



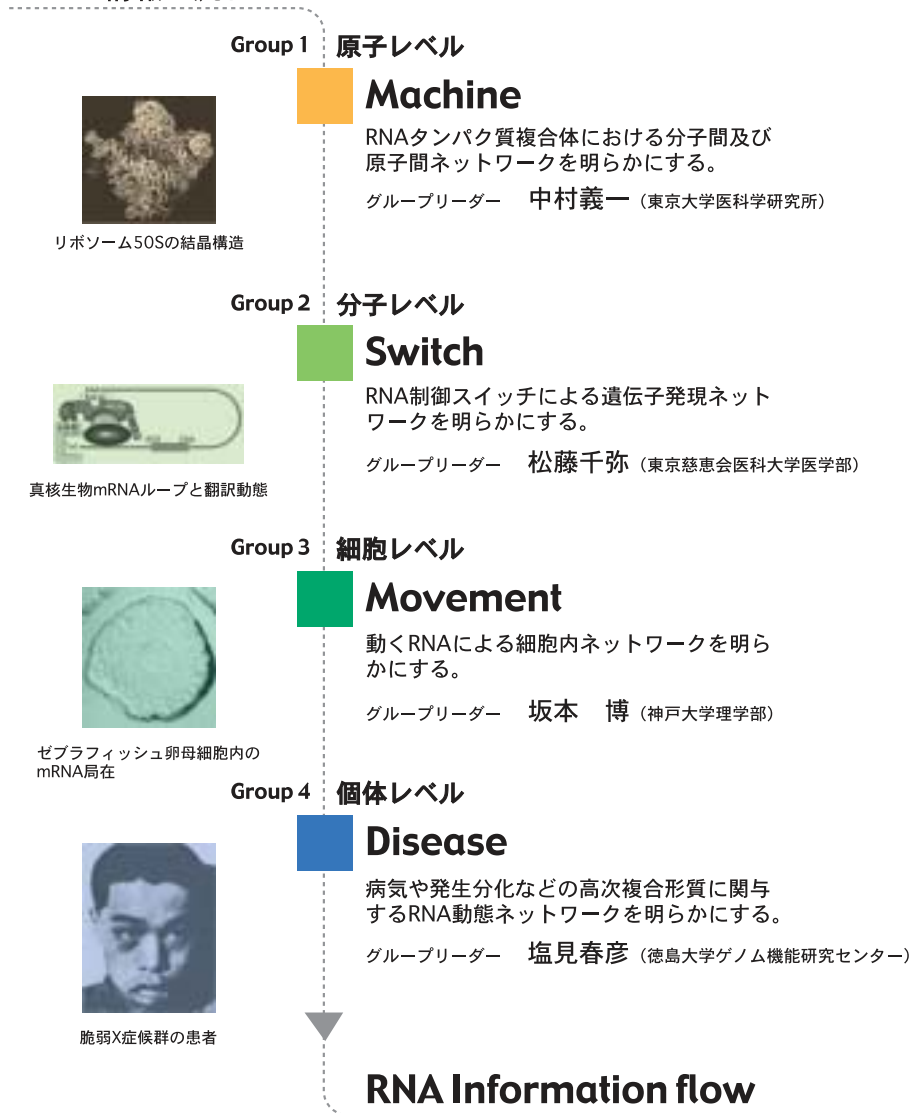
RNA Network Newsletter

Volume 1. Number 1. July 2002

文部科学省科学研究費特定領域研究 2001-2006
RNA情報発現系の時空間ネットワーク
Spatiotemporal Network of RNA Information Flow

研究領域の階層性と計画研究グループ構成

RNA情報の流れ



この特定領域では、ロゴマーク作成や Newsletter 創刊など新しい試みを行なう予定です。皆さま「RNA情報発現系の時空間ネットワーク」のコンセプトを反映させたロゴはいかがでしょうか。4つの四角形は4つの班を表し、色のグラデーションは各班の個性である原子レベル、分子レベル、細胞レベル、個体レベルの階層性と時間軸のイメージも含めています。また、配色も色覚が通常でない人に、それぞれの四角形が区別できるように考慮してあります。

一方、Newsletterの立ち上げを任せられた私は「RNA情報網」立ち上げにふさわしい次世代型（未来志向）の図案に頭を悩ませました。最終的に「原始的なものは、むしろ未来志向である」という結論になり、手でリボソームを表現してみてもどうかということに。右手が50S、左手が30Sサブユニット、クローバーはtRNAのつもりです。

クローバー tRNA の connotation は「三位一体」。三位は、いろいろ考えられますが、例えば、RNA、RNA-binding proteins、RNP machines、または単純にDNA、RNA、Protein。そして、それらを我々の手によって明らかにしていこうというイメージを込めたつもりです。4つ並べた「手によるリボソーム」は、Joachim Frank の「The ratcheting motion of the ribosome」を表現しようと試みました。リボソーム画像の作成は伊藤耕一氏、手のモデルとして東あすかさんに協力して頂きました。

この特定領域のイメージが皆さまに届くことを願うとともに、一方では研究成果を出さなくてはと思いながらも無事 Newsletter を創刊することができました。（Newsletter 編集長 塩見春彦）

新しい RNA 研究を展開しましょう 中村義一	2
海外からのメッセージ Dear my Japanese RNA colleagues, Harry Noller	4
特定領域研究「RNA 情報網」の研究開始に当たって 坂本 博	4
元気が一番 多比良和誠 (第 4 回 RNA ミーティング世話人)	6
随筆 私の RNA との出会い 三浦謹一郎	9
■ミーティング報告■	
上海紀行-第 19 回国際 tRNA ワークショップ参加に託けて- 渡辺公綱	11
Ribosome Conference, Queenstown NZ, 2002 「The Dynamics of Ribosome Structure and Function」 剣持直哉, 内海利男, 鈴木 勉	13
RNA polymerase の molecular memory と RNA mimicry 嶋本伸雄	20
■ RNA Update ■	
特集: 品質管理と多様性の創造 片岡直行, 石垣靖人, 山下暁朗, 武藤 昱, 木下和生, 井上邦夫, 今泉和則, 萩原正敏, 加藤俊治	22
シュードノット 松藤千弥	45
The messenger <i>is</i> the message 塩見春彦	48
若者達 サイエンスを志して 神 唯	50
■海外からの便り■	
前田 明, 羽原靖晃	52
■ New Techniques ■	
ランダムリボザイムライブラリーを用いた機能遺伝子の網羅的探索 川崎広明	56
Society 色覚バリアフリープレゼンテーション 岡部正隆, 伊藤 啓	58
■ Business ■	
遺伝子ネットワークと内分泌攪乱化学物質 近藤昭宏	61
名簿 特定領域研究, 研究者名簿	63

RNA Network Newsletter

Volume 1. Number 1. July 2002

CONTENTS

新しい RNA 研究を展開しましょう

中村 義一 (領域代表)

渡辺公綱先生の特定領域研究の後をうけて、平成14年度より新しいRNA特定領域研究(文部科学省)「RNA情報発現系の時空間ネットワーク(略称:RNA情報網)」を今後5年間にわたりお世話させて頂くことになりました。

ここに本特定領域の立案から採択に至るまで惜しみないご協力を頂きました関係各位に厚くお礼を申し上げます。同時に、本特定領域の計画・公募研究に参加頂きます方々の独創的なインパクトある研究成果を期待しています。

21世紀の生命科学においては、RNA研究が中心的な役割を果たすであろうと考え、RNA情報網という耳なれない言葉を新領域のテーマに選んだ。

第1の要因は、mRNAのプロセッシング・翻訳、リボザイム等の機能性RNAの研究から、RNAの能動的な機能が、すべての生物の、すべての遺伝子発現系で、生命を維持するために普遍的な重要性をもつことが明らかになったことだ。これは、遺伝子発現の研究が、初期の転写を中心とした研究から転写後過程を含めたグローバルな研究へと、広がりや深みを増した結果である。例えば、リボザイム発見の契機となったイントロンは、真核生物において普遍的に存在し、選択的スプライシング(一つのmRNA前駆体から複数のエキソンを選択的に連結することにより異なる種類の成熟mRNAを作る仕組み)は、発生、分化、性決定、環境応答等でかなめの役割を演じているし、その異常は多くの場合致命的である。翻訳因子の異常も細胞の癌化の原因となり、ヒトの遺伝性疾患の原因遺伝子のかなりが、RNA結合性タンパク質にマップされる。それらの個別のシステムの重要性はもちろんだが、そこではたらく装置やメカニズムの間に密接な相互作用が存在する。核内における様々なmRNAの加工(プロセッシング)は、RNAポリメラーゼによる転写と共役して進行し、mRNAの核外輸送は大規模な輸送システムによって触媒され、輸送の完了を待たずに細胞質でタンパク質合成を始める場合もある。細胞質におけるmRNAは、翻訳過程と共役して巧みに安定性が調節され、さらに、mRNAの5'端(Cap)と3'端(poly A)とが翻訳装置の一部をアダプターとして相互にコミュニケーションする。つまり、転写後の調節に係わるすべてのステップが、相互に密接なネットワークを形成して制御されているため、RNA自身あるいはRNA情報発現系の時間的、空間的なネットワークの研究が重要なのである。

RNA情報発現系のネットワークは、原子、分子、細胞レベルで、時間的あるいは空間的に相互作用して、個体レベルの高次な形質を生み出す基盤となっているはずだ。その認識にたった体系的な理解こそが21世紀の生命科学にとって大変に重要であると信じている

第2の要因は、ゲノム研究の急進展。最近数年間で、数多くの生物ゲノムの全塩基配列が決定され、すでにヒトゲノムについてもその概要が明らかにされた。その結果、ヒトの遺伝子の数は4万程度であると推測され、これがどのようにして20万とも見積られるタンパク質の種類を発現できるのか、という問題がクローズアップされた。おそらく、その多様性を生み出す駆動力はmRNAの選択的スプライシングにあると考えられ、生命の多様性と複雑性はRNAの高い機能的なポテンシャルに大きく依存しているはずである。さらにゲノム科学の急速な進展により、個別の遺伝子の機能や発現に影響する遺伝子や突然変異を洗い出し、またゲノム間の比較研究によって、新規遺伝子の機能や発現に関する解析を行うといった、ゲノムレベルのネットワーク研究が可能になった。すでに、ゲノム研究の中心は、塩基配列解析から遺伝子発現やタンパク質の機能に関するポストゲノム研究に移行しつつあり、その流れの中で、RNA情報発現系のネットワークは、プロテオームとならび、重要な研究領域だ。

第3の要因は構造生物学の進歩。様々な技術の進歩により、X線解析に必要な重原子導入にも道が開かれ、播磨のSpring-8を始めとする大型の放射光施設の建設により分解能が飛躍的に向上した。そのため、少量の試料を用い短時間の測定で構造解析に必要なデータがとれ、X線結晶解析に画期的な進歩をもたらした。当然、RNAやRNA-タンパク質複合体(RNP)の構造研究も急ピッチで進展しているのが世界の現状である。1998年からは、4つのグループ(T. SteitzとP. Moore, H. Noller, B. Ramachrishnan, A. Yonath)から分子量270万というリボソーム自体のX線結晶解析の成果が出はじめ、それからわずか3年で、2.4-3Å分解能の構造が発表された。この事実、超分子RNP複合体に関する構造生物学も本格的な研究フェーズに突入したことを象徴しており、RNAとタ

ンパク質の相互作用を分子間のみならず原子間ネットワークとして研究することが、重要かつ feasible なものとなっていることを示している。

「RNA 情報発現系の時空間ネットワーク」では、表紙裏に示すように、RNA や RNP 複合体の構造や RNA の「動き」といったミクロの領域から、モデル動物やヒトの病気といったマクロの領域までを含めて、RNA を縦糸にして織り成す RNA 情報発現系の時間的・空間的なネットワークを明らかにしたいと考えている。RNA 情報発現系のネットワークは、原子、分子、細胞レベルで、時間的あるいは空間的に相互作用して、個体レベルの高次な形質を生み出す基盤となっているはずだ。その認識にたった体系的な理解こそが 21 世紀の生命科学にとって大変に重要であると信じている。

世界的にも RNA 研究は、今後、単純化と複雑化という両方向への大規模な展開をみせることが予想される。波及効果も、おのずとそれらの両方向に期待される。単純化とは、一例をあげるならば、リボソームをはじめとする翻訳装置の精密立体構造の決定により、翻訳の根本反応はリボザイムで行われることが証明され、翻訳因子の動的な役割が明瞭に提示されるだろう。リボザイムの反応は、翻訳反応に限られるものではない。生物のもつ主たる二つの属性は遺伝と代謝であるが、遺伝を司る複製、転写、翻訳のみならず、代謝を司る種々の生化学的な反応も、最初はリボザイムで触媒されていたことを示唆する証拠が得られるかもしれない。これらの研究の先には RNA ワールド仮説が実験的に検証され、生命の RNA 起源説が確立されるのではないかという期待がある（このことは、すでに渡辺特定領域研究においても指摘された）。我々が機能的な研究により発見したタンパク質と RNA の分子擬態は生物学にとって新しい概念だが、生命が RNA ワールドからタンパク質ワールドへと進化してきたことを考えれば、生命の基本原理のひとつかもしれない。分子擬態は進化の過程で、なぜ、どのようにして、RNA の働きがタンパク質で置き換えられたのか、あるいは置き換えられなかったのか、という生命の進化のプロセスをたどる貴重な糸(分子化石)となり、タンパク質や RNA の工学においても新たな分子デザインの扉を開くものと期待される。その先には、基礎と応用の両方向の研究がお互いを活性化しつつ、かつ、お互い

その先には、基礎と応用の両方向の研究がお互いを活性化しつつ、かつ、お互いを統合するような研究へと進展するのではないだろうか。こうして RNA 研究は、我々研究者を生命現象の根本的な理解へと導き、生命の構築原理の解明に大きく貢献することはまちがいない。我々の 5 年間のミッションはそこにあると考える

を統合するような研究へと進展するのではないだろうか。こうして RNA 研究は、我々研究者を生命現象の根本的な理解へと導き、生命の構築原理の解明に大きく貢献することはまちがいない。我々の 5 年間のミッションはそこにあると考える。

本領域研究推進のコアメンバーには 40 才前半の新進の研究者(坂本、松藤、塩見)に参加頂き、領域研究の運営にも新しい試みを導入したいと思います。まずは、これまで RNA ミーティング(日本 RNA 学会)に先立ち開催された合同班会議を、毎年数名の(established or promising)外国人研究者を招待する国際シンポジウムに変え、国際的な研究の進捗と感性が RNA 学会の若い方々の刺激になることを期待しています。合同班会議は正月明けの(未だ皆様が忙しくなる直前に)2泊3日の予定でしっかりと進捗状況をご報告頂く予定。また、塩見春彦さん(徳島大学)が編集長として活躍して頂き「RNA ネットワーク」ニュースレターを年 2 回発行の予定です。従来の実務的なものから大胆に変身して、若者向けの「RNA タウン誌」的なもの、スナップショットもあり、読んで面白く、きれいで、とっておきたいニュースレターにしたいと考えています。また、JT 生命誌研究館でサイエンスコミュニケーション&プロモーションセクターのチーフとしてご活躍の工藤光子さんに表紙のデザインやロゴの作成等でご協力を頂きましたので、魅力的なものに仕上がると思います。国内外の生命科学の研究者へ広く配布する予定です。どうぞ、我々の新しい試みにご期待下さい。

プロフィール

1977 年京都大学大学院理学研究科修了、理学博士。1978 年より東京大学医科学研究所の助手、助教授をへて、現在、遺伝子動態分野の教授。趣味スキー。

中村 義一
(領域代表)



◆ 海外からのメッセージ ◆

Dear my Japanese RNA colleagues,

June 8, 2002

I wish to extend my warmest congratulations to my Japanese RNA colleagues for this important support from your government. There is no doubt that it will be repaid many times over by future research progress in the RNA field by scientists in Japan.

Sincerely,

Harry Noller



プロフィール
Professor of MCD Biology,
and Robert L. Sinsheimer
Prof. of Molecular Biology
University of California
Santa Cruz

Harry Noller

特定領域研究「RNA 情報網」の研究開始に当たって

坂本 博 (神戸大学理学部)

この4月から本格的な研究が開始された特定領域研究「RNA 情報発現系の時空間ネットワーク」(略称: RNA 情報網)のスタートアップに当たって、ニュースレター編集長の塩見さんからの依頼で、3班「動くRNA」の班長としてのメッセージを書くことになりました。さて何を書こうかと考えあぐねましたが、まずはこれまでの日本のグループ研究の流れやそれに関連する事柄を簡単にまとめて、その後で私が班長を務める3班の取り上げる研究内容について私のイメージを伝えたいと思います。

振り返ってみると、日本における広い意味でのRNAについてのグループ研究は十数年前にスタートした重点領域研究「遺伝暗号の可変性」(代表:名古屋大・大澤省三教授,平成元~3年度)から本格化しました。ついで、その流れは重点領域研究「RNA 機能構造の新視点」(代表:東大・横山茂之教授,平成4~7年度),重点領域研究「RNA レプリコン」(代表:東大・野本明男教授,平成4~6年度),特定領域研究「RNA 動的機能の分子基盤」(代表:東大・渡辺公綱教授,平成9~12年度)と連綿と継続され、そして今回の特定領域研究「RNA 情報発現系の時空間ネット

ワーク」(代表:東大・中村義一教授,平成13~18年度)へと発展してきています。この間、国際的に見て重要な多数の研究成果がこれらのグループ研究から発信され、「RNA」という物質のさまざまな側面をテーマとした研究が日本において着実に認知されるようになってきました。そのことは今回グループ研究が特定領域研究としては最長期間にわたるものになったことから分かります。そして今や、このような流れを背景にして、日本におけるRNA研究をさらに発展させる義務が本特定領域研究の全メンバーに課せられていると言っても過言ではないでしょう。

それでは、この課題を達成するためには何が必要なのでしょう。もちろん、本特定領域研究の個々のメンバーがRNAの持つさまざまな側面について優れた研究成果を出すことがまずは第一です。私自身も良い意味で強いプレッシャーを感じています。しかしまた一方で、グループ研究の特性を活かしたメンバー間の共同研究も必要であると思います。この原稿を書いている今、日本と韓国ではワールドカップサッカーが開催されており、国の名誉をかけた激しい戦いが繰り広げられています。これを見ていると、

試合に勝つためにはスーパースターの卓越した個人プレーだけではなく、複数のプレーヤーによる優れた連携プレーがいかに大切かよく分かります。特定領域研究のような、今のところ日本以外では見られない(?)大型のグループ研究の特性を活かして、そのような連携プレーによる素晴らしい成果も是非あげてみたいものです。

日本のRNA研究をさらに発展させる上で、もうひとつ忘れてはいけないことは、若手研究者の支援・育成です。かく言う私は40代半ばで、自分ではまだ若手であるという意識を持っています。しかし、新しいものを作り出すという点では、やはり20代後半から30代のパワーには負けるかもしれません。現在RNA研究に多少なりとも従事している若手研究者・大学院生に言いたいことは、お仕着せではなく、自主的に何かことを成そうという気概を持って欲しいということです。そして、そのような活動を私たちが何らかの形で支援することが大切だと考えています。私と谷時雄さんが呼びかけ人になって行った六甲山(平成9年8月)と志賀島(平成10年7月)の「RNA研究若手の会」はなかなか有意義で楽しいミーティングだったと思います。若手の会は、現在RNAミーティング(日本RNA学会年会)として発展的に解消していますが、そろそろテーマや目的を絞った若手中心の積極的活動が始まることを期待しています。

さて次に、3班「動くRNA」についての私なりのイメージを伝えたいと思います。この班で目指したいことは、RNAやRNA結合タンパク質の核・細胞質間輸送を制御する分子機構やRNA局在化を制御する分子機構を探り、RNA情報発現システムが密接に関係する細胞機能維持や細胞増殖・分化の分子基盤を明らかにすることです。また、

スプライシング調節機構の問題も取り上げます。これは、ショウジョウバエの性分化制御機構に見られるように、選択的スプライシングによる細胞分化制御のさまざまな事例がこれからも発見されることが期待できること、そして、最近 mRNA の核外輸送において、スプライシングを受けた後に mRNA 上に形成される複合体 (Exon Junction Complex あるいは Post-Splicing Complex) の重要性が明らかになってきたからです。全体としての流れは、スプライシング→核外輸送→細胞質局在化→RNA機能発現→細胞機能維持、細胞増殖・分化制御といったイメージです。このような研究を進める上で、RNAやRNA結合タンパク質の挙動をリアルタイムで視覚化し追跡することは基盤的技術として大変重要になると考えます。また、3班の研究テーマは、2班「RNA制御スイッチ」で研究テーマとする翻訳や mRNA 動態の制御、そして4班「高次複合系 RNA 動態」で研究テーマとする発生・分化、病気、神経活動なども密接に関係しますので、班の枠組みを越えた連携プレーも推進していきたいと考えています。

そろそろテーマや目的を絞った若手中心の積極的活動が始まることを期待しています

最後に一言。RNAの働きの解明を中心とする研究は、RNAという物質を取り上げて

いる点で特徴的である反面、一見どのようにアプローチしたらよいか分かりにくい面があるように思えます。しかし、あらゆる生命現象が遺伝情報の発現制御を基礎としていることを考えれば、あらゆる生命現象にRNAの働きが重要であるとみなすことができます。そして、例えば線虫 *C. elegans* で数年前に見つかった RNA interference という現象が動物に普遍的現象であることが分かったように、RNA情報発現をベースにした未知の生命現象がまだまだ数多く眠っていると思います。これからのRNA研究ほど、私たちのオリジナリティーが試され、また活かされる研究分野はないのではないのでしょうか?



坂本研究室

プロフィール

1986年京都大学大学院博士後期課程修了、理学博士。京都大学理学部助手、神戸大学理学部助教授を経て、2000年より現所属、教授。

坂本 博
(神戸大学理学部)

元 気 が 一 番

多 比 良 和 誠

〔 東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻
独立行政法人産業技術総合研究所 〕

久しぶりに日本が元気になった。森島と中田の活躍のおかげで昼間のビールをおいしくいただき、塩見先生から依頼されていた原稿に着手する気分になった。正直なところ、期限が切れて既に半月たっているのでノーチョイスである。論文に関しては「夜中に書き始め、終わるまでは帰宅しない」というのが私の鉄則であり、犠牲になっている学生も多い。この原稿も今夜書き終えないと、来週は塩見先生の顔が恐ろしくそうなので、いつもの通りコップを片手に書き終えることにする（夜中の3時を回ったところなのでコップの中身に関しては想像にお任せする）。さて、内容であるが、普通の「総説」でも「人生」について語っても構わないとのことなので、普通の「総説」より少し柔らかいタッチで、我々の研究を中心にその周辺について語ってみたい。

長めの自己紹介から RNA との出会いまで

本来なら、日本 RNA 学会の会誌に相応しい「RNA 研究の歴史」について書けたらいいのだが、私自身の RNA 研究の歴史が浅く、とても手に負えない。渡辺公綱先生と志村令郎先生が執筆された「RNA 研究の歴史と展望」（「RNA 研究の最前線」シュプリンガー・フェアラーク東京、2000）を読ませていただき、私自身が身をもって感じた「RNA 研究の歴史」がいかに浅いものであるかを再認識した。私が RNA に初めて触れたのは意外に遅く、約 10 年前である。

私は、長崎県島原半島の普賢岳の麓で 1952 年に生まれたが（多比良<タイラ>という地名がサッカーが盛んな国見町にある）、酒飲みの親父を若くして亡くしたのを機に母親が職を得るために引っ越し、中学時代を五島列島で過ごした。五島の中学卒業後は、競争率 0.9 倍の地元唯一の県立高校へは進学せず、国立佐世保高専へいった。高専卒業後、一端就職し社会人になったものの、学問への飢えを感じ始めるとともに「このままでは人生面白くないかな」と思い、渡米した。社会人になって貯めた 100 万円を片手に、資金がなくなるまで勉学に励むことにしたのである。佐世保には米軍基地があり、高専時代に基地のアメリカ人とよく遊んでいたので渡米には全く抵抗がなかった。

アメリカでの生活は厳しいものの、学生生活を満喫し、

1984年にイリノイ大学大学院理学研究科化学専攻で Ph.D. を取得した。大学院時代の指導教官であったゴーレンスタイン教授は、時間的なプレッシャーを全くかけない人だったので、「やらされる」ことなく、自発的に目標に向かって研究ができたのが幸いであった。化学の分野では一番権威のある J. Am. Chem. Soc. を中心にドクターの研究で 10 報ほどの論文を仕上げたので、まだ記録は敗られていないと信じている。とにかく、ほとんどの時間をラボで過ごしたが、プレッシャーがなかったので（性格的にあまりプレッシャーを感じないので）、やりがいのある楽しい学生生活であった。私のワークホリックの癖はアメリカの大学院時代についてのかもかもしれない。

大学院では物理有機化学に興味をもち、有機合成をしてその有機化合物の反応性を速度論的にしらべたり、化学反応を左右する有機分子の電子雲に関する福井謙一先生の「フロンティア軌道理論」に関する論文を読みあさった。1981年、感激していた「フロンティア軌道理論」で福井先生がノーベル賞を受賞されたので、感無量であった。

ドクターを取るまで生体分子に触れる機会が無かったが、ペンシルバニア州立大のベンコヴィック教授のもとでポストドクをしたときに初めて、希望して、タンパク質工学と酵素反応速度論の研究に従事した。3年間のポストドク生活の後、1987年、当時の通産省・工業技術院、現在の産業技術総合研究所に職を得て帰国し、ポリ塩化ビフェニル（PCB）分解菌の遺伝子解析を古川謙介室長（現九大教授）のもとで行った。そのころ、ハンマーヘッド型リボザイムが発見され、私は「どうして、全長がせいぜい 30mer 程度の短い RNA が酵素として働くのだろうか」と疑問に思い、しらべたくなった。これが RNA との出会いの始まりである。

ハンマーヘッド型リボザイムは金属酵素

リボザイムの研究を始めるといっても、それまで RNA に触れたことが無かったので、まずは昔とった杵柄で、分子軌道計算から手がけた。計算結果は意外と面白く「RNA 分解反応において、2'-酸素がリンを攻撃するより 5'-酸素がリンから離れるのが難しい」、つまり、5'-酸素がリンか

ら離れる段階が全体の律速段階であり、また更なる軌道計算から「金属イオンが5'-酸素に結合するとRNA分解が起こる」という結論に達した。つまり、「リボザイムは金属酵素」であることを分子軌道計算が示唆してくれた。その後の速度論的解析からも、「リボザイムが基質に結合すると、そこに二価の金属イオン、具体的にはマグネシウムイオンを取り込む穴が形成される。要するに、ある種のリボザイムはMg(II)が取り込まれる足場を提供しており、このMg(II)の作用によって相手のRNAが切断される」ということが支持された。

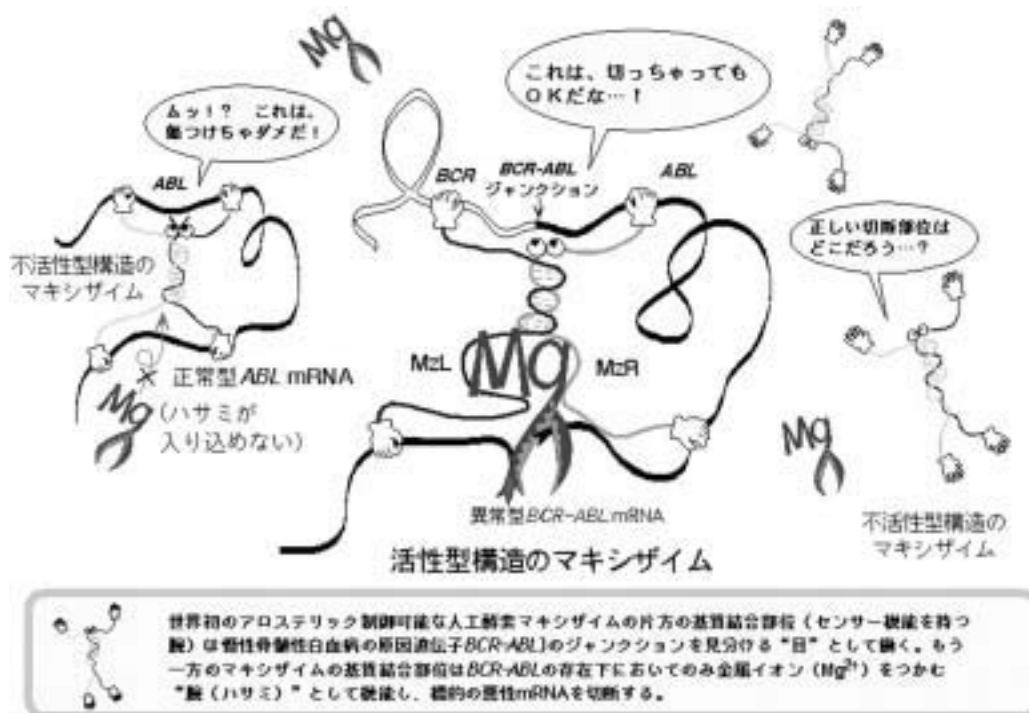
しかし、メカニズムの研究は奥が深く(?)、他の解釈も可能な場合がある。国際的には、RNA分野の大御所であるウーレンバック教授のメカニズムが引用される。しかし、ウーレンバック・ハーシュラグ・メカニズムが本人らにより頻繁に書き換えられていることに気づいているRNA研究者は多くないと思う。「5'-酸素の脱離が律速であり、そこにMg(II)が直接配位することにより、RNA分解が加速される」という、我々のメカニズムに抵触するような実験データは無いと思うし、この10年間(提案して以来)我々はメカニズムを変えることなく、全てのデータを同一メカニズムで説明している(JACS 124:3850, 2002; 124:4595, 2002; Suzumura et al., JACS in press 2002)。キネティクスのマニアックである高木康臣と院生になって間もない井上敦が、8月にイギリスで開催される「Ribozymes and RNA Catalysis」のEMBOワークショップで、ウーレンバック、ハーシュラグ両教授を説得する手はずになっている。うまくいったら高木にドクターを与えることにしよう。

基礎研究と応用研究は意外に近い

リボザイムの構造と機能の相関を速度論的に解析する目的で、余分と思われる配列を削っていき、その過程で20mer程度でダイマーを作って活性型になる現象を見つけた。速度論的解析という基礎研究からダイマー構造を発見したので、少し付加価値が付けられないか考えてみた。つまり、その二量体という特性を積極的に使って何か細胞内でできる事はないだろうか考えてみたわけである。その結果、「慢性骨髄性白血病(CML)の原因となるBCR-ABLキメラmRNAがちょうど良いターゲットとなる」と思った。このCMLの原因であるBCR-ABLキメラmRNAを除去すれば、白血病細胞のみを特異的に殺すことができることがわかっていたが、正常な細胞に悪影響を与えないようにするためには、BCRとABLのジャンクションをリボザイムで切断する必要があった。しかし、ジャンクション付近には、野生型のリボザイムの切断可能な配列がなかった。

そこで、「ヘテロ二量体」には基質認識部位が2ヶ所ある特徴を生かして、片方をキメラmRNAのジャンクションに結合するように設計。もう片方は少し離れたところにあるリボザイムが切断できる配列に結合できるように設計した(図1)。つまり、片方が目、もう片方にハサミとして作用するMg(II)イオンを取り込むのを助ける手の役割をもたせることにした。BCR-ABLキメラmRNAのジャンクションに結合した時のみ、ハサミを助ける手が働くようにしたのだ。つまり、ハンマーヘッド型リボザイムは金属酵素であることと、ヘテロ二量体構造の特性を活かして、ジャンクション配列の有無によってリボザイム活性のオン・オフ(金属イオンを取り込むか取り込まないか)ができるよ

図1



うにしたのである。(図1)

漫画を具現化できるすばらしい学生－研究は「人」

図1のアロステリック酵素のアイデアを当時のあるRNA研究者に説明したところ、「絵に描くのは簡単だが、実際はそんなにうまくいくはずがない」とのコメントが返ってきた。実は、私がねずみの絵を書いても誰もねずみと思ってくれなかったりする。それが原因だとは思わないが、結構ネガティブな人がいるものだと感じた。図1のイラストは桑原知子（現在は薬科知子）という当時の学生がデザインしてくれ、私は大変気に入っているの、いまだにT大のマーク代わりに名刺に使っている。彼女はデザインだけでなく研究でも抜群のセンスと才能を持っていた。多分この研究は桑原知子と薬科雅岐という、週100時間以上働く馬力ある学生がいなかったらできなかったと思う。細胞の中で切断活性を調べるには多数の発現コンストラクトを設計したり、細工をする必要があり、実際、器用さだけでなく力仕事も要求されたからである。ケミストリーの切り口の強みと、器用な担当者の登場、この二つの要因が融合した結果、動物モデルにおいても成功をおさめた日本オリジナルのアロステリック酵素（マキシザイムと命名）が誕生した(図1)。

漫画が具現化したもうひとつの例として、ハイブリッド・リボザイムがある(図2)。細胞を扱い始めて感じたことは、「試験管内反応と違い、細胞内でのリボザイム反応の律速段階はターゲット部位を捜すところ」である。リボザイムと基質 mRNA の相互作用を考えると、RNA 酵素の最大の欠点は RNA であること、つまり、酵素も基質も同じ負の電荷を帯びていることである。DNA を切断する制限酵素は、結合部位が正の電荷を帯びており、負の電荷を帯びた DNA 上をリニアモータみたいに走りながら認識配列を捜

すことができる。直線上でスライディングできれば、速度論的に不利なアソシエーション・ディソシエーションの繰り返しによる捜査を回避できる。リボザイムの活性を上げるために最初に描いた漫画は、RNA 上をリニアモータみたいに走るリボザイムであった。しかし、リボザイムのみでは負電荷が邪魔してうまくいかないの、正電荷をもつタンパク質等に結合させる必要があった。

また、この分野での最大の難問は、標的となる mRNA のどの領域を狙うかによって効き目が大きく違ってくることである(実際は効かないことが多く、アンチセンス分子を使うことはナンセンスだという人も多い)。その理由は、標的となる mRNA は直線状ではなく、大部分が二本鎖のステム構造で、一部が一本鎖のループ構造などからなる高次構造をとっているからである(図2)。したがって、アンチセンス分子やリボザイムは一本鎖のループ領域には結合し塩基対を形成する(切断する)ことができるが、二本鎖のステム領域を狙うと分子間の塩基対よりも分子内塩基対のほうが強いために、外から導入したリボザイムやアンチセンス分子は効かないということになる。

「いろんなゲームをやったが、最先端のサイエンスを国際的な競争の中で行うのが一番贅沢で飽きないゲームだ」

といて、コンピュータなどでどこが開いた領域であるかを予測するのも、必ずしも容易ではない。しかしよく考えてみると、mRNA は常に外に対して閉じた硬い高次構造をとっているわけではない。いつもそういう構造をとっていたのでは、いざというときに遺伝情報が正確に読めなくなるからタンパク質合成の際には、

このような硬い高次構造はほぐされる必要がある。では何が mRNA の高次構造を解きほぐすかという、それは RNA ヘリカーゼという酵素である。私の発想はリボザイムが結合しやすい一本鎖のループを予測するのではなく、逆に RNA ヘリカーゼの力を利用して、高次構造をくずしてやればよいという考え方であった。具体的には RNA ヘリカーゼとリボザイムの複合体を細胞の中で発現させ、ヘリカーゼとの複合体(ハイブリッド・リボザイム)によって開かれた mRNA にリボザイムを作用させるというアプローチをとったわけである(図2)。

このアイデアはかなり早い時期に出し、T大のある名門研究室でドクターを取ったポスドクに4年間任せた。しかし、彼は馬力が無く進展が見られなかったの、仕方なく薬科雅岐にバトンタッチした。薬科は才能があり、桑原と競って週100時間以上働く元気な学生だったので、テーマを与えられて半年後には図2のアイデアがうまくいくことを証明してくれた。

ハイブリッド・リボザイムによる高次構造の解きほぐしと切断

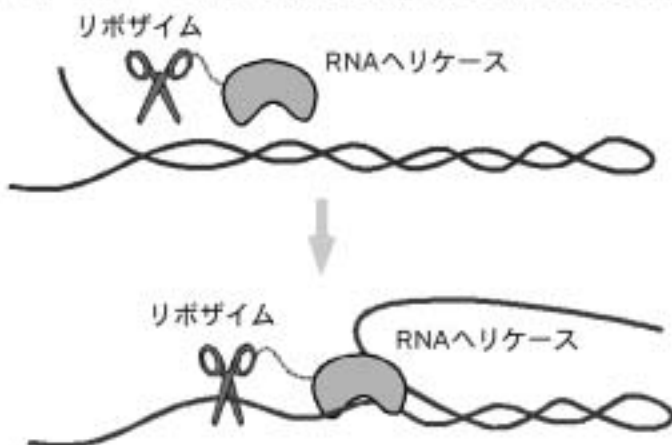


図2

「いい基礎研究は必ず応用性があり世の中の為に役立つ」と信じて

基礎研究だけで終わらせたくなかったので付加価値を高め、世の中の為に役立つものにしようと努力した。その結果、図2の万能性を生かして「ジーンディスカバリー」という概念を生み出した。具体的には、DNA ベクターのレベルでリボザイムの結合部位をランダム化し、そのプールをある細胞に導入する。例えば Fas (アポトーシスのレセプター) を発現している細胞に導入。ランダム化したリボザイムが、「死になさい」という信号を核内に伝えるのに大事な mRNA を切断すると、シグナルがそれ以上伝わらなくなり細胞が生き残る。リボザイム・ライブラリーを導入した後、Fas を刺激し、生き残った細胞を調べてやれば (回収したリボザイムの結合配列を読めば)、表現型を指標に細胞死に関係している遺伝子の同定が可能になるわけである。

本来、こういう競争の激しい分野では新規遺伝子をとる事は大変困難なことだと考えられていた。しかし、我々の手法を用いると、迅速かつ効率よく新規機能遺伝子を同定することができる。助手の川崎広明が中心になり、実際、アポトーシス関連の新規遺伝子を150以上発見した (Nature Biotechnol., 20:376, 2002; EMBO Rep., 3:443, 2002; Onuki et al., PNAS 99, in press, 2002)。

同様な手法で、院生の須山英悟はがんの転移に関係するような遺伝子を、また、同じく院生の大貫礼子はアルツハイマー関連の遺伝子を数多く発見している。これらの技術は、助手の宮岸真のRNAi発現ベクター (Nature Biotechnol., 20: 497, 2002) とともに、ポストゲノムと言われる機能ゲノム学の強力なツールとなりそうである。

さいごに

本稿で名前が出てきた共同研究者の共通点は「元気さ」である。今回は紹介できなかったテーマに従事している元気な学生を含め、彼(女)らは共通して、ゲーム感覚で最先端の研究を楽しんでいるように見える。ちなみに、私は研究時間に関しては何も束縛しない。「いろんなゲームをやったが、最先端のサイエンスを国際的な競争の中で行うのが一番贅沢で飽きないゲームだ」と彼(女)らは言う。たくましかぎりである。何と言っても、「元気が一番」。元気な人が増えると日本も元気になる。彼(女)らは

< <http://www.chembio.t.u-tokyo.ac.jp/chembio/labs/taira/index.html> >
で頑張っている。仲間は歓迎する。



プロフィール

1984年イリノイ大学大学院理学研究科博士課程修了, Ph.D. ペンシルバニア州立大学ポスドク後, 1987年帰国。通産省・工業技術院(現・独立行政法人・産業技術総合研究所)主任研究官を経て, 1994年筑波大学応用生物化学系教授に。1999年より現所属, 教授(産総研・併任)。

多比良和誠

東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻・独立行政法人産業技術総合研究所

◆ 随筆：RNA and I ◆

私の RNA との出会い

三浦 謹一郎

小, 中学生の頃から理科少年だった私は生きものに興味を持ちながらも化学にとりつかれていた。大学では化学を専攻したものの, 将来は生命体の仕組みを物質的に解き明かして行くような方向に進みたいと思い, 大学院(新制度の大学院の第一期)ではその方面の新進気鋭の渡辺先生の研究室を目指した。しかし, 渡辺先生はカリフォルニア大

学のウイルス研究所に2~3年出張されることになっていたので, 「もし大学院に入学許可が下りたら, 自分が戻るまで同じ東大理工学研究所(後の宇宙研)の蛋白質化学の安藤教授の研究室に入って修士課程の勉強をするように」と指示された。これはしかし, 後から考えると私自身にとって大変よいトレーニングの機会となり, 核酸だけでなく

蛋白質についても基礎をしっかり身につけることができたのではないかと思っている。

1952年に生命科学の道に入ったわけだが、50年前ということになる。安藤研ではDNAの相手になっているプロタミンの構造研究が行われていたが、助手の石井信一さんからアミノ酸分析や生体高分子の構造研究方法を習うことができた。1年たつ頃には渡辺研の助手の先輩方から「渡辺先生はまだ1年ぐらい先でないかと帰国しないけれども、そろそろ渡辺研へ来て核酸の研究を始めないか」と誘われたので、渡辺研へ移った。渡辺研には当時3人の助手(宇井信生、川出由巳、鈴木撃之)が居られて、大学院生は私一人だったので私にとっては特に恵まれた状態であった。しかも研究所の第四部は物理化学の研究者が多く、生体高分子の研究が盛んに行われていたので、学生にとってはぜひいたくな環境であったといえる。渡辺研では最初鈴木さんが、後には川出さんが主に面倒を見て下さり、テーマとして細胞内のRNAを分別することとRNAの塩基組成分析をすることが与えられた。助手の先生達はカリフォルニアの渡辺先生とはよく連絡して居られるようだった。これが私のRNAとの出会いで、1954年のことであった。WatsonとCrickのDNAの二重らせん構造モデルの提出が1953年のことだったが、その頃RNAは、ときにはまだPNA(pentose nucleic acid)とも呼ばれることもあるぐらいで、細胞内にどんな分子種があってどんな働きをしているのかがわかっていなかった。そのあと数年から10年の間にメッセンジャーRNA、リボソームRNA、アミノ酸転移RNAがはっきり区別されて命名された。大学院に入ってすぐの頃から核酸についての本をできるだけ読んでいたが、一番印象に残っているのは細胞の中でのRNAを顕微分光測定で調べることについて記したT.Casperssonの細胞学的な本“Cell Growth and Cell Function”で、友人の木村孝一君と二人で輪読した。研究を進めるのに実験方法を開発することが大事であることも学んだように思う。この本とJ.Brachetの論文などから、細胞内での蛋白質合成にRNAが絡んでいるようだということがわかった。

私の研究は細胞からRNA全体を抽出した標品をイオン交換クロマトグラフィや塩析によって分別することであり、また分別したRNA分画の塩基組成や分子の大きさを分析することであった。クロマトグラフィは安藤研で見習ったアミノ酸やペプチドに対して行われる方法をRNAやヌクレオチドや塩基の分別にうまく使えるように条件を検討した。核酸自体の分離をするにはその頃作製されたイオン交換繊維を文献に従って自分で調製して用いたりもした。こうした方法でRNAの標品を大きさの違いによって分離

し、RNAの不均一性を示すことができた。細胞からできるだけおだやかにRNAを抽出し、1~2Mの食塩で塩析すると、沈澱部分のRNAは大きくて細胞顆粒(リボソーム)のRNAで、可溶部分のRNAは小さくて後には転移RNAと同定されるsolubleRNA(sRNA)であった。sRNA分画を分析すると、第5のヌクレオチドと思われる未同定のヌクレオチドが含まれていることを見付けていた。しかし、量的に少なく同定できずに放つて他の仕事をした。pseudouridylic acidを発見しそこなったのだった。少しあとでpseudouridylic acidが発見されたときにはとても口惜しい思いをした。大学院3年めの年(1955)に渡辺先生が帰国され、そのときからフェージ感染後に現れるフェージ特異的なRNA研究グループに入って32PでラベルされるRNAのヌクレオチド組成分析を分担した。渡辺先生からはバクテリアの増殖、フェージの扱い方、細菌やウイルスの定量の仕方などの他、ラジオアイソトープ実験の手ほどきを直接に教えていただき、研究の進め方も教えていただいた。このようにして次第にRNA研究にはまってしまい、魅力的なRNAのとりこになった。渡辺先生は後に京大ウイルス研の教授をつとめられ、さらに慶應義塾大学医学部に分子生物学教室を開設され、日本の分子生物学の発展に尽力された。慶応の時代にはRNAフェージの増殖機構の研究に力を入れられ、RNAの魅力にとらわれておいでだった。慶応大学を定年で止められるときだったか富士山のような形をした山の頂の上を覆うように浮かんでいる雲にRNAのsituationを託した画を書かれた。RNAが生命科学の根源的な物質であるという意味だったようだ。

私のRNAとの出会いはまさに渡辺格先生のお導きによるものであったわけだが、その後の約50年の主テーマは蛋白質の合成機構であり、蛋白質とともにいまだにRNAの魅力にとりつかれている。

プロフィール

1958年東京大学大学院化学系研究科修了、理学博士。京大ウイルス研究所助手、コロンビア大学研究員、東大理学部・応徹研助手、名古屋大学理学部助教授、1969年国立遺伝学研究所分子遺伝部長、1983年東大工学部教授、1991年学習院大学生命分子科学研究所長を経て、現在プロテオス研究所社長。

三浦 謹 一 郎

(プロテオス研究所)

◆ ミーティング報告 ◆

上海紀行

— 第 19 回国際 tRNA ワークショップ参加に託けて —

渡辺公綱 (東大・新領域)

4月6日から11日にかけて中国上海の中心地で第19回国際 tRNA ワークショップが開かれた。このワークショップは英国のケンブリッジで1969年に開かれたのが最初で、以来約2年毎に世界各国で開催され、tRNAを中心としてそのときどきの翻訳まわりのトピックスが紹介されてきた。私は1983年に日本の箱根で開かれた第10回から1回を除き毎回参加しているので、約20年間にわたってこの分野の研究者とつきあってきたことになる。私が最初に参加した頃は tRNA アイデンティティの研究が本格的にスタートした時期であり、またリボザイムのまさに揺籃期であった。その後ゲノム研究の飛躍的な進展とともに tRNA-酵素複合体の X 線結晶解析など構造生物学的な研究が大きく発展したが、最近の数年の間に、いわゆる tRNA プロパー以外の研究者が徐々に参加しなくなってきた。それはその間に、tRNA 自身の研究が次第に飽和し、その周辺の、ARS や翻訳関連因子、さらにはリボソームやリボザイムなどの研究が盛んになるにつれて、Cold Spring Harbor の Translational Control に関するカ

「しかし日本人は original なものを真似しながら、それをうまく融合して新しいものを作るのに長けている」

ンファレンスや Ribosome Meeting, 米国での RNA 学会の設立と RNA Meeting, ARS Meeting, など関連した国際学会が殆ど毎年のように次々と開催されるようになって、研究者の関心が徐々に分散していったからである。(またこの10年間で分子生物学の誕生からこのバイオブームの勃興までの渦中であって、常に tRNA 研究をリードしてきた世界の有力な研究者たちが次々に引退したり、亡くなったりして世代交代が行われたこともある。)それでも前回までは毎回200~300名が参加していたが、今回はついに150名を切ってしまった。それには、一つは地理的な制約(日本での過去2回の開催時には、大学院生を含む多数の若手研究者に渡航費の補助を約束して、積極的に参加を呼び掛けたと記憶している。それほど極東地域は米国からもヨーロッパから遠いことを今回改めて実感した。), もう一つは1月に米国で ARS Meeting (本来なら昨年9月末に開かれる予定だったのが、テロの影響で4カ月遅れたため)、1月末から2月にかけてニュージーランドで Ribosome Meeting と関連学会が短期間に相次



渡辺研究室 (前列左から4番目の女性が華東理工大学の張さん, 前列右から3番目が筆者)



豫園

いで開かれたことが大きく影響している。実際、これまで常に参加していた米国の大御所の P. Schimmel や O. C. Uhlenbeck らは来なかったし、やはり常連でオーガナーになっていたドイツの M. Sprinzl やスエーデンの G. Bjork も不参加だった。そのせいもあってか、やたらと目立ったのはフランスと日本の研究者であった。また地理的な理由から日本を始めとして中国や韓国、インドからの新たな参加者が多かったことも特徴的であった。そのせいもあってか、今回はインドのバンガローで、2004年に開催されることになった。

私は1997年に返還直前の香港に一度観光で行ったことがあるだけで、いわゆる中華人民共和国の中国に行くのは初めてだったので、このワークショップの参加を口実に、実は中国を直接経験することに大きな期待を抱いていた。ワークショップでは旧知の友人と旧交を暖めたこと以外さしたる収穫はなかったが（最近是国内の学会でもそうなので、これは私の年のせいかも知れない）、現在の上海を目の当たりにして、予想以上の感慨をもった。それは新生中国の躍進ぶりを体感したことであり、かつ旧き良き時代のなごりをふんだんに残している文化遺産に接し感動したことである。

初めて知ったが、上海は今や人口1,700万人の世界一の大都市であり（因みに、次に大きいのは北京で1,400万人、1,300万人の東京は第三位だそうである）、3年前に新設された浦東空港から旧上海市街（黄浦江という河を挟んで西側なので浦西という）に向かう途中の浦東新区と呼ばれる地域は最近急速に開発されており、巨大な工業団地になっている。黄浦江に面した有名なテレビ塔や浦西の中心をなす人民広場周辺の立派なビル群と活気溢れた上海人の活動ぶりをみながら、ふとプラットホームや電車の床に何のためらいもなく座り込んで、携帯電話をかけたり、化粧をしたりする日本の若者の姿が目につくが、日本もこの13億

（日本の人口の10倍で、世界人口の何と1/4に近い）の民を擁する中国にあらゆる面で早晚追いこされるのではないかという危惧を覚えた。日本人の良き特質であった、自制心からなる「恥の文化」までをまさに捨てさろうとする現在の日本は、確かに大きな時代の曲り角に差し掛かっている気がするが、それは文明の飽和期の徴候なのだろうか。

現在私の研究室に、上海にある華東理工大学の張さんという女性助教授が文科省の留学生として滞在しているので、彼女に案内してもらっていろいろなところを見ることができた。華東理工大学では張さんの所属する（日本式にいうと）生物工学研究所を見学した。生理活性物質の探索や、それを利用した有用物質生産などに力を入れている。日本に留学したスタッフが何人かいて、米国偏重主義の韓国とはずいぶん違うと思った。まだ遺伝子がらみの研究者層が薄く、張さんへの高い期待をひしひしと感じ、責任の重さを改めて実感した。昼食会には副学長まで出席され、大変な歓待を受けた理由がやっと分かった。

上海市内では、租界や外灘（Bund）、外白渡橋（Garden Bridge）など帝国主義時代のなごりを止める比較的新しい歴史的建造物がそのまま維持されている一方で、豫園（写真参照）周辺の明朝以来の古い町並みには、一種浅草に通じる情緒が感じられ、連綿と受け継がれている上海の歴史の厚みを実感した。思えば上海は南京と並んで三国時代の呉の主要都市だったはずである。

一日、鉄道で北西に向かって1時間位のところにある東洋のベニスと呼ばれる蘇州を観光した。蘇州という名は我々の世代では李香蘭の「蘇州夜曲」で覚えているし、日本では特に寒山寺で有名である。ここは唐代の張継という詩人による「楓橋夜泊」という七言絶句の発祥地でもある。科挙に失敗し船で帰郷する途中、楓橋のたもとで一泊した夜半に寒山寺の鐘を傷心の中で聞いたという詩だそうである。また拙政園という大庭園は明代の王猷臣という政治家が退官後に建造し、自らの失政を自嘲してこう命名したという。それほど財をどうして調達したのかは聞き漏らしたが、日本の現在の政治家ならさしずめ何十、何百という拙政園を作らねばなるまい。

中国ではこのような日本人に馴染みの深い漢詩や漢字が到る所に充満しているところがなんとも懐かしく、漱石の「草枕」の冒頭をさまよっているような気分になり、やはり日本文化のルーツはまさしくここにあることを再認識した。張さんは来日後半年しか経っていないからまだ日本語が十分に使いこなせず（といっても私自身の経験からすれば驚異的な上達ぶりだが）、英語はお互いに危なかしい上に固有名詞は全く発音が異なるため、肝心なやりとりはすべて漢字による筆談であった。しかしそれで全く違和感なく

意志疎通のできるどころが、かえって私の郷愁をそそった。華東理工大学の副学長に「日本文化は元来中国からの輸入である」とその時の実感を、多少お世辞をこめて言ったところ、「しかし日本人は original なものを真似しながら、それをうまく融合して新しいものを作るのに長けている」と聞きようによってはお世辞とも皮肉ともとれる応えが返ってきた。日本のサイエンスの来し方と行く末を重ね合わせて、若干複雑な気分になった。漢字からひらがなやカタカナを創造したことが日本人の独創性のなせる業とすれば、せめてサイエンスでもその能力を存分に発揮したいものだと思った。

プロフィール

1972年東京大学大学院博士課程修了，理学博士。㈱三菱化成生命科学研究所研究員，東京大学農学部，工学部助教授，東京工業大学大学院総合理工学研究科および生命理工学部教授，東京大学工学部教授を経て，1999年より現所属，教授。

渡辺 公綱

(東大・新領域)

Ribosome Conference, Queenstown NZ, 2002 ①

「The Dynamics of Ribosome Structure and Function」

リボソームミーティング in Queenstown

剣持 直哉 (宮崎医科大学)

真冬の日本を抜け出して、半袖Tシャツが心地よいクイーンズタウンの町に到着したのは午後1時を回った頃だっただろうか。寝不足のかすんだ目に飛び込んできたものは、ワカティプ湖の湖面に鮮やかに映し出された、どこまでも青く澄み切った空と氷河によって削り取られた急峻な山々の岩肌であった。

今年の1月27日から2月1日までの6日間の会期中、リボソームに関する国際会議「The Dynamics of Ribosome Structure and Function」がニュージーランド屈指のリゾート地クイーンズタウンで開催された。近年、構造を中心としたリボソーム研究の急進展を受けて数多くのリボソームに関する国際会議が開かれているが、今回の会議もまさに「リボソームの構造と機能」に主眼を置いたタイムリーなものであった。リボソームに関するミーティングは、大きく分けて2つの流れがあり、ひとつは今回のもの、他方は「リボソームの生合成」に重点を置いたもので、両者ともおおむね3年に一回開かれている。この2つの国際会議が長年に渡ってリボソーム研究推進の両輪となり、極めて重要な役割を果たしてきたことは言うまでもない。筆者も、1992年にベルリンで開かれた「The Translational Apparatus」という会議に初めて

もっと多くの学生やポストドクが参加して、世界の息吹を肌で直接感じ取ってほしい。読者の皆さん、この古くて新しい「リボソーム」の世界をちょっと覗いてみませんか？

参加して以来、この会議を毎回心待ちにしてきた。それにしてはベルリン以降の10年間、特にここ2～3年のリボソーム研究の進展には目を見張るものがある。RNAの解析法と構造生物学的な手法、特にクリオ電子顕微鏡やX線結晶解析の進歩に依るところが大きいと思われる。筆者はどちらかというと生合成の方に興味があり構造については専門外であるため、詳細については他の方の報告にお任せして、ここでは全体の雰囲気や特に印象に残ったことなどを中心にお知らせしたい。

今回の開催地クイーンズタウンは、サザンアルプスの山ふところに抱かれたワカティプ湖畔の町で、夏の避暑地、冬のスキー基地として日本でも人気が高く、東大の中村義一教授に言わせると、冬場はほとんど日本人スキー客しかいないとのこと(中村教授もかつてはその一人?)。

日本食レストランや日本人店員のいるショップが至る所にあり、不景気とはいえ今更ながらにジャパニーズエコノミーのパワーに驚嘆することしきりであった。会場となったRYDGESホテルは湖に面した立派なもので、部屋からはニュージーランドの大自然が一望できたいへんすばらしいものであった。ダウントOWNのはずれにあるため、食事の時などは三々五々連れだっただけ湖畔を散歩しながら町中まで行くことができ、慣れない英語に疲

れた頭にはとてもよいリフレッシュになった。

ミーティングはPeter Mooreのオープニングレクチャーに始まり、翌日の、今回最もホットなX線結晶解析に続いた。ノーベル賞の噂(?)も聞かれる中、Tom Steitz, Ada Yonath, Harry Nollerら大御所の発表もあり、活発な討論が行われた。アグレッシブに意見を述べるYonathの姿に、長年リボソームの結晶化に取り組んできた彼女の執念とも言える情熱を垣間見た。さらに、比較リボソーム解析、分子擬態と続き夜の10時頃ようやく2日目を終了した。

3日目はリボソームダイナミクスと翻訳因子、夜にはポスターセッションが開かれた。Joachim Frankはクリオ電子顕微鏡による3次元画像解析法により、伸長過程におけるリボソームの様子を動画も交えて発表した。動画によるプレゼンテーションは、リボソーム全体の動きが、電頭には馴染みの薄い筆者にも手に取るように分かり、たいへんすばらしいものであった。やはり百聞は一見に如かずである。それにしても、クリオ電頭の威力は凄いものだと感心しつつ、コンピューターで構築したあのような動画を見せられるとイメージだけが先行するような危惧も憶えた。夜のポスターセッションは、ワインやビールを飲みながら和やかな雰囲気の中で行われた。アルコールのおかげで会話も幾分滑らかになったような気がする。口頭発表のセッションではなかなか質問しにくいことでもポスターならば気軽に訊ける点がうれしい。筆者のグループは2つの発表を行った。一方は、ヒトリボソームタンパク質遺伝子の構造解析と他種生物との比較について、他方は、同じくリボソームタンパク質遺伝子でX染色体から常染色体にレトロ転位したものについてで、それぞれ大学院の学生がポスター発表した。二人にとっては、国際学会での初めての発

表であったが、高名な研究者からの質問もいくつかあり、貴重な経験になったと思う。

4日目はお待ちかねのフリーデイ。せっかくニュージーランドまで来たのだから、なにか思い出に残るようなアクティビティはと、ダウンタウンのJTB(こんな所にもある!)に駆け込んだ。当地で最も過激なアクティビティは、あのバンジージャンプ。クイーンズタウンが発祥の地とのこと。大学院生に勧めてはみたものの、だれもトライする勇気はなくあえなく退散。ショットオーバージェットという、切り立った渓谷を岩の合間を縫いながらジェットボートで疾走するものも候補に挙がったが、最近事故があったので日本人には勧められないということで、これも断念。結局、ワカティブ湖に流れ込んでいるダートリバーのジェットサファリに参加することにした。究極のエコツアーと銘打っているだけのことはあり、手つかずの雄大な大自然の中を、バスと歩きとジェットボートを組み合わせて探索する、スケールの大きなものであった。

ミーティングもいよいよ終盤の5日目。ドラッグターゲットとしてのリボソームに引き続きオルガネラのリボソームのセッションが持たれた。そこで、ミトコンドリアのリボソームタンパク質の解析に長年携わってきたTom O'Brienからの発表があった。実は、彼とすぐ後の演者であった鈴木勉氏(東大)、ノースカロライナ大のLinda Spemulli(今回不参加)はミトコンドリアのリボソームタンパク質の同定でライバル関係にあり、去年は筆者も含めて激しい競争を繰り広げた間柄だった。幸いにも各々が論文をパブリッシュできたため、険悪な関係に至ることはなかったが、今思うとお互い本当にきつい状態が続いてい



ウォルターピーク牧場でのカンファレンスディナー。右より、吉浜(琉球大, 現宮崎医科大), 中村(東大), 上地(琉球大), 藤原(東大), 内海(信州大; P15 参照), そして筆者。

た。今回3人で話し合う機会もあり、改めてほっとした次第である。リボソームの生合成のセッションの後、夕方には波止場に集合して、カンファレンスディナーが開かれるウォルターピーク牧場へと向かった。これは主催者 Warren Tate のプランで、昔懐かしい蒸気船に乗って、湖の対岸にある人里離れた牧場に出かけ、羊飼いのショーを楽しんだ後、夕食を取る、という心憎いばかりの演出だった。本格的なバンドの演奏もあって、盛り上がった参加者の踊りの輪がいつまでも絶えることはなかった。特に、John Atkins と Knud Nierhaus のエネルギー的なパフォーマンスには驚かされた。その晩ダウンタウンに戻ってきたのは、夜中の12時を大きく回っていた。

最終日、転写後の調節に関するセッションと Richard Brimacombe によるクロージングプレナリーが持たれた。Joan Steitz の NMD (nonsense-mediated decay) に関する発表は、mRNA の品質管理という点で注目が集まった。新たな情報発現のコントロールとして、更なる広がりを見せるものであった。

おわりに、リボソームの国際会議に参加していつも感じるのだが、日本からの若い人の参加が少ないように思える。筆者も含めて毎回お馴染みのリボソーム屋ばかりが集まっているような気がする。今回、200名弱の参加者のうち日本からは18名の参加があったが、多くが常連であったように思う。もっと多くの学生やポストドクが参加して、世界の息吹を肌で直接感じ取ってほしい。読者の皆さん、この古くて新しい「リボソーム」の世界をちょっと覗いてみませんか？

プロフィール

1978年 東北大学工学部卒業。新潟大学医学部、琉球大学医学部を経て2001年より現所属、助教授。

剣持直哉

(宮崎医科大学)

Ribosome Conference, Queenstown NZ, 2002 ②

国際リボソーム会議に参加して

内海利男

(信州大学繊維学部高分子工業研究施設)

リボソームに関する国際会議 (International Conference on the Ribosome) が今年の1月27日から2月1日の間、ニュージーランドのQueenstownで、開催された(参加人数160名)。この会議は1973年に、M. Nomuraらが世話人となり Cold Spring Harbor で最初に開かれ、以来通常3年に一度、世界各地で催されてきた。今回は南半球での最初の開催で、世話人は W. Tate であった。2000～2001年の間、4つの研究グループによる衝撃的なリボソーム結晶構造の報告があったが、今回はその直後に催される国際会議とあって、研究の展開に多くの注目が集まった。この会議への日本からの参加者は徐々に増えており、今回は口述発表が3件とポスター発表が12件もの演題が出された。それぞれ好評であったが、特に中村義一教授は、最も熱が入った分子擬態のセッションで講演し、大きな反響を得ていた(後述)。

既に2000年に報告されているように、T. Steitzらの研

究グループは好塩性古細菌 *H. marismortui* の50Sサブユニットの構造を2.4Åの分解能により解明した。そして、ペプチドを形成するペプチジルトランスフェラーゼ活性に23S rRNAの4塩基による電荷リレーを介してA2451塩基が酸・塩基触媒するというモデルを提案した。私が今回注目した一つに、このモデルが他のデータから支持されているかどうか、ということがあった。A. Yonathらは放射線耐性菌 *D. radiodurans* からの50Sサブユニットを結晶解析(3.1Å)し、構造をSteitzらの *H. marismortui* のものと比較した。その結果、Steitzらの反応モデルで寄与するという4塩基の傾き・方向性が *D. radiodurans* では異なっていることを示し、Steitzらの反応モデルに異を唱えた。また、別な日に発表したA. Mankinはこれら4塩基を他の塩基に置換しても、ペプチジルトランスフェラーゼ活性が残存することを示し、塩基は触媒反応に直接寄与するのではなく、自発的ペプチド結合反応の場を作り上げている、という代案を提言した。Yonathもほぼ同じ考え方の

ようだ。しかし、A2451の塩基置換により細胞が優性致死型になることもまた事実であり、この塩基が仮に触媒反応に直接寄与しないにしてもリボソーム機能に決定的役割を演じていることは確かであろう。A2451塩基の役割については、今後の研究動向を見守る必要がある。

今回の会議に参加するにあたり、私自身に課した最重要課題があった。それは、“結晶構造解析がリボソームの構造変化・動的性質の研究にどこまで役立つのか”，ということであった。これに関して、いくつかの収穫があった。まず、30Sサブユニットの動的性質については、V. Ramakrishnanらが以前より報告していたが、今回彼は、*T. thermophilus* 30Sサブユニットの結晶を開始因子や抗生物質溶液にsoakingすることによって、これらリガンドの結合による構造変化を示した。いずれの結合でも、デコーディングセンターを中心にその下側のbody部分と上側のhead部分の相対位置が変化する大規模な運動が見られた。結晶学の基礎を知らない私にとって、これは新鮮な知見であった。そして、結晶格子の中でこれだけ構造変化が見られるのなら、実際溶液中ならどれほどの変化があるのだろう、という新たな疑問が生じた。ともあれ、結晶中でもリボソームの構造変化がある程度議論で

翻訳反応に関わる成分の構造は
かなり柔軟で、一つの結晶構造
だけでは真実が語れない場合
がある

きそうである。30Sサブユニットに比べ、50Sサブユニットの構造変化は局部的であるようだ。23S rRNAの動的ヘリックス部位の一つ、H69（ヘリックス番号は、rRNAの二次構造上に生物種を超えて見られるステム・ループ構造を、5'側から順に番号で命名したもの）については、個人的に注目していなかった部位で、特に興味を持った。この部位について以下にもう少し詳細に解説したい。

H69は、50Sサブユニットの動的部位として知られるL7/L12部位（H43/H44）とL1部位（H76/H77/H78）とともに、Steitzらの2.4Åの構造モデルでは帰属されず、不規則に運動する部位（disordered structures）として知られていた。H. Nollerらによる*T. thermophilus*の70Sリボソーム構造とYonathらの*D. radiodurans* 50Sサブユニット構造の

比較解析により、これらの部位の動的性質が明確にされた。50Sサブユニット上のこれら三つの動的なRNA部位は結合する三分子のtRNAを挟み込むような位置関係になっている（図1）。H69の先端は70Sリボソームと単離した50Sサブユニットで十数Åも位置的に差があった。この差はH69構造が柔軟であることを物語っている。Yonathは、50Sサブユニットの結晶をtRNA断片の溶液にsoakingし、H69とtRNA間の結合状態を分析した。A、P両サイトのtRNAのアクセプターステムからDステムにかけての部位がH69と接触している様子を報告した。この結果は、Nollerらの70SリボソームとtRNAの複合体の解析結果（図1）と一致していた。また、同じ日に講演したJ. FrankラボのR. Agrawalはクリオ電子顕微鏡によるリボソームとEF-Gの複合体解析の結果を発表し、EF-GのドメインIVの一部がH69領域と接触していることを示した。そして、EF-GがH69と16S rRNAのデコーディングセンター（H44上部）間の相互作用に変化を与える可能性を論じた。これらのデータを総合して考えると、H69はA、P両サイトのtRNA、30Sサブユニットのデコーディングサイト（H44）、そして、EF-Gの全てと相互作用する柔軟な部位と理解することが出来る。私はこれらの知見から一つの仮説を立ててみた。それは、“H69はEF-Gによって促進されるtRNAのトランスロケーション反応に直接寄与する”というものである（図2）。すなわち、EF-GのGドメインとリボソームのL7/L12領域との相互作用によりGTPの加水分解を起こし、そのエネルギーはEF-Gの構造変化を介してドメインIVに伝わり、H69の構造変化を引き起こし、これに伴いtRNAを動かす、という仕組みである。もちろんこの際、前述した30Sサブユニットの構造変化も伴うと考えられる。関連研究者はそれぞれ同様のモデルを描いていたに違いない。H69は今後、複雑、怪奇なトランスロケーション反応の“花形役者”になるかもしれない。

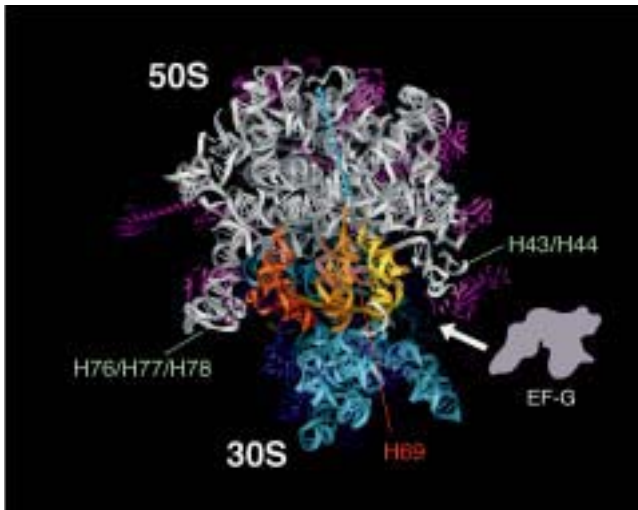


図1 70Sリボソーム-tRNA複合体の結晶構造断面図

30S, 50Sサブユニット境界面をリボソーム上部から観察している。23S rRNA（灰色）中の柔軟なヘリックスH69に赤の太線を加え示す。他の動的ヘリックスH43/H44とH76/H77/H78の位置も示す。23S rRNAと16S rRNA（薄青）の隙間にAサイトtRNA（黄色）、PサイトtRNA（黄土色）、およびEサイトtRNA（オレンジ色）が結合している。tRNAの奥側にはmRNA（暗黄）、またPサイトtRNAのCCA-3'末端に結合する新生ペプチドのヘリックス構造（薄青）が見られる。紫と濃青色のリボンはそれぞれ、23S rRNAと16S rRNAに結合するリボソームタンパク質を示す。EF-Gが結合する方向性も示されている（H. Nollerの許可を得て、*FEBS Letters* 514 (2002) 11-16からの図を一部改変して示す）。

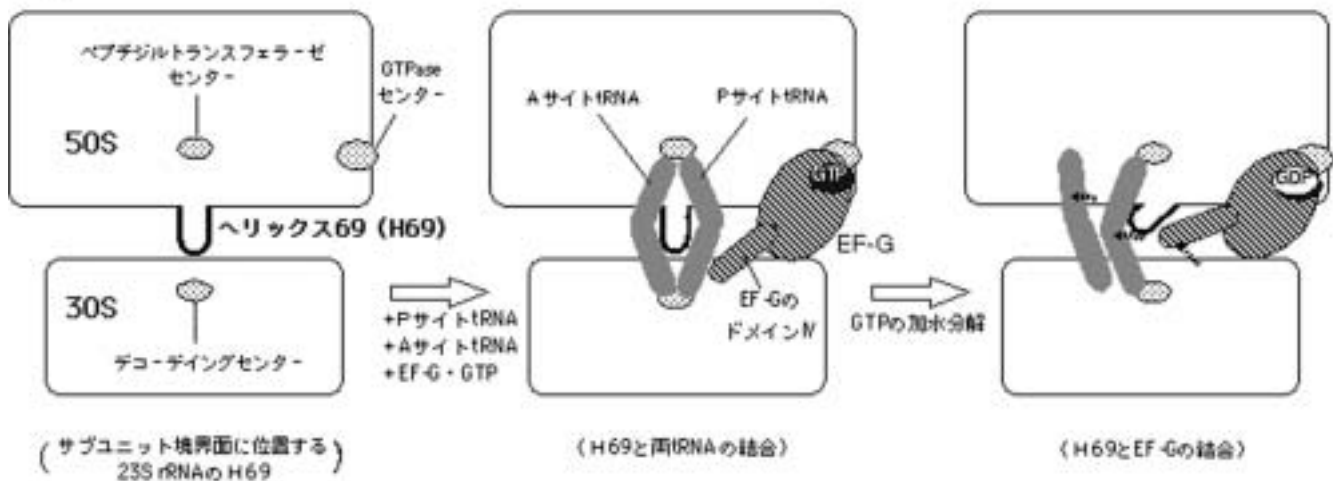


図2

H69の性状についてある程度明らかになってきたのは、結晶解析とクライオ電子顕微鏡による解析の共同作業の成果である。しかし、両者の分析結果に驚くべき差異が生じることも今回の会議で目の当たりにした。B. Vestergaardは解離因子RF2の結晶構造を報告した。その結果によると、ペプチジル tRNA からのペプチド遊離反応に寄与するGGQモチーフ部位と中村義一教授らのグループが発表したストップコドン認識部位 (SPF モチーフ) 間の距離が23Åと比較的近傍に位置し、“GGQ 部位と SPF 部位が、それぞれ50Sサブユニットのペプチジルトランスフェラーゼセンターと30Sサブユニットのデコーディングセンターに同時に結合することは不可能である”と解説した。そしてその後、J. Frankはリボソーム-RF2複合体のクライオ電子顕微鏡による解析結果を示した。驚いたことに、結晶中では隣接していたGGQ部位とSPF部位がリボソーム上で大きく開き、離れていた(図3)。その距離は、ペプチジルトランスフェラーゼセンターとデコーディングセンターの橋渡しが可能に見える。そして、同様のクライオ電子顕微鏡像は、R. BrimacombeとM. van Heelらの研究グループの独立した解析でも観察されたというのである(近日中に論文掲載予定)。午後9時を過ぎていたと思うが、この相反する二つの構造解析結果に会場の熱気は高まった。そして、このセッションが終わったあとも、あるグループはバーで、またあるグループは廊下で、そして各部屋に戻って熱く議論する一夜となった。この両アプローチからの観察結果が両方とも正しいとすると、この差は我々に重要な問題を提起する。すなわち、翻訳反応に関わる成分の構造はかなり柔軟で、一つの結晶構造だけでは真実が語れない場合がある、ということである。この点は以前から指摘されていたことではあるが、今回のRF2の場合はいかにも極端な例である。RF2の構造がこの様に柔軟なのであれば、RF3との結合によりどう変化するか?という興味もわいてくる。リボソームタンパク質、

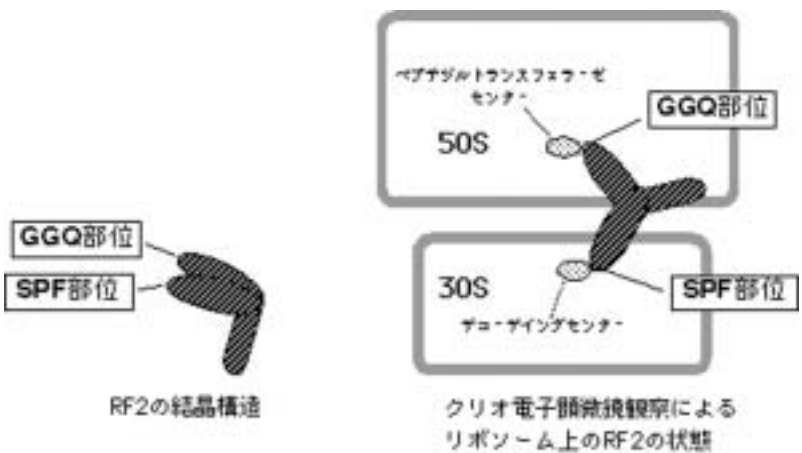


図3

rRNA成分も含め、翻訳反応に関わる因子・成分の構造と機能に関する研究は、今後、著しい構造変化の可能性を考慮しながら進める必要があるだろう。

熱い議論が続くホテル会場から一歩でると、そこは南国の太陽、湖と草花に囲まれたリゾート地で、真冬の信州から出かけてきた私にとっては、夢心地の6日間であった。今回の会議は、一部半信半疑な面は残されたものの、私自身の課題に答える十分な内容があった。最後に、特記しておきたい嬉しいこととして、参加者に若い日本人研究者が増えたことをあげたい。国内からの大学院学生、ポスドク、若い教職員諸氏に加え、海外に留学している研究者等多くの方々と接することができた。この交流を通して、日本のリボソーム研究の若い力を感じる事が出来た。

プロフィール
 1981年新潟大学医学研究科博士課程中退, 1985年医学博士。新潟大学助手, カリフォルニア大学博士研究員を経て1996年より現職(信州大学助教授)
 P14写真参照

内海利男
 (信州大学繊維学部 高分子工業研究施設)

リボソーム研究の新しい潮流

ーリボソームミーティングに参加してー

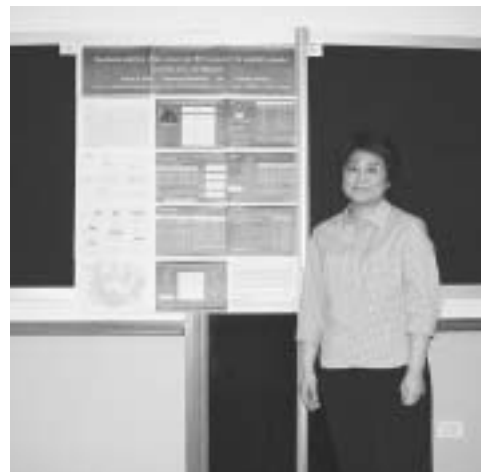
鈴木 勉 (東大・新領域・先端生命)

3年に一度開かれるリボソームの国際会議は、今年の1月に Warren Tate の主催により、ニュージーランドのクイーンズタウンで開催された。今年の目玉はやはり、リボソームの X 線結晶構造に関する発表であった。3年前のミーティングではリボソームの結晶構造に関する報告が全くなかったわけであるから、ここ2-3年のリボソーム研究に関する進歩はすさまじいものがある。古典的なリボソーム研究のあらゆるトピックスが立体構造をもとに議論されるという新しい潮流がはっきりと見えてきた学会でもあった。50S の構造を決定した Steitz, Moore を筆頭に、30S の構造を決定した Ramakrishnan, Yonath そして 70S リボソームと mRNA, tRNA との複合体の構造を解いた Noller ら、錚々たるメンバーが集結した。リボソームマニアの私にとって、今回の学会には特別な思いがあり、大学院の業務をキャンセルまでして参加してしまった。2000年にリボソームの立体構造が発表され、真っ先に注目されたのは、30S サブユニットにおける tRNA のコドン認識と、50S サブユニットにおけるペプチド転移反応のメカニズムに関する構造生物学的な解釈であった。

コドン認識に関しては、ほとんど Ramakrishnan の独壇場であった。彼らのグループは2000年に *Thermus thermophilus* の 30S サブユニットの構造を発表して以来、IF1 との共結晶やアミノグリコシドをはじめとする種々の抗生物質との共結晶の構造など 30S サブユニットに結合する因子や薬剤との結合様式を原子レベルで解明している。中でも、A サイトにおける tRNA のアンチコドンステムループ (ASL) と mRNA の相互作用を視覚化した構造は、遺伝暗号解読における最大のミステリーである「EF-Tu による GTP の加水分解メカニズム」の解明へ向けて、大きな貢献をしたと言えるであろう。リボソームにおけるブルーフリーディング機構は翻訳の精度を維持する最後の要になっているステップである。アミノアシル tRNA-EF-Tu-GTP の三者複合体 (TC) がリボソームの A/T サイトに結合し、30S サブユニットにおいて正しいコドン-アンチ

古典的なリボソーム研究のあらゆるトピックスが立体構造をもとに議論されるという新しい潮流がはっきりと見えてきた

チコドンの対合が起きなければ、EF-Tu による GTP の加水分解が生じず、EF-Tu が離れないためアミノアシル tRNA は A/A サイトに入ることができない。正しいコドン-アンチコドンの対合が起きれば、何らかのシグナルが 50S 側の EF-Tu に伝わり、GTP を加水分解することで EF-Tu-GDP が tRNA から遊離し、アミノアシル tRNA は A/A サイトに入ることができる。Ramakrishnan らの構造解析によって、この正確なコドン-アンチコドンの対合は 16S rRNA の保存された A1492, A1493, G530 の 3 塩基によって認識されることがわかった。これらの 3 塩基がコドン1字目とアンチコドン3字目、コドン2字目-アンチコドン2字目のワトソクリック塩基対のマイナーグループ側から接触し (A-minor interaction)、これら2つのワトソクリック塩基対を正確にモニターすることがわかった。さらにこの相互作用によって、A1492 と G530 の間で塩基対が形成され、16S rRNA 全体の構造が大きく変化することが明らかとなった。正しいコドン-アンチコドンの対合が起きなければ、この 30S 側の変化は生じないことから、この構造変化が 50S 側を通して EF-Tu による GTP の加水分解を引き起こす何らかの要因になっているのではないかと考えられる。また、アミノグリコシド系抗生物質が誤翻訳を誘発させるメカニズム



ポスターの佐藤さとみネウザさんの発表風景

や non-cognate なコドン-アンチコドン対合が排除されるメカニズムなど、従来の生化学的な観測を構造解析の結果から解釈しようとする彼の発表は、非常に印象深く心に焼きついた。

つい先日、3月21日号の Nature に Simonson と Lake は、「トランスオリエンテーション仮説」を発表した。これは A/T サイトに TC が結合する際、tRNA のアンチコドンループの構造が 3' 側にスタックしている構造から 5' 側にスタックする構造に変化するという大胆な仮説である。彼らのモデルは A サイト上の mRNA の構造を固定しているため、基本的に A1492, A1493, G530 の 3 塩基による A-minor interaction には矛盾しない (Ramakrishnan 私信) もの、このような drastic な tRNA 側の構造変化が実際に生じているかが今後の争点になると考えている。最近 Frank のグループは、キロマイシンでフリーズした TC とリボソームの構造をクリオ電顕で詳細に解析した (EMBO J, in press / Agrawal 私信)。この構造は A/T サイトに TC が結合した状態とみなすことができるが、彼らの構造によれば、tRNA のアンチコドンループの構造変化は観測されず、むしろ A/T サイトにおけるコドン-アンチコドン対合により、tRNA にひずみが生じ、エルボー部位が GTPase センターにコンタクトすることで EF-Tu による GTP の加水分解の引き金を引くのではないかと推測している。コドン認識による GTP の加水分解という非常に繊細でダイナミックな反応はリボソームが精巧な分子機械であることを印象付けるものであり、その全貌が近い将来に明らかになると確信している。

Steitz, Moore らは 2000 年の Science 誌に発表した論文で、ペプチド転移反応を触媒するのは 23S rRNA であり、「リボソームはリボザイム」であると断定した。A2451 の N3 が酸塩基触媒的に働き、アミノ酸のアミノ基の求核置換攻撃を誘発するというメカニズムを提唱し、その触媒のパワーは 3 つの塩基 A2451-G2447-G2061 (catalytic triad) の水素結合を介した電荷リレー系により生み出されるというエレガントな仮説は非常に魅力的で説得力があった。しかしその後いくつかのグループの遺伝学及び生化学的な実験によってこの仮説が否定され、事態は混迷を極めていた。我々のグループは catalytic triad をランダマイズし、64 通りの組み合わせの中から機能し得る配列を in vivo で選択

したところ、野生型以外に一つだけバリエーション (A2451-A2447-G2061) が存在することを見出していたので、電荷リレー系に関しては否定的であるが、A2451 が担う触媒としての役割に関しては肯定的な立場をとっている。今回の学会では、リボソーム RNA が触媒か否かについての議論が真っ向から対立していた。Steitz, Moore らは電荷リレー系に関しては全く触れなかったものの、ペプチド転移反応後 (A/P* state) のアナログの構造を解き、A2451 の N3 はやはり触媒であることを強調していた。また、Rodnina は A2451 を U に置換したリボソームを用い、ペプチド転移反応の反応速度論的な解析から A2451 は酸塩基触媒である可能性が強いという結論を導き出していた。一方で、昨年の Nature 誌に「Ribosomal peptidyl transferase can withstand mutations at the putative catalytic nucleotide」というショッキングな論文を発表した Mankin はリボソーム RNA の役割は触媒ではなく反応場を提供するに過ぎないとの考えを披露した。さらに最近、真正細菌 *Deinococcus radiodurans* の 50S サブユニットの構造を解いた Yonath は、tRNA アナログとの共結晶の構造を発表した。彼女の構造によると A2451 は tRNA の A76 とスタッキングをしており、Steitz, Moore らの構造と微妙に異なることを強調していた。結論として、「リボソームはフレーム (鋳型) である」との考え方を提唱し、触媒はマグネシウムであると明言した。結晶構造が解けてなお熱い議論が展開され、これだけ、はっきりと見解がわかれるほど、ペプチド転移反応の触媒メカニズムという命題の重要性とリボソーム研究者の熱意を強く感じた。ここ 1-2 年で、また新たな展開が期待されるが、我々も独自のアプローチからメカニズムの解明に貢献をしなければならぬと決意を新たに帰国した。



プロフィール

1996年東京工業大学大学院生命理工学研究科博士課程修了、博士(理学)。三菱化学研究員、東京大学大学院工学系助手を経て1999年より現所属、講師。

鈴木 勉

(東大・新領域・先端生命)

RNA polymerase の molecular memory と RNA mimicry

嶋本 伸雄

〔国立遺伝学研究所
構造遺伝学研究センター〕

原核細胞由来の RNA ポリメラーゼは変な酵素である。大体が図体はでかい（大腸菌でも 500kDa）がウイルス由来のものはずっと小さいところをみると、RNA 合成機能以外に何か訳ありである。腸内細菌では、競争のためサイズ縮小の圧力は大きいので、動物のタンパク質のように理由無く分子量が大きい可能性は少ない。しかも転写の開始にシグマ因子というサブユニットを要求する。プロモーター群のスイッチングをするのだが、それだけなら、真核のように普通の転写因子を要求すれば済むことである。情報処理能力を持つ分子機械として、普通の酵素にない魅力を持つものである。このようなわけで、テーマは時々で変化しているが、結局 25 年も大腸菌の RNA ポリメラーゼに付き合ってきた。

過去の RNA 学会年会で、シグマ因子と RNA とが、コア RNA ポリメラーゼにとって同じ機能を果たしているという突飛な予言をさせていただいた。常識的ではないモデルだけに、身近な研究者からの懐疑的な質問を受けた記憶がある。私自身もオッズは 10 倍ぐらいとは思ったが、この学会がただの石橋たたき渡り競技会ではなく、石橋渡りたたき競技会になって欲しいと思ったので、あえて推論させていただいた。しかしなんと、結果は私の勝ちであった。待ちに待ったものであるが、2001 年の FASEB (2 年に一度、このテーマで開催される) で初めて、ロックフェラーの村上らにより Taq ホロ酵素とホロ・プロモーター複合体の結晶構造が発表され、本年 SPring-8 理研の Vassylyev らにより *T. thermophilus* のホロ酵素の構造が発表された (Science 296:1280, 2002; Science 296:1285, 2002)。これらは実に豊かな情報に満ちあふれている X 線モデルであった。私が注目したのは、シグマ因子の Region 3 と呼ばれる種間保存領域の一部が、まっすぐ伸展されて、RNA が入るべきチャンネルに入っていたことである (図 1)。つまり、この領域は、まだ RNA が存在しない転写開始期に、RNA を分子擬態 (正しくはドメイン擬態) していることになる。ここに何かを入れておかないと、RNA 合成活性が保てないと推定できよう。また、転写開始後になぜシグマ因子がコア酵素から解離するのか、という問題にも示唆を与える。このホットな話題は、私も巻き込まれているが、タンパク質-タンパク質の問題なので機会を改め紹介したい。

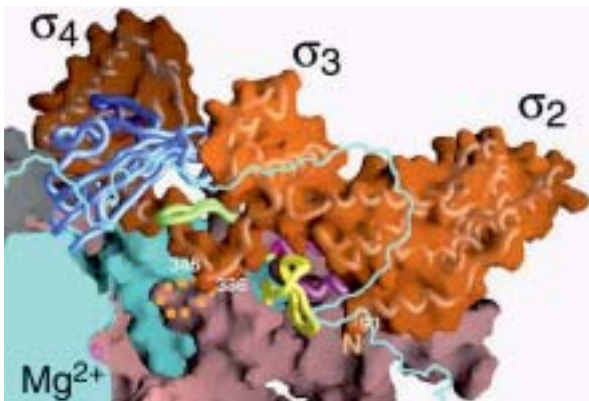


図 1 シグマ Region3 の一部の分子擬態 σ の後の数字は種間保存領域 1-4。擬態部分は 3-4 の間 (点線部を含む) Mg^{2+} が活性中心。

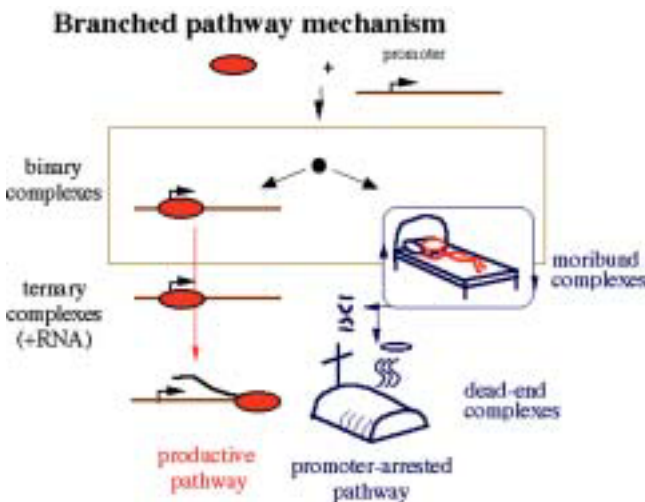


図 2 転写開始の新機構: Branched pathway (本文参照)

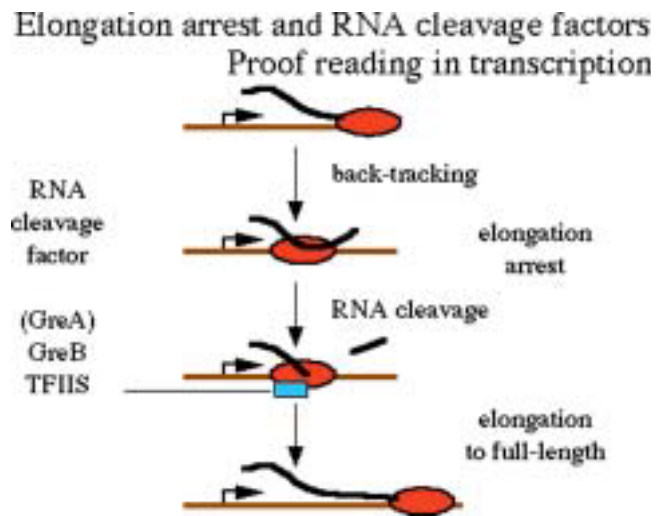


図 3 RNA 切断因子の RNA 伸長時の機能 (本文参照)

ここ数年の私の論文で最も多いのは、転写複合体は、分子メモリーを持っており、それを利用して転写開始をポストリクルートメントで調節していることを証明するものである。7年前に初めてこの考え方(JMB 256:449, 1996)をFASEBで明らかにしたときは、“your idea”と、chemical kineticsをよく知る人以外は冷淡であった。5年前にはそれが“your model”に昇格していた。3年前には、私を批判していた米国人たちが“our model”と言い出し、「おいおい、それはないだろ！」であった。一人だけ、「今まで君の考え方に冷淡であって済まない。あなたの考え方は正しい。」と謝ってくれたことは、この学会の救いである。最も最近にJBCに投稿したものは、投稿した瞬間から数えるとたった10日で実質的に受理された。皆さんはもっと早いでしょうが、論文を書くのが下手な私は、JBCでは最短記録であった。データに基づいてものを判断していく科学的態度が困難なのは、日本だけではないというこの数年の経験であった。

受け入れられ始めても、この私のモデルの本当の野蛮さに気が付いている人は一握りである。「タンパク質はアミノ酸配列で決まる最安定状態で機能している」というアンフィンゼンの仮説(タンパク質の形はアミノ酸配列で決まるという彼の定理ではない)を否定する。さらに、「エネルギーがタンパク質内に貯蔵できる」という大沢・柳田のルースカップリング説に与し、支配的なタイトカップリング説の論拠の一つを否定するからである。

この分子メモリー説は、普通 moribund complex か branched pathway という名前を受け入れられている(JMB 256:449, 1996)。前者は短鎖RNAしか合成できない転写複合体に我々がつけた名前であり、後者は、いままで常識であった直列経路を否定しているところから付いた名前である。要するに、転写開始複合体は、均一な成分から構成されていても、2つの安定なコンフォメーションを持ち、一つは短鎖RNAしか合成出来ずやがて不活化してしまう、というモデルである(図2)。

このモデルが受け入れられ始めた理由は、もう一つある。一般的な分類では、このモデルは2状態モデルというものに属している。転写開始以外でも、RNA伸長と転写終結において、2状態モデルを受け入れざるを得ない状況が発生している。RNA伸長の例を紹介しよう(図3)。転写の伸長では、中断が起こる。そのときの複合体は、ポリメラーゼの位置が、DNAとRNAに対して上流側にずれており、RNAの3'末はポリメラーゼから遠く離れてしまっていて、伸長が不可能である。この状態の複合体にGre因子(真核ではTFIIS)が作用すると、ポリメラーゼ(Gre因子ではない)がRNAをendonucleoticに切断し、再びRNAの3'末が活性部位にきて、円滑なRNA伸長が再開され、成熟したRNAが合成される(PNAS 94:1755, 1997)。誤った塩基を取り込んだ時にもこの反応が起きるので、proof readingと考えられ、これらの因子はproof reading factorとも呼ばれる。これがなぜ2状態モデルかという、最初

の中断に至るRNA伸長と、2度目のスムーズな伸長とは、同じ位置を転写しており、2つは異なるコンフォメーションと考えられるからである。より複雑な転写終結も、終結するコンフォメーションと終結しないコンフォメーションとの2状態で考えられ始めている。転写は、開始、伸長、終結と区別されるより、やがて統一した2状態として考えられ始めているのである。

統一した2状態説の傍証を我々は見つけることが出来た。RNA切断促進活性のためにRNA伸長でしか働かないと見られていたGre因子は、実は転写開始複合体の2状態を交換するシャペロン機能を有していることを発見したのである(Genes Cells 6:389, 2001.)。Gre因子は、RNA合成前の、プロモーターとRNAポリメラーゼの2体複合体で機能していたのである。もし、共通した機構を想像するならば、転写開始複合体の2状態は、DNAとポリメラーゼとのズレを含み(JBC 277:15407, 2002)、伸長複合体では、コンフォメーションの変換が原因でRNA切断は結果であろう。我々は、この転写開始複合体に関する予想をDNAフットプリントで証明した。

なぜGre因子がシャペロン機能を持ちうるのであろうか?想像をたくましくしてみよう。ヒントは2つのGre因子GreAGreBのわずかな共通性、基質の入る穴付近との相互作用部位とRNA相互作用部位である。転写開始複合体にはRNAはない。その代わり、シグマ因子のRegion 3が入っているだろう。転写開始複合体の不活性なコンフォメーションでは、この部分が溶液に露出していることを我々は発見した(JBC 275:10899, 2000; JBC 277:15407, 2002)。つまり、Gre因子は、基質の入る穴付近とシグマ因子のRegion 3との距離を適正にすることにより、シャペロン機能を果たしているのではないか、という説である。ではなぜ、RNA切断を引き起こせるのであろうか?村上らのプロモーターDNA・ホロ酵素複合体では、酵素の活性中心は、密室空間であり、RNAのチャンネルと基質NTPのチャンネル以外は水が侵入する隙間もなく閉ざされているそうである。Gre因子は後者の蓋として作用できるので、逆にもしNTPの代わりに水分子を閉じこめしまうと、効率はわるいが加水分解しか起こらないであろう。「X線モデルは研究の再スタート」の格言のとおりである。



プロフィール

1978年京都大学大学院博士課程修了、理学博士。アルバートアインシュタイン医科大学ポスドク、広島大学助手、国立遺伝学研究所を経て1996年より教授。

嶋本 伸雄

(国立遺伝学研究所
構造遺伝学研究センター)

遺伝子発現における諸過程間のネットワーク

—スプライシングはイントロンの除去だけの過程ではない—

片岡直行 (京都大学ウイルス研究所)

真核生物では、核にコードされる遺伝子のほとんどが、タンパク質をコードしない配列（イントロン）によって、コーディング領域（エクソン）が分断された形になっている。そのため、遺伝情報はまず DNA から mRNA 前駆体へと転写され、イントロンの除去を含む様々な過程を経て成熟した mRNA となり、核から細胞質へと輸送された後タンパク質合成の鋳型として働く。このようにイントロンの除去、すなわち mRNA スプライシングは真核生物の遺伝子発現に必須な過程である。真核生物では転写からスプライシング、輸送、そして翻訳までが遺伝子発現の諸過程であるが、最近、これらの過程は各々独立しているのではなく、それぞれが密接に関わっているということが明らかになってきた。

私は大学院時代に志村令郎教授の下でキャップ構造と核内キャップ構造結合因子の mRNA スプライシングにおける役割について研究を行った。その後、ペンシルヴァニア大学の Gideon Dreyfuss 教授の研究室でポスドクとして赴いた。当時キャップ構造が RNA の核外輸送に関与するということが知られてきたこともあり、スプライシング後の mRNA 上にどのようなタンパク質が存在するかに興味を持っていた。何年かの研究の後、私はある一つの RNA 結合タンパク質と出会うことになる。このタンパク質がまさにスプライシングとそれ以後の過程を結ぶものであった。

Dreyfuss 教授の研究室で私は核—細胞質間の輸送に関する研究に携わっていた。その過程で新しい RNA 結合タンパク質を同定し Y14 と名付けた。このタンパク質は RNA 結合ドメイン様の配列を持っており、細胞内では主に核内に斑点状に存在する。この局在のパターンはスプライシング因子に特徴的なものであり、RNA 結合ドメイン様の配列を持っていることから、Y14 はスプライシング因子である可能性が考えられた。そこで私は *in vitro* のスプライ

スプライシングはEJCをエクソン境界近傍に付加し、その mRNA が核内で経てきた履歴 (nuclear history) を mRNA 上に刻み込む。それが局在や翻訳、分解といった mRNA の細胞質での運命 (cytoplasmic fate) を決め、タンパク質の発現を時間的、空間的に調節していく

シング系を用いて、Y14 がスプライシング因子であることを証明しようと試みた。抗体を加える、リコンビナント Y14 タンパク質を加える等を行ったが、結果はどれもネガティブであった。Y14 はスプライシング因子ではないかもしれないとあきらめかけたが、私は最後の実験を試みることにした。もしも Y14 がスプライシング因子であるならば、

in vitro のスプライシング系から Y14 に対する抗体で免疫沈降を行えば何らかの RNA が沈降するであろうと考えたからである。免疫沈降後に抗 Y14 抗体でどの程度の RNA が沈降したかを測ってみるとネガティブコントロールよりわずかに高い程度しかなかった。その時は非常に落胆したのを覚えているが、少しでも差があるのならゲル上で見てみようと思ひ、そのパターンを解析した。その結果、非常に興味深いことに、沈降した RNA のほとんどが mRNA であった。このような沈降パターンを示す抗体はこれまでに知られていなかったもので、私もボスである Gideon も相当エキサイトする発見であった。同様の実験にイントロンのない mRNA を用いたところ、配列は全く同じにも関わらず、抗 Y14 抗体はこの RNA をほとんど沈降させられなかった。これらのことから、Y14 はスプライシングによって産生された mRNA に非常に効率よく結合する RNA 結合タンパク質であることが示された。今まではスプライシングは mRNA 前駆体からイントロンを除くだけだと思われていたが、Y14 の様な特異的なタンパク質を用いて mRNA 上に何らかの情報を残す過程でもあるということが明らかになったのである。

Y14 の報告とほぼ同じ頃、独立にいくつかのグループから他にも同じような挙動を示すタンパク質が報告された。そしてそれらのタンパク質はエクソンとエクソンのつなぎ目の近傍に複合体を形成することが明らかになった。このスプライシング依存的に形成される複合体は exon-exon junction complex (EJC) と呼ばれ、Y14, Aly/REF,

RNPS1, SRm160, DEK の5種類の構成成分が同定された。さてこの複合体にはどんな機能があるのか。まず一つ目は、mRNAの核外輸送を促進することである。実際、Aly/REFはmRNAの核外輸送を促進することが示されている。もう一つの機能として考えられたのが nonsense-mediated mRNA decay (NMD)である。NMDはmRNAの品質管理とも言うべき過程で、突然変異によりコーディング領域に終止コドンが生じたmRNAを選択的に壊していく過程である。正規の終止コドンの上流に終止コドンが存在した場合、このようなmRNAからはカルボキシル末端が欠失したタンパク質が産生され、多くの場合細胞にとって有害である。そこでこのようなタンパク質の産生を防ぐためにNMDは存在すると考えられている。これ以外にも、私は、スプライシングが完了していないmRNAが核外に輸送されてしまった場合にもNMDは機能していると考ええる。すなわち、mRNA前駆体ではイントロン中に終止コドンが存在する確率が非常に高いので、NMDによって壊されると考えられる。真核細胞は、スプライシング因子をイントロン上に会合させることでmRNA前駆体を核内に保持することに加え、誤って核外に輸送されてしまったmRNA前駆体を壊すためにもNMDを利用しているとは私と考えている。

NMDは、スプライシングと翻訳に依存することが示されていた。スプライシングは核内で起こり、タンパク質への翻訳は細胞質内で起こると考えられるため、この二つの異なった過程を結ぶ何らかの機構が存在すると考えられていた。そこで、核内で形成され、しかもその構成成分のうち少なくともY14は細胞質でもmRNA上に存在することから、EJCが候補として考えられた。一方NMDには3種類の因子が必須であり、それらはUpf1, 2, 3と呼ばれている。このうちUpf3のみが核内に存在しており、核と細胞質を往復することが示されていた。そこで、我々は、一つの作業仮説を立てた。Upf3がY14と会合してEJCに存在し、核内での情報を細胞質へと伝える役割を担っているという可能性である。そこで、まずUpf3がY14と会合しているかどうかを検定したところ、in vitroとin vivoとにおいて両者の会合が見られた。そして、in vitroスプライシング



旧ラボ：Prof. Gideon Dreyfuss と

反応系を用いた解析より、Upf3はY14と同様にスプライシングによって産生されたmRNA上のエクソンとエクソンの境界の近傍に効率よく結合することが明らかとなった。これらのことから、Upf3がEJCの構成成分であることが示され、EJCが核と細胞質とをNMDのためにつなぐ役割をしていることが強く示唆された。他のグループから、EJCの前述の構成成分のうちRNPS1とY14がNMDを誘導する活性を持つことが示され、EJCがNMDに必須な役割をしていると考えられた。このようにEJCにより、スプライシングとその下流にある輸送やNMDといった過程が密接に関連しているということが明らかになってきた。他にも我々はEJCの新しい構成成分としてキイロショウジョウバエのmago nashiタンパク質のヒトホモログであるmagohを同定した。mago nashiタンパク質はある種のmRNAの細胞質内局在に関与していることがわかっている。magohもY14と同様に、核内でmRNAに結合し、細胞質へと輸送された後もmRNA上の同じ位置にとどまることが明らかになり、スプライシングとmRNAの細胞質内局在との関連が強く示唆された。

以上の発見から、細胞内での一連の遺伝子発現における諸過程はそれぞれ密接なつながりを持ってお互いに影響を与えているという可能性が強まった。これまでにも転写とRNAプロセッシングが共役していることが示されていたが、スプライシングもその下流に位置する輸送、NMD、細胞質内局在そして翻訳とも密接に関わっていると考えられる。このことは真核生物にとってむしろ当然のことかもしれない。そう考えると、真核生物がなぜイントロンを進化的に獲得、保持し、複雑なスプライシングという現象を行っているかの一つの説明になる。ヒトゲノム解析が完了したが、塩基配列から予想される遺伝子の数は実際に発現しているタンパク質の種類よりもはるかに少ないことが明らかになった。このことを考えても遺伝子の発現調節は転写の段階だけで行われるのではなく、転写後の調節も非常に重要だと私には思える。生物にとってエクソンに加えイントロンまで合成するのは一見エネルギーの無駄遣いのようなのだが、いろいろなパターンの選択的スプライシングを駆使することで、一つの遺伝子からいくつかの異なるタンパク質を



新ラボ：新しい仲間達と（中央 大野睦人教授）

発現することができる。さらにスプライシングはEJCをエクソン境界近傍に付加し、そのmRNAが核内で経てきた履歴(nuclear history)をmRNA上に刻み込む。それが細胞質へと輸送によって伝えられ、NMDや翻訳、あるいは細胞内局在の機構によって読みとられる。それが局在や翻訳、分解といったmRNAの細胞質での運命(cytoplasmic fate)を決め、タンパク質の発現を時間的、空間的に調節していく。真核生物は、より複雑な遺伝子の発現調節を見事に獲得し、調和させたと感嘆せざるを得ない。人に歴史あり、とはよくいわれるが、mRNAにも歴史あり、である。

一つのRNA結合タンパク質から、いや一つの実験から新しい概念の発見へとつながった。それが最後の望みとして行った実験だけに感慨深いものがある。余談だが私は大学院時代、核内キャップ構造結合因子がヘテロダイマーであると

いう可能性を考えなかったために競争相手に発見を譲るといふ苦い経験をした。その際、サイエンスをやる上ではいかなる可能性も排除せず一度は考えてみるという教訓を得た。それがY14に関する実験と新しい概念の発見につながったのなら、悔し涙も高い授業料ではなかったと今では思える。

プロフィール

平成7年3月京都大学大学院理学研究科生物物理学専攻博士後期課程修了、博士(理学)。University of PennsylvaniaでのPost-doctoral fellow, Research Associateを経て平成14年3月より現所属。助手。

片岡 直行

(京都大学ウイルス研究所)

RNA Update

特集：品質管理と多様性の創造②

NMD と 翻 訳

石垣 靖人

(金沢大学大学院自然科学研究科)

何年も前の話になるが、何気なく読んでいた論文や講演会のスライドに、ふと目にとまる図があった。それらは、ある遺伝疾患の原因となる遺伝子を突き止めたことを報じたものであったが、私が吸い込まれるように見つめたのはノーザンブロットの結果だった。突き止められた原因遺伝子のRNAは正常細胞ではふんだんに存在するにもかかわらず、変異を持っている患者さんの細胞では、このRNAがほとんど消失していた。あれあれ、と不思議に思いながら文献をあれこれ調べてみると、確かに多くの遺伝疾患で変異のあるmRNAは減っている。こうなると、変異をもつDNAから写し取られたmRNAは、多くの場合細胞から消えてしまうようで、普遍性のある現象のようにも思える。現象が普遍的となればメカニズムを知りたくなるが、周囲の誰に訊いてもそんな現象や専門家は知らないと言う。おかしくなったRNAが無くなるなんて当然じゃないの、などと言う人もいたけれども、やはりこれは何か面白い仕組みがあるのではないかと感じていた。

たしかに細胞はDNA修復やチェックポイントなどの洗

練された機構で常に遺伝情報の本体であるDNAを守っている。けれど、これらの機構がいかに完璧を期しても膨大なDNA配列の全てを守りきれものでもないし、生体が死んでしまわない程度に変異が蓄積しなければ進化も起こらない。そこで、たとえ設計図の原本であるDNAに問題が生じていても、設計図のコピーを一旦RNA上に写し取ったときに、誤りがないかをチェックする仕組みが必要となる。問題があるコピーは捨ててしまえば、つまり変異のあるmRNAを何者かが見分けて分解してしまえば、変異がない方のmRNAのみが蛋白質合成に利用されて発現する遺伝情報の内容を正しく保てるわけである。この何者かが、ナンセンス変異mRNA選択的分解(Nonsense-mediated mRNA decay, NMDと略される)あるいはRNAサーベイランスと呼ばれる機構である。

紆余曲折の末、私は、このNMDをテーマに仕事をすべく米国のMaquat博士の門をたたくことになる。1999年の夏の終わりのことであった。彼女はすらりとした長身の意欲的なNMDの研究者で、すでに細胞生物学的な解析を終

え、関与遺伝子のクローニングからはじめて分子機構に手をのびしていた。この頃までに① NMDは普遍的に存在する機構であり、終止コドンが途中でできたナンセンス変異と呼ばれるタイプの突然変異が存在する場合に、中途半端な蛋白質の合成を抑えるべく変異 mRNA を選択的に分解してしまうこと、②あくまでキャップ構造の解離を伴う分解であって変異を持つ DNA の RNA への転写を抑えているわけではないこと、③さらに、スプライシングに共役してエクソンとエクソンのつなぎ目付近に結合する因子を足場に、NMDに必要な蛋白質群が働くらしいこと、④私の仕事で大きなポイントとなる特徴として、NMDによるナンセンス変異の認識には蛋白質合成すなわち翻訳が必要であり、翻訳を止めてしまうと変異を持つ mRNA の量が増えてくること等が明らかにされていた。RNAは転写→スプライシング→翻訳とステップを踏んで代謝されていくが、コドンの認識は翻訳のステップで初めて行われることから、NMDのナンセンスコドン認識における翻訳の必要性は実験結果と合わせて十分にうなずける。しかし、この時点ではNMDにおいて変異認識を行う場である、翻訳過程についての詳細は不明なままであった。

NMDによるナンセンス変異の認識には蛋白質合成すなわち翻訳が必要であり、翻訳を止めてしまうと変異を持つ mRNA の量が増えてくる

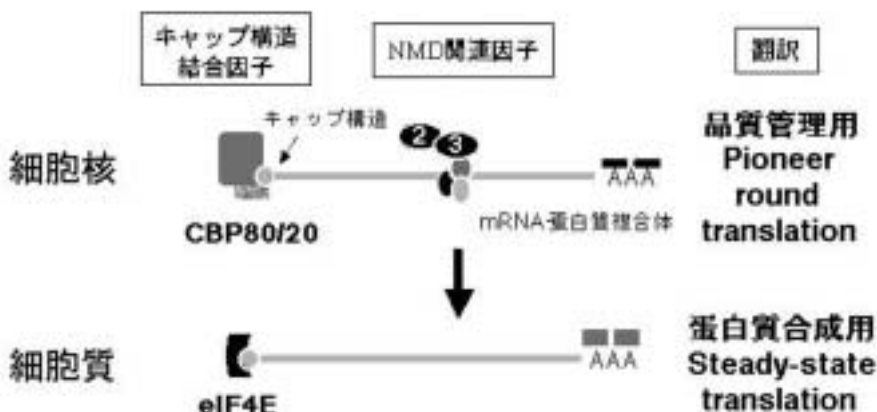
何が不明かと言えば、NMDが mRNA 中のナンセンス変異を認識しているのは細胞内のどこだろうか、という点である。つまり細胞内で NMD が起こる場、そのものが問題であった。Maquat 博士は自分の実験結果から、mRNA が細胞核にリンクした状態で NMD が起きることを報告していた。しかし、この結果は NMD に必要な翻訳が細胞核で起きることを意味しており、論議を呼ぶこととなった。なぜなら、この実験結果は、翻訳は細胞質内で行われるとする教科書の記述に合わなかったからである。一方で、教科書で読む限り、転写から翻訳へつながる反応の分子機構はかなり詳細に説明されていた。細胞核内において DNA から転写された RNA は 5' 末端にキャップ構造を付加される。キャップ構造には 2 つの蛋白質、CBP80 と CBP20 が結合

し、この CBP80/20 複合体は RNA の下流でおきるスプライシングなどを助ける働きを持つことが知られている。イントロンを取り除かれポリ A を付加された mRNA は細胞核の外へ運び出されるが、この時点では CBP80/20 はキャップ構造に結合している。やがて、細胞質へ運ばれた mRNA 上で CBP80/20 は eIF4E と呼ばれる蛋白質と置換され、翻訳の開始因子やリボソームが集合して蛋白質合成が始まる。この置換反応がどのように起きるのかは分からないけれども、ともかく細胞質で eIF4E がキャップ構造に結合することによって翻訳は始まると説明されていた。しかし、eIF4E が結合する前に、CBP 80/20 が結合した状態で翻訳が起きるかどうか直接検討した報告はなかった。たしかに、細胞核内での翻訳がありうるか、との点については、1996 年頃から一部の研究者がその可能性を指摘していた。

さらに CBP80/20 が翻訳に関わる可能性については、McKendrick らが CBP80 と翻訳開始因子の結合を報告し、酵母を材料として Fortes らが CBP 80/20 複合体が翻訳開始因子と結合して試験管内で翻訳反応を促進することを示していた。しかし、これらの実験結果は細胞核内あるいは核に結合した状態、つまりは CBP80/20 が結合した mRNA 上

で翻訳が起きることを示唆はするが、細胞内での直接的な証明とは言い難い。やがて、このステップで翻訳が起きるか否かが、私の中で NMD の機構とからんで極めて重要な課題へと成長することになった。

あれやこれやと頭をひねっているうちに細胞内で CBP80/20 が結合した mRNA 上で NMD が起きることを証明できれば、翻訳も起きていることを直接的に証明し、NMD が起こる場に関する問題にも答えることになるのではないかと思いついた。このアイデアに基づき免疫沈降と RT-PCR の技術を使って CBP80/20 が結合した mRNA-蛋白質複合体を解析する実験を行ったところ、驚いたことに CBP80/20 が結合した mRNA 上で NMD が起きていることを示すデータが出てきた。面白いことに CBP80/20 が結合した mRNA-蛋白質複合体の中には NMD に必須とされていた Upf2 あるいは Upf3/3X と呼ばれる分子や翻訳開始因子も含まれていた。いろいろと実験を繰り返した後、NMD の標的分子が CBP80/20 の結合した mRNA-蛋白質複合体であり、NMD に必要な翻訳がこの分子上で起きていることをはじめて細胞内で直接的に示すことができた。この結果は今まで翻訳の開始点とされてきた、キャップ構造に eIF4E が結合する前の段階、つまり





左から2人目が Maquat 博士, 右から2人目が筆者

CBP80/20 が結合している mRNA 上でも翻訳が起きていることを意味する。細胞質で行われる翻訳が蛋白質合成を目的とする "Steady state" な状態での翻訳とすれば、この CBP80/20 が結合した状態で起きる NMD のための翻訳は、mRNA が自らの品質管理のために初めて受け入れる、"Pioneer round" と呼ぶにふさわしい翻訳過程である (図参照)。そして、品質保証された mRNA では CBP80/20 複合体から eIF4E への置換が起こり、活発な蛋白質合成に使われるのだろう。もちろん NMD によって変異を見つめられた mRNA は半端な蛋白質合成を抑えるべく、選択的に分解されて消失する。この実験結果とモデルをタイミング良く論文発表でき (Cell 106:607-617, 2001), すぐに Science 誌の Editor's choice 欄にも取り上げられたりして多方面から注目を浴びたことは非常に幸運なことであった。また、ほぼ同時期に細胞核内における翻訳反応の存在が Iborra らによって明快に示されたこと (Science

293:1139-1142, 2001) も私たちの結論を強く支持している。今後、これらの知見が広く受け入れられていけば、教科書における翻訳過程の記述は、これまでと幾分違ったものになるのではないかと期待している。

以上は拙い私の経験ですが、ここまでやってきて、自分がテーマを選んだつもりで仕事をしてきたものの、何だかテーマの方が私を選んで段取りして仕事をさせたような気もしています。この仕事の最中、真夜中に、現像したばかりのエクス線フィルムに目を凝らしながら、何が私にこのような努力をさせてくれているのか、不思議な思いにとらわれる瞬間を幾度か感じる事ができました。それが何者かは今も分かりませんが、今後も医学・薬学も含めてサイエンスに貢献していけることを祈る毎日です。

Maquat Lab Page:

http://dbb.urmc.rochester.edu/labs/maquat/maquat_lab.htm

プロフィール

1991年金沢大学大学院薬学研究所修士課程修了, 金沢大学薬学部教務職員, 同助手を経て2002年より現所属, 助手, 博士(薬学)。

石垣 靖人

〔金沢大学大学院
自然科学研究科〕

RNA Update

特集：品質管理と多様性の創造③

初めはサブ実験：巨大キナーゼと NMD

山下 暁朗

(横浜市立大学医学部第二生化学)

研究の始まり

1998年4月のはじめ、大学院博士課程に進学して少したった頃だった。私はそのころ、修士課程で行った MUK と MLK2 という MAPK カスケードで働く分子の仕事を論

文化するためデータの再現性を検討していた。カンファレンス室で雑談をしているときに、大野茂男教授がさらっと切り出した。データベース検索で mTOR や ATM といった巨大タンパク質リン酸化酵素に少し似た構造を持つ cDNA 断片を見つけたから、誰か全長をとってみたいかと。

これが hSMG-1 との出会いだった。これに先立つ 2 ヶ月ほど前にも同じことを聞いていたが、そのときは修士論文などで忙しく聞き流していた。だが、このときはタイミングが違った。ちょうど仕事が一段落して、研究の進め方を落ち着いて考えているときだった。当時、私が行っていた MAPK カスケードの高発現系を用いた解析は限界に近づいていると感じていた。そのまま解析を進めても、本質的なことはなにも分からない。新しいアプローチが必要だった。新しいことを行うには大きなリスクが伴う。そのリスクを回避するため、私は、大野教授の探してきた cDNA 断片の全長をクローニングするという仕事を、MAPK の仕事が行き詰まったときの保険として行うことを決めた。5 月中旬に、それまで行っていた解析が不調だったポストクの 大西哲生さんに声をかけた。大野教授の承諾を得て私は強力なパートナーと研究をすることとなった。

新規巨大キナーゼのクローニング

hSMG-1 のクローニングは困難を極めた。当初の予定では巨大キナーゼの仕事は 1 ヶ月程度で終わるはずだった。実際、当初予定していた 3' 側からから 7 kbp までのクローニングは 2 週間で終了した。しかし、より 5' 側にのびるクローンが次々とクローニングされた。部分配列を報告していたグループのデータである 7 kbp 程度のクローニングは遙かにすぎ 10 kbp に届こうとしていた。クローニングと平行して、hSMG-1 に対する特異抗体を複数作成し、ウエスタンブロットを行った。465 kDa の DNA-PKcs と 370 kDa の ATM のちょうど中間に約 430 kDa と 400 kDa の 2 本のシグナルが検出された。3,600~3,800 アミノ酸、11 kbp 前後の ORF を持つ巨大なタンパク質であることが予想された。巨大なだけでなく、5' 側にはおそらく複数の異なる遺伝子由来の 98% 程度の相同性を持つクローンが数多く同定された。5' race によるクローニングを行うにもこれらの異なる遺伝子がじゃまをしてしまう。地道なバックスクリーニングを 10 以上のファージライブラリーで 30 回以上繰り返し、決定したクローンの配列から最終的に、4 つの遺伝子に分類した。残念なことに hSMG-1 のクローンにはギャップがあった。RT-PCR によりギャップに相当する領域を増幅し、数多くのクローンを sequence して、hSMG-1 のギャップを埋める配列を入手したのはクローニングを始めて 2 年以上過ぎた 2000 年の 6 月だった。最後の 2000 bp を決定するのに 1 年以上かかった。hSMG-1 は約 11 kbp の ORF をもつ 410 kDa のタンパク質だった。

約 11 kbp に及ぶ cDNA を発現ベクターに乗せるのにはさらに 4 ヶ月の時間が必要だった。hSMG-1 をベクターに

乗せる作業は、発現ベクターの制限酵素サイトを 6 箇所つぶし、さらに新しく設計したマルチクローニングサイトを用いるまで成功しなかった。ベクターの改良は、当時、大学 4 年生で卒業研究のため日本大学から来ていた鹿島勲君の指導の一環として行った。彼がベクターを改良しなければ hSMG-1 の発現ベクターを完成させることは出来なかっただろう。

NMD とのつながり

解析を始めた当初、ATM に似たキナーゼドメインを持つことから p53 の活性制御に関わる可能性を考え、がんセンターの田矢洋一、田中知明両博士の協力の下、p53 の蓄積や転写活性を捕まえるアッセイシステムの構築を行った。そして、実際に、hSMG-1 の cDNA 断片を用いて p53 の機能に与える影響を解析し始めていた。

1999 年 9 月 2 日、ほとんど日課になっていたデータベースサーチを行うと、新たな分子が登録されていた。線虫 SMG-1 だった。mRNA surveillance という現象に関与する

hSMG-1 の阻害剤によりナンセンス mRNA だけでなく、それ由来の短いタンパク質の検出に成功したことは、疾患の治療につながる可能性を示したものだと考えている

ことが記されていた。衝撃を受けた。遺伝学的に、自分のクローニングしている分子の機能が分かった瞬間だった。SMG-1 の配列を登録した Philip Anderson 教授の論文を調べ、すばらしい仕事をしている科学者だと思った。同時に、そのとき行っていた全ての解析を中止することを決めた。大野教授も方針転換に賛成してくれた。一週間で、入手

できる論文全てに目を通した。大まかな内容をつかんで、NMD を調べるためのアッセイシステムの実験プロトコルを作成した。新規に RNA 分解の分野に参入するため、最も正確に mRNA の安定性を見ることの出来る実験系を選んだ。実際に実験系が完成したのは、2000 年の 3 月下旬



Lynne Maquat 教授と、みなとみらいの観覧車で。非常に気さくな方だったが、研究についてはものすごく厳しかった。ファッションセンスがすごく良くて、格好いいというしかありません。

旬に入ってからだった。クローニングが終了していなかったため、外部との共同研究をさけたことで余分な時間がかかった。実験系の構築と同時に、NMDに関わる酵母の遺伝子 Upf1p, Upf2p, Upf3p および線虫 SMG-5, SMG-7 のうち哺乳類相同分子が未同定だった Upf2p, Upf3p, SMG-5, SMG-7 についても相同性検索によるクローニングを開始した。これらの分子のクローニングは hSMG-1 のクローニングと平行して行った。EST clone の購入とフェアライブラリーのバックスクリーニングによりクローニングは順調に進んだ。

2000年の国際RNA学会のアブストラクトに UPF2, UPF3 に関して相同分子の解析が3つの異なるグループでなされていることが記されていた。国際RNA学会の存在に気づいたのは2000年の10月だった。考えてみれば当たり前だったが、残念だった。クローニングに使った時間が惜しかった。彼らと重複しない内容について、hSMG-1の仕事と合わせて報告することにした。

hSMG-1の存在は高等真核生物においてNMDがリン酸化により調節されることを示している

mRNAの品質管理が行われているという概念自体、私には驚きだった。NMDの解析を始めた当初、NMDを含め、遺伝子発現における転写後調節のメカニズム(選択的スプライシング、翻訳調節など)の知識をほとんど持ち合わせていなかった。さらに、自分の解析している分子により、NMDの活性が制御されているという可能性を理解したときは非常に興奮した。リン酸化による調節があるということから、NMDによるナンセンス mRNAの排除はおそらく本来の機能の付随的なものにすぎないのではないだろうかと考えている。酵母や線虫で報告されているように、ヒトにおいてもTCR遺伝子の発現調節以外にNMDの生理的な基質となる遺伝子が存在しその遺伝子発現の転写後調節を担っているのだろう。マイクロアレイなどの網羅的解析やデータベースサーチにより今後数年のうちにターゲット遺伝子の同定がなされることが期待される。NMDの研究は、そこから次のステップに移るのではないだろうか。リン酸化によるNMDの制御の意味はそこで重要な意味を持ってくるはずだ。

初めてNMDという現象を知ったとき、ナンセンス変異に由来する、全ての疾患を治療できる可能性を秘めているのではないかと考えた。特に酵母における解析で、*upf* mutantがナンセンス抑制を示すということに注目した。hSMG-1の阻害剤によりナンセンス mRNAだけでなく、それ由来の短いタンパク質の検出に成功したことは、疾患の治療につながる可能性を示したものだと考えている。hSMG-1がナンセンス抑制に関わる可能性に関しては今の

ところ結果はないが、私が今もっとも注目していることの一つだ。

チームでの研究

hSMG-1の酵素としての生化学的解析は大西さんにより着実に進められた。in vitroでの実験はほぼ全て彼が行った。cDNA cloningが困難であったため、細胞内在性の酵素を用いての解析だった。これまで経験したことのない巨大な分子量の酵素。解析はcDNAのクローニング同様困難だった。彼の経験と力が解析の大きな推進力になった。鹿島君の成長も大きかった。比較的大きな分子量のタンパク質であるhUpf1/SMG-2のモビリティシフトによるリン酸化状態の解析は、彼が2ヶ月近く条件を検討して安定な実験データをとった。彼の出すウェスタンプロットのデータは、今では3人の中で最もすばらしい。NMD systemの解析は3人がチームとなって、一つのテーマをまとめていく方針で行っている。たまたま、個々の個性が反発しない人間が集まったため、非常に効率よくデータを積み上げることが出来た。この巡り合わせと、私のアイデアの修正と解析のためのサポートを最大限行ってくれる大野教授の存在が、私が最も感謝している事柄だ。

論文の投稿

hSMG-1の酵素活性をなくした変異体を用いた解析で、NMDに対して dominant negative 効果を得た2000年の12月、Philip Anderson教授にあてて大野教授にメールで連絡を取ってもらった。彼らのSMG-1の仕事より先に、連絡もしないで論文を出すことは出来ないと考えた。Anderson教授からは、好意的な返答が帰ってきた。同時期に論文を投稿できればということになった。3月上旬にほぼ完成した原稿をAndersonに送付した。しかし、投稿論文に使うためのデータの取り直し作業に時間がかかった。時間は過ぎていった。

2001年5月2日、Allan Fields教授のグループによるhSMG-1のクローニングがJBCのweb siteに公開された。パーシャルクローニングだった。ゴールデンウィーク中であり、大野教授も大西さんもいなかった。これに先立つ3月3日に大野教授は神戸であったシンポジウムに参加していたFields教授に解析の進み具合を話していた。お互いに投稿するときには連絡を取るとの約束をしていたが守られなかった。休み明けにあわてて論文を仕上げ5月16日にGenes and Development誌に宛てて投函した。Anderson教授にも連絡を取ったが、彼らの仕事は間に合わなかった。私たちの論文はほぼ修正なしに受理された。Anderson教授の論文がまだ発表されていないのが、非常に気がかりであり、申し訳なく思っている。彼らの名前を論文に入れる

べきだった。

私たちの hSMG-1 の論文が載った同じ号に、デューク大の Abraham 教授が ATM のレビューを書いている。そこに hSMG-1 が p53 の活性制御に関わる可能性について検討を重ね、それらしい結果を得ているということが書かれていた。p53 の解析を続けていけば、彼らと競合することになっただろう。どの方向に進んでも必ず競合相手がいる。競合相手に先駆けて、彼ら以上の結果を出すことは出来るかもしれないが、それを先に発表することは難しい。彼らと違うアイデアを出し、異なる土俵の上で解析を続けていく必要がある。

来年度の予定は決まっていないが、どんなテーマを研究するにせよ、与えられた課題の中でも、自らの考えで研究方針を決めることの出来る環境にいたい。

プロフィール

1996年日本大学農獣医学部卒業、1998年横浜市立大学大学院総合理学研究科修士課程修了、2001年横浜市立大学大学院医学研究科博士課程修了、医学博士。横浜市立大学医学部生化学第二講座所属。木原記念科学振興財団嘱託研究員。

山下 暁朗

(横浜市立大学
医学部第二生化学)

RNA Update

特集：品質管理と多様性の創造④

tmRNA の 10 年

武藤 昱 (弘前大学・農学生命科学部)

tmRNA 研究についての個人的な思い出を書きたいと思う。1990年頃、私は次の研究テーマを決めることで頭がいっぱいであった。それまでの約10年間、名古屋大学ではじめてマイコプラズマの分子遺伝学的研究は遺伝暗号の進化の研究に発展して、それなりの成果をおさめて順調に進んでいたが、もう研究の山は越えて収束の時期であることははっきりしていた。当時 RNA の世界はスプライシングの研究を中心に大きな展開がはじまっていた時期であり、やりたいことは沢山あったが、新たにテーマを選ぶとなると不安と迷いがつきまとった。結果として選んだテーマは新しい RNA を自分で見つけようということ、材料にまずマイコプラズマを選んだ。これはある程度の見通しがあったことで、マイコプラズマの全 tRNA とその遺伝子を単離し構造を決定していた過程で、いくつかの small RNA の存在には気がついていたからである。博士課程に入ってきた牛田千里さん(現弘前大)と二人でこのプロジェクトをスタートさせ、彼女は1年足らずの間に6種の small RNA (そのうち3種は既に他種で見つかった

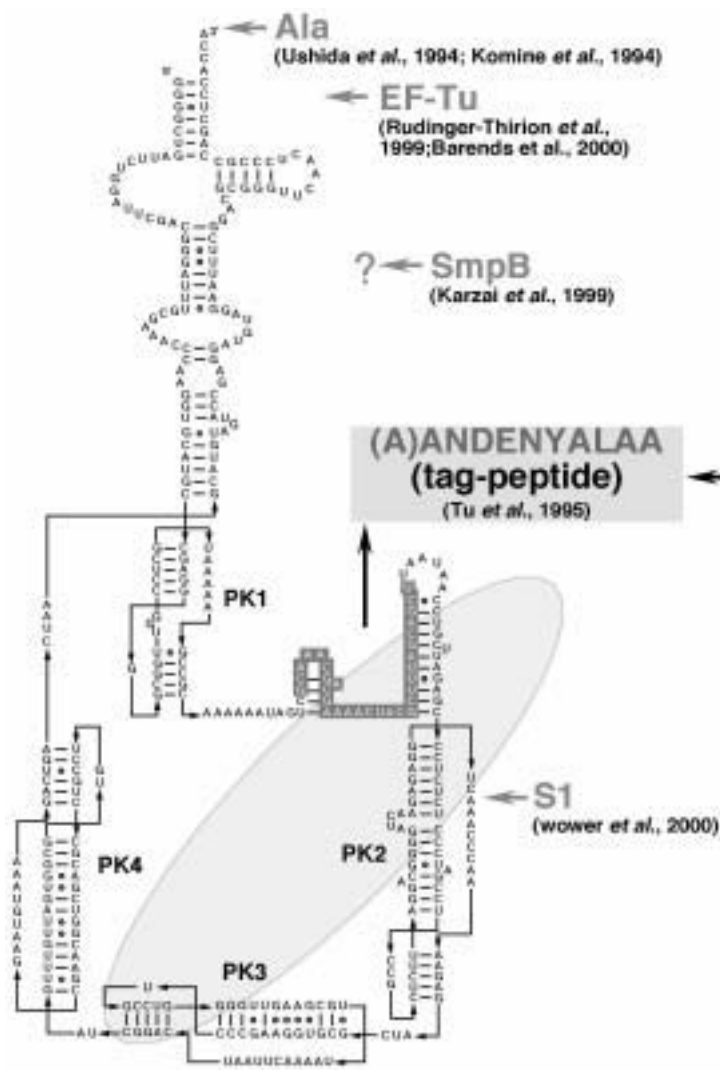
タグがプロテアーゼの標的になり翻訳に失敗したタンパクを分解するシステムである

もののホモログ)を見つけたし、その構造を決定した。その中で興味を引かれたものが二つあった。ひとつは U6 snRNA に似た配列をもつ MCS4 RNA、そしてもうひとつが tmRNA である。この RNA は 1979 年に Apirion のグループが大腸菌で見つけ 10Sa RNA と名付けていたもので、その意味では新しい RNA とはいえないものの、その機能にはまったく手が付けられていなかった。興味を持った理由はその RNA の末端が tRNA 様の構造を取ることに気がついたことである。それまでに大腸菌をはじめ数種の 10Sa RNA 遺伝子配列が報告されていたのでそれを見るとやはり tRNA 様構造は存在する。それに誰も気がつかなかったのは DNA 配列だけを決めて RNA 両末端のアサインメントが不正確であったためであろう。その頃私はマイコプラズマの tRNA 全遺伝子探しをしていたのでその特徴は配列をひとめ見て気が付いたのである。1991年の春に京都大学の井口八郎氏と電話で話していて、氏も大腸菌の 10Sa RNA の末端の tRNA 様構造を見つけたことを知った。井口氏も大腸菌で全 tRNA 解析を行っていたの

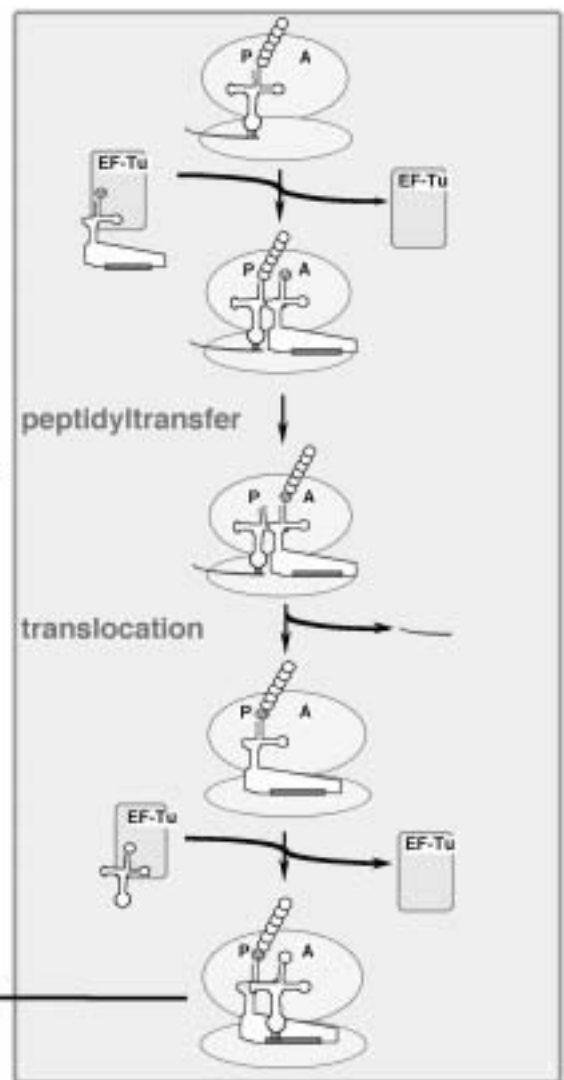
ですぐに気がついたと思われる (なおそれがアラニン tRNA の特徴を持つことに気がついたのは井口氏の方が先である)。

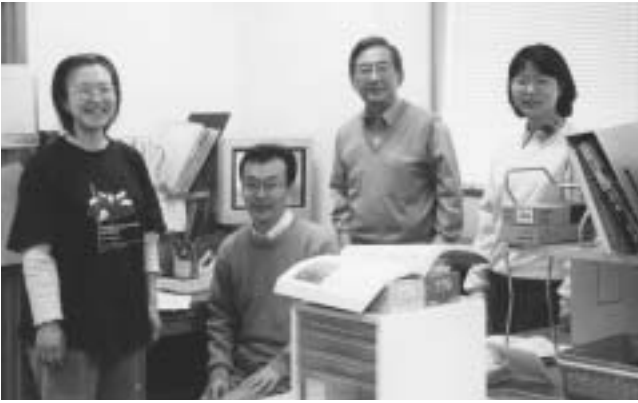
弘前大学に移ったのは10年前の1992年冬であった。研究室を立ち上げるのに半年ほどのブランクがあったが、翌年春には姫野俊太、牛田千里両氏をスタッフに迎え、材料を大腸菌、枯草菌に切り替えて10Sa RNA 機能解析への本格的な取り組みを開始した。tRNA 同様にアラニンを結合し、70 S リボソームに結合するという結果は1993年フランスでの tRNA Workshop で発表し (最初の論文は1994年)、それなりの反響があったが、機能は相変わらず不明であり、考えられる実験を繰り返す毎日であった。Breakthrough は1995年の夏、思いがけない方向から突然やってきた。オーストラリアのグループがマウス interleukin-6 遺伝子を大腸菌で大量発現させたときに、不完全長のペプチドが沢山でき、そのC端に共通配列の短いペプチド(タグ)が付加されていることの発見である。しかもタグをコードしている配列が10Sa RNA 中にある短いORFのC端部

と一致する、つまり mRNA として働くことが示唆されたのである(図)。我々はすぐにすでに完成させていた大量発現系で作った RNA を in vitro 翻訳系に入れて mRNA 活性を測定した。そして試行錯誤の末、その秋に poly(U) 依存 poly(Phe) 合成のある時のみ 10Sa RNA のタグ配列が翻訳されることを明らかにした。この研究のハイライトであり、その時の高揚した気持ちは忘れられない。その年の分子生物学会で発表し論文を書き上げた頃、ショッキングなニュースを松藤千弥氏 (慈恵医大) から知らされた。MIT の Robert Sauer のグループが 10Sa RNA の機能を解明した論文が Science 誌に出ることになり、その紹介をユタ大学の J. F. Atkins と R.F. Gesteland が Nature 誌の News and Views 欄に書くという。松藤氏の仲介で Atkins に電話してこちらの仕事の独自性を説明し、その review に紹介してもらい辛うじて面目を保ったものの、トランス翻訳モデルは我々も考えていただけに、僅差で先を越されたショックは大きかった (この review で初めて tmRNA, trans-translation という語が提唱された)。Sauer らの論文 (1996年) をみて、まったく別方向からのアプローチで



tmRNA





左より牛田千里, 姫野俵太, 筆者, 塙(末次)京子

あることが判り少し安心したが、タグがプロテアーゼの標的になり翻訳に失敗したタンパクを分解するシステムであることは考えが及ばなかった点で目から鱗が落ちる思いがした。その年の第1回 RNA Society Meeting (Wisconsin大)での発表の反響は大きかった。しかしトランス翻訳反応の直接証明といえる *in vitro* トランス翻訳系についての論文は我々の自信作であったのにも関わらず、5つの雑誌に投稿してほとんど門前払いの扱いで reject され続け、やっと6つ目の *J. Mol. Biol.* に accept されたのは1年後の1997年の春、研究をスタートさせて5年がたった。

次の5年間はあっという間に過ぎた。筋道が判ると次にやるべきことは誰もが同じことを考える。競争である。tmRNAの構造と機能、結合タンパク質、トランス翻訳の分子メカニズム、生理的意義、等々。我々のグループは姫野氏が中心となり数百種のtmRNA変異体を作り、*in vitro* トランス翻訳系でのtmRNA機能構造解析を徹底的に行うことにより辛うじて独自性を保ってきた(約15編の論文となっている)。昨年から今年にかけて新規に参入したグループからのtmRNA関連論文が目立って増えてきており、競争はますます激しくなっている。何度か先を越された苦い思いを繰り返しながらも、これまでなんとか取り残されずにやってきたというのが実感である。一方、この5年

間でtmRNA、トランス翻訳が一般に広く知られ、教科書にも取り上げられるようになったことには多少の感慨がある。

書きたいことはまだあるが紙面が尽きた。博士課程もなかった地方大学でtmRNA研究を曲がりなりにも世界に伍してこれまでやってこれたのは、スタートがよそより早かったことと、独自の系を持ったことが大きな要因であったと思う。誰もやっていない、結果が予測できないテーマに取り組むのはリスクと不安を伴う。しかし、それが解消されていく過程では研究の醍醐味を十分に味わうことができた。この10年を振り返って、まだ機能が判らず日夜議論し、色々試してみても結果に一喜一憂していた頃が、もっとも楽しかったと感じる。また、弘前大学で研究室を開いた年に「横山重点」(横山茂之代表)が始まり、「渡辺特定」(渡辺公綱代表)がつづき、それぞれ格別の配慮をいただいたことも大きかった。「未来開拓プロジェクト」(遠藤弥重太代表)からも大きな援助をいただいた。これらがなければ研究の継続さえ困難だったろう。代表の先生方、関係者各位には改めて深く感謝したい。そして、今回「中村特定」の5年間が始まった。今後5年間のこの分野の進展はある程度予測できるが、その中で我々のグループがどれだけ貢献できるかに頭を悩ましている昨今である。

プロフィール

1968年名古屋大学大学院博士課程修了、理学博士。広島大学助手、名古屋大学助教授を経て1992年より現所属、教授。

武藤 昱

(弘前大学農学生命科学部)

トッパダウンとボトムアップの間に

木下和生

(京都大学大学院医学研究科分子生物学)

私は抗体遺伝子のクラススイッチ組換えという現象を見つけた本庶佑教授の研究室に医学部4年生のころからお世話になりそれ以来、大学院に入学してからも、同研究室でクラススイッチをテーマに研究をしています。抗体遺伝子の研究からイントロンの存在や、エンハンサーによる転写調節機構、分泌タンパクのシグナル配列、体細胞での遺伝子変化(可変領域のV(D)J組換え、体細胞突然変異、定常領域のクラススイッチ)など驚くべき発見がもたらされましたのは皆さんご存じの通りです。だれにとっても自分が調べている遺伝子ほどかわいいものはないでしょうが、私にとっても抗体遺伝子がナンバーワンであり、まだまだそこにお宝が眠っているのではないかと期待しています。ここでは本研究班に私たちを結びつけてくれた activation-induced cytidine deaminase (AID) というお宝についてご紹介したいと思います。

AIDはクラススイッチが誘導された細胞と誘導前の細胞でcDNAサブトラクションを行い単離された198アミノ酸からなるタンパクで、同僚の村松正道くんにより1999年に報告されました。抗体をつくるBリンパ球特異的に発現しています。ノックアウトマウスを作って調べますとそのネズミではクラススイッチ組換えのみならず体細胞突然変異も起きないことが分かり、また、ヒトでもその遺伝子に変異が生じると同じ表現型をしめすことがフランスの協同研究者から報告されました。つまり、AIDは抗体の多様性を生むための master controller であると言えます。免疫の研究者以外にこの発見に興味を示してくれたのはRNA編集を研究している人達でした。というのもAIDはアミノ酸配列上RNA編集酵素であるAPOBEC-1と相同性があり、RNA上のシトシンをウラシルに変えるcytidine deaminase活性を持っていたからです。現在はAIDが本当にRNA編集酵素であるのかどうか、もしそうだとしたら編集標的となるRNAは何かという点に焦点をおいて解析を進めています。

抗体遺伝子はDNA組換えや突然変異を「環境に応じて」行うことができるインテリジェントな遺伝子です。この現象を細胞のなかの情報の流れという観点でみると、ゲノムに刻まれた情報にしばられないフレキシブルな能力を進化のなかで獲得したと捉えることもできます

図1にマウスの抗体重鎖遺伝子の模式図を示します。抗体可変領域の遺伝子はV、D、Jという3種類の断片が複数コピー並んだクラスターをなしており、Bリンパ球が骨髄で生まれてくる過程で、それぞれのうち一つがVDJ組換えにより選ばれ機能的なVエクソンとして結合されます。この反応はRAG-1、RAG-2という進化的にトランスポゾンに由来すると思われるendonucleaseにより触媒されます。このようにして可変領域の再構成を完了したB細胞は表面に膜型の抗体を発現し、そこから入るシグナルによりさらに成熟した段階へと進みます。成熟したB細胞は骨髄を出て末梢組織に分布しますが、そこで抗原に出会い活性化されると可変領域に通常の約百万倍の頻度で突然変異が誘導され、その後、抗原によりよく結合できるものが

選択的に増殖するという現象が起こります。これが抗体の親和性成熟であり、リンパ節や脾臓の胚中心で起こります。AIDはここで発現しています。胚中心では同じく、抗体の定常領域をすげかえるクラススイッチが起こります。B細胞は最初にIgMクラスの、図に示しますようなlooping out型の欠失を伴う組換えがイントロンにある繰り返し配列に富むS領域間で起こりますと下流の別のクラスの定常領域遺伝子(図ではC ϵ)が可変領域遺伝子と連結されあらたなクラスの

抗体(図ではIgE)が出始めるのです。このようにして様々な抗原を効率よく結合できる可変領域が抗体の性質を決める種々の定常領域とリンクされ、極めて多様な抗体が生まれるのです。

この体細胞突然変異とクラススイッチはこれまで独立の機構も異なる現象であると考えられていたのですが、ともに標的DNAの転写が必要であることや、DNA切断を伴うという報告に加え、AIDが両者に必須であるという結果から、共通の分子機構があるのではと考えられ始めています。私たちはAIDがDNA切断酵素の活性制御に関与しているのではと疑っていますがまだ証拠はありません。AIDと類似しているAPOBEC-1はapolipoprotein Bの

mRNA の編集に必須の酵素であり、6666 番目のシトシン周辺の塩基配列を認識して結合し、そのシトシンの脱アミノ化によりウラシルに変換します。この結果、ゲノム上ではグルタミンのコドンが終止コドンにかわり短いタンパクが生成されるわけです。RNA 編集はこの脂質タンパクの系以外にも神経のグルタミン酸受容体のアミノ酸置換型変異を起こす ADAR による RNA 編集や ADAT による tRNA の編集が証明され、また造血系やミトコンドリア、ウイルスゲノムでも RNA 編集が示唆されています。RNA editing をキーワードに PubMed で検索していただければホットなフィールドであることがお分かりいただけるでしょう。ゲノムを変えることなくタンパクを変えられるわけですから、臨機応変かつ微妙で多様な調節を可能にする巧妙なシステムであります。



家族と

AID が RNA 編集酵素であろうとなかろうと、抗体遺伝子は DNA 組換えや突然変異を「環境に応じて」行うことができるインテリジェントな遺伝子です。この現象を細胞のなかの情報の流れという観点でみると、ゲノムに刻まれた情報にしばられないフレキシブルな能力を進化のなかで獲得したと捉えることもできます。細胞の社会では核の指令のもとに統率されたトップダウン方式だけでなく、環境の変化に応じて APOBEC-1 が（ひょっとすると AID も）やるように伝令文書 (mRNA) にすこし手を加えたり、抗体遺伝子のように極端な例ではボトムアップ式に指令の源 (DNA) をも変化させることで柔軟な対応を可能にしているのでしょう。私はこのような仕組みは細胞の社会にとどまらず、実は人間の社会においても行われているからこそ円滑な社会が発達し、今後も続いていく（ものと私は期待

しています) のではないかと思うようになりました。最近では学生に話をするときにも、「細胞を知ることは世の中を知ることにもなるんだよ」と言ってみたりします。銀行や市町村の合併は最近珍しくないですが、卵子と精子、筋細胞などに代表される細胞の融合と言葉以上の共通性があるのではないかと思ったりもします。

先日大学から配布された『新しい「国立大学法人」像について』という冊子やプロジェクト志向型大型研究組織の設立の流れにもあるように、近年はトップダウン式の意味決定や予算配分などが目立つような気がして、すこし心配です。トップダウン、ボトムアップ、横のつながり、いろいろなバランスの上になりたってきた社会の方向性を少数の人の意見で上からより良い方向に変えるのは簡単ではないと思います。でも、楽観的な私はそれについて大いに心配しているわけではありません。人間の社会は細胞と同様にフレキシブルなシステムです（と信じている）から、たとえ上の人が間違いを犯そうが何をしようが、状況によっては現場で伝令を修正（RNA 編集に相当、実社会での例として、車の来ない横断歩道で赤信号を無視するなど）したり、場合によってはトップをすげかえたり（体細胞突然変異やクラススイッチ組換えに相当、実社会では例をあげるまでもなくよくご存じのはず）して対処する仕組みを社会は持っていると思います。

こういうシステムがいかに効率よく運営されているのかということは 40 億年かけて細胞が試行錯誤した結果に学ぶところがあるのではないのでしょうか。核が指令を出すといえども、細胞の活動すべてを制御する少数の遺伝子があるわけではありません。

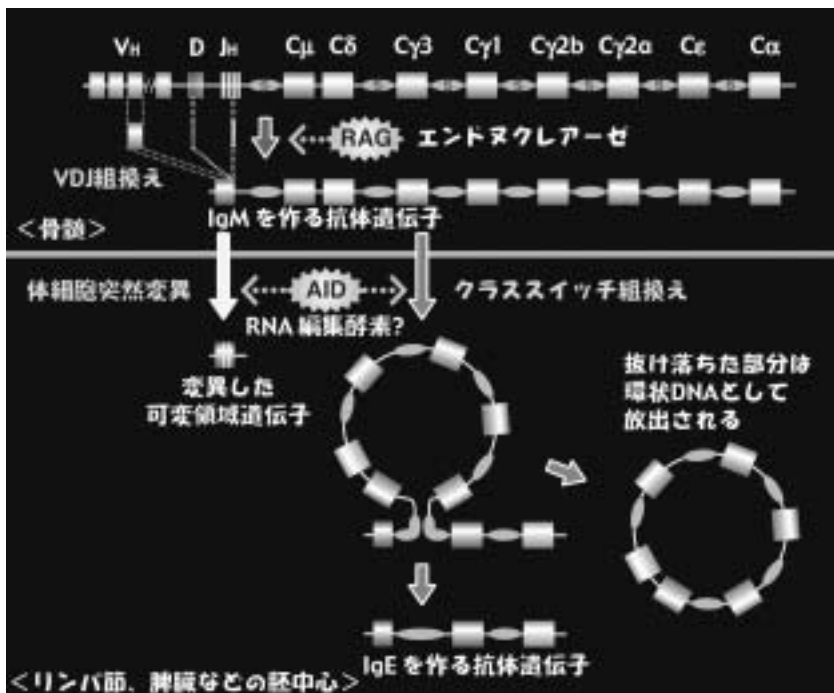


図1. 抗体遺伝子にみられる DNA の変化

ヒトですと2万個の遺伝子それぞれの役割があって、協調しあいながら全体のネットワークとして核の機能を遂行しているのです。2万の遺伝子が自己組織化した結果が核として我々が見ているものであると言い換えることもできます。細胞質には細胞質の自己組織化、細胞集団には細胞集団の自己組織化とさまざまなレベルでの自己組織化の総体として生命の活動が営まれています。社会から研究室までいろいろな組織形態の運営をそのリーダーが意識する場合にも、この自己組織化を促進するようなやり方が良いのではないのでしょうか。そうすることにより、遺伝子がこれまでしてきたように、独創的で画期的な進歩が発生してくるのだと私は考えます。自己組織化がおこるためには構成員が共通の目標・利益を持ち、互恵的な関係を築く必要があります。遺伝子の場合はそれが永続した自己の複製であることは明らかですが、社会ではどうでしょう。単純にお金がかればよい、論文を出せばよいとリーダーが思っているようでは一時的な繁栄は起こっても持続したものはならないのではないかと思います。しかし、共通の目標というのは構成員次第で一概にこうあるべきというもので

はないのかもしれませんが。

この研究班も自己組織化しつつある集団であるのでしょう。効率よく自己組織化されるためには構成員の間の情報交換が必要不可欠です。みなさんと積極的にコミュニケーションし、素晴らしい成果を生みだすことができれば大いなる期待をいただきつつ、今後ともよろしく願い申し上げたい次第です。

プロフィール

1994年京都大学大学院博士課程、1997年より同分子生物学講座助手。2002年医学博士号取得、現在に至る。

木下和生

京都大学大学院
医学研究科分子生物学

RNA Update

特集：品質管理と多様性の創造⑥

選択的スプライシング研究の逆襲

井上邦夫 (奈良先端大・バイオ)

多様性を生むスーパースター

近年、ゲノム研究の進展により、選択的スプライシングの重要性が再認識されている。ヒトゲノムを調べた結果、当初の予想よりも遺伝子数が少ないことが示唆され、遺伝子数の少なさを補うように、全体の4割から6割程度もの遺伝子が何らかの選択的スプライシングを受けると推定されている。

選択的スプライシングによって多くのタンパク質を生じる例は枚挙に暇がないが、とりわけ、ショウジョウバエ *dscam* 遺伝子のケースは驚異的である。この遺伝子の場合、第4番目のエキソンは、12のレパートリーからどれか1つが選択使用される。同様に、第6番目は48種、第9番目は33種、第17番目は2種類の中から1つのエキソンが選択される。それぞれの選択的スプライシングが独立に起こっていると仮定すると、何と3万8千種類もの mRNA

が生成する計算となるのである。

選択的スプライシングには、対立する機能をもったタンパク質を生成する場合や、終止コドンを含むエキソンの選択使用によって、機能を持つタンパク質の生成のオン・オフを決めている場合なども存在する。特に我々が注目しているのは、いわゆる組織特異的スプライシングである。組織や器官、時期、組織内の細胞種などに応じて、スプライシング様式が変化するケースである。

さて、選択的スプライシングについてさらに話を進めるにあたって、まず強調しておきたいのは、(1)いわば「合目的」なスプライシング制御とそうでない選択的スプライシングが存在すると考えられる、(2)選択的スプライシング制御には、何らかの制御因子によって積極的に制御するものと、スプライシング装置の特性として自然に起こってしまうケースが考えられる、ということである。ある遺伝子

で選択的スプライシングによって複数種のタンパク質が生成する場合、生物学的・生理的に重要性の高い制御（後述のショウジョウバエ性決定過程はその好個の例である）もあれば、“何となくできちゃった”的なものも多そう。スプライシングの総説を読んでもそういうことには触れずに選択的スプライシングと一括りにしているが、実は多種多様な代物なのである。そして、後述するように、これまでの研究から、選択的スプライシングの制御因子には、基本的なスプライシングに関わる因子や普遍的に存在する因子もあれば、組織・時期特異的な制御因子も存在していることがわかっている。最近の研究の主流は、前者の General 因子であろう。私自身は、もっと特異的制御因子が存在するはず（あるいは、存在していて欲しい）と考えてきた。現時点での目標は、合目的制御で、組織特異的因子による選択的スプライシング機構を解明すること、である。本稿は、そういう思い入れ（思いこみ？）のもとに書いていることをお断りしておきたい。

選択的スプライシング研究の苦悩

選択的スプライシング研究は、一昔前は大いに脚光を浴びる分野であった。昔を懐かしむような書き方をすると、自分が歳をとっただけだろうと笑われるかも知れないが、決してそんな問題ではない。多くの研究者の興味が本ニュースレターで取り上げられている輸送や NMD, RNAi など進展めざましい分野に吸い取られ、何となく沈滞ムード、海外のミーティングでも、どうも隅っこに追いやられている感じである。

では、選択的スプライシングは、研究すべき面白さがなくなってしまったのか？否。実際のところ、選択的スプライシングはもちろん、基本的なスプライシング機構にも、解けない謎がまだまだ山積みなのである。スプライシング装置は、膨大な配列の海の中からいかにしてエキソン・イントロンを見つけ出すのか？どうやって隣り合うエキソン同士の間でのみ正しくスプライシングを行いうるのか？そして、いかにしてある特定の時期や場所でのみ特定のエキソンの使用を変化させるのか？

特定の遺伝子について組織特異的スプライシング機構を明らかにするためには、組織特異的なスプライシングを再現する細胞株やその核抽出液を用いた実験系を用い、制御に必須なシス配列の同定や制御因子の同定を進めていくのが一般的である（このような手法が奏功している代表例としては、Black 博士のグループで行われてきた c-src 遺伝子における神経系特異的スプライシング機構の研究が挙げら

れる。また、ごく最近の CaMK IV に応答するシス配列の同定にも唸らされた）。このような解析が多くの研究室で行われ続けてきたわけだが、その労力の割に、これまで明らかとなった知見は極めて乏しい。厳しい現実である。理由はさまざま考えられる。シス配列が複数散在していたり、イントロンやエキソンの長さ自体が影響してしまうと、なかなか真実が見えてこない。また、生化学的に制御因子を同定していく場合にも、組織特異性に関わる活性を追いかけているつもりが、ユビキタスな因子に辿り着いてしまうこともある。解析の難しさは、研究者が別のエキサイティングな領域に移ってしまう大きな要因になっていそう。

これまでの選択的スプライシング研究

1) 普遍的因子による調節機構

かれこれ 10 年前に京大・志村研究室で私の後輩院生であった渡我部（わたかべ）らは、エキソン内にスプライシングのエンハンサー配列が存在することを見出した。その後、多くのエンハンサー配列やサイレンサー配列が同定されている。また、最近の疾患研究（たとえば、tau 遺伝子が原因遺伝子となっている前頭側頭型痴呆症など）から、エンハンサーやサイレンサーの重要性が証明されている。

スプライシングエンハンサー配列には SF2/ASF をはじめとする SR タンパク質ファミリーが結合し、弱いスプライシング部位でのスプライシングを活性化

する。SR タンパク質は、スプライシング因子同士を架橋する接着剤的な存在で、基本的なスプライシングに必須であるが、エンハンサー配列への結合によって選択的スプライシング調節因子として働く。各 SR タンパク質の好みのエンハンサー配列に違いがあること、細胞ごとに存在量が違うことなどから、さまざまな選択的スプライシング調節において主要な役割を果たすと考えられており、多くの研究が行われている。

一方、PTB は、イントロン内のピリミジン配列に結合し、スプライシングを抑制する。多くの遺伝子のスプライシング制御に重要なことが示され、脚光を浴びた。最近、神経系特異的な PTB（nPTB/brPTB）も同定されている。

2) ショウジョウバエ性決定過程における特異的制御因子

ショウジョウバエ体細胞の性決定過程は、いくつかの遺伝子の発現が性特異的スプライシングによって制御されるカスケード系である。私が博士課程の時、後輩院生や当時助手であった坂本さん（現 神戸大教授）とともに、これら性決定遺伝子をモデル系として選択的スプライシング機構

スプライシング装置は、膨大な配列の海の中からいかにしてエキソン・イントロンを見つけ出すのか？どうやって隣り合うエキソン同士の間でのみ正しくスプライシングを行いうるのか？そして、いかにしてある特定の時期や場所でのみ特定のエキソンの使用を変化させるのか？

を解明することに成功した。詳細は省略するが、我々の研究から、特異的制御因子 (Sxl タンパク質) が特定のスプライシングを抑制する負の制御系と、特異的因子 (Tra, Tra-2) によって特定のスプライシングを活性化する正の制御系が存在することがはじめて明らかとなった。後者については、その後 Tom Maniatis 博士の研究グループによって、制御因子が SR タンパク質と相互作用することによってスプライシングの活性化を行っていることが明らかにされた。

3) 脊椎動物における組織特異的制御因子

私自身は、その後しばらくの間、選択的スプライシング研究から遠ざかることとなった。本格的に前線復帰したのは、およそ3年前のことである。そのブランクの間、幸か不幸か、組織特異的スプライシング制御機構の研究が大きく前進したとは言いがたい。しかし、2つの重要な組織特異的制御因子が同定されている。CUG-BP を含む CELF/Bruno タンパク質ファミリーと、Nova タンパク質である。CUG-BP は CUG トリプレットリピートに結合する因子として同定された。そして、Cooper 博士らによって、このタンパク質が心筋性トロポニン遺伝子のイントロン内に存在する CUG 配列を介して筋肉型スプライシングを誘導することが示された。我々も CELF/Bruno タンパク質ファミリーの解析を行っており、これらのタンパク質が CUG 配列にはあまり結合しないと言う結果を得ていたため、個人的には、彼らの論文に?マークの部分もあるのだが、CUG-BP が組織特異的スプライシング制御因子であることを示した功績は大きい。一方、Nova は、Darnell 博士のグループによって、腫瘍随伴性の自己免疫疾患の解析から同定された神経系特異的タンパク質である。その後、同グループによって着々と知見が積み重ねられ、約2年前、ノックアウトマウスを用いた解析から、Nova が抑制性グリシンレセプター遺伝子の神経系特異的スプライシングを制御することが示されている。

我々のアプローチ

我々は、まずゼブラフィッシュにおいて組織特異的に発現する RNA 結合性タンパク質を同定し、それぞれの性質を解析していくことを糸口として、選択的スプライシングを含めた RNA 情報発現系の制御因子同定を目論んできた。このアプローチの正しいことは、Yui Jin 君の行った fox-1 の解析によって証明された。fox-1 はゼブラフィッシュ初期発生過程において筋肉系列特異的に発現し、RNA 認識モチーフ (RRM) 型の RNA 結合タンパク質をコードしている。また、このタンパク質は細胞内で核に局在しており、スプライシングなどの核内イベントに関与することが期待された。SELEX 法により結合配列を同定した結果、GCAUG 配列に特異的に結合することが明らかとなった。



井上グループ (右端が筆者、チョウの少年が神唯 P50 参照)

GCAUG なる配列は、すでいくつかの遺伝子の選択的スプライシングにおいてシス配列として働くことが示されている配列であるが、結合するタンパク質に関しては全く知見がなかった (希望の陽が強く射しかけてきた気がしたことは言うまでもない)。筋肉系特異的スプライシングに関して GCAUG がシス配列として働くという報告は全くなかったため、論文をひっくり返して探した結果、いくつかの標的候補遺伝子を見つけることができた。そのうちミトコンドリア ATP 合成酵素ガンマ遺伝子を自治医大・遠藤博士から、アクチニン遺伝子をケンブリッジ大 Smith 博士に供与していただき、培養細胞へのトランスフェクション実験を用いて、Fox-1 がこれらの遺伝子の筋肉型スプライシングを誘導できることを示した。また、筋肉型スプライシングではないが、GCAUG 配列がスプライシング促進配列として働くことが示されている代表例としてフィブロネクチン遺伝子について解析を行った結果、ごく低レベルながら Fox-1 による制御効果が検出された。Fox の興味深い点は、エキソン除去を誘導するケースとエキソン挿入を誘導するケースが存在することである。さらに、最近のコンピューター解析から、筋肉や神経系特異的なエキソンの近傍イントロン中に GCAUG 配列が多く存在することが示されており、Fox-1 がさまざまな遺伝子の組織特異的スプライシングに重要な役割を果たすものと考えている。今後の課題は、どうやって Fox-1 がスプライシング制御を行っているのか、分子メカニズムの解明である。

おわりに

選択的スプライシングの重要性が再認識されている今、研究者にとって追い風が吹いていることは間違いがない。未解決の問題が多いからこそ、若い人にとってやりがいがあるだろう。自分自身を含めたスプライシング研究者がこの風をつかんで大きく飛翔することを祈り、熱いエールを送りたい。

……最後の最後に。本特定での私の計画研究課題は「mRNA 局在化の制御機構」です。次のニュースレター執筆の機会には、是非、mRNA 局在化に関連したすばらしい研究結果をご披露できるように頑張っていきたいと思っております。

プロフィール

1992年京都大学大学院理学研究科博士課程修了（指導教官、志村令郎教授）。カリフォルニア大学アーバン校(Ken Cho 博士)ポスドク研究員、京都大学理学部助手を経て、1996年より奈良先端科学技術大学院大学。

井上 邦夫

(奈良先端大・バイオ)

RNA Update

特集：品質管理と多様性の創造⑦

RNA スプライシングがおもしろい

— 選択的スプライシングの巧妙さとその破綻 —

今泉 和 則

〔奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科細胞構造学〕

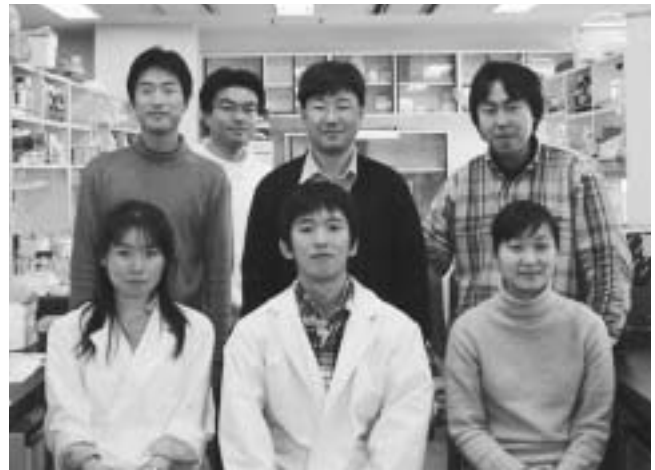
ヒトゲノムの全容が明らかとなり、約4万種類ある遺伝子の機能がゲノム情報から推定されるものと期待されている。しかし、期待に反し遺伝子はいつまでも我々にバールを剥がしてくれない。遺伝子配列だけでは理解できない遺伝情報の複雑さがある。その複雑さを生むひとつに選択的スプライシングが挙げられる。選択的スプライシングとは、前駆体mRNAからイントロンを切り出し、エクソンをつなぎ合わせる過程で、様々な様式のエクソン選択をするRNAプロセッシングのことをいう。このシステムによってあるひとつの遺伝子から複数の mRNA が産生され、機能の異なるタンパク質が発現するのである。例えば、細胞死制御遺伝子としてよく知られている Bcl-x 遺伝子の選択的スプライシングを例に挙げることができる。Bcl-x は選択的スプライシングによって、ロングフォーム (Bcl-xl) とショートフォーム (Bcl-xs) が産生される。全長型の Bcl-xl は細胞死を救済する役割があるのに対し、Bcl-xs は Bcl-xl に対しドミナントネガティブ的に働き、細胞死を促進させる (Cell, 74: 597, 1993)。このように、相反する機能が選択的スプライシングにより付与され、それが細胞の運命を決定する重要な事象になっている。このような例は、細胞死の生物学以外にも様々な生命現象の中でたくさん知ら

れていることは言うまでもない。

スプライシングの巧妙さ

スプライシングの詳細な分子機構についてはまだまだ解かっていないというのが現状である（と私は思っている）。snRNP と呼ばれる一群の核タンパク質群がRNAプロセッシングの実行部隊、すなわちイントロン切断とエクソン融合の主役であることは良く知られている。しかし、何 kb あるいは何 10kb という非常に長いイントロン部分をどのように認識し、エクソン部分だけを上手くつなぎ合わせるのだろうか。エクソン-イントロン間の認識を促す道標となる特異的配列がプレmRNA (mRNA 前駆体) 側にあるはずである。事実酵母から動物細胞に至るまで、イントロンとエクソンの境目 (スプライス部位) の配列は、5' 側は必ず GU で、3' 側は AG で終わるという規則性が保存されている。しかし、これだけの情報では正確にスプライシングを制御できるわけではない。このエクソン-イントロン結合部分以外に、スプライシングの精密さを規定するプレmRNA 側の特異的配列がいくつか知られている (図)。この中で、エクソン部分に存在するスプライシングエンハ

ンサー (ESE) について少し触れることにする。ESE は GARGAR (R はプリン塩基) が連続的に繰り返す構造になっている。この特異的配列にはセリン残基およびアルギニン残基に富むドメイン (RS ドメイン) をもった SR タンパク質が結合する。この結合を介して、様々なスプライシング因子群が直接的あるいは間接的に pre-mRNA に結合し、イントロン部分を切り出す。SR タンパク質はいわばスプライシングの司令塔の働きをするのである。ESE 配列内の一塩基が何かの塩基に置き換わると SR タンパク質が ESE に結合できなくなるためスプライシングが抑制される。つまり、ESE が含まれるエクソンはスキップした形の選択的スプライシングを起こしてしまう。最近、スプライシング・サイレンサー (ESS) と呼ばれるスプライシングに抑制的な働きをするエクソン内特異的配列の存在も知られるようになってきた。しかし、ESE と比べると、その配列の保存性は低いと予想されている。



今泉グループ

ここでは SR タンパク質の役割を少し述べたが、スプライシングされる側の pre-mRNA 配列には、スプライシングを起こす因子の認識・結合に重要な配列が多数含まれ、それを認識して様々なスプライシング関連分子群が巧妙に選択的スプライシングを制御しているのである。ひとつの遺伝子でも臓器、細胞種あるいは発生ステージの違いでスプライシングのパターンに違いが見られるのは、スプライシング因子の発現量あるいは活性化状態の違いにより、スプライシングの道標となる pre-mRNA 側特異的配列の認識の相違に基づくと考えられる。そして細胞としての機能を規定するひとつの手段としてこのような多様性をもったスプライシングが重要な役割を果たすことは間違いない。

ダメージを受けたスプライシング因子は RNA スプライシングの際、“フィデリティー(忠実性)の緩み”を生み、本来とは異なったスプライシングを行ってしまう

スプライシング障害を引き起こす。そしてそのほとんどがエクソン内に見つかっている。エクソン内の塩基変異といえば、ミスセンス変異によってそのタンパク質機能が変化して疾患に陥るのだと思われがちだが、必ずしもそうでは

ない。特に先に述べた ESE の領域に塩基変異があると、スプライシングのパターンが大きく変わり、それが原因で疾患発症に結びつくケースがある。この例としてよく知られているのが、神経変性疾患のひとつである前頭側頭型痴呆症 (FTDP-17) 原因遺伝子タウのエクソン 10 の異常スプライシングである。タウのエクソン 10 にみられる塩基変異のいくつかはエクソン 10 を含まないス

プライシングを起こす(正常ではエクソン 10 を含む割合が約半分)。これはスプライシングを制御する ESE 配列の変異のため、スプライシングの司令塔である SR タンパク質によるスプライシングの活性化が起こらなくなってしまうからである。ESS に変異が入った場合は、逆にスプライシングが活性化され、全てがエクソン 10 を含むようになる。ESE あるいは ESS 領域の変異から起こる疾患は、他に遺伝性筋ジストロフィーも有名で、dystrophin 遺伝子のエ

スプライシング制御の破綻と疾患

ヒト遺伝性疾患と関連のある塩基変異のうち約 15% が

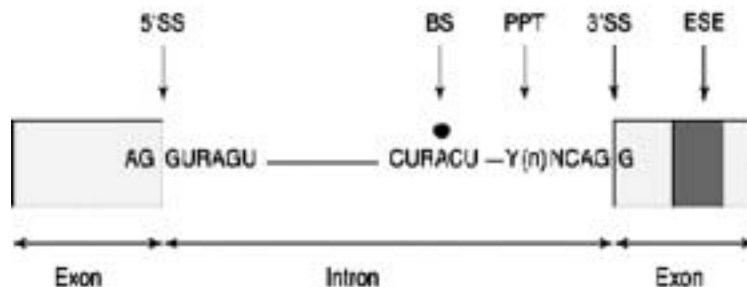


図 スプライシング制御に関する pre-mRNA 側の特異的配列

5'SS: 5' スプライスサイト, 3'SS: 3' スプライスサイト, BS: ブランチングポイント, PPT: ポリピリミジントラクト, ESE: エクソニック・スプライシング・エンハンサー。R: プリン塩基, Y: ピリミジン塩基。pre-mRNA 側の特異的配列をスプライシング因子が認識・結合する (Trens. Biochem Sci. 25:106-10, 2000. からの改変引用)。

クソン 27 のスプライシング異常がみられる。現在, E S E あるいは E S S 内の塩基変異が S R タンパク質群を含めた様々なスプライシング調節因子の機能にどのように影響を与えて、スプライシング異常が起こるかが研究の焦点になっている。おそらくそういったメカニズムが明らかにされれば、基本的な選択的スプライシングの制御機構の解明にもつながる。

上に示した病気はいずれも遺伝性疾患で、遺伝子側に変異がありスプライシング制御が攪乱されるために起こる病気である。これは遺伝子側を操作しない限り治療は難しい。一方、遺伝子側に変異はないが、スプライシング制御自体が障害され発症する疾患もある。これに関連して私に最もインパクトを与えた論文は 1998 年の Neuron に報告された筋萎縮性側索硬化症 (ALS, ルー・ゲーリック病としても知られている) でみられるグルタミン酸トランスポーター E A A T 2 の異常スプライシングである。孤発性 (非遺伝性) ALS 患者に観察される現象であるので、E A A T 2 遺伝子に塩基変異が起こっているわけではない。しかし、スプライシングパターンが本来とは異なるいくつかのエクソンが欠失した様々な異常スプライシング産物が脊髄前角に検出されている。E A A T 2 の異常スプライシングは、E A A T 2 タンパク質の本来の機能低下を招きグルタミン酸の取り込み障害とその結果としての神経毒性を惹起する。運動ニューロンは変性あるいは細胞死を起こし、その支配下領域の機能異常、つまり筋肉随意運動障害と萎縮につながるというのである。この研究成果に関しては、異常スプライシング産物の発現は ALS 患者の末期で起こる現象、つまり病気の結果をみている可能性もあると指摘されている。実験の再現性もうまく取れないこともあり、ALS 発症がスプライシング異常であるという仮説は現在棚上げされている。もろもろの状況はあるにせよ、疾患発症にスプライシング障害が関連すると指摘したアイデアは画期的であった。その後、私どもの研究も含め、疾患特異的スプライシングバリエーションの検出が試みられ (孤発性アルツハイマー病患者からプレセニン 2 遺伝子、様々な悪性腫瘍の転移に関わる CD 44 遺伝子の異常スプライシングなど)、疾患と異常スプライシングとの関連性を示唆する報告も増えてきている。

異常スプライシングの原因

疾患の病巣部でなぜ異常なスプライシングが起こるのか非常に興味深い。また、その原因がわかれば病気の治療につながるかもしれない。それを十分に説明できる実験データはないが、いくつか可能性が指摘されている。ひとつは酸化ストレスが原因でスプライシング因子の遺伝子 DNA にダメージが生じたり、あるいはその翻訳産物自身が酸化

されることである。ダメージを受けたスプライシング因子は RNA スプライシングの際、“フィデリティー (忠実性) の緩み”を生み、本来とは異なったスプライシングを行ってしまうというのである。もうひとつは、病変部局所でスプライシングを受ける遺伝子 DNA に変異が起こり、転写産物のスプライシングに重要な道標となる特異的配列が消失してしまうためにスプライシングパターンが変わるといった直接的影響である。後者の場合は、DNA リペアーの観点から疾患を見ていく必要があり、私としては興味が湧かない。一方前者の場合は、スプライシング因子側の問題であるので、スプライシング制御を改善してやれば、治療につながる可能性が生まれてくるのでおもしろい。酸化ストレスのみでなく、ストレス依存的にスプライシング因子の活性変化あるいは発現変化がみられるケースがある。S R タンパク質の一種で、メジャーな E S E 結合タンパク質である T r a 2 β と呼ばれる分子は、低酸素刺激の際に転写レベルで発現が上昇する。つまり、T r a 2 β によりスプライシング制御される遺伝子は低酸素刺激を受けるとスプライシングパターンを大きく変化させる可能性があるのである。また、本来スプライシングの制御機構とは全く関係のないタンパク質が、低酸素ストレスの際にプレセニン 2 遺伝子エクソン 5 の特異的配列に結合し、エクソン 5 をスキップさせる現象も私どもは見つけている。

スプライシング異常を起こす要因として、酸化ストレスや低酸素刺激を例に挙げたが、その他の様々なストレス、刺激、あるいは細胞内シグナル伝達などに伴ってスプライシング調節因子の活性が変化し、選択的スプライシングの制御異常が生じてもいいのではないかと。細胞はストレス負荷に対して恒常性を維持するために防御システムを働かせようとするが、その際に諸刃の剣として巧妙に構築されたシステムさえも自ら崩し、細胞傷害を時として悪化させているのではないかと。基本スプライシング制御のメカニズム解明に加え、巧妙に構築されたスプライシング制御機構がなぜ破綻していくのか、疾患発症に関連する異常スプライシングはこれからおもしろくなってくる。

プロフィール

1985 年東京農工大学農学部獣医学科修士課程修了、医学博士。田辺製薬株式会社創薬研究所、大阪大学大学院医学系研究科非常勤講師を経て 2000 年より現所属、助教授。

今泉 和 則

奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科
細胞構造学

生命体の多様性と品質管理を担う核内メカニズム

萩原正敏

(東京医科歯科大学難治疾患研究所)

1) はじめに

ゲノムプロジェクトが終わってみると、遺伝子の数が意外と少ないことが判明した。大腸菌が4289遺伝子、出芽酵母が6241遺伝子なのはともかくとして、人間でも4万弱しか遺伝子はゲノム上に存在しない。人間が大腸菌の9倍、酵母の6倍程度の設計情報で構築されているとは思えない。では構造や機能の多様性を生み出す如何なる仕掛けが、人間を含めた高等生物には備わっているのか？真核細胞のゲノム上では遺伝子はイントロンによって分断されて存在する。ゲノムDNA（遺伝子）から転写されたmRNAのイントロンが除去される過程（スプライシング）において一つの遺伝子から複数の成熟mRNAを生み出すこと（選択的スプライシング）により、多細胞生物は、一つの遺伝子を幾通りにも使い回している。また、核外へのmRNA輸送や翻訳段階でも複雑かつ精妙な制御を行うことで、多細胞生物はその複雑な構造や機能を生み出し維持しているらしい。

2) 遺伝子発現の諸過程間の連携

転写、RNAプロセッシング、核外へのRNA輸送、そして翻訳は、相互に連携する連続反応過程と考えられている(図1)。例えばSF2やSC35などのSR蛋白は選択的スプライシングの特異性決定に重要な働きをしているが、転写調節因子の結合するプロモーターをスワップすると、SR蛋白依存的選択的スプライシングのパターンに影響が出ることが報告されており(Mol. Cell 4: 251, 1999)、転写調節因子が選択的スプライシングをも調節する可能性がある。また、キャッピング酵素のGTaseはリン酸化されたRNAポリメラーゼII(Pol II α)に特異的に結合し、initiation complexの構成因子として伸張反応前のmRNAにキャップ構造を付加するものと思われる(PNAS 94: 12898, 1997)。キャップ構造はmRNAをexoribonucleaseによる分解から保護する働きをするだけでなく、スプライシング反応、polyA付加反応などのRNAプロセッシングを促進する。酵母で転写終結(transcriptional termination)とpolyA付加を別々に行うことは可能だが、転写終結と

cleavageは不可分の反応であることが示されている(Science 280: 298, 1998)。polyA付加反応を触媒するCPSFはpreinitiation complexで基本転写因子のTFIIDと結合しelongation時にはRNAポリメラーゼIIのCTDに受け渡される(Nature 385: 357, 1997)。また、転写coactivatorのCBPはRNAヘリケースと結合することが判明しており、mRNAの高次構造を変化させるRNAヘリケースもmRNAファクトリーの構成要素であるらしい(Aratani, S. et al.: Dual roles of RNA helicase A on CREB-dependent transcription. MCB. in press)。キャッピングは転写やスプライシングとリンクしているばかりでなく、mRNAの核外輸送や翻訳反応の開始に必要である。こうしたキャップ構造の働きはcap binding protein complex(CBC)によって触媒されている。すなわち、CBCはCPB20とCPB80の2種の蛋白の複合体で、NES(nuclear export signal)受容体CRM1と結合するといわれている(GD 12: 3303, 1998)。またCBCは翻訳開始因子の一つeIF-4G(eukaryotic initiation factor-4G)とも結合する(Mol Cell. 6: 191, 2000)。eIF-4Eも核内でU1snRNPなどのスプライシング因子とも挙動をともにする(J Cell Biol. 148: 239, 2000)。そうだとすれば、eIF-4GやeIF-4Eなど翻訳に関わる因子もmRNAファクトリーで作られた成熟mRNAと核内でセットされて、蛋白生産現場であるリボゾームに運ばれるのかも知れない。酵母のmRNAスプライシング異常株(prp1)がmRNAの核外輸送にも異常を示すことから、mRNA輸送はRNAスプライシングと不可分の反応であると予想されている。mRNAの核外輸送と局在化のためには、heterogeneous nuclear ribonucleoproteins(hnRNPs)などのRNA結合蛋白がmRNAと複合体を作る必要がある。1本鎖のpre-mRNAはRNAaseに感受性が高く不安定な状態なので、pre-mRNAは転写直後からhnRNPsと結合する。実際、転写中のmRNAを電顕で調べると、hnRNPsとRNAが‘糸に通したビーズ様’の外観を示す。hnRNPA1のM9配列はNESとして働くが他のhnRNPsがmRNAの核外輸送に果たす役割は良く判らない。ただ、Xenopus卵の核にpre-mRNAを注入するとスプライスされた後、核外に輸送されるが、既にスプライスされた成熟mRNAを核に打ち込んでも、核外輸送

が起こらないことが示されている。これは、スプライソゾームを形成する段階で nuclear export factor が組み込まれることが、核外輸送に必要であることを示唆している。実際、Aly/REF や Y14 はスプライソゾームの中に存在して、スプライスされた mRNA の nuclear export factor として働くことが判明している (EMBO J. 18: 2241, 1999)。

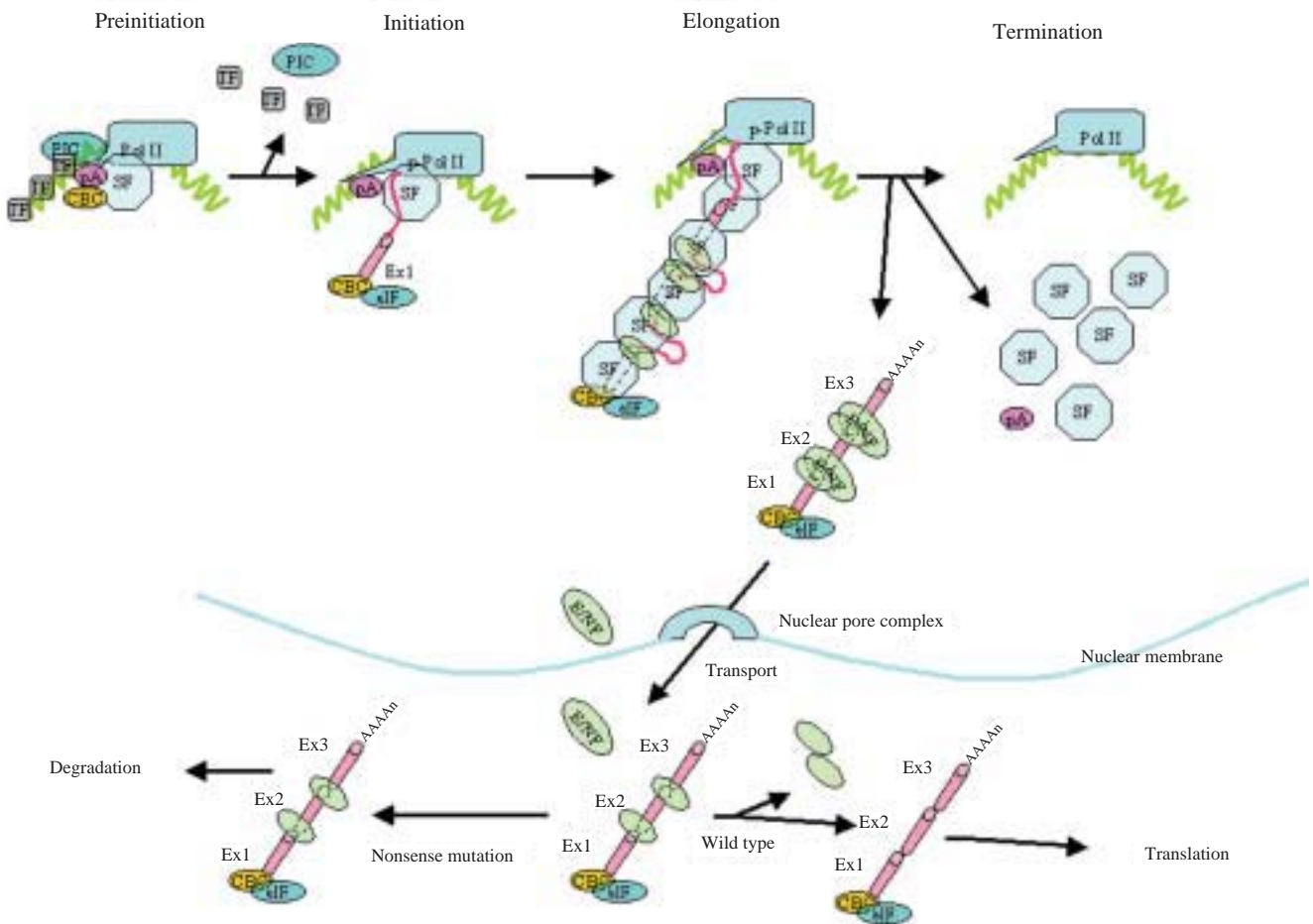
3) mRNA ファクトリーの概念

上記したように、転写、mRNA プロセッシング、そして RNA 輸送が密接にリンクしているのは、転写調節因子から RNA 結合蛋白までを包含する巨大な複合体が核内に存在してベルトコンベアーを持つ工場の生産ラインの様に働き、最終産物として核外へ輸送可能な成熟 mRNA を産生しているのではないだろうか？その仮想的な核内巨大複合体を筆者は 'mRNA ファクトリー' と称している。HeLa 細胞の核には転写サイトが約 10,000 個あり、そのうち約 2,000 が

転写調節因子から RNA 結合蛋白までを包含する巨大な複合体が核内に存在してベルトコンベアーを持つ工場の生産ラインの様に働き、最終産物として核外へ輸送可能な成熟 mRNA を産生しているのではないだろうか？

RNA ポリメラーゼ III ファクトリー、そして約 8,000 が RNA ポリメラーゼ II ファクトリー (すなわち mRNA ファクトリー) であると、Br-UTP あるいは bio-CTP を使った解析から算定されている (EMBO J. 20: 2062, 2001)。

一方、細胞はどれくらいの数の RNA ポリメラーゼ II を有しているのだろうか？³²P-UTP を使って RNA ポリメラーゼ活性を定量化してみたデータによれば、1 細胞当たり 80,000 ~ 95,000 分子の RNA が同時に合成されているらしい (MCB 9: 1523, 1998)。RNA ポリメラーゼ II と RNA ポリメラーゼ III は α -アミノニチンで、RNA ポリメラーゼ I はアクチノマイシン D で特異的に抑制されることを利用して、活性型 RNA ポリメラーゼ I, II, III の分子数はそれぞれ約 15,000, 60,000, 10,000 と算定される。つまり mRNA ファクトリーという一つの工場当たり、8 本の mRNA 製造ラインが存在することになる。実際に、Miller spread 法などを使って、同時に



図の用語の説明 TF: transcription factors, PIC: preinitiation complex, CBC: cap binding protein complex
 pA: polyadenylation factors, Pol II : RNA polymerase II
 p-Pol II : CTD-phosphorylated RNA polymerase II, SF: splicing factors
 eIF: eukaryotic initiation factors, E/NF: export/NMD factors

数本の mRNA が 1 遺伝子上で合成されている像が撮られている。ただし、数個の RNA ポリメラーゼ II ユニットが直列に並んでいる必要はなく、電顕像から mRNA ファクトリーはほぼ球形であると考えられる。DNA の上を RNA ポリメラーゼが滑っていくような転写の模式図を見かけることがある。mRNA ファクトリーという巨大構造体が、DNA からあまりもせず、クロマチン構造のすきまを縫うように走ると考えるのは全く非現実的である。実際、界面活性剤処理した細胞から転写産物は抽出されるのに対し、mRNA ファクトリー自体は界面活性剤耐性の核内構造体に結合している (Science 284: 1790, 1999)。したがって、RNA ポリメラーゼ II を含む転写複合体が DNA 上を動くのではなく、固定された mRNA ファクトリーの中を DNA 鎖が手繰られていくとのイメージの方が真実に近いだろう。転写調節因子の作用は、ゲノム上の転写開始点に RNA ポリメラーゼ II などリクルートして preinitiation complex 形成を促進することだと思われていたが、話は逆で、mRNA ファクトリー中の RNA ポリメラーゼ II 近傍にゲノム DNA を手繰りよせることが、転写調節因子の主たる働きではないだろうか。また転写調節因子が CBP など coactivator をゲノム DNA にリクルートすると、coactivator の HAT 活性によりヒストンがアセチル化されてその近傍のクロマチンの可動性が増し、ゲノム DNA は mRNA ファクトリーの方へ近付き易くなると考えれば矛盾はない。

4) mRNA ファクトリーの生産高と QC

mRNA ファクトリーはその名の通り、多様な mRNA を生成する工場であるから、その生産高と生成した産物 (transcript) の quality control (QC) は極めて重要な問題である。mRNA ファクトリーが 1 細胞当たり 8,000 箇所あるということは、8,000 個以上の遺伝子の発現が 1 細胞で同時に進行していることを意味する。ただし、相同染色体からの同一遺伝子の発現は別々のスポットとして観察されるので、約 4,000 種の遺伝子発現が起きていると見る方がより正確であると思われる。RNA ポリメラーゼ II は毎分約 1200 ヌクレオチドの速度で mRNA を伸長する (MCB 13: 3456, 1993)。Pre-mRNA は約 8,400 ヌクレオチドの長さがあるとして、1 分子の RNA ポリメラーゼ II は 7 分に 1 本の Pre-mRNA を産生できる。細胞当たり 60,000 の活性型 RNA ポリメラーゼ II が存在するので、毎分約 10,000 の Pre-mRNA を産生していること

になる。mRNA の平均 half life が 500 分とされているので (Cell 7: 455, 1976)、細胞当たりの mRNA は 5,000,000 以上になり従来の細胞当たり平均 mRNA とされている 1,000,000 という数字を大きく上回る。この数字の乖離は、mRNA ファクトリーが厳しい quality control (QC) を行って、合成ミスのある mRNA を自ら分解していることを意味している。実際、伸長反応に進まなかった短い RNA やキャッピング、polyA 付加など RNA プロセッシングに異常がある場合、5'-3' 方向へは exosome が、3'-5' 方向へは Rat1p が mRNA をただちに分解する。また、hnRNPs や SR 蛋白は mRNA ファクトリーの構成要素だが、スプライシング過程で Aly/REF や Y14 など mRNA の核外輸送に関わる因子もスプライソームに結合するため、スプライシングに異常があると、核外輸送が行われない。細胞質でも nonsense-mediated mRNA decay (NMD) によって、mRNA の QC が行われている。こうした QC の結果、最終的に核外のリボソームに到達できる mRNA の割合は 5% 程度だと予想される。このように異常蛋白を作らないように mRNA は厳しい QC のもとに mRNA ファクトリーで産生されるが、この計算だと毎分 500 程度しか正常な成熟 mRNA ができないことになる。初期胚などこれ以上の mRNA を必要とする場合は、あらかじめ母体など別の場所で作った mRNA を RNA 結合蛋白で保護して貯め込んでおり、必要な時に翻訳を開始するものと思われる。

5) むすびにかえて

特定領域研究「RNA 情報発現系の時空間ネットワーク」の領域ニュース編集長になられた塩見さんから、“生物における「品質管理」と「多様性の創造」について「個人的な思いが詰まったカタチ」でエッセイのようなものを書いてくれ”とのメールが舞い込んだ。余り長いものでもないので気楽に引き受けたが、真面目に考えだすと、う〜ん、こ



萩原研究室 (最後列中央が筆者)

れは大変だと考えこんでしまった。班員の方だけでなく、予備知識のない一般の方にも判るように書けとの塩見編集長の命令を守りつつ、現代生命科学の先端的话题を取り上げるといふ無謀な試みに挑戦する羽目にならざるを得ないからだ。今回の小文がどの程度、塩見さんの要求を満たしたか定かではないが、これから本文中に触れた mRNA ファクトリーのリン酸化依存的制御機構の一端を明らかにしていくことで、本特定領域研究に貢献したいと考えている。

プロフィール

1988年三重大学大学院医学研究科博士課程修了，医学博士，名古屋大学医学部薬理学 講座助手，Salk 研究所ポスドク，名古屋大学医学部解剖学第3 講座助教授などを経て，1997年より現所属，教授。

萩原正敏

〔東京医科歯科大学〕
難治疾患研究所

RNA Update

特集：品質管理と多様性の創造⑨

品質管理におけるヒューマンエラーから学ぶこと

加藤 俊 治

(日本ミリポア(株)米沢工場 品質保証部)

人はかならずミスをする動物である。ヒューマンエラーはいつでも起きる可能性があり、製造現場においては、如何にこれを防止するかが永遠の課題となっている。弊社においても、「ピュアリフィケーションテクノロジー」を基盤とし、食品、製薬、医療そしてバイオテクノロジーを支える各種の製品群を取り扱っており、品質管理は極めて重要な工程である。一方で生物は、その最小の構成ユニットである細胞内において、さまざまなエラーを犯しながらも、巧みに補い、機能しているかに見える。研究者の皆様は、この生物の有する巧みな機能の解明に思いを馳せて止まないと察するが、果たして、このエラーに対する共通の原理は存在しないのだろうか。ヒューマンエラーと生物の反応を結びつけて何かを推測することなど、大それた試みで甚だ恐縮であるが、弊社の品質管理において、ヒューマンエラーの傾向を分析し、数々の対策を講じた経験を述べることにする。その中で、生体分子の機能と共通した、少しでも興味を頂ける知見を提供でき、RNA 研究の行方を託すことが出来れば幸いである。

1. 製品の外観検査工程で発生するエラーとその対策

弊社では、全ての製品において全数外観検査を実施しており、外観検査の項目は、異物（表面に付着、プラスチック材料に練り込みの両方を含む）、バリ（ササクレや突起）、

ヒビ、ワレ、変色、成型不良等、お客様が異常と思われるもの全てに及ぶ。

これらの項目の中で、異物、バリについては、 0.0mm 以内、あるいは 0.0mm 以下等の規格値を設け、人間の目による目視検査を行っている。しかし、目視で正確な測定を行うことはできないため、限度見本を設け、規格値の代用として使用している。限度見本は、実際の製品で異物があるものの中から規格値にあったものを選定し、これと見比べることにより検査を行っている。

作業者は、繰り返し検査を行っている間にその大きさを覚え、限度見本を見なくても可否の判定ができるようになる。そこで、規格値近辺の大きさのものを発見した時のみ限度見本を見るようにしている。なぜなら、製造現場においては、確かな品質を提供する一方で、効率をよくすることも使命であり、一つ一つ限度見本と見比べていたのではコストが跳ね上がり、一気に競争力を失ってしまうからである。

ところが、限度見本を設定したことにより、絶えず一定の外観品質が得られると言うわけではなかった。作業者の意識が働き、徐々に可否のレベルが変化する場合があるからである。

その変化は、一般に次のようなステップを踏む。

- ① 外観検査を始めた頃は、合否レベルに十分な確信が持てないためか、作業者の目は厳しい方に傾く。そのため、合格品でさえ不合格と判断する場合がある。
- ② 慣れてくると徐々にそのレベルは甘い方に傾く。度が過ぎると不合格品を合格品と判断してしまう。
- ③ この状態で不合格品が流出し、それが客先苦情となって報告されると、作業者の目は一気に厳しくなり、今まで発見されなかった極めて小さな異物まで発見してしまう。
- ④ 上記①から③を繰り返す。

これを防止するためには、定期的な限度見本との目合わせが必要となることが分かった。合否のレベルを再度確認し、それをパターンとして覚え込み、比較することが防止につながるのである。この時、定期的な目合わせは熟練度合いによって異なってくる。初心者は短い期間でやる必要があり（例えば1ヶ月）、慣れて来るとその頻度は少なくて済む。実証はできないが、人間がもつあらゆる感覚が総合されることにより、その結果として記憶されるのだと考えられる。

2. エラーの発生を防止する検査手法の検討

外観検査を行っているにも係らず、不合格品が流出する場合がある。この流出の原因としては、(1)検査項目にはあるが見逃した場合、(2)検査項目にはなく今まで発生したこともない現象のために流出した場合とがある。(1)については、集中力の欠如が原因と捉え、検査時間を区切り、作業者の入れ替えや休憩時間の導入を行うなどの対策を取るのが一般的である。一方、(2)については、検査方法の変更（製品の持ち方、製品を見る角度……等）もしくは検査項目の追加が一般的な対策である。

そこで、見逃しが1件発生するたびに検査項目を増やしていき、検査のやり方を工夫したが、発生件数は減らなかった。続いて、2時間実施したら別の作業をやることも実施したが、飛躍的に減少するには至らなかった。最悪のケースとして、見れば誰でも一目でわかるような成型不良品が流出したこともあった。この理由として、見る部分が多くなればなるほど、逆に見逃す可能性が高くなり、また、注意力が散漫となって、重大な欠陥を見逃してしまう場合があると思われる。

そこで、私達が最終的に到達した手法は以下の通りである。

- ① 検査項目は重要なものに絞る。
- ② 十分な教育/トレーニングを行い、検査項目の具体的なパターンを頭に入れてもらう。
- ③ 検査方法は全員が同じやり方ではなく、ある程度各自

の裁量あるいはやりやすい方法に任せる。

このような方法を取った結果、外観異常の流出は、1ppm以下のオーダーとなった。製品本体に接続されたチューブ先端のフィルターの溶着不良が発見された事例では、作業者が外観検査をしているときに、もともと検査項目にはなかったが、光の加減でいつもと違う見え方をすることに気づき、工程責任者に報告された結果明らかとなった。この作業者は、他の製品の不具合で同じように見えたものがあつたため、これも同様の現象ではないかと思ったと言う。検査項目のパターンが認識されることで、作業者の余裕と、検査項目以外の変化も際立たせて認識されることが可能になり、高い品質レベルを維持することができた。

以上の知見をもとに推測すると、1番目の例が示すように、生物の各分子には、認識するための見本となるものが常に存在するのだろうか。ヒューマンエラーから学ぶ限り、毎回基準と照らし合わせて正誤を判定する手法は大変非効率率のようである。人がある事象をエラーと判断できるのは、正しい事象があるからであり、判断基準が必要である。さら

に辿れば、判断基準が存在するのは人に記憶が存在するからであり、記憶される出来事が存在しなければ、判断基準は存在しないと考えられる。細胞の老化や腫瘍化に関わると言われる真核生物染色体のテロメアのように、記憶とも取れる現象が知られるが、その他の1生体分子にも記憶と呼べるような現象が存在するの

であろうか。また、逆に存在しないとすれば、いかにしてエラーを防ぐ生体反応の仕組みを獲得してきたのであろうか。

一方、2番目の例では、効率的なエラーの認識が行われるためには、チェックポイントを極めて重要な部分のみに限ることが有効であった。生体分子が機能するためにも、認識部位や活性部位が重要であるが、分子同士の認識とは、ある条件で適合するという事実が存在するだけで、それ以外は案外ルールであるのかもしれない。極めて小さな細胞という単位の中にあらゆる分子が押し込まれていながら、決められた分子同士が会合し、生体反応が行われる理由はそこにあるのであろう。さらに推測するならば、人がエラーを認識する上で、作業環境も大変重要であるが、生体反応においても、分子を取り巻いている水分子の存在が重要な機能を果たしているのかもしれない。

生物は進化の過程で、判断の基となる多様な分子をいかにして獲得し伝えてきたのか、興味は尽きない。いずれ、あらゆる生命の仕組みが明らかにされるころ、ヒューマンエラーはある分子の認識部位を変化させ、神経細胞の伝達経路を変える事で防止できるなどと言われる日が訪れるのであろうか。

シュードノット

松藤 千 弥 (東京慈恵会医科大学)

図書館でコピーしてきたその論文の図に目が止まった。Legend も読まないうちに自分のシーケンスを引っぱり出した。翻訳フレームがとぎれる位置にあるヘアピンのループは確かに下流の領域と塩基対を形成していた。アンチザイムのシュードノットに出会った瞬間だった。時は1990年春、ポリアミンの調節タンパク質であるアンチザイムをクローニングし、その発現機構を追い求めていた頃の思い出である。

シュードノットは、1978年に Studnicka ら (NAR 5:3365, 1978) によって最初に用いられ、1985年に Leiden 大学の Pleij 教授 [NAR 13:1717, 1985] によって確立された RNA の構造で、ヘアピンなどの二次構造の1本鎖ループ部分が、同一分子上の別の1本鎖部分と相補的塩基対を形成するものである (図 A)。シュードノットは RNA の二次構造同士の関係を指し示すため、三次構造と同義に用いられている。RNA の1本鎖ループにはヘアピンループ、バルジループ、内部ループ、分岐点ループの4種類があり、その組み合わせによりシュードノットは14種類に分類されるという。しかしよく目にするのは、ヘアピンループがヘアピンの外側の1本鎖部分と塩基対を形成するもので、H (Hairpin) 型という名前がついている。アンチザイムのシュードノットも H 型である (図 B, C)。シュードノットには少なくとも2つのステム (2本鎖領域) が含まれる。Pleij 教授は、これらのステムが同じ軸上に並ぶことによる塩基対の積み重なり (Co-axial stacking) を、この構造を安定化する要因として重視した。これが最も効率よく行われるのは、2つのステムが出会うところに対を作らない塩基が余っていない場合である。天然型として最初に構造が決定されたバクテリオファージ T2 の Gene 32 mRNA 由来のシュードノットでも、実際にこの積み重なりが確認された (図 A) (Biochemistry 35:4187, 1996)。しかし、後述のように翻訳フレームシフトにはたらくシュードノットは、むしろそうではないことが多い。

アンチザイムは、シュードノット成立の進化過程が追跡できる可能性のある貴重な系である

Pleij 教授がシュードノットを記載した1985年は、翻訳フレームシフトがいろいろな遺伝子発現に用いられていることがわかった年でもある。大腸菌のペプチド鎖解離因子 2 (RF2)、出芽酵母の Ty1、そしてレトロウイルスである Rous 肉腫ウイルス (RSV) の、*gag-pol* 遺伝子の翻訳フレームシフトがこの年に報告された。RSV のフレームシフトの発見は、UCSF の Varmus 研の大学院生だった Jacks らによるものである。彼らはその後4年ほどの間にマウス乳癌ウイルス (MMTV) やエイズウイルス (HIV-1) のフレームシフトを立て続けに解析して、7塩基のシフト配列と下流の RNA 構造からなる信号配列を明らかにし、2つの tRNA が mRNA 上を同時に 5' 側に1塩基分ずれるタンデムスリップモデルをうち立てた。しかし彼らはなぜかシュードノットを見落としていた。1988年の Cell の論文では RSV のシュードノットの尻尾をつかんでいたにもかかわらず、その存在を確認もせず可能性を簡単に言及しているのみである (Cell 55:447, 1988)。翻訳フレームシフトを促進するシュードノットを初めて実験的に

証明したのは、Cambridge 大学の Brierley らによるコロナウイルスの一種 IBV に関する研究で1989年に報告された (Cell 57:537, 1989)。私をアンチザイムのシュードノットに引き合わせてくれた論文である。その後 RNA ウィルスのフレームシフト部位はシュードノットを伴うことがむしろ一般的であることがわかってきた。一部のレトロウィ



松藤研究室 (後列中央が筆者)

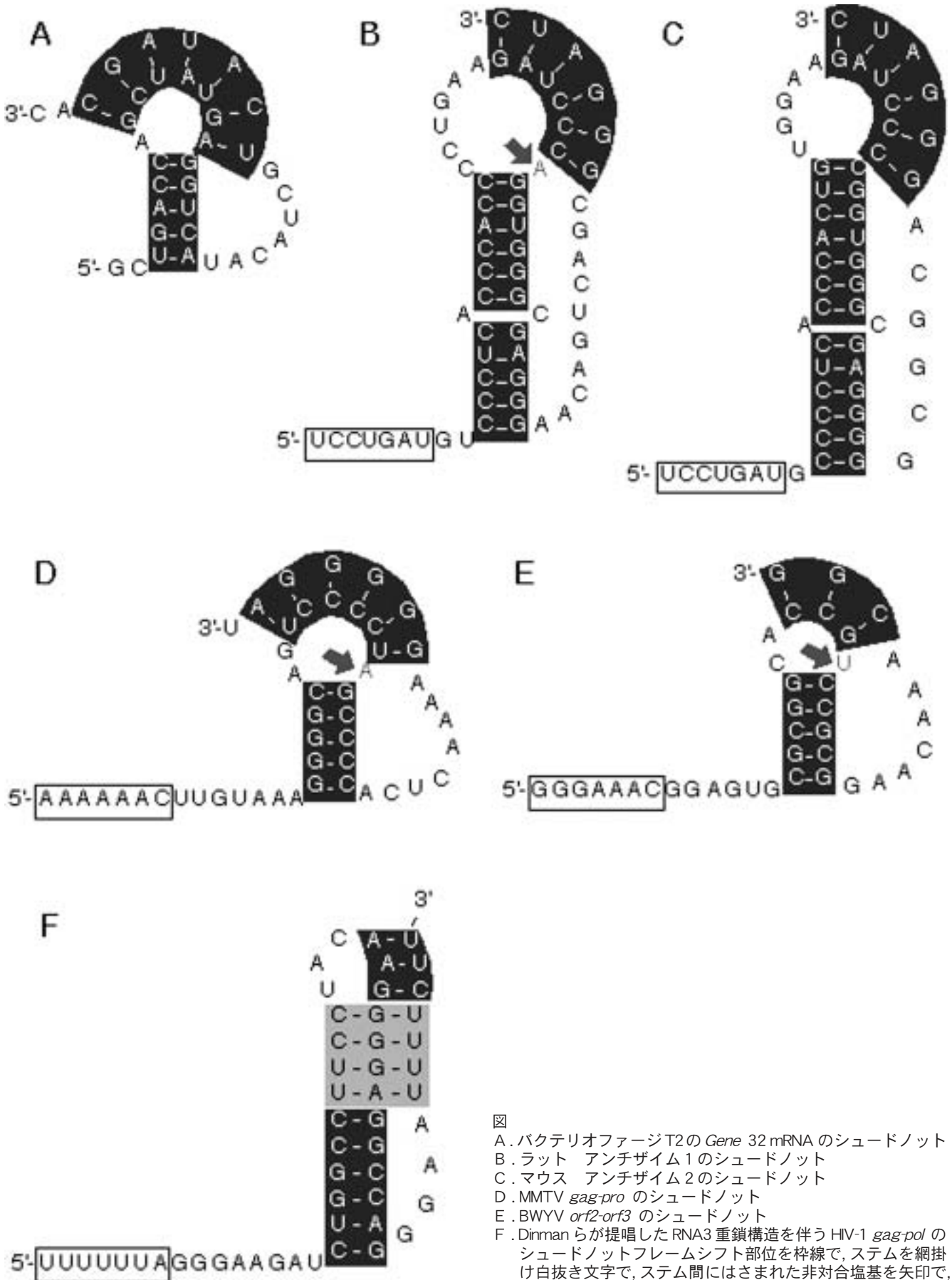


図
 A. バクテリオファージT2の Gene 32 mRNA のシュードノット
 B. ラット アンチザイム1のシュードノット
 C. マウス アンチザイム2のシュードノット
 D. MMTV gag-pro のシュードノット
 E. BWYV orf2-orf3 のシュードノット
 F. Dinman らが提唱した RNA3 重鎖構造を伴う HIV-1 gag-pol のシュードノットフレームシフト部位を枠線で、ステムを網掛け白抜き文字で、ステム間にはさまれた非対合塩基を矢印で、RNA3 重鎖を薄い網掛けで示した。

ルスでは gag-pol 融合タンパク質が翻訳フレームシフトではなく終結コドンの読み替えによって発現するが、この場合にも下流のシュードノットが信号となっている。

翻訳フレームシフトを促進するシュードノットについても構造が解析されている。これまでに MMTV の gag-pro 部位のものが NMR によって (図 D), また植物 RNA ウィルス BWYV のものが X 線結晶解析によって (図 E) 詳細に調べられた (JMB 298:167, 2000)。いずれも H 型シュードノットだが, 人工的な配列やバクテリオファージ T2 のシュードノットなどと異なり, 2つのステムの軸がかなりの角度で交わっている。これは, 2つのステムの間に対を作っていない 1塩基が余っているためである。また 1本鎖領域の塩基もステム部分と様々な相互作用を形成している。BWYV のシュードノットでは, 何らかの塩基間相互作用に関わっていない塩基がほとんどないという状態である。ステムを最大限に形成しようとして, ステムにも 1本鎖領域にも強いテンションがかかり, ステムと 1本鎖領域がむりやり近づけられ, そのためにできる新たな相互作用がさらに全体の構造を安定化しているという構図になる。これを見ると, タンパク質のモチーフであるが, ヘリックスのピッチが変化するほどテンションがかかっている亜鉛フィンガーを連想してしまう。いずれにしても, シュードノットのように詰め込まれた構造は, 高度な適応の結果できたものに違いない。シュードノットを伴う -1 フレームシフトが, ゲノムの進化速度が速いといわれる RNA ウィルスに見つかることが多いのは, そこではシュードノットの速い進化が可能だからかもしれない。

RNA ウィルスの -1 フレームシフト部位の多くは, 6 から 9 塩基下流にシュードノットを伴う。ところがヒトと関係の深い HIV-1 では, この位置にヘアピン構造しか描くことができない。どうもおかしいということで, 少し上流から始まるシュードノットが提案されたり, それが実験的に否定されたりと, 議論が続いている。最近 Dinman らは, 2つのステムが部分的に 3重鎖を形成してオーバーラップする新しいシュードノットのモデルを提唱した (図 F) (PNAS 99: 5331, 2002)。証拠として示されているデータは確かにこのモデルを支持しているように見える。しかし, この構造をとるためには, 連続する C-G-U および U-G-U の base triple が必要であり, それは紙の上に書いてみる限り不可能に思える。構造解析の結果が待たれるが, もしこれが本当なら, 単なるヘアピンループと考えられていた多くの RNA 領域が実は同様の構造である可能性が出てくるであろう。

アンチザイムは +1 フレームシフトによって誘導される。シュードノットが描けるのはフレームシフト部位のすぐ3

側であり, ここにフレームシフトの促進活性がある。促進活性を指標として, ステムごとに complementary change と compensatory change を導入する変異解析を行うと, きれいにシュードノットの存在を示すことができる (EMBO J 15:1360, 1996)。分子進化的にもこの構造が支持される (NAR 28:3185, 2000)。アンチザイム・ファミリーの主要メンバーであるアンチザイム 1 (AZ1) は, 脊椎動物全体にオルソログが存在し, シュードノットのステム部分の塩基配列が完全に一致する。ループは配列に多様性があるものの長さは不変である。AZ1 のパラログにあたる AZ2 では長い方のステムが上下に 1塩基ずつ延長している (図 B, C)。より重要な違いは, AZ1 の方には 2つのステムの間にアデニンが余っているが, AZ2 にはそれがないことである。したがってステム間の立体的な位置関係は大きく異なっている可能性がある。是非とも確かめたいのだが, 残念ながらアンチザイムのシュードノットの構造解析は進んでいない。アンチザイム mRNA のこの領域を翻訳系から取り出すと, 第二のステムが検出できないのである。これはおそらく細胞内にシュードノットを安定化する因子が存在することを示唆しているのだろう。アンチザイムのシュードノットには, もっと不思議なこともある。なぜ +1 方向のフレームシフトにシュードノットが必要なのかということである。このような例は他にない。下流にあるシュードノットが, フレームシフト部位に達したりリボソームの進行を妨げたり上流に押し戻したりすることはありそうだが, 下流の方にリボソームを引っ張るモデルは考えにくい。シュードノットがいったい何と相互作用をしているのかが決まらなないとこの問題は解決しないだろう。翻訳フレームシフトによって発現するアンチザイムは, 分裂酵母やアカパンカビから脊椎動物まで保存されている。ところが無脊椎動物のアンチザイム mRNA にはヘアピン構造さえ見あたらない。シュードノットはヘアピンを経て段階的にできたのだろうか。あるいは, いきなり出現したか, レトロウィルスなどから拝借してきたのだろうか。アンチザイムは, シュードノット成立の進化過程が追跡できる可能性のある貴重な系なのである。

プロフィール

1983年東京慈恵会医科大学卒業, 1989年同大学院博士課程修了(医学博士), 同栄養学教室助手。途中米国ユタ大学への留学をへて, 2001年より教授。

松藤千弥

(東京慈恵会医科大学)

The messenger is the message

塩見春彦

(徳島大学ゲノム機能研究センター)

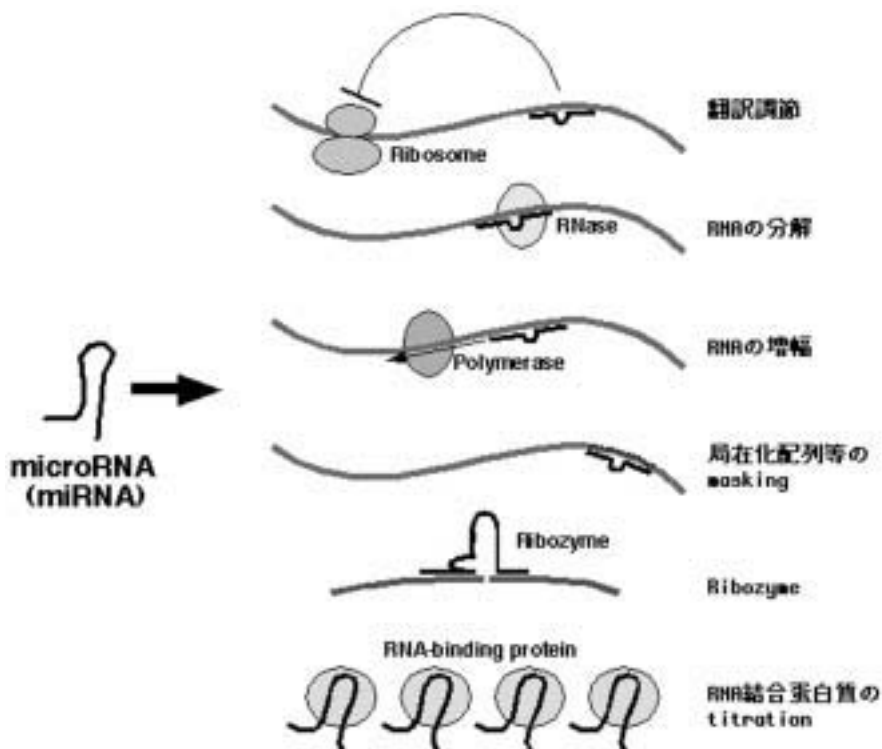
--- the angel Gabriel, who brings Mary the message of the divine birth of the Savior, bears a name that spells out his mission: "My husband is (*gabri*) God (*el*)." According to Ben-Chorim, "it corresponds...to an old Hebrew tradition that claims the messenger and the message are identical...."

Clara Pinto-Correia THE OVARY OF EVE (1997)

私達の細胞は、多くの「翻訳フレームを持たない RNA」、つまり蛋白質に翻訳されない RNA を発現している。これらは一般に「noncoding RNA」と呼ばれ、その代表例が rRNA や tRNA です。高等真核生物の場合、RNA に転写されるゲノム情報の実に 97%-98% が蛋白質に翻訳されない RNA であると見積もられている。このことは、ゲノム情報の膨大なアウトプットの大部分が、RNA 内に留まっていることを示している。このような RNA 内に留まるゲノ

ム情報の大部分は、“ジャンク (junk, ゴミ・クズ)” として無視されてきた。ところが、最近の研究から、数年前まではまったく予想も及ばなかったほどの多種多様な noncoding RNA が存在し、しかもこれら noncoding RNA が仲介するさまざまな遺伝子発現調節機構が明らかになってきた。したがって、“ジャンク” は“ジャンク”ではなく、しかもゲノム情報発現系における単なる“中間体”でもなく、その存在自体に何らかの意味が賦与されているという可能性がでてきた。

様々な生物種のゲノム解析が進むにつれて、高等真核生物は少ない数の蛋白質をコードする遺伝子を「使い回す」ことにより洗練された複雑なシステムを作り出し、維持しているらしいということがわかってきた。細胞の中には、幾つかの基本となる蛋白質が形成するネットワークが存在し、そのネットワーク内の中核となっている少数の蛋白質の発現 (on-off) を時間的、空間的に制御することによりネットワーク内の連携 (または回路) を変化させ、一つのネットワークに幾つもの仕事を課すという柔軟性 (可塑性) があるようです。このために、細胞は、たとえば、ある特定の蛋白質をある特定の時空間に押し込め、そ



miRNA になにができるかを考えてみました。6つ考えた内、5つまでが RNA の持つ相補的な配列間の塩基対形成による特異性の極めて高い認識能力を考慮したものです。まず、lin-4 と let-7 との類似性から翻訳調節。次に RNAi との類似性から RNA の分解や増幅。さらに mRNA の細胞内局在化等を決定しているシス配列の隠蔽。また、miRNA の中には、もしかしたらリボザイムとして働くものもあるかもしれない。また、RNA 間の相補的結合形成に依らなくても、miRNA は、たとえば、RNA 結合蛋白質の細胞内での利用可能な量を調節という手段で遺伝子発現調節に関与できるかもしれない。



パートナー 塩見美喜子と

ここに隔離するという方法をとる。これにより、その蛋白質を一つのネットワークから排除し、別のネットワークに参加させることが可能になる。その結果、一つのネットワーク内の連携を変化させるだけでなく、別のネットワークに新しい連携を生み出すことが可能となる。つまり、生物は複雑さを増大させるために、蛋白質をコードする遺伝子の数を増やす方法をとるのではなく、一つのネットワークに幾つもの仕事を遂行させるための調節方法を進化させたようである。言い換えれば、生物の複雑さはネットワークを修飾する方法とか集合の規則性を変える方法とかの複雑さの反映とも言えるかもしれない。また、連携のために必要な最低限の仕掛けはあらかじめシステムに組み込まれており、その中で、ある蛋白質の量がある閾値を超えたときに、新しい連携が始まるということもあるかもしれない。コンピュータ用語であるニューラルネットワークやオブジェクト指向プログラミングという言葉を連想する人もいると思う。

では、どのような調節方法があるのか？ヒトの蛋白質をコードする遺伝子の数は3万前後と見積もられていて、これは酵母の5倍ほどにすぎない。ところが、ヒトのゲノムサイズ (3×10^9 bp) は酵母 (1.5×10^7 bp) の200倍である。この差に高性能システムとしてのヒトの秘密が隠されているのではないかと。蛋白質をコードしないRNA領域には、シスに働く調節配列とトランスに働く機能性RNAと、そして、おそらく、変化のために必要な余白とに大きく分けることができるであろう。機能性 noncoding RNA (以下、rRNA, tRNA, snRNA 等の研究歴の長い noncoding RNA は、ここでは議論しません) は、imprinting (例, H19), 遺伝子量補正 (例, roX), 転写活性化 (例, SRA), 減数分裂 (例, meiRNA), そして発生時期制御 (例, let-7) 等、多くの重要な生命現象に関わっている。最近では、このような機能性 noncoding RNA は、riboregulator とか efference RNA (eRNA) とか呼ばれているようである。高等真核生物は、RNA上の調節配列や機能性 noncoding RNAの種類や数を増やすことで、蛋白質をコードするRNAの発現、つまり、蛋白質の on-off を、高度に調節する方法を進化させてきたように見える。機能性 noncoding RNAによる遺伝子発現調節の中で、この1年ほどの間に急激に注目を集め出したのがたかだか22塩基鎖長ほどの大きさしかない microRNA (miRNA) による調節機構である。

miRNAによる調節機構のさきがけとなったのは、線虫の発生時期を変える変異として同定された lin-4 と let-7 である。これら遺伝子の転写産物は、Dicer (DCR-1) という RNaseIII 様の分子により小分子 RNA (~22-nt) にブ

ロセシングされ、しかもその配列は標的 mRNA (lin-14 や lin-41 など) の 3' UTR 配列と相補的である。lin-4 と let-7 は、このRNA間の塩基対形成を通してこれら標的 mRNA の翻訳を、ある期間、特異的に抑制することで発生の時期を決めている。この翻訳抑制性 miRNA の内、let-7 が線虫からヒトに至るまでほぼ100%保存されていることが判明し、このような miRNA は線虫以外でも、遺伝子発現調節に関与している可能性を示唆した。実際、この1年ほどの間に線虫、ショウジョウバエ、そしてヒトにおいて数多くの miRNA が同定された。lin-4 と let-7 が持つ機能の類推から、これら新規 miRNA も翻訳制御に関与するであろうと予想されているが、これら miRNA が標的 RNA に及ぼす影響とそこに関与する機構は、翻訳制御以外にもさまざまなものが存在するのかもしれない(図)。miRNA の機能に関しては、今後の研究成果を待たなければならないが、数年後には、miRNA は蛋白質の発現を時空間的に制御し、ネットワーク内の連携を変化させる鍵となる分子であるということになっているかもしれない。

RNA の特性の一つは、相補的な配列間の塩基対形成による特異性の極めて高い認識能力である。miRNA は、この特性を活かした「テーラーメイド」の遺伝情報発現調節分子なのかもしれない。miRNA の研究から、高性能システムとしてのヒトの秘密を解き明かす重要な手がかりが得られるのではないだろうか。ヒトの特徴の一つである高度な精神活動も、もしかしたらこのような miRNA による調節、特に微調節 (fine-tuning), が重要な役割を果たす現象かもしれない。精神分裂症や自閉症の原因遺伝子の同定が困難な理由の一つは、従来の遺伝子という定義で規定されるゲノム領域の変異、つまり多くの場合、蛋白質をコードする遺伝子領域の変異、を同定しようとしているからというのは言い過ぎであろうか。また、新規 miRNA の発見がこれからも続いていけば、「遺伝子」の定義や遺伝子数の見直しが始まるに違いない。

プロフィール

1988年、京都大学大学院医学研究科博士課程修了、医学博士。日本学術振興会特別研究員、ペンシルバニア大学ハワードヒューズ医学研究所ポスドク、ペンシルバニア大学医学部 Assistant Professor を経て、1999年より現所属。教授。

塩見春彦

(徳島大学ゲノム機能研究センター)

◆ 若者達 ◆

サイエンスを志して

神 唯 (奈良先端大・バイオ)

「人生って何なんだろう？生まれてきた意味は何だろう？」私はこの言葉の答えを探す旅を続けているのかもしれませんが。そして今、私は奈良先端大バイオサイエンス研究科において学生として選択的スプライシングの研究をしています。今回はこのような機会を与えて頂いた編集長に心より感謝します。まずはいつ頃からサイエンスの道に入ろうと決めたのか、ということについて書いてみます。

私がサイエンティストになりたいと思い始めたのは小学生の5,6年の頃でした。その頃は今のように生物の不思議さに憧れていたわけではなく、宇宙や時空といったなにかしら壮大なものに興味がありました。おそらくは物理が好きで父の影響を受けていたのだと思います。光は何者なのか？波なのか、粒子なのか、どっちなのか？(そのときに波、粒子などの言葉の定義を理解していたのかどうかはわかりませんが)と詰問していたことを今でも覚えています。それに対し父は真剣に答えてくれました、何も知らない小学生を相手に飽きることなくずっと。少なくともその時の私は真剣に答えてくれていると感じていました。そして知らず知らずの内にサイエンティストになりたいと思い始めていました。そういう意味ではサイエンスを志したきっかけは父の影響でしょう。そして、自分の存在意義を求めため、さらには自分自身の知的好奇心を満たすために。

実際に学問としての生物に興味を持ったのは、高校1年でメンデルの法則を習ったときでした。それは生物学は化学や物理学と違って曖昧な学問なんだという先入観が吹っ飛んだ瞬間でした。そして、私の中では生物学も科学なん



だと認識を新たにした日だったと記憶しています。

そんな中高生だった私は今、分子発生生物学講座という名の研究室に所属しているのですが、その名の通り生物の発生現象を分子で語ろうと研究を行っている所です。大学では工学部に入った私が、生物の工学的応用ではなく基礎的な生物学に再び興味を持ちはじめた頃に「ダーウィン以来」(スティーブン・J・グールド著)という本を読んだことが、この研究室を選ぶきっかけになったのではないのでしょうか。それは進化について書かれた本であり、それまでも進化には少なからず興味があり自分なりにいろいろ考えてはいましたが、この本を読んだことで、もしかすると生物種間における初期発生段階の違いを分子(遺伝子)レベルで表現できるようになれば“進化”とはどのようにして起こったのかという疑問にアプローチできるのではないかと考えたのです。実際には私よりもっと昔から多くの人たちがそう考えていたらしいですが、そんなこととは露知らずこの発生と名の付く研究室に飛び込んだのです。

そして今、初めて聞いたゼブラフィッシュという小型魚類と、RNAレベルでの遺伝子発現制御という2つのキーワードに心惹かれ、私は尊敬する井上邦夫博士の下で研究を進めています。

大学院に入り今の研究を始めて4年目、その中で一番心に残っていることは、海外での学会発表に行ったときの事です。博士後期課程1年の夏の終わりにCold Spring Harborで開催された学会での出来事です。Cold Spring Harborはとても緑の多い、栗鼠がたまに顔を見せるような自然に囲まれた研究所でした。しかしそんな事に心躍らす余裕もなく自分の発表日が近づいてくるのを、不吉な日を待つ、そんな心持ちでした。発表日の当日も、自分よりも前の人たちの殆どの発表が頭に入らず、しかもかなり緊張していました。しかし演台の前に立ち発表し始めると、ジェスチャーを付け抑揚もつけながらほとんど丸覚えに暗記した英語が自分の意志とは関係なく口からついて出るといった感じでした(しかし質疑応答ではまともな答えは口からついては出てくれませんでした)。その時、聴衆を見る余裕があったのかどうかさだかではありませんが、最前列に座っていたEMBLのIain Mattaj博士がずっと私のことを

凝視していたと記憶しています。発表は最終日の最後のレセプションだったために、発表したという実感がなのまま学会が終わり一人で壁にもたれ掛かっていたときでした。Iain Mattaj 博士に「Good job!」と言われ、握手を求められたのです。私からは「Thank you」しか言えず、その後も別に言葉を交わしたわけではないですが、涙が出そうになるくらいうれしかったことを覚えています。海外で発表したんだという実感が出てきたのも、その言葉を言われてからでした。

それからでしょうか、学生の間から海外に出て研究発表を行うようにしていく方がよいと、さらにはディスカッションできるぐらいの英語力を身に付けたいと、そう考えるようになったのは。

そんな海外での発表は私にとって大きな変化をもたらしてくれたのではないのでしょうか。それは英語の能力もそうですが、なによりもプレゼンテーションについて非常に大事だと感じました。大学院においてもこの事については多くを学んでいるつもりでしたが、実際にその大事さを体感できたように思います。例えば海外の学会では日本での学会と異なり、すでに publish された内容を発表することを禁じている学会が少なくないようです。今回私が参加した学会もそうでしたが、発表者としては、初めて公の場で自分の導き出した結果・結論について多くの人に披露するのです。そして限られた時間のなかでより多くの人に理解してもらうことが非常に大事なのです。つまりは自分の研究内容をより解りやすく説明するというプレゼンテーションの能力が非常に重要になると感じました。多くがそのような緊張感のある発表であり、その分それを初めて見聞きする人達も緊張感を持って聞くという場でありました。そのような緊張感を学ぶ機会を得られたことは、良い研究というのは研究内容も大事ですが、それを良いと判断してもらうように他人に理解させることが重要なのだと私に気付かせてくれました。そして、日本の学会も多くの人達が publish されていない内容を発表するようになれば、学会の雰囲気も変わってくるのではないかと考えています。

最近は何にも考えていることがあります。まず第一に、研究を行う動機についてです。研究を行っていく原動力というのは人それぞれだと思います。考えられる事として、知的好奇心を満たすため、医療向上のため、名声を得るためなど色々挙げることができると思います。しかしながらどんな理由にせよ、自分自身のお金で趣味的に研究をしているわけではないのですから、つまり税金などを研究費として使用している以上、研究成果をどこかに還元していかななくてはならないと強く思っています。それは、よく

耳にする社会に還元、でなければならないとは思いません。サイエンスという知識体系に還元・貢献でも良いと私は考えています。私の考えが絶対に正しいとは言いきれませんが、少なくとも還元するということに関しては間違っていないと思います。ですから、ただ自分の欲を満たすためだけに研究者として過ごしていく事はいけませんよ、というような教育が大学院においてあってもいいのではないかと考えています。

また第二に、せつかくの場なので日頃私が感じている大学院生の地位の低さについて言わせて頂きます。一学生である私が言うべきことではないかもしれませんが、例えば学位を取得するつもりで大学院で研究活動をしている総ての学生に対して、親などの援助なしに一人で生活していただけるだけの金銭的な保護があってもいいのではないのでしょうか。日本において科学研究を支えているのは、ポスドクが増えてきた今でも、大学院生によるところが大きいと私は感じているからです。それでも学位を取りたい人たちが大学院に行けばいいのだと言われればそれまでですが。

<これから>

取り留めもなく色々書いてしまいましたが、最後に“これから”について書いてみたいと思います。今は RNA の世界に浸かっていますが、学位を取得した後どうするのか具体的な事はまだ決めていません。それでも海外において研究生活を続けたいとは考えています。そして何を研究していくのか？最近の研究分野というのは非常に細分化されてきていると共に、複数の研究分野の特質を併せ持った複合領域が増えてきているように感じています。そんな中で木を見て森を見ずということにならないようにし、さらに、いろいろな分野の研究を経験することで自分の幅を広げていき、最終的には自分の原点である進化というテーマにどこかで貢献できればいいなと考えています。あまりに現実味のない甘い考えかもしれませんが、それでも私は、いつまでも夢を語れるようなそんな研究者を目指していきたい。

そしてあの冒頭の言葉の答えを探す私の旅は続いていくのです。



プロフィール
 関西大学工学部卒業後、
 1999年奈良先端科学技術
 大学院大学バイオサイエ
 ンス研究科博士前期課程に
 入学。現在、同博士後期課程
 2年の大学院生。
 P36 写真参照

神 唯
 (奈良先端大・バイオ)

◆ 海外からの便り① ◆

「英会話上達指南は至難？」

前田 明

Department of Biochemistry and Molecular Biology,
University of Miami School of Medicine, Miami, Florida, U. S. A.

日本で学位を取得後、アメリカの Cold Spring Harbor Laboratory にポスドクとして留学した頃は、当然の事ながら、3、4年でのいい結果を出して、日本の大学に助手で就職できたらいいなあ…、なんて思っていたわけです。予想に反して、幸か不幸か一度も日本に職を得る機会がなく（5年たった頃からは一応かなり努力をしたのですが…）、結果的にアメリカの大学に就職、今年で既に在米12年を迎えようとしています。おかげさまで英語はかなり上達して、英米人と平気で口喧嘩をする事も朝飯前。ところが簡単な漢字が思い出せなかったり、日本語がおかしいと言われていたりして、これは日本人として情けないなあ～、と感じる今日この頃です。

7年半も勤めた Cold Spring Harbor Laboratory は、研究員の6割以上が30カ国以上の国籍をもつ外国人で占められているとても国際的な研究所で、洋の東西を問わず様々な国から若い研究者が入れ替わり立ち替わり来るので、日本人も例外ではなく、長く勤めたおかげで、国際会議に参加された、あるいはポスドク留学された数多くの日本人との出会いがありました。そこで実感したのが、日本人の英語力、とりわけ聞いたり話したりする英会話は、残念ながら他のどの外国人よりも下手だということでした。それではなぜそうなのか、と色々と考えてみました。

1. 「日本では全く使われない音が沢山ある」

このことは昔からよく言われていることで、例えば、'R'の発音は、日本人はとりわけ難しく、大人になってからだと、よほど訓練しないと'L'とうまく区別が出来ないし、区別できないと全く言葉が通じない事になります。同じ東洋人でも中国人は、なまりはなかなか抜けないけれど、日本人よりずっと英語の発音が上手なのは、中国語で使う音が、日本よりずっと多いことや文法が英語に近い事実が大いに関連しています。ちなみに言語の発音形態や文法が日本語に近い韓国人は、日本語の発音が本当に上手なのですが、日本人と同様英語の発音は苦手です。スペイン語が母国語の友人がいたのですが、彼に日本語を教えると、英米人よりずっと上手く、逆に彼からスペイン語を習って

しゃべると、アメリカ人より発音がずっといいと言われました。スペイン語は英語より発音においては日本人には楽なようです。ところで、大人ではなかなか難しい発音の訓練は、小さい子どもではとても簡単なようです。余談になりますが、地元の保育所に通っている息子は、人生まだ2年半しか経験していませんに、生意気にも英米人と同じ素晴らしい英語の発音で「文章」を話します。しかも話すときに大げさなジェスチャー入り。家では時々日本語の「単語」のみ、しかも情けない事にそれがあの英米人特有のアクセント付きなのです！ 何とか日本の美しい言葉や大和魂を忘れないで欲しいと思うのは親ばかりでしょうか。

2. 「簡単な日常会話を全く習っていない」

日本人は中学、高校、大学とずっと英語を習ってきているので、文法や読解力は、他の外人よりむしろ優れています。ところが情けないことに、会話になるとたちまち困ってしまうのです。理由は明らかで、文法的には中学レベルの簡単な日常会話の単語や言い回しを、今まで学校で全く習っていないからです。例えば、What's up, Bless you, Okeydokey, Oh boy (man), Cool, I gonna..., I wanna... などなど。アメリカに来て3日もすれば、必ずやこれらの言葉を聞いているに相違ありません。初めてアメリカに来た人で、これらの意味が分かり、きちんと対応できる人はほとんどいないと思われます。私もアメリカに来た当初は、相手が何を言っているのか分からず、困ったことに音から辞書を引くことはまず無理で（実際辞書にない言葉も多いのですが…）、さりとて当人にも聞きづらく、なかなか大変でした。習っていないのだから、慣れるしかありません。しかし慣れというのは恐ろしいもので、何も先生に習わなくても、1年もすれば、相手の言うこともだんだん分かってくるし、それなりに対応できるようになります。習うより慣れる、でした。

3. 「日本の外来語が悪影響している」

日本は、とりわけカタカナ英語が多く使われていて、そのほとんどが、元の英語の発音とは似ても似つかぬ発音に

なって、きちんと和製英語になっています。また外来語の中には、おそらく語源が英語ではなくドイツ語であるために、その発音が英語と違って来る例も見受けられるように思われます。例えば、アニマル、アップル、エタノール、エーテル、メチル、ゲル、ガーゼ、ガレージ等の本来の英語発音は、まるで違う単語のように聞こえるぐらい違います。カタカナにするときに、アナモー、アッポー、イーサノール、イーサー、メッサイル、ジェル、ゴーズ、ガラアージ、とでもしてくれていれば、少しはましだったかもしれません。また、日本の外来英語は、文字どおりイギリスから来たものも多く、それが全くアメリカでは通用しないことがあります。例えば、トイレット、車のボンネット、ウインカーなど。英会話の上達は猿まねが一番でしょう。アメリカ人が話しているようにまねすることです。私の以前のボス (Adrian R. Krainer) は南米ウルグアイの出身で、スペイン語が母国語。在米が長いので、もちろん英会話は大変上手いのですが、彼特有の英語の言い回しや、単語の使い方がありました。彼の奥さんはアメリカ人だけど、ある時奥さんが話すのを聞いてびっくり…何とそっくりのしゃべり方！ 彼特有ではなく、奥さん特有だったわけです。科学は猿まねしてはいけないけれど、語学は猿まねに限ります。



新しい前田研究室のメンバー。左からポストドクの鈴木仁（日本人）、前田明本人（日本人）、テクニシャンの Karine Galoian（アルメニア人）、ポストドクの Leopold Puzis（ウクライナ人）

4. 「日本の美德が損をする」

外国人は、英語が下手でも実によくしゃべりますね。とりわけラテン系と中国人。最初は結構ひどい英語を使っているのですが、どんどん積極的にしゃべっていくうちにだんだん慣れて上手になっていくような感じです。日本人は概してこの積極的に自分からしゃべるといのが苦手な人が多く、それが実際に会話の上達を妨げています。国際会議でポスターの前で白熱している議論の中に上手く割って入って、演者に質問するのは並大抵の事ではないと感じる日本人は多いことでしょう。そういう私でも、つついちょっと話が切れるのを待っていて、結局いつまでたっても話せないことが多々あります。間違った英語を話すのが恥ずかしい。自分からしゃしゃり出て厚かましくおしゃべりするの気が引ける。「沈黙は金なり」といった根強い文化的背景がないとは、言えないような気がします。多少英語が間違ってもいい、積極的に自分から話して、相手とコミュニケーションを取るよう努力すると英会話の上達も早いような気がします。

アメリカでの留学、研究をめざす方々はもちろん、会議での発表などでアメリカ旅行される方も多いと思われませんが、私たち科学者にとって一番の不安は何と言っても語学の事ではないかと思われま。周到に準備された日本人の口頭発表は、いい加減な準備しかしていない英米人のアドリブ発表よりずっと分かりやすく、聴衆に好評であることを最後に付け加えておきたいと思います。たかが語学、されど語学。お粗末な話に長々とつき合ってもらってありがとうございました（参考：この日本的表現はアメリカでは厳禁！）。

プロフィール

1989年筑波大学大学院医学研究科終了、医学博士。
九州大学理学部、Cold Spring Harbor Laboratoryを経て、1998年より現所属、Assistant Professor。

前田 明

Department of
Biochemistry and
Molecular Biology,
University of Miami
School of Medicine,
Miami, Florida, U. S. A.

◆ 海外からの便り② ◆

留学先の決定まで

羽原 靖 晃

(Duke 大学 Robin P. Wharton 研究室)

海外でのポスドクを希望する場合、ラボの選び方は主に二つに分かれる。「積極型」と「なりゆき型」である。積極型の場合、1年近く前から複数の希望研究室へ手紙を書き、グラントの申請を行い、ラボへ面接に赴き…と時間をかけ、多くの候補の中から選ぶ事が多い。不景気下の就職活動に近いと思えばよいかもしれない。一方、なりゆき型には様々なパターンがある。共同研究先から誘われた、海外の学会で声をかけてくれたPIのラボに行く事になった、医局の命令、教授のコネ、等々。私の場合は完全に後者であった。博士3年の秋、私は進学(オーバードクター)を覚悟し、ただひたすら実験に打ち込んでいたのだが、突然「君は博士号がなんとか取れそうなので、就職活動を始めなさい」という思いがけないお言葉を教授からいただき「嬉しいけど困った状況」を初体験。進学覚悟であったということは、すなわち来春まで必死で実験してようやく卒業ができるかどうかという状況であったわけで、就職活動に割ける時間などほとんどないのである。困った私がRNA学会でお世話になっている先生方に助けを求めたところ「知り合いのアメリカ人がポスドク募集しているけど話を聞いてみるかい？」とのお言葉をいただいた。後はトントン拍子に話が進み、2000年5月、アメリカ合衆国ノースキャロライナ州に旅立つことになったのであった。



森の中の一軒家と真っ赤なコンバーチブルと妻と

研究学園都市 RTP

勤務先のデューク大学は森に囲まれた田舎にある、と聞いてはいたものの、現地に到着してあらためて驚いた。町も大学も森の中、キャンパスの周りに森があるのではなく、森の中に大学の建物が点在しているのだ。気候は日本の平均的なものと大差なく過ごしやすいのだが、とにかく森の中なのだ。しかし研究環境は決して悪くない。デューク大学から車で15分ほどの所にUNC(University of North Carolina), 30分ほどの所にNCSU(North Carolina State University)という2つの巨大な州立大学があるのだ。UNCは医学部と歯学部を持ち(特に有名なのは文系と数学であるが)、NCSUは工学・農学系が名門、そしてデュークは医学部が有名で(法学と経済も名門)、この3つの総合大学を頂点とする三角形の内側に、企業の研究所を誘致し出来たのがRTP(Research Triangle Park)である。特に製薬関連企業とコンピューター関連企業が多く、代表的なものには、製薬ではグラクソ・スミスクライン、コンピューターではIBM, CISCO, そして政府の研究所としてはEPA(Environmental Protection Agency: 環境庁に相当?)とNIEHS(National Institute of Environmental Health Science: NIHの1部門)がある。一万人以上が勤務するIBMの研究所から車で5分も走れば広大な牧場に出る、というRTPの環境は田舎や自然が好きな研究者には天国である。もちろん、都会が好きな方には最高に退屈な場所だろうが…。

Robin P. Wharton 研究室

Wharton 研究室は全員で10人強、ハーワードヒューズ医学研究所の研究室としては小さい方になる。ボスのRobinはポスドク時代からショウジョウバエの発生に興味を持ち研究しているが、遺伝学者というよりは分子生物学者で、発生過程で出てくる分子、特にnanos(nos)に興味を持っている。発生過程で卵や胚の一部に局在したり濃度勾配を形成したりするmRNA, タンパク質は多数知られ、nosもそのひとつである。現在の研究室のテーマは、大きく言えば、Nosタンパク質ができる前の制御(nos mRNAの局在及び翻訳制御)と、Nosタンパク質が行う制御(Nosは

翻訳抑制因子である) の2つである。mRNA の局在・翻訳抑制のシグナルは3' 非翻訳領域 (UTR) に存在するので、分子レベルではタンパク質・RNA の結合を測定し、in vivo ではトランスジェニックショウジョウバエを作成して実際の発生過程での影響を観察する、というのが主な研究手法である。

RNA 結合タンパク質, Pumilio

私が現在注目している Pumilio (Pum) タンパク質は、ショウジョウバエの胚発生過程に必要な RNA 結合タンパク質である。Pum は Nos と共に母性 hunchback (hb) mRNA の翻訳を胚の尾部側で抑制し、Hb タンパク質に濃度勾配を形成させる。ボスの Robin はポストドク時代に hb mRNA 3'UTR に存在する翻訳抑制に必要なシス配列を発見し、これを NRE (Nanos Response Element) と命名、その後 NRE 配列上に Pum-Nos-Braintumor (Brat) の3者が会合し複合体を作ることが翻訳抑制に必須であることを示してきた。

Pum の興味深い点は主に二つある。一つは Pum タンパク質の配列認識能力がどのように生み出されているかである。in vitro の結合実験 (SELEX を含む) で明らかになった Pum が結合するコンセンサス配列は UUGU4 塩基だけである。しかし全ての UUGU に結合するわけではないので、周囲の配列の何かを見分けているらしい。Pum のターゲット RNA は特定の二次構造を取らないので、アミノ酸残基が塩基を直接認識するはずだが、一体どのようなメカニズムで多数のバリエーションの RNA を認識しているのだろうか。Pum はつい最近結晶化が成功し立体構造が決定されたが (Cell, 105:281, 2001), Pum の結晶だけでは RNA との結合の仕組みは解明できない。現在、RNA-Pum の共結晶化が試みられており、結果が楽しみである。

Pum の研究におけるもう一方の興味深い点は、RNA ターゲット及び Pum と共同で働く因子についてである。hb mRNA の翻訳抑制では、3'UTR 内の NRE 配列上に、RNA-Pum-Nos-Brat の RNA+3 タンパク質複合体が形成される。現在判明している Pum のターゲット RNA は他に2種類あるが、Cyclin B の制御には Pum, Nos が関与し Brat は関与せず、bicoid の制御には Pum のみが関与し Nos, Brat は関与しない、と考えられている。翻訳抑制には RNA+3 タンパク質の複合体形成が必要と仮定すると、Pum は異なる RNA に対して異なるタンパク質因子をリクルートする能力がある、と考えなくてはならない。pum の変異株は、生殖細胞のメンテナンス、卵形成、初期発生など様々な異常を示すことから、Pum の役割は多種の細胞で翻訳抑制を行うに際して RNA を固定する「土台」ではないかというイメージが湧いてくる。この RNA+3 タンパク

質複合体には特別な名前はないが、Wharton 研のテクニシャンは「ソノダゾーム」と好んで呼んでいる。複合体の発見者である園田純一郎さん (GD, 15:762, 2001) の名前に由来するこの名前が翻訳抑制複合体の名前として有名になる日が来るのかもしれない (この Newsletter は Sonodasome という名前が公共の出版物に載る第1報目です)。

研究室の雰囲気

ボスの Robin は教育的指導を行うことが多い。例えばラボ内のミーティングでも、学生にすぐに解答を示さず「この実験のウイークポイントは？」「次に最優先すべき実験は何でその理由は？」などの質問をよくする。これは論理的に考える訓練のひとつのようで、非常に勉強になる。発表に対するこだわりもすごく、学生でもポストドクでもトークの4日以上前に必ず Robin のチェックを受けなくてはならない。実際に Robin のトークを聞いたことは何回かしかないが、確かに上手い。トークの指導はためになるし、ポストドクにここまで指導をしてくれるボスの存在は大変ありがたいものである。

アメリカの田舎の暮らし

アメリカの田舎に住むのであれば、その良さを満喫したいものだ。ゴルフをするもよし (安くて近い)、乗馬や飛行機の操縦に挑戦するもよし、旅行に勤しむもよし (ワシントン DC やフロリダは車で行ける範囲内にある)、様々である。スポーツ観戦もポピュラーな娯楽で、デュークが大学バスケットボールで全米優勝した2001年はものすごい盛り上がりだった。しかし何と言っても、広く美しい自然を楽しむのがお勧めである。現在、私は木々に囲まれた一軒家を借りて住んでいるが、広い庭に花を植え、小鳥のさえずりを聞き、リスやウサギと戯れる生活というのは素晴らしいものである。天気の良い日には、最近妻が購入したコンバーチブルでのドライブを楽しみ、ノースキャロライナの自然を堪能している。ニューヨークなどの大都市ほどではないが、RTP は学園研究都市なので田舎の割には日本人も多く、寂しい思いもせずに住む。なりゆきで決まった就職だが、アメリカに来て2年、生活も研究もおおいに楽しんでいる。

プロフィール

2000年3月、九州大学大学院博士過程終了、理学博士。2000年5月より Duke University Medical Center, Robin P. Wharton 研究室 (HHMI) にポストドクとして勤務。

羽原 靖 晃

Duke 大学
Robin P. Wharton 研究室


New Techniques

*'Progress in science depends on new techniques, new discoveries,
and new ideas, probably in that order.' S. Brenner 1985*

ランダムリボザイムライブラリーを用いた 機能遺伝子の網羅的探索

川崎 広明 (東京大学大学院工学系研究科)

2000年6月、ヒトの全遺伝子配列がほぼ明らかにされたこと記念すべき宣言がありました。今後これらの遺伝子情報は、ゲノム創薬やバイオテクノロジー関連産業などで役立つものと考えられます。しかしながら、この遺伝子情報を有効に活用するためには、個々の遺伝子の機能解明が必要です。特にバイオテクノロジー関連産業の分野では、早急に産業に有用な新しい機能遺伝子を同定し特許を取得しようと激しい競争になっています。そのため効率よく機能遺伝子を見つけるには、我々にとって必要なある細胞内機能に着目し、その機能に関連した遺伝情報のみを探索する技術が必要と考えられます。そのような観点から我々は、リボザイムの基質認識部位をランダム化したリボザイムライブラリーを用いて、有用な遺伝子を機能の面から探索できる方法(ジーンディスカバリーシステム)を考案しました。ここでは、このジーンディスカバリーシステムをはじめた経緯やその手法について述べたいと思います。

効率よく機能遺伝子を見つけるには、我々にとって必要なある細胞内機能に着目し、その機能に関連した遺伝情報のみを探索する技術が必要と考えられる

さてはじめた経緯ですが、今から4年前までさかのぼります。当時、筑波大で学位を取得したての私は、研究テーマの一つとして動物培養細胞中で活性型リボザイムを見つける研究をしていました。リボザイムとは、触媒活性をもつRNAのことで、その中でも私は、ハンマーヘッド型リボザイムという特定のRNAを切断する酵素活性をもつ小さなRNAを扱っていました。このリボザイムは、20塩基程度の基質認識配列を持ち、その配列が特定のRNAと結合し、NUX配列の直後で切断をすることができます。その特性を利用することでリボザイムは、ウイルス由来の遺伝子や癌遺伝子を標的とした遺伝子治療への可能性があり、また機能遺伝子の解析ツールとして用いられています。実際、私もリボザイムを用いて遺伝子発現の転写に関わるp300とCBPの機能解析を理化学研究所との共同研究で行っていました(Nature 393:284, 1998)。

一方、リボザイムは、試験管内では高活性を示すのですが、動物細胞中では十分な活性をなかなか示さないということが一般に知られていました。そこで我々は、リボザイムを動物細胞中でも利用できるように工夫を試みました。特にtRNAのプロモーターを用いた発現系は、リボザイムの発現量を飛躍的に増加させて、また標的と同じ細胞質に局在させることでリボザイムの細胞内での効果を上げることに成功しました。その後、より活性の高いリボザイムを動物細胞中で選択できないかという流れになり、リボザイムの配列にランダムな配列を導入して、高い活性を示すリボザイムを探索することを試みていました。具体的には、

リボザイムの一部の配列をランダム化したライブラリーを作り、すでに癌化近づいた培養細胞に導入します。もしリボザイムが癌抑制遺伝子の発現を抑制すれば悪性の癌細胞の一つの性質であるコロニー形成能を獲得すると考え、それを指標に活性型リボザイムの選択を行いました。その結果として活性中心部位にランダムな配列を導入して選択を行ったところ、

期待どおりに活性型のリボザイムの配列が選択されてきました。

そのような研究をしていた最中、指導教官の多比良和誠教授から、リボザイムの基質認識部位をランダム化して、ある生命現象に関わる機能遺伝子を探索したらどうだろうとアドバイスを受けました。私は、すぐにはじめてみずとは言ったものの内心はあまり気が進みませんでした。というのも当時、今もそうですが、流行ものの好きの私は、いろいろテーマを抱えていて特にこのころは、転写因子のヒストンアセチル化の研究に熱中していました。当時転写因子の研究分野ではヒストンのアセチル化が最も脚光を浴びていて、内容的にもトップジャーナルへの掲載がねらえるものでした(Nature 405:195, 2000)。そのため当初、ジーンディスカバリーシステムについては、そのアセチル化の

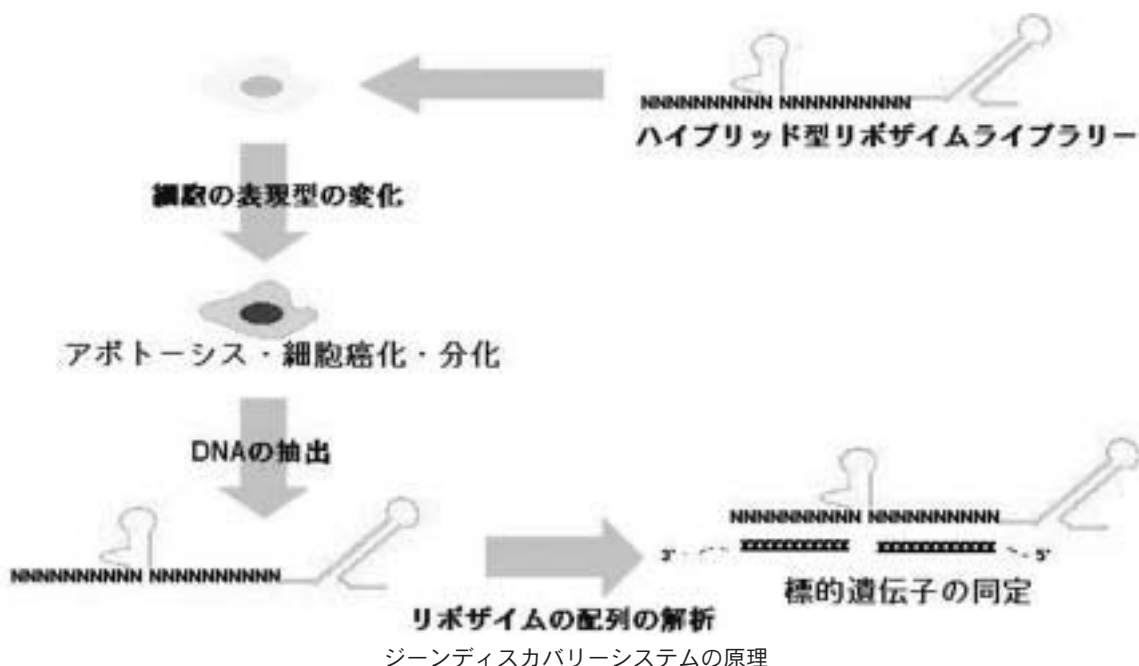
実験の間に行っていました。さてこのシステムの構築をはじめるとあって、ある現象に関わるといっても何の生命現象についての遺伝子を探索するかを考えなくてはなりません。ここで簡単にジーンディスカバリーシステムの原理を説明しますと、リボザイムがある生命現象のシグナル経路に必要な遺伝子の発現を抑制した場合に細胞の表現型が変化するとします(図1)。その変化を指標に細胞を分離して、その細胞で発現しているリボザイムの基質認識部位の配列を解析すれば、標的遺伝子の一部の配列がわかります。その配列をもとにDNA データーベースで検索すれば標的遺伝子を同定できます。その遺伝子はおそらく細胞の表現型の変化に関わる遺伝子と考えられるわけです。私は、まずシステムが機能するかが重要なので、はじめは表現型の変化がわかりやすい方がよいと思いました。そこでリボザイムがアポトーシス(計画的な細胞死)に必要な遺伝子の発現を抑制したらアポトーシスを起こさず細胞が生き残るかもしれないと考え、この系を用いて機能遺伝子探索を試みようと思いました。

次にジーンディスカバリーシステムを行うには、種々の基質認識部位の配列をもったリボザイムのライブラリーを作製しなければなりません。リボザイムライブラリーは、テンプレートDNAのリボザイムの基質認識部位にランダムな塩基配列を20塩基程度いれておき上流と下流のプライマーを使って二本鎖DNAに増幅します。あとは、制限酵素処理をして発現プラスミドに組み込めば出来上がりです。この時、私は二種類のリボザイムライブラリーを作製しました。一つは通常のリボザイムライブラリーで、もう一つは、RNAヘリカーゼと相互作用できるハイブリッド型リボザイムライブラリーです。ハイブリッド型リボザイムは、リボザイムの配列の後にRNAヘリカーゼ結合モチー

フの配列を連結させています。通常のリボザイムは、固いシステム構造を形成するmRNAを切断することが難しいですが、ハイブリッド型リボザイムは、RNAヘリカーゼが標的mRNAの構造を巻き戻してくれるので切断することが可能です。そのため標的遺伝子の発現抑制効果が重要であるジーンディスカバリーシステムでは、このハイブリッド型リボザイムが効果的であると考えています。

その後、出来上がったライブラリーを細胞に導入して細胞にFAS抗体で処理をしました。そうするとほとんどの細胞はアポトーシスを誘導して死んでしまいましたが、ライブラリーを導入した細胞では生き残った細胞集団を観察することができました。予想どおり生き残った細胞は、ハイブリッド型リボザイムライブラリーを用いた方が多く見られました。次にその細胞を回収してきてそれぞれのクローンのDNAを抽出してリボザイムの配列を解析して標的遺伝子を同定しました。その結果、FADDやCaspas 3など多くのアポトーシスに関わる遺伝子を見つけることに成功しました。しかしながら、同定された遺伝子の中には、アポトーシスに関係ない遺伝子もありましたが、そういった遺伝子は全体で見つかった遺伝子の5%以下でした。よってリボザイムライブラリーを用いたジーンディスカバリーシステムは、確かに機能していると確信しました。このアポトーシスに関しては、他に神経系のアポトーシス系として筑波大学の菅野さんが、またUV照射によるアポトーシス系として東京大学の常見君がそれぞれ成功させています。

アポトーシスのシステムが機能していることがわかったので、次に他の生命現象にこのジーンディスカバリーシステムが使えるのかということを考えました。確かにアポトーシスは、生き残った細胞を回収すればよいという比較



的簡単な系でした。では、このシステムを応用するのに他にどのような系が考えられるでしょうか。一つには、細胞分化の系に応用できると考えています。細胞がある化学物質の刺激によって分化するときに細胞の表面に特異的なタンパク質を作ります。その分化特異的なタンパク質を認識する抗体を用いれば、蛍光を指標としたセルソーターによる細胞の分離や磁気を指標とした細胞磁気分離装置を使用して、分化した細胞または未分化の細胞を分離することができます。実際にレチノイン酸誘導の分化の系では、このシステムが正しく機能しています。また他の系として癌細胞が悪性化して転移能を獲得すると細胞の運動性がより活発化します。この細胞の運動能を指標として癌転移に関わる遺伝子の同定も考えられます。この系に関しては、東京大学の須山君が担当しており、実際に興味ある遺伝子がいくつも見つかってきています。またこの系を応用してマウスの個体で行うことも試みています。

しかしながら、このジーンディスカバリーシステムの研究がこのようにスムーズに進むとは、私自身思っていませんでした。私は、幸運にも多比良研究室でリボザイムを含めた RNA の知識と手法を理化学研究所で細胞シグナル伝達に関する知識や研究手法を習得することができたので、両方の知識をもとにアイデアが浮かび研究が順調に進んだのかもしれませんが。そういう意味では、一つの研究分野にとらわれず、色々な分野で幅広い知識や実験手法を習得するのは、大変ですが研究する上で大事なと思います。という私もまだまだ学ばないといけないのですが…。というわけで現在は、リボザイムから離れて RNA 干渉と microRNA の研究を精力的に進めているところです。もち

ろんジーンディスカバリーシステムの研究をやめてしまったわけではなく、ヒト間葉系の幹細胞を用いて多種多様の分化に関わる因子の同定も行っています。

ジーンディスカバリーシステムは、リボザイムが細胞内で作用したときに何か細胞の表現型が変化し、それを指標に細胞を分離することができれば、色々な生命現象の系に応用することが可能であると私は考えています。もしかしらこの寄稿を読んで下さっている方々が研究されている系でも応用可能かもしれません。また誌面の都合上、ジーンディスカバリーシステムについて十分な説明ができませんので、興味をもたれた方は我々の論文を参考にして下さい (Nature Biotechnol 20:376, 2002; EMBO rep 3:443, 2002)。最後になりますが、我々のジーンディスカバリーシステムがポストゲノムの研究に少しでも貢献できましたら幸いに思います。



プロフィール

1998年筑波大学大学院博士課程修了(農学博士)。1998~2000年9月まで産業技術総合研究所博士研究員。2000年10月東京大学大学院工学系研究科教務職員を経て2001年4月より同助手。

川崎 広明

(東京大学大学院
工学系研究科)

◆ Society ◆

色覚バリアフリープレゼンテーション

岡部 正隆 (国立遺伝学研究所
総合研究大学院大学)

伊藤 啓 (東京大学分子細胞生物学研究所
岡崎国立共同利用機構
基礎生物学研究所)

<http://www.nig.ac.jp/labs/DevGen/shikimou.html>

日本人男性の約5%、白人男性の約8%は、赤や緑の混じった特定の範囲の色について差を感じにくい「色盲*」という色覚特性を持っている。これは世界的に見れば、AB型の血液型の頻度にも匹敵する人数である。学術雑誌の力

ラー図版も増加し、学会等におけるプレゼンテーションにおいても、色に重要な情報が含まれているケースが多くなってきた。色盲の読者や聴衆、論文の査読者にも分かりやすいプレゼンテーションを心がけることは、発表者の利

益になる。

色盲の人が困る色使いとは？

色盲の人の大多数は「赤緑色盲」で、赤または緑感受性錐体細胞の視物質遺伝子に変異がある。どちらかの錐体が機能しなくても残った緑と青、あるいは赤と青の錐体細胞を使って、ほとんどの色を見分けることができる（図1）。しかしながら、赤～橙～黄～黄緑～緑の色範囲では、感じられる色の差が小さい。また濃緑と茶色、水色とピンク、青と紫など、ある色とそれに赤や緑を足した色を区別するのが難しくなる。また、最も長波長側の赤視物質遺伝子に変異がある色盲の人では、長波長領域の感度が低下し、「濃い赤」がほとんど「黒」に認識される（図1）。

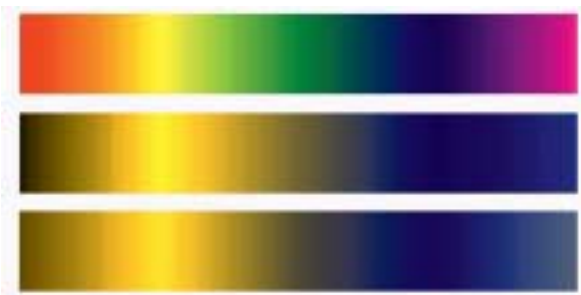


図1) 上段から順に、光のスペクトル、赤視物質遺伝子の変異による色盲のシミュレーション、緑視物質遺伝子の変異による色盲のシミュレーション。どちらの変異においても赤～緑の領域で色の差が小さくなっており、さらに赤視物質の変異では濃い赤がほとんど黒として認識されていることがわかる。しかしながら緑～青の領域においては、色盲の人も問題なく区別できることがわかる。

国内総生産の成長率 (93・94年は見込み)

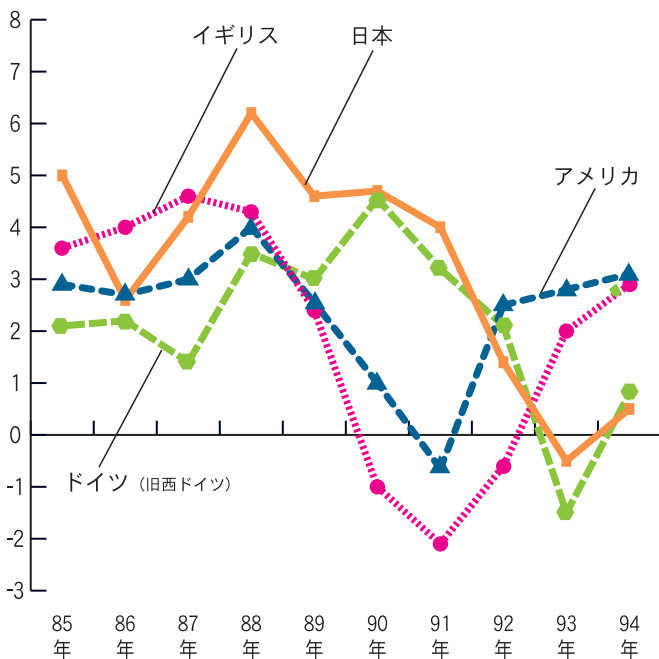


図2) 色に頼らなくても理解できるグラフ。線の形状、形の異なるシンボル、ハッチングの併用などの工夫をしている。凡例をグラフに直接書き込むことも重要なポイントである。
(図版提供：橋本知子／文化総合研究所)

大原則：色以外の情報でも判断ができるようにプレゼンテーションする。

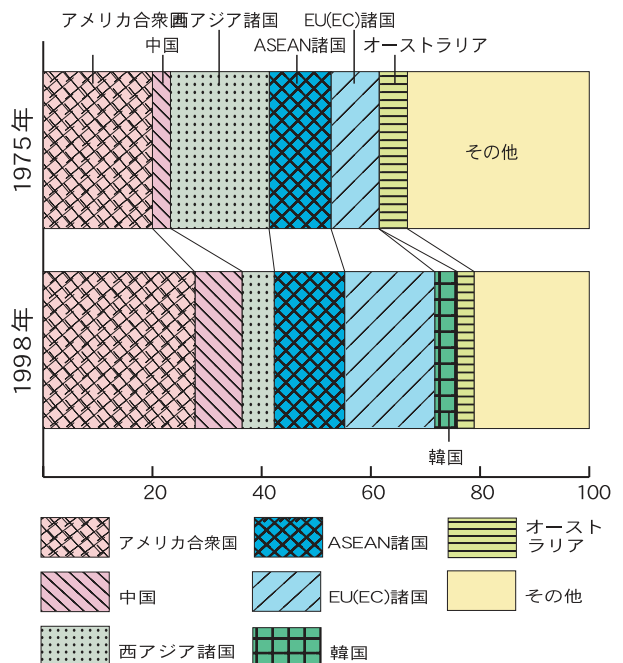
以上のような特徴を持つ色盲の人を含むすべての人に、一目で分かりやすいようなプレゼンテーションをするためには、色以外の情報でも判断できるように図やスライドを作ることが重要である。このような工夫は白黒でコピーを取った場合にも有効である。たとえば折れ線グラフでは線の太さや形状（実線と点線）を変える。点のプロットには色の違う同一形状のシンボルを並べるのではなく、●■▼▲×などを組み合わせる。グラフの塗り分けでは、色を変えるだけでなく、さまざまなハッチングを併用する。凡例は図の横に別に置くのではなく直接グラフに書き込むなどの工夫が有効である（図2）。

学会や講義で図を説明する際にも、「緑色は○○を示します」のように色名だけで説明せず、対象を指し示しながら「この緑色の△△は○○を示します」のように色以外の情報を付加する。また、よく用いられている赤いレーザーポインターは長波長の光を使用しているため、色盲の人には視認できないことがある。最近容易に入手可能になった緑色のレーザーポインターを使用したり、小さな会場なら指示棒を使用するなどの配慮が求められる。

塗り分けに使う色

赤緑色盲では赤～緑の色に差を感じにくいので、グラフ

日本の貿易相手国の変化



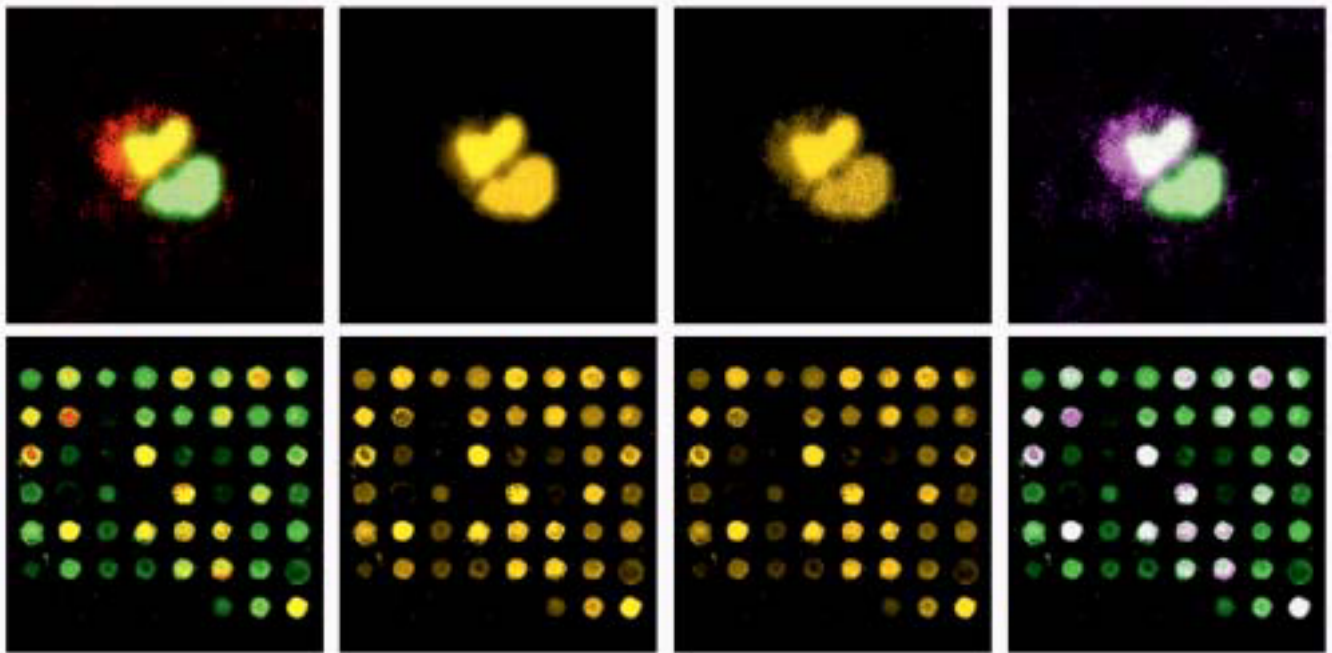


図3) 左から順に、元画像、赤視物質遺伝子の変異による色盲のシミュレーション、緑視物質遺伝子の変異による色盲のシミュレーション、推奨される「マゼンタ（赤紫）+緑画像」：赤と緑が重なりあった部分は黄色になるが、色盲の人には黄色と緑の差が識別しにくい。赤視物質遺伝子の変異による色盲ではさらに赤の部分も暗く見にくい。「マゼンタ+緑」の組み合わせでは、重なった部分が白になる。

や線を塗り分ける場合には、赤～緑（暖色系）と緑～紫（寒色系）から色を対比させて選ぶようにする（図1）。緑を使う場合は、なるべく青みの強い寒色系の緑を使うと間違えにくい。複数の色を使う場合は、暖色系と寒色系を交互に並べ、明るいオレンジと暗い緑のように、なるべく明度を大きく離れた色を組み合わせるとよい。また、塗り分けの境界には白や黒で縁取りをすると、区別が分かりやすい。さらに、可能ならば色分けだけでなくハッチングを施すと、非常に分かりやすい。

写真の色使い

CCDカメラを利用したデジタル画像では、元の色に関係なく、見やすい色を自由に選択してプレゼンテーションできる。蛍光顕微鏡の二重染色写真やDNAチップの画像では、これまで各チャンネルの情報を使った蛍光色素の色に合わせて赤と緑で表現していた。しかしこれでは色盲の人には、重なった部分の黄色が緑と見分けられない（図3）。赤のかわりにマゼンタ（赤紫=赤と青の混合色）を用いた「マゼンタ+緑」の組み合わせに変えれば、重なり合った部分が白になり、色盲の人にも色盲でない人にも理解しやすい（図3）。既存の赤+緑画像をマゼンタ+緑画像に変換するのは、フォトショップなどの画像処理ソフトで赤チャンネルの絵を青チャンネルにコピーするだけなので簡単である。全チャンネルを重ねた画像だけでなくチャンネルごとの白黒画像も並べて掲示すると、白黒のコピーでも情報が伝わる。

1チャンネルの画像をカラーで表示している例も見受けるが、色つきの単色写真は暗いので白黒の画像より見にくいし、色盲の人には赤の単色写真がほとんど見えないことがある。また論文等の印刷物ではカラーは白黒より階調再現性ははるかに低く、明るい部分や暗い部分がつぶれてしまい、せっかくの情報が有効に伝わらない。一見地味でも、白黒画像で掲示するのが最適である。

以上の注意点に留意して、自由に創意に満ちた表現法と色覚バリアフリーとを両立させていただきたい。

*「色盲」については差別的表現を避ける意図から「色覚異常」「色覚障害」「色弱」などと言いかえられることも多いが、本稿では、「異常」などの無用な価値判断を含まず、バリアフリーにおいて最も配慮が必要な重い症状までも包含している点から、「色盲」という用語に統一する。言葉の抱える問題に関しては、<http://www.nig.ac.jp/labs/DevGen/mou.html>を参照されたい。

プロフィール

1996年東京慈恵会医科大学大学院博士課程修了，博士（医学）。科学技術振興事業団研究員と経て1997年より現所属，助手。

岡部正隆

〔国立遺伝学研究所〕
〔総合研究大学院大学〕

遺伝子ネットワークと内分泌攪乱化学物質

近藤 昭宏

(タカラバイオ(株) DNA 機能解析センター)

私の所属する DNA 機能解析センターの仕事のひとつに DNA マイクロアレイ (DNA チップとも称する) に関する分野の仕事がある。当センターでは、DNA マイクロアレイを作るところから解析するところまで、幅広く活動している。その中には、独自のテーマで研究を進めているものもあるが、コンソーシアムに加わっていたり、大学や企業との共同研究を行っていたりするものもある。もちろん、種々の受託も行っている。そのなかで本稿では、平成 12 年度より研究している「環境ホルモンの作用を DNA マイクロアレイで解析する」というテーマについて紹介し、RNA 研究分野におけるマイクロアレイの今後一層の有効利用をお考えいただける機会となればと考える次第である。

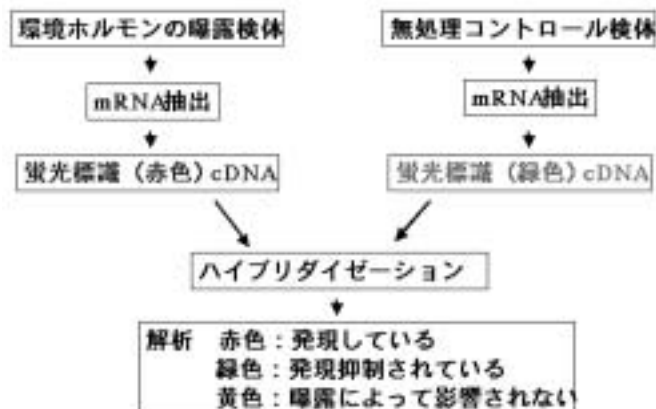
近年、内分泌攪乱化学物質 (いわゆる「環境ホルモン」) のヒトへの影響については、野生生物に見られるような深刻な影響があるのか、また胎児に対しての影響はどうかなど、さまざまな不安を人々に抱かせている。しかし、ここでいう環境ホルモンの健康への影響すなわち、いわゆる「毒性」は、従来の毒性学では十分に評価できない困難さをもった「毒性」であると考えられている。それは、環境ホルモンの作用が内分泌ホルモンレセプターを介したものであり、レセプターを介する毒性自体新しい概念である。また、通常の毒性学で用いられるよりずっと低用量で作用し、いわゆる用量作用関係が成立しないとか、胎児期から直接あるいは間接に影響を及ぼす可能性が指摘されるなど、このよ

うな事象は従来の毒性学からすると新しいパラダイムにあたるからである。環境ホルモンの研究における低用量作用とは毒性学における標準的な生殖・発生毒性試験法に一般的に用いられる用量の百分の一から千分の一以下の非常に微量であり、このような微量で生物学的変化が引き起こされているとされている。この環境ホルモンの攪乱作用のやっかいなところは、ヒトや野生動物がその「毒性」ですぐさま死ぬわけではないが、子孫にその影響が残るところにある。これは、通常的手段では非常に検証が困難な話である。

いくつかのグループでは、先人が論文で報告しているような低用量作用は観察できなかったと報告している。この実験の難しさのひとつには、マウス新生仔の前立腺の大きさ (重さ) を議論するところに起因しており、実験結果の比較検証より実験自体の正確さや再現性を含めた標準化が優先すると思われる点である。よって、低用量作用の実験が難しく、必ずしもどの研究者にも追試できるわけではないとしてもしかたがない。しかし、ここ数年にわたって行われてきた野生動物の観察結果などからすれば、低用量作用は無視できる現象ではないのは確かである。そこで我々は、環境ホルモンの影響評価に遺伝子の発現パターンを用いて分析評価するという試験法を提案し研究を進めている。

遺伝子発現の量的変化の測定には、我々の得意分野のひとつであり最近の進歩がめざまい DNA マイクロアレイ技術を用いて測定することとした。DNA マイクロアレイ技術を用いれば、数千種以上の遺伝子の発現量の変化を一度に測定できるという大変な利点を持っている。よって、この技術は環境ホルモン研究分野でたいへん魅力ある技術で、上手く使えば、環境ホルモンといわれている化合物の分類が可能となる。つまり、遺伝子発現パターンを用いた新しい環境ホルモンの影響評価の試験法となると考える。しかもこの適切に設定された系における遺伝子発現の変化を見る試験法では、従来の動物実験による生物学的変化を見る試験法に比べて短期間で高感度な試験結果が得られ、その得られる情報量も多い (図 1)。

DNA マイクロアレイの実験プロトコール



我々が試験に用いた化合物は、SPEED_98に掲載された化合物のうち内分泌攪乱化学物質問題検討会により選定された「優先してリスク評価に取り組む物質」を中心に行った。実験の対象には、ステロイドホルモン感受性のヒトおよびマウスの培養細胞、加えてマウスの胎仔を用いた。その結果、ヒトの遺伝子約8,400種から約1,000種、マウスの遺伝子約9,000種から約1,500種の環境ホルモンの内分泌攪乱作用と関連すると考えられる遺伝子をDNAマイクロアレイ技術を用い選別することができた。

現在は、選別した遺伝子を整列配置したDNAマイクロアレイを作成しており、それらを用いてより詳細なデータ解析を行っている。これらのデータは、化学物質ごとの遺伝子発現パターンを表しており、環境ホルモン研究の立場から見た化学物質のカテゴリー分類に役立ち、環境ホルモンの影響評価に大いに貢献できる。また、DNAマイクロアレイによる解析データのデータベースを構築しつつあり、研究者間の情報の共有化を図るため早期公開を目標としている。なお、今後はかかる遺伝子技術を用いた新試験法の評価にあたり、従来の毒性学的手法であるげっ歯類による

子宮肥大試験法などと感度や信頼性等の点を比較検討しつつ試験法の確立を推進する予定である。

本稿で紹介したDNAマイクロアレイの利用法は、mRNAの存在量の比較測定という極conventionalな利用法であるが、DNAマイクロアレイはすでにmRNAの安定性、分解応答、翻訳効率の解析などに広く利用されていることはご存知のことと思う。また、スライドグラスにアレイできる物質はDNAだけではなく、RNAやたんぱく質など種々の分子を配置できる。さらに、少々知恵を出し洒落たトリックを考えれば、DNAマイクロアレイはRNA情報解析の有用な手段となり得ると思われる。特に、「リボソーム医学」や「RNA医工学」と呼ばれる医療分野には必須のアイテムとなってくるであろう。

本研究の多くの部分は、環境省のミレニアムプロジェクトの一環として行われたものであり、共同研究者の武田健教授（東京理科大学）、井口泰泉教授（岡崎基生研）をはじめそれぞれの教室の皆様のご協力に深謝する。

街で見かけたRNA



特定領域研究 (RNA 情報発現系の時空間ネットワーク)

領域代表 中村 義一

総括班

評価グループ

志村 令郎 (日本学術振興会ストックホルム研究連絡センター)
 京極 好正 (産業技術総合研究所 生物情報解析研究センター)
 堀田 凱樹 (国立遺伝学研究所)
 野本 明男 (東京大学 大学院医学系研究科)
 谷口 維紹 (東京大学 大学院医学系研究科)

実施グループ

中村 義一 (東京大学 医科学研究所)
 松藤 千弥 (東京慈恵会医科大学 医学部)
 坂本 博 (神戸大学 理学部)
 塩見 春彦 (徳島大学 ゲノム機能研究センター)
 渡辺 公綱 (東京大学 大学院新領域創成科学研究科)
 横山 茂之 (東京大学 大学院理学系研究科)
 饗場 弘二 (名古屋大学 大学院理学研究科)
 伊藤 耕一 (東京大学 医科学研究所)

計画研究

研究項目 A01 RNP マシン (班長: 中村義一)

中村 義一 (東京大学 医科学研究所)
 研究課題: 翻訳マシンの分子擬態とプリオン特性の研究

内海 利男 (信州大学 繊維学部)
 研究課題: リボソーム機能構造の分子解剖

渡辺 公綱 (東京大学 大学院新領域創成科学研究科)
 研究課題: ミトコンドリア翻訳系の特異な分子間ネットワークと機能特性

井上 丹 (京都大学 大学院生命科学系研究科)
 研究課題: リボザイム機能構造のネットワーク

竹中 章郎 (東京工業大学 大学院生命理工学研究科)
 研究課題: リボザイム RNA 構造

横山 茂之 (東京大学 大学院理学系研究科)
 研究課題: RNA タンパク質複合体構造
 (分担者: 河合 剛太)

研究項目 A02 RNA 制御スイッチ (班長: 松藤 千弥)

松藤 千弥 (東京慈恵会医科大学 医学部)
 研究課題: 翻訳リコーディング制御

正木 春彦 (東京大学 大学院農学生命科学研究科)
 研究課題: RNase による RNA 分解制御
 (分担者: 尾之内 均)

水本 清久 (北里大学 薬学部)
 研究課題: 5' 末端キャップ構造による mRNA 動態制御
 (分担者: 稲田 利文)

武藤 あきら (弘前大学 農学生命科学部)
 研究課題: tmRNA によるトランス翻訳機構
 (分担者: 饗場 弘二)

伊藤 耕一 (東京大学 医科学研究所)
 研究課題: 翻訳終結制御機構の解明

研究項目 A03 動く RNA (班長: 坂本 博)

坂本 博 (神戸大学 理学部)
 研究課題: RNA 結合タンパク質による細胞の増殖分化制御機構
 (分担者: 渡辺 嘉典)

萩原 正敏 (東京医科歯科大学 難治疾患研究所)
 研究課題: リン酸化によるスプライシングと mRNA 輸送の制御機構
 (分担者: 谷 時雄)

大野 陸人 (京都大学 ウイルス研究所)
 研究課題: RNA 核外輸送の多様性と制御機構
 (分担者: 多比良 和誠)

井上 邦夫 (奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科)
 研究課題: mRNA 局在化の制御機構
 (分担者: 平岡 泰)

研究項目 A04 高次複合系 RNA 動態 (班長: 塩見 春彦)

塩見 春彦 (徳島大学 ゲノム機能研究センター)
 研究課題: 高次機能性 RNA 結合蛋白質による ゲノム情報発現制御
 (分担者: 塩見 美喜子, 岡野 栄之)

林 純一 (筑波大学 生物科学系)
 研究課題: ミトコンドリア tRNA 遺伝子突然変異導入マウスの病態解析と遺伝子治療
 (分担者: 太田 成男)

阿形 清和 (発生・再生科学総合研究センター 進化再生研究グループ)
 研究課題: 発生・再生における RNA 動態
 (分担者: 中村 輝)

神津 知子 (埼玉県立がんセンター 研究室・がん治療研究担当)
 研究課題: 機能性 RNA と治療デザイン
 (分担者: 石川 冬木)

剣持 直哉 (宮崎医科大学 医学部附属実験実習機器センター)
 研究課題: リボソームの高次複合形質
 (分担者: 森 茂郎)

公募研究

五十嵐 一衛 (千葉大学 大学院薬学研究院)
 研究課題: ポリアミンによる RNA 機能のモジュレーション

井沢 真吾 (京都大学 大学院農学研究科)
 研究課題: ストレス応答における核内チオレドキシニンによる mRNA 核外輸送の redox 制御機構

石垣 靖人 (金沢大学 薬学部)
 研究課題: ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構の解析
 (分担者: 松永 司)

今泉 和則 (奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科)
 研究課題: 神経変性疾患原因遺伝子の異常スプライシング

上田 卓也 (東京大学 大学院新領域創成科学研究科)

研究課題: 翻訳の終結機構の解明

遠藤 仁司 (自治医科大学 医学部)

研究課題: 筋分化システムに働くスプライシング因子の
同定とその調節メカニズムの研究

岡田 典弘 (東京工業大学 大学院生命理工学研究科)

研究課題: LINE 逆転写酵素による RNA3' 末端配列の
認識機構
(分担者: 大島 一彦)

影山 裕二 (奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科)

研究課題: ショウジョウバエ MSL 複合体の核内局在化機構

柏原 真一 (筑波大学 応用生物化学系)

研究課題: 哺乳動物 CPEB ホモログによる mRNA 情報の
時空間的発現制御機構の解析

片平 じゅん (大阪大学 大学院生命機能研究科)

研究課題: mRNA 核外輸送トランスポーター Tap の
核膜孔通過機構

片平 正人 (横浜国立大学 大学院環境情報研究院)

研究課題: アプタマー, Musashi 及び hnRNPD による
遺伝情報発現制御の分子基盤

木下 和生 (京都大学 医学研究科)

研究課題: RNA 編集による抗体遺伝子の DNA 情報変換機構
(分担者: 村松 正道)

木俣 行雄 (奈良先端科学技術大学院大学 遺伝子教育研究センター)

研究課題: 小胞体ストレス応答性 RNase である
Ire1 と標的 RNA のユニークな動態
(分担者: 河野 憲二, 都留 秋雄)

栗原 靖之 (横浜国立大学 大学院環境情報研究院)

研究課題: マウス生殖細胞の高次生物機能を具現する
RNA 情報発現ネットワークの研究

小池 英明 (産業技術総合研究所 脳神経情報研究部門)

研究課題: 好熱性古細菌由来 NusA, G 両蛋白質の
立体構造に基づく mRNA 伸長制御機構の解明

小林 剛 (大阪大学 微生物病研究所)

研究課題: 分泌蛋白質 mRNA の神経突起伸長点への
蓄積機序の解明

坂口 末廣 (長崎大学 大学院医学研究科)

研究課題: PrP pre-mRNA3' プロセッシング異常と
神経細胞死の分子機構解明

佐藤 充治 (東京大学 医科学研究所)

研究課題: リボザイムを利用した胚性幹細胞における
未分化維持遺伝子のスクリーニング
(分担者: 吉田 進昭)

椎名 伸之 (国立遺伝学研究所 構造遺伝学研究センター)

研究課題: p105 新規タンパク質による細胞質
mRNA 複合体の形成と細胞骨格依存的輸送
(分担者: 徳永 万喜洋)

嶋本 伸雄 (国立遺伝学研究所 構造遺伝学研究センター)

研究課題: RNA 蛋白複合体の情報発現分子機械と
しての動的機構
(分担者: 十川 久美子)

杉浦 麗子 (神戸大学 大学院医学系研究科)

研究課題: RNA 結合蛋白質を介した新規シグナル
伝達系の分子遺伝学的研究
(分担者: 久野 高義, 春籐 久人)

鈴木 勉 (東京大学 大学院新領域創成科学研究科)

研究課題: 新規機能配列選択法を用いた
リボソーム RNA の機能解析

善野 修平 (東京大学 大学院理学系研究科)

研究課題: RNAi 酵素複合体の実体解明と分子機能解析

多田隈 尚史 (早稲田大学 理工学部)

研究課題: 1 分子蛍光イメージング法による
mRNA 核外輸送メカニズムの解析
(分担者: 船津 高志)

程 久美子 (東京大学 理学部)

研究課題: 新機能性 RNA, 7SL-RNA の
神経細胞生存活性と作用機序の解明
(分担者: 浜田 剛, 高橋 史峰)

野島 博 (大阪大学 微生物病研究所)

研究課題: 翻訳フレームを持たない新規な
ポリ A プラス RNA 群の機能解析
(分担者: 藤井 孝之)

姫野 依太 (弘前大学 農学生命科学部)

研究課題: 新規 RNA 結合型 G タンパク質の研究

星野 真一 (東京大学 大学院薬学系研究科)

研究課題: 翻訳と mRNA 動態を制御する
新規 G 蛋白質群の機能
(分担者: 堅田 利明, 仁科 博史, 紺谷 圏二)

松野 健治 (東京理科大学 基礎工学部)

研究課題: ショウジョウバエ新規 RNA ヘリカーゼ
Naruto による Notch 情報伝達系の制御

三森 経世 (京都大学 大学院医学研究科)

研究課題: 自己免疫疾患患者の自己抗体が認識する新規
tRNA 結合蛋白質の解析に関する研究
(分担者: 藤井 隆夫, 野島 崇樹)

飯 哲夫 (京都大学 大学院理学研究科)

研究課題: 植物における PTGS 反応系の解析

森 泰丈 (大阪大学 大学院医学系研究科)

研究課題: α CaMKII mRNA のシナプスにおける
翻訳調節機構の解明

森井 孝 (京都大学 エネルギー理工学研究科)

研究課題: 機能性ミニチュア RNA タンパク質複合体の構築
(分担者: 牧野 圭祐)

山中 伸弥 (奈良先端科学技術大学院大学 遺伝子教育研究センター)
 研究課題: eIF4G 関連蛋白質 NAT1 の機能解明
 (分担者: 三井 薫)

吉久 徹 (名古屋大学 物質科学国際研究センター)
 研究課題: 核内に存在する成熟体 tRNA の生理的意義の解析

和田 明 (大阪医科大学 医学部)
 研究課題: リボソームの 100S ~ 70S 変換
 一定常期における蛋白合成制御機構の研究
 (分担者: 吉田 秀司)

渡辺 雄一郎 (東京大学 大学院総合文化研究科)
 研究課題: 植物での RNA 情報の移行および発現制御

渡邊 洋一 (東京大学 大学院医学系研究科)
 研究課題: 古細菌を用いた、核小体低分子 RNP の解析

研究者名簿

(五十音順, 公募研究については代表者のみ)

(あ)

饗場 弘二 (あいば ひろじ)
 名古屋大学 大学院理学研究科 教授
 〒464-8602 名古屋市千種区不老町
 Tel : 052-789-3653
 Fax : 052-789-3001
 E-mail : i45346a@nucc.cc.nagoya-u.ac.jp

阿形 清和 (あがた きよかず)
 発生・再生科学総合研究センター
 進化再生研究グループ 教授
 〒650-0047 神戸市中央区港島南町 2-2-3
 Tel : 078-306-3085
 Fax : 078-306-3085
 E-mail : agata@cdb.riken.go.jp

五十嵐 一衛 (いがらし かずえい)
 千葉大学 大学院薬学研究院
 病態生化学研究室 教授
 〒263-8522 千葉市稲毛区弥生町 1-33
 Tel : 043-290-2897
 Fax : 043-290-2900
 E-mail : iga16077@p.chiba-u.ac.jp

井沢 真吾 (いざわ しんご)
 京都大学 大学院農学研究科 助手
 〒611-0011 京都府宇治市五ヶ庄
 Tel : 0774-38-3731
 Fax : 0774-33-3004
 E-mail : izawa@food2.food.kyoto-u.ac.jp

石垣 靖人 (いしがき やすひと)
 金沢大学 薬学部 総合薬学科
 健康薬学講座 遺伝情報制御学研究室 助手
 〒920-0934 金沢市宝町 13-1
 Tel : 076-234-4488
 Fax : 076-234-4427
 E-mail : ishigaki@mail.p.kanazawa-u.ac.jp

石川 冬木 (いしかわ ふゆき)
 京都大学 大学院生命科学研究所
 統合生命科学専攻 細胞周期学分野 教授
 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町
 Tel : 075-753-4196
 Fax : 075-753-4197
 E-mail : fishikaw@lif.kyoto-u.ac.jp

伊藤 耕一 (いとう こういち)
 東京大学 医科学研究所
 基礎医科学部門遺伝子動態分野 助手
 〒108-8639 東京都港区白金台 4-6-1
 Tel : 03-5449-5309/5308
 Fax : 03-5449-5415
 E-mail : itopi005@ims.u-tokyo.ac.jp

稲田 利文 (いなだ としふみ)
 名古屋大学 大学院理学研究科
 生命理学専攻 助手
 〒464-8602 名古屋市千種区不老町
 Tel : 052-789-2982
 Fax : 052-789-3001
 E-mail : p47294a@nucc.cc.nagoya-u.ac.jp

井上 邦夫 (いのうえ くにお)
 奈良先端科学技術大学院大学
 バイオサイエンス研究科 分子発生生物学講座
 助手
 〒630-0101 生駒市高山町 8916-5
 Tel : 0743-72-5558
 Fax : 0743-72-5559
 E-mail : kunio@bs.aist-nara.ac.jp

井上 丹 (いのうえ たん)
 京都大学 大学院生命科学研究所
 統合生命科学専攻 遺伝子動態分野 教授
 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町
 Tel : 075-753-3995
 Fax : 075-753-3996
 E-mail : tan@kuchem.kyoto-u.ac.jp

今泉 和則 (いまいずみ かずのり)
 奈良先端科学技術大学院大学
 バイオサイエンス研究科 細胞構造学講座
 助教授
 〒630-0101 生駒市高山町 8916-5
 Tel : 0743-72-5411
 Fax : 0743-72-5419
 E-mail : imaizumi@bs.aist-nara.ac.jp

上田 卓也 (うえだ たくや)
 東京大学 大学院新領域創成科学研究科
 先端生命科学専攻 教授
 〒277-8562 柏市柏の葉 5-1-5
 Tel : 0471-36-3641
 Fax : 0471-36-3642
 E-mail : ueda@kwl.t.u-tokyo.ac.jp

内海 利男 (うちうみ としお)
 信州大学 繊維学部
 高分子工業研究施設 助教授
 〒386-8567 長野県上田市常田 3-15-1
 Tel : 0268-21-5575
 Fax : 0268-21-5571
 E-mail : uchiumi@giptc.shinshu-u.ac.jp

遠藤 仁司 (えんどう ひとし)
 自治医科大学 医学部
 生化学教室 講師
 〒329-0498 栃木県河内郡南河内町薬師寺
 3311-1
 Tel : 0285-58-7322
 Fax : 0285-44-1827
 E-mail : hendo@jichi.ac.jp

太田 成男 (おおた しげお)
 日本医科大学 老人病研究所
 生化学部門 教授
 〒211-8533 神奈川県川崎市中原区小杉町
 1-396
 Tel : 044-733-9267
 Fax : 044-733-9268
 E-mail : ohta@nms.ac.jp

大野 睦人 (おおの むつひと)
 京都大学 ウイルス研究所
 遺伝子動態研究部門 情報高分子化学研究分野 教授
 〒 606-8507 京都市左京区聖護院川原町 53
 Tel : 075-751-4018
 Fax : 075-751-3992
 E-mail : hitoohno@virus.kyoto-u.ac.jp

岡田 典弘 (おかだ のりひろ)
 東京工業大学 大学院生命理工学研究科
 生体システム専攻 教授
 〒 226-8501 横浜市緑区長津田町 4259
 Tel : 045-924-5742
 Fax : 045-924-5835
 E-mail : nokada@bio.titech.ac.jp

岡野 栄之 (おかの ひでゆき)
 慶応義塾大学 医学部
 生理学教室 教授
 〒 160-8582 東京都新宿区信濃町 35
 Tel : 03-5363-3747
 Fax : 03-3357-5445
 E-mail : hidokano@sc.itc.keio.ac.jp

尾之内 均 (おのうち ひとし)
 北海道大学 大学院農学研究科
 応用生命科学専攻 応用分子生物学講座 助手
 〒 060-8589 札幌市北区北 9 条西 9 丁目
 Tel : 011-706-3888
 Fax : 011-706-4932
 E-mail : onouchi@abs.agr.hokudai.ac.jp

(か)

影山 裕二 (かげやま ゆうじ)
 奈良先端科学技術大学院大学
 バイオサイエンス研究科 助手
 〒 630-0101 奈良県生駒市高山町 8916-5
 Tel : 0743-72-5552
 Fax : 0743-72-5559
 E-mail : kageyama@bs.aist-nara.ac.jp

柏原 真一 (かしわばら しんいち)
 筑波大学 応用生物化学系 助手
 〒 305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1
 Tel : 0298-53-6270
 Fax : 0298-53-6270
 E-mail : kashiwa@sakura.cc.tsukuba.ac.jp

片平 じゅん (かたひら じゅん)
 大阪大学 大学院生命機能研究科
 細胞ネットワーク講座 助手
 〒 565-0871 吹田市山田丘 2-2
 Tel : 06-6879-3211
 Fax : 06-6879-3219
 E-mail : katahira@anat3.med.osaka-u.ac.jp

片平 正人 (かたひら まさと)
 横浜国立大学 大学院環境情報研究院
 自然環境と情報部門 助教授
 〒 240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台 79-5
 Tel : 045-339-4264
 Fax : 045-339-4264
 E-mail : masakata@ynu.ac.jp

河合 剛太 (かわい ごうた)
 千葉工業大学 工学部 工業化学科 助教授
 〒 275-0016 千葉県習志野市津田沼 2-17-1
 Tel : 047-478-0425
 Fax : 047-478-0425
 E-mail : gkawai@ic.it-chiba.ac.jp

木下 和生 (きのした かずお)
 京都大学 医学研究科
 分子生物学 助手
 〒 606-8501 京都市左京区吉田近衛
 Tel : 075-753-4377
 Fax : 075-753-4388
 E-mail : kkinoshi@mfour.med.kyoto-u.ac.jp

木俣 行雄 (きまた ゆきお)
 奈良先端科学技術大学院大学
 遺伝子教育研究センター 動物細胞工学 助手
 〒 630-0101 生駒市高山町 8916-5
 Tel : 0743-72-5643
 Fax : 0743-72-5649
 E-mail : kimata@bs.aist-nara.ac.jp

京極 好正 (きょうごく よしまさ)
 産業技術総合研究所
 生物情報解析研究センター センター長
 〒 135-0064 東京都江東区青海 2-41-6
 臨海副都心センター
 Tel : 03-3599-8106
 Fax : 03-5530-2064
 E-mail : y.kyogoku@aist.go.jp

栗原 靖之 (くりはら やすゆき)
 横浜国立大学 大学院環境情報研究院
 自然環境と情報研究部門 助手
 〒 240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台 79
 Tel : 045-339-4263
 Fax : 045-339-4263
 E-mail : kurihara@mac.bio.bsk.ynu.ac.jp

剣持 直哉 (けんもち なおや)
 宮崎医科大学
 医学部付属実験実習機器センター 助教授
 〒 889-1692 宮崎県清武町木原 5200
 Tel : 0985-85-9665
 Fax : 0985-85-1514
 E-mail : kenmochi@post.miyazaki-med.ac.jp

小池 英明 (こいけ ひであき)
 産業技術総合研究所 脳神経情報研究部門
 DNA 情報科学研究グループ 研究員
 〒 305-8566 つくば市東 1-1-1
 Tel : 0298-61-6679
 Fax : 0298-61-6534
 E-mail : hi-koike@aist.go.jp

神津 知子 (こうづ ともこ)
 埼玉県立がんセンター
 研究室・がん治療研究担当 主任研究員
 〒 362-0806 埼玉県北足立郡伊奈町小室 818
 Tel : 048-722-1111(ex.4651)
 Fax : 048-722-1739
 E-mail : kozu@cancer-c.pref.saitama.jp

小林 剛 (こばやし たけし)
 大阪大学 微生物病研究所
 ウイルス免疫分野 助手
 〒 565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-1
 Tel : 06-6879-8309
 Fax : 06-6879-8310
 E-mail : koba@biken.osaka-u.ac.jp

坂口 末廣 (さかぐち すえひろ)
 長崎大学 大学院医学研究科
 感染分子病態学 講師
 〒 852-8523 長崎市坂本 1-12-4
 Tel : 095-849-7059
 Fax : 095-849-7060
 E-mail : suehiros-ngs@umin.u-tokyo.ac.jp

(さ)

坂本 博 (さかもと ひろし)
 神戸大学 理学部 生物学科 教授
 〒 657-8501 神戸市灘区六甲台町 1-1
 Tel : 078-803-5796
 Fax : 078-803-5720
 E-mail : hsaka@kobe-u.ac.jp

佐藤 充治 (さとう みつはる)
 東京大学 医科学研究所
 ヒト疾患モデル研究センター 助手
 〒 108-8639 東京都港区白金台 4-6-1
 Tel : 03-5449-5753/5754
 Fax : 03-5449-5455
 E-mail : mitsus@ims.u-tokyo.ac.jp

椎名 伸之 (しいな のぶゆき)
 国立遺伝学研究所 構造遺伝学研究センター
 生体高分子研究室 助手
 〒 411-8540 静岡県三島市谷田 1111
 Tel : 0559-81-6864
 Fax : 0559-81-6865
 E-mail : nshiina@lab.nig.ac.jp

塩見 春彦 (しおみ はるひこ)
 徳島大学 ゲノム機能研究センター
 分子機能解析分野 教授
 〒 770-8503 徳島市蔵本町 3-18-15
 Tel : 088-633-9450
 Fax : 088-633-9451
 E-mail : siomi@genome.tokushima-u.ac.jp

塩見 美喜子 (しおみ みきこ)
 徳島大学 ゲノム機能研究センター
 分子機能解析分野 助教授
 〒 770-8503 徳島市蔵本町 3-18-15
 Tel : 088-633-9490
 Fax : 088-633-9451
 E-mail : siomim@genome.tokushima-u.ac.jp

嶋本 伸雄 (しまもと のぶお)
 国立遺伝学研究所 構造遺伝学研究センター
 教授
 〒 411-8540 三島市谷田 1111
 Tel : 0559-81-6843
 Fax : 0559-81-6844
 E-mail : nshima@lab.nig.ac.jp

志村 令郎 (しむら よしろう)
 日本学術振興会ストックホルム研究連絡
 センター 所長
 S-171 77 Stockholm, Sweden
 Tel : 08-5088-4561
 Fax : 08-31-38-86
 E-mail : y-shimura@jpsps-sto.com

杉浦 麗子 (すぎうら れいこ)
 神戸大学 大学院医学系研究科
 ゲノム科学講座 助教授
 〒 650-0017 神戸市中央区楠町 7-5-1
 Tel : 078-382-5441
 Fax : 078-382-5459
 E-mail : sugiurar@med.kobe-u.ac.jp

鈴木 勉 (すずき つとむ)
 東京大学 大学院新領域創成科学研究科
 先端生命科学専攻 講師
 〒 277-8562 千葉県柏市柏の葉 5-1-5
 Tel : 0471-36-5401
 Fax : 0471-36-3602
 E-mail : t-suzuki@k.u-tokyo.ac.jp

善野 修平 (ぜんの しゅうへい)
 東京大学 大学院理学系研究科
 生物化学専攻 助手
 〒 113-0032 東京都文京区弥生 2-11-16
 Tel : 03-5841-4404
 Fax : 03-5841-4400
 E-mail : zenno@biochem.s.u-tokyo.ac.jp

(た)

多比良 和誠 (たいら かずなり)
 東京大学 大学院工学系研究科
 化学生命工学専攻 教授
 〒 113-8656 東京都文京区本郷 7-3-1
 Tel : 03-5841-8828
 Fax : 03-5841-8828
 E-mail : taira@chembio.t.u-tokyo.ac.jp

竹中 章郎 (たけなか あきお)
 東京工業大学 大学院生命理工学研究科
 分子生命科学専攻 助教授
 〒 226-8501 横浜市緑区長津田町 4259
 Tel : 045-924-5709
 Fax : 045-924-5748
 E-mail : atakenak@bio.titech.ac.jp

多田隈 尚史 (ただくま ひさし)
 早稲田大学 理工学部 物理学科 助手
 〒 169-8555 新宿区大久保 3-4-1
 Tel : 03-5286-3863
 Fax : 03-5286-3863
 E-mail : tadakuma@aoni.waseda.jp

谷 時雄 (たに ときお)
 熊本大学 理学部 生物科学科
 生体機能学講座 教授
 〒 860-8555 熊本市黒髪 2-39-1
 Tel : 096-342-3461
 Fax : 096-342-3461
 E-mail : ttani@sci.kumamoto-u.ac.jp

谷口 維紹 (たにくち ただつぐ)
 東京大学 大学院医学系研究科
 免疫学講座 教授
 〒 113-0033 文京区本郷 7-3-1
 Tel : 03-5841-3375
 Fax : 03-5841-3450
 E-mail : tada@m.u-tokyo.ac.jp

程 久美子 (てい くみこ)
 東京大学 理学部 生物化学専攻
 生物情報科学学部教育特別プログラム
 特任助教授
 〒 113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1
 Tel : 03-5841-3044
 Fax : 03-5841-3044
 E-mail : ktei@biochem.s.u-tokyo.ac.jp

(な)

中村 輝 (なかむら あきら)
 筑波大学生物科学系 遺伝子実験センター
 講師
 〒 305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1
 Tel : 0298-53-6420
 Fax : 0298-53-7723
 E-mail : akiran@sakura.cc.tsukuba.ac.jp

中村 義一 (なかむら よしかず)
 東京大学 医科学研究所
 基礎医科学部門遺伝子動態分野 教授
 〒 108-8639 東京都港区白金台 4-6-1
 Tel : 03-5449-5307
 Fax : 03-5449-5415
 E-mail : nak@ims.u-tokyo.ac.jp

野島 博 (のじま ひろし)
 大阪大学 微生物病研究所
 難治疾患バイオ分析部門 教授
 〒 565-0871 吹田市山田丘 3-1
 Tel : 06-6875-3980
 Fax : 06-6875-5192
 E-mail : hnojima@biken.osaka-u.ac.jp

野本 明男 (のもと あきお)
 東京大学 大学院医学系研究科
 病因・病理学専攻微生物学講座 教授
 〒 113-0033 文京区本郷 7-3-1
 Tel : 03-5841-3407
 Fax : 03-5841-3374
 E-mail : anomoto@m.u-tokyo.ac.jp

(は)

萩原 正敏 (はぎわら まさとし)
 東京医科歯科大学 難治疾患研究所
 形質発現分野 教授
 〒 113-0034 東京都文京区湯島 1-5-45
 Tel : 03-5803-5836
 Fax : 03-5803-5836
 E-mail : m.hagiwara.end@mri.tmd.ac.jp

林 純一 (はやし じゅんいち)
 筑波大学 生物科学系 教授
 〒 305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1
 Tel : 0298-53-6650/7271(直通)
 Fax : 0298-53-6614
 E-mail : jih45@sakura.cc.tsukuba.ac.jp

姫野 俵太 (ひめの ひょうた)
 弘前大学 農学生命科学部
 応用生命工学科 助教授
 〒 036-8561 弘前市文京町 3
 Tel : 0172-39-3592
 Fax : 0172-39-3593
 E-mail : himeno@cc.hirosaki-u.ac.jp

平岡 泰 (ひらおか やすし)
 通信総合研究所 関西先端研究センター
 生物情報グループ グループリーダー
 〒 651-2492 神戸市西区岩岡町岩岡 588-2
 Tel : 078-969-2240
 Fax : 078-969-2249
 E-mail : yasushi@crl.go.jp

星野 真一 (ほしの しんいち)
 東京大学 大学院薬学系研究科
 生理化学教室 講師
 〒 113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1
 Tel : 03-5841-4754
 Fax : 03-5841-4751
 E-mail : hoshino@mol.f.u-tokyo.ac.jp

堀田 凱樹 (ほった よしき)
 国立遺伝学研究所 所長
 〒 411-8540 三島市谷田 1111
 Tel : 0559-81-6700
 Fax : 0559-81-6701
 E-mail : yhotta@lab.nig.ac.jp

(ま)

正木 春彦 (まさき はるひこ)
 東京大学 大学院農学生命科学研究科
 応用生命工学専攻 分子育種学研究室
 教授
 〒 113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1
 Tel : 03-5841-8248
 Fax : 03-5840-8248
 E-mail : hmasaki@mcb.bt.a.u-tokyo.ac.jp

松野 健治 (まつの けんじ)
 東京理科大学 基礎工学部
 生物工学科 助教授
 〒 278-8510 千葉県野田市山崎 2641
 Tel : 04-7124-1501 (ex.4401)
 Fax : 04-7125-1841
 E-mail : matsuno@rs.noda.sut.ac.jp

松藤 千弥 (まつふじ せんや)
 東京慈恵会医科大学 医学部
 生化学講座第二 教授
 〒 105-8461 東京都港区西新橋 3-25-8
 Tel : 03-3433-1111(ex.2276)
 Fax : 03-3436-3897
 E-mail : senya@jikei.ac.jp

水本 清久 (みずもと きよひさ)
 北里大学 薬学部 生化学教室 教授
 〒 108-8641 東京都港区白金 5-9-1
 Tel : 03-5791-6245
 Fax : 03-3444-6198
 E-mail : mizumotok@pharm.kitasato-u.ac.jp

三森 経世 (みもり つねよ)
 京都大学 大学院医学研究科
 臨床生体統御医学講座 教授
 〒 606-8507 京都市左京区聖護院川原町 54
 Tel : 075-751-4379
 Fax : 075-751-4338
 E-mail : mimorit@kuhp.kyoto-u.ac.jp

武藤 あきら (むとう あきら)
 弘前大学 農学生命科学部
 応用生命工学科 教授
 〒 036-8561 弘前市文京町 3
 Tel : 0172-39-3592
 Fax : 0172-39-3593
 E-mail : muto@cc.hirosaki-u.ac.jp

飯 哲夫 (めし てつお)
 京都大学 大学院理学研究科
 植物学教室 助教授
 〒 606-8502 京都市左京区北白川追分町
 Tel : 075-753-4136/4140
 Fax : 075-753-4141
 E-mail : tmeshi@gr.bot.kyoto-u.ac.jp

森 茂郎 (もり しげお)
 東京大学 医科学研究所
 人癌病遺伝子分野 教授
 〒 108-8639 東京都港区白金台 4-6-1
 Tel : 03-5449-5299
 Fax : 03-5449-5418
 E-mail : mori@ims.u-tokyo.ac.jp

森 泰丈 (もり やすたけ)
 大阪大学 大学院医学系研究科
 ポストゲノム疾患解析学講座 助手
 〒 565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2
 Tel : 06-6879-3221
 Fax : 06-6879-3229
 E-mail : mori@anat2.med.osaka-u.ac.jp

森井 孝 (もりい たかし)
 京都大学 エネルギー理工学研究科
 生体エネルギー研究分野 助手
 〒 611-0011 宇治市五ヶ庄
 Tel : 0774-38-3585
 Fax : 0774-38-3524
 E-mail : t-morii@iae.kyoto-u.ac.jp

(や)

山中 伸弥 (やまなか しんや)
 奈良先端科学技術大学院大学
 遺伝子教育研究センター 動物分子工学
 部門 助教授
 〒 630-0101 奈良県生駒市高山町 8916-5
 Tel : 0743-72-5591
 Fax : 0743-72-5599
 E-mail : shinyay@gtc.aist-nara.ac.jp

横山 茂之 (よこやま しげゆき)
 東京大学 大学院理学系研究科
 生物化学専攻 教授
 〒 113-0032 東京都文京区弥生 2-11-16
 Tel : 03-5841-4392
 Fax : 03-5841-8057
 E-mail : yokoyama@biochem.s.u-tokyo.ac.jp

吉久 徹 (よしひさ とおる)
 名古屋大学 物質科学国際研究センター
 助教授
 〒 464-8602 名古屋市千種区不老町
 Tel : 052-789-2950
 Fax : 052-789-2947
 E-mail : tyoshihi@biochem.chem.nagoya-u.ac.jp

(わ)

和田 明 (わだ あきら)
 大阪医科大学 医学部 物理学教室 助教授
 〒 569-0084 大阪府高槻市沢良木町 2-41
 Tel : 0726-75-6905
 Fax : 0726-74-6033
 E-mail : phy003@art.osaka-med.ac.jp

渡辺 公綱 (わたなべ きみつな)
 東京大学 大学院新領域創成科学研究科
 先端生命科学専攻 教授
 〒 277-8562 柏市柏の葉 5-1-5
 Tel : 0471-36-3601
 Fax : 0471-36-3600
 E-mail : kw@kwl.t.u-tokyo.ac.jp

渡辺 雄一郎 (わたなべ ゆういちろう)
 東京大学 大学院総合文化研究科
 生命環境科学系 助教授
 〒 153-8902 東京都目黒区駒場 3-8-1
 Tel : 03-5454-6776
 Fax : 03-5454-6776
 E-mail : solan@bio.c.u-tokyo.ac.jp

渡邊 洋一 (わたなべ よういち)
 東京大学 大学院医学系研究科
 国際保健学専攻 生物医化学教室 講師
 〒 113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1
 Tel : 03-5841-3528
 Fax : 03-5841-3444
 E-mail : ywatanab@m.u-tokyo.ac.jp

渡辺 嘉典 (わたなべ よしのり)
 東京大学 大学院理学系研究科
 生物化学専攻 助教授
 〒 113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1
 Tel : 03-5841-4387
 Fax : 03-5802-2042
 E-mail : ywatanab@ims.u-tokyo.ac.jp

編集後記

特定領域研究「RNA 情報発現系の時空間ネットワーク」が昨年発足し、今年から公募班員を加えて本格的に活動を始めるにあたり、領域ニュースを出すことになりました。私とその編集人を任されることになりました。Alberts の MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL 初版序文に以下の文章が出てきます。

It has been a long time in gestation - three times longer than an elephant, five times longer than a whale.

これほど時間をかけることはできませんが、私が目指している編集スタイルは、一般の人にも理解でき、しかも「読み物」として楽しめるもの、より個人的な思いやスタイルが全面にでてくるものです。また、もちろん、多くの人が「面白かった、次号が楽しみである」と思ってくれるものを作りたいと望んでいます。さらに、「考えるきっかけ」になるような素材を提供したいという思いを持って編集しています。掲載されたエッセイ・総説等に関してコメント、批判、疑問等があれば、letter to editor を歓迎します。次号以降の編集の参考にさせていただきます。また、重要な問題提起がある場合は、「letter to editor」という項を作り、掲載することも考えています。

RNA Network Newsletter

第1巻第1号（2002年7月発行）

編集人 塩見春彦

発行人 中村義一

発行所 特定領域研究

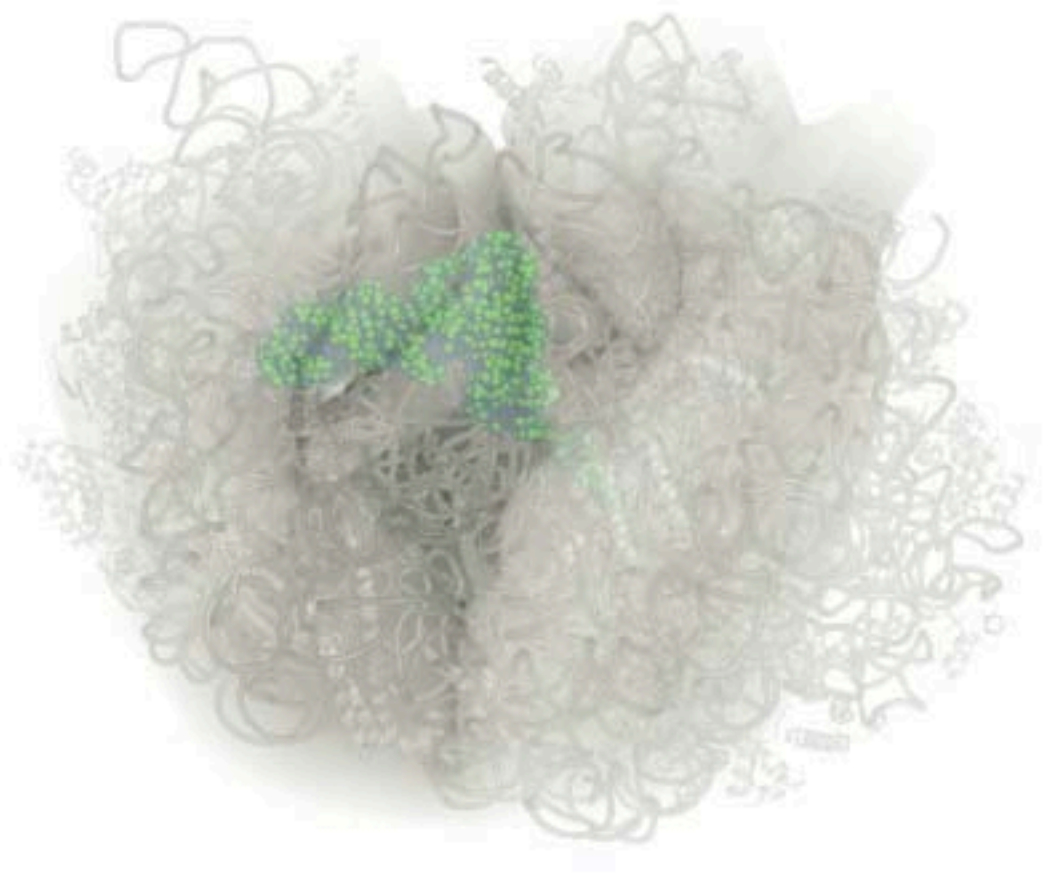
「RNA 情報発現系の時空間ネットワーク」広報担当
塩見春彦

徳島大学ゲノム機能研究センター

〒770-8503 徳島市蔵本町 3-18-15

Tel: 088-633-9450 Fax: 088-633-9451

e-mail: siomi@genome.tokushima-u.ac.jp



RNA NETWORK

2001 ···· 2006



文部科学省科学研究費特定領域研究 RNA情報発現系の時空間ネットワーク

Spatiotemporal Network of RNA Information Flow