始する OriP レプリコンを持つプラスミド上に候補配列をクローニングして解析することにより、決定することが出来ました (OriP プラスミドは正井研から頂きました。ありがとうございました。) (図)。その結果、今までの F. Grummt のモデルを修正して、Sal-box/TTF-1 複合体が RFB として機能することを実験的に証明することができました。

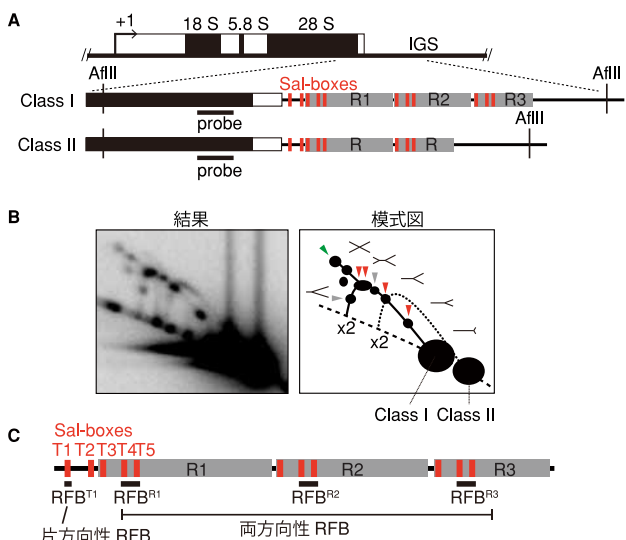
しかし、基本的に同じ DNA 配列をもつ RFLP の Class I と Class II の間で RFB の活性が異なる理由が分かりませんでした。これは rDNA が S 期に複製するタイミングを調べることで解決しました。哺乳動物細胞のゲノム中に数百コピー存在する rDNA は、すべてが転写されているわけではなく、一部が活発に rRNA 合成を行っている一方で、残りの rDNA コピーはヘテロクロマチン化してサイレントな状態で存在します。Class I の RFB 活性は、転写活性のある rDNA コピーが複製されるタイミングと相関して S 期の初期に最も高く、サイレントなコピーが複製される S 期後期では DNA 複製フォークの進行阻害がほとんど起こっていないということが分かりました。さらに、RFB 活性がほとんど見られない Class II では 90% 以上が大規模な CpG メチル化を受けていて、RFB 活性は低メチル化状態の Class I に存在することが分かりました。これらのことから、特に rRNA 転写の活発な rDNA の RFB で

DNA 複製フォークの進行が阻害されることが分かりました。

これは、RFB の役割を考える上で興味深い結果でした。もともと RFB の役割は、転写されている rDNA 領域の下流から DNA 複製フォークが進行するのを阻害し、転写と複製の正面衝突を避けるためと考えられていました。したがって、やみくもに Sal-box が RFB として機能するのではなく、転写の起こる rDNA でのみ RFB が働いていることは、この役割と一致しています。実際に、RFB での DNA 複製フォーク進行阻害が起こらない TIMELESS ノックダウン細胞では、Class I の rDNA のみに rRNA の転写と反対の方向から正面衝突する DNA 複製フォークのブレーキが、転写活性に依存して観察されました。このことは、RFB が機能しない場合には、転写の

活発な rDNA で転写と複製の衝突が起こることを示唆しており、RFB の存在意義を実験的に示すことが出来たと思っています。

今回の研究では、哺乳動物細胞 rDNA の RFB を以前よりも詳細に解析して、混沌としていたモデルを整理でき、個人的にはかなりスッキリした気持ちになりました。今後、出芽酵母のように、RFB で起こる DNA 複製フォーク進行阻害と rDNA の不安定化やコピー数維持機構、さらに細胞老化など、様々なメカニズムとの関連が出てくれば、大変面白いと思います。今回の研究成果が、哺乳動物の rDNA 研究の良いスタートラインになればいいな、と期待しています。



A: ヒト rDNA の構造と転写終結領域近傍の拡大図。二次元電気泳動解析に使用した AflII サイトとプローブを示す。Sal-box の位置 (赤色)、3 つの Sal-box を含む R リピート (グレイ) を示す。Class I と Class II はリピートの数により異なる。

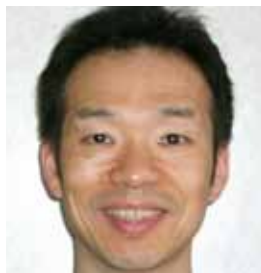
B: HeLa 細胞の AflII 領域の DNA 複製中間体を示す二次元電気泳動解析の結果 (左) とその模式図 (右)。Class I の Y アーク上に転写と逆方向に進行する Y フォーク (赤矢印) と同方向に進行する Y フォーク (グレイ矢印) の蓄積が観察された。向かい合う Y フォークによって起こる複製終結を緑矢印で示す。Class II の Y アーク上には RFB 活性を示す複製中間体の蓄積が検出されない。

C: 本研究で決定した RFB 部位とその機能的方向性。R リピートの中に存在する Sal-box T4/T5 は、両方向から到達する DNA 複製フォークの進行を阻害する。それぞれの R リピート中の RFB を RFB^{R1}、RFB^{R2}、RFB^{R3} と呼ぶ。最も転写領域に近い Sal-box T1 (RFB^{T1}) は、転写領域に侵入する方向でのみ DNA 複製フォークの進行を阻害する片方向性 RFB であった。Sal-box T2 と T3 は RFB として機能しない。

研究成果の紹介

HAC ベクターの特性を利用した
トランスジェニックマウスの作製

長谷川 嘉則

公益財団法人かずさ DNA 研究所
パイオ研究開発部
シーケンシングチーム

Generating a transgenic mouse line stably expressing human MHC surface antigen from a HAC carrying multiple genomic BACs.
Hasegawa Y, Ishikura T, Hasegawa T, Watanabe T, Suzuki J, Nakayama M, Okamura Y, Okazaki T, Koseki H, Ohara O, Ikeno M, Masumoto H.
Chromosoma. 124(1):107-18 (2015)



これまでに、ヒト人工染色体 (HAC) を利用した、セントロメア構成因子によるクロマチンネットワークの解析に関しては何度も話を聞いていると思います。本稿では、HAC をベクターとして利用する研究について、研究の経緯を交えて紹介させていただきます。私が以前所属していたクロモリサーチ社では、HAC の特性を利用して、これまでのベクターにはない特徴を持つベクターを完成させました (Ikeno et al, 2009)。HAC ベクターの特徴を挙げると、(1) 宿主細胞の染色体遺伝子を破壊せず、核内で独立して存在する。(2) 細胞増殖過程で安定に次世代細胞に維持される。(3) ゲノム由来の調節領域を含めた巨大な遺伝子領域を導入できる。(4) 種々の生物種、細胞種に移入することができる。(5) 搭載した遺伝子は宿主細胞の生理的発現制御をうける、となります。さらに、本研究において使用した環状の HAC ベクターは、部位特異的組換えサイトが4箇所挿入されているので、狙った数の DNA 断片を挿入することが可能です。

私のプロジェクトの目的は、HAC ベクターを用いて、ヒト造血因子、サイトカイン遺伝子などを導入することにより、臨床的に応用性の高い造血免疫系ヒト化マウスを作製することでした。HAC ベクターに搭載する遺伝子は、HLA-DR としました。MHC クラス II 分子である HLA-DR は、活性化 T 細胞、B 細胞、マクロファージや樹状細胞、などで組織特異的発現を示し、 α 鎖 (HLA-DRA) と β 鎖 (HLA-DRB1) からなるヘテロダイマーで構成されています。HLA-DRA と HLA-DRB1 についての制御領域に関する情報は少ない上、制御領域を含んだ HLA-DRA と HLA-DRB1 の両遺伝子を持ったトランスジェニックマウスは作製されたことがありませんでした。そこで我々は、HAC ベクターの特性を利用して、制御領域全体を十分に含むと思われるゲノム領域、100kb の HLA-DRA と 50kb の HLA-DRB1 について、それぞれの遺伝子のコピー数を1個ずつに制御したトランスジェニックマウスの作製を試みました。また、実際の患

者さんの病態モデルマウスとして利用するためには、すべての HLA-DR のハプロタイプを用意する必要があります。日本人の HLA-DR のハプロタイプ分布を見ると、HLA-DRA は機能的に1種しかありませんが、HLA-DRB1 は約 30 種知られています。そこで、HLA-DRA と日本人に最も多いハプロタイプである HLA-DRB1*0405 を各1コピーずつ搭載した HAC (HLA-HAC) を作製すると共に、将来すべての HLA-DRB1 のハプロタイプと組み合わせることも見越して HLA-DRA を1コピーのみ搭載した HAC (DRA-HAC) でもトランスジェニックマウスを作製しました。

研究はすこぶる快調に進み、1. 大腸菌内での相同組換えによる HLA-BAC クローンへの HAC ベクター挿入用カセットの付加。2. HAC ベクター保有 CHO 細胞内での、HAC ベクターへの二つの HLA-BAC クローンの挿入。3. HLA-HAC のマウス ES 細胞へのトランスファー。4. キメラマウス作製、まで予定よりも随分と早く到達しました (図1)。そして、キメラマウスにおいて、HAC ベクターに搭載した HLA-DR は組織特異的発現を示し、ヘテロダイマーを形成して表面抗原として機能しており、さらに、HLA-HAC も DRA-HAC もキメラマウスから約 50% という期待通りの確率でトランスミッションすることが確認できました (HAC ベクターは1細胞に1つ保持しますので、最高で 50% となります)。あとは、本実験に使用したマウス ES 細胞はハイブリッド細胞だったので、純系にするために B6 マウスとバッククロスを7世代以上行うだけとなりました。しかし、その後、思いもよらぬ結果が出てきました。バッククロスを進めると、DRA-HAC (HLA-DRA のみ) は期待通り高い保持率を示しましたが、HLA-HAC (HLA-DRA + HLA-DRB1*0405) は体細胞中の保有率がより低めで維持されることが分かり、さらにバッククロスを進める毎に HLA-HAC ではトランスミッション率が落ちていったのです (図2)。どこまで落ちてしまうのかと心

配しましたが、3 回目のバッククロスで底を打ったので、何とか目的を達成することはできました。B6 の純系のバックグラウンドになることが染色体やクロマチンのエピジェネティックな状態にまで影響を与えているようで、2つの遺伝子を環状 HAC の別の領域に挿入したことが何らかの安定性の低下を引き起こす原因であると思われます。8回目のバッククロスを行ったあとでも、HLA-HAC 保有マウスは、HLA-DR の二つのヒト遺伝子からの組織特異的発現が確認できたので、ここまでの結果を論文にまとめました。なんとか形にはなったのですが、HLA-HAC の低い保有率やトランスミッション率では、実際に病態モデルマウスとしての使用には耐えられません。

私のこれまでの研究人生を振り返ってみると、与えられたテーマについても、自分で立てた仮説についても、想い描いた結果の半分も実現していません。いや、8割方失敗している気がします。私は、こういう局面になった時に思い出す言葉があります。博士の学位を取得して働き出したばかりの時ですが、研究室の教授から「あなたは給料をもらって仕事をしているので、プロなんだよ。研究のプロとして雇っているんだ。プロ野球選手と一緒になんだよ。」との言葉をいただきました。子供の頃にプロ野球選手といえばスターであり憧れでした。特に私は、王貞治選手のファンで、豪快なホームランに魅せられたものです。この言葉を言われた時に、自分の中に甘さがあることに気づき、はっとしました。プロは、上手いかなかった時こそ、真価が問われるのです。舛本先生と、それこそ侃々諤々の議論を重ね、実際の使用に耐えうる HAC ベクターの開発を進めました。ここでは簡単に述べますが、1. HAC ベクターへの遺伝子搭載方法の改良、2. HAC ベクターへのテロメア配列の挿入による線状化、を行い数種類の改良型 HLA-HAC を作製しました。B6 マウスから自分で細胞株を作製して、そこに作製した全ての改良型 HLA-HAC をトランスファーして、安定性を検討しました。100 回の細胞分裂後の観察の結果、培養細胞上ではありますが、DRA-HAC と同等の安定性を持つ改良型 HLA-HAC の作製に成功したこ

とが分かりました。マウス個体内においても、DRA-HAC と同等の性能を示してくれることが期待できます。今後、機会を見て改良型 HLA-HAC のトランスジェニックマウスも作製して行きたいと考えています。私の場合は、なかなか王選手のように格好良く逆転ホームランは打てないので、周りの皆様のお力を借りしながら、フォアボールでもデッドボールでも泥臭く塁に出て研究を進めていきたいと考えています。

最後になりますが、NEWS LETTER 7 でカエルの方言の話題が出ましたので、私にも少し紙面をいただきたいと思います。実は私は、カエルの方言で博士の学位を取得したのです。夏になると田んぼからカエルの鳴き声が聞こえてきますが、これは雌を誘惑するために鳴いています。この鳴き声を Mating call といいます。雌は、視覚情報や嗅覚情報を利用せずに、Mating call だけを頼りに同種の雄に近づき、近づいてきた雌に雄が抱きつきカップル成立となります。つまり、カエルの場合は、相手の選択権は完全に雌にあるのです。本邦産のいろいろな種で地方集団の Mating call を調べたのですが、方言が確認できた種がありました。さらに、方言が見られた種において、集団別に雌の嗜好性を調べたのですが、雌の嗜好性にも地方差があったのです。それぞれの集団における方言と雌の嗜好性は相関していました。ただし、モテない雄もただ黙ってはいません。上手く鳴く雄のそばにひっそりと鳴かず待機していて、近寄ってきた雌を奪い取る悪知恵が働く雄がいるのです。ヒトもカエルも恋の相手探しには知恵を絞りますね。

もうすぐ、僕の一番好きな季節がやってきます。木更津は田舎なので、周りに田んぼがたくさんあります。網戸にしてカエルの鳴き声を聞きながら、ナイターを見て、ビールを飲み枝豆を食べるのです。至福のひと時です。

参考文献

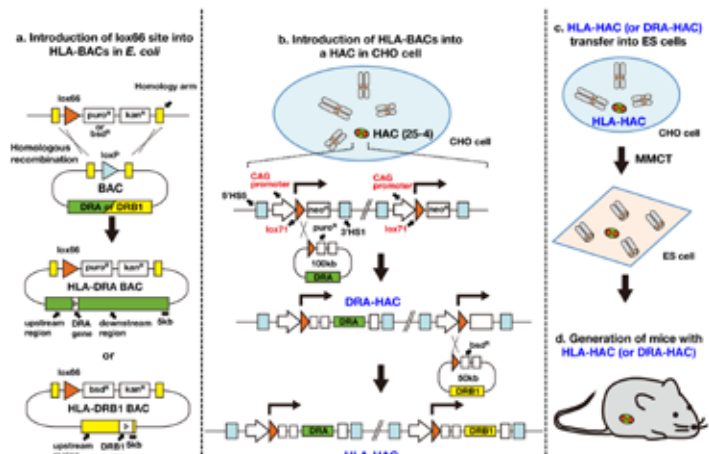
1) Ikeno et al (2009) *Nucleic Acids Res* 37:e44

図1 ヒト遺伝子搭載 HAC 保有マウスの作製。a. 大腸菌内での相同組換えによる HLA-BAC への lox66 サイトの挿入 b. CHO 細胞内での部位特異的組換えによる HLA-BAC の HAC ベクターへの挿入 c. 微小核融合法による CHO 細胞からマウス ES 細胞への HLA-HAC のトランスファー。d. ES 細胞と 8 細胞胚のアグリゲーション法によるキメラマウスの作製

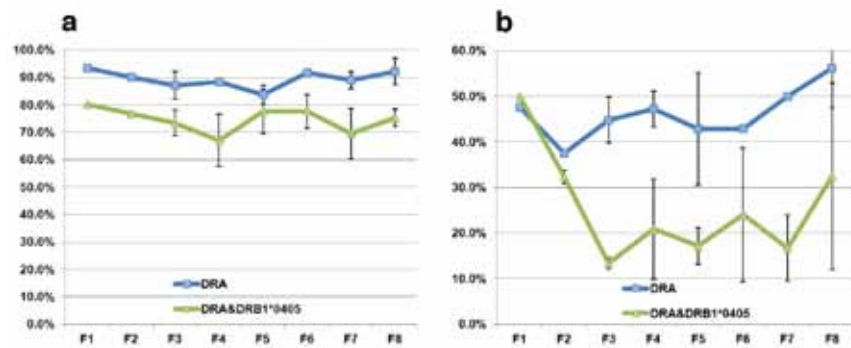


図2 HAC の保有率と伝達率。a. FISH 細胞解析によって確かめた尻尾細胞における HAC 保有率 b. HAC の子孫伝達

研究成果の紹介

非コード DNA 領域を介して機能する
2 種類のモーター分子による効率的な
染色体整列機構

家村 顕自

東北大学加齢医学研究所
分子腫瘍学研究分野

細胞分裂期において複製された染色体を娘細胞に均等分配することは、細胞増殖に伴い遺伝情報を正確に伝搬する上で重要な現象です。染色体均等分配の破綻は、遺伝情報の攪乱に繋がることから、多くの遺伝病や発がん、がんの悪性化の主たる要因になりうることが示唆されています。

分裂期への進行と共に凝集した染色体は、核膜崩壊後、紡錘体中央部の赤道面に向けてダイナミックに移動します。赤道面に全ての染色体が移動し整列すると、染色体中央部の非コード DNA 領域であるセントロメアを基盤として形成される構造物（キネトコア）が両極から伸びる微小管に引っ張られることで、染色体は娘細胞に均等分配されます。核膜崩壊からこの間僅か 30 分弱の出来事です。即ち、染色体を娘細胞に均等に分配するためには、全ての染色体を赤道面に速やかに運ぶ必要があります。

永らく染色体は、キネトコアが微小管末端と結合（末端結合）し、微小管の重合脱重合によって移動すると考えられてきました。これは、両極から伸びる微小管末端が姉妹キネトコアそれぞれをランダムに捕捉し、結果的に姉妹キネトコア双方が両極から伸びる微小管に最も捕捉されやすくなる、両極から伸びる微小管末端が同程度分布する赤道面に染色体が集合していくというモデルに基づくものです。

しかし、2011 年に核膜崩壊後の染色体動態が詳細に解析され、染色体は紡錘体表面を沿って赤道面へ移動し、末端結合は染色体が赤道面に移動した後に引き起こされることが明らかにされました。また、このとき、紡錘体表面を沿って移動する染色体はキネトコアが微小管の側面に結合している（側面結合）状態であることが示されました。これらの結果から、染色体が赤道面へ移動する際は側面結合によってなされることが示唆されました¹⁾。一方、側面結合はこれまで一過的な結合であると考えられており、側面結合による染色体の移動に関する分子基盤はほとんど明らかにされていません。

側面結合染色体の赤道面への移動を司る分子として、キネトコアに局在するモーター分子 Kinesin-7/CENP-E が既に知られてい

ます。CENP-E は、末端結合を形成した微小管側面を動くことによって染色体を赤道面へ運搬します²⁾。しかし、前述したように末端結合は側面結合染色体が赤道面に移動した後に形成されます。それでは、末端結合形成以前の側面結合染色体は如何にして赤道面へ運ばれるのでしょうか？また、末端結合が存在しない紡錘体でも染色体は CENP-E によって赤道面へ運ばれるのでしょうか？我々はこの疑問を解決するために、CENP-E に加えて染色体腕部に局在するモーター分子 Kinesin-10/Kid に着目しました。

Kid は染色体腕部に局在し、極から染色体を遠ざける働きを担うモーター分子です。Kid の機能抑制や発現抑制は、減数分裂では染色体整列異常を引き起こすものの、体細胞分裂での異常は観察されていません。このことから、Kid の染色体整列における役割は不明でした。そこで我々はまず初めに、Kid と CENP-E を共発現抑制し、体細胞分裂における表現型を解析しました。その結果、Kid/CENP-E 共発現抑制細胞では、赤道面に整列できない染色体が CENP-E 発現抑制細胞と比べて増加することが分かりました。この結果から、体細胞分裂においても Kid は一定の条件下での染色体整列に寄与している可能性が示唆されました。

次に、側面結合染色体の赤道面への移動における Kid と CENP-E の寄与を明らかにするため、末端結合形成に必須なキネトコア分子 Hec1 を発現抑制しました。Hec1 発現抑制細胞では末端結合が形成されないため、ほとんどの染色体が側面結合状態になります。Hec1 発現抑制細胞の染色体動態を観察してみると、核膜崩壊直後、染色体が赤道面へ一過的に移動することが分かりました（図 1, Hec1 si）。この結果は、染色体の赤道面への移動が側面結合によってなされていることを支持しています。このとき、Kid を共発現抑制すると、染色体の赤道面への移動が抑制され、核膜崩壊後にみられた染色体の一過的な赤道面への集合がみられませんでした（図 1, Hec1/Kid si）。分裂期初期の細胞を免疫染色し、赤道面からキネトコアの距離を測定してみると、Hec1/Kid 共発現抑制細胞の染色体は Hec1 発現抑制細胞の染色体に比べて紡錘体内に散在しており、この表現型は Kid を過剰発現することでレスキューすることができました。Kid のモーター変異体（微小管上を移動できない変異体）の過剰発現ではレスキューでき

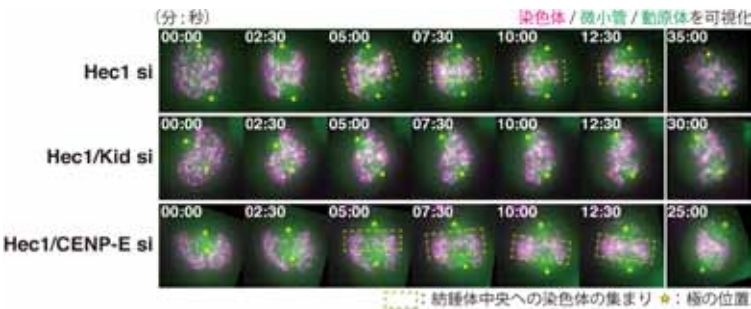


図 1 各発現抑制細胞の
分裂期染色体動態

なかったことから、Kid のモーター活性が側面結合染色体の赤道面への移動を担っていることが示唆されました。一方、Hec1 と CENP-E を共発現抑制すると、核膜崩壊後、染色体は赤道面へ移動し、Hec1 発現抑制細胞と比べてより赤道面へ集合することが分かりました（図 1, Hec1/CENP-E si）。この染色体の赤道面への過度な集合は、CENP-E を過剰発現することでレスキューできること、また、CENP-E の微小管結合能を亢進させることで赤道面への集合が抑制されることから、CENP-E はその微小管結合能を以って Kid による側面結合染色体の赤道面への移動を抑制していることが考えられました。

末端結合を阻害した細胞で得られた我々の CENP-E 発現抑制結果は CENP-E が染色体の赤道面への移動に寄与するというこれまでの考えとは相反します。この違いは何に起因するのでしょうか？CENP-E による染色体運搬は末端結合を形成した微小管を足場に行われます。また、紡錘体内の微小管は分裂期進行に伴い末端結合が形成されることで安定化します。このことから我々は、CENP-E の染色体運搬に対する寄与が微小管の安定性によって異なるのではないかと考えました。

分裂期において紡錘体微小管の脱重合に寄与するモーター分子 Kinesin-13/MCAK を共発現抑制し、それぞれの発現抑制細胞の紡錘体微小管を安定化したところ、Hec1/MCAK 及び Hec1/Kid/MCAK 共発現抑制細胞では染色体が赤道面により集合することが分かりました。一方、Hec1/CENP-E 共発現抑制細胞では MCAK を発現抑制しても染色体の集合度合いに変化はみられませんでした。これらの結果から、紡錘体微小管を安定化することで CENP-E が染色体運搬能を獲得し、染色体をより赤道面へ運んでいることが示唆されました。

以上の結果を踏まえ、我々は側面結合染色体の赤道面への移動において、次のようなモデルを提唱しました。まず、分裂期初期の末端結合が形成されていない時期は、紡錘体微小管が不安定であるため、側面結合染色体は染色体腕部に結合する微小管を介した Kid のモーター活性によって赤道面へ運ばれます（図 2, 上）。このとき、CENP-E はその微小管結合能を以ってキネトコアを紡錘

体上にアンカーし、適切な方向（赤道面）へ運ばれるよう方向性を調節する働きを担っています。分裂期が進行し、末端結合が形成され始めると、微小管が安定化すると共に CENP-E が運搬能を獲得し、CENP-E によっても染色体が運搬されます（図 2, 下）。側面結合染色体は Kid と CENP-E の 2 種類のモーター分子が協調して機能することにより、効率よく速やかに赤道面へ運搬されると考えています。

これまで、染色体の移動は非コード DNA 領域であるセントロメアを基盤として形成されるキネトコアに結合する微小管や CENP-E が担っていることが知られていましたが、我々はこちらに加えて Kid がその移動の効率性を高めていることを明らかにしました。哺乳動物の Kid は DNA 結合部位を介して c-erbB-2 遺伝子のプロモーターに直接結合する分子として同定されました³⁾。Kid が結合する DNA のコンセンサス配列は明らかにされていませんが、結合配列として同定された配列は α サテライト配列に相同性があり、Kid は α サテライト配列を好んで結合する可能性が示唆されています。今後、Kid が結合する DNA 配列の解析を進めることで、セントロメア周辺領域を含めたより広範囲におよぶ非コード DNA 領域の染色体動態制御における役割を明らかにできるのではと期待しています。

本研究は私が田中耕三教授の研究室に赴任した際に独断的に始めた研究です。当初得られた結果の解釈の多くは、自分勝手な見解に基づくものでしたが、田中教授と何度も議論を重ねることで洗練され、本論文にまとめることができました。研究の場を提供して下さい、ときには深夜に及ぶこともあった我々議論に辛抱強く真摯に対応して下さい田中耕三教授及び研究室の皆様、研究遂行にあたりご助言や実験材料を提供して下さい諸先生方にこの場をお借りして御礼申し上げます。

参考文献

- 1) V. Magidson et al. (2011) *Cell* 146: 555-567
- 3) T. Kapoor et al. (2006) *Science* 311: 388-391
- 4) N. Tokai et al. (1996) *EMBO J.* 15: 457-467

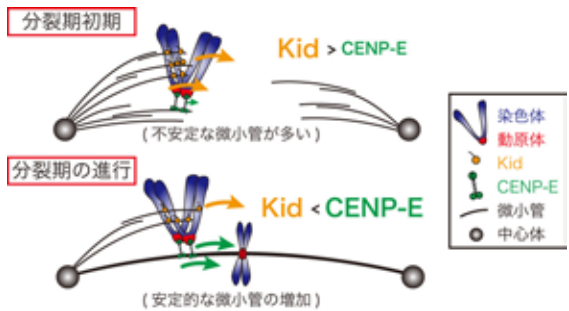


図 2 Kid と CENP-E の使い分けによる
効率的な染色体整列モデル

研究成果の紹介

グルコース飢餓ストレス適応時の
非コード RNA の転写制御

小田 有沙

東京大学 大学院総合文化研究科
広域科学専攻
複雑生命システム研究センター

私達は、非コード DNA 領域の一種である「遺伝子間領域」、及びその領域から合成される非コード RNA が果たす役割に注目して研究を進めています。プロモーターを含め遺伝子上流の非コード DNA 領域は、様々な生命現象における遺伝子発現制御に関わっており、特にエピジェネティック制御に重要な役割を果たします。近年のオミックス解析技術の発展により、真核生物の非コード DNA 領域からは非常に多くの非コード RNA が転写されていることが明らかにされてきました。非コード RNA の中でも、200 ヌクレオチドを超える長さを有する「長鎖非コード RNA(long noncoding RNA; lncRNA) は、発生や細胞制御などにおいて重要な役割を果たすと考えられています、その大部分は未だに機能が不明です。

太田研究室では、現在は首都大学東京で教授をされている廣田博士らと共同で、分裂酵母の糖新生に関わる *fbp1*⁺ 遺伝子のの上流から転写される lncRNA (metabolic stress induced lncRNA: mlonRNA) を介した遺伝子発現調節機構の解析を行ってきました。グルコースが豊富な時は、*fbp1*⁺ では 1kb ほど遺伝子の上流域から ORF 全域に及ぶ領域で、mlonRNA がごく微量転写されています。グルコース飢餓時には、mlonRNA の転写開始点が段階的に下流へとシフトし、次第に転写量が増大します。これに伴いプロモーター領域のクロマチン構造が段階的に弛緩し、その結果下流の *fbp1*⁺ 遺伝子の大規模な活性化が引き起こされます⁽¹⁾。なお、グルコース飢餓直後からプロモーター周辺ではヒストン修飾の変化が起こるのですが、*fbp1*⁺ の mRNA やタンパク質の合成は、ストレスから 1 時間近く経たないと観察されません。また、この lncRNA が独自の RNA 品質保証系で分解制御を受けること事もわかってきました⁽²⁾。

今回、*fbp1*⁺ 遺伝子活性化の調節に関わる mlonRNA と類似の lncRNA が、他のグルコース飢餓応答遺伝子領域でも観察されるかについて、網羅的に調べる事にしました。まず、分裂酵母にグルコース飢餓ストレスを与えてから 2 時間以内の RNA 発現応答をストランド特異的 RNA-seq により解析し、ストレス直後から 2 時間後までに、大きな発現変動を見せる遺伝子を階層的クラスタリングによって解析してみました。なお、この研究は東大柏の菅野教授・鈴木教授との共同研究で実施し、解析ツール開発およびビッグデータ解析は東大生産研の平田准教授と共同で行いました。

まず、得られたデータについて、通常のクラスタリング解析を行ったところ、ストレス応答初期に見られる翻訳抑制に対応して翻訳系遺伝子群が抑制されること、代謝系遺伝子群が応答中期から後期にかけて誘導されることなどが明らかになりました。これらの遺伝子については、ヒストン H3 抗体を用いた ChIP-seq の結果から、その多くが転写開始点付近でストレス応答時にクロマチン構造の変化を伴うことが確認できました。

上記の遺伝子領域だけでなく、非コード DNA 領域の転写にも注目して解析を行いました。その結果、数百種類の非コード RNA が、グルコース飢餓に応答して転写制御を受けていることがわかりました（図 1）。さらに、様々なストレス応答に反応して遺伝子発現に関わる ATF/CREB 型転写因子 Atf1 の役割にも着目しました。Atf1 の欠損変異体を用いて同様の RNA-seq を実施したところ、観察された非コード RNA の 1/3 以上が、多くのストレス応答性遺伝子と同じように Atf1

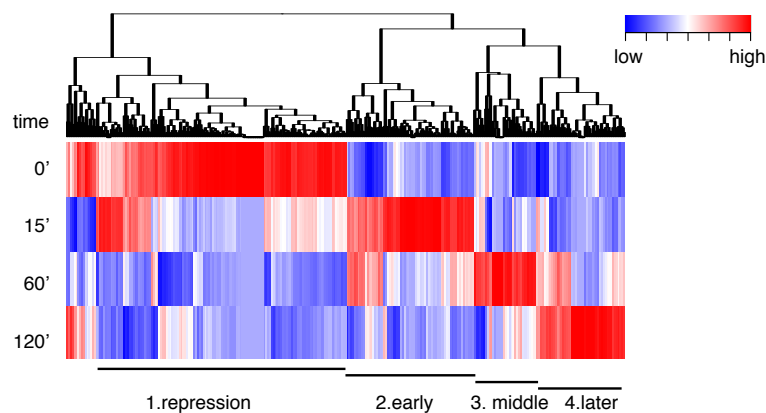


図 1 様々なタイミングで発現するグルコース飢餓応答性非コード RNA

Dynamic transition of transcription and chromatin landscape during fission yeast adaptation to glucose starvation.
Arisa Oda, Naomichi Takemata, Yoshito Hirata, Tomoichiro Miyoshi, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, and Kunihiro Ohta
Genes Cells. 20: 392-407 (2015)



依存性を示し、ストレス応答性の非コード RNA 転写が単なる転写ノイズでなく、ストレス応答において重要な制御的役割を果たす可能性が示唆されました。

そして、本研究の目的である *fbp1*⁺ mlonRNA と類似の lncRNA 探索を行いました。このような lncRNA を探索する情報解析ツールというのは存在していませんでしたので、平田准教授と協力して、一からツール開発を行いました。それまではあまりコンピューターをいじったりしたことがなかったのではじめはなかなか大変でしたが、いろいろな方に協力して頂いてプログラミングも学び、新しいツールの開発も行うことができました。自分の研究スキルを広げる経験ができたことは、その後の研究にも大いに役立っています。

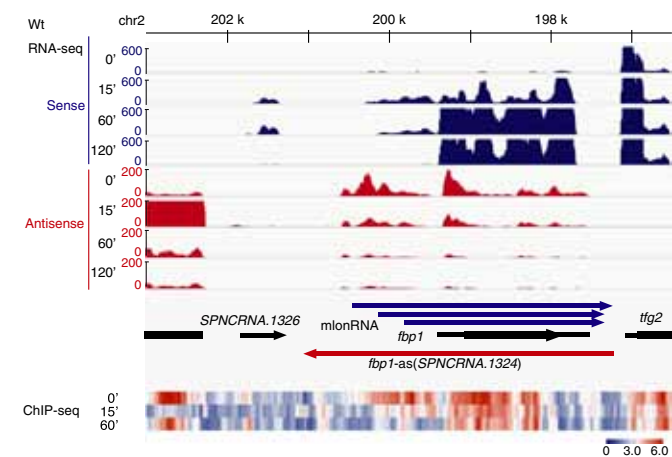
mlonRNA はプロモーターから ORF までをカバーする領域で転写される lncRNA ですので、プロモーター付近での転写物の時系列データに着目し lncRNA の探索を行いました。まず、プロモーター領域の非コード RNA の時系列データの波形パターンを統計的に解析するツールを作成し、このツールを用いて *fbp1*⁺ lncRNA と同じ性質を有する 9 つの lncRNA 候補領域を同定しました。これらが本当に連続した lncRNA であるかが不明でしたので、ノザン解析等により、多くの候補領域が実際に連続的な lncRNA を合成することを示しました。またこれらの lncRNA の転写が mlonRNA と同様に Atf1 依存性を示すこと、グルコース飢餓時に局所的なクロマチン構造変化を伴うこともわかりました。おそらく、これらのグルコース飢餓応答性遺伝子も mlonRNA タイプの lncRNA による類似の遺伝子発現制御機構の支配下にあると考えられます。

さて、今回の研究を行っている際に、予想外のデータに直面することになりました。今回ストランド特異的な RNA-seq を行ったのですが、*fbp1*⁺ を含め、上記の lncRNA 候補領域のいずれにおいても、グルコース飢餓時に発現変動するアンチセンス lncRNA の転写が確認できました。このうち 5 カ所については、グルコース飢餓時にセンス鎖 RNA の合成量が増えると、逆にアンチセンス RNA の発現量が減少する現象が見られました（図 2）。つまり、センス RNA とアンチセンス RNA の発現に逆相関が認められました。この結果は、センスとアンチセンス RNA の間に何らかの相反的な制御ネットワークの存在を予期させます。

現在、アンチセンス lncRNA (*fbp1-as*) に注目し、その機能を調べており、近々第 2 の論文にまとめる予定です。特に、センス・アンチセンス lncRNA が統合的な遺伝子発現制御ネットワークを形成し、これら遺伝子に独特なストレス応答のキネティクスを生じさせていることがわかりつつあります。現在それを数理モデルや 1 細胞レベルの解析で検証しています。

参考文献

1. Hirota et al., 2008, **nature**
2. Galipon et al., 2013, **Genes Cells**

図 2 グルコース飢餓応答時の *fbp1*⁺ 領域に見られる mlonRNA 及び *fbp1-as* (RNA-seq) とヒストン H3 密度の変化 (ChIP-seq)

研究成果の紹介

肝内胆管癌の全ゲノムシーケンスにより明らかになった塩基置換のパターンとドライバー遺伝子

藤本 明洋
理化学研究所
統合生命医科学研究センター



Whole-genome mutational landscape of liver cancers displaying biliary phenotype reveals hepatitis impact and molecular diversity
Akihiro Fujimoto, Mayuko Furuta, Yuichi Shiraishi, Kunihito Gotoh, Yoshiiku Kawakami, Koji Arihiro, Toru Nakamura, Masaki Ueno, Shun-ichi Arizumi, Ha Hai Nguyen, et al.
Nat Commun. 6: 6120 (2015)



私たちは、肝内胆管癌の全ゲノムシーケンスを行い、肝炎が塩基置換パターンに影響しうることと、ドライバー遺伝子の候補を報告しました。本稿では、がんゲノム研究の最近のトピックを紹介させて頂き、次に私たちの研究について紹介し、最後に若干の（おそらく良くある）苦労話と今後の課題について述べさせていただきます。

まず、最初に、最近のがんゲノム研究について、簡単にまとめたいと思います。がんは、ゲノムの突然変異が原因であると考えられ、全ゲノムシーケンスによる網羅的な変異検出は、発がんのメカニズムを解明するためにきわめて重要であると考えられています。超並列シーケンサー（いわゆる次世代シーケンサー）の登場により、全ゲノムシーケンスが可能になりました。現在、アメリカを中心としたがんゲノムアトラス計画（TCGA; The Cancer Genome Atlas）や国際がんゲノムコンソーシアム（ICGC; International Cancer Genome Consortium）などに代表される大型プロジェクトが進行しています。日本では、理研と国立がん研究センターがICGCに参加し、共同で肝臓がんの解析を行っています⁽¹⁾。

これらの研究で、多くの発見がありました。主なトピックは、ドライバー遺伝子の発見と点突然変異の塩基置換パターンの発見だと思います。ドライバー遺伝子とは、発がんに影響する遺伝子のこと、主に変異しているサンプルの頻度を統計的に解析して検出されます。最近の研究により、多くのドライバー遺伝子が検出されています。ドライバー遺伝子の機能は多岐に渡っており、様々なシグナル伝達系、DNAメチル化、ヒストン修飾、クロマチン制御、転写因子、スプライシング因子、代謝、テロメア安定化、細胞周期やアポトーシスに関連する遺伝子が報告されています⁽²⁾。また、非コード領域においても *TERT* 遺伝子のプロモーターが複数のがん種において高い頻度で変異していることが報告されており⁽³⁾、極めて重要なドライバー変異であると考えられています。

点突然変異の塩基置換パターンもがん種によって特徴があることが知られています。例えば、メラノーマでは C:G>T:A 変異が多く、紫外線により生じる DNA 傷害で多くの変異が生じると考えられています。最近の大規模研究により、いくつかの癌種に特徴的な変異パターンが検出されています⁽⁴⁾。臨床情報との比較により、年齢、紫外線に加えて化学物質（アルストロキア酸やアフラトキシン）、APOBEC などのシチジン脱アミノ化酵素による変異の導入、特定のポリメラーゼの変異が置換パターンと関連することが報告されています^(4,5)。さらに、がんの変異率が replication timing やクロマ

チンの構造と関連することも報告されています⁽⁶⁾。

肝臓癌は、世界の癌死の第3位に挙げられる予後不良の癌で、原発性肝癌の約90%を占める肝細胞癌と肝内胆管癌に大別されます。これまでに、我々の研究も含め、国内外より数々の肝細胞癌のエクソーム研究や全ゲノム研究が発表されています⁽⁷⁻⁹⁾。これらの研究により、肝細胞癌の発症に寄与する遺伝子変異が多数同定されてきました。しかし、肝内胆管癌の全ゲノムシーケンスの報告はありませんでした。

30 症例の全ゲノムシーケンスの解析の結果、平均約4300個の点突然変異が検出されました。また、非常に多くの変異が検出された症例がありました（約18万個）。この症例にはミスマッチ修復遺伝子である *MLH1* の欠失と *MSH2* 上のミスセンス変異が検出されており、ミスマッチ修復機構の異常が変異数の増加を引き起こしていると考えられました。

突然変異の置換パターンを比較した結果、肝細胞癌と類似していましたが、C:G>T:A の頻度に有意な違いが見られました（図1(a)(b)）。そこで、置換パターンをサンプルごとに比較するために、公開されている全ゲノムシーケンスのデータと合わせて主成分分析（PCA）を行ったところ、肝炎がある肝癌は PCA プロット上で一部に固まりましたが（置換パターンの類似性が高いことを示しています）、肝炎がない肝癌は、散らばりが大きく、症例間で置換パターンが類似していないことが分かりました。（図1(c)）。このことは、肝炎が置換パターンに強い影響を与えることを示唆していると考えられました。

ドライバー遺伝子についても、新しい知見を得ました。変異している遺伝子を調査した結果、*KRAS* 遺伝子、*IDH* 遺伝子や *BAP1* 遺伝子が5%以上の症例で変異していました。また、*TERT* 遺伝子のプロモーターも高い頻度で変異していました。肝内胆管癌と肝細胞癌で変異頻度を比較した結果、*KRAS* 遺伝子や *IDH* 遺伝子、*TERT* プロモーター変異の頻度が有意に異なっていました。また、今回の解析で、新規ドライバー遺伝子候補として *PCLO* 遺伝子が同定されました。さらに、ミスセンス変異や挿入・欠失変異、構造異常が存在する遺伝子の機能的偏りを解析した結果、細胞骨格やシナプス成長因子をコードする遺伝子に有意に多く、これら遺伝子の機能低下が発がんに影響することが示唆されました。

臨床情報と遺伝子変異について統計解析を行ったところ、*IDH* 遺伝子変異は予後に影響すること（図2）、*ARID2* 遺伝子の変異はリンパ節転移に関連していることが示唆されました。

以上の解析より、肝内胆管癌の置換パターンは、炎症に影響されること、ドライバー遺伝子の頻度が肝細胞癌と異なることが明らかとなりました。

この研究は最初に15症例で解析を行い、Nature Genetics 誌に投稿したのですが、症例数が少なく結論がはっきりしていないとの理由でリジェクトされました。そこで、さらに15症例を加えて Nature Genetics 誌に再投稿したのですが、その間に肝内胆管癌のエクソーム解析の論文が2報出てしまい^(10,11)、再度リジェクトされ、その後 Nature Communications 誌に投稿し掲載されました。最初から強い結論が出せる症例数で論文をまとめていれば良かったのですが、他のグループに先を越されまいと急いだことが仇となりました。論文を書き、図を作り、シーケンスデータをデータベースに登録して、投稿して審査結果を待つと数ヶ月経ちます。また、データを足すと、解析が全てやり直しになりますので、長い時間と労力を失うことになります。急がずにきちんとした結論を得てから論文を投稿していれば、より良い結果になったのではないかと思います。今回の研究では、以上のようなごく当然の（でも焦ると忘れがちな）教訓を得ました。

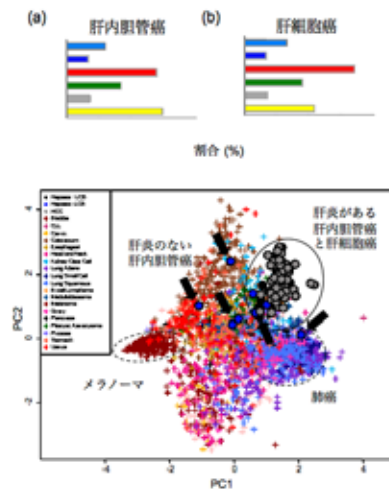


図1 (a) 肝内胆管癌の塩基置換パターン。(b) 肝細胞癌の塩基置換パターン。(c) 塩基置換パターンの主成分分析。メラノーマや肺癌のように特定の変異源に強く影響される癌種は、塩基置換パターンがサンプル間で良く似ていて、一部に固まっています。肝炎がある肝内胆管癌と肝細胞癌もクラスターしていたことから、肝炎が置換パターンに強く影響するのではないかと考えました。

がんゲノム解析の分野は、進展が非常に早いですが、まだ解決すべき問題が山積しています。例えば、癌種ごとに置換パターンは異なっていますが、その違いを生じるメカニズムはよく分かっていません。また、非コード領域の役割は、*TERT* 遺伝子のプロモーターなどの少数の例を除き、ほとんど解明されていません。さらに、情報解析によってドライバー遺伝子候補が多数検出されていますが、遺伝子機能や変異についての実験的検証は極めて不十分であると考えられます。さらに、得られた知見をがんの治療や早期発見に活かすためには、さらなる研究（主に機能解析）が重要になります。これらの課題を解決するためには、より深い情報解析と機能解析を行うことに加え、様々な分野の研究者の参入が必要であると考えられます。

参考文献

1. Hudson, T.J. et al. *Nature* 464, 993–8 (2010).
2. Garraway L.A. & Lander E.S. *Cell* 153, 17–37 (2013).
3. Huang, F.W. et al. *Science* 339, 957–9 (2013).
4. Alexandrov, L. et al. *Nature* 500, 415–21 (2013).
5. Hoang, M. L. et al. *Sci. Transl. Med.* 5, 197ra102 (2013).
6. Polak, P. et al. *Nature* 518, 360–4 (2015).
7. Totoki, Y. et al. *Nat Genet* 43, 464–9 (2011).
8. Fujimoto, A., Totoki Y. et al. *Nat Genet* 44, 760–4 (2012).
9. Guichard, C. et al. *Nat Genet* 44, 694–8 (2012).
10. Chan-On, W. et al. *Nat. Genet.* 45, 1474–8 (2013).
11. Jiao, Y. et al. *Nat. Genet.* 45, 1470–3 (2013).

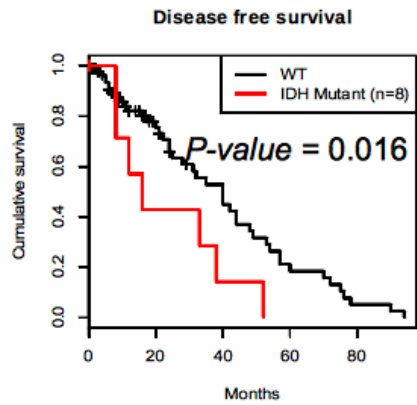


図2 *IDH* 遺伝子の変異と予後 *IDH1*, *IDH2* 遺伝子のホットスポット変異 (*IDH1* (codon 132), *IDH2* (codon 172)) は予後と関連していました。

高校生向け公開講座 「ゲノムの調べ」開催を終えて

有吉 眞理子
京都大学工学研究科



2014年2月8日（日）、横浜情報文化センターにおいて、本新学術研究領域主催による高校生向け公開講座「ゲノムの調べ」が開催されました。「非コードDNA」領域立ち上げ当初から小林代表が温めてきた“ゲノムの中に繰り返し現れる謎のDNA配列を音楽になぞえながら、生物の遺伝と進化のシステムを考えよう”という企画がついに実現の運びとなりました。グラランドピアノがある適当な規模の会場探しという難題をなんとかクリアし、下記のプログラム構成で開催にこぎつけました。第一部として、小林さんの進行、正井さんのピアノ演奏によるサイエンス・音楽エンターテインメント「ゲノムの調べ」、後半の第2部では、本領域を代表して、古賀さん、加納さんにご講演いただき、最後に質問コーナーの時間を設けました。広報活動の不手際で事前参加登録が思ったように集まらず、いささか少人数の会（50人程度；一般19名、大学生1名、高校生&先生9名、中学生3名、プラス関係者）となってしまいましたが、本格的なピアノ演奏とサイエンストークが融合した充実の内容で、高校生・一般参加者の皆さまにも満足していただ

けたようでした。ここでは、開催報告も兼ねて、今回の公開講座の内容をふりかえってみたいと思います。

講演プログラム

ゲノムの調べ

進行：小林武彦（遺伝研）

ピアノ演奏：

正井久雄（京都医学総合研究所）

講演 1

ヒトのゲノム、類人猿のゲノム

古賀章彦（京大・霊長類研究所）

講演 2

テロメアの神秘

加納純子（阪大・蛋白質研究所）

質問コーナー

*担当：小林武彦

有吉眞理子（京大）

須賀則之（明星大）

2月の日曜日、冷たい雨の中、（おそらく来場者が少ないことを心配して）駆けつけてくれた領域計画班メンバーと加納研のBZ（ボスざる）さまが見守る中、分子生物学会のモーツァルト

こと、正井さんが奏でる軽やかなピアノの音色で「ゲノムの調べ」第一部の幕が開きました。「本日は、初の試みとして無機質なゲノム配列を音で置き換えて音楽にしてみましょう。ゲノム配列を我々が聞いて心地よい規則、つまりコード進行に置き換えて、あるいはイメージを曲に変えてゲノム、遺伝情報を感性で捉えてみましょう。」という司会・小林さんから「ゲノムの調べ」という試みの主旨が説明され、開始早々、「染色体は遺伝子の乗り物、船のようなもの」というちょっと強引な流れから、♪ I am sailing, I am sailing, home again 'cross the sea ~ ♪、とスポットライトを浴びた小林さんによる“Sailing（Rod Stewart, 1972年）”の熱唱。その後、小林さんの軽妙なトーク・解説を挟みながら、名曲アレンジ、オリジナル曲織り交ぜての正井さんの演奏によって、セントロメア、テロメア、トリプレットリピート、エキソン・イントロンなどなど、「非コードDNA研究」のエッセンスが表現されていきました（当日のピアノ演奏プログラムを参照ください）。開場前、「ゲノムを音楽で表すって、どうということ？想像つかない…できるのか

な？」と話しながら、半信半疑で会場に入っていった女子校生3人組も時々ノートをとりながら熱心に聴き入っていたのが印象的でした。リハーサル通り、予定時間を超過しての約45分間でしたが、ピアノとトークの絶妙な掛け合いであっという間に感じられました。完成度の高いパフォーマンスに拍手喝采で第一部、終了。

休憩を挟んで、熱帯でのフィールドワークから戻られたばかりという古賀さんが、“お猿のかごや”のピアノの調べにのって壇上へ。独特の語り口で、ヒトとお猿のゲノム、進化について講演される様子は、まさにゲノムの語り部。ヒトにいちばん近いといわれるチンパンジー、そのチンパンジーの染色体にあるヘテロクロマチンのかたまりがヒトでは消失している、その理由は何か？この謎に迫る仮説を楽しく語っていただきました。続いて、ショパン「バラード」第1番ト短調（注：日本が誇るフィギュアスケーター羽生結弦選手の2013-2014シリーズ・ショートプログラム使用曲である。）の調べに乗って、加納さんが壇上にふわりと舞い降り、不老不死の科学として一般の方も耳にした

ことがあるであろう「テロメアについて解説されました。実際の最新実験データも交えて、テロメア研究の最先端を紹介していただきました。会場の高校生の様子はというと、このような公開講座に興味を持って参加するだけあって、専門的な内容でも興味を持って耳をかたむけてくれている様子でした。

うなっているのですか？」など、内容を理解した質問が複数ありました。講演者、そして、本領域計画班・太田さんによる的確な回答、解説で質問者にも納得いただいたところで、無事、「ゲノムの調べ」閉幕となりました。個人的に寄せられた参加者からの感想は概ね高評価で、特にゲノムを音楽で表現するという試みが斬新でおもしろい、今回だけで終わらせるのはもったいないのでは、と再演を望む声もありました。

“ゲノムの調べ”担当者として、最後に一言。事前の宣伝活動の段取りが悪く、もっと多くの高校生にきいてほしかったと、反省すべき点も多くありましたが、班員の皆様のご協力のもと無事開催することができました。この場を借りて、高校生向けの講演という難題を引き受けていただいた古賀さん、加納さん、そして、素晴らしいピアノ演奏を披露していただいた正井さんに感謝の意を表します。当日、駆けつけてくれた計画班の皆様、そして、ボスざるさま、ありがとうございました。

最後の質問コーナーでは、「挿し木や挿し芽で増える植物のテロメアってど



2015 年夏、 ゴードン会議に行ってきます

非コード領域には第 1 期から公募班員として参加させてもらっている。バクテリアのコンデンシン MukB タンパク質による染色体 DNA の凝縮機構を研究している。MukB はいわゆる SMC タンパクの仲間で、真核細胞型のコンデンシンやコヒーシンと同様にリング状のダイマーを形成する。バクテリア染色体が凝縮し核様体構造を形成には MukB コンデンシンが欠かせないが、どの部位にどのように結合して機能しているのかわかっていない。公募研究では MukB による凝縮の足場となる染色体部位としてリボゾーム遺伝子などの非コード領域が利用されていることを明らかにしようとしている。しかし、MukB の DNA への結合様式といった基本的なことも不明であり、この点を明らかにするため DNA 結合の生化学的な研究で進めてきた。どうも MukB コンデンシンもコヒーシンと同様に抱え込むように DNA を保持していることがわかってきた。この成果については論文にまとめている最中なので、その代わりとしてエッセイを書かせてもらうことにした。

研究成果をまとめる際に、関連分野の研究者らと議論することは有益である。そして、そのような場として国際会議での発表はさまざまコメントもらえ役立つのだが、リスクもある。競争の激しい分野ではないにもかかわらず、知らず知らずのうちに同じ研究を行っているようなことは、どんな研究分野であっても珍しいことではない。競争相手になってしまっているのに有用な情報を与えてしまうことになりかねない。特に欧米の研究者が相手の場合には英語が得意なだけに論文発表で出し抜かれてしまったということをよく聞く。なので、国際会議では発表するときには投稿原稿まで書き上げておくか、理想としては投稿してからにしろなさいということをお大学院

時代にとある教員からの忠告してもらった。至極もったもであるが、なかなか実践できるものではない。ただ、1997 年のゴードン会議（Gordon research conference）、Plasmid & Chromosome dynamics の際には、忠実にその言葉を守って参加した。7 月の会議に先立ち、6 月には発表内容を投稿した。出発の 1 0 日ほど前に審査コメントが送られてき、すぐさま追加のデータを出して出発の前にはリバイスをアメリカ・ボストンの編集局に送り返し、私自身もゴードン会議参加するためアメリカに向かった。

ゴードン会議というのは毎年夏にアメリカ東部ニューハンプシャー州郊外の大学を会場に、分野の研究者を一堂に集めた複数の分科研究会の総称である（写真 1）。6 月から 8 月にかけて毎週日曜日にはボストンのローガン国際空港から、参加者を各会場に運ぶチャーターバスが出発している。夏休みの学生のない大学の寄宿舎で参加者は一週間ほど寝食を共にする（写真 2）。密な付き合いをへてお互いに刺激し合おうという会議である。未発表のデータの公開を推奨し要旨集も作らない。参加者が見聞録などで会議の内容を公開することも禁止されている。会議期間中は午前中に講演、午後は自由時間、夕方にポスター発表、夕食後にまた講演というのが基本である。その後は夜遅くまで飲みながらのソーシャルアワーである。オーガナイザーの役目はこの飲み代を集めてくれることと言われ、よいオーガナーザーだと無料でビールなどがサービスされる。期間は長いがゆったりしてスケジュールである。過密スケジュールの CSH meeting とは全く逆のタイプの国際会議である。ただし、もっと講演を詰め込もうというオーガナイザーもいるようで、午後の休みを潰してセッションを入れようと企画するのである。が、ゴードン会

議の組織側はこれを公式には決して認めない。プロジェクターなどの貸し出しもしてくれない。ゴードン会議のホームページの案内にも載せてくれない。会場だけをなんとか借りて、持参してきたプロジェクターでゲリラ的に行った年もあった。とにかく、午後の自由時間を研究者の交流にと開催組織は重要視しているらしい。確かに、分野の大御所らがこぞって参加するため、学生やポスドクなどの若い研究者が彼等と知り合えるよい機会となっている。

1997 年の 7 月 13-18 日にかけて Plasmid & Chromosome dynamics ゴードン会議が開催された。この会議は Chromosome dynamics ゴードン会議と名前を代えて続いており、2015 年も開催される。この年の会議は私の初めての参加であった。もう 3 7 歳になっていたが、それまで海外の国際会議には 2 回ほどしか参加したことがなかった。参加者は論文でしか知らない研究者たちばかりであった。この時、私はポスターで発表であった。内容は、F プラスミドが大腸菌の細胞分裂を通じて分配されていく過程を FISH 法を使って観察したというものであった。大腸菌細胞内のプラスミド DNA の位置を蛍光 DNA で検出することにより、細胞に中央に位置していた一個の蛍光輝点が細胞分裂直前には 2 つの蛍光輝点に分離し、それぞれが細胞長の 1/4 と 3/4 の位置に移動しそのまま分裂を迎えるということを観察していた。その結果として新生細胞では細胞の真ん中に再び位置していることを示したものであった。この成果をまとめて、直前に投稿までしてきたのである。

この年の 3 月ハーバード大のグループが LacI-GFP、lacOP 系でバクテリア染色体の複製起点の動きを示した論文が Cell 誌に発表していた。いまで



仁木 宏典
国立遺伝学研究所

は一般的になった LacI-GFP、lacOP 系であるが、バクテリアで応用した最初の論文であった。バクテリアの蛍光細胞生物学がまさに始まった時期であった。固定した細胞とはいえ FISH 法によってバクテリア内での DNA の動きを観察することはまだ誰も成功していなかったのも、自分の研究も悪くはないと思っていた。さて、ポスターを貼りだしてからしばらくすると、自分のポスターの前に人だかりができていた。私がポスター発表者だとわかると、その中にいた白髪の紳士的な研究者が話しかけてきた。ボストンのタフツ大学の教授である AR さんであった。AR さん等は LacI-GFP と lacOP 系を使って F プラスミドの分配を観察したのだそうだ。結果はお前と同じだという。生細胞で観察したプラスミドの分配の様子を動画にし、バクテリアの細胞の中を分配されていくプラスミドを見ているというのである。FISH 法で死んだ細胞内の蛍光輝点の位置を拡大した写真に物差しを当てて測り、統計的にその細胞内の局在の位置を調べたような泥臭い方法ではないのだ。



写真 1 2005 年のゴードン会議 Chromosome Dynamics の会場である Colby-Sawyer College New London, NH。決して設備のいいとはいえない会場だが、最新の話で活気づいている。



写真 3 New London ちかくで一番高いという山、それでも標高は 800 メートルほどしかない。周りを見渡す限り森林。その中に湖は点在する。街は森に隠れてわからない。ほんとに小さな街しかない。

早く見せて欲しいと思ったが、AR さんのトークは最終日であり、会期中はどのような発表をするのかずっとやきもきしていた。最終日、F プラスミドや P1 プラスミドの細胞内での動き、さらには大腸菌の Ori と Ter の動きを初めて動画で示したプレゼンテーションには圧倒されてしまった。AR さん等もこの会議の始まる直前に論文を投稿してきたという。こんなすごい結果を先に出されてしまったら、自分の論文などは木っ端微塵になってしまうと考えると気が滅入ってしまった。どうかリバイスした論文がうまく受理されるようにと祈るばかりであった。

1997 年当時、電子メールなどは普及しておらず海外からの連絡は国際電話か Fax しかなかった。ニューハンプシャー州の片田舎からでは、日本からの連絡もままならなかった頃である（写真 3）。最終日の夕食はロブスターというのがゴードン会議のお決まりである（写真 4）。しかし、帰国してみると一通の Fax が編集局から届いており、なんと私

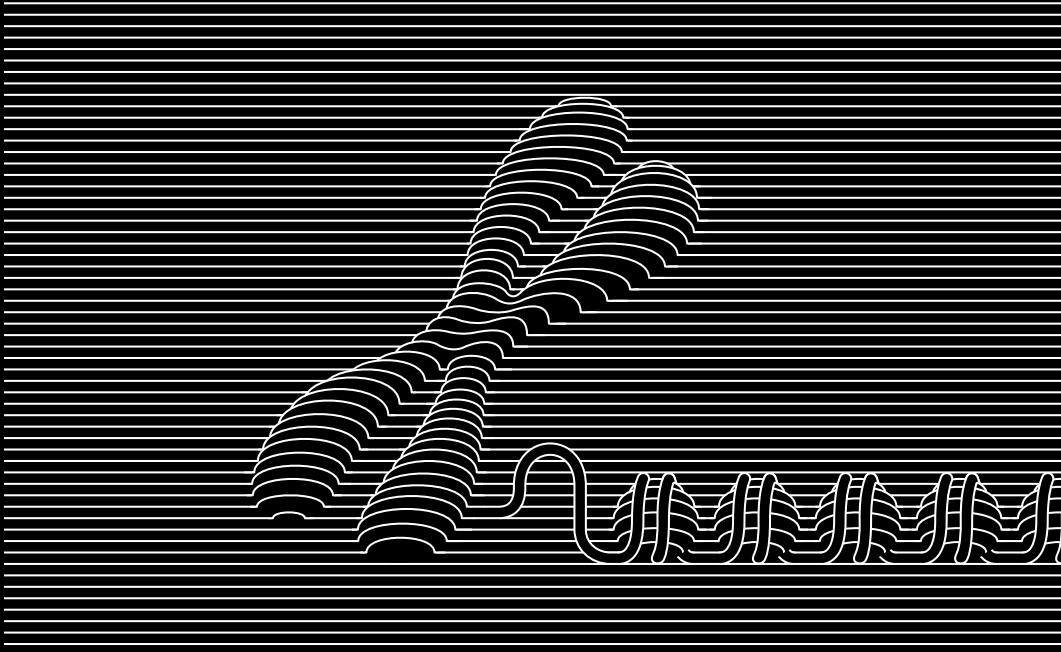
の投稿した論文は 7 月 11 日付で受理になっていた。会議の開催前にこちらの方は決着していたのだった。そして晴れて出版された論文には Received 12 June 1997, Revised 11 July 1997 と記録されている。そして、タフツ大学らのグループの論文は同じ雑誌に 1 号遅れて掲載された。その論文の日付をみると Received July 14, 1997; revised August 6, 1997 であり、ゴードン会議の始まる前に投稿していた。もし、この二つの投稿の順番が逆であったら、彼等の論文が受理されてから私の論文を送っていたらどうなっていたのかなんてことは考えるだけでまたまた気が滅入りそうだ。このときは教えを律儀に守ったことが功を奏したのである。ただ、これを教訓にしてこの教えをずっと守ってきたかとかというそうでもない、残念なヒトだ。しかし、今年のゴードン会議に参加するにあたっては、きちんと論文原稿を書いてから行こうと決意しているのだが。



写真 2 Colby-Sawyer College New London, NH の寄宿舎。学生のない夏休みを利用して研究会を開いている。寄宿舎なのでバス、トイレが共同だったりすることもある。ただ、あまりに設備が悪いと参加者が会場を代えるというので、長く使われているところはそれなりに設備はいい。



写真 4 巨大なザリガニという人もいるが、食べ応えは充分ある。醤油は、味ポンはないのかというのが日本人の常套句。最近はこの田舎の大学の食堂にまで soy sauce があつたりする。



**International Symposium on
Non-coding DNA and
Chromosomal Integrity**

toward the finding of Intermeres

August 7-8, 2015
Awaji Yumebutai International Conference Center
Awaji, Japan

Invited Speakers
Wolfgang Fischle (Max Planck Institute)
Thomas W. Glover (Univ. Michigan)
Hironori Funabiki (Rockefeller Univ.)
Olivier Cuvier (CNRS, Toulouse)
Miguel G. Ferreira (IGC, Portugal)
Hiroshi Kimura (Tokyo Tech.)
Tatsuo Fukagawa (Osaka Univ.)
Takehiko Kobayashi (Univ. Tokyo)

Organizers
Jun-ichi Nakayama (Nagoya City Univ.)
Junko Kanoh (Osaka Univ.)
Minoru Takata (Kyoto Univ.)

For registration
<http://www.nsc.nagoya-cu.ac.jp/~jnakayam/ncDNA.html>

Supported by
Grants-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas "Functions of Non-coding DNA Region for Genome Integrity" by the MEXT of Japan

国際シンポジウム「Non-coding DNA and Chromosomal Integrity」ポスター

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

2015 年	8 月 5 ～ 7 日	第 9 回領域会議（担当：中山）
	8 月 7, 8 日	国際シンポジウム「Non-coding DNA and Chromosomal Integrity」（担当：中山・高田・加納）
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） 第 10 回領域会議（担当：小林）

（実施月は目安）

ncDNA
NEWS LETTER

「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）

VOL. 8 2015 June

編集後記

今回も何とかニュースレターをまとめることができました。忙しい中、原稿を執筆してくれた領域関係者の皆様に感謝したいと思います。小林代表の巻頭言にもあるように、本領域は残り 1 年を切りました。時が経つのは実に早いものです。残りの期間で領域の集大成となるような成果を挙げて、本領域の活動を次の「何か」につなげられたら素晴らしいと思います。非コード DNA に隠された機能はまだまだたくさんあると思われます。本領域では染色体の機能に焦点を絞っていますが、たとえば個体の多様性、病気のリスク、寿命、オーダーメイド医療など、さまざまな分野で非コード DNA の重要性が明らかにされつつあります。今後は非コード DNA をキーワードに、分野横断型の研究が必要になってくるかもしれません。

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 8 号

2015 年 6 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.nsc.nagoya-cu.ac.jp/~jnakayam/ncDNA.html>