

# 9

# 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）

2016  
January





## contents

巻頭言	2
研究成果の紹介	
□ CENP-CとCENP-IIはキネトコアとCENP-A集合を結びつける要となる因子である	4
□ 新規ヒストンシャペロンGRWD1によるpre-RC形成促進	6
□ セントロメア反復配列の高次構造はヒトに近い種に限定されるものではない	8
□ セントロメア蛋白質シュゴシンがサブテロメアの特殊なクロマチン状態を規定する	10
□ コヒーシンによって構築される染色体構造が減数分裂前期相同染色体の対合に必要	12
□ ゲノムワイド関連解析による抗がん剤の奏効性予測因子の探索	14
□ 非コードDNAの機能を規定する因子としてのグアニン4重鎖構造	16
コラム	
□ 「君」vs. 「さん」vs. 「先生」	20
アーカイブ	
□ ニュースレター表紙集	22
編集後記	23

## 巻頭言

# 最後の巻頭言

この巻頭言も9回目を迎え今回が最後となります。5年間本領域をご支援いただきまして誠にありがとうございました。

来年度の成果取りまとめ研究費が採択になりますとニュースレターの総集編（DVD付き）を発行する予定です。総集編ではこれまでの研究成果をまとめた「成果集」とDVDには2014年2月に横浜で開催し好評を博した市民公開講演会「ゲノムの調べ」のコンサート部分を中心に収録いたします。「ゲノムの調べ」ではDNAの塩基配列を音符に置き換え、テロメア配列の繰り返しやヒストン遺伝子の保存性などを「音楽（感性）で捉える」初の試みです。正井久雄班員（東京都医学総合研究研）が素晴らしいピアノ演奏を披露しています。必見です。

## 3つの大きな発見

さて当領域のまとめとしては、おかげさまで当初の計画通り運営、実行することができました。研究成果の本格的なとりまとめはこれからですが、班員の多くが参画した共同研究プロジェクトでは3つの大きな発見がありました。1つは前号でお知らせした分裂酵母野生株38株の配列を決定し、その比較により新しいインターメア（非コード機能配列）候補を見つけたこと。中には非常にユニークな繰り返し配列なども見つかり今後の解析が楽しみです。2つ目はインターメア間でのクロマチン構造の共通法則の発見です。異なるインターメアの連携の実態、染色体全体として制御機構が明らかになってきました。そして3つ目。これは今後新分野に発展する可能性を秘めています。というのは、どうやら非コードDNA領域には未知の機能、つまり進化を牽引し新機能を獲得する能力があるようです。これは非コードDNA領域の新しい概念の発見ということになります。

## 非コード領域が進化を引っ張る

3つ目の発見に関してですが、具体例を1つ紹介いたします。古賀班員（京大霊長研）を中心に展開しているプロジェクトで、真猿類（ニホンザル、オランウータン、ヒトなど）の視覚に関する研究です。真猿類はほとん

ど昼行性（昼に行動して夜は眠る）ですが、唯一ヨザル（夜猿）という南米に生息するサルは夜行性です。近縁種は全て昼行性なので、比較的最近夜目が利くように進化したと予想されます。それで目の網膜にある視細胞を調べてみると、興味深いことに集光に働くレンズ用の構造が細胞核の中心に存在しています。そしてこのレンズは非コードDNA領域が変化してきた特殊なクロマチン構造からできているようです。まさに機能をもった非コードDNA「インターメア」ですね。

## 人類はこれからどこへ行くのか

非コードDNA領域が進化の牽引役となった理由は、その可塑性にあると考えられます。エンハンサーの位置、イントロンの大きさなども非コードDNA領域の持つ可塑性により容易に変化します。例えばレトロトランスポソンの増幅などがそれらを引き起こします。ヒトの非コードDNAに存在する膨大なレトロトランスポソンの残骸量からすれば、もしそれが進化の原動力として働いてきたとすると、例えばサルからヒトへの劇的な進化なども案外簡単に説明できるかもしれません。

加えてもっと重要なことは、この非コードDNAの変化の法則を捉えることができるかどうかです。特に霊長類での研究は、我々人類が今後どのような方向に進化していくのかを予想する新たな研究分野に発展すると期待しています。今後急激な環境の変化や天変地異が起こらない限り、かなり正確で論理的な人類の進化予想が可能になると考えています。宇宙の果てを探る天文学にも匹敵するロマン溢れる分野になるといいですね。

## 非コードDNAはまだ神秘的宝庫です

今年をもって当領域は終了しますが、もちろん非コードDNA領域の研究はまだはじまったばかりです。現班員の努力により上で紹介した3つ以外にもたくさんの発見がありましたが（次号で紹介しますが）、これはまだ入り口にすぎないという

感触を持っています。上の可塑性の研究もこれからですし、非コード機能配列「インターメア」のさらなる探索、それらの機能解析に核内の挙動など、まだまだ課題は山積みです。また焦点を絞るために本領域はあえて非コードRNAの研究と距離を置いてきましたが、もちろん非コードRNAも非コードDNA領域の持つ最重要要素の1つです。今後は従来の局所的な転写抑制に働く非コードRNAに加えて染色体全体の制御に関わるような非コードRNAの解析も必要です。

かつてはゴミ（ジャンク）ではないかと言われた非コードDNAですが、そこから複製開始点を始めとする多くのインターメアが見つかり、それらが連携してゲノムを維持し、さらには転写抑制に関わる小分子RNAも次々に同定されてきています。まさに非コードDNA領域はゴミからの大躍進を成し遂げています。それらの研究を進展させるのはもちろん個々の研究者の日々の努力が中心となりますが、非コードDNAの役割を「ゲノ

ムの機能」という大きな視点で捉え、連携して研究を進めていくことは、この新しい研究分野を飛躍的に発展させるためには大変有効です。

本領域は一旦終了しますが、以上のような生命科学の重要な課題に取り組むために、チームの構成は変わるとは思いますが、今後もなんらかの形で継続し、若い世代に夢を託せる研究となれば素晴らしいです。新たな組織で研究の進展をご紹介できる日を楽しみにしております。

追記：  
当領域のメンバーが中心となり、成果の一部を斬新な切り口でわかりやすく紹介した書籍が出版されました。ぜひご覧ください。

「ゲノムを司るインターメア  
--非コードDNAの新たな展開--」

小林武彦編 DojinBioscience 23、  
化学同人より2015年11月発行



領域代表  
小林 武彦  
東京大学  
分子細胞生物学研究所

研究成果の紹介

## CENP-C と CENP-I は キネトコアと CENP-A 集合を結びつける 要となる因子である

庄野 暢晃  
かずさ DNA 研究所  
細胞工学研究室  
名古屋大学大学院  
生命理学研究科



CENP-C and CENP-I are key connecting factors for kinetochore and CENP-A assembly.  
Shono N, Ohzeki JI, Otake K, Martins NM, Nagase T, Kimura H, Larionov V, Earnshaw WC, Masumoto H.  
*Journal of Cell Science* (2015) 128, 4572-4587  
doi:10.1242/jcs.180786



セントロメアは遺伝情報の安定な継承に関する染色体上の機能領域である。分裂期染色体のセントロメア領域にはキネトコアと呼ばれる構造体が形成され、微小管との相互作用により姉妹染色分体を各娘細胞へと正確に分配する。

ヒトセントロメアは、非コード DNA の  $\alpha$ -サテライト (アルフォイド) と呼ばれる巨大な繰り返し DNA 領域に形成され、ここにはセントロメア特異的なクロマチンが集合する。このセントロメアクロマチンは、ヒストン H3 バリエーションである CENP-A を含んだヌクレオソームからなり、セントロメア/キネトコアタンパク質因子群の集合の基盤となる。この CENP-A クロマチンは細胞が分裂を繰り返してもセントロメアの記憶「エピジェネティクス」として維持される。したがって、CENP-A の集合・維持機構解明は極めて重要な研究課題である。

興味深いことに、CENP-A ヌクレオソームは、通常のヒストン H3 を含むヌクレオソームとは異なり、DNA 複製時には補充されず、集合量が半減したまま分裂期に入り、分裂期が終了する G1 初期に補充されることが明らかにされている。Mis18 複合体 (Mis18  $\alpha$  / Mis18  $\beta$  / M18BP1) を含むいくつかの因子と CENP-A 特異的ヒストンシャペロンである HJURP が、この CENP-A ヌクレオソームの補充に関することが報告されている。さらに、これらの G1 初期における CENP-A の補充に関する因子に加えて、新たに補充された CENP-A の安定化に関与と考えられる MgcRacGAP やリモテリング因子 RSF1 なども報告されている。

一方、これまでに 100 を越えるセントロメア/キネトコア因子が報告されているが、それらが CENP-A 集合に対してどのように関与しているかは十分に調べられていない。私は、これまで知られている多数のセントロメア/キネトコア因子

が CENP-A 集合に関与するのか? 関与するならば、どのような経路で関与するのか? という疑問を持った (図 1)。

私の属する研究室では、これまでに、tetO 配列を含んだ合成アルフォイド DNA (alphoid<sup>tetO</sup>) を培養細胞に導入することで、CENP-A が集合し、機能的なセントロメアを獲得したヒト人工染色体 (alphoid<sup>tetO</sup>-HAC) を開発した (Nakano et al., 2008)。一方、HAC を形成しなかった導入 alphoid<sup>tetO</sup> は染色体腕の異所的部位に挿入され、この部位には CENP-A は集合していない。これらの alphoid<sup>tetO</sup>-HAC や異所的部位に tetR 融合タンパク質をテザリングすることで構成学的アプローチが可能となる。この方法の利点として、因子の機能重複や局在に縛られずに、直接の効果や相互作用をテザリングした場所で観察できることが挙げられる。これまでに、いくつかのヒストン修飾因子のテザリングを用いて、CENP-A 集合維持に関するクロマチン状態が調べられている。当研究室では、転写活性化に働くヒストン修飾は CENP-A 集合を促進するのに対し、ヘテロクロマチン化は CENP-A 集合に抑制的に働き、両者のバランスで CENP-A 集合が制御されるという重要なメカニズムを明らかにしており (Ohzeki et al., 2012)、さらに多くのヒストン修飾因子での検証も望まれる。

そこで私の研究では、先に述べた多数のセントロメア/キネトコア因子と多種のクロマチン修飾因子の tetR 融合タンパク質を作成し、テザリングによる HAC セントロメア上での CENP-A 集合の増減を調べた。この解析によって、HAC セントロメア上の CENP-A 集合を増加、減少させる因子が多数同定された。さらに、CENP-A 集合のない異所的部位へのテザリングを行い、新規に CENP-A 集合を引き起こす因子も多数同定した。最終的に、これらの解析の結果から CENP-A 集合に影響を与える因子を 4 つのクラス (クラス I ~ IV) に分類した (図 2)。

興味深いことに、KMN network と呼ばれるキネトコア構造形成の中心となる因子群 (KNL1、Mis12、NDC80 など) が異所的部位上に新規 CENP-A 集合を引き起こすクラス (クラス I) に分類された。この結果は、キネトコア形成と CENP-A 集合の結びつきを強く示唆している。そこで、さらなる解析により、この重要な経路の解明を目指した。構成学的アプローチの利点として、目的の現象 (新規 CENP-A 集合) の原因となる相互作用因子をその場所で探すことができる。クラス I 因子のテザリングにより集合する因子を調べた結果、全てのクラス I 因子で CENP-C がリクルートされた。この CENP-C のノックダウンにより KMN network 因子のテザリングによる新規 CENP-A 集合は激減した。CENP-C が KMN network の集合に関することと CENP-A 集合に関する M18BP1 と相互作用することがこれまでに報告されており、極めて整合性のある逆方向からの証明ができた。一方で、興味深いことに、CENP-I のテザリングによる新規 CENP-A 集合は CENP-C に依存しておらず、これまでに明らかになっていない経路の存在が予想された。そこで、CENP-C が M18BP1 と相互作用することから、Mis18 複合体の構成因子のリクルートを調べたところ、驚くべきことに、CENP-I も M18BP1 をリクルートすることが判明した。さらにこの知見から、CENP-I と相互作用する CENP-C のドメインのみで新規 CENP-A 集合を引き起こす新たな経路「CENP-C → CENP-I → M18BP1 →

新規 CENP-A 集合」を発見した。これまでの報告から推測されていた CENP-C の C 末ドメインと M18BP1 の直接の相互作用による CENP-A 集合経路もあわせて確認され、全長の CENP-C はこれら二つの経路で M18BP1 をリクルートすることが明らかとなった (図 3)。

最後に、天然のセントロメアでの CENP-C、CENP-I の機能を確認した。CENP-C のノックダウンは CENP-I のセントロメア局在を激減させ、CENP-I のノックダウンは CENP-C 局在には影響がなかったことから、CENP-I は CENP-C の下流因子であることが明らかとなった。CENP-I のノックダウンにより、G1 初期のセントロメアにおける M18BP1 集合と CENP-A の補充が有意に減少したため、CENP-C だけでは本来の CENP-A 集合が十分には起こらないことが明らかとなった (CENP-C のノックダウンは両因子の局在がなくなるため激減)。これらのことから、CENP-C による直接的 M18BP1 リクルートと平行して、CENP-I は CENP-C の下流で M18BP1 集合を補強していることが明らかとなった。

本研究により、CENP-C と CENP-I はセントロメアの「機能」に必要なキネトコア形成とセントロメアの維持/記憶に必要な CENP-A クロマチンの集合 (「エピジェネティクス」) を結びつける要となる因子であることが示された (図 3)。

	HAC	異所的部位	異所的部位+CA発現	因子
クラスI	増加	新規集合あり	新規集合あり	CENP-C、CENP-I、KMN network 因子など
クラスII	増加	新規集合無し	新規集合無し	CENP-B、CENP-N、MgcRacGAP など
クラスIII	混	新規集合無し	新規集合あり	SSRP1、RSF1、ヒストンアセチル化酵素など
クラスIV	減少	新規集合無し	新規集合無し	ヒストンメチル化酵素、ヒストン脱アセチル化酵素

図 2 CENP-A 集合の増減、新規 CENP-A 集合の有無により各因子のクラス分けを行った。(CA は CENP-A の過剰発現と組み合わせた。)

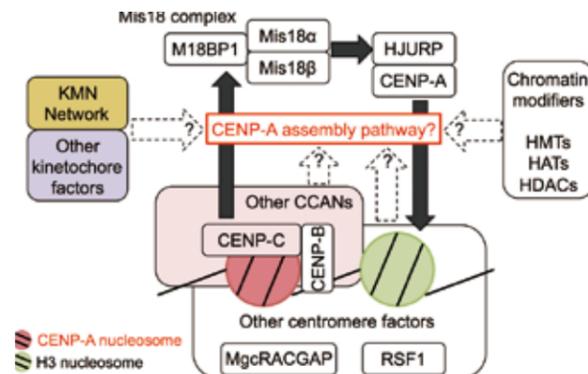


図 1 本研究の主旨: セントロメア/キネトコアに局在する多数の因子は CENP-A 集合に関与するか?

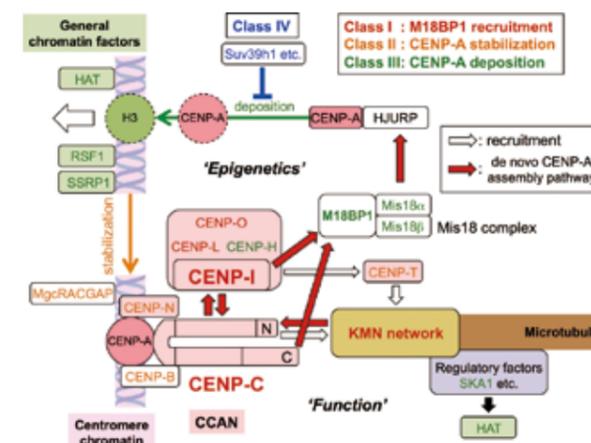


図 3 赤い矢印は本研究で示された新規 CENP-A 集合経路である。

## 研究成果の紹介

## 新規ヒストンシャペロン GRWD1 による pre-RC 形成促進

杉本 のぞみ

九州大学大学院薬学研究院  
医薬細胞生化学分野

真核生物の DNA 複製開始領域には、複製開始に必要な複製前複合体 (pre-RC; pre-replication complex) が形成されます。これは、ORC 複合体を足場として CDC6 や Cdt1 が結合し、次いでこれらがヘリカーゼ活性のコアとなる MCM2-7 をロードすることで形成されます。細胞は S/G2/M 期には再複製を抑制するため、様々な方法で MCM ローディングに働く因子の機能を抑えています。当初、Cdt1 の機能抑制は geminin というタンパク質との結合が主なものだと考えられてきましたが、私たちは、Cdt1 は Cdk リン酸化によっても機能抑制され、リン酸化に依存して SCF<sup>Skp2</sup> ユビキチンライゲースによる分解制御を受けていることを見出しました<sup>(1)</sup>。さらに、兵庫県立大学の西谷先生との共同研究により、Cdt1 は S 期に PCNA との結合に依存して Cul4-DDB1<sup>Cdt1</sup> ユビキチンライゲースによる分解制御も受けていることが明らかになりました<sup>(2)</sup>。そして複数の機構によって厳密に制御されていることと一致して、Cdt1 は MCM loading を強く促進することも発見してきました<sup>(3)</sup>。実際に Cdt1 の量的脱制御は再複製や染色体障害を引き起こし、ひいてはがん化の一因にもなり得ます<sup>(3,4)</sup>。

ゲノム DNA のほとんどはコアヒストンに巻き取られクロマチンとして格納されているため、DNA 複製などの核内現象は何らかの形でクロマチン構造変化を伴うと考えられます。DNA 複製と似たような核内現象である転写では、クロマチンリモデリング因子、ヒストン修飾酵素、およびヒストンシャペロンが協同的に機能することでこの反応の促進を行うことが知られています。クロマチン上に効率よく pre-RC を形成することはゲノムの完全性の維持に不可欠であり、pre-RC 形成の際にも同様の機構が機能すると考えられます。例えば、ヒストンアセチル化酵素 HBO1 がライセンスに寄与することが報告されていますし、私たちはクロマチンリモデリング因子 SNF2H が Cdt1 との結合を介して MCM ローディングを促進することを発見しました<sup>(5)</sup>。しかし、pre-RC 形成におけるヒストンシャペロンは不明なままでした。

私達は、以前 Cdt1 結合因子として GRWD1 (glutamate-rich WD40 repeat containing 1) を同定していました<sup>(6)</sup>。GRWD1 は種間で高度に保存されている因子で、内部にグルタミン酸に富む酸性ドメインと、タンパク質-タンパク質相互作用に関わる WD40 ドメインを持ちます。酸性ドメインは多くのヒストン結合因子に共通して見られるドメインであり、GRWD1 の WD40 ドメインはヒストンシャペロン CAF1 のサブユニット p48 とホモロジーがあります。また、出芽酵母ホモログである RRB1 は生育に必須で、リボソーム生合成や染色体分配に関わることが示唆されていました。さらに、RRB1 と ORC6 に遺伝的相互作用があり、DNA 複製に関与している可能性も示唆されていましたが、

その詳細な分子機構は不明なままでした。特に、ヒト細胞において GRWD1 の解明はほとんど進んでいませんでした。そこで、GRWD1 が pre-RC 形成におけるヒストンシャペロンである可能性を考え、検証を進めました。

その結果、GRWD1 は実際にヒストン結合能およびヒストンシャペロン活性を持ち、Cdt1 だけでなく CDC6 とも結合し、この結合依存的にヒト細胞の代表的な複製オリジンである lamin B2 origin および MCM4 origin に局在することがわかりました。また GRWD1 発現抑制により、MCM ローディングが阻害され、BrdU の取り込み量の低下が認められました。

次に、GRWD1 が pre-RC とゲノムワイドに共局在しているか調べるため、ChIP と NGS 解析を組み合わせた ChIP-Seq を行いました。Pre-RC 部位は、CDC6 ChIP および MCM7 ChIP を組み合わせてマッピングし、firing オリジンとして報告のある SNS (short nascent strands)-Seq の結果と比較して正確性が高いと判断しました。この pre-RC 部位と GRWD1 結合部位は有意に共局在していました (~27%)。さらに、firing する pre-RC 部位 (SNS と共局在する部位) と GRWD1 結合部位の共局在も見られたことから、GRWD1 は特定のオリジンだけでなく、ゲノムワイドに pre-RC と共局在していることが示されました。次に、FAIRE (formaldehyde assisted isolation of regulatory elements) 法により、GRWD1 がクロマチン構造を制御するのかを調べました。FAIRE-qPCR によって lamin B2 および MCM4 オリジンを調べたところ、GRWD1 発現抑制によりクロマチン openness が低下しました。そして FAIRE-seq によりゲノムワイドに調べたところ、GRWD1 が近傍にある firing する pre-RC 部位では、GRWD1 抑制により openness の低下が認められました (図 1)。以上から、GRWD1 はゲノムワイドに多くの pre-RC 部位のクロマチン構造を制御していることが示唆されました。

当初、本研究はいわゆる Wet と呼ばれる分子生物学的手法のみの内容でしたが、NGS 解析の専門家である大川恭行先生が同じ九州大学で研究を主催されていたことから、共同研究という形で、いわゆる Dry と呼ばれるバイオインフォマティクスの手法も取り入れることができました。次世代シーケンサーの登場により、全ゲノムレベルの解析が可能となり、今や NGS はなくてはならない研究ツールの一つとなっています。Wet 解析を主体としてきた研究者にとって、得られたデータを解析するには敷居の高い部分が多くありますが、専門家が身近にいる環境で研究を行うことができ、とても幸運であったと感じています。現在は、GRWD1 の結合因子を網羅的に同定し、そこから GRWD1

を中心とした細胞増殖制御機構ネットワークの新たなパラダイムを見出そうと目論んでいます。研究途中でラボの引越 (私事では結婚・出産) などもあり、GRWD1 を Cdt1 結合因子として同定してから、約 10 年を経てようやく本内容を発表することができました。しかしこの月日があっという間だったと思えるほど、興味深いデータがいくつも得られており (例えば、GRWD1 が p53 制御に関与する可能性が出てきています)、今後の展開が楽しみな因子です。

## 参考文献

- 1) Sugimoto et al. (2004). *J. Biol. Chem.*, 279: 19691-19697.
- 2) Nishitani, Sugimoto et al. (2006). *EMBO J.* 25: 1126-1136.
- 3) Sugimoto et al., (2009). *J. Cell Sci.*, 122: 1184-1191.
- 4) Tatsumi, Sugimoto et al. (2006). *J. Cell Sci.*, 119: 3128-3140.
- 5) Sugimoto et al. (2011). *J. Biol. Chem.*, 286: 39200-39210.
- 6) Sugimoto et al. (2008). *Mol. Biol. Cell*, 19: 1007-1021.



Cdt1-binding protein GRWD1 is a novel histone-binding protein that facilitates MCM loading through its influence on chromatin architecture.  
Sugimoto N, Maehara K, Yoshida K, Yasukouchi S, Osano S, Watanabe S, Aizawa M, Yugawa T, Kiyono T, Kurumizaka H, Ohkawa Y, Fujita, M.  
*Nucleic Acids Res.* 43:5898-911., 2015. doi: 10.1093/nar/gkv509.

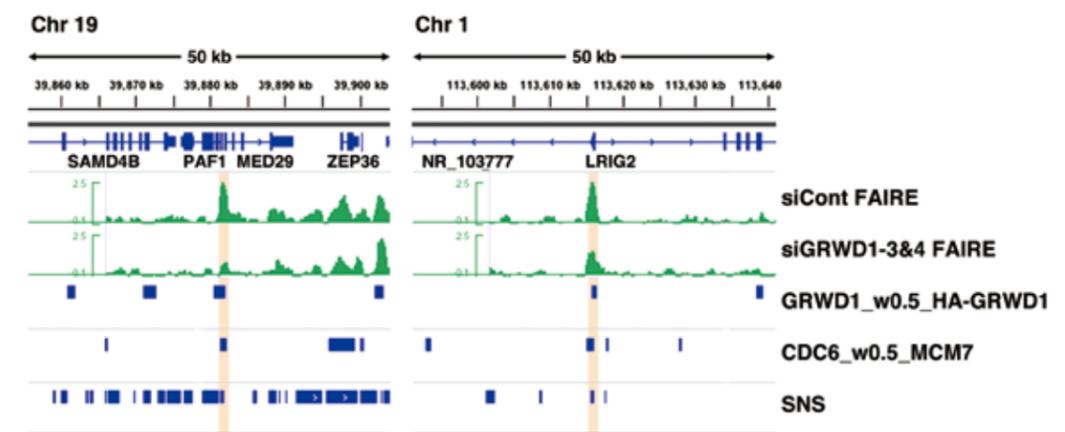


図 1 GRWD1 により DNA 複製開始領域のクロマチン構造がオープンになる

研究成果の紹介

## セントロメア反復配列の高次構造はヒトに近い種に限定されるものではない

古賀 章彦  
京都大学  
霊長類研究所



### 概要

ヒトやゴリラなどヒト科では、セントロメア反復配列に高次構造がみられます。しかしヒト科以外の霊長類からはみつからず、高次構造はヒト科に特有の現象であろうと、長らく考えられていました。私たちは、高次構造を検出する方法を工夫し、マーモセットとヨザルで、明瞭な高次構造があることを証明しました。この結果から、高次構造は霊長類に広く存在するものであることを提唱しました。

### アルファサテライト

セントロメア近辺には一般に、大量の縦列反復配列が存在します。このセントロメア反復配列、塩基配列の内容は系統ごとあるいは種ごとに様々です。ヒトでは、アルファサテライトとよばれる反復配列が、主要なセントロメア反復配列となっています。アルフォイドともよべれます。ユニットの長さは171 bpです。

### 高次構造

アルファサテライトの個々のユニットの間には、塩基配列にばつばつと違いがみられます。このユニット間の変異に関して、ヒトでは図1に示すような2種類があることが、30年ほど前からわかっています。高次構造をもたないものと、もつものです。高次構造とは、ユニットがたとえば5個など一定の数つながったものがより大きな単位となり、この大きな単位が繰り返しとなっている状態です。英語では higher-order repeat structure。

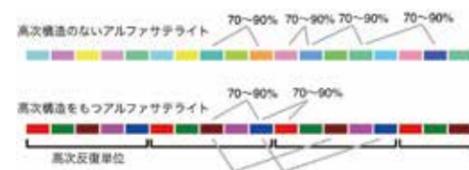


図1 2種類のアルファサテライト

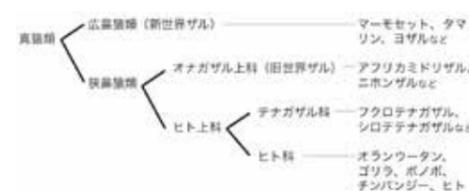


図2 真猿類の系統関係

### 高次構造の意義

高次構造の有無は、セントロメアの機能と密接に関連しています。核心は、高次構造をもつアルファサテライトはセントロメアの本体となることが多く、もたないものは主にセントロメア周縁部を構成することです。ただし、その直接の原因が高次構造自体なのか、高次構造と組み合わせられている他の要素なのかは、いまだに不明です。詳しくは、小林代表の編集となる近刊「ゲノムを司るインターメア」の第7章(舛本・大関の執筆)をご覧ください。

### 真猿類の系統関係

霊長類のうち、アイアイやガラゴなど、ヒトからずいぶん遠い系統を除いたまとまりを、真猿類といいます。アルファサテライトは、この真猿類の範囲でみられます。真猿類の中での系統関係は図2のようになっています。アルファサテライトが最初に発見されたのは、アフリカミドリザル。1971年のことです。

### 高次構造がみられる種の範囲

高次構造は1986年にヒトでみつき、ほどなくゴリラなどヒト科の他の種でも確認されました。その次にヒトに近いのは、テナガザル科です。テナガザル科では高次構造はみつからず、ヒトから見てさらに遠い旧世界ザル、またその向こうの新世界ザルにもみつかりません。このため、高次構造はヒト科とテナガザル科が分岐した後にヒト科の系統で生じたという見解が、定着しました。ただしここまでは、旧来の塩基配列解析法に基づく推測です。

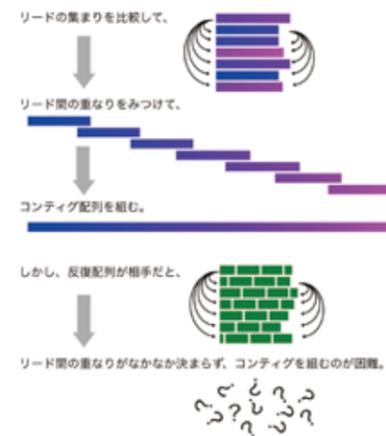


図3 長い領域の塩基配列決定

### パイオインフォマティクスでの探索

次世代シーケンサーの発達に伴い、インフォマティクスからの探索がなされるようになりました。しかし、ヒト科で新しい構成の高次構造が次々と同定されるのに対し、ヒト科以外でみつかったという報告はなかなか出て来ません。ネガティブな結果であるために論文になっていないだけで、幾多の試みがなされたものとは、容易に想像がつかます。高次構造がヒト科で生じたとする推測は、時代は進み定着の度を深めました。

### みつからない原因

高度なインフォマティクスでもみつからない理由は何か。2つあります。次世代シーケンサーから出てくるシーケンスリードが短いこと、エラー率が高いことです。この状況では、図3に示すように、なかなかコンティグが組めません。

### 実験法の工夫

ヒト科以外でも高次構造がある場合、長いクローンで正確なコンティグが得られれば検出できるであろうと、私たちは考えました。そのために、図4に示す方法を開発しました。解読方法は、旧来のサンガー法。シーケンスリードの長さは800 bpを超え、次世代シーケンサーよりずっと長い。しかもエラー率はぐっと低い。そのうえ1地点から両方向に読むので、シーケンスリードの長さは実際は1500 bp以上。もう1つ決定的な利点があります。それはどのリードとどのリードがつながるかが、別の情報からわかること。通常は、リード間の塩基配列の重なりを見つけ

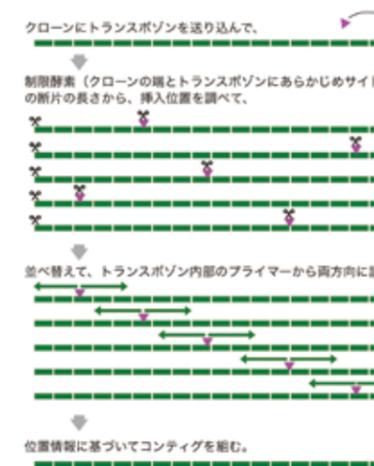


図4 開発した塩基配列決定法

て、それを基にしてコンティグを組みます。でも反復配列が相手だと、重なりはいくらでも出ます。ここが弱点です。私たちが開発した方法では、トランスポゾンが入った位置から、どれとどれがどのくらいの隔たりでつながるかがわかります。この位置情報に合わせてリードをつなぐと、長い領域にわたる正確な塩基配列が出ます。

### 新世界ザルでの検出

旧世界ザルをとばして、ヒトからさらに遠い新世界ザルを調べることにしました。具体的には、高度なインフォマティクスでもネガティブな結果しか出ていないマーモセット、それに私たちが別のテーマで取り組んでいるヨザル。それぞれ13.1 kbと10.8 kbの正確なコンティグを作りました。そしてユニット間の変異を比較したら、図5に示す明瞭な高次構造が出ました。赤い斜めの線は、高い類似度が連続していることを意味します。これがマーモセットでは12ユニットごと、ヨザルでは9ユニットごとに、繰り返し現れています。

### 意義

ヒト科の特性であろうと考えられていた高次構造。これは霊長類に広く存在するものであると、提唱するに至りました。決め手は、長くて正確な塩基配列を得る方法の開発です。第4世代シーケンサーの正確性が向上すればこの方法も不要となりますが、同等の正確性が達成されるのはいつ頃か、いまのところ見込みは立っていません。当分は有用な方法であるといえましょう。

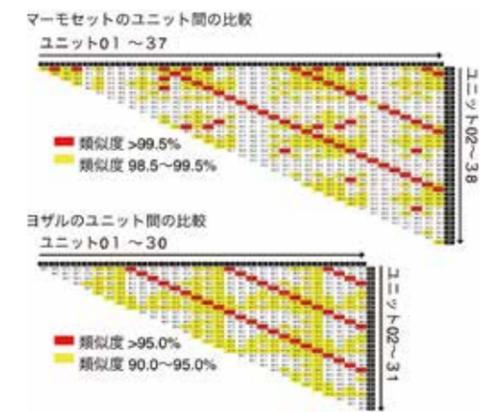


図5 高次構造の証拠



Higher-order repeat structure in alpha satellite DNA occurs in New World monkeys and is not confined to hominoids.  
Sujiwattarat P, Thapana W, Srikulnath K, Hirai Y, Hirai H, Koga A.  
Sci. Rep. 5: 10315 (2015)

## 研究成果の紹介

## セントロメア蛋白質シュゴシンがサブテロメアの特殊なクロマチン状態を規定する

田代 三喜  
大阪大学 蛋白質研究所



私達の研究室では、染色体の末端付近、すなわちテロメアとそれに隣接するサブテロメア領域に着目した解析を進めています。本稿では、サブテロメア結合蛋白質の機能に関する、最近の研究成果をご紹介します。

ご存知のように、テロメアは、寿命や老化、癌といった、人類の興味を引いてやまないテーマと密接に関わることから、長年にわたって精力的な解析が続けられています。ノーベル生理学医学賞にテロメア研究が選ばれて数年が経ちますが、依然としてテロメアは染色体研究の中心的存在であり続けています。これに比べると、その隣接領域であるサブテロメアについて知られていることは、決して多いとは言えないのが現状です。近年、サブテロメア領域の変異が、精神遅滞などの疾患と関連することが指摘され、すでに臨床現場でサブテロメアを対象とした染色体検査が可能となっています。しかしながら、それら疾患の発症機序はおろか、サブテロメアの基本的な性質の理解さえ十分ではありません。

サブテロメア領域の最も顕著な特徴は、その DNA 配列にあります。ある個体のサブテロメア間で配列を比較すると、様々な反復配列がモザイク状に並ぶという特徴的な構造がみられます。出芽酵母の大半のサブテロメアが持つ X エlement や Y エlement は、その代表例と言えるでしょう。しかしながら、サブテロメア配列の生物種間での保存性は一般的に低く、また、たとえ同一種内であっても、個体間を比較するとしばしばモザイク構造のあり方が異なっていることから、この染色体領域がいかに変化に富んでいるかが分かります。一例を挙げますと、ヒトとチンパンジーのゲノムにはほとんど差が無くともよく言われますが、その中であってサブテロメア領域は比較的相違の多い領域であることが分かっています。このような動的性質から、サブテロメア領域はしばしば進化研究者の関心を集めるのですが、一方で、その変化し易さ故に、サ

ブテロメアに関する知見の一般化は難しく、これがサブテロメア研究の進みにくさの一因になっているように思われます。

私達は、モデル生物として分裂酵母を用いて研究を進めていますが、遺伝的に均質な細胞集団を扱うことが容易という基本的な利点はもちろん、サブテロメアのモザイク構造が比較的単純な形で存在すること、染色体がたった三本しか存在しないことなど、サブテロメア解析にとって有利な特徴を備えています。さらに、分裂酵母サブテロメアについては、すでに DNA 配列以外にも興味深い性質が幾つか見出されています。第一に、サブテロメア領域には蛋白質をコードする遺伝子が多数存在しますが、いずれも生存に必須でないばかりか、それらの発現は低く抑えられています。この低発現の一因は、テロメアのごく近傍において転写に抑制的なヘテロクロマチン構造が存在することにありますが、そのヘテロクロマチンに隣接するセントロメア側の数十 kb の領域においても遺伝子の発現レベルが低い傾向にあり、そこはユークロマチンともまた違った特殊なクロマチン状態にあると考えられています<sup>(1)</sup>。第二に、DNA が複製される細胞周期 S 期において、サブテロメアはとりわけ遅い時期に複製される領域であることが知られています<sup>(2)</sup>。最近私達は、サブテロメア領域におけるこれらの特徴が、シュゴシン蛋白質によってもたらされていることを報告しました。

シュゴシンは真核生物で広く保存されたセントロメア結合蛋白質であり、分裂期において、染色体を正確に娘細胞へと分配するうえで重要な役割を果たしています。分裂酵母には二種類のシュゴシン、Sgo1、Sgo2 が存在し、Sgo1 は減数分裂期特異的に発現するのに対して、Sgo2 は構成的に発現しています。後者の Sgo2 は、分裂期にセントロメアへ染色体パセンジャー複合体をリクルートすることを通じて、染色体分配に貢献することが知られています。ところが、この Sgo2

はどのような訳か、分裂期のセントロメアでの役割を果たすと、間期にはテロメア近傍へと局在を変化させます<sup>(3)</sup>。

今回私達が行った解析によって、Sgo2 がサブテロメア領域の性質を決める重要な因子であるということが判明しました。ChIP-chip 法を用いてテロメアから約 100 kb 以内の染色体領域に Sgo2 が局在することを確認しましたが、この領域に存在する遺伝子の多くが Sgo2 欠損により発現上昇することをマイクロアレイ解析によって見出しました (図 1)。また、この領域における DNA 複製の時期が、Sgo2 欠損により早期化することも明らかになりました (図 2)。

興味深いことに、Sgo2 がクロマチンの高次構造形成に寄与することも分かってきました。近年、光学顕微鏡の本来の分解能を超える手法によって、細胞内の微細な構造をより鮮明に観察することが出来るようになりました。大阪大学の平岡泰先生のグループは、この手法の一種である 3D-SIM を用いて分裂酵母の核を観察し、ノブと呼ばれる高度に凝縮したクロマチン体を発見されました<sup>(4)</sup>。このノブの大きな特徴は、間期核にのみ、しかもテロメア近傍にのみ形成されることにあります。これはまさに、サブテロメアにおける Sgo2 の局在様式そのものであり、実際に Sgo2 はノブと共局在し、Sgo2 欠損株ではノブが全く形成されなくなることを見出しました (図 3)。つまり、Sgo2 がサブテロメア領域のクロマチン凝縮に必須の役割を果たすことが明らかになったのです。Sgo2 が転写や複製に抑制的に作用するの、恐らくはこのノブの形成を通じてのものと考えられます。

では、サブテロメア領域において凝縮したクロマチン構造を形成し、転写や複製を抑制する意義はどこにあるのでしょうか。この疑問を解決することは今後の課題として残されましたが、現時点で想像している可能性を少し述べたいと思いま

す。転写は言うまでもなく生命にとって極めて重要なプロセスですが、同時にゲノムを不安定化させる要因にも成り得ることが知られています。特に、転写中の RNA ポリメラーゼが S 期において DNA 複製装置と衝突すると、DNA 二重鎖切断などの損傷を引き起こす恐れがあります。Sgo2 は、サブテロメア領域における転写を抑制し、DNA 複製を適切に制御することで、両者の衝突を防いでいるのかもしれませんが、あるいは、Sgo2 の転写や複製に対する抑制的作用はあくまで副次的なものであって、凝縮されたクロマチン構造自体に別の何らかの意義が存在することも考えられます。例えば、サブテロメア領域の間では、配列の相同性が高いために組換えが高頻度で起こることが予想されますが、これを放置すれば、場合によっては有害なゲノム再編成に繋がりがかねません。この危険性を低下させるため、Sgo2 はノブの形成を通じて、組換え因子の DNA への接近を阻害している可能性があります。いずれにせよ、Sgo2 はゲノムの守護神としての新たな顔を見せ始めるのかもしれませんが、本成果がきっかけとなって、シュゴシン蛋白質の世界が広がるのはもちろん、サブテロメア領域の性質を本質的に理解することにつながるのを期待します。

本研究を進めるにあたりまして、升方久夫先生、太田邦史先生、平岡泰先生、石井浩二郎先生と、先生方の研究室の皆様には、共同研究をはじめ、様々な面で大変お世話になりました。この場をお借りしまして、心より感謝申し上げます。

## 参考文献

1. Buchanan et al., *PLoS Genet.*, 2009
2. Hayashi et al., *EMBO J.*, 2007
3. Kawashima et al., *Genes Dev.*, 2007
4. Matsuda et al., *Nat. Commun.*, 2015

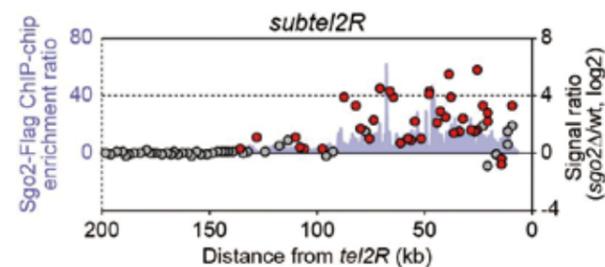


図1 サブテロメア領域において、Sgo2 の分布 (薄紫色) と、Sgo2 欠損により発現上昇した遺伝子 (ドットが遺伝子と対応、赤色が有意に変化した遺伝子) の位置が良く一致する。

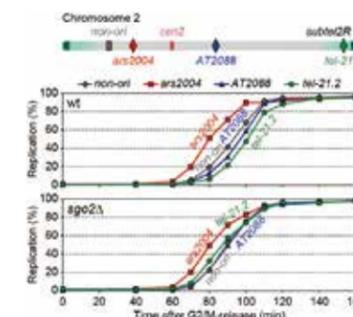


図2 サブテロメア領域 (tel-21.2) の複製時期が、Sgo2 欠損により早期化する (升方先生)。

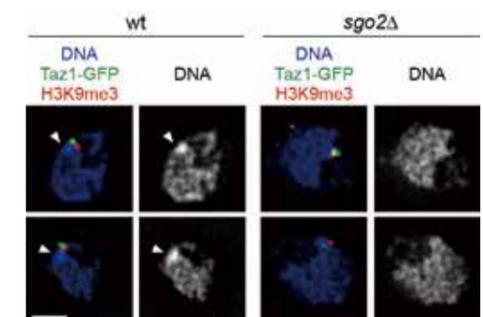


図3 ノブ構造 (矢頭) はテロメア (Taz1) とヘテロクロマチン (H3K9me3) に隣接して存在するが、Sgo2 欠損株では全く形成されない (平岡先生)。

## 研究成果の紹介

## コヒーシンによって構築される染色体構造が減数分裂前期相同染色体の対合に必要

丁 大橋

国立研究開発法人  
情報通信研究機構未来 ICT 研究所  
バイオ ICT 研究室

Meiotic cohesin-based chromosome structure is essential for homologous chromosome pairing in *Schizosaccharomyces pombe*.  
Ding DQ, Matsuda A, Okamasa K, Nagahama Y, Haraguchi T, Hiraoka Y.  
*Chromosoma*. 2015 Oct 28. [Epub ahead of print]



有性生殖の基本を司る減数分裂の分子機構の解明は基礎生物学においても医学的観点からも非常に重要である。減数分裂前期の主なイベントとして、DNA の複製、相同染色体の対合と組換え、シナプシスが行われる。そのうち、相同染色体の対合は親世代から受け継いだ相同染色体が互いを見つけて接着する過程で、正常な対合が相同組換えに不可欠である。対合に関して特に相同染色体がどのようにお互いに認識するのかがもっとも謎に満ちた問題で、まだほとんど解明されていない (文献1)。

我々はこれまでの研究でテロメアブーケの形成および核運動が相同染色体の対合に必要であることを明らかにしてきた。テロメアブーケとは、減数分裂前期にすべての染色体末端が核膜の一箇所に集まり、染色体を花束のように束ねる現象で、酵母から植物や哺乳類まで共通に見られる。分裂酵母では、核融合の過程と同時にテロメアが SPB (spindle pole body) に集まり、染色体がテロメアブーケの配向をするホーステール核 (horseshoe nucleus) と呼ばれる細長い核が現れる (図1)。分裂酵母のホーステール期は、減数分裂前期前期に相当し、約 2 時間にわたり核が絶えず往復運動し、相同染色体の対合・組換えが行われる。染色体領域を可視化し、対合を生細胞観察することによって、ブーケ配向の形成と核運動が相同染色体を空間的に近づかせることに重要で、さらに相同組換えによって安定な染色体対合が実現することが明らかになった (文献2)。

減数分裂前期前期においては染色体構造が大きく変化する。植物や動物細胞では減数分裂期特異的な染色体構造を形成し、細糸期 (レプトテン期)、合糸期 (ザイゴテン期)、厚糸期 (パキテン期) で分けられるように、減数分裂前期前期から染色体が光学顕微鏡でも観察できるほど凝縮度が徐々に高まり、そして、シナプトネマ複合体 (SC) が相同染色体を架橋するように形成され、相同染色体が端から端まで対合する。減数分裂前期前期の染色体構築はコヒーシン複合体に依存する。コヒーシン複合体は Smc1, Smc3 および Rad21/Sccl, Sccl3 からなるリング状構造を形成し、姉妹染色体分体をリング内にトラップすることによって接着させる役割を果たす。一方、減数分裂期特異的なコヒーシン複合体は相同組換えに必要で、分裂酵母の減数分裂前期前期では、Rad21 と Sccl3 (分裂酵母では Psc3) の大部分が Rec8 と Rec11 にとって代わり、Smc1/Smc3 と減数分裂期特異的なコヒーシン複合体を形成する。分裂酵母は SC を形成せず、減数分裂前期前期の染色体凝縮もホーステール核の一つで、その間、染色体凝縮度がほぼ同じ程度に保たれている (文献3)。減数分裂期特異的なコヒーシン複合体は染色

体の軸様構造を形成し、染色体に一定な凝縮度をもたらす。Rec8 の欠損株では、染色体の凝縮度が大きく下がり、染色体のコヒーシン軸がほぼ完全に消えてしまう (文献3)。一方、Pds5 はコヒーシン複合体に結合する調節因子で、姉妹染色体接着の確立と維持に寄与し、Pds5 の欠損した分裂酵母では、Rec8 の染色体結合サイトが減り、ホーステール核が野生株の半分ほどの長さしかなく、過度に凝縮した染色体構造を呈す (文献3)。SC が形成されない代わりに、分裂酵母ではリニアエレメント (LinEs) と呼ばれる短い糸状構造が形成される。LinEs がコヒーシン複合体依存的に形成され、コヒーシンが欠損すると LinEs が形成できなくなる。LinEs が形成されない Rec10 欠失変異体では、ホーステール核の凝縮度が野生株と同程度なので、LinEs が染色体の凝縮度に寄与しない (文献3) が、相同組換えに必要である。

今回の論文では、分裂酵母では相同染色体の対合に減数分裂特異的な染色体構造がどのように寄与するか、また、超高解像度顕微鏡システム 3D-SIM (Structured Illumination Microscopy) を用いて解析したホーステール期の染色体構造について報告した。

まずは染色体構造がどのように対合に影響するかを調べるために、Rec8 または Pds5 の欠損株での対合頻度を計測した。相同染色体の対合を lacO/LacI-GFP で可視化した染色体のアーム、セントロメア、sme2 ローカスで調べたら、Rec8 と Pds5 のいずれの欠失株で、すべてのローカスにおいて対合頻度が大きく下がったことが分かった。さらに、相同染色体間の距離を測ると、いずれの変異体も野生株より大きく離れて、相同染色体が核内でお互いに近づけられないことが明らかになった。sme2 ローカスは非コード RNA に制御されるロバスタな対合サイト (文献4) で、セントロメアとともに相同組換え非依存的な対合を果たせることから、コヒーシンによる対合への役割は相同組換えを通して働くのではなく、直接に染色体構築への制御を介して働くことが明らかになった。

次に、ホーステール核の染色体構造がどう変化したかを 3D-SIM で観察しました。Histone-GFP と Rec8-GFP 二重染色でホーステール核を生細胞観察すると、野生株では染色体軸と Rec8 の軸が綺麗に重なって、ホーステール核の全長にわたり染まるのが分かる (図1)。ヒストンで染まる染色体軸が Rec8 破壊株では消失し、構造が見えない均一な蛍光染色になり (図2)、反対に、Pds5 破壊株では染色体が太く短くなった (図2)。3D-SIM の画像を Gaussian fitting で太さを定量解析すると、Rec8 軸がヒストンで

ラベルした染色体より細く、また Pds5 破壊株では、Rec8 軸の太さがほぼ変わらないが、染色体が約 1.4 倍太くなった (図2)。これらのデータから、分裂酵母も他の生物と同様、コヒーシン複合体を軸にクロマチンがループ状に配置・組織されることが示唆された。相同染色体を空間的に並べて近寄せるためには、軸の無い (Rec8 破壊株) 染色体は、適度な硬度がなく、テロメア付近の染色体だけが引っ張られて動きまわって、染色体全体が動かされない (文献3)、対合がうまくできないと考えられる。一方、Pds5 破壊株でみられる軸が短く、クロマチンループが大きい染色体は、恐らく染色体の硬度が高過ぎて、相同染色体が上手く密着できないのではないかと考えられる (図2)。

非コード RNA 対合サイトである sme2 ローカスも Rec8 と Pds5 に依存して対合することは、減数分裂特異的に構築される染色体構造が相同染色体の相互認識にも必要であることが示唆されました。また、Rec8 と Pds5 破壊株では、姉妹染色体分体の分離がア

ム上の ade8 と sme2 ローカスで見られるが、セントロメアでは見られない。それに関わらず、すべての場所で対合が大きく損なわれたことから、コヒーシンの姉妹染色体分体を接着させる役割と対合を促進する役割が独立であると考えられる。結論として、相同染色体を物理的に並べさせることは対合の前提条件で、そのために、テロメアクラスターの形成、テロメアを先頭とする染色体往復運動、ダイナミックな染色体運動と空間配列を可能にする秩序よく折り畳まれる染色体構造のいずれも不可欠であることが明らかになった。しかし、Rec8 タイプのコヒーシン複合体がどのように染色体を軸とループにオーガナイズするのが不明で、そのメカニズムの解明が減数分裂を理解する上で非常に重要な問題であろう。

## 参考文献

- Gerton, JL and Hawley, RS *Nat Rev Genet* (6), 477-487 (2005).
- Ding, D-Q., et al. *Dev Cell* (6), 329-341 (2004)
- Ding, D-Q., et al. *J Cell Biol* (174), 499-508 (2006)
- Ding, D-Q., et al. *Science* (336) 6082, 732-736 (2012)

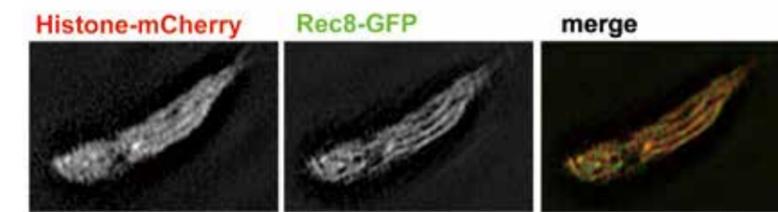


図1 分裂酵母ホーステール期生細胞のヒストン・Rec8 二重染色 3D-SIM イメージ。

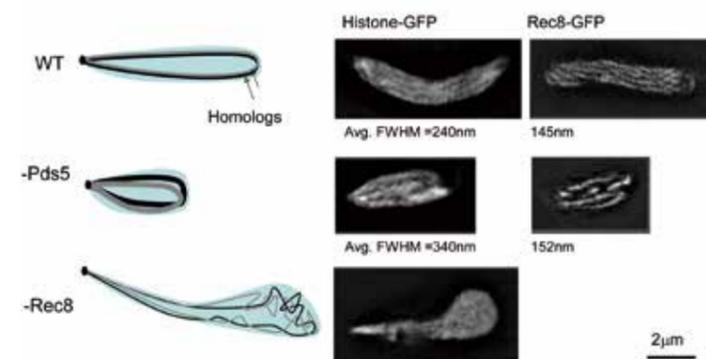


図2 野生株と Pds5、または Rec8 破壊株での染色体、コヒーシン軸の生細胞 3D-SIM イメージ。Avg.FWHM は Average full width at half maximum を表す。

研究成果の紹介

## ゲノムワイド関連解析による 抗がん剤の奏効性予測因子の探索

高橋 広夫

千葉大学 大学院  
園芸学研究所 応用生命化学領域



疾患に関する遺伝子解析は、2 つに大別されます。1 つは、生まれ持った遺伝子、すなわち、生殖細胞系列の遺伝子解析、もう1 つは、病変した体細胞の遺伝子解析です。これらの2 種類の遺伝子解析を進めることで、個々の患者さんに合わせた個別化医療 (もしくは Precision Medicine) を推進し、患者さんの Quality of Life を向上させることが出来ると期待されています。個別化医療は、様々な疾病の診断・治療において期待されていますが、副作用の強さ・発現頻度は著しく高く、奏効率が 20 ~ 50% と低い抗がん剤において特に有望視されています。本稿では、特に、前者の生殖細胞系列の遺伝子解析について述べさせていただきます。

近年、薬の効き方の個人差の原因の一つとして、遺伝子因子、つまり、遺伝子多型が目目されておられ、遺伝子多型をマーカーとしたコンパニオン診断による個人個人に合わせた適切な治療の実現が期待されています。例えば、イリノテカン、日本で開発された抗がん剤の一つですが、好中球減少や下痢などの副作用が問題となっています。UGT1A1 遺伝子のプロモーター多型である \*28(-40\_-39insTA) と相関するという報告<sup>(1)</sup> が 2000 年に安藤らにより発表されて以来、欧米からも、同様な報告が相次ぎ、2005 年 6 月には、FDA がイリノテカンの添付文書を改訂しました。改訂された添付文書には、UGT1A1\*28 をホモ接合体で有している患者に対しては、好中球減少のリスクが高いことから、初回投与量の減量を考慮すべき旨が追記されています。その後、2005 年 8 月には \*28 をマーカーとした診断薬の販売が認可され、イリノテカンの個別化医療がアメリカで開始されることになりました。なお、血流に乗ったイリノテカンは、肝臓の CES2 タンパク質により、強いトポイソメラーゼ I 阻害効果を持つ SN-38 へ変換

され、抗腫瘍効果を発揮します。SN-38 はさらに、UGT1A1 タンパク質により速やかにグルクロン酸抱合され SN-38G に変換・解毒されることが分かっています (図 1)。

我々のグループでは、イリノテカンの副作用と遺伝子多型とのゲノムワイド関連解析 (GWAS) を行うことで、UGT1A1\*28 が、SN-38 の血中濃度を変化させることを確認するとともに、イリノテカンの主要な副作用の一つである下痢は、SN-38 の血中濃度とは相関せず、KCNQ5 遺伝子のイントロン上の一塩基多型 (SNP) である rs9351963 と強く相関する事を見いだしました<sup>(2)</sup>。KCNQ5 タンパク質は、腸管平滑筋に発現しており、腸管の蠕動運動に関わるアセチルコリン応答性のカリウムチャンネルであることが分かっています。イリノテカンはコリン様作用を示すことから、KCNQ5 rs9351963 は、イリノテカン投与症例の下痢 (特に早発性の下痢) の発現の予測因子の候補として期待されます。

また、同様な GWAS 解析を、フッ化ピリミジン系抗がん剤 (5-FU) を投与された胃がん症例の奏効性と相関する予測因子の探索にも応用し、5-FU の奏効性と相関する SNPs である EGFR rs2293347 と ANXA3 rs2867461 を同定しました<sup>(3)</sup>。5-FU は、代謝拮抗剤の一種で、核酸と似たアナログ物質をがん細胞へ核酸として間違っ取り込ませることで、がんの増殖阻害を引き起こします。EGFR rs2293347 は、抗 EGFR 分子標的薬「イレッサ」投与肺がん症例における予後因子として、Ma らによって 2009 年に初めて報告されました<sup>(4)</sup>。EGFR の経路の活性化は、5-FU の分解酵素である DPD タンパク質発現を促進し、5-FU 系抗がん剤の耐性を高めることが知られていることから、EGFR の多型と 5-FU の

奏効性と関連することは矛盾しません。しかし、rs2293347 は、エキソン上に存在するアミノ酸変化を伴わない同義置換 SNP ですので、rs2293347 そのものが、mRNA の安定性に関わるのか、或いは、rs2293347 とゲノム上で連鎖する機能多型が存在する可能性が示唆されます。一方で、ANXA3 rs2867461 は、イントロン上に存在する SNP であり、2012 年に岡田らによって、リウマチ性関節炎、全身性エリテマトーデス、パセドウ病などの自己免疫疾患の発病と相関する SNP として初めて報告されました。また、同時期に、Tong らにより、5-FU 耐性がん細胞株のプロテオーム解析から ANXA3 タンパク質が、5-FU 耐性がん細胞で高発現していることも報告されています<sup>(6)</sup>。さらに、2013 年には Pénzváltó らによって、ANXA3 タンパク質が EGFR を含むチロシンキナーゼのリン酸化標的分子であることが明らかにされました<sup>(7)</sup>。以上より、EGFR rs2293347 と ANXA3 rs2867461 が 5-FU 投与胃がんにおける奏効性の予測因子の候補として統計的に同定されたことは生化学的にも妥当であると考えられます。このように同定した 5-FU 投与胃がん症例の奏効性と関連する 2 つの多型マーカーを組み合わせた図 2 で示すような指標 iEA (integrated predictive index based on EGFR and ANXA3 polymorphisms) を定義し活用することで、約 60% の患者さんを 5-FU の非奏効群として予測することが可能であると期待されます。つまり、このような患者さんは、副作用の強く効果の無い抗がん剤を 5 年間投与され続け、年間で約 100 万円 (国の負担分も含む) の薬代を負担するとともに、他の抗がん剤治療を受けるチャンスを失っていると考えられます。

以上のように、我々の同定した 3 つの SNPs はアミノ酸置換を伴わないものの、抗がん剤の副作用や主作用の予測マーカーとして有用性を秘めており、今後のさらなる研究により機能解明や臨床的有用性の検証が期待されます。

### 参考文献

- Ando Y., Saka H., Ando M., Sawa T., Muro K., Ueoka H., Yokoyama A., Saitoh S., Shimokata K., Hasegawa Y., Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: a pharmacogenetic analysis, **Cancer Res.**, 60(24), 6921-6926, 2000
- Takahashi H., Sai K., Saito Y., Kaniwa N., Matsumura Y., Hamaguchi T., Shimada Y., Ohtsu A., Yoshino T., Doi T., Okuda H., Ichinohe R., Takahashi A., Doi A., Odaka Y., Okuyama M., Saijo N., Sawada J., Sakamoto H., and Yoshida T., Application of a combination of a knowledge-based algorithm and 2-stage screening to hypothesis-free genomic data on irinotecan-treated patients for identification of a candidate single nucleotide polymorphism related to an adverse effect, **PLoS ONE**, 9(8), e105160, 2014
- Takahashi H., Kaniwa N., Saito Y., Sai K., Hamaguchi T., Shiro K., Shimada Y., Matsumura Y., Ohtsu A., Yoshino T., Doi T., Takahashi A., Odaka Y., Okuyama M., Sawada J., Sakamoto H., and Yoshida T., Construction of possible integrated predictive index based on EGFR and ANXA3 polymorphisms for chemotherapy response in fluoropyrimidine-treated Japanese gastric cancer patients using a bioinformatic method, **BMC Cancer**, 15(1), 718, 2015
- Ma F., Sun T., Shi Y., Yu D., Tan W., Yang M., Wu C., Chu D., Sun Y., Xu B., Lin D., Polymorphisms of EGFR predict clinical outcome in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with Gefitinib, **Lung Cancer**, 66(1), 114-119, 2009
- Okada Y., Terao C., Ikari K., Kochi Y., Ohmura K., Suzuki A., Kawaguchi T., Stahl E.A., Kurreeman F.A., Nishida N., Ohmiya H., Myouzen K., Takahashi M., Sawada T., Nishioka Y., Yukioka M., Matsubara T., Wakitani S., Teshima R., Tohma S., Takasugi K., Shimada K., Murasawa A., Honjo S., Matsuo K., Tanaka H., Tajima K., Suzuki T., Iwamoto T., Kawamura Y., Tanii H., Okazaki Y., Sasaki T., Gregersen P.K., Padyukov L., Worthington J., Siminovich K.A., Lathrop M., Taniguchi A., Takahashi A., Tokunaga K., Kubo M., Nakamura Y., Kamatani N., Mimori T., Plenge R.M., Yamanaka H., Momohara S., Yamada R., Matsuda F., Yamamoto K., Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population, **Nat. Genet.**, 44(5), 511-6, 2012
- Tong S.W., Yang Y.X., Hu H.D., An X., Ye F., Hu P., Ren H., Li S.L., Zhang D.Z., Proteomic investigation of 5-fluorouracil resistance in a human hepatocellular carcinoma cell line, **J. Cell Biochem.**, 113(5), 1671-1680, 2012
- Pénzváltó Z., Tegze B., Szász A.M., Sztupinszki Z., Likó I., Szendrői A., Schäfer R., Györfy B., Identifying resistance mechanisms against five tyrosine kinase inhibitors targeting the ERBB/RAS pathway in 45 cancer cell lines, **PLoS ONE**, 8(3), e59503, 2013

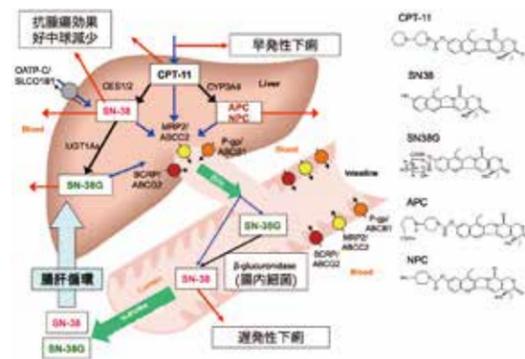


図 1 抗がん剤イリノテカン (CPT-11) の代謝

血流に乗った CPT-11 は、肝臓に運ばれることで、抗腫瘍効果を発揮する活性型 SN38 に変換されるプロドラッグです。SN-38 は、肝臓の UGT1A1 タンパク質によって、グルクロン酸抱合により解毒されます。また、CPT-11 は、CYP3A4 タンパク質によって、APC や NPC に変換されることによっても解毒されます。CPT-11 はカルバミル基を有しているため、アセチルコリンエステラーゼ阻害作用を介して、コリン様作用を引き起こします。コリン様作用は主として、早発性の下痢を引き起こされます。一方、グルクロン酸抱合された SN-38G は、胆汁として、腸に排出され、腸内細菌の  $\beta$ -グルクロナダーゼの作用によって、SN-38 に変換され、遅発性の下痢を引き起こすと考えられています。

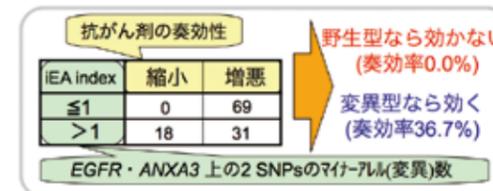


図 2 5-FU 投与胃がん症例における抗がん剤の奏効性予測 我々の定義した指標 iEA に基づき、約 60%(69 / 118) の症例を 5-FU 無効群 (がんの増悪群) として投与前に推定することが可能です。「縮小」は、固形がんの奏効性の判定基準である RECIST (response evaluation criteria in solid tumors) に基づき、完全寛解 (complete response :CR)、もしくは、部分寛解 (partial response: PR) した症例で、「増悪」は、不変 (no change: NC)、もしくはは、進行 (progressive disease: PD) と定義しました。

## 研究成果の紹介

非コード DNA の機能を規定する  
因子としてのグアニン 4 重鎖構造

ギムザ染色により分裂中期期の染色体を染色すると、強く染まる領域 (Gバンド; 低 GC 含量、低い転写活性) と染まりが弱い領域 (Rバンド; 高 GC 含量、高い転写活性) に染め分けられる。このバンドニングパターンが複製のタイミングと関連していることは以前から知られていた (G は後期、R は初期)。しかし、複製タイミングを制御する分子機構は不明であった。私たちは、数年前に分裂酵母とヒト細胞で Rif1 という因子が複製タイミングを制御する重要な因子であることを発見した<sup>1</sup>。今回 Rif1 は、ゲノム上に存在する代表的な非 B 型 DNA 構造であるグアニン 4 重鎖 (G4) 構造を認識結合することにより複製タイミングを制御することを見出した<sup>2</sup>。一連の解析から、代表的な非 B 型 DNA 構造である G4 は非コード DNA の機能を規定する重要な因子の一つである可能性が浮かび上がってきた。

## 発見の経緯

私たちは長年 DNA 複製の制御機構の研究を行ってきたがその過程で複製開始に重要な役割を担う Cdc7 キナーゼの研究に従事してきた。Cdc7 は複製開始に必須なリン酸化をする酵素であることから、当然増殖に必須であるものと考えていた。実際、出芽酵母においても非常にタイトな温度感受性変異株が多数存在し、欠損は致死であるし、マウス ES 細胞においても Cdc7 ノックアウトは致死であった。ところが、分裂酵母の Cdc7 である hsk1 の温度感受性変異株と mrc1 (複製チェックポイントの mediator として機能する) の欠損株を掛け合わせると hsk1ts の温度感受性増殖が相補されることを見出した<sup>3</sup>。mrc1 の下流で機能する cds1 の欠損でも同様であった。さらに驚いたことに mrc1 や cds1 欠損株は、hsk1 の欠損株の増殖も弱く回復した<sup>4</sup>。これは、mrc1-cds1 の欠損下では hsk1 は複製開始に必須ではないということを示唆していた。mrc1 や cds1 変異体では、後期複製起点が HU 存在下でも fire することが知られていた。チェックポイント変異株では種々の複製抑制機構が off になっているため、複製開始のポテンシャルが増加しており、そのため、Cdc7 なしでも複製が開始できるようになったのではと考えた。そこで、「hsk1 機能をバイパスするような変異体をスクリーニングすることにより、複製タイミング制御に関与する新しい因子を単離できるのではないか」という仮定のもと、スクリーニングを行った。その結果、最も効率よく hsk1 欠損を相補する因子として同定されたのが rif1 であった<sup>1</sup>。rif1 欠損株では、予想通り、複製タイミングが大きく変動していた。この変動はストレスの存在しない通常の S 期進行時にも観察

された。Rif1 はもともとテロメア結合因子として発見されており、分裂酵母の Rif1 もテロメアに結合しテロメア長を制御することは、本新学術領域の班員である加納純子博士より報告されていた<sup>5</sup>。ちょうど同時期に升方先生のグループは後期複製起点近傍にテロメリビート配列に似た配列を同定し、Taz1 がこれに結合し複製タイミングを制御することを見出していた<sup>6</sup>。このようにテロメア因子と複製タイミング制御の関係がクローズアップされた。Rif1 は動物細胞にも保存されるが、テロメア結合やテロメア長の制御に関しては否定的な報告がされていた。一方、ヒト及びマウスの Rif1 は分裂酵母と同様に複製タイミングをゲノムワイドで制御することが明らかとなった<sup>7,8</sup>。このように、Rif1 は、酵母からヒトに至るまで、ゲノム複製タイミングの主要な制御因子であることが示された。

## Rif1CS の同定

ヒトの Rif1 をノックダウンすると、複製タイミングのドメインが大きく変動した。これは Rif1 が個々の複製起点を制御するのではなく、数百 kb から Mb に至るクロマチドメイン単位を制御することを示唆した。また、動物細胞で Rif1 をノックダウンするとクロマチンループサイズの増加が観察された。Rif1 は核骨格様構造に強く結合し、DNaseI で消化してもそのシグナルは核膜周辺、核小体辺縁部に観察された。これらの性質は基本的に分裂酵母でも保存されている。そこで、当研究室の加納博士は、分裂酵母の Rif1 結合部位 (Rif1BS) を ChIP-chip で解析した。その結果 155 箇所の結合部位を同定した。Rif1BS は主に遺伝子間領域 (非コード DNA 領域) に存在し、複製起点 (Mcm 結合部位) とは重ならなかった。しかし、近傍に後期複製開始起点が存在するものが多かった。共同研究者の Claire Renard-Guillet 博士らはこれらの配列の解析から一部の Rif1BS 配列に保存される配列を同定した。さらに加納博士は ChIP-seq により Rif1 結合部位をより正確に解析した。その結果、より信頼性の高い結合部位が同定され、最終的に再現性の高い、強い Rif1 結合部位を 35 個に限定した。これらの配列を解析した結果 G-rich の保存された配列を同定した。この配列は、先に Renard-Guillet 博士が同定したものと重複していた。さらに加納博士は、この配列は、多くの場合 2 個以上存在し、head-to-tail に並んでいる場合が多いこと、配列の数と結合効率に相関があることを示した。この配列は Rif1CS (consensus sequence) と名付けたのであるが、最初私は Rif1 box という名前を提唱した。Rif1CS はなにか boring な名前だと思ったし、私の頭のなかに、大腸菌複製起点に発見された有名な DnaA box があつたからだが、加納博士はこれに強行に反対した。結果として、この配列は DnaA



正井 久雄  
東京都医学総合研究所

box のようにタンパク質が直接認識する配列ではなく構造を形成するための配列であったので Rif1 box は適切な名前ではなかった。

## Rif1CS は Rif1 の結合に必須か？

当然、次の課題は「Rif1CS が Rif1 のクロマチン結合に必要かどうか？」ということになる。加納博士は 2 個の強い Rif1BS を選んで、それに存在する Rif1CS に変異を導入した。結果はきわめて明快で、2 個の Rif1CS は Rif1 のクロマチン結合に必要であることが明らかとなった。特に両方の Rif1CS を潰した場合は Rif1 のクロマチン結合は完全に消失した。また Rif1CS の変異は、変異部位以外の主要な Rif1BS への Rif1 の結合には影響を与えなかった。

## 局所的な Rif1 結合の喪失は DNA 複製にどのような影響を与えるか？

このように特定の部位の Rif1 結合が消失した株を樹立できたので、次にこの株で Rif1 結合の喪失が複製タイミングに及ぼす影響を調べた。この Rif1BS を含む 200kb くらいの領域は野生株では完全に抑制されているが、rif1Δ 株では HU 存在下で、この領域内の多くの複製起点が fire する。Rif1CS 変異体でも同様にこの結合部位の近傍約 100kb に渡って、複製開始が促進された。このことは Rif1 の一箇所の結合によりその近傍 100kb 近くにあつて複製が阻害されることを示す。この事実、Rif1 が核内染色体のドメイン形成に関与しており、ドメインを介して複製を制御するというモデルと矛盾しない。

## Rif1 はどのように Rif1CS を認識し結合するか？

RifBS に Rif1CS を同定し、それが機能的に重要であることもわかったので、次は「Rif1 が Rif1BS に直接結合するか？そしてその結合は Rif1CS に依存するか？」という問題になる。Rif1 は動物細胞発現系を用いて精製できたので、すぐに Rif1BS を持つ DNA 断片を用いて gel shift や DNaseI footprint などを行った。しかし、どのようなアッセイを行っても結合は弱く、野生型と変異体で差を見出すことができなかった。Rif1CS は 5G あるいは 6G の連続した G を有する。他の配列をみると、この他にも 3G の連続配列が散在していることに気づいた。そこで Rif1BS はなんらかの特殊な構造を形成する可能性を想定した。G-rich 配列を有する一本鎖 DNA は特殊な構造を形成し得ることが知られている。そのなかでもグアニン 4 重鎖構造は以前から多くの研究がされていたが、これまでその普遍的な生物学的意義は大部分不明であった。Rif1BS を含む 2 本鎖 DNA を熱変性・再生した後に PAGE に流

すと、遅く泳動されるバンドが生じた。Rif1CS の変異体では同じ処理をした後このバンドは生じなかった。さらに、G4 に特異的に結合する化学リガンド、7-deaza dGTP、DMS footprint、CD 解析など種々の方法をもちいて、この配列は G4 構造を形成し得ることを確認した。重要なことは、この G4 構造は、Rif1CS あるいは他の G 連続配列の変異により消失あるいはその量が減少することであった。

次に精製した Rif1 タンパク質を用いてゲルシフトアッセイを行った。その結果、今度は確かに Rif1 は G4 構造を形成した DNA に選択的に結合することが明らかとなった。また、Rif1CS に変異を有する DNA には結合しなかった<sup>2</sup>。

これらの一連の実験から、Rif1 は遺伝子間領域に存在する潜在的な G4 構造を認識し結合することが強く示唆された。今後、Rif1BS 上に形成される DNA 高次構造の特異性および、Rif1 との相互作用の詳細を明らかにする必要がある。

G4 構造は実際に形成されるのか？  
また細胞内ではどのように形成されるのか？

上記の実験では、多くの場合 Rif1BS を含む一本鎖 DNA、あるいは二本鎖の場合は熱変性した後に使用している。細胞内ではどのようにして二本鎖 DNA から G4 構造が形成されるのであろうか？二本鎖 DNA が一過性に一本鎖に変換される過程としては、複製、転写などが考えられる。実際、複製の過程で G4 構造が形成され、複製フォークブロックとしてゲノム不安定性を増加させること、それを一連の G4 ヘリカーゼが G4 構造を破壊することにより解除しゲノム安定性の維持に貢献していることがよく知られている<sup>9</sup>。Rif1 は複製に先立ち G1 初期に染色体に結合するので、転写が貢献する可能性が考えられる。実際、Rif1BS 二本鎖 DNA を転写するとゲル上で遅く泳動するバンドが現れ、これは DNA-RNA ハイブリッドを形成すること、Rif1CS に依存すること、7-deaza GTP や 7-deaza dGTP では形成されないことが明らかになった (正井ら、未発表データ)。すなわち Rif1BS が転写され、DNA-RNA ハイブリッド上に RNA を含むハイブリッド G4 構造が形成される可能性が示唆された。細胞内でも転写により Rif1BS 上に G4 構造が形成されるかどうかは今後の解析を待たねばならない。

## Rif1 による複製・組換え・修復・転写制御のメカニズム

2014 年に、多くのグループから、Rif1 が二重鎖 DNA 切断 (DSB) の修復時に 53BP1 を介して相同組換え依存性修復 (HR) を抑制し非相同末端接着修復 (NHEJ) 経路を促進するという報告



Rif1 binds to G quadruplexes and suppresses replication over long distances.  
Kano H, Matsumoto S, Fukatsu R, Kakusho N, Kono N, Renard-Guillet C, Masuda K, Iida K, Nagasawa K, Shirahige K, Masai H.  
*Nat Struct Mol Biol.* 2015 22(11):889-97.

## 研究成果の紹介

がされた<sup>10-15</sup>。DSB に応答して Rif1 が核内に foci を形成することは以前から知られていた<sup>16</sup>。また、Rif1 ノックアウト (KO) マウスは E12.5 で死亡するが、Rif1KO によりクラスター遺伝子を中心に転写のプロファイルが大きく変動することも明らかとなった (吉沢、山崎ら; 未発表データ)。複製タイミングの制御とこれらの染色体ダイナミクス制御が共通のメカニズムでされるのか、あるいは、distinct なメカニズムが関与するのか今後の研究の発展が期待される。Rif1 による複製タイミング制御に関して Hiraga など複数のグループから Rif1 による PPase1 のリクルートが重要な役割を果たす事が報告された<sup>17-19</sup>。脱リン酸化酵素により、Cdc7 キナーゼなどによるリン酸化に拮抗し複製開始が阻害される。本学術研究においても升方先生のグループは、Taz1 や Rif1 による複製ダイミグ制御のメカニズムを詳細に解析し、テロメアと腕部の相互作用を通じた染色体の空間的制御が重要であることを明らかにしている。私達は、複製タイミングの制御においては Rif1 によるクロマチンドメインの形成とその空間的制御と PPase1 のリクルートが協調的に比較的大きなドメインの複製開始を抑制するというモデルを現在考えている。今後 Rif1 が染色体 fiber の折りたたみを空間的にどのように制御するかの解析が重要である。

## 非コード DNA としての非 B 型 DNA

今回の研究から、Rif1 は遺伝子間領域 (非コード DNA 領域) に存在する G4 構造を認識し、複製タイミングドメインの形成に貢献する可能性が示された。これまで G4 構造を始めとする非 B 型 DNA は試験管内での性質は詳細に解析されてきたが、細胞レベルでの機能は大部分不明であった。今回の研究から G4 構造が核内染色体ドメインの形成に関与する可能性が示唆された。動物細胞の Rif1 も G4 構造に特異的に結合することを見だしてあり (森山ら、未発表データ)、Rif1 による G4 構造認識とそれによる染色体ドメイン制御は進化的に保存されている可能性がある。Rif1BS の配列は、通常の G4 構造の consensus 配列 ( $G_{23}N_{1-7}G_{23}N_{1-7}G_{23}N_{1-7}G_{23}$ ) とは大きく逸脱している。実際分裂酵母ゲノム上で推定された G4 構造のプロファイル<sup>9</sup> とは殆ど一致しない。Rif1BS の二個の G 連続配列は 100bp ほど離れており、その他の短い G 連続配列もクラスター形成せず散在している場合が多い。そのため Rif1CS を同定してから、G4 構造の可能性を検討するまで長い時間を要した。最近の研究から G4 構造を形成し得る配列の可塑性が明らかになっており、今後、実際に細胞内で形成される G4 構造を明らかにすることが重要となるであ

ろう。最近、ヒト染色体複製起点の近傍に G4 構造を形成する配列が存在すること、その構造が複製開始に重要であることを示唆する事が報告されている<sup>20,21</sup>。このように G4 構造は染色体ダイナミクスの多様な側面と鍵となる役割を果たす可能性がある。

これらの研究から、小林新学術の課題である、非コード DNA 中の重要な因子の一つが、G4 構造を含む非 B 型 DNA であると私達は考えている。多様な G4 構造あるいはその他の非 B 型 DNA 構造が、特異的なタンパク質に認識され、種々の染色体ダイナミクスを、非コード DNA 領域を介して制御するメカニズムは今後極めて重要な研究分野となるであろう。

## おわりに

今回の一連の研究は、研究室の大学院生、研究員の方々、及び共同研究者の方々の努力、協力により進化した。その過程でいくつかの驚きがあった。ひとつは Cdc7 キナーゼは増殖に重要であるが、細胞はそれをバイパスする種々の方策を有しているということである。これを利用して Cdc7 の主要なバイパス経路として Rif1 を同定した。このスクリーニングでは、当時大学院生だった早野元詞君 (現在 Harvard 大学) が、かなり難しいスクリーニングであるにもかかわらず成し遂げ Rif1 を見つけたことが最初のブレイクスルーとなった。全く予期せぬ因子であったので当時は、この因子がどのように Cdc7 の機能をバイパスするかは全くわからなかった。加納君が、白髭研で開発した BrdU ChIP 技術を駆使して複製タイミングがゲノムワイドで大きく変化していることを発見した時には、全ゲノムのプロファイルを 3MM の大きな紙にはりつけて、にらめっこしたものであった。加納君は引き続き Rif1 結合部位の ChIP-chip 解析に取り組んだ。最初は弱いピークも含めて 155 個の結合部位が同定された。これらの配列の解析に白髭研の Renard-Guillet 博士の貢献が大きかった。彼女はこれらの配列の subset に G-rich の共通配列を見いだした。その後加納君は、ChIP-seq に方法を変えさらに詳細に解析し、強い結合部位 35 個を最終的に同定した。それらの配列解析から Rif1CS の存在、及びその配列の存在様式と結合の強さの相関を明らかにした。Rif1 の発現と精製は、深津理乃さん、Rif1BS と Rif1 タンパクの相互作用については覺正直子さんの、二名の技術員のすばらしい実験技術に多に助けられた。当研究室の松本清治博士は分裂酵母研究のプロで、すべての研究の側面において、重要な実験を正確・迅速に遂行し、研究進行において要となった。Rif1 結合部位の核内配置についてのモデリングや配列解析については慶応大学の河野 暢明博士に大変お世話になっ

た。また白髭研の増田晃士博士にも研究の後半で情報解析をしていただいた。また、東京農工大の飯田啓介博士および長澤和夫教授には G4 構造一般についての多くの重要なご教示をしていただき、きわめて特異性の高い G4 リガンドや DNA を供与していただき、これらの試葉なしには研究は進展しなかった。あらためてこれらの多くの共同研究者に心から感謝したい。

最後に、私達がこの研究を遂行することができたのは、4 年間にわたり小林武彦教授をリーダーとする非コード DNA 新学術に公募研究で採用していただいたことが、大変大きな要因である。研究費の支援はもちろんのこと、太田研究室では動物細胞 Rif1 の ChIP-seq 解析で久郷和人、村幸子博士らに大変お世話になった。また班会議での discussion も大変励みになった。小林教授始め、本新学術の関係者の皆様に心からの感謝の気持ちを表明したい。どうもありがとうございました。

## 参考文献

- Hayano, M. *et al.* Rif1 is a global regulator of timing of replication origin firing in fission yeast. *Genes Dev* 26, 137–150 (2012).
- Kanoh, Y. *et al.* Rif1 binds to G quadruplexes and suppresses replication over long distances. *Nat Struct Mol Biol* 22, 889–897 (2015).
- Hayano M, Kanoh Y, Matsumoto S, Masai H. Mrc1 marks early-firing origins and coordinates timing and efficiency initiation in fission yeast. *Mol Cell Biol* 31, 2380–2391 (2011).
- Matsumoto, S., Hayano, M., Kanoh, Y. & Masai, H. Multiple pathways can bypass the essential role of fission yeast Hsk1 kinase in DNA replication initiation. *J. Cell Biol* 195, 387–401 (2011).
- Kanoh J, Ishikawa F, spRap1 and spRif1, recruited to telomeres by Taz1, are essential for telomere function in fission yeast. *Curr Biol* 11, 1624–1630 (2011).
- Tazumi, A. *et al.* Telomere-binding protein Taz1 controls global replication timing through its localization near late replication origins in fission yeast. *Genes Dev.* 26, 2050–2062 (2012).

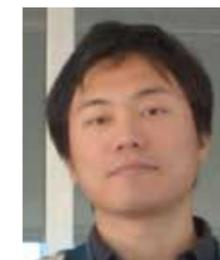
- Yamazaki, S. *et al.* Rif1 regulates the replication timing domains on the human genome. *The EMBO Journal* 31, 3667–3677 (2012).
- Cornacchia, D. *et al.* Mouse Rif1 is a key regulator of the replication-timing programme in mammalian cells. *The EMBO Journal* 31, 3678–3690 (2012).
- Sabouri, N., Capra, J. & Zakian V. A. The essential *Schizosaccharomyces pombe* Pfh1 DNA helicase promotes fork movement past G-quadruplex motifs to prevent DNA damage. *BMC Biology* 12, 101 (2014).
- Zimmermann, M., Lotterberger, F., Buonomo, S. B., Sfeir, A. & de Lange, T. 53BP1 regulates DSB repair using Rif1 to control 5' end resection. *Science* 339, 700–704 (2013).
- Di Virgilio, M. *et al.* Rif1 prevents resection of DNA breaks and promotes immunoglobulin class switching. *Science* 339, 711–715 (2013).
- Chapman, J. R. *et al.* RIF1 Is Essential for 53BP1-Dependent Nonhomologous End Joining and Suppression of DNA Double-Strand Break Resection. *Mol. Cell* 49, 858–871 (2013).
- Escribano-Diaz, C. *et al.* A Cell Cycle-Dependent Regulatory Circuit Composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP Controls DNA Repair Pathway Choice. *Mol. Cell* 49, 872–883 (2013).
- Callen, E. *et al.* 53BP1 mediates productive and mutagenic DNA repair through distinct phosphoprotein interactions. *Cell* 153, 1266–1280 (2013).
- Feng, L., Fong, K. W., Wang, J., Wang, W. & Chen, J. Rif1 counteracts BRCA1-mediated end resection during DNA repair. *J. Biol. Chem.* 288, 11135–11143 (2013).
- Silverman, J., Takai, H., Buonomo, S. B. C., Eisenhaber, F. & De Lange, T. Human Rif1, ortholog of a yeast telomeric protein, is regulated by ATM and 53BP1 and functions in the S-phase checkpoint. *Genes Dev* 18, 2108–2119 (2004).
- Hiraga, S. I. *et al.* Rif1 controls DNA replication by directing Protein Phosphatase 1 to reverse Cdc7-mediated phosphorylation of the MCM complex. *Genes Dev* 28, 372–383 (2014).
- Davé, A., Cooley, C., Garg, M. & Bianchi, A. Protein Phosphatase 1 Recruitment by Rif1 Regulates DNA Replication Origin Firing by Counteracting DDK Activity. *Cell Rep* 7, 53–61 (2014).
- Mattarocci, S. *et al.* Rif1 Controls DNA replication timing in yeast through the PP1 Phosphatase Glc7. *Cell Rep* 7, 62–69 (2014).
- Cayrou, C. *et al.* New insights into replication origin characteristics in metazoans. *Cell Cycle* 11, 658–667 (2012).
- Valton, A. L. *et al.* G4 motifs affect origin positioning and efficiency in two vertebrate replicators. *EMBO J.* 33, 732–746 (2014).



松本 清治 博士



加納 豊 博士



早野 元詞 博士

## 「君」 vs. 「さん」 vs. 「先生」

昭和時代が生んだ人気漫画の代表と言えば、「サザエさん」と「ドラえもん」でしょう。どちらも小学生の日常を描いていますが、その描写に決定的な違いがあるのをご存知でしょうか。正解は、「小学生の同級生どうしの呼び方」の違いです。サザエさんでは、女子が男子を呼ぶ時は「磯野君」、男子が女子を呼ぶ時は「花沢さん」「早川さん」「カオリちゃん」。ドラえもんでは、女子が男子を呼ぶ時は「のび太さん」、男子が女子を呼ぶ時は「しずちゃん」です。つまり、女子が男子を呼ぶ時に使うのが「君」か、「さん」かという違いです。そんなことどうでもいいという声があるかもしれませんが、いえいえ、呼称はとても奥が深く、人間関係の構築において非常に重要です。

以前、京都大学のN先生が「昭和39年生まれの人から同級生の男性を“君”で呼ぶようになったんだよね～。それまでは“さん”だったのに。僕は女性が男性を“君”って呼ぶのは嫌いだな～」と私におっしゃいました。日本全国的に見ると、昭和39年生まれからというはっきりした区別はないと思いますが、それはさておき、「君」は上から目線で男性的な言葉だという御意見でした。「君」userの私からすると、君は「くん」というやさしい響

きで親しみがこもっているイメージなのですが、男性、特にある一定以上の年齢の男性にとっては、とてもえらそうな響きに聞こえてしまうようです。同じ言葉がこんなに違う印象になってしまうのは、とても困ったことです。

そもそも「君」という呼称は、幕末武士の間で流行ったのが現代に受け継がれているという説が有力です。「君」はもともと尊称であり、今も国会では議長が議員のことを「○○君」と呼ぶように、目下に使う言葉ではありません。学校で男子生徒のことを「○○君」と呼ぶようになった後、“男の子供”から転じて、同輩や後輩の男性を「○○君」と呼ぶことが普及したそうです。慶応義塾大学では今でもすべての教職員が「君」付けで呼ばれていますが、この場合の「君」には、本来の尊称の意味と、福沢諭吉が唯一の眞の先生であるという意味の両方がこめられているとのこと。私が大好きなフィギュアスケート業界では、後輩スケーターは先輩男性スケーターのことを「君」付けで呼びますし、某芸能事務所でも先輩を「君」付けで呼びますので、尊称の意味での「君」が国会以外で絶滅したわけではありません。

しかし前述のように、現在の多くの日本人には同輩が後輩の男性に対して

のみ「君」を使用する文化が浸透しています。問題は、「君」＝目下という上下関係を常に意識する人（主にある一定以上の年齢の男性）と、全く意識しない人がいるということです。最近、男女平等の観点から男子生徒も女子生徒も「さん」付けで呼ぶことを教師に強制する学校が多いのですが、私は、男子生徒を「君」付けで呼んだからと言って男女平等だとは全然思いませんし（本来尊称ですから）、男子生徒や同輩、後輩の男性を「さん」付けで呼ぶのは逆によそそしい感じがします。女側の私からすると、「女々しい」「主人（夫）」「家内（妻）」「奥（妻）」という類の単語の方がダイレクトに差別的意味を含んでいて強い不快感をおぼえます。最近、私の周りでは自分の夫のことを「主人」と呼ばず、「旦那」「夫」「個人名（ニックネームなど）」と呼ぶ女性が増えたように思います。男性も「家内」「奥さん」ではなく、「妻」「ワイフ」と呼ぶ人が増えたのではないのでしょうか。関西では、お笑いの影響で妻のことを「(うちの) 嫁(さん)」と呼ぶ人がかなり多いですが、

話を研究室での呼称に移しますと、これがまた奥深いです。私は、学生の時から基礎生物学系の環境の中で過ごしてきました。学生時代、多くの学生



加納 純子  
阪大・蛋白研

は指導教員のことを「Y先生」と呼んでいましたが、一部の上級生は「Yさん」と呼んでいました。そう言えば、京都大学の某Y研では、学生は全員、指導教員のことを「Yさん」と呼んでいましたし、卒業してからもそのままです。基礎科学系では、目上の教員に対しても「さん」付けで呼ぶ文化が強く残っているようです。サイエンスにおいては目上も目下も関係ないという考えがベースにあるのでしょうか。逆に、「先生」は嫌味を表現する時に使用されるから注意しろと教わりました。用例として、私がコントロールのない実験データを発表したとしましょう。その際、「は～、さすが加納せんせい、そのデータで結論を導こうとされているんですね。いやあ、すご～い」などと年上から言われるわけです。「さすが加納せんせい」と言われたからといってニヤッと笑って喜んでいたら、愚の骨頂です。つまり、少なくとも理学部系では「先生」と呼ばれる立場にない時に「せんせい」と言われたら、それは95%以上の確率で嫌味（＝アホ、バカ、ボケ）であるということです。今日まで知らなかった方は、今後ご注意ください。

「嫌味のせんせい」ルールの根底には、誰でも「せんせい」と呼ぶ医者や

弁護士に対する抵抗があるように思います。多くの医学部では、指導される立場にある学生であっても目下であっても「せんせい」と呼ばれます。なぜそうなっているのか、歴史的背景は私にはわかりませんが、ドクターの日本語訳を「せんせい」としてしまっただけでしょうか。病院で患者と医師を区別するためだと苦し紛れに説明した医師がいましたが、それならば、薬剤師も看護師も「せんせい」と呼ぶべきでしょう。研究室での呼称で最も難しいシチュエーションとなるのは、基礎系の人と医学系の人と同じ空間に存在する時です。私が以前所属した研究室（基礎系）には、一人の「先生（＝ボス）」と一人の「せんせい」がいました。その「せんせい」は、私と同じ年齢の男性医師で、博士号を取るために大学院生として研究をしに来ていました。その時の私は博士号取得済みの助教でしたから、なぜ同じ年の彼を私が「せんせい」と呼ばないといけないのか不思議でなりません（その人は私のことを「加納さん」と呼んでいました）。その状況に学生さんたちも戸惑っていたに違いありません。一方、海外のラボではボスのことをfirst nameだけで呼ぶのが普通です。「Professor ○○」と呼ぼうものなら、変な目で見られる

でしょう。郷に入らずんば郷に従えと言われるように、その場その場で最もふさわしい呼称を使うことが良好な人間関係の構築に重要だと思われます。

研究機関における呼称には、さらに奥深いルール（のようなもの）があり、若い頃に知り合った人の呼称が年月や状況とともに変わることもあります。ある一定以上のポジションに就いた時に変わり目を感じるがよくあります。例えば、昔は「君」付けで呼んでいた後輩（よそのラボ出身）が教授になったら、その人を「さん」あるいは「先生」付けで呼ばないといけないうかかなと感じる状況が増えますし、昔は「さん」付けで気軽にお話していた若手教員の方が大教授になってしまった今となっては「先生」と呼ぶべきなのかと悩むこともよくあります。逆に、自分が教授になった途端に他の人を「先生」付けで呼び始める人もいます。「かしこまったメールと会議の時だけ、先生を付けたいいいんだよ」と教えてくれた先輩がいますが、そう単純なものでもないような。同年代の研究者で「さん」がOKな人と「先生」じゃないとダメな人が同席している場合にどう呼ぶのかなど、呼称の判断はいつも難しく、人間力が試されるように感じます。

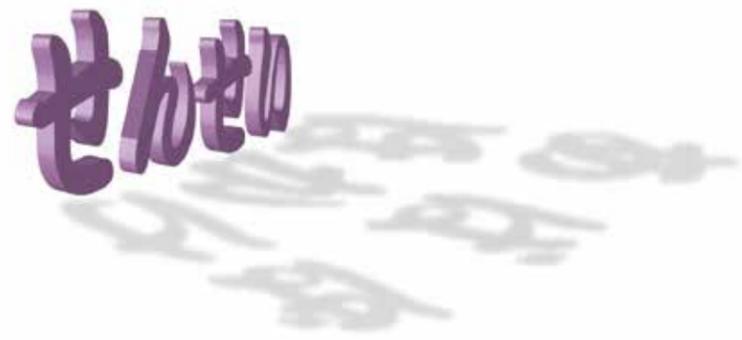
### 新学術領域研究「ゲノムを支える非コード DNA 領域の機能」 終了シンポジウム

## 「ゲノム研究の未来」 — インターメアと染色体制御 —

本新学術領域も本年3月をもって5年間の研究期間を終了する予定です。これまで領域の発展に貢献していただきました関係者の皆様に感謝申し上げます。領域の総括として、終了シンポジウムを下記の通り開催する予定です。何かとご多用とは存じますが、ご予約表に組み込んでおいて頂ければ幸いです。

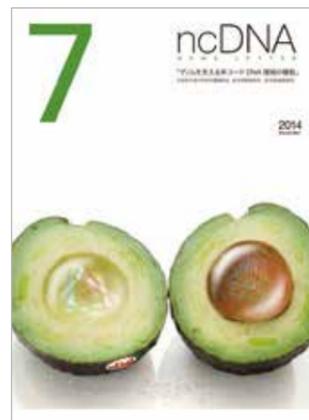
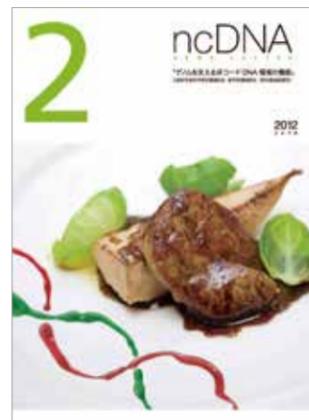
日時 2016年3月22日(火) 13:30～

会場 東大弥生キャンパス（中島記念ホール）  
（詳細は追ってHP等でご案内させていただきます）



アーカイブ

ncDNA 表紙集



国際シンポジウム「Non-coding DNA and Chromosomal Integrity」  
新学術領域「ゲノムを支える非コード DNA 領域の機能」第9回領域会議

平成27年8月5～8日 (於 淡路夢舞台国際会議場)

本新学術領域の第9回領域会議と国際シンポジウム「Non-coding DNA and Chromosomal Integrity」が8月に淡路夢舞台で開催されました。

最初の2日間は、各班の代表と分担者、合計28名がそれぞれの進捗状況を発表し、今後の方針について相談しました。後半の2日間は第1回国際シンポジウム「Non-coding DNA and Chromosomal Integrity」を開催しました。

今回の国際シンポジウムでは海外から5人の演者、Hironori Funabiki 博士 (ロックフェラー大)、Wolfgang Fischle 博士 (KAUST、サウジアラビア)、Thomas Glover 博士 (ミシガン大)、Olivier Cuvier (CNRS、フランス)、Miguel Ferreira (IGC、ポルトガル) を招待し、また国内からは木村宏先生 (東工大) を招待して、領域内の2名の演者とともに、非コード DNA と染色体恒常性の維持に関する最新の研究について発表してもらいました。

会議の運営で尽力していただいた皆さん、大変お疲れ様でした。



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. 9 2016 January

編集後記

冒頭の小林代表の巻頭言にもありますが、今回の9号は本領域の最後のニュースレターになります。これまで原稿を寄稿して下さった領域関係者の皆様には大変お世話になりました。「染色体機能を支える非コード DNA 領域の機能」、班員の皆さんの精力的な研究で大きく進みましたが、全体像の理解はまだまだ先のように感じられます。本領域の成果、人的ネットワークをさらに発展させて、『インターメア』の実態解明につながれば幸いに存じます。最後になりますが、センスの良い表紙のデザインを担当していただいた、トリスの渡辺勇生さんと関係者の皆様に感謝したいと思います。長い間ご愛読下さりどうも有り難うございました。

# 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）

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9号

2016年1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>