独立行政法人科学技術振興機構

創造科学技術推進事業
追跡評価用資料
（追跡調査報告書）

堀越ジーンセレクタープロジェクト
（1997～2002）
総括責任者　堀越　正美

目　次

1. はじめに 1
2. 研究の発展と展開図 3
3. プロジェクトの研究成果と継続・発展の状況 4
3.1. プロジェクト期間の成果 4
3.1.1. プロジェクト期間の成果 4
3.2. プロジェクト終了後の継続と発展の状況 8
3.2.1. プロジェクト後の研究のねらいとテーマ 8
4. 研究成果から生み出された科学技術的、社会的、経済的な効果・効用及び波及効果について 11
4.1. 科学技術の進歩に貢献する成果 11
4.1.1. 学術上での新発見と発明 11
4.1.2. 新理論・概念の構築 11
4.1.3. 新領域・潮流の創出 12
4.2. 社会的、経済的な効果・効用及び波及効果 12
4.2.1. プロジェクト成果から期待される技術革新・イノベーション 12
4.2.2. 当該分野における研究の拡大（キーワード検索の結果） 13
5. 参考資料 18
5.1. プロジェクトで発表し確定された論文、およびその後プロジェクトのテーマに関連して発表された全論文リスト 18
5.2. プロジェクトに関連して出願された特許リスト 18

1.　はじめに

「ジーンセレクター」とは、真核細胞においてどの遺伝情報をどの時期に読み取るのかという、細胞機能にとって最も重要な選択(即ち「ジーンセレクション」)の過程に関与する蛋白質群、という意味で、プロジェクト参加前にプロジェクトメンバーと討議の結果、総括責任者によって作出された用語である。このプロジェクト名が端的に示すように、堀越プロジェクトは、出芽酵母を研究材料として、真核細胞のゲノム DNA の転写制御に関与する蛋白質分子の単離と構造的側面に重点をおいた機能解析を行うとともに、それらが細胞機能の維持/変換に果す役割の解明をめざした。

1944 年に Avery(米国)により DNA が遺伝子であることが証明され[1]、1953 年に Watson(米国)と Crick(英国)により DNA の二重らせん構造が解明[2]されて以降、生命科学の研究が飛躍的に進歩した。こうした研究の重要な流れとして、まずそのもととなる遺伝子の構造(DNA の設計図)を解読しておくことが様々な生命科学の研究を進める上で重要であるとの考えのもとに、ゲノム DNA の全てを解読するゲノム解析プロジェクトが世界規模で進められた。そして 1996 年に、出芽酵母のゲノムの全塩基配列が真核生物として初めて、米欧日によって組織された国際チームから発表された[3]。ヒトのゲノムの全塩基配列を解析するヒトゲノム計画は 2003 年に完了した。2000 年に Allis(米国)らにより“ヒストンコード”仮説が提唱され[4]、真核生物におけるゲノム機能発現においてヒストンの修飾が重要であることが明らかになった。以降、さまざまなヒストン修飾を行なう酵素と、その修飾された配列に特異的に結合する因子が次々と同定・解析され、今日では、「ヒストンコード」は DNA に次ぐ第 2 の遺伝子コードとなるか[5]と言われている。

真核細胞のゲノム DNA は、ヒストン蛋白質に巻きついたヌクレオソーム構造を基本骨格とするクロマチン構造を形成しており、染色体上の領域依存的に遺伝子発現が調節されている。遺伝子発現が抑えられている領域の転写が起きるには、(1)ヌクレオソーム構造を変換させ、(2)次に転写開始複合体をプロモーター上に形成させる、といったように 2 段階の反応によって、不活性な状態の DNA が正に活性化されることが必要である。1960 年代にヒストンの N 末端領域へのアセチル化が遺伝子発現の活性をコントロールすることが示され、

[1] Avery ら, J Exp Med, 79, 137-158, 1944
[2] Watson ら, Nature, 171, 737-738, 1953
[3] Goffeau ら, Science, 25, 546-567, 1996
[4] Strahl ら, Nature, 403, 41-45, 2000
[5] 網代ら, 蛋白質 核酸 酵素, 47, 753-760, 2002

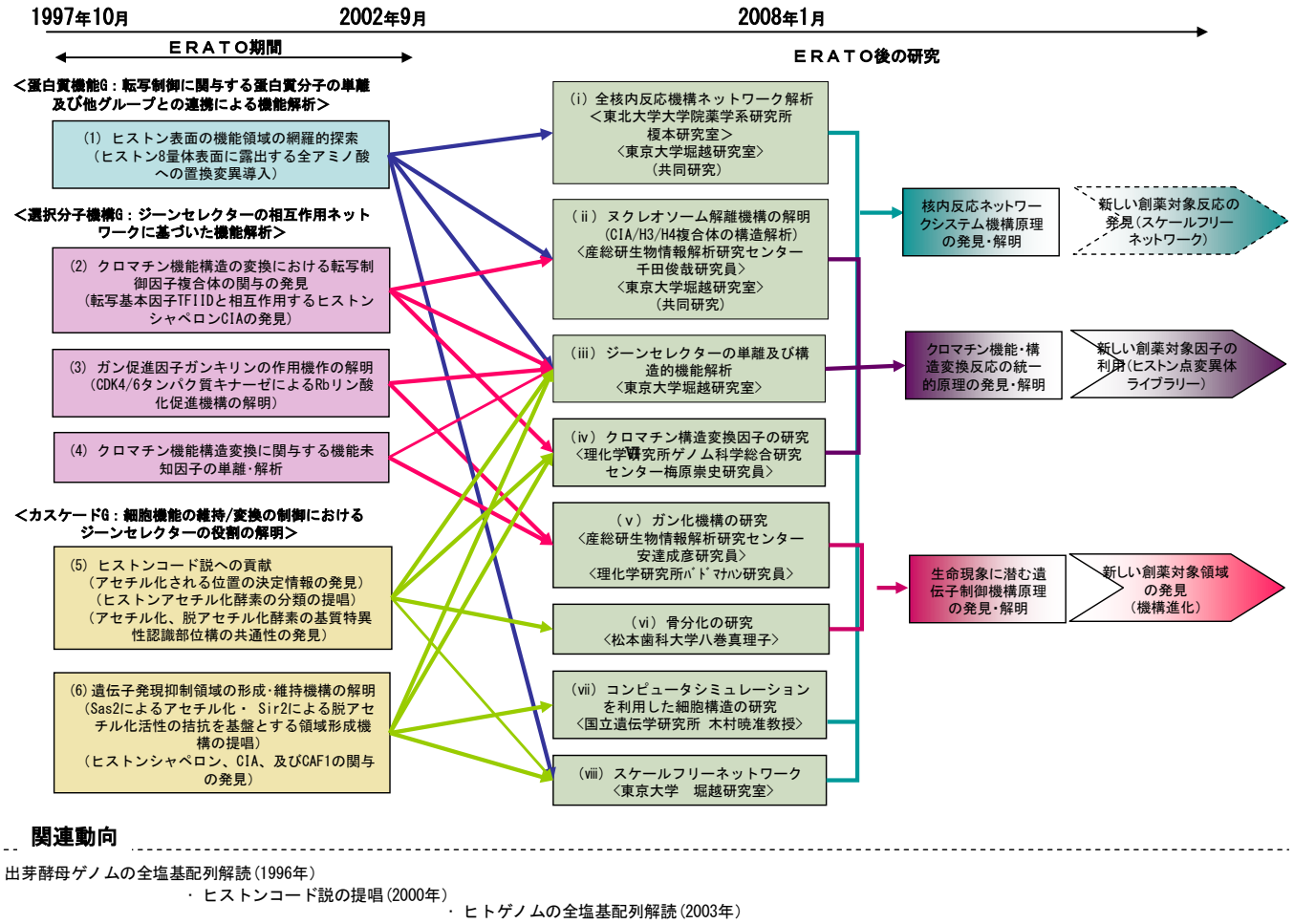
1970 年代にヒストンと DNA からヌクレオソーム構造を形成させる因子としてヒストンシャペロンが単離されていたが、その後は、総括責任者が東京大学で研究室を立ち上げた 1990 年代初めまで、ヒストン、ヌクレオソーム、ヒストンシャペロンという実態、及びヒストンへの化学修飾といった反応以外には、特に見るべき知見のない時期が続いた[6]。

プロジェクトがスタートした 1997 年は、領域特異性を規定して転写の活性化や不活性化を制御する「染色体上の目印」が何なのか、また、その「目印」が働くメカニズムがどのようなものなのかについての研究が、世界中で活発化し始めていた時期であった。そしてプロジェクト期間中には、上述したとおり、Allis により化学修飾によるヒストンコード説が発表され、「染色体上の目印」として、DNA 側ではメチル化修飾、ヒストン側ではアセチル化、メチル化、リン酸化等の修飾の研究が世界規模で活発化し、後者は「全ヒストンコードの解読」の研究として今日に至っている。

本プロジェクトはこのような背景の中でスタートしたが、特筆すべきは、細胞の分裂、ガン化、及びアポトーシスといった種々の細胞機能の視点を持って、ジーンセレクターの構造学的機能研究がスタートされたことである。

[6] 堀越，構造生物，8，2-18，2002

2.　研究の発展と展開図



テーマ番号(1)～(6)は、「3.1.1.プロジェクト期間の成果」の項目番号に対応する。

3.　プロジェクトの研究成果と継続・発展の状況

3.1.　プロジェクト期間の成果

3.1.1. プロジェクト期間の成果

本プロジェクトのねらいは、クロマチン・染色体構造をとっている遺伝子 DNA のある特定領域を選択し、遺伝情報の発現(転写)を制御する分子及び分子群を同定してその作用及び反応機構を解明するとともに、それらの時間的・空間的に制御された相互作用の結果としての、細胞増殖、細胞死、分化、ガン化などの高次生物現象を理解しようとするものであった。この目的を遂行するために、クロマチン状態を規定するもっとも重要な因子の一つであるヒストンの化学修飾、ヒストン複合体の立体構造変換機構、クロマチンの転写活性領域の制御機構の解明を中心的なテーマとして、各研究者の得意分野と技術を最大限に生かしつつ研究プロジェクトが遂行された。具体的な研究テーマをその内容によって分類し、プロジェクト期間内に達成された成果をテーマごとに以下に記述する。

(1) ヒストン表面の機能領域の網羅的探索[7]

ヒストン 8 量体とそれに巻き付いた DNA からなるヌクレオソームを基本構造とするクロマチンの転写活性制御の理解のために、アラニン・スキャニングとよばれる手法を用いて、ヒストン 8 量体表面に露出することが判明しているアミノ酸残基のすべてに置換変異を導入し、その変異が転写、DNA 複製、修復などの生物学的機能に与える影響を調べた。

その結果、まず、細胞が生きていくために必須のアミノ酸残基を明らかにした。更に、ヒストン表面の限られた領域と転写伸長反応の間には強い関係があり、この領域のアミノ酸残基が RNA ポリメラーゼとの相互作用に重要な役割を果たしている可能性があることを示した。

この研究成果は、諸事情から、プロジェクト終了から数年の時間が経過した時点で論文として発表されたが、本研究はプロジェクト期間内に終了したことが当該プロジェクト関係者より確認されており、ERATO の研究成果であるといえる。

この研究は、テーマ(6)「遺伝子発現抑制領域の形成・維持機構の解明」の研究にヒストン突然変異株を供給するという重要な役割をも果たした。作製された変異体コレクションは、外部有識者によると、他研究者の今後の研究に役立つものであり、貴重である。

この研究については、日本特許[8]が成立している。クロマチンをターゲットとする薬剤開発の可能性を示す結果も得られた(4.2.1.(1)参照)。

---

[7] 論文リスト 47

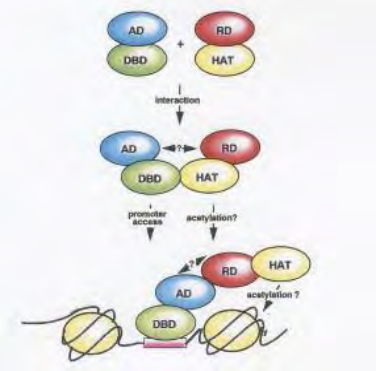
[8] 特許リスト 1、3、9、10、11、12、13、及び 14

(2) クロマチン機能構造の変換における転写制御因子複合体の関与の発見[9]

本テーマに属する主要論文の研究内容を以下に記述する。

DNA 結合性転写調節因子は、その基本的機能を果たすための DNA 結合ドメインと転写活性化ドメインを有しているが、本テーマでは、DNA 結合ドメインには、DNA との結合機能以外にも別の蛋白質との相互作用を介した新たな機能があるとの仮説に基づいて研究が進められた。その結果、DNA 結合性転写調節因子 Sp1 の DNA 結合ドメインは、ヒストンアセチル化酵素(以下、HAT)p300 の HAT ドメインと *in vitro* 及び *in vivo* で結合することを見いだした。Sp1 が DNA に結合すると p300 の HAT ドメインは解離していることから、Sp1 の DNA 結合ドメインは、HAT との協調的相互作用によって、その DNA 結合を促進させるという新たなモデル((図 2)参照) を提唱した[10]。

さらに、Sp1 の DNA 結合ドメインと相互作用する未知因子の検索を行い、TAF-1(ヒストンの C 末端と相互作用してクロマチンの構造変換に関与するヒストンシャペロン)が当該ドメインと結合すること、そして TAF-1 は Sp1 の DNA 結合ドメインの DNA 結合活性を抑制することを見いだした。ヒストンの N 末端領域と相互作用する HAT である p300 が Sp1 の DNA 結合活性と転写活性を促進させるのに対して、ヒストンの C 末端領域と相互作用する TAF-1 は両活性を抑制することを示し、クロマチン機能構造の変換における転写制御因子複合体の関与の研究に新たな局面を開いた[11]。



AD：活性ドメイン
DBD：DNA 結合ドメイン
RD：制御ドメイン
HAT：HAT ドメイン

作業仮説

堀越プロジェクト成果報告書より

図 1

JDP2(転写抑制因子で、転写因子複合体 AP-1 の成分)は、ヒストン脱アセチル化酵素 3 と結合し、c-jun(細胞分化に関わる遺伝子)のプロモーター領域に結合してその転写を抑制す

[9] 論文リスト 1、論文リスト 7、論文リスト 8、論文リスト 9、論文リスト 10、論文リスト 13、論文リスト 14、論文リスト 17、論文リスト 18、論文リスト 21、論文リスト 25、論文リスト 31
[10] 論文リスト 7
[11] 論文リスト 25

ること、さらにレチノイン酸による c-jun 遺伝子の転写誘導後は、HAT を含む複合体により置換されてプロモーター領域から解離することを示し、遺伝子転写制御の 1 つのメカニズムを明らかにした[12]。

酵母のヒストンシャペロン ASF1/CIA1 欠損株において、アポトーシス様細胞死(核の断片化及びミトコンドリア膜の電位差低下)が認められることを見いだし、ヒストンシャペロンがアポトーシスに関連する可能性を示した[13]。このアポトーシスに関する研究については日本特許[14]が成立している。

(3) ガン促進因子ガンキリンの作用機作の解明[15]

ガン抑制因子 Rb のサイクリン依存性キナーゼ(以下、CDK)によるリン酸化は、細胞分裂促進のキーステップである。

アンキリンリピート蛋白質であるガン促進因子ガンキリンは、Rb、CDK に結合して Rb のリン酸化を促進するが、その機構は不明であった。本テーマでは Nas6p(ガンキリンの出芽酵母ホモログ)の立体構造を解析し、特徴的な湾曲構造をもつことを明らかにした。そして、ガンキリン N 末端領域と CDK、ガンキリン C 末端領域と Rb が結合するという知見に基づき、CDK による Rb のリン酸化は、湾曲したガンキリンの同一側面での相互作用を介して促進されるという分子モデルを提唱した。本研究は、細胞増殖活性を制御するドメイン、モチーフの同定と、それらに拮抗的に働く化合物の分子設計に有意義な知見を提供した。

(4) クロマチン機能構造変換に関与する機能未知因子の単離・解析[16]

本テーマに属する主要論文の研究内容を以下に記述する。

Tip60 等に含まれる、MYST ドメインと名付けた非常に保存性の高いドメインが、アセチル化の活性ドメインであることを発見した[17]。

MYST ドメインを持ちながらも *in vitro* で活性が見いだせなかったものについて、位置特異的突然変異を導入して *in vivo* でのアセチル化活性を調べることで酵母 Sas2 がアセチル化酵素であることを明らかにした[18]。

相互作用を調べる一般的な方法である two-hybrid 法を繰り返して用いることにより機能既知の蛋白質との関連を見いだした(ヒストンシャペロン CIA の発見)[19]。

---

[12] 論文リスト 17
[13] 論文リスト 13
[14] 特許リスト 6
[15] 論文リスト 16
[16] 論文リスト 3、論文リスト 4、論文リスト 5、論文リスト 6、論文リスト 7、論文リスト 8、論文リスト 11、論文リスト 12、論文リスト 15、論文リスト 19、論文リスト 22、論文リスト 23、論文リスト 31
[17] 論文リスト 4、論文リスト 22
[18] 論文リスト 22
[19] 論文リスト 8

蛋白質の立体構造と一次構造上の類似性から機能の類推を行い、CCG1 相互作用因子 CIB が加水分解酵素活性を持つことを明らかにした[20]。

(5) ヒストンコード説への貢献[21]

本テーマに属する主要論文の研究内容を以下に記述する。

ヒストンの化学修飾はいわゆるヒストンバリアントの産生とともにヒストンコード説の根幹をなす。ヒストン蛋白質の N 末端領域にあるリジン残基の特異的アセチル化は、そのなかの主要な化学修飾であるが、例えば、ヒストン H4 の N 末端から 16 番目のリジン(以下、H4K16)がどのアセチル化酵素によって、どのように認識されてアセチル化されるのかという問題、すなわち、基質認識の法則性は解明されていなかった。

このような背景の中で、本テーマは、アセチル化されるリジン残基の周辺のアミノ酸配列には規則性があり 6 つのタイプに分類できること、この分類に対応してアセチル化酵素もその基質特異性によって分類できることを発見し、ヒストンアセチル化の分類とヒストンアセチル化酵素の特異性に関するルールを提唱し、実証した[22]。

次項(6)で述べる酵母の Sas2 は、H4K16 のアセチル化を担う酵素であり、MYST ファミリーと本プロジェクトメンバーが名付けた一群の蛋白質に含まれる。MYST ファミリーに属する別の酵素 Esa1 と、それによってアセチル化されたヒストンからの脱アセチル化反応を触媒する Rpd3 の蛋白質構造を比較することにより、約 20 アミノ酸からなる相同性を示す配列が含まれることを見出した。ER モチーフと名付けたこの蛋白質部分は、リジンアセチル化の特異性を決める重要な構造モチーフであると考えられた。更にこれらの研究から、アセチル化と脱アセチル化を区別する機構を理解する知見を得た[23]。

(6) 遺伝子発現抑制領域の形成・維持機構の解明[24]

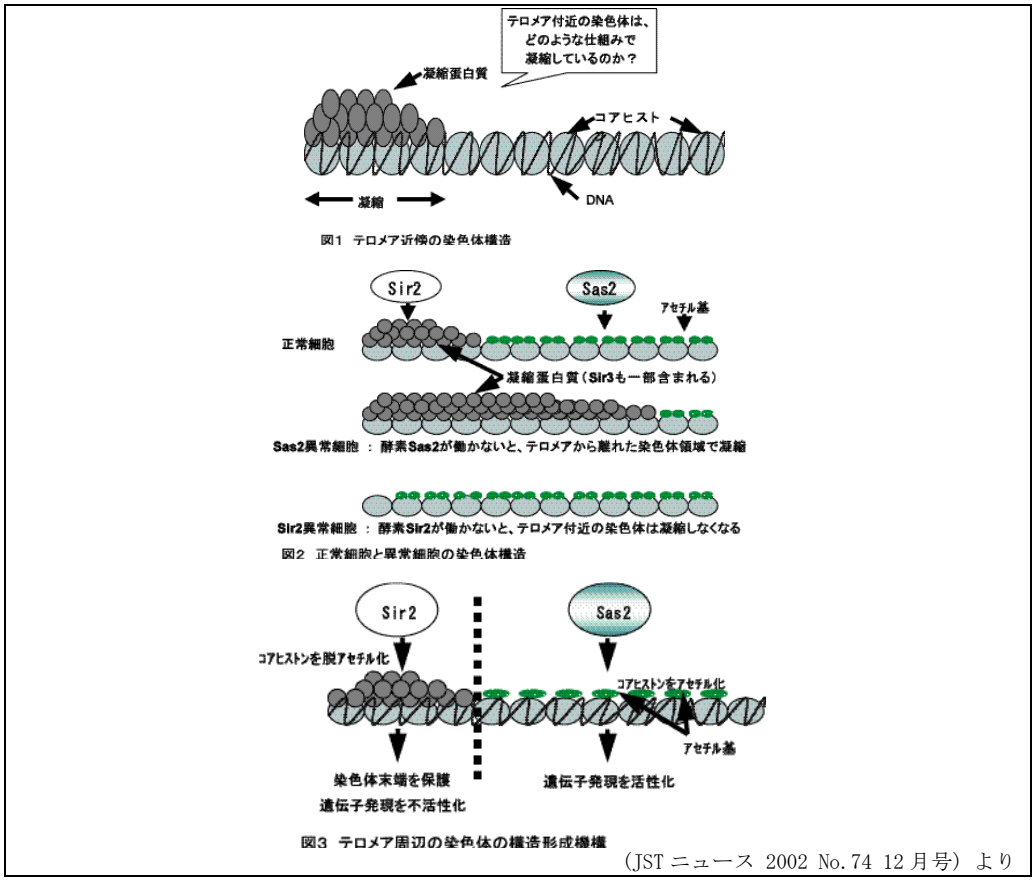
本テーマに属する主要論文の研究内容を以下に記述する。

真核生物のゲノム染色体には、クロマチンが凝縮し転写が不活性となっているヘテロクロマチン領域と、凝縮度が低いユークロマチン領域とが存在するが、本論文が発表された時点では、何がその境界を決定しているかについては不明であり、テロメアの凝縮に関わる蛋白質は数多く知られていたものの、その凝縮が他の領域に広がらないように区切る仕組みは分かっておらず、例えばインスレーダー(仕切り因子)の存在などが推察されていた。

このような背景の中で、MYST ファミリーに属する Sas2 アセチル化酵素がテロメア近傍のヒストン H4 のリジン 16 のアセチル化を担う酵素であることを、Sas2 欠損酵母を用いて明

[20] 論文リスト 11、論文リスト 12、論文リスト 31
[21] 論文リスト 2、論文リスト 4、論文リスト 7、論文リスト 20、論文リスト 22
[22] 論文リスト 2、論文リスト 4、論文リスト 22
[23] 論文リスト 20
[24] 論文リスト 8、論文リスト 10、論文リスト 14、論文リスト 18、論文リスト 21、論文リスト 22

らかにした。次いで、対応する脱アセチル化酵素である Sir2 を欠失する突然変異体を用いて、これら 2 つの酵素、即ち Sir2 と Sas2、の活性の勾配とそのバランスによってテロメア近傍の遺伝子発現抑制領域が形成されることを発見した。即ち、いわば寒流と暖流で潮目ができるように、出芽酵母のテロメア領域においては、ヒストンアセチル化酵素 Sas2 とヒストン脱アセチル化酵素 Sir2 による、アセチル化されたヒストンの密度勾配によりヘテロクロマチン化の境目ができるとの説を提示した(図 2 参照)。更に、ヒストンの C 末端領域と相互作用してヌクレオソームの形成と解離反応に関与するヒストンシャペロンの中の特定のもの(CIA、CAF-I)が、テロメア遺伝子発現抑制領域の形成に関与すること、さらにヒストンシャペロンとアセチル化・脱アセチル化系の間に相互作用があることも示した[25]。



（JST ニュース 2002 No.74 12 月号）より

図 2

3.2. プロジェクト終了後の継続と発展の状況

3.2.1.プロジェクト後の研究のねらいとテーマ

本プロジェクトの発足当初から研究のねらいはクロマチンの構造変換を基礎とした遺伝子発現の時間的・空間的制御機構を明らかにすることであった。プロジェクト終了後は、

[25] 論文リスト 22

プロジェクト期間中に新たに単離・同定されたクロマチン関連因子、あるいは新たに発見された分子相互作用を基盤としてプロジェクト発足時のねらいが継続され、いくつかの研究テーマとして研究は引き継がれ現在に至っている。具体的には、(研究の発展と展開図)の「ERATO 後の研究」に示したとおりである。2005 年～2007 年度には、総括責任者を研究代表者として、以下の研究課題名の科学研究費補助金を得ている(表 1)。

表 1　科学研究費補助金内訳

研究課題名	配分額(円)
ヌクレオソーム構造変換機構を介した染色体機能領域形成機構	(2007 年度)　14,560,000
遺伝子発現制御機構の解析を通した発ガン過程の解明	(2007 年度)　5,600,000 (2006 年度)　5,400,000
FK506 結合蛋白質(FKBP)のクロマチン構造変換活性の解析	(2005 年度)　3,400,000
ヌクレオソームを中心とした遺伝子情報発現制御機構の解明	(2005 年度)　4,200,000
立体構造特異性に基づくガン化制御機構の解析	(2005 年度)　11,200,000
ガンキリン・INK によるサイクリン依存性キナーゼ活性制御機構の解析	(2005 年度)　1,900,000 (2004 年度)　1,800,000

プロジェクト終了後の研究は、フローチャートに示したとおり、多くのテーマの研究がなされているが、プロジェクト終了後の 5 年間に発表された、ERATO 以降(以外)の論文は以下に示す 7 報である。

まず、Nakamura らの 3 論文[26]は、テーマ(ｖ)「ガン化機構の研究」に属するもので、ガンキリンのホモログと 26S プロテオソームの活性制御成分である ATP アーゼの相互作用を、構造的側面から明らかにしたものである。これらの成果は、26S プロテオソームによる、ガン抑制因子 Rb、及び p53 の分解の制御機構の理解に資するものとなるであろう。

次に Jin らの 2 論文[27]は、いずれも、テーマ(iii)「ジーンセレクターの単離及び構造的機能解析」及び(iv)「クロマチン構造変換因子の研究」の双方にまたがって属するもので、転写制御因子 JDP2 が p300(HAT)のアセチル化活性を阻害し、ヒストンシャペロンの活性を合わせて持つことを明らかにし、F9 細胞(マウス胚性腫瘍細胞)におけるレチノイン酸による発ガン遺伝子 c-jun の転写誘導に、アセチル化、脱アセチル化反応が関与することを示したものである。

次に Okuda ら(2007)の論文[28]は、テーマ(iii)「ジーンセレクターの単離及び構造的機能解析」に属するもので、酵母の chd1 蛋白質とそのヒトホモログを比較することにより、クロモドメイン(メチル化ヒストンと結合するドメイン)のアミノ酸配列中のどの部分が結合に必須であるかを明らかにしたものである。

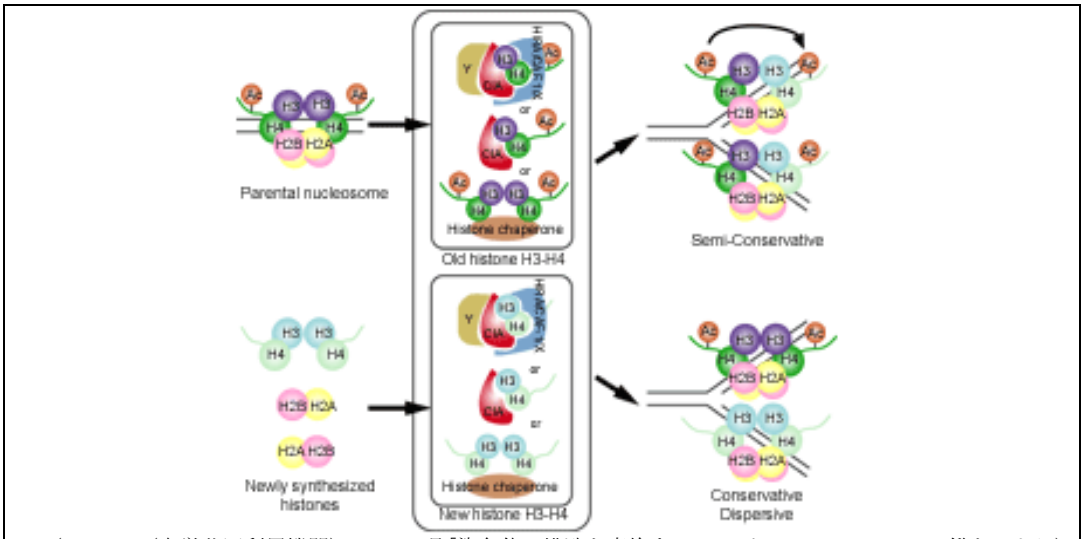
最後に Suzuki ら(2007)の論文[29]は、テーマ(iii)「ジーンセレクターの単離及び構造的機

[26] 論文リスト 51、論文リスト 54、論文リスト 56
[27] 論文リスト 27、論文リスト 43
[28] 論文リスト 48
[29] 論文リスト 55

能解析」に属するもので、心臓血管アポトーシスの阻害に関与する転写因子 KLF5 がアセチル化修飾を受け、それによってポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ 1(PARP1)との相互作用が促進されることなどを発見した。

ERATO 実施期間中の研究であるがプロジェクト期間終了後の 2003 年～2007 年に発表された論文は 18 報あり、これらの中の特筆すべきものとして、テーマ(4)「クロマチン機能構造変換に関与する機能未知因子の単離・解析(CIA/H3/H4 複合体の構造解析)」において得られた Natsume らの論文[30]がある。この論文は、CIA はヒストン H3/H4 ヘテロダイマーと結合することによりヌクレオソームの解離を促進することを示した。ヒストンシャペロン CIA は、プロジェクト期間中においてはいくつかの研究テーマでしばしば中心的な重要性をもつ細胞因子として研究されていたが、プロジェクト終了後は産業技術総合研究所生物情報解析研究センター千田俊哉研究員との共同研究として継続され、結晶化に成功し、プロジェクト期間終了後数年を経過後に本論文になった。

外部有識者によると、この発見はクロマチン構造のリモデリングの具体的メカニズムを明らかにした点で重要であり、例えばバリアントと呼ばれる異種ヒストンを含むヌクレオソームの解離と集合の機構の理解に対しても明瞭な視点を与えるなど、一般性を有している。この発見は、染色体複製に伴うヌクレオソームの形成が半保存的に行われるとする概念の具体化に大きく貢献するものであり、まだ実験的証明に乏しいものの、このヒストンの半保存的複製という概念は、ヒストンにコードされる情報(エピジェネティックコード)の遺伝を説明することができるという点で遺伝学的に興味深い((図 3)参照)。



(News@KEK(大学共同利用機関)2007.3.1号「染色体の構造を変換する~ヒストンシャペロンCIAの働き~」より)

図 3　複製に伴うヌクレオソームの半保存的(semi-conservative)複製が成立すれば、エピジェネティックコードの均等分配が起きうる。ヌクレオソームの半保存的複製が起きない場合(conservative/dispersive)、エピジェネティックコードの不均等分配が起きると考えることもできる。

[30] 論文リスト 50

4. 研究成果から生み出された科学技術的、社会的、経済的な効果・効用及び波及効果について

4.1. 科学技術の進歩に貢献する成果

4.1.1. 学術上での新発見と発明[31]

ヒストンのアセチル化は、ヒストン化学修飾の主要なものの 1 つで、いわゆるヒストンコード説の根幹をなす。クロマチン機能との関連で重要なアセチル化は、ヒストン N 末端領域のリジン残基に起こるが、この領域にある 28 箇所のリジンのうち、生体内では 15 箇所のみがアセチル化の基質となりそれ以外の箇所では修飾がみられないこと、どのリジンが修飾されるかによって生物機能が異なることが知られていた。

このような背景の中で、3.1.1.項で述べたテーマ(5)「ヒストンコード説への貢献」において、リジンのN末端側の隣接アミノ酸の特徴によってアセチル化される15箇所が大きく3クラスに分けられること、周辺の2、3アミノ酸を考慮することで、各クラスを2つずつに分けて合計6グループに分類できること、ヒストンN末端領域にありながらアセチル化されないリジンはこの 6 グループのいずれにも属さないことを発見し、ヒストンアセチル化の分類とヒストンアセチル化酵素の特異性に関するルールを提唱した。続いてMYSTファミリーに属するアセチル化酵素は、クラスⅠのリジン残基をターゲットとすることを示し、当該ルールを実証した。更に、酵母テロメア領域の転写抑制領域の形成に関係しているヒストンH4のN末端から16番目のリジンのアセチル化がMYSTファミリーの酵素によって触媒されるとの仮説を導き、Sas2 がこのリジンのアセチル化を特異的に行う酵素であることを発見した。

4.1.2. 新理論・概念の構築[32]

3.1.1.項で述べたテーマ(6)「遺伝子発現抑制領域の形成・維持機構の解明」において、出芽酵母のテロメアヘテロクロマチンの形成が、MYST ファミリーに属するアセチル化酵素であるSas2によるヒストンH4のN末端から16番目のリジンのアセチル化と、脱アセチル化酵素であるSir2の活性の勾配とそのバランスによっていることを見いだして、染色体機能領域及び境界領域の形成機構のモデル Negotiable border model を提示し、領域として遺伝子発現を制御する機構の理解に大きく貢献した。

テロメアは、ガンなどの不死化した細胞やクローン動物などで異常があることが知られており、テロメア凝縮を区切る酵素を発見したこの研究は、細胞寿命の制御に道を開くも

[31] 論文リスト2、論文リスト4、論文リスト22

[32] 論文リスト22

のとして注目されている[33]。

4.1.3. 新領域・潮流の創出[34]

3.1.1.項で述べたテーマ(1)「ヒストン表面の機能領域の網羅的探索」においてなされた、ヒストンの点突然変異体を網羅的に作製してヒストンの構造と機能に遺伝学的根拠を提供するアプローチは、アラニン・スキャニングとよばれる手法を用いたもので、外国においては “saturated mutagenesis”と呼ばれているものであり、ドメインに対して用いられている。しかしながら、本研究のようにヒストン全領域についてより徹底的な網羅的解析を行った例は、外部有識者によるとこの分野では他に見あたらないことから、日本において新しいアプローチの潮流を創出したと言える。実際、2008 年になって、相次いで、この内容を踏襲した論文が Cell 及び Nature Struct.Mol.Biol.にそれぞれ掲載された[35]。

4.2. 社会的、経済的な効果・効用及び波及効果

4.2.1. プロジェクト成果から期待される技術革新・イノベーション

(1) 3.1.1.項で述べたテーマ(1)「ヒストン表面の機能領域の網羅的探索」の研究成果のひとつとして、「ヒストン H4 の 1 アミノ酸変異蛋白質とその変異細胞、並びにそれらの用途」の名称で特許が成立している[36]。ヒストン H4 の G48 をアラニンに置換した株では強い SPT 表現型(トランスポゾン挿入による転写阻害を解除する)を示すことが見出された(SPT 表現型は転写活性に影響を与えるクロマチン構造の変化の指標として用いられる)。

出芽酵母(パン酵母)ヒストン H4 の 22 位から 53 位までの 32 アミノ酸配列はヒトと同一であり、G48 をアラニンに置換したヒストン H4(G48A)は、同領域が別種出芽酵母カンジダのヒストン H4 のアミノ酸配列と同一である。即ち、ヒストン H4 のアミノ酸配列の 48 位がグリシンかアラニンかの違いによって、出芽酵母ヒストン H4 がカンジダ型(G48A)かヒト型かに分かれ、1 アミノ酸の違いによって出芽酵母のクロマチン機能が変化することが判明した。カンジダ型 G48A のヒストンを持つ変異株と、ヒト型 G48 のヒストンを持つ野生型出芽酵母とで細胞増殖活性等を比較することにより、カンジダ特異的な薬理作用を有する化合物をスクリーニングすることが可能である。別のヒストンの 1 アミノ酸変異株が、微小管重合阻害剤として知られるチアベンダゾールに超感受性を示したことは、このスクリーニング系が、新薬のリード化合物などの探索に有効であることを示している[37]。

(2) 3.1.1.項で述べたテーマ(6)「Sas2 によるアセチル化・Sir2 による脱アセチル化活性

---

[33] 科学技術振興事業団報 第 267 号(http://www.jst.go.jp/pr/report/report267/)
[34] 論文リスト 47
[35] Cell 134,1066-1078(2008), Nature Struct.Mol.Biol. 15,881-888(2008)
[36] 特許リスト 14
[37] 堀越ジーンセレクタープロジェクト成果報告書第 3 章 I.B.(p20)

の拮抗によるサイレンシング領域決定機構の提唱」の研究は、Sir2 はテロメア付近で起こる染色体凝縮が他の領域に広がらないように染色体を区切る酵素という新概念を提示したが、Sir2 は脱アセチル化によりクロマチン状態を DNA が露出しにくい構造にする酵素であり、細胞の諸機能に重要な役割を担っている。

酵母の Sir2 やそのヒトホモログである Sirtuin は、真核細胞の出芽酵母からヒトに至るまで高い保存性を示す脱アセチル化酵素で、遺伝子の安定性、DNA の修復、転写サイレンシング、p53 が関与するアポトーシス、そして脂質生成といった重要な細胞の機能に関与していることが報告されている。更に、Sir2 とそのホモログは、酵母、線虫、及びショウジョウバエで延命効果が報告されており、これらが、進化の過程で高く保存されてきた老化制御因子として働いているのではないかとの仮説が提唱されている[38]ことから、本テーマが扱った Sir2 は、医学的に非常に興味が持たれている酵素である。(図 4)に示すとおり、プロジェクト期間の半ば頃から Sir2 を扱った論文の発表数は急増しており、本論文が扱った Sir2 は、医学的に非常に興味が持たれている分野に発展して来た。

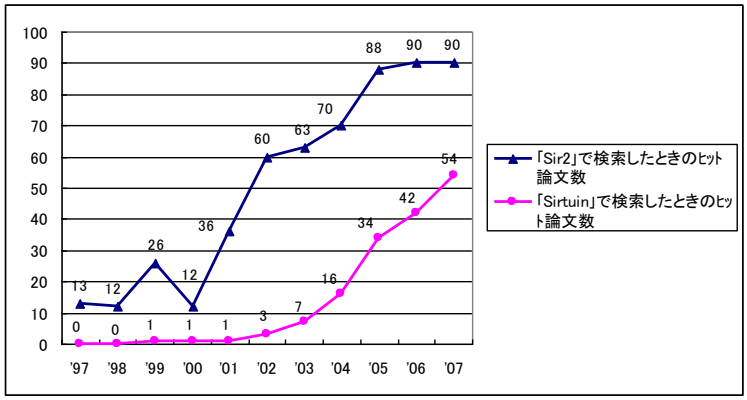


図 4　Sir2 又は Sirtuin を研究対象とした論文数の年推移

4.2.2.当該分野における研究の拡大(キーワード検索の結果)

堀越プロジェクト期間とプロジェクト終了後の計 10 年間(1998 年～2007 年)に発表された、総括責任者が著者名に含まれる英語の原著論文、計 50 報の年推移を、ERATO の論文、ERATO 以外の論文に区別して(図 5)に示した。

50 報の内訳は、図に示されるとおり、成果報告書に記載されている ERATO の論文が 24、成果報告書に記載されておらず論文の謝辞欄等から特定される ERATO の論文が 18、及び、ERATO 以外の論文が 8 である。

年間発表数は、プロジェクトの最終年度(2002 年)に 11 と最も多く、その後減少して、2007 年に 9 と再び増加している。この 9 報の中には、プロジェクト期間中に preliminary

[38] Kaeberlein ら, J. Biol. Chem. 280, 17038-17045, 2005

な結果が得られ、期間後にヒストン結晶化に成功して 2007 年に発表された論文[39]及び、プロジェクト期間中の成果で期間終了前後に初回投稿が行われたものの諸経緯を経て 2007 年に発表された論文[40]が含まれている。

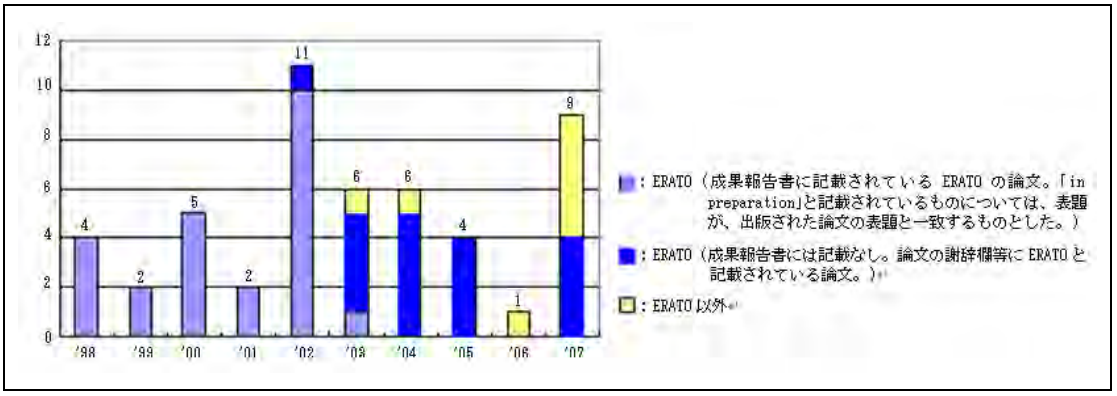


図 5　総括責任者の発表論文数の年推移

②堀越プロジェクト期間とプロジェクト終了後の計 10 年間(1998 年～2007 年)に発表された論文を、論文誌別に(図 6)に示した。

図にみられるとおり、論文誌の種類は多く、Genes Cells、Cell 等の分子細胞生物学的内容を主に掲載する論文誌が多いのに加え、生化学的内容、あるいは構造解析学的内容を主に掲載する論文誌などが並んでいる。

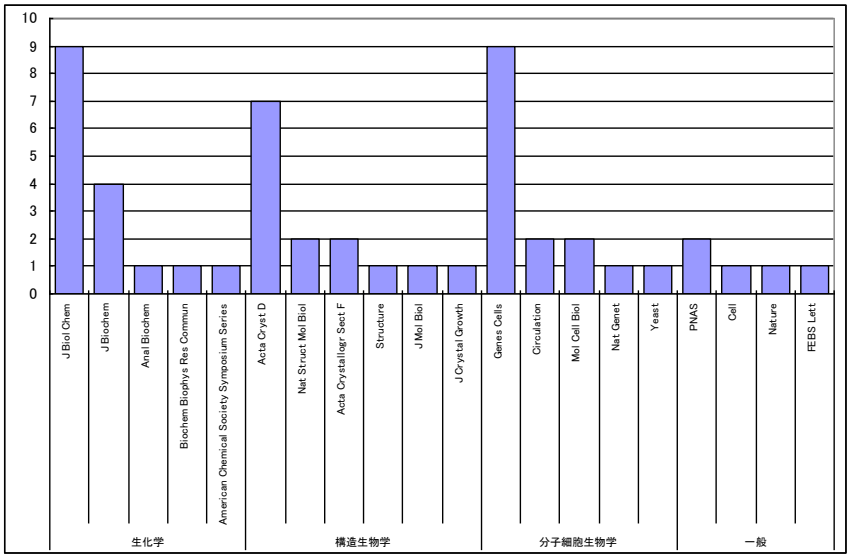


図 6　論文誌別発表論文数

[39] 論文リスト 50
[40] 論文リスト 47

③堀越プロジェクト期間とプロジェクト終了後の計 10 年間(1998 年～2007 年)に発表された論文の、年別合計被引用数及び対象論文あたりの平均被引用数を(図 7)に示した。

図にみられるとおり、各年の対象論文あたりの平均被引用数は、2002 年以降、4.00 と 5.00 の間の値が維持されている。2001 年の値が 5.46 と高いが、これは、前年に発表された Ikura ら(2000)の論文[41]の当該年の被引用数が 40 と多かったことによっている。この論文の年間被引用数は、2002 年以降 2007 年まで常に 50 を超えている。

次いで年間被引用数が多いのは、Kimura ら(2002)の論文[42]と Oishi ら(2003)の論文[43]で、いずれも、発表翌年以降 2007 年まで年間被引用数は常に 20 を超えている。

主にこれらの 3 論文が、平均被引用数の維持に寄与しており、これら以外の論文の年間被引用数は殆どが 10 以下である。

3.2.1 節に述べた Natsume ら(2007)の論文[44]、及び 4.1.3 節に述べた Matsubara ら(2007)の論文[45]は、2007 年の発表であることから、今後、被引用数の増加が予想される。

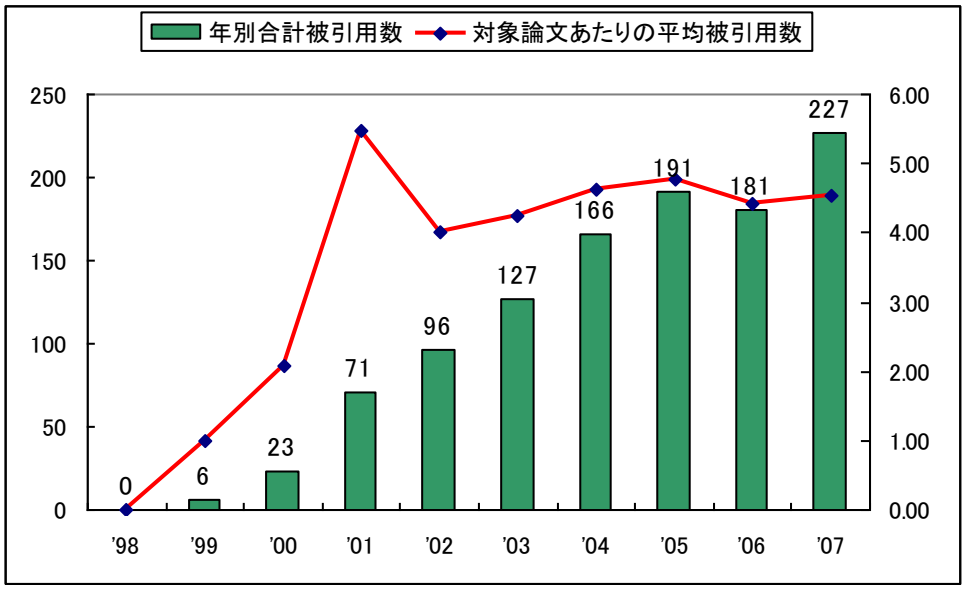


図 7 発表論文の年別合計被引用数及び対象論文あたりの平均被引用数の推移

④堀越プロジェクト期間とプロジェクト終了後の計 10 年間(1998 年～2007 年)に発表された論文のうち、2 番目に被引用件数が多かったのは Kimura らの論文(Nat Genet, 32, 370-377, 2002)[46]であった。この論文の 2002 年の発表後 2007 年までの被引用件数は 112 と非常に多く、更に、(図 8)に示すとおり、112 のうち 42 が総説である。これらの総説の中には、同期間の被引用数 405 の Allis 一派による総説(Fischle ら, Curr Opin Cell Biol,

[41] 論文リスト 10
[42] 論文リスト 22
[43] 論文リスト 29
[44] 論文リスト 50
[45] 論文リスト 47
[46] 論文リスト 22

15, 172-183, 2003)、及び被引用数 301 の Grewal and Moazed の総説(Grewal ら, Science, 301, 798-802, 2003)が含まれている。Allis はヒストンコード提唱者であり、Grewal らはヘテロクロマチン形成機構に関する著名な研究をしているグループである。

また、この論文を引用した 112 の論文の研究分野は、(図 9)に示すとおり、広い範囲に分布しており、このことは、本論文が提唱した概念が、広い分野にインパクトを与えたことを示している。

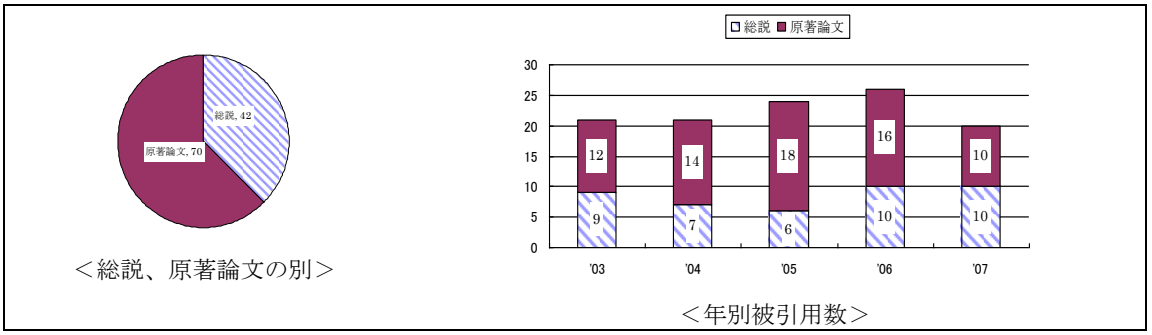


図 8　Kimura ら(2002)の論文[46]の発表翌年以降 2007 年までの総被引用数 112 の内訳・総説/原著論文別及び年別被引用数

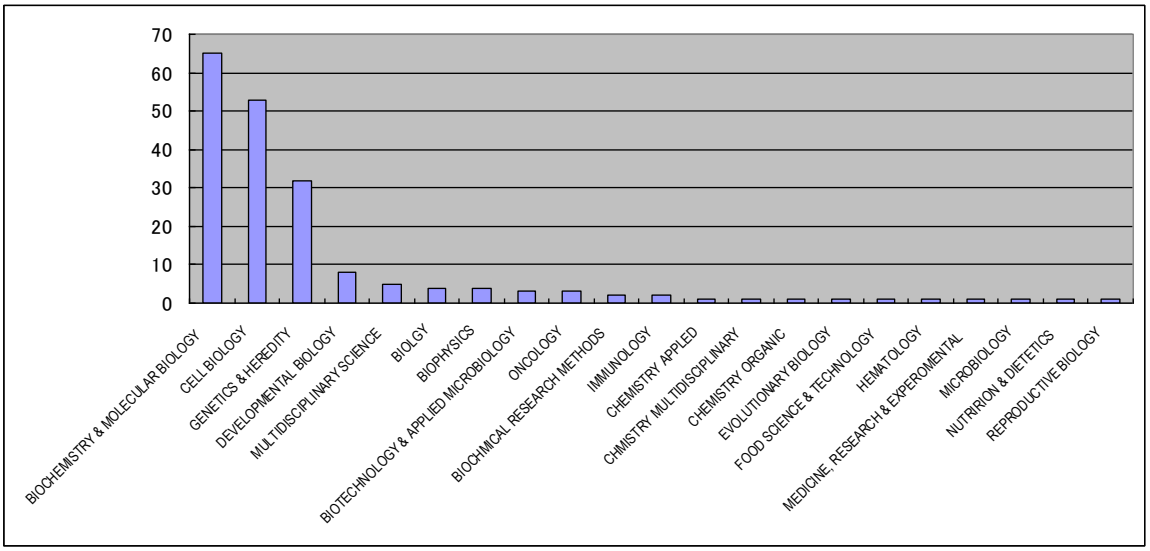


図 9 Kimura ら(2002)の論文[46]の発表翌年以降 2007 年までの総被引用数 112 の内訳・分野別被引用数

[46] 論文リスト 22

5. 参考資料

5.1. プロジェクトで発表し確定された論文、およびその後プロジェクトのテーマに関連して発表された全論文リスト

別添表1

5.2. プロジェクトに関連して出願された特許リスト

別添表2