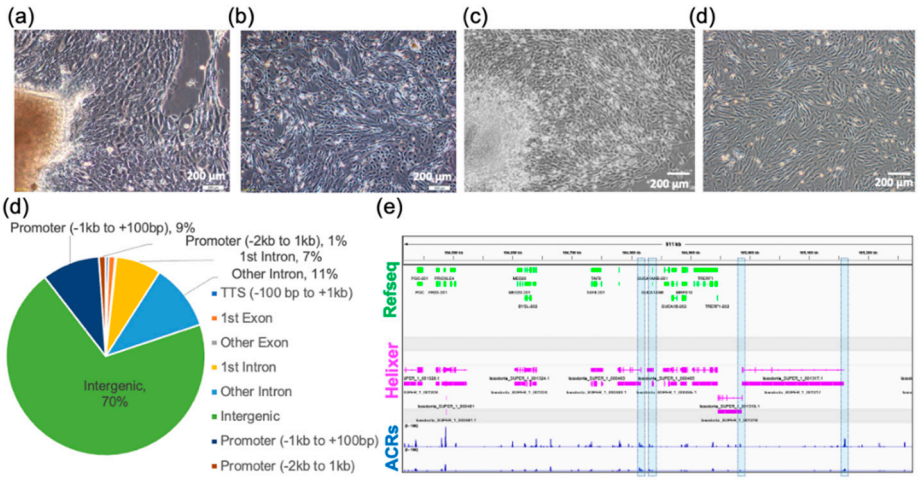
110　がん抑制因子の重複はPeto's paradoxを説明するのか	川口　茜

【目的】脊椎動物の個体を構成する細胞数はマウスでは約 300 億個、ゾウでは 3,000 兆個と大きく異なる。一般的に、細胞分裂に伴う DNA 複製回数が多ければ複製エラーは蓄積し、また個体の成長後も、外的ストレスや老化による DNA の変異や損傷の蓄積は増大することから、細胞のがん化は個体の細胞数と正の相関を示すと考えられる。しかし、ゾウ、クジラやサメといった巨大な体躯の（細胞数の多い）生物におけるがん発症率は低く、寿命も長い傾向にある。これは現在の生物学においても未解明の Peto のパラドクス（Peto *et al.*, 1975）として知られている。そこで著者はパラドクスの分子背景の解明を目的とし、体躯の違う生物種間の遺伝情報を精査・比較し、遺伝子の守護神であるがん抑制因子 p53 ファミリーとその周辺因子群の遺伝子重複や特異的スプライシングバリアントを同定する。同定した遺伝子について培養細胞での強制発現や発現阻害をおこない、細胞老化やアポトーシスの活性化を調べることで、がん抑制機構の原理の解明を目指した。

【方法】本研究では、体躯が大きく寿命が長い脊椎動物として、アフリカサバンナゾウ（以下、アフリカゾウ）、軟骨魚類であるイヌザメ、トラザメの初代繊維芽細胞、及び比較対象とする体が小さく寿命が短い脊椎動物として一般的に研究で用いられる B6 マウスの初代繊維芽細胞を用いることを計画した。まずは、軟骨魚類に属するトラザメ、イヌザメの培養細胞の確立とゲノム情報の整備を、さらに、アフリカゾウの培養細胞の入手、ゲノム情報の整備のため、既存の Ref-seq を新たなゲノムバージョンに対して適応させた。既存の遺伝子モデルには見出されていない新規遺伝子モデルを構築するため、*de novo* 遺伝子モデル予測アルゴリズムである Helixer を用いて、新規遺伝子モデルの予測を実行した。さらに、アフリカゾウの培養細胞の Epigenetic landscape を調べるため、培養細胞を用いて ATAC-seq をおこない、エンハンサーやプロモーターの網羅的解析を行った。また、DNA 損傷時におけるアフリカゾウの培養細胞のエピジェネティック動態を調べるため、アフリカゾウの培養細胞を UV 照射することで DNA 損傷を引き起こし、ATAC-seq を行った。

【結果】トラザメ胚及びイヌザメ胚に由来する初代培養細胞を確立、さらに 6 ヶ月以上も継続培養が可能である条件を確立した（図 a～d）。アフリカゾウの培養細胞は、理化学研究所 CELL BANK から入手、さらにアフリカゾウの高度に整備されたゲノム配列を Earth Biogenome Project から入手した。新たに入手したゲノム情報に対して、既存の遺伝子モデルの再配置と、既存のゲノム DNA の情報には欠失していたと考えられる 80 の重複遺伝子候補を見出した。また、*de novo* 遺伝子モデル予測アルゴリズムを用いて、未同定の遺伝子モデル予測を行ったところ、これまでの遺伝子モデルには存在しなかった 7,619 の未同定遺伝子が見出された。またアフリカゾウの ATAC-seq からは、培養細胞におけるエンハンサーとプロモーターといった基盤となる情報を得ることができた（図 d、e）。

サメ類の培養細胞の確立・アフリカゾウの未同定遺伝子の予測と培養細胞から得られた ACRs



110. がん抑制因子の重複は Peto's paradox を説明するのか

川口　茜

情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所 ゲノム・進化研究系 分子生命史研究室

Key words：Peto のパラドクス，重複遺伝子，ゲノム進化，エピゲノム転写制御，シス調節配列

緒　言

脊椎動物の個体を構成する細胞数はマウスでは約 300 億個、ゾウでは 3,000 兆個と大きく異なる。一般的に、細胞分裂に伴う DNA 複製回数が多ければ複製エラーは蓄積し、また個体の成長後も、外的ストレスや老化による DNA の変異や損傷の蓄積は増大することから、細胞のがん化は個体の細胞数と正の相関を示すと考えられる。しかし、ゾウ、クジラやサメといった巨大な体躯の（細胞数の多い）生物におけるがん発症率は低く、寿命も長い傾向にある。これは現在の生物学においても未解明の Peto のパラドクスとして知られている［1］。これらのパラドクスを説明するメカニズムの 1 つとして、ゾウのゲノム上には *p53* が 20 個も重複遺伝子として存在し、その重複した *p53* がゾウのがん発症リスクを抑えているという分子機構が提唱された［2］。それに対して、最大級の脊椎動物であるクジラ（ザトウクジラやミンククジラ）、ジンベエザメやホホジロザメはマウスと同様に *p53* を 1 個しか持たず、重複したという報告はない。興味深いことに、クジラでは p53 の下流で誘導されるアポトーシス関連因子群が遺伝子重複し、さらにサメでは、p53 経路の因子群が強い正の選択圧を受けていること、また小型のサメと比べて DNA 修復経路に強く関与するヒストン *H2AX* 遺伝子が 5 倍以上も重複していることが示された［3，4］。これらのことから著者は、体細胞の増加とがん化リスクという制約からの逸脱を許した分子機構は、DNA 修復・ゲノム安定性・アポトーシスに関与する因子群が重複した遺伝子として存在し、さらに遺伝子重複に伴った発現量の増加が鍵であると仮説を立てた。このことは、海陸での生活環境の違い、それに伴う選択圧の違い、さらには種が属する系統学的背景の違いには依らない、体躯の大きな脊椎動物で見出される普遍的な原理ではないかと考えている。そこで本研究ではパラドクスの分子背景の解明を目的とし、体躯の違う生物種間の遺伝情報を精査・比較し、例えば、遺伝子の守護神であるがん抑制因子 p53 ファミリーとその周辺因子群の遺伝子重複や、DNA 損傷ストレスを与えられた際に引き起こされる特異的なエピジェネティックな遺伝子発現状態を調べることを目指した。解析を行う上で、これまで研究材料として扱われる頻度が低かった非モデル動物のゲノム情報の整備、さらに個体を用いた解析を行うことが困難である非モデル動物については培養細胞系などを駆使して研究課題を遂行している。これらの一連の解析から同定した遺伝子について、培養細胞での強制発現や発現阻害をおこない、細胞老化やアポトーシスの活性化を調べることでがん抑制機構の原理の解明を試みる。

方法および結果

1. アフリカサバンナ象とイヌザメ及びトラザメの細胞培養実験系の確立

体躯が大きく、寿命が長い脊椎動物として、本研究ではアフリカサバンナゾウ（*Loxodonta africana*：以下、アフリカゾウ)、軟骨魚類であるイヌザメ（*Chiloscyllium punctatum*)、トラザメ（*Scyliorhinus torazame*）の初代繊維芽細胞、及び比較対象とする体が小さく寿命が短い脊椎動物として一般的に研究で用いられる BL6（C67BL/6J 系統）マウスの初代繊維芽細胞を用いることを計画した。以下にそれぞれの培養細胞の入手方法、あるいは確立手法を記述する。

1）アフリカサバンナゾウの培養細胞

ワシントン条約によってアフリカゾウは保護対象動物に指定されているが、旭山動物園で飼育されていたアフリカサゾウの検体から理化学研究所細胞バンクに寄付された線維芽細胞はその対象とならないため、これを以降の解析に用いた。培養細胞の培地条件などは、理化学研究所細胞バンクからの情報をもとに行った（https://cellbank.brc.riken.jp/ cell_bank/CellInfo/?cellNo=RCB2320&lang=Ja）。

2）軟骨魚類に属するトラザメ、イヌザメの培養細胞の確立、ゲノム情報の整備

本研究課題で特に用いる予定であった軟骨魚類に属するイヌザメゲノムのサイズはおよそ 4.5 Gb、トラザメは 6.7 Gb と予想されている。現在までに、国立遺伝研究所でゲノム情報の整備を進めている（別課題の共同研究として遂行中であるため、ここでデータは示さない）。前述の通り、サメは DNA 損傷に強く、独自の機構でがんの発症を抑えている可能性が考えられる。そのことから、国内で個体が入手可能な、トラザメ、イヌザメをモデルとして選んだ。トラザメ、イヌザメの初代細胞培養法は存在するが［5，6］、継続的に長期培養・継代し、分子生物学的実験に用いられた報告はない。そこでまず、トラザメ胚全体を使った初代培養の安定供給の手法の確立を行った。使用したトラザメは、発生ステージ 30 から 35 の胚を用いた。培養条件には、既報のイヌザメの初代細胞培養条件を適応した［6］。その結果、トラザメ胚及びイヌザメ胚に由来する初代培養細胞は、18℃、5% CO_2 供給条件下で、2 週間に一度継代をすることで継続的に培養できること、また 6 ヶ月以上も連続して継代が可能であった（図 1a～d）。

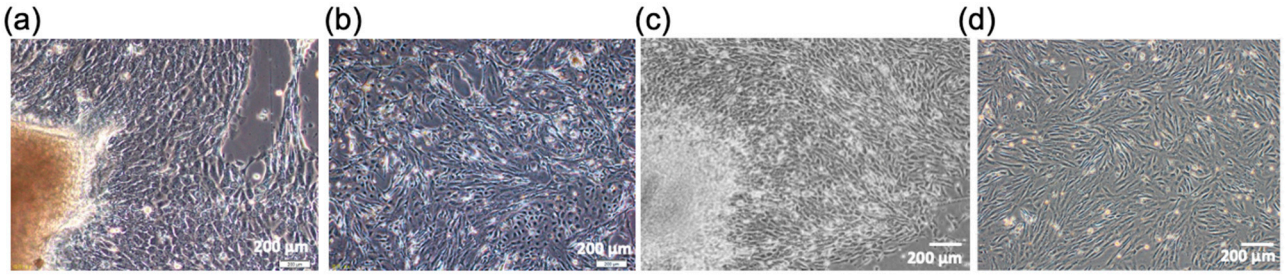


図 1. トラザメ及びイヌザメの胚由来初代繊維芽培養細胞

a） トラザメ胚の組織片から遊走し、底面に付着する初代トラザメ線維芽細胞。

b） 初代培養後、数回の継代後、約6ヶ月以上連続培養されているトラザメ培養細胞。

c） イヌザメ胚の組織片から遊走し、底面に付着する初代イヌザメ線維芽細胞。

d） 初代培養後、数回の継代後、約1年以上連続培養されているイヌザメ線維芽細胞。

2. アフリカゾウのゲノム情報の整備

アフリカゾウを用いてゲノムワイドな次世代シークエンス解析を行うためには、ゲノム情報の整備が必要であった。現在 UCSC で公表されている最新とされたゲノム DNA 情報は loxAfr3.0 でアセンブリ状態は 2,352 scaffold、合計約 3,1 Gb のゲノムバージョンである。より高品質なゲノムを入手するため、本研究では EBP（Earth Biogenome Project）が提供しているゲノム配列を利用した（Individual 1 Haplotype 2 Assembly：以降、これをバージョン mLoxAfr1_2022 とする：https://www.genomeark.org/genomeark-all/Loxodonta_africana.html）。提供されている mLoxAfr1_2022 は 880 scaffold、合計約 3,54 Gb のアセンブリであり、loxAfr3.0 のゲノムバージョンと比較すると染色体レベルにより近い（核型は 2n＝58）。本研究では重複遺伝子を発見し、そこに着目して解析を進める予定であったため高精度な遺伝子モデルを必要とするが、mLoxAfr1_2022 に対して予測された遺伝子モデルは提供されていなかった。そこで UCSC から提供されている loxAfr3.0 に対して構築された遺伝子モデルを採用し、このモデルを mLoxAfr1_2022 に対して適応させるために Liftoff（異なるゲノムバージョン間で遺伝子モデルを変換するアルゴリズム）を試みた。その結果、loxAfr3.0 に対して構築された 28,964（タンパク質コード遺伝子 21,094、非タンパク質コード遺伝子 3,894 を含む）の遺伝子モデルから 25,628 の遺伝子が loxAfr3.0 から mLoxAfr1_2022 に Lift された。さらに、loxAfr3.0 のゲノム情報では検出されておら

ず、新たに整備された mLoxAfr1_2022 において 1 コピー以上存在するとして新たに 80 の重複遺伝子候補群が見出された。この 80 遺伝子について、配列解析と予想される機能について解析を行った。未だ解析途中ではあるが、これらの 80 遺伝子の多くは、嗅覚受容に関与する因子、あるいは嗅覚受容体そのものであることが明らかとなってきた。アフリカゾウの嗅覚は、有胎盤類の他の動物と比較しても非常に優れていることが報告されており、その分子機構に貢献する実体の 1 つは、イヌ、マウス、ヒトなどの鋭い嗅覚を持つ動物よりも 2 倍から 10 倍存在する嗅覚受容体の遺伝子重複であることが示唆されている［7］。嗅覚受容体が多く見出された本解析結果は、既知の知見と一致するものであり、解析の妥当性を示している。現在は、嗅覚受容体として見出された重複遺伝子候補以外のものに着目し、残る遺伝子についても解析を進めている。さらに、既存の遺伝子モデルでは検出されていなかった新規遺伝子が存在している可能性を見出すため、*de novo* 遺伝子構造予測を行う Helixer プログラムを mLoxAfr1_2022 に対して動作させた［8］。その結果、28,714 個の遺伝子がタンパク質をコードする遺伝子として予測された。これは既存の遺伝子モデルで使用している 21,094 のタンパク質コード遺伝子数より多く、Helixer で予想された遺伝子の中に、未同定の遺伝子が存在する可能性を示す（図 2）。現在は、これらについても、配列解析、及び機能予測を進めている。

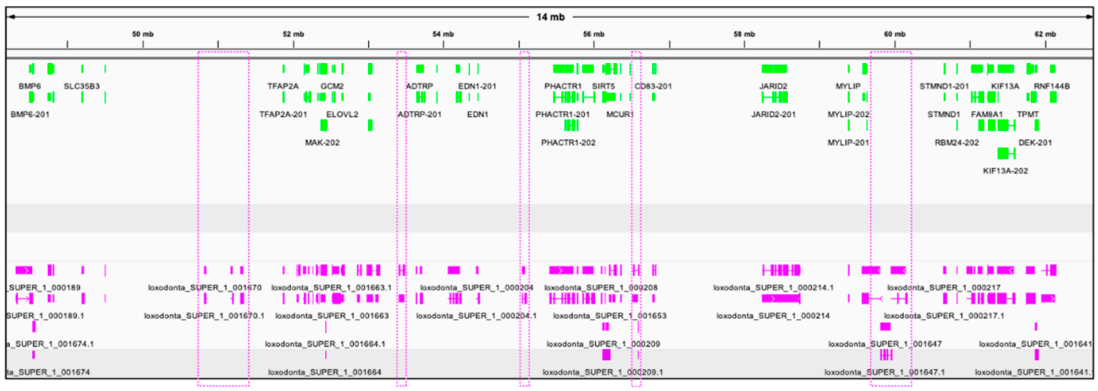


図 2. アフリカゾウのゲノム整備・Helixer を用いた未同定遺伝子の予測

既存の loxAfr3.0（UCSC）における遺伝子モデルを mLoxAfr1_2022 に Lift した遺伝子アノテーション（緑）と、Helixer を用いて mLoxAfr1_2022 における遺伝子モデル（ピンク）を予想した結果を示した IgV track（Genomic region: SUPER_1：48,186,875-62,651,386）。Helixer において新規に予想されたプロテインコード領域をピンクの箱で示している。図のように、いくつもの遺伝子がこれまでの遺伝子モデルには存在していなかった。Helixer による遺伝子モデルはあくまで予想モデルではあるが、こういった情報を組み合わせることで、未同定の機能遺伝子が見出される可能性がある。

3. アフリカゾウの培養細胞の Epigenetic landscape

アフリカゾウのゲノム整備と並行して、アフリカゾウ培養細胞を用いたエピジェネティック制御機構の解析を行った。現在までに、アフリカゾウのヒストン修飾制御機構やユークロマチン・ヘテロクロマチンなどの核内動態を同定した報告はない。そのため、アフリカゾウの核内染色体の状態を俯瞰するため、活性化状態にあるエンハンサー、プロモーター、CTCF の結合配列などのオープンクロマチン領域を捕捉し、次世代シークエンス技術を用いてその領域の配列決定を行う ATAC-seq（Assay for Transposase-Accessible Chromatin）を行った（ATAC-seq ではトランスポゾンを用い、Accessible chromatin regions（ACRs）を見出すことでエンハンサーなどの同定を行う）（図 3a）［9］。トランスポーズ反応には 25,000 細胞のアフリカゾウ培養細胞を用い、2 サンプルの調製を行った。その後、PCR で標的を濃縮し、次世代シークエンスの配列読み取りを行う会社へサンプルを送付、Novaseq 6000 -PE150 の設定で配列が読み取られた。返送された生データは、図 3a の順序で処理を行った。

解析の結果、アフリカゾウの培養細胞からは、111,340（レプリケイト 1）、97,411（レプリケイト 2）の ACRs が見出された（図 3b）。どちらものテクニカルレプリケイトで共通して見出される ACRs は 85,099 であることがわかった。次に、見出された 85,099 の ACRs がゲノム上のどういった性質を持つ領域に存在するのかを明らかにするため、HOMER アルゴリズムを用いて Peak annotation を行った（図 3 c～d）。その結果、全体の割合に対して Promoter 近傍に 10%、Intron 領域に 18%、Intergenic 領域に 70%の ACRs が見出された（図 3e）。

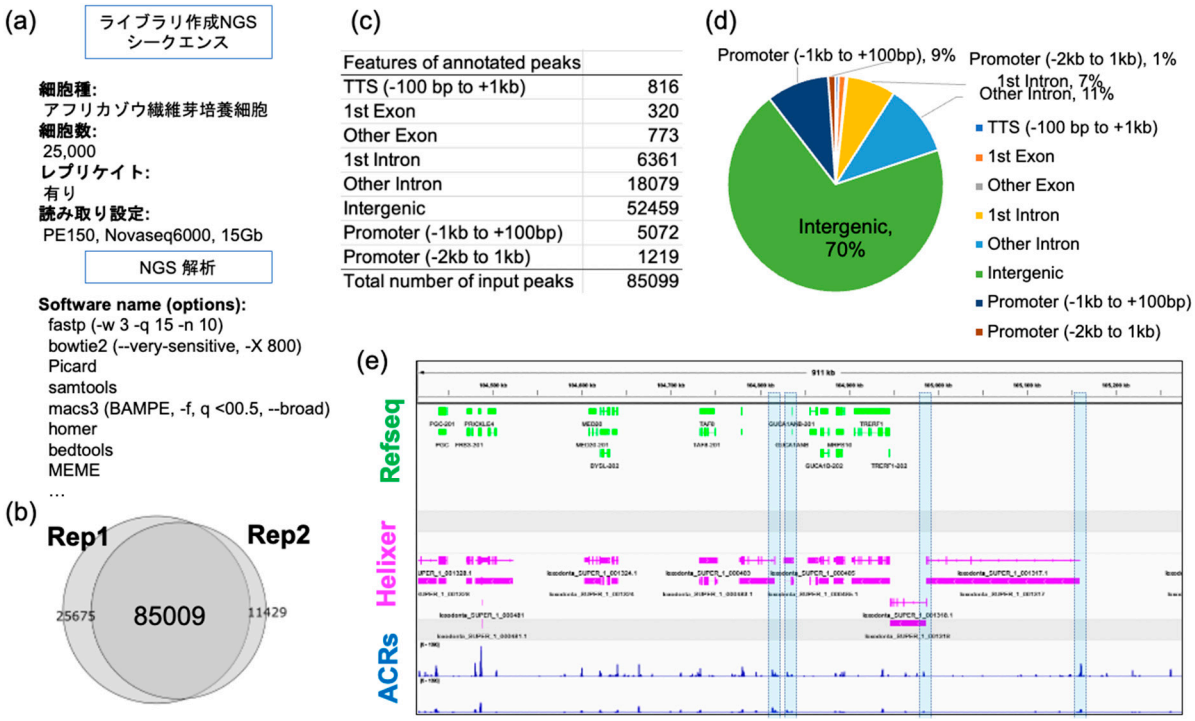


図 3. アフリカゾウ培養細胞における ACRs の解析

新たに整備したアフリカゾウゲノム配列（mLoxAfr1_2022）と、新たに遺伝子予測を行った遺伝子ファイル一覧を基に、アフリカゾウの培養細胞において見出された ACRs の領域を解析した。

a） ATAC-seq の実験的設定、またその後の一連の解析を示す。

b） 本研究で用意した 2 つのレプリケイト間での Peak の重なりをベン図で示した。両サンプル間で見出された 85,099 の ACRs について解析を進めた。

c） b）で示した 85,009 の ACRs が存在するゲノム上の機能、あるいは性質を調べ、それらの ACR 数を示した（TSS：Transcriptional Terminal Site）。

d） c）を円グラフで示した。

e） Refseq を緑、Helixer によって予測された *de novo* 遺伝子モデルをピンク、本研究で得られた ACRs を青で示した IgV track。水色で囲った領域は Helixer で予測された新規遺伝子候補領域の TSS と ATAC-seq によって得られた peak の重複する領域を示す。このことからも、Helixer で予想された遺伝子モデルが未同定遺伝子群候補であることが強く示唆される。

4. DNA 損傷時におけるアフリカゾウの培養細胞の Epigenetic landscape と変化

アフリカゾウ、及びサメといった生物が特異的な DNA 修復機構や、あるいは過剰な DNA 損傷を起こした細胞を細胞死プログラムへと誘導する分子機構が存在するかどうかについて、UV 照射による DNA 損傷の誘発と、それに伴った DNA 損傷時のエピジェネティックな変化を調べた。現在、本実験はいまだに検討中であるが、これまでに行った検証方法をここに述べる。まず、アフリカゾウの培養細胞を用いた条件検討を行った。使用した UV 照射機は、UVP CX-2000 を用い、6 J と 12 J の UV を培養細胞に照射した。その後の経時的変化を観察するため、照射後、3、9、24、48 時間培養した後、細胞を回収した。まず、ACRs の変化を観察するため、回収した細胞を結果項目 3 と同様に ATAC-seq の処理をおこない、ライブラリ作製をおこない、次世代シークエンスでの配列決定が終了した。現在、解析を進めているところである。また、包括的なエピジェネティック状態を観察するため、UV 照射による DNA 損傷を誘導し、CUT&Tag 法（既存の ChIP-seq と同様の結果を得ることができるが、より好感度にシグナル変化を捉えることができる）を用いることで、ヒストン修飾状態の変化などを調べている。

考　察

本研究期間の間では、Peto のパラドクスを解明するため、アフリカゾウやサメ類といったゲノム情報や実験材料が十分に揃っていない非モデル実験動物を用いた分子生物学的実験の基盤整備を行った。特に、アフリカゾウの高品質なゲノム整備、そのゲノム情報に対して行った Helixer による遺伝子予測の結果、約 8,000 近い未同定の遺伝子候補群が見出されたことは興味深い。これら 8,000 近くの遺伝子が全く機能未知であることは考えにくいものの、これまで見出されてこなかった既存遺伝子の重複遺伝子群を含んでいる可能性が高い。過去の知見から、DNA 損傷応答機構に関与する遺伝子の重複が Peto のパラドクスの解明の鍵となりうることを考えると、多くのコピーが存在するいずれかの遺伝子が DNA 損傷に対する耐性を強化するようなメカニズムが示唆されることから、引き続き今後も解析を続ける。現在は、培養細胞に対して UV 照射をおこない、DNA 損傷によって惹起されるエピジェネティック機構とそれによって発現が上昇する重複遺伝子群を調べているが、薬品処理などによる DNA 損傷ストレスの条件検討をおこなっており、今後の解析系に加える。詳細なエピジェネティック動態を俯瞰するために、エンハンサーやプロモーターを網羅的にスクリーニングする ATAC-seq や CUT&Tag といった非常に強力なツールを組み込むことで、DNA 損傷が起因する分子機構の動的基盤を明らかにすることができる。また、サメの培養細胞についても同様の実験系を用いて解析をおこなうことで、進化的に重複遺伝子が DNA 損傷から体を守るメカニズムを明らかにする。本来であれば、Nano-pore Direct RNA シークエンスを行う計画であったが、昨今の円安による海外製試薬の高騰から費用面での実現が困難であった。Long-read 関連のシークエンス技術を用いる解析は今後必須と考えるが、実現可能性を探るため、キメラ RNA の発現や Alternative splicing を持つ遺伝子の発現をキャプチャーする別手法の採用についても検討が必要である。

共同研究者・謝辞

本研究内で用いたアフリカサバンナゾウの培養細胞は、旭川市旭山動物園の佐藤伸高先生から理化学研究所 CELL BANK に提供されたアフリカサバンナゾウ「Nana」の細胞を使用しました。Nana さんと佐藤伸高先生には心から感謝申し上げます。また、共同研究者である国立遺伝学研究所分子生命史研究室の工樂樹洋博士、理化学研究所生命機能科学研究センターの門田満隆博士、種子島千春様（元分子配列比較解析チーム）に感謝申し上げます。さらに、多くの科学的議論をしていただいた山形大学医学部の越智陽城博士に感謝申し上げます。

文　献

1) Peto R, Roe FJ, Lee PN, Levy L, Clack J. Cancer and ageing in mice and men. Br J Cancer. 1975;32:411–426. PMID:1212409 DOI: 10.1038/bjc.1975.242

2) Sulak M, Fong L, Mika K, Chigurupati S, Yon L, Mongan NP, Emes RD, Lynch VJ. TP53 copy number expansion is associated with the evolution of increased body size and an enhanced DNA damage response in elephants. eLife. 2016;5:e11994. PMID:27642012 DOI: 10.7554/eLife.11994

3) Marra NJ, Stanhope MJ, Jue NK, Wang M, Sun Q, Pavinski Bitar P, Richards VP, Komissarov A, Rayko M, Kliver S, et al. White shark genome reveals ancient elasmobranch adaptations associated with wound healing and the maintenance of genome stability. Proc Natl Acad Sci USA. 2019;116:4446–4455. PMID: 30782839 DOI: 10.1073/pnas.1819778116

4) Tan M, Redmond AK, Dooley H, Nozu R, Sato K, Kuraku S, Koren S, Phillippy AM, Dove AD, Read T. The whale shark genome reveals patterns of vertebrate gene family evolution. eLife. 2021;10:e65394. PMID: 34409936 DOI: 10.7554/eLife.65394

5) Fujimori C, Umatani C, Chimura M, Ijiri S, Bando H, Hyodo S, Kanda S. In vitro and in vivo gene transfer in the cloudy catshark *Scyliorhinus torazame*. Dev Growth Differ. 2022;64:558–565. PMID: 36376176 DOI: 10.1111/dgd.12824

6) Uno Y, Nozu R, Kiyatake I, Higashiguchi N, Sodeyama S, Murakumo K, Sato K, Kuraku S. Cell culture-based karyotyping of orectolobiform sharks for chromosome-scale genome analysis. Commun Biol. 2020;3:652. PMID: 33159152 DOI: 10.1038/s42003-020-01373-7

7) Niimura Y, Matsui A, Touhara K. Extreme expansion of the olfactory receptor gene repertoire in African elephants and evolutionary dynamics of orthologous gene groups in 13 placental mammals. Genome Res. 2014;24:1485–1496. PMID: 25053675 DOI:10.1101/gr.169532.113

8) Stiehler F, Steinborn M, Scholz S, Dey D, Weber APM, Denton AK. Helixer: cross-species gene annotation of large eukaryotic genomes using deep learning. Birol I, editor. Bioinformatics. 2021;36:5291–5298. PMID: 33325516 DOI: 10.1093/bioinformatics/btaa1044

9) Buenrostro JD, Giresi PG, Zaba LC, Chang HY, Greenleaf WJ. Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. Nat methods. 2013;10:1213–1218. PMID: 24097267 DOI: 10.1038/nmeth.2688