HOKUGA 北海学園学術情報リポジトリ
学校法人北海学園
北海学園大学
北海商科大学

タイトル	反復DNA配列を起点とした染色体再編成と種分岐
著者	高橋，考太；TAKAHASHI，Kohta
引用	北海学園大学工学部研究報告(40)：1-19
発行日	2013-02-12

Hokkai-Gakuen Organization of Knowledge Ubiquitous through Gaining Archives.

研究解説

反復DNA配列を起点とした染色体再編成と種分岐

高　橋　考　太*

Chromosome Reorganization Induced by Repetitive DNA Elements Affects Speciation

Kohta TAKAHASHI*

1．ゲノムにおける非コードDNAの存在

ある生物が持つ全ての遺伝情報のことをゲノム（genome）という．DNAの塩基配列情報の総体といってもよい．酵母やヒトを含む真核生物（eukaryote）のゲノム情報は，染色体（chromosome）と呼ばれるDNAとタンパク質の高次複合体に記録され，細胞内の核に収納されている．重要な発見が相次いだことから，分子生物学にとって，そののち奇跡の年と呼ばれるようになる1953年，ワトソンとクリックにより，DNAの二重らせん構造モデルが提出された[1]．この発見を機に，遺伝暗号の解明が進み，DNAからRNAを介してタンパク質（protein）へと流れる生命の情報伝達の基本システムが明らかとなった．クリックによってセントラルドグマと名付けられたこのゲノム情報の伝達のしくみは，そののち長らく分子生物学の常識として研究者の論理を支配することになる．すなわち，DNA上の機能単位である遺伝子（gene）の核酸配列情報は，RNAに転写（transcription）され，その多くはさらに転移RNA（tRNA：transfer RNA）を介した遺伝暗号の翻訳（translation）過程を経て，タンパク質のアミノ酸配列情報に変換される．タンパク質に翻訳されない遺伝子も存在し，そこからはリボソームRNA（rRNA：ribosomal RNA）などの機能的なRNA分子が生成する．

この古典的な考えに従えば，DNA分子には，遺伝子という機能的な部分と，それ以外の“機能しない”部分が存在することになる．この“機能しない”DNA配列は，タンパク質や機能的RNA分子などの有用な情報を持たない（コードしない）ということから，非コード（non−coding）DNAと呼ばれている．奇跡の年から近年にいたるまで，分子生物学者の興味は，遺伝子の機能を解明することに集中し，非コードDNAが注目を集めることは，ほとんどなかっ

* 北海学園大学工学部生命工学科
* Department of Life Science and Technology, Faculty of Engineering, Hokkai-Gakuen University

たといってよいだろう．実際，非コードDNAは，その無機能性を指して，“がらくた”(junk) DNAとも呼ばれてきた．しかし近年，この“がらくた”DNAが，「進化を含めた生命現象に極めて重要な役割を果たしてきたのではないか」という見方が生まれつつある．本稿では，この非コードDNAの特徴を分類し，現在提唱されているその生理的機能を紹介，特に染色体の再編成と種分岐（speciation）という観点から，このDNA配列を再考してみる．また，分裂酵母（fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*）を用いた，われわれの非コードDNA機能解明の試みについて，一部の未発表データを交えながら紹介し，今後の展開について考察したい．

2．非コードDNAの分類とその特徴

ヒトゲノム32億塩基（3,200Mb：Mega base）のうち，遺伝子が占める割合は，約２％に過ぎず，残りの約98％が，実は非コードDNAで構成されている[2]（**図１**）．古典的見方によれば，ヒトゲノムのほとんどは“がらくた”というわけである．ところが不思議なことに，ゲノムに非コードDNAが占める割合は，酵母からハエ，脊椎動物と，高等な生物になるに従って増加傾向にある．ただし，アメーバ，植物，両生類などの一部には，ヒトよりもはるかに多く非コードDNAを抱えている例もある．これまでは，遺伝子数の多さが，「その生物がどれくらい高等であるか」を推量する指標として用いられていたが，近年のゲノム解析の結果から，この指標は必ずしも正しいとは言えないことがわかってきた．たとえば，ミジンコの遺伝子数は，ヒトの約25,000個を上まわる約31,000個もあることが示されている[3]．

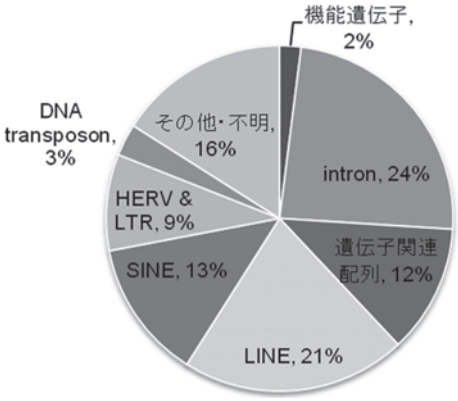

図１．ヒトゲノムのDNA配列組成；非コードDNAの分類

機能的遺伝子は，タンパク質をコードする遺伝子と，古典的な意味での非コードRNA（tRNAやrRNAなど）を含む．近年，大量に見つかった非コードRNAは，まだ機能があるかどうか明らかでないものが大多数であるため，このグラフでは，機能的遺伝子部分には含めなかった．RNAスプライシングに関与するイントロンと，転移因子由来と考えられている４種の反復配列を除いた部分（その他・不明）には，偽遺伝子やサテライトDNAなどの反復配列，機能未知の非反復遺伝子間DNAが含まれる．

非コードDNAには，本当に機能がないのだろうか．今のところ，一部を除いて，その答えは明確になっていない．これは，非コードDNAの多くが長大な反復配列を含むため，その構造を決めることすら困難で，機能解析のアプローチが極めて難しかったことによる．“がらくた”と示されたのではなく，“がらくた”かどうか，今までのところ詳しく調べようがなかったというのが正しい．後のセクションで一部のデータを示すように，われわれはこの非コードDNAの主要な構成要素である反復配列が，分裂酵母のゲノム上で正常に制御されない状態を作り出すことに成功した．非コードDNA制御が異常になった細胞の表現型（phenotype）を調べることにより，“がらくた”DNAの機能的側面に迫ることができるかもしれない．この研究結果を紹介する前に，まず非コードDNAをその配列の由来と構造から分類し，その一般的な特徴をまとめておきたい[2)]．

非コードDNAは，タンパク質に翻訳されるエクソン（exson）とtRNAやrRNAなどの機能的RNAをコードしている部分を，ゲノムから除いた残りの部分からなる．ヒトの場合，前述したように，エクソンと古典的な意味での機能的RNAを合わせても，全ゲノムの約２％にしかならない（**図１**）．成熟した伝達RNA（mRNA：messenger RNA）がつくられる過程で除去されるイントロン（intron）部分も，一般的には非コードDNAに分類され，ゲノムの約24％を占める．このイントロンや非翻訳領域（UTR：untranslated region）などの遺伝子調節部位と，偽遺伝子（pseudo gene）や遺伝子断片などのいわゆる遺伝子関連配列を合わせると，約1,200Mbとなり，ヒトゲノムの約38％を占めている．これ以外の約62％が，今のところその機能がほとんど分かっていない“未知”の配列で，遺伝子間DNAと呼ばれている．

遺伝子間DNAのうちの約1,400Mbが，ゲノムの中で何度も繰り返し反復している配列である．その大半は，トランスポゾン（transposon）あるいは転移因子（transposable element）と呼ばれるゲノム内を移動するDNA断片で，主に，長鎖散在性核内反復配列LINE（large interspersed element），短鎖散在性核内反復配列SINE（short interspersed element），ヒト内在性ウイルスHERV（human endogenous retrovirus）および長鎖末端反復配列LTR（long terminal repeat），DNAトランスポゾン（DNA transposon）の４種類に分類できる．いわゆる“動く遺伝子”と呼ばれている配列群だ．このうち最初の３つは，RNAトランスポゾン（RNA transposon）由来の配列といわれている．RNAトランスポゾンは，真核生物に特徴的で，原核生物（prokaryote）では見つかっていない．HERVは，人間に過去に感染したウイルスの名残と考えられている配列である．LTRは，レトロウイルス（retrovirus）などに見られる配列で，RNAゲノムを持つレトロウイルスが，逆転写酵素（reverse transcriptase）を使って自らの遺伝情報をDNAに変換し，宿主のDNAに侵入する際に，中心的な役割を果たす配列である．LTRを持たないRNAトランスポゾンであるLINEとSINEを，レトロポゾン（retroposon）という．LINEファミリー（**図２**）は，ヒトゲノムの21％を占める比較的長い散在性の反復配列で，非常に古

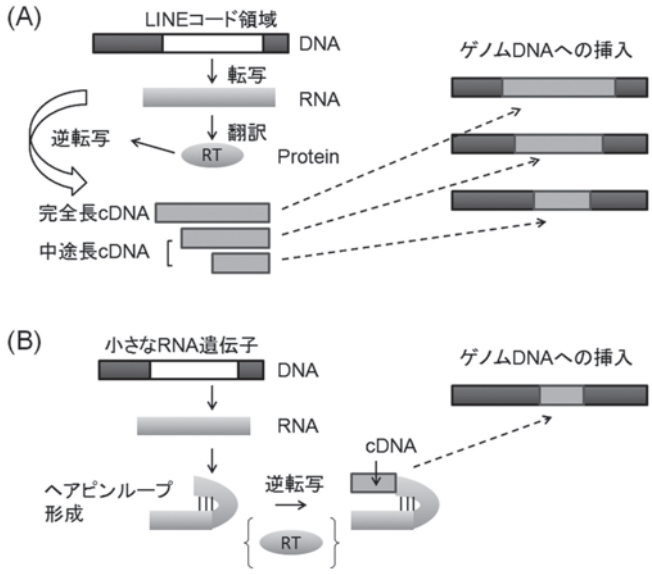

図２． LINEおよびSINEファミリーの構造とゲノムへの侵入の仕方[4)]

（A）LINE‐１は逆転写酵素をコードしており，RNAに転写後，活性のある逆転写酵素タンパク質（RT）を生み出す．この逆転写酵素（RT）は，LINEファミリーのRNAを逆転写して，その相補的DNA（cDNA：complimentary DNA）を合成するが，逆転写が途中で終わって，不完全な長さのcDNAも多数生成される．これらが，任意の染色体の別の場所に挿入されることにより，LINEファミリーがゲノム中で増幅する.（B）SINE配列は転写され，多くの場合，３’側でヘアピンループを作ることができる構造をとっている．LINEのコードする逆転写酵素によって，このヘアピンループ部分をプライマーにして，SINEファミリーのcDNAが合成され，ゲノム中に挿入され増殖する．

くからあった配列であることがわかっている[4)]．ヒトLINEは３種類あるが，そのうちLINE‐１配列はゲノムにおよそ６万コピー存在し，逆転写酵素をコードしていて転移しうる唯一のタイプである．長いもので6.4kbの長さがある．これに対して，SINEは比較的短い300bp以下の散在性の反復配列で（**図２**），ゲノムの約13％に存在している[4)]．そのほとんどを占める0.28kbのAlu配列は，ゲノム中に120万コピーも繰り返し反復しており，これは平均すると約2.7kbくらいの間隔でゲノムに散在していることになる．これらに加え，DNA型のトランスポゾン配列が，反復性の配列として約３％存在している．以上の反復配列は，個々の反復単位がゲノム上にランダムに散在している．

これ以外に，縦列反復配列（tandemly repeated sequence）として，反復単位が１ヵ所に隣り合って並んでいるものもある．サテライトDNA（satellite DNA）とも呼ばれ，その多くはセントロメア（centromere）などに集積し，染色体の重要なシス因子（*cis* element）として，動原体（kinetochore）などに代表される特殊な構造体の構築基盤を形成している．さらに，２～５塩基の配列が４～50回あるいはそれ以上反復しているマイクロサテライトと呼ばれる単純反復

配列SSR（simple sequence repeat）もある．

以上のように，ヒトゲノムは，さまざまなタイプの反復配列に，まさに埋め尽くされている状況なのである．この一見“がらくた”にしか見えず，ゲノム内にランダムに広まったように思える配列群に，はたして機能的存在意義があるのか，もしあるとすれば，どのような役割を担っているのだろうか．

3．非コードDNAが進化上保持されてきた理由

反復配列に富む非コードDNAは，大腸菌などが属する原核生物（procaryote）のゲノムには，ほとんど存在しない．言い換えると，原核生物のゲノムは，遺伝子が密に詰まった構造をしている．これは原核生物が，進化の戦略上，もっとも効率よく自らの細胞をコピー（クローン）し，最短時間で増殖する道を選択したためだろう．ゲノムDNAの複製（replication）には，多くのエネルギーが必要となるため，生存に必要のない余分な配列は少なければ少ないほど，低コストでの細胞の再生産が可能になる．さらに複製酵素DNAポリメラーゼ（DNA polymerase）の単位時間あたりのDNA合成能力には上限があるので，全体のDNA長が短いほど，短時間での複製が可能になる．短い複製時間は分裂時間の短縮につながるため，細胞の増殖戦略上，極めて有利に働く．細胞は，環境に十分な栄養があれば，指数関数的に増殖する．たとえば，最適環境下では20分で分裂する大腸菌の場合，目に見えないわずか１～２μm長のひとつの細胞が，無制限に栄養を供給できると仮定すれば，３日後には$2^{216} \fallingdotseq 10^{65}$細胞となって，総体積に換算すると地球の1,000倍以上の分量に達する．いわば“増殖”重視型の生き残り戦略である．これに対して，われわれヒトを含む真核生物は，以下に述べるような“多様性”重視型の戦略を採用しているようだ．これは，原核生物が単細胞体であるのに対し，真核生物の多くが細胞の共生的集合体である多細胞体として進化してきたことと関係があるかもしれない．

真核生物は，非コードDNAをゲノム内に大量に保有している．従来，これは過去にレトロウイルスなどの感染により外部侵入してきた“寄生的”DNAが，自律複製とゲノム内転移をくりかえした結果，進化的に長い時間をかけ，宿主生物のDNA内に自然と蓄積拡散したものと説明されてきた．しかし，この説では，高等な生物になるに従って非コードDNAの割合が増加する傾向にあることをうまく説明できない．余分なDNAを複製するエネルギーと時間の無駄が生じるため，非コードDNAが何の機能も持たないのならば，細胞にとって競争力低下の有害要因となって，淘汰されたはずである．さらに，非コードDNAのうち，自律複製する能力を持った転移因子は，突然変異を誘発する因子としてふるまう．すなわち，重要な遺伝子配列を分断したり，その制御因子を阻害してしまうことにより，その細胞の生存戦略上，不利な影響を与えてしまう可能性がある．また，反復配列に富む非コードDNAでは，類似配列間

での組換えがある一定頻度で起こることが予想され，多くの場合，その組換えは染色体編成の変化をともなうため，細胞にとって致死的な影響を与える潜在的リスクが増大する．以上のような観点からは，非コードDNAがゲノム内に増幅してゆくことが，進化の過程で選択圧に打ち勝って許容されてきた理由を説明することは難しい．そのため，非コードDNAには，何らかの進化上有利になる特徴もしくは機能があったと考えられる．その候補として，まだほとんど実証されていないものもあるが，いくつかの魅力的な仮説がある[4),5)]（**図 3**）．

第１に，染色体機能のシス因子として利用されている可能性である（**図 3 A**）．実際，セントロメア，テロメア（telomere），複製起点（replication origin），転写調節部位，スキャッフォールド（scaffold）などの染色体の機能単位の形成の足場として，特徴的な反復配列が利用されている例が多数報告されている[2),4)]．あるいはコヒーシン（cohesin：染色体接着・分離にかかわる）やコンデンシン（condensin：染色体凝縮にかかわる）などの染色体結合タンパク質の結合部位に，何らかの遺伝子間DNA配列が関与している可能性は高い[6)]．

第２に，突然変異因子として，進化における点変異と同じような役割を果たしている可能性（**図 3 B**）で，非コードDNAの挿入やそれを介した組換えによるゲノム改変が，生存上有利に働くような変異を起こす場合である[7)]．この有利な変異が，進化上，負の変異より大きな影響

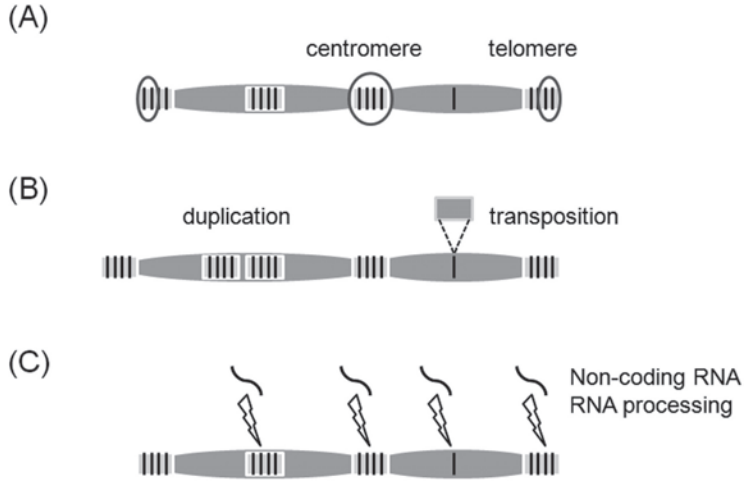

図 3．ゲノム反復配列の機能

(A) セントロメアやテロメアなどに代表される染色体上に構築される複雑な機能シス因子の形成基盤として働く．(B) 反復配列間の組換えを介して，染色体の構造を一気に大きく変化させ，生殖隔離による種分岐の原動力になるのと同時に，重複遺伝子の産生などを介して，遺伝子機能の多様化を加速する．(C) 非コードDNAから，多くの非コードRNAが転写されている．その一部は，テロメアやセントロメアの構造形成に働いたり[14),15),16)]，選択的RNAスプライシングなどのRNAプロセシングを介して，タンパク質や機能的RNAの多様性を生み出したりすること[10)]が知られているが，その他の機能の多くは，まだほとんど解明されていない[12),13)]．

を与えるならば，非コードDNAは選択圧に打ち勝ち，ゲノムに定着することになる．すでに機能している遺伝子の構造に変化を与える変異の大部分は有害であると考えられるが，重複などによる遺伝子量の変化[8]や，遺伝子上流の転写制御部位への転移因子の挿入などにより，単独あるいはまとまった複数の遺伝子の発現制御の変化を誘起して，非コードDNAは，生物の生存上有利な変異を導くのかもしれない．

第３に，染色体の再編成の起点となり，種分岐の原動力となる役割が考えられる（**図３B**）．この場合，種分岐に寄与することが，生命の多様性を増加させることは明らかであるが，それがその生物にとって，自然選択上有利に働くかどうかは，環境変動の度合いとも関連するため断言できない．ただし，反復配列間の組換えにより，ゲノムの大規模な重複が起こる場合，一般に重複した遺伝子の変異速度が増加することは示されており，この場合，既存の遺伝子を基にして効率よく新たな機能を持った遺伝子を生み出すことが可能になる．ゲノム全体の重複である倍数化が起こり，進化に有利に働いた可能性が多くの生物で示唆されており[8),9)]，非コードDNAの進化上の役割としては，この大規模重複を誘因するケースが重要かもしれない．

第４に，遺伝子に多様性を付与するイントロンの隠れた機能があげられる（**図３C**）．マウス全遺伝子の約半分で，選択的RNAスプライシング（alternative RNA splicing）という遺伝子制御が起きていることが明らかになった．これは，RNAをプロセシングする際にイントロンの除去を選択的におこなうことにより，エキソン部分の連結パターンを変えて，ひとつの遺伝子から複数のタンパク質や機能的RNAを生み出すしくみである．ヒトの場合，実に95％以上の遺伝子が選択的RNAスプライシングを受けている．特に神経細胞では，活発に選択的RNAスプライシングがおこなわれており，この「限られた遺伝子材料から多様なタンパク質やRNA分子を産生するしくみ」が，神経系の発達とその機能に重要な役割を果たしていることが示唆されている[10)]．

最後に，現在，もっともホットな研究分野になりつつある非コードRNA（non−coding RNA）による遺伝子機能制御がある（**図３C**）[11)]．2005年，日本の研究グループが中心となって推進したマウスの転写産物の網羅的解析結果が発表された[12)]．驚いたことに，収集解析できたマウスゲノム転写産物の53％にあたる23,000個以上が，実はタンパク質をコードしない非コードRNAであり，しかも，これらが生体内においてさまざまな機能を果たしている可能性があることが示唆されたのである．今後，ゲノム転写産物に占める非コードRNAの割合は，さらに増えることが予想されている．タンパク質に翻訳されるmRNAやtRNA, rRNAなどの翻訳過程にかかわるRNA，さらにRNAのプロセシングや化学修飾に関与する小分子RNAであるsnRNA（small nuclear RNA），snoRNA（small nucleolar RNA）などの古典的な機能RNA分子のほかに，非コードDNA部分に遺伝子発現制御などの機能を持つsiRNA（small interfering

RNA）やmiRNA（micro RNA）などの非コードRNA遺伝子が存在することは，この研究以前からすでにわかっていた．しかし，その数が予想をはるかに超えて大量に存在していたという事実は，われわれがゲノム機能のまだほんの一部しか理解していないことを物語っている．最近のヒトゲノム研究の結果によると，DNAからタンパク質にまで翻訳される遺伝子は21,000個以下であるにもかかわらず，ゲノムの約80％は生化学的に活性であり，RNAへ転写されるDNAはゲノムの76％にも達することがわかった[13]．これは，反復配列を含む非コードDNAのかなりの部分がRNAに転写され，そのうちの一部は，機能的RNA分子として生体制御に働いている可能性を強く示唆している．これまで比較的よく研究されてきた小分子RNAに加えて，近年はlncRNA（long non-coding RNA）と呼ばれるタンパク質に翻訳されない長鎖RNAも次々と見出されている．その一部は，クロマチン修飾酵素群と相互作用したり，核内構造体の構成成分として機能している可能性が報告されているが，その生理機能の多くについては（機能を持つか持たないかを含めて），まだほとんど解明されていない[13]．

上記の非コードDNAが進化上保持されてきた理由のうち，４番目と５番目については，従来の古典的な遺伝子概念の変更を迫るものだ．遺伝子DNAと機能タンパク質の単なる“橋渡し役”として，遺伝子のコピー産物と考えられがちであったRNA分子の制御と機能が，極めて多彩で複雑なものであった可能性が出てきたからである．しかも，ヘテロクロマチン形成におけるRNA転写の役割[14]など，反復配列から転写された機能的RNA分子が，１番目から３番目までにあげた非コードDNAの生体機能に深くかかわっている可能性は極めて強いだろう．しかし，現時点で新しく同定された非コードRNA分子の機能について，明確にわかっていることはほとんどなく，今後の研究の進展を待つより他にない．そこで，本稿の以下のセクションでは，１番目から３番目の理由に関する非コードDNAの機能，すなわち主に反復配列を含んだゲノム領域の機能について議論してみたい．

４．セントロメアとテロメアの反復配列

上記の非コードDNAが進化上保持されてきた５つの理由のうち，第１のケースで，比較的よく研究されているのが，セントロメアとテロメアの反復配列の役割である．セントロメアとテロメアは，それぞれ真核生物の染色体上に存在する生存に必須なシス因子である．セントロメアは，染色体上必ず１ヵ所（しかし２ヵ所以上あってはいけない），テロメアは線状染色体の末端部（すなわち染色体あたり２ヵ所）に存在する．例外は存在するが，多くの場合，セントロメアとテロメアには特徴的な反復配列が集積し，ヘテロクロマチン（heterochromatin）と呼ばれる特殊なクロマチン構造をとっていることが知られている[14),15),16)]．ヘテロクロマチン領域では，減数分裂時の組換えや遺伝子発現が抑制されている．

テロメアは，真核生物ゲノムに特有のTとGに富んだ６塩基前後の配列を単位とした反復配

列で，各染色体の両末端に存在する．ヒトの場合は，５’-TTAGGG-３’からなる数百コピーの縦列（タンデム：tandem）反復DNAで構成されている．最末端は，３’末端が少し突出した形をとり，テロメア結合タンパク質により防護されている．テロメアは，線状染色体の“正常な”末端を提示するために必須の機能を果たすと考えられている．すなわち，細胞は，染色体断裂などによって生じた異常な（修復すべき）末端と，本物の（修復してはいけない）末端を区別しなくてはならず，テロメアがその目印となっているのである．このようなTとGに富む短いタンデム反復配列の存在は，さまざまな生物種のテロメアに保存された特徴で，これはいわゆる“末端複製問題”（end−replication problem）を解決するために，進化の過程で生み出された戦略のひとつである．“末端複製問題”は，DNAの二重らせん構造を解明したワトソンによって半世紀以上前に提起されたDNA複製に関する矛盾で，「通常の複製酵素を使う限りにおいては，染色体の末端は複製できない」というものだ．複製酵素DNAポリメラーゼは，一定の方向（５’→３’）にしかDNA合成をおこなうことができず，さらに合成開始のためには必ずRNAプライマー（RNA primer）と呼ばれる鋳型DNAにとりつく足場を必要とする．そのため，少なくともプライマーの長さに相当する染色体３’末端のDNA合成が，理論上不可能になるのである．このため，何の対策もとらなければ，細胞が分裂をくりかえすたびに，染色体は徐々に短く削れていってしまい，最終的には消滅してしまうことになる．そこで細胞は，染色体末端をテロメア反復配列で囲い，テロメア専用のDNA合成酵素であるテロメラーゼ（telomerase）を用意することで，この問題を解決した[17]．テロメラーゼは，テロメア反復単位と相補的な配列を有するRNAをサブユニットとして持つリボヌクレオタンパク質（ribonucleoprotein）であり，そのRNA配列を鋳型にしてテロメアDNAを合成伸長する“逆転写活性”を持つ酵素である．複製のたびに短くなる染色体の末端をテロメラーゼが補修することで，一定の染色体長を確保しているのだ．このように，末端を少しずつ“付け足す”ためには，テロメアDNAのような短いタンデム反復配列が最適であることは，容易に想像がつくだろう．面白いことに，ショウジョウバエなどの一部の昆虫のゲノムには，TとGに富む典型的なテロメア配列がなく，テロメラーゼ遺伝子も持っていない．その代わりに，これらの生物では，染色体末端にトランスポゾン様因子が働きかけ，“自己犠牲的”（sacrificed）DNAとして，自らのDNAを削り取らせることで，宿主の染色体末端維持に機能していることが知られている[18]．ショウジョウバエの場合は，LINE配列が染色体末端に連なり，ここに逆転写されたLINE cDNAが，選択的にターゲッティングされることで，細胞分裂ごとに短縮する染色体末端の長さを維持している．宿主のゲノムの中で，自らのコピーを増やしてゆく寄生的な配列は，そのふるまいからしばしば“利己的”（selfish）DNAと呼ばれるが，この場合は，重要な遺伝子がほとんど存在しない染色体末端を，「いくらそこで増えても宿主の生存機能を阻害しない（したがって自らも生きながらえることができる）寄生の楽園」として選択したLINEが，同時に宿主の染色体

維持にとっても不可欠の存在として機能し，両者が共生関係を結んで進化したケースといえるのではないだろうか．前述したように，テロメアDNAの伸長を可能にするテロメラーゼは，RNAを鋳型にDNAを合成する逆転写活性を持つ逆転写酵素として機能する．もともと逆転写酵素は，RNAをゲノムとして持つレトロウイルスが，宿主内で自身のRNAゲノムをDNAに変換し，宿主DNAに埋め込むために進化したと考えられている．LINEなどのトランスポゾン様配列も，逆転写酵素をコードする転移因子で，ウイルスゲノムより派生したと考えられていることを踏まえると，ある時点で宿主に感染したウイルスゲノム，あるいはそれに似た寄生的なDNA配列の祖先が，宿主と共生的な相互進化を遂げ，ヒトとショウジョウバエでは，それぞれ違った様式で収斂（convergence）進化した結果，染色体末端維持に機能するようになったという仮説が成り立つかもしれない．実際，逆転写酵素で分子系統樹を作成してみると，テロメラーゼはLINEにもっとも近い位置に配される[19]．

一方，セントロメアは，各染色体の特定の一領域（ヒトの場合，数Mb以上にもおよぶ）を占めるDNA配列部分で，細胞の分裂期（M期）において，動原体と呼ばれる複合体を形成するための足場を提供する．動原体は，複製時に倍加した姉妹染色分体（sister chromatid）を娘細胞に均等に分配するために必要で，100種類以上のタンパク質が集積して作られた巨大複合体である．動原体は，分裂期に構築される紡錘体（mitotic spindle）の微小管（microtubule；2種類のタンパク質からなるポリマーで，細胞骨格の一種）に結合し，それを脱重合させることにより染色体を娘細胞の極方向に牽引する動力源となるため，その足場を提供するセントロメアDNAは，染色体分配に必須なシス因子である[20]．セントロメアDNA配列を欠いた染色体は，無動原体染色体（acentric chromosome）となり，その染色体が細胞分裂時に高頻度で欠落するため，対応する遺伝情報を受け取ることができなかった娘細胞は，ほとんどの場合，致死となる．逆に，染色体に余分なセントロメアDNA配列が存在すると，二動原体染色体（dicentric chromosome）となり，分裂期に両極から伸びてきた紡錘体微小管が，それぞれの動原体に付着して，ひとつの染色体を反対方向に引っ張りあう事態が発生するため，染色体の断裂が起こり，必要な遺伝情報を欠落するか，もしくは余分な量の遺伝情報を持った娘細胞が出現し，多くの場合，これも致死となる．このようにセントロメアDNAは，染色体あたり厳格に１ヵ所だけ動原体が形成されることを可能にする条件を備えていなければない．このような場合，特定の配列情報（コンセンサス配列）を動原体タンパク質の結合部位として進化させる戦略が，もっとも確実であるように思われるが，不思議なことに，そのような戦略をとっているのは出芽酵母（budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*）など，限られたごく一部の生物種だけである．われわれが研究してきた分裂酵母を含む多くの生物種の動原体では，明確なセントロメアDNAのコンセンサス配列は存在せず，周辺に反復配列が連なるヘテロクロマチン領域が横たわるという共通点が見出されるのみであった．このことは，反復配列領域に形成されるヘテ

ロクロマチンが，動原体形成に何らかの役割を担っているという可能性を示唆している．ヒトでは，セントロメア反復配列の主要なメンバーとして，アルフォイドと呼ばれる171bpの配列が，ヘテロクロマチン領域にMbオーダーでタンデム反復しており，そこにCENP−Bという動原体タンパク質の結合部位が存在することが明らかになっている[21]．

5．染色体再編成とヘテロクロマチンの機能

われわれは，3本の染色体を有する分裂酵母をモデル生物として，染色体再編成の過程で，ヘテロクロマチンがどのような役割を果たしているかを検定する実験系を開発した[22]．セントロメア破壊（centromere disruption）と名付けたこの方法では，Cre−loxPの遺伝子破壊システムを利用して，遺伝子の代わりに分裂酵母第1染色体のセントロメア全域を欠失させ，その後，細胞がどのような運命をたどるのかを追跡する（**図4**）．ある染色体のセントロメアが機能不全を起こす例は，自然界でもたびたび起こっているはずだが，これまではその様子を詳細に観察解析する実験系が存在しなかった．セントロメア領域が，周辺のタンデム反復配列間で偶発的に組換えを起こせば，セントロメアを含む環状DNAと無動原体染色体が形成される．この組換えを起こした細胞は，前述したように大多数が死滅すると考えられるが，ごく稀に，無動

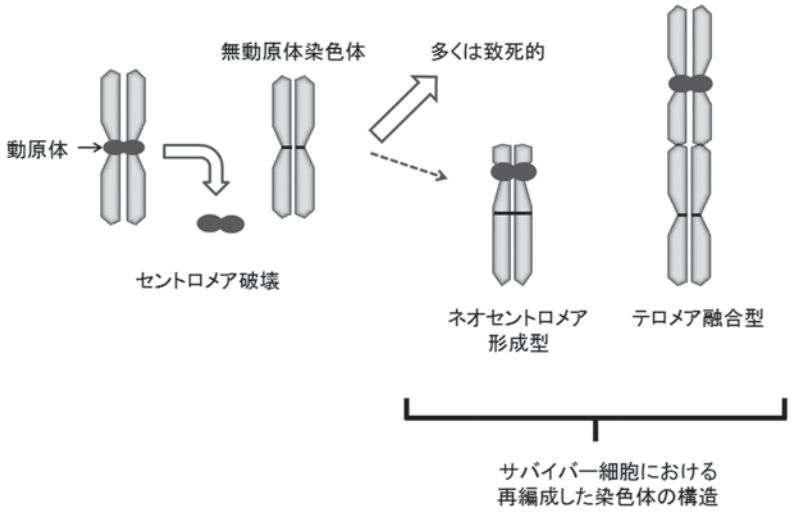

図4．分裂酵母のセントロメア破壊による2種類の染色体再編成現象

セントロメア破壊法により，分裂酵母の第1染色体のセントロメア全域を誘導的に欠失させ，無動原体染色体を作成すると，ほとんどの細胞は続く分裂期にゲノム情報を失い致死となる．しかし一部の細胞は，無動原体染色体を再編成させることにより生き残る（サバイバー細胞）．サバイバー細胞の染色体を調べると，動原体がテロメア近傍に移動したネオセントロメア形成型と，別の染色体にテロメア末端で融合し，その動原体の助けを借りて染色体分配を成功させるテロメア融合型の2種類に分類できた．

原体染色体の再編成をおこない，“生き残る”サバイバー細胞が現れることが報告されている[23]．実際の実験系では，無動原体染色体を持つ細胞を作成してその運命を追跡しようと思っても，単純にセントロメアがうまく破壊できなかったためにコロニーをつくる細胞，すなわちバックグラウンドが出現し，観察したいサバイバー細胞がその中に埋もれてしまう．そのため，セントロメア破壊法では，確実にセントロメアが破壊された細胞だけを遺伝マーカーで選別し，この稀に“生き残る”サバイバー細胞だけを，選択的に追跡できるように，分子遺伝学的な工夫を施してある．野生株（wild−type strain）細胞に対するセントロメア破壊の実験結果は，実に驚くべきものだった．細胞は，１）ネオセントロメア（neocentromere）の新規形成，あるいは２）他の染色体とのテロメア融合（inter−telomere fusion）という２つのまったく異なる染色体再編成をおこない，無動原体化した第１染色体を救済したのである（**図４**）．

ネオセントロメア形成は，染色体のセントロメア領域とはまったく異なる場所に，新規に動原体が形成される現象で，培養細胞などで偶発的に見つかるほか，精神遅滞や発育障害などの患者の染色体検査でも見つかることがあり，非常に稀なケースだが，ネオセントロメアを持つ家系も知られている[23]．われわれの実験系は，世界で初めて人為的にネオセントロメアを作成した例となった．われわれが作成した分裂酵母のネオセントロメア領域には，セントロメアDNAとの配列相同性がまったく無く，DNAの一次配列に依存しない動原体形成が起こったことがわかった．動原体という染色体上に単独で存在しなければならない構造体の場所を，DNA配列情報以外の方法で指定するにはどうしたらよいのだろうか．分裂酵母第１染色体の場合，ネオセントロメアは，ヘテロクロマチン構造をとるテロメア近傍に形成されることが明らかになった．ヘテロクロマチン上に形成されるのではなく，ヘテロクロマチンに隣接する場所に，動原体構造ができるのである．分裂酵母のセントロメアでは，ヘテロクロマチン構造をとる反復配列に挟まれる形で，動原体構造が構築される．テロメア反復配列上のヘテロクロマチンの真横に，一次配列非依存的にネオセントロメアが形成されたことから，おそらくヘテロクロマチンが，積極的に動原体構築に関与していることが推定できる．実際，ヘテロクロマチンを構築できない遺伝子変異株（mutant strain）で，同様のセントロメア破壊をおこなうと，テロメア融合に比べてネオセントロメア形成の比率が有意に減少することもわかった[22]．

一方，テロメア融合のパスウェイについては，本来，末端を他の染色体との融合から守るために存在するはずのテロメアが，セントロメアの欠損という緊急事態における再編成では，逆に他の染色体との融合の仲介起点として利用される点が，非常に興味深い．

これまで反復配列は，相同組換えを介して異常染色体を生み出す可能性があるために，ゲノムの不安定化因子としてとらえられてきた．ヒトをはじめとする多くの真核生物では，その不安定化因子をわざわざセントロメアやテロメアといった染色体維持の要となるシス因子の近傍に集積させ，さらにそれをヘテロクロマチンという特殊なタンパク質ネットワークで覆って，

その組換えを抑制しているのである．染色体が，このような一見まわりくどいしくみを持っているのは，実は緊急時の染色体再編成を可能にするための生命のしたたかな戦略なのかもしれない．

今回のわれわれの実験では，２点の予想外の結果がでた[22]．ひとつは，染色体の再編成を起こして生き残ってくる細胞が，数千細胞にひとつという極めて高い頻度で出現したことである．ゲノムの安定性という視点からは，たとえば，細胞分裂１回につき，DNAの変異が10^9ヌクレオチドあたりひとつしかないことや，分裂期の染色体の脱落頻度が0.001％以下しかないことと比べると，驚くほど高い比率である．しかも，これはうまく生き残れるような再編成がたまたま起こった細胞の比率である．再編成の結果，生き残れなかったものも含めれば，実際には，もっと高い頻度で再編成現象が起こっているはずである．これは，染色体の再編成を起こすことが，生命の生き残り戦略上，極めて有効で重要であったことを反映しているのかもしれない．

もうひとつの予想外の結果は，ネオセントロメア形成とテロメア融合という構造上まったく異なった再編成現象が，オーダーとしては，ほぼ同じ頻度で出現したことである．これは偶然とは考えにくく，２つの再編成現象が，同じくらいの頻度で起こるように，進化上の淘汰圧がかかった結果ではないだろうか．実際，われわれの予備的データでは，第２染色体のセントロメア破壊実験でも，ほぼ同様のオーダーで２つの再編成現象が起こるという結果を得ている．一般に，強い放射線を浴びたり，DNA複製に大きな障害が発生して複製途中の状態が長時間続いた場合，染色体の断裂などにともなう異常染色体が，細胞内に同時に複数形成されることがあるが，そのようなときには，この２つの再編成現象が同じような頻度で出現することによって，より多様な染色体構成を有する細胞を生み出すことができ，生き残りのチャンスを広げることができるのだろう．

６．非コードDNAを起点とした染色体の再編成と種分岐

非コードDNAが進化上保持されてきた理由のうち，第２と第３の可能性は，いずれも染色体の大規模な構造変換に関連している（**図５**）．代表的な構造変換として，反復配列間の相同組換え（homologous recombination）をきっかけにしたDNA配列の重複，欠失，逆位，転座，転移などが知られている．さらに反復配列は，セントロメア欠失やテロメア融合などを誘導し，それにともないネオセントロメア形成，テロメア融合，セントロメア不活性化[24]などの染色体再編成を引き起こすこともある（**図４**）．組換えを介さない再編成としては，細胞分裂時の染色体分配異常による染色体数変化なども挙げられよう．これらの染色体の構造変化は，進化上，種の多様性を飛躍的に増大させる分岐点となることができる．実際，染色体の再編成と染色体数の変化によって，真核生物のゲノムは進化的変遷を遂げるのである．ゲノムプロジェ

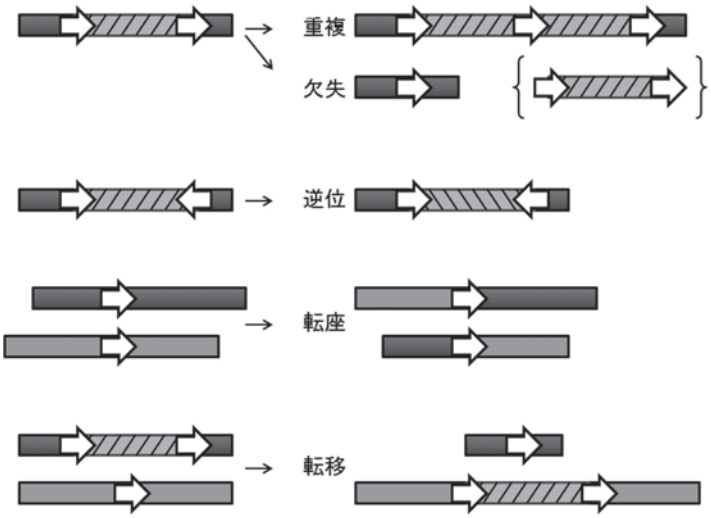

図 5． 反復配列間の相同組換えを介した染色体再編成の基本パターン

DNA配列の重複（duplication），欠失（deletion），逆位（reversion），転座（translocation），転移（transposition）の多くは，ゲノムに内在する反復配列間の相同組換えにより誘導される可能性が高い．重複は，ゲノムの離れた場所で起こることもある．また，転移は，もとの配列がゲノムから欠落する場合と，そのまま残る場合がある．図中の白抜きの矢印は，相同反復配列を示す．

クトの完成は，この染色体の進化過程について，多くの知見をもたらした．たとえば，マウスとヒトのゲノムを比べると，両者の多くの領域でDNA配列自体は大変よく似ていることがわかった．DNA配列が似ていて，対応する遺伝子も同じ順序で同じ転写方向で並んでいる部分を，シンテニー領域（syntenic segment）と呼ぶが，そのパターンを分析すると，進化の過程で，染色体の再編成がたびたび起こったことが読み取れるのだ．原則として，ヒトのゲノムを，平均の長さ16Mbの342個の断片にして，順序を変えてつなぎ合わせると，マウスのゲノムの配列パターンを再構築することができる．このパターン解析によれば，マウスとヒトのゲノムはおよそ300回の再編成を経て進化したという仮説を立てることができるそうだ[4]．

以上のような染色体の大規模な再編成の原因は，たとえば，トランスポゾン様因子の転移，あるいは染色体上の反復因子の相同配列間の組換えなど，さまざまな可能性を考えることができるだろう．しかし，1）大規模な遺伝子数や遺伝子発現パターンの変化を引き起こすこと，もしくは，2）重複した遺伝子が遺伝子ファミリーとして独立に変異することを許容するという特性を持つ点で，反復配列を起点とした染色体再編成は，点変異の蓄積とは時間的スケールの異なった，進化上，急速な突然変異を誘導することができる（変異速度を加速させる特性）．同時に，再編成した染色体を持つ個体と野生型の個体が有性生殖をおこなった結果生まれたF_1雑種は，主に減数分裂時の相同染色体組換えの異常に起因する致死性の配偶子を産生す

ることから，その子孫を残すことができない．一方，同じパターンの染色体再編成を起こした個体間の有性生殖で生まれたF_1世代は，問題なく減数分裂をおこなうことができるため，結果として生殖的隔離が起こり，急速に種の分岐が進むと考えられる（生殖隔離を誘導する特性）．この２つの特性を反映した変化が同時に進行するので，反復配列を起点とした染色体再編成が起こった細胞では，比較的短いタイムスケールで，種分岐が誘導されることになるのかもしれない．

一般に，ゲノムでは，数ヌクレオチドからゲノムまるごと全部に至るまで，さまざまな単位で繰り返し重複が起こり，その大きさが増加してゆく．重複した部分に遺伝子があると，もともとの遺伝子かそのコピーのどちらかは，機能を失う変異も含めて自由に変異を蓄積し多様化することができるため，機能進化の重要な原動力となることができる．免疫グロブリン遺伝子のスーパーファミリーなどは，そのよい例である[4]．

分裂酵母の場合，数千細胞にひとつという極めて高い頻度で，ヘテロクロマチン近傍へのネオセントロメア形成やテロメア融合が，多様な（しかし決まった組み合わせパターンの）再編成染色体を生み出すことにより，種分岐を促進しているのではないだろうか．再編成した染色体を持つ細胞と野生型細胞の間のF_1雑種では，前述したように，ほとんどの場合，子孫を残すことができず不妊となる．これに対し，一定のパターンで比較的高頻度に再編成染色体を有する細胞が生じるならば，同じ再編成パターンの細胞同士が出会って子孫を残す確率が増加する．この結果，生殖隔離が起こるので，種分岐のきっかけになることができるだろう．予想外に高い再編成現象の発生率は，遺伝情報の維持というゲノムの安定性と，種分岐の原動力として働くためのゲノムの不安定性が，２つの相反する事象として，なんとか折り合いをつけた進化的帰結なのかもしれない．

７．タンデム反復配列の組換え抑制とヒストン転写系の関係

最後に，現在，われわれが開発しつつある新しい染色体再編成の誘導系について，簡単に紹介しておきたい．この実験系は，分裂酵母のコアヒストンの細胞周期依存的転写活性化に関与するAms2遺伝子の解析を通して，開発された．Ams2遺伝子は，GATAタイプの転写因子をコードし，その遺伝子破壊株（gene disruptant strain）細胞では，コアヒストン（Histone H2A，H2B，H3，H4）遺伝子群の複製期（S期）特異的な転写活性化が起こらない[25]．Ams2タンパク質は，これらコアヒストン遺伝子上流にあるコンセンサス配列に結合するので，転写因子として直接活性化に関わっているらしい[25]．Ams2破壊株細胞では，DNAが複製され倍加されるS期に，新規合成されるヒストンの供給が十分におこなわれないため，ゲノム全域にわたって，“ゆるんだ”ヌクレオソーム（nucleosome）構造が出現していると考えられる．その結果，Ams2破壊株では，極めて興味深いゲノムの再編成細胞が頻出していることを示すデータ

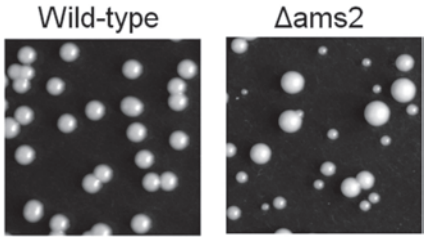

図６． 分裂酵母Ams*2*破壊株のコロニー形成能

分裂酵母のAms*2*遺伝子の一倍体破壊株（Δ*ams2*）を作成し[26]，そのコロニー形成能をYPD完全培地プレート上で観察すると，野生株（wild-type）が均質な大きさのコロニーを形成するのに対し，Ams*2*破壊株（Δ*ams*2）は，常に大小さまざまな大きさのコロニーを形成する．小さいコロニーあるいは大きなコロニーを選択して，新しくYPDプレートに引き直しても，やはりそこからは大小の不均一なコロニーが発生する．これは，Δ*ams2*のゲノムにある決まったパターンの構造変化が高頻度に起こっており，その変化の一部が増殖速度に影響していると仮定すると，説明できる．

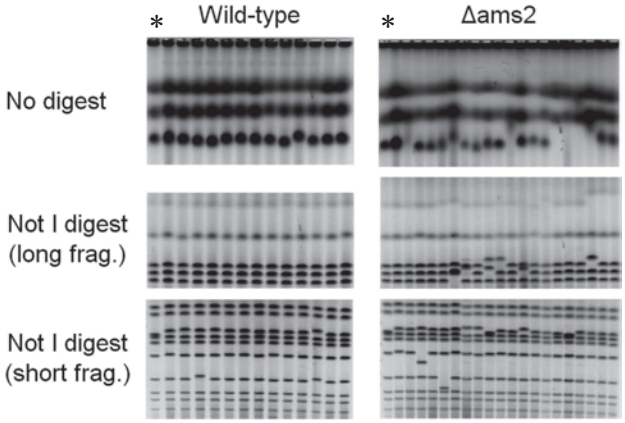

図７． 分裂酵母Ams*2*遺伝子破壊株細胞のPFGEによるゲノム解析

約６ヵ月間，YPDプレート上で継代培養した野生株（HM123株）およびΔ*ams2*株から，ゲノムDNAをマイルドな方法で抽出し，それぞれ制限酵素で未処理のまま（No digest），もしくは８bpカッターである*Not* Iで処理した後（Not I digest），パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE：pulse field gel electrophoresis）した．電気泳動後，ゲルを臭化エチジウム染色し，DNAを可視化した．未処理の場合，３本の染色体が，分離して観察できる（上から，第１，第２，第３染色体）．*Not* I処理したゲノムは，それぞれ適切な電気泳動条件で流すと，個々の*Not* I切断ゲノム断片を分離して解析することができる．第３染色体には，*Not* I制限酵素サイトが存在しないので，Not I digestのパネルで見えているバンドの変動は，第１および第２染色体のゲノムDNAの変化を反映している．それぞれのレーンは，約６ヵ月間独立に継代培養した株のゲノムDNAサンプルを流しているが，＊印は培養前の野生株のDNA（ローディングコントロール）．野生株に比べ，Δ*ams2*株では，高頻度にゲノム構造の変化が誘発されていることがわかる．

が集まりつつある．

Ams2破壊株は，不均一なコロニーを形成する（**図 6**）．それぞれのコロニーを分離し，独立に固形培地で生育させ，数日おきにコロニーを植継ぎながら，半年間培養してみた．対照実験として同じ条件で，野生株細胞も培養した．その後，それぞれ独立培養した株のゲノム構造を解析した．ゲノムDNAを*Not* I消化後，そのバンドパターンをパルスフィールドゲル電気泳動法により分析した．その結果，Ams2破壊株細胞では，高頻度でゲノム構造に変化がみられた（**図 7**）．未処理のゲノムDNAをパルスフィールドゲル電気泳動し，３本の染色体の長さをみると，驚くべきことに染色体融合により２本の染色体に変化しているものや，特に第３染色体の長さが激しく変動しているものなどが見つかった．野生株ではこのようなゲノムの不安定性は見られず，Ams2遺伝子の欠損による影響であることが明らかとなった．われわれが知る限り，これほど短期間にゲノム構造が変化する株は，Ams2破壊株をおいて他に存在しない．現在，このゲノム構造の変化が，どのような要因により引き起こされているのかを解析中である．予備的な結果によれば，ゲノム内に散在するタンデム反復配列間で相同組換えが起こる結果，数十kbから数百kbの単位で，長大なゲノム重複が起こっているようである．同様にゲノム欠失も起こっていると考えられるが，実験には一倍体を使用しているため，ゲノム欠失体の多くは致死となり，解析サンプルにならないのであろう．ゲノム欠失体を検出するためには，今後，Ams2遺伝子の二倍体ホモ破壊株細胞を作成し，同様の解析をおこなう必要があるかもしれない．

セントロメア破壊法や，Ams2遺伝子破壊株を利用することで，これまで人為的に作出することが困難であった染色体の再編成細胞を取得できるようになった．セントロメア破壊法では，染色体融合株やネオセントロメア形成株が作れる[22),24)]．Ams2遺伝子破壊株を利用したヒストン発現異常誘発系では，タンデム反復配列間組換えに起因するゲノム重複株が取得できる．今後，ヘテロクロマチン関連遺伝子の破壊株や，さまざまな組換え欠損変異株を用いて，種分岐に重要な染色体再編成過程にどのような遺伝子システムが関与しているかを解き明かしていく予定である．一例として，すべての染色体が１本につながった１本染色体分裂酵母*ponebe*と野生株分裂酵母*pombe*の交配実験を，**図 8** に示した．１本染色体分裂酵母*ponebe*は，セントロメア破壊法を駆使し，テロメア融合を繰り返し発生させることで，われわれが人為的に作成した染色体再編成株である（未発表）．予想通り，これらの２株は，その遺伝子組成はほとんどまったく変わらないにもかかわらず，四分子解析の結果，子孫細胞の産生に著しい異常を示した．しかし１本染色体酵母間の交配では，まったく正常に子孫細胞を産生することができた．これは，染色体再編成の結果，種分岐につながる生殖隔離が起こっていることを，人為的操作で再現することに成功した実験例である．

細胞は，さまざまな障害を感知し，それを修復する機能を備えている．染色体に断裂や欠失

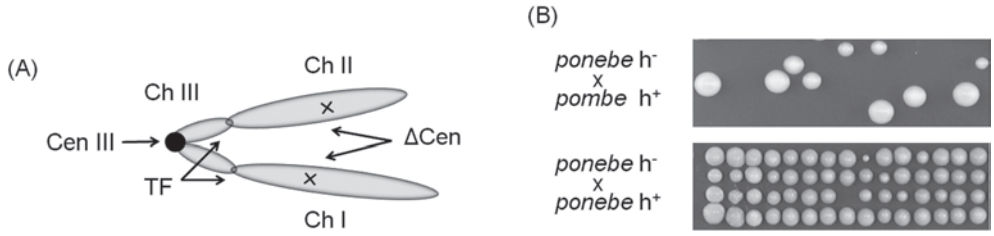

図８． １本染色体酵母の交配実験

（A）第１染色体（Ch I）および第２染色体（Ch II）のセントロメア破壊（ΔCen）を続けておこなうことにより作成した染色体が１本しかない分裂酵母（*ponebe*）の染色体構造の模式図．第３染色体（Ch III）の動原体（Cen III）のみを用いて，染色体分離がおこなわれる．Ch IIIのテロメア末端は，それぞれ動原体を失ったCh IおよびCh IIとテロメア融合（TF：telomere fusion）している．（B）１本染色体分裂酵母*ponebe*と通常の３本の染色体を持つ分裂酵母*pombe*の交配実験．四分子解析法により，h^-株とh^+株をSPA培地上で掛け合わせ胞子形成させ，YPD完全培地上に４つの胞子を展開，培養した．*ponebe*同士の掛け合わせでは，正常な４つの胞子ができ，子孫細胞も正常にコロニー形成することができたのに対し，*ponebe*と*pombe*の掛け合わせでは，胞子形成自体に異常がみられ，うまく４つの胞子ができたものについても，その子孫細胞は正常にコロニー形成できないものが多数を占めた．

などの重篤な障害が発生したとき，クロマチンの状態を変化させることで，ゲノム内に散在する反復配列間の組換えを“あえて”誘発するような何らかのシグナルが発動する可能性はないだろうか．今後，さまざまな変異株を用いた分子遺伝学的手法が駆使できる分裂酵母で，セントロメア破壊法とヒストン発現異常誘発系を利用した染色体の再編成実験を推進することにより，種分岐にかかわる新しいシグナル系を見出すことができるかもしれない．

本稿で紹介した研究は，平成23年度北海学園学術研究助成により，支援を受けた．本稿で紹介した未発表データは，久留米大学分子生命科学研究所の増田史恵研究員，副島朗子研究員との共同研究である．

参考文献

１）Watson, JD, Crick FH. : Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid, *Nature*, **171** (4361), pp.964−967, 1953.

２）Brown TA. : Genomes 3, *Garland Science*, 2006.

３）Colbourne JK et al., : The ecoresponsive genome of Daphnia pulex, *Science*, **331** (6017), pp.555−561, 2011.

４）Hartwell LH et al., : Genetics : From Genes to Genomes (3rd edition), *McGraw−Hill Science/Engineering/Math*, 2006.

５）López−Flores I, Garrido−Ramos MA. : The repetitive DNA content of eukaryotic genomes, *Genome Dyn*., **7**, pp.1−28, 2010.

６）D'Ambrosio C et al., : Identification of cis−acting sites for condensin loading onto budding yeast chromosomes, *Genes Dev*., **22** (16), pp.2215−2227, 2008.

7）Levin HL, Moran JV. : Dynamic interactions between transposable elements and their hosts, *Nat Rev Genet.*, **12** (9), pp.615−627, 2011.
8）Ohno S. : Patterns in genome evolution, *Curr Opin Genet Dev*., **3** (6), pp.911−914, 1993.
9）Wolfe KH, Shields DC. : Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome, *Nature*, **387** (6634), pp.708−713. 1997.
10）Norris AD, Calarco JA. : Emerging Roles of Alternative Pre−mRNA Splicing Regulation in Neuronal Development and Function, *Front Neurosci*., **6**, pp.122, 2012.
11）Hainer SJ, Martens JA. : Transcription of ncDNA : Many roads lead to local gene regulation, *Transcription*, **2** (3), pp.120−123, 2011.
12）Carninci P et al., : The transcriptional landscape of the mammalian genome, *Science*, **309** (5740), pp.1559−1563, 2005.
13）ENCODE Project Consortium. : An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome, *Nature*, **489** (7414), pp.57−74, 2012.
14）Grewal SI. : RNAi−dependent formation of heterochromatin and its diverse functions, *Curr Opin Genet Dev*., **20** (2), pp.134−141, 2010.
15）Stimpson KM, Sullivan BA. : Epigenomics of centromere assembly and function, *Curr Opin Cell Biol*., **22** (6), pp.772−780, 2010.
16）Luke B, Lingner J. TERRA : telomeric repeat−containing RNA, *EMBO J*., **28** (17), pp.2503−2510, 2009.
17）Collins K. : Single−stranded DNA repeat synthesis by telomerase, *Curr Opin Chem Biol*., **15** (5), pp.643−648, 2011.
18）Silva−Sousa R, López−Panadès E, Casacuberta E. : Drosophila telomeres : an example of co−evolution with transposable elements, *Genome Dyn*., **7**, pp.46−67, 2010.
19）Eickbush TH. : Telomerase and retrotransposons : which came first?, *Science*, **277** (5328), pp.911−912, 1997 ;
20）O'Connell CB, Khodjakov A, McEwen BF. : Kinetochore flexibility : creating a dynamic chromosome−spindle interface, *Curr Opin Cell Biol.*, 24(1), pp.40−47, 2012.
21）Ohzeki J, Nakano M, Okada T, Masumoto H. : CENP−B box is required for de novo centromere chromatin assembly on human alphoid DNA, *J Cell Biol*., **159** (5), pp.765−775, 2002.
22）Ishii K et al., : Heterochromatin integrity affects chromosome reorganization after centromere dysfunction, *Science*, **321** (5892), pp.1088−1091,2008.
23）Marshall OJ et al., : Neocentromeres : new insights into centromere structure, disease development, and karyotype evolution, *Am J Hum Genet*., **82** (2), pp.261−282, 2008.
24）Sato H et al., : Epigenetic inactivation and subsequent heterochromatinization of a centromere stabilize dicentric chromosomes, *Curr Biol*., **22** (8), pp.658−667, 2012.
25）Chen ES, Saitoh S, Yanagida M, Takahashi K. : A cell cycle−regulated GATA factor promotes centromeric localization of CENP−A in fission yeast, *Mol Cell*, **11** (1), pp.175−187, 2003.
26）Takayama Y, Takahashi K. : Differential regulation of repeated histone genes during the fission yeast cell cycle, *Nucleic Acids Res*., **35** (10), pp.3223−3237, 2007.