

日本 RNA 学会から再現性に疑義が指摘された論文に関する最終調査報告

東京大学工学系研究科調査委員会

目次

1. 序 論
2. 日本 RNA 学会から再現性に疑義があると指摘された 12 篇の論文の概要
3. 調査の経過
4. 調査を行った 4 篇の論文の問題点と調査結果
 - 4.1 調査目的および調査委員会が認識した 4 篇の論文の問題点
 - 4.2 調査方法
 - 4.3 調査結果
 - 4.4 調査結果の分析
5. 結 論
6. 調査委員会

1. 序論

平成17年4月1日、日本RNA学会 渡辺公綱 会長より、本学工学系研究科 平尾公彦 研究科長に対し、化学生命工学専攻 多比良和誠教授らが関係する12篇の論文の実験結果の再現性等に関し調査依頼があった。科学的立場からその再現性、信頼性について調査をするため、工学系研究科に調査委員会を設置し、実験結果の再現性の検証が比較的容易であると判断された論文4篇(2章に示す論文3, 7, 8, 12)を原著論文の中から選定し、多比良教授に実験記録等の提出を求め、検討を進めてきた。その結果、日本RNA学会から指摘を受けた多くの論文に対する実験ノート、生データは残っておらず、実験結果の信頼性を確認するには至らないことが明らかとなった。平成17年9月、日本RNA学会に対し、「論文の中に示された実験結果を裏付ける生データの存在を確認するには至らなかった」とする中間報告を行った。

科学研究を遂行するにあたり、当然のこととして「客観的資料・データ等の管理保存」を行い、「その論文の正しさを客観的に説明する責任」を果たす必要がある事は自明の理であるが、当該著者らがそれらを行っていない状況にあることは極めて適切性を欠いた状態である。客観的な実験ノート、生データが管理保存されておらず、再実験等により再現性を示せない論文は捏造されたものとされても致し方ないと判断される。そのような状態を重く受け止め、当該著者らにかけられた嫌疑を晴らす機会として、論文記載と同じ実験材料・試料を用いて再実験を行い、その詳細な結果と実験のプロトコルを平成17年末までに提出するよう要請した。しかしながら、十分な時間的余裕をもって再実験を行えると考えられる17年末になっても、論文の中に示された実験結果の再現には至らなかった。平成18年1月に、再度学会に「現段階では論文の中に示された実験結果の再現には至っていないという結論となった」ことを報告した。

上記の調査の過程で、論文記載の実験の生データとして提出されたものの中に明らかに捏造されたデータが含まれていることが判明するとともに、本来、実験によって大腸菌内で合成され、酵素活性が発現するか否かを検証されるべき hDicer が、再実験中に川崎助手により個人的に購入されているなど、再実験そのものを疑せしめる事実が発覚した。また、論文記載の hDicer 発現ベクターの構築方法が単純な記載ミスであったとして、新たに hDicer 発現ベクターの構築方法のプロトコルとこれに用いたとする6種類の DNA プライマーの中の3種類の PCR 用の DNA プライマーの塩基配列情報がその合成記録とともに提出された。しかし、その中の1種類の DNA プライマーの塩基配列は hDicer の塩基配列とは全く異なり、PCR 用の DNA プライマーになり得ないものであることが判明した。さらに、当該著者らが hDicer 発現ベクターの構築を行ったとしている期間に外部業者から納入された DNA プライマーの塩基配列記録の中にも、hDicer のクローニングに用いることが可能な制限酵素サイトの塩基配列を含む PCR 用 DNA プライマーは存在しなかった。これらの事実は、実験ノート、生データが残っていないこと、容易に実験結果が再現されないことと相俟って、論文の正当性を強く疑わせるものとなっている。

独立行政法人産業技術総合研究所においては、当調査委員会の9月の発表を受け、当該研究所の「ミスコンダクト規程」に基づき、調査を行い、平成18年3月3日に「調査対象となった産総研協力研究員川崎氏が筆頭著者の論文は、研究記録がほとんど保存されておらず、論文の実験結果を系統的に裏付ける資料は提出されなかったため、研究ミスコンダクトの有無に関し、事実の裏づけに基づく判断は極めて困難であった。しかし、論文の作成過程で責任著者である多比良研究センター長と生データで議論したことが無いこと、また研究試料の作成方法について責任著者と異なる説

明があったことなどから、公表された論文において研究ミスコンダクトが行われたことを否定できないと判断した。」等とする報告を行っている。

本報告書は、日本 RNA 学会から再現性に疑義があると指摘された多比良教授らの論文に関して本調査委員会が行ってきた調査の最終報告書である。

2. 日本 RNA 学会から再現性に疑義があると指摘された 12 篇の論文の概要と問題点

以下に日本 RNA 学会から指摘を受けた 12 篇の論文とその学会からの指摘事項を示す。

1. Kawasaki H, Song J, Eckner R, Ugai H, Chiu R, Taira K, Shi Y, Jones N, Yokoyama KK. P300 and ATF-2 are components of the DFR complex, which regulates retinoic acid- and E1A-mediated transcription of the c-jun gene in F9 cells. *Gene Dev.* 1998 12(2): 233-245.

論文概要：アデノウイルス E1A と会合するタンパク質 P300 と転写活性化因子 ATF-2 が、レチノン酸処理や E1A 感染によって誘導される F9 細胞の分化に必要な c-jun 遺伝子の転写活性化を調節する分化制御因子 DRF 複合体の構成成分であることを明らかにした。また、レチノン酸処理や E1A 感染後のプロテイン・キナーゼ C α による ATF-2 のリン酸化が、F9 細胞での c-jun 遺伝子のトランス活性化に必要なことを見出した。

問題点：実験の再現性についての疑義が提出されている。

2. Kawasaki H, Schiltz L, Chiu R, Itakura K, Taira K, Nakatani Y, Yokoyama KK. ATF-2 has intrinsic histone acetyltransferase activity which is modulated by phosphorylation. *Nature.* 2000 May 11; 405(6783): 195-200.

論文の概要：転写因子 ATF-2 がヒストン・アセチルトランスフェラーゼ(HAT)であり、インビトロで特異的にヒストン H2B と H4 をアセチル化することを見出した。また、HAT ドメイン中のモチーフ A は c-AMP 応答要素(CRE)依存的な転写促進に関与することを見出した。ATF-2 の HAT 活性向上と CRE 依存的な転写促進が ATF-2 のリン酸化と共に起こることから、ATF-2 がクロマチン構成成分に直接的に作用を及ぼすことによって転写を活性化することができる新しいクラスの配列特異的因子である可能性を示した。

問題点：実験の再現性についての疑義が提出されている。

3. Kawasaki H, Taira K. Hes1 is a target of microRNA-23 during retinoic-acid-induced neuronal differentiation of NT2 cells. *Nature.* 2003 Jun 19; 423(6942): 838-842.

論文の概要：DNA データベースを用いたホモロジー解析により、マイクロ RNA-23(miRNA-23) が転写リプレッサー Hairy enhance of split(Hes1)の mRNA の終止コドンのす

く上流のコーディング領域の一部と77%の相補的な配列を持つことを見出した。レチノイン酸誘導によりニューロン細胞に分化する NT2 細胞に miRNA-23 を発現させると、Hes1 の mRNA 量は変化しないものの Hes1 の発現量は抑制されること、また、miRNA に対する siRNA を同時に細胞内に導入すると Hes1 の発現量が増加してレチノイン酸誘導による NT2 細胞の神経分化を阻害したことから、miRNA-23 が Hes1 の mRNA を標的として転写後レベルで Hes1 の発現を制御し、NT2 細胞のレチノイン酸誘導神経分化に関わっていることを明らかにした。

問題点：ホモロジー解析によって miRNA-23 の標的 mRNA と同定した遺伝子は、転写リプレッサー-Hes1 由来のものではなく、ヒト ES1 ホモログ由来のものであった。miRNA-23 と77%程度のホモロジーを示す遺伝子は数多く有り、一般的にマイクロ RNA の標的 mRNA を配列情報のみから推測することはほとんど不可能にもかかわらず、何故、転写リプレッサー-Hes1 遺伝子（実際にはヒト ES1 ホモログ遺伝子）が標的遺伝子候補として選ばれたのかが不明確である。また、実験に用いられた市販の抗転写リプレッサー-Hes1 抗体の特異性が低いため、ELISA 法によって転写リプレッサー-Hes1 を定量することは困難であるとの専門家の指摘がある。

4. Retraction in : Kawasaki H, Taira K. Nature. 2003 Nov 6; 426(6962): 100.

撤回理由の概要：遺伝子の命名法が混乱していたため、遺伝子の同定を間違えた。NT2 細胞における我々の実験は転写リプレッサー-Hes1 のタンパク質レベルは miRNA-23 によって減少することを明らかにした。miRNA-23 は転写リプレッサー-Hes1 の mRNA とも結合する可能性を示唆する未発表データを我々は持っているが、転写リプレッサー-Hes1 のタンパク質レベルが miRNA-23 に応答して減少するという発見に対する説明は、その機構と特異性に関して、まだ明らかではない。我々の間違いから解釈の困難さが生じたため、表題の論文を謹んで撤回する。

5. Kawasaki H, Warashina M, Kuwabara T., Taira K. Helicase-attached novel hybrid ribozymes. Methods Mol Biol. 2004; 242: 237-243.

6. Kawasaki H, Taira K. Identification of genes by hybrid ribozymes that couple cleavage activity with the unwinding activity an endogenous RNA helicase. EMBO Rep. 2002 May; 3(5): 44-450.

論文の概要：上記5の論文では RNA 切断活性と RNA ヘリカーゼ eIF4A1 の RNA 高次構造巻き戻し活性とをカップルさせるために、eIF4A1 と相互作用する Poly(A) 結合タンパク質の結合モチーフである poly(A) 配列をハンマーヘッド・リボザイムの 3' 側に導入した新規リボザイムの構築方法について述べている。また、6の論文では、この新規なハイブリッドリボザイムが標的 mRNA の二次構造、三次構造には無関係に mRNA 上の多くの標的部位を効率的に切断できることを示した。さらに、mRNA に対するランダムな基質結合アームを持つハイブリッド・リボザ

イムのライブラリーを導入した細胞の表現型が変化した場合、その細胞に導入されたハイブリッド・リボザイムの基質結合アームの塩基配列を調べることで、そのハイブリッド・リボザイムが標的として切断した遺伝子、すなわち表現型を決定する遺伝子を迅速に同定できることを、HeLa 細胞の Fas を介するアポトーシス経路に関与する遺伝子群を例として示した。

問題点：某製薬会社が上記の論文に関する特許を購入し、ベンチャーをスタートさせたが、そこではこのハイブリッド・リボザイムの効果を再現できていない。RNA の切断活性と mRNA の高次構造をほどく内在的ヘリカーゼの活性とを併せ持つハイブリッド・リボザイムというのが本当に有効なのか疑問視されている。

7. Kawasaki H, Suyama E, Iyo M, Taira K. siRNAs generated by recombinant human Dicer induce specific and significant but target site-independent gene silencing in human cells. *Nucleic Acid Res.* 2003 Feb 1; 31(3): 981-987.

論文の概要：活性型組み換えヒト Dicer (re-hDicer) を大腸菌で発現することに成功した。外来性のピューロマイシン耐性遺伝子、内在性の H-ras, c-jun, c-fos などの遺伝子を鋳型に T7 RNA ポリメラーゼや SP6 RNA ポリメラーゼによって調製された 2 本鎖 RNA を、この re-hDicer を用いて in vitro で切断して 21-23 塩基長の siRNA を作製した。このような siRNA の RNA 干渉活性によって、それぞれの遺伝子の発現を特異的に抑制できることから、この方法で調製した siRNA がほ乳類動物細胞の遺伝子の不活性化のための強力な武器となることが示された。

問題点：この論文で記載されている大腸菌の発現系で活性型の re-hDicer を作製する追試実験に誰も成功していない。

8. Kawasaki H, Onuki R, Suyama E, Taira K. Related Articles, Links Abstract. Identification of genes that function in the TNF-alpha-mediated apoptotic pathway using randomized hybrid ribozyme libraries. *Nat Biotechnol.* 2002 Apr; 20(4): 376-380.

論文の概要：mRNA に対するランダムな基質結合アームを持つハイブリッド・リボザイムのライブラリーを導入した MCF-7 細胞の中で、アポトーシスを誘導する腫瘍壊死因子 TNF- α を加えても生き残ったクローンから回収したハイブリッド・リボザイムの塩基配列を解析し、DNA データベースを探索することにより、TNF- α を介したアポトーシス経路に関与する多くの前アポトーシス遺伝子を同定した。

9. Suyama E, Kawasaki H, Nakajima M, Taira K. Related Articles, Links Free in PMC
Identification of genes involved in cell invasion by using a library of randomized hybrid ribozymes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003 May 13; 100(10): 5616-5621. Epub 2003 Apr 28.

論文の概要：mRNA に対するランダムな基質結合アームを持つハイブリッド・リボザイムのライブラリーを導入した繊維芽細胞 NIH3T3 細胞の中で接着因子フィブロネクチンに対して遊走性を示し、組織侵入性が亢進した細胞を、細胞外マトリックスゲルをコートした孔径 12 μ m のメンブレンフィルターを用いた組織侵入性アッ

セイ法により選択した。このクローンから回収したハイブリッド・リボザイムの塩基配列を解析し、DNA データベースを探索することにより、Gem GTPase 遺伝子やいくつかの未同定遺伝子が NIH3T3 細胞の組織侵入に関わっていることを明らかにした。

10. Kawasaki H, Tsunemi M, Iyo M, Oshima K, Minoshima H, Hamada A, Onuki R, Suyama E, Taira K. A functional gene discovery in cell differentiation by hybrid ribozyme and siRNA libraries. *Nucleic Acid Res Suppl*; 2002;(2) : 275-276.

論文の概要：ランダム化した基質結合部位を持つハイブリッド・リボザイムと siRNA の集団を用いてレチノイン酸誘導型の細胞分化に必要な機能性遺伝子の同定を試み、数個の分化遺伝子の同定に成功した。

11. Kawasaki H, Kuwabara T, Miyagishi M, Taira K. Identification of functional genes by libraries of ribozymes and siRNAs. *Nucleic Acid Res Suppl*; 2003;(3): 331-332.

論文の概要：ランダム化した基質結合部位を持つハイブリッド・リボザイムと U6 または t-RNA 駆動型 siRNA を細胞に導入することによりアポトーシス、ガン転移、細胞分化などの経路の中に存在し、表現型に関連する遺伝子が迅速に同定できるようになった。このようにして同定された機能性遺伝子は、コーディング領域のみならず非コーディング領域からも転写される遺伝子であった。

問題点：上記 8 から 11 のいずれの論文にも再現性が無く、RNA ヘリカーゼが結合したランダム化リボザイムの効力も再現できていない。ランダム化した基質結合部位を持つハイブリッド・リボザイムを用いた Gene Discovery という方法論にも疑問が呈されている。

12. Kawasaki H, Taira K. Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNA in human cells. *Nature*. 2004 Sep 9; 431(7005): 211-217.

論文の概要：E-カドヘリンや erbB2 などの遺伝子のプロモーター内の CpG アイランドを標的とした合成 siRNA が、ヒト細胞 MCF-7 の DNA のメチル化とヒストン H3 のメチル化を引き起こした。また、二種類の DNA メチルトランスフェラーゼのどちらか一方の発現を特異性の高い siRNA で阻害すると、siRNA による DNA のメチル化は阻害された。このように、特定の遺伝子のプロモーター内の CpG アイランドを標的とした siRNA はヒト細胞中で DNA メチルトランスフェラーゼに依存した DNA のメチル化によって転写レベルで遺伝子サイレンシングを誘導できることを明らかにした。

問題点：細胞の外部から導入した RNA でクロマチンを標的とする場合には核内輸送システムをカップルさせることが必須であるというのが、これまでの一般的な考え方である。しかし、本論文では shRNA の高発現系を用いて細胞質で siRNA を過剰発現させるだけでクロマチンのサイレンシングを実現できたと報告している点が腑に落ちない。さらに、バイサルファイト法により DNA メチル化部位を検出するための DNA プライマーの配列は後で「検出不能」であることが判明したため、後日その訂正記事を Nature 誌に掲載している。

3. 調査経過

以下に調査委員会が行った調査経過を示す。

1. 平成17年4月1日の日本RNA学会渡辺公綱会長からの依頼に基づき、研究科内に調査委員会を4月11日に発足させた。
2. 実験結果の再現性の検証が比較的容易であると判断された論文4篇(論文3, 7, 8, 12)を選び、その再現性を検証するために実験記録と実験試料の提出を、7月7日に多比良教授に求めた。
3. 多比良教授より7月19日に提出された実験記録等を精査し、8月6日開催の調査委員会で、いずれの記録も実験の生データであることを明確に証明するものではないことを確認した。
4. 以上の結果に基づき、8月10日に調査委員会は工学系研究科長に中間報告を行い、実験の生データの存在を明確に証明する資料の提出が無かったため、実験結果の信頼性を検証するには至らなかったこと、また、その再現性を検証するためには、多比良教授が実験試料を提出する必要があることを報告した。
5. この中間報告を受けて、実験試料ならびに関連する実験ノートなど実験記録を提出するよう、8月22日に研究科長から多比良教授に要請した。
6. これに対して多比良教授より9月5日に提出された回答と資料から、4つの論文に関する実験データや実験プロトコルなどが記載された実験ノートが存在しないことが明らかとなった。また、その回答と提出された生データを含む資料内容について、9月7日開催の調査委員会にて検討し、提出されたいずれの回答ならびに資料も、実験結果を裏付ける生データの明確な存在を示すものではないことが判明した。
7. 以上の結果に基づき、調査委員会では、これまでの調査では論文の中に示された実験結果を裏付ける明確な生データの存在を確認することができなかったことから、実験結果の信頼性を確認するには至らないとの結論に至った。
8. さらに詳細な検討のためには、回答において提出が可能とされている実験材料・試料が発表論文に記載のとおり「原材料・試料」であることを保証するデータの提出とともに、その実験材料・試料を用いた追試実験の詳細な結果と実験のプロトコルの提出が必要であるため、直ちに再実験を行い、論文で示された実験結果の物的証拠として提出するよう、平成17年9月8日に研究科長から多比良教授に要請した。さらに、9月26日に調査委員長より、今年中に目処を付ける必要があることを再度通知するとともに、再実験の進行状況、実験計画などを報告するようメールで依頼した。
9. 論文12の再実験の計画書(研究員B氏作成)が10月1日に多比良教授より提出された。
10. 調査委員会より10月3日に書面にて上記4篇の論文の再実験を早急に行い、遅くとも12月末までにこれらの再実験の実験結果、実験記録、実験資料を提出するよう依頼した。また、10月14日までに4篇の論文に関する再実験の実験計画書、実験スケジュールを調査委員会宛に提出するよう依頼した。
11. 論文7のhDicerの大腸菌発現、活性確認の再実験のスケジュール案が10月14日に川崎助手より提出された。
12. 委員長より、実験スケジュールに関し、前倒しで行うよう、また結果が出たものから逐次提出

するよう要請した。

13. 同上再実験のスケジュール変更案が10月19日に多比良教授より提出され、結果が出たものから逐次対応するとの報告があった。
14. hDicer 発現用プラスミド、宿主大腸菌などの再実験用材料、再実験プロトコル、川崎氏研究ノートが10月24日に多比良教授より提出された。
15. hDicer 発現用プラスミド、宿主大腸菌などの再実験用材料、川崎氏研究ノート記載の実験プロトコルを10月25日にA社に送付し、再実験を依頼したむね、10月30日に多比良教授より報告があった。
16. hDicer の大腸菌発現と活性確認の第2回目の実験結果および須山氏によって行われた hDicer 遺伝子の5'側断片クローニング実験に用いられた合成報告書、クローニングされた DNA 断片の塩基配列解析結果などの資料の提出と A 社に依頼していた hDicer 発現用プラスミド上の hDicer 遺伝子の全長塩基配列解析結果が出たとの報告が12月9日に多比良教授よりあった。
17. 再実験の中間報告が12月11日に多比良教授より提出された。
18. 調査委員長より、12月27日に4件の論文に付き、遅くとも1月10日までに報告書を提出するよう要請した。
19. 再実験の報告書が平成18年1月13日に多比良教授より提出された。それに依れば論文3, 8については再現実験に取り掛かっておらず、論文12については再現実験は不首尾で、論文7については再現したと報告された。
20. 14日に調査委員会を開催し、多比良教授から提出された報告書の内容を精査した結果、多比良教授の報告書の中で論文7に関し、論文記載の実験結果が再現できたと報告されている hDicer の実験結果も含めて、現段階では下記4篇の論文の中に示された実験結果の再現には至っていないという結論を得た。
21. 報告をまとめるにあたり、再現性に関する調査委員会として1月17日に多比良教授に対し概要を示すとともに、21日には、川崎助手に聞き取り調査を行った。「再実験材料が論文記載の実験材料と異なっている」との指摘に対し、論文の記載が間違っていたとする回答を得たが、それを証明するものは提出されず、このような調査結果を受けて、調査委員会では、予定していた最終報告書の纏めには至らず、1月27日調査の現状を発表するとともに、2月3日、改めて、再実験結果の提出と追加資料の提出を3月20日までにを行うように要請した。
22. 多比良教授より、3月2日に再実験結果と追加資料が提出された。
23. 3月17日に多比良教授に最終報告書(暫定案)を送付し、27日を期限に意見を求めた。
24. 川崎助手より、3月20日に最終再実験報告および追加資料が提出された。
25. 調査委員会を3月21日に開催し、追加資料などを勘案し、最終報告書(暫定案)を検討し、最終報告書(修正案)を取り纏めた。
26. 3月23日に最終報告書(修正案)を多比良教授に示した。
27. 調査委員会を3月28日に開催し、川崎助手から3月27日に提出された意見を勘案し、最終報告書を取り纏めた。

4. 調査を行った4篇の論文の問題点と調査結果

4.1 調査目的および調査委員会が認識した4篇の論文の問題点

日本 RNA 学会から再現性に疑義があると指摘された 12 篇の論文のうち、多比良教授が責任著者で、東京大学赴任以降に発表された原著論文 6 篇（上記論文 3, 6, 7, 8, 9, 12）の中から、専門調査委員の意見も参考に、実験結果の再現性の検証が比較的容易であると判断された下記の 4 篇の論文（上記論文 3, 7, 8, 12）について、科学的立場からその再現性、信頼性について調査することを目的とした。

3. Kawasaki H, Taira K. Hes1 is a target of microRNA-23 during retinoic-acid-induced neuronal differentiation of NT2 cells. *Nature*. 2003 Jun 19; 423(6942): 838-842.

7. Kawasaki H, Suyama E, Iyo M, Taira K. siRNAs generated by recombinant human Dicer induce specific and significant but target site-independent gene silencing in human cells. *Nucleic Acid Res*. 2003 Feb 1; 31(3): 981-987.

8. Kawasaki H, Onuki R, Suyama E, Taira K. Related Articles, Links Abstract. Identification of genes that function in the TNF-alpha-mediated apoptotic pathway using randomized hybrid ribozyme libraries. *Nat Biotechnol*. 2002 Apr; 20(4): 376-380.

12. Kawasaki H, Taira K. Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNA in human cells. *Nature*. 2004 Sep 9; 431(7005): 211-217.

外部専門委員が指摘したこれら 4 篇の論文の問題点は以下の通りである。

論文 3 は、転写因子 Hes1 の mRNA が microRNA-23 の標的となり、Hes1 タンパク質の発現を抑制することが、レチノイン酸による NT2 細胞の神経細胞への分化誘導のメカニズムであることを論じた報告である。しかし、本論文発表後、対象とした Hes1 mRNA が、転写因子 Hes1 と同名の全く別の遺伝子（ヒト ES1 のホモログ=HES1）由来のものであることが指摘され、この論文は撤回されることになった。論文 3 の Retraction において、著者は microRNA-23 が転写因子 Hes1 タンパク質の発現を抑制することで、レチノイン酸による NT2 細胞の神経細胞への分化を誘導するという本論文の結論自体は正しいと主張している。さらに、別の場所で、ヒト ES1 のホモログの HES1 mRNA も microRNA-23 の標的であったと主張しており（例えば日経サイエンスの論文）、この論文の徹底検証を行う必要がある。

論文 7 では、re-hDICE の大腸菌内発現を、プロメガ社の PinPoint Xa Vector を用いて行なっていると報告している。このベクターの特徴は、ビオチン化されるタグ配列領域に目的蛋白質遺伝子を融合することで、大腸菌内でビオチン標識化蛋白質を発現させることができる。この融合蛋白質遺伝子は、大腸菌の tac プロモーター下におかれているために、培地中への IPTG 添加により誘導が可能である。tac プロモーターは、大腸菌の生育速度依存的、つまり、リッチな培地かつ 37 度での生育条件で最も効率の良い蛋白質合成が可能であるが、その反面、分子量の大きな蛋白質は不活性な凝集体を形成し易いという問題がある。一方、大腸菌での re-hDICE 発現系の構築は全く不可能ではない事も現時点では明らかになっている。それは、タカラバイオ(株)が開発した大腸菌のコールドショック発現系を用いたものであり、

『RNA 干渉活性をもった siRNA を生成させるヒト型組換え二本鎖 RNA 分解酵素の発現に (タカラバイオが) 世界で初めて成功』と記述されている。本文には、『ちなみに、この二本鎖 RNA 分解酵素の発現を、T7 発現システムを用いて検討しましたが、まったく発現できませんでした。』(抜粋)と記述されていることは十分考慮する必要がある。

論文 8 へのクレームは、20 ヌクレオチドのランダムな配列が持つ 10^{12} の多様性を持つリボザイムを 10^7 個の細胞に導入した場合に TNF- α によるアポトーシスに關与する遺伝子 8 個をヒットする確率は 10^{-14} 程度であり、このような奇跡的なことが本当に起こりうるのかという点と、ヘリケースが 70 ヌクレオチドの二重鎖を形成した RNA をほどく活性があるとした場合、リボザイム自体の二重鎖構造をほどかないのかという点、tRNA とのキメラの RNA が核から細胞質に本当に輸送されるのかという点に集約される。

論文 12 へのクレームは、プロモーター領域に特異的な siRNA により配列特異的な遺伝子発現抑制がおこるか? 少なくとも、用いた siRNA により記載されている E-cadherin と erbB2 遺伝子において発現抑制がおこるか? 配列特異的な遺伝子発現抑制が見られる場合、それは siRNA の核移行を促進させるような処理や方法をまったく行なわなくても起こるのか? 配列特異的な遺伝子発現抑制が見られる場合、それは配列特異的な DNA メチル化によるものであるのか? という点に集約される。

4.2 調査方法

上記の目的を達成するため、以下の項目について調査した。

調査委員会からの平成 17 年 7 月 7 日付け文書による実験材料、プロトコル、記録の提出依頼に対して多比良教授から提出された回答書および添付資料 (平成 17 年 7 月 19 日)
平尾研究科長からの口頭による平成 17 年 8 月 22 日付け実験記録、試料提出依頼に対して多比良教授から提出された回答書および添付資料 (平成 17 年 9 月 5 日)

調査委員会からの平成 17 年 10 月 3 日付け文書による再実験計画書提出依頼に対して多比良教授から提出された実験スケジュールおよび実験計画書 (平成 17 年 10 月 19 日)
調査委員会からの平成 17 年 10 月 3 日付け文書による再実験の実験結果、実験記録、実験試料の 12 月末までの提出依頼に対して多比良教授から提出された論文 7 に関する実験結果 (平成 17 年 10 月 24 日)

多比良教授から提出された論文 7 に関する第 2 回目再実験結果 (平成 17 年 12 月 9 日)

多比良教授から提出された論文 7, 12 に関する再現実験中間結果報告書
(平成 17 年 12 月 11 日)

多比良教授から提出された論文 7, 12 に関する再実験結果報告書
(平成 18 年 1 月 13 日)

調査委員会から平成 17 年 10 月 24 日付けで外部調査委員に依頼した論文 7 の再実験材料 (hDicer 発現ベクター、宿主大腸菌) に関する調査結果報告書 (平成 18 年 1 月 14 日)

川崎助手からの事情聴取 (平成 18 年 1 月 21 日)

2000 年 9 月 ~ 2002 年 12 月の間に川崎助手が業者に合成依頼した合成オリゴ DNA 納品記録 (3 社) (平成 18 年 1 月 31 日から 2 月 2 日)

調査委員会からの平成18年2月3日付け文書による論文7, 12, 3, 8に関する物的証拠, 再実験結果, 実験記録, 実験試料の提出依頼に対して多比良教授から提出された資料(平成18年3月2日)

同上の依頼に対して多比良教授から提出された最終再実験報告書及び資料(平成18年3月20日)

川崎助手から提出された最終報告書(修正案)に関する意見(平成18年3月27日)

4.3 調査結果

(1) 4篇の論文に関する実験材料, プロトコル, 記録の提出依頼に対して多比良教授から提出された回答書および添付資料(上記4.2, の回答書および添付資料)について実験材料は既に廃棄処分されており残っているものがほとんどなく, 提出されなかった。唯一, 論文7の hDicer の発現ベクターの試料は研究室に残されているとの回答であった。

実験プロトコルとしては, 論文7に関する hDicer タンパク質の産生, 分離精製および検出用のプロトコル, 論文12に関連する siRNA および tRNA-shRNA の細胞への導入方法に関するプロトコルが提出されたが, 論文3, 8に関する実験プロトコルは全く提出されなかった。また, 提出されたプロトコルも市販のキット付属のプロトコルのコピー, またはそれを要約したもの, あるいは論文のコピーであり, 論文記載の実験スケールに対応した実験プロトコルは提出されなかった。

4篇いずれの論文に関しても, 実験担当者である川崎助手の実験ノートが存在せず, また, 実験に用いられた DNA/RNA 合成機や RI 強度検出用, イメージング用の BAS の更新に伴ってコンピューターが処分されたため, 実験材料である合成 DNA に関する合成記録やその精製度などの記録が残っていないことを確認した。すなわち, 論文作成時の基礎となる体系的な実験記録や生データがいずれの論文についても残されていないことが明らかとなった。また, 生データとして提出されたものについても, 論文3に関する市販の HES1 抗体を用いた ELISA 実験やルシフェラーゼアッセイ実験の比色・発光プレートリーダーによる測定結果の印字データのように, 論文中に記載のデータとの対応関係が全く示されておらず, また, 論文7に関する hDicer 検出のゲル写真や論文8に関する BAS による切断 RNA の電気泳動写真は論文に掲載されている2次データであるため, 明確な生データと判断できるものでは無かった。論文12に関連する Bisulphite 法による DNA シークエンシング解析結果の印字データは, 実験を行った直後にプリントアウトされた生データとして提出されたものであったが, 提出されたのは論文記載の内容のごく一部であり, さらに, 実験が行われた2003年11月末の時点ではまだリリースされていない, 新しいバージョンの解析ソフトを用いてこのデータの解析が行われていたという矛盾点が発見された。

(2) 再実験スケジュールおよび再実験計画書(上記4.2 の再実験スケジュール及び計画書)について

研究員 B から提出された論文12の siRNA 発現ベクターによる DNA メチル化誘導の再実験計画書は, 十分に計画が練られた具体的なものであり, 12月末までに再実験が終了する実験スケジュールが立案された。一方, 川崎助手からは論文7の re-hDicer の大腸菌での発現と活性確認の再実験, 論文12の siRNA 発現ベクターによる DNA メチル化誘導の再実験, 論文3の抗 Hes1 抗体

を用いた ELISA アッセイの再実験をそれぞれ1ヶ月間で終了し、最終的に2月末までに再実験を終了するというスケジュール案のみが提出され、具体的な実験計画案は示されなかった。多比良教授には、研究員 B から提出された再実験計画書に匹敵する具体的な実験計画書を提出するよう依頼したが、最後まで提出されなかった。

(3) 論文7, 12に関する平成18年1月12日までの再実験の実験結果報告書について
(上記4.2, , , の再実験結果報告書)

多比良教授から提出された再実験報告書の概要は以下の通りである。

- 1) 川崎助手が論文7で使用したと思われる実験材料(hDicerの遺伝子をクローニングしたプラスミド)については存在が確認できた。また、須山氏がクローニングした5'側部分欠損(1・10番目の塩基が欠損)hDicerのシークエンスデータが見つかった。
- 2) 川崎助手によるhDicerの蛋白質発現、活性確認により、論文7記載の実験結果の再現に成功した。
- 3) 川崎助手が論文7の再実験に用いた実験材料、実験プロトコルに基づいてA社に再実験を依頼した結果、現在までにプラスミド上のhDicer遺伝子のDNA塩基配列がデータベースと完全に一致したこと、このプラスミドを実験プロトコルで指定された宿主大腸菌に導入しhDicerの蛋白質発現の確認に成功したとの報告を受けた。しかし、発現したhDicerの活性確認は現時点ではできておらず、再確認中である。
- 4) 研究員Bが論文12記載の実験材料、実験プロトコルに基づいて再実験を進めているが、現段階では論文12記載のE-cadherinのプロモーター領域を狙ったsiRNAによるE-cadherinの発現抑制は確認できなかった。siRNAの塩基配列は異なるものの、論文12と同じくE-cadherinのプロモーター領域を狙ってE-cadherinの発現抑制に成功したことを報告したTingらによる論文(Nature Genetics 2005, 37(8):906-910)の再実験もあわせて行ったが、E-cadherinの明確な発現抑制は確認できず、再実験そのものがうまくいっていない可能性がある。
- 5) 論文3については、現時点ではまだ再実験は行っていない。論文記載の特異性の低い抗Hes1 polyclonal 抗体(Santa Cruz Biotechnology社)では論文中に示されているELISAアッセイデータが出ないのではないかと疑問に答えるために、今後、ELISAアッセイの再実験を研究員Cが行う。川崎助手が使用した抗Hes1抗体と同一ロットの抗体を現在入手するのは不可能であるため、現在手持ちのSanta Cruz Biotechnology社の抗Hes1 goat polyclonal IgGを用いてELISAアッセイの再実験を行う。サンプル調製に4週間、ELISAアッセイに2週間、計6週間で予定している。
- 6) 論文8についても、現時点ではまだ再実験は行っていない。論文で使用されたりボザイムライブラリーを1999年にD社に譲渡していたことを示すD社からのe-mailが発見されたので、その当時、実験で用いられた実験材料が存在したことは確認できた。しかし、現在そのライブラリーは存在していないので、リボザイムライブラリーの構築を含めて再実験をE研究員が行う。この再実験に集中して取り組んでも、半年以上の期間が必要と考えている。

上記1)の hDicer の全長遺伝子の存在については、A 社に依頼して行った発現ベクターの塩基配列解析結果により確認された。しかし、この発現ベクターが論文7の投稿の時点で存在していたかどうかについては、今回提出された資料からは確認することはできなかった。

また、上記2)の hDicer の発現・酵素活性の確認のための再実験は川崎助手によって2回行われたが、その結果は著しく異なるものであった。1回目の再実験では、PinPoint Xa Vector 系の標準的な発現条件（培養温度37℃、アンピシリン添加条件）で大腸菌が培養されたが、SDS-PAGE 解析の結果、目的とする hDicer の分子量サイズの蛋白質の発現は見られなかった。2回目の再実験では、かなり特別な発現条件（培養温度30℃、多種類の抗生物質添加条件）で大腸菌の培養が行われ、その結果、SDS-PAGE 解析では hDicer の分子量である 200kDa の位置にバンドが観測され、ビオチン化蛋白質を特異的に検出する方法でビオチン化 hDicer の発現が確認されたと報告している。しかし、1回目の実験結果のように電気泳動ゲル全体を示すのではなく、hDicer と思われるバンドの周辺だけを切り出して SDS-PAGE の結果を表示しているため、分子量マーカーのラダーの相対的な位置情報が失われており、客観性に欠ける表示方法であると言える。これに対して、上記3)の A 社の再実験報告はスタンダードな客観性に富む方法で表示されており、その結果と比較すると川崎助手によって示された2回目の再実験の電気泳動データには作為的な要素が含まれていると思われる。

hDicer の酵素活性の確認実験については、川崎助手の結果と A 社の結果は全く異なっており、A 社の結果では酵素活性の確認はできなかった。

(4) 外部調査委員による再実験材料（hDicer 発現ベクター、宿主大腸菌）に関する調査結果報告書（4.2 の調査結果報告）について

hDicer の大腸菌発現ベクターについては、論文7には EcoRV 平滑切断サイトで hDicer 遺伝子全長を導入した発現ベクターと記載されているが、再実験に用いられた発現ベクターの塩基配列を解析した結果、論文記載のものとは全く異なる実験材料（KpnI、NotI サイトで hDicer 遺伝子全長を導入した発現ベクター）が用いられていることが判明した。

また、宿主大腸菌についても川崎助手の再実験ノートには Rosetta-gami と記載されていたが、これとは性質が異なる T7 RNA ポリメラーゼ発現誘導株が宿主大腸菌として再実験に用いられていることが判明した。

(5) 川崎助手からの事情聴取（4.2 の事情聴取）について

外部調査委員による再実験材料（hDicer 発現ベクター、宿主大腸菌）についての調査の結果、論文記載事項と異なる hDicer 発現ベクター、再実験ノート記載事項とは異なる宿主大腸菌が再実験に用いられていたことに対して、川崎助手に事実関係について事情聴取を行った。川崎助手からは、hDicer 発現ベクターの構築手順に関しては論文の記載ミスであり、論文作成の際、古い論文原稿からのカット・アンド・ペーストをしている途中で間違えて記載ミスをしたとの回答があった。実際に行った発現ベクターの構築の手順やその際に用いた DNA プライマーについては、はっきりとは覚えていないとの回答であった。その際に用いた DNA プライマーはいつ頃どのように準備したのか質問したところ、2000年の秋頃から2002年12月頃までの間に三つの業者のいずれ

かに合成依頼をした可能性がある。また、一部のものについては自分で合成した可能性もあるとの回答であった。何故、外部業者に一括して合成を依頼しないで、自分で合成したり外部に合成依頼するのかを質問したところ、明確な回答は無かった。また、宿主大腸菌については使用した大腸菌は Rosetta-gami のはずであるとの回答で、Rosetta-gami と T7 RNA ポリメラーゼ発現誘導株との性質の違いについて明確に認識していなかった。

(6) 川崎助手が業者に合成依頼した合成オリゴ DNA 納品記録(4.2 の納品記録)について事情聴取の際に、川崎助手が論文7の再実験に用いた hDicer の発現ベクター構築のための DNA プライマーの合成を2000年9月～2002年12月の間に依頼した可能性があると述べた北海道システム・サイエンス(株)、(株)日本バイオサービス、つくばオリゴサービス(株)から、この期間内に川崎助手に納品した合成 DNA の塩基配列情報、納品日などの情報を川崎助手の了解の上で得た。これらの情報から、hDicer の5'側の塩基配列(赤字)あるいは3'側に相補的な塩基配列(青字)を含む合成 DNA は以下の6種類のもので納入されていることが判明した。しかし、これらの DNA プライマーには Kpn I サイトと hDicer の5'側上流の配列を連結するための DNA プライマー及び hDicer の3'側下流の配列と Not I サイトを連結するための DNA プライマーは見当たらない。

つくばオリゴサービス(株)から納入された合成 DNA

2001年9月28日: 5'-ATG AAA AGC CCT GCT TTG CA-3'

(株)日本バイオサービスからの納入された合成 DNA

2002年6月8日: 5'-GAA GCA GAA TTC ATG AAA AGC CCT GCT TTG CAA CCC CTC AGC-3'

2002年7月2日: 5'-GAA GCA GTC GAC ATG AAA AGC CCT GCT TTG CAA CCC CTC AGC-3'

2002年7月6日: 5'-AGT CCT GAT ATC TCA GCT ATT GGG AAC CTG AGG TTG-3'

2002年7月11日: 5'-AGT CCT GTC GAC TCA GCT ATT GGG AAC CTG AGG TTG-3'

2002年10月19日: 5'-ATG AAA AGC CCT GCT TTG CAA CCC CT-3'

なお、2002年10月19日納入の合成 DNA は論文7に記載されている hDicer のクローニングのための Forward プライマーと同一の配列のプライマーであるが、論文7の投稿は2002年10月7日であるため、hDicer の実際のクローニングに用いられた可能性は無い。

(7) 調査委員会からの平成18年2月3日付け文書による物的証拠、再実験結果、実験記録、実験試料の提出依頼に対して3月2日に多比良教授から提出された資料(上記4.2の提出資料)について

以下の資料が多比良教授より提出された。

KpnI サイトと NotI サイトを持つ完全長の hDicer 遺伝子が2004年1月7日の段階で存在したことを示す三熊氏の実験ノート

2005年4月1日から10月31日までに北海道システム・サイエンス(株)から川崎助手に納品された DNA プライマーの納品日、塩基配列などに関する回答書

2005年4月1日から10月31日までに(株)日本バイオサービスから川崎助手に納

品された DNA プライマーの納品日，塩基配列などの情報

2005年4月1日から10月31日までにつくばオリゴサービス(株)から川崎助手に納品された DNA プライマーの納品日，塩基配列などの情報

A社による hDicer の大腸菌による発現，酵素活性確認のための再実験結果

D社研究員によるリボザイムライブラリー受領のお礼のメール文

動物細胞内で Dicer を発現させるための発現ベクターを構築する実験を行っていた三熊氏の上記の実験ノートから，KpnI と NotI をそれぞれ 5'側，3'側に持つ完全長の hDicer 遺伝子をプロメガ社の TNT ベクター(*in vitro* 翻訳系用ベクター)から切り出したことを窺わせる記述があった．上記の資料から，以下に示す hDicer の 5'側の塩基配列(赤字)あるいは 3'側に相補的な塩基配列(青字)を含む合成 DNA が納入されていることが判明した．これらの DNA プライマーは，動物細胞内で hDicer を過剰発現させるための発現ベクター系を構築するために購入したとの説明が川崎助手よりあった．

2005年6月2日: 5'-ACTGAAAAGCTT**ATGAAAAGCCCTGCTTTGCAACCCC**-3'

: 5'-AACTGAGGTACCT**TCAGCTATTGGGAACCTGAGGTTG**-3'

: 5'-AACTGAGGTACCGCTATTGGGAACCTGAGGTTGATT-3'

2005年7月19日: 5'-ACTGAAAAGCTT**ATGAAAAGCCCTGCTTTGCAACCCC**-3'

: 5'-AACTGAGGTACCGCTATTGGGAACCTGAGGTTGATT-3'

2005年8月4日: 5'-TCACTGACAAGCTT**ATGAAAAGCCCTGCTTTGCAACCCC**-3'

: 5'-TCTACTGAGGTACCT**TCAGCTATTGGGAACCTGAGGTTG**-3'

上記の資料には，hDicer に関連する DNA プライマーの納入は見当たらなかった．

上記の A社による再実験の結果は，川崎助手の実験結果とは全く異なり，hDicer の酵素活性は認められなかった．

上記の D社研究員から多比良教授宛の1999年10月8日のメールには，リボザイムライブラリーを受領したことが記載されており，1999年10月の時点での論文8で用いられたハイブリッド・リボザイムライブラリーの存在の可能性が示唆された．

(8)平成18年3月20日提出の再実験結果報告書および資料(上記(12)の報告書と資料)について

以下の資料は多比良教授(川崎助手)より提出された．

提出資料の説明と再実験最終報告書

論文7の記載ミスであったとされる hDicer 発現ベクターの構築方法のプロトコル

hDicer のクローニング，発現ベクターの構築に用いられた一部の DNA プライマーの合成，納入記録

三熊氏の実験ノート(3月2日提出の資料と同じもの)

2005年4月1日から10月31日までに購入されたオリゴ DNA の合成報告書(3月2日提出の資料に対応するもの)

今回、新たに提出された hDicer 発現ベクター（hDicer の全長の遺伝子が Kpn I, Not I サイトで PinPoint™-Xa ベクターに挿入されたもの）の構築方法のプロトコルによれば、hDicer のクローニングと発現ベクターの構築には 6 種類の DNA プライマーが用いられている。その中で下記の 3 種類の DNA プライマー TE-1, TE-2, dic-4 はそれぞれ制限酵素 XbaI, EcoT22I, EcoRI の認識塩基配列（赤字）を含むものであり、外部の業者に合成依頼をして 2002 年 6 月 8 日、6 月 13 日に納入されている。

TE-1: 5'-TCT CCC CTA GAT **CTA GAT** AGA GAC AGC TCT-3'

TE-2: 5'-CTC TCT TTT GTC CAA **GAT GCA** TTT ACT TCT-3'

Dic-4: 5'-ATG CCT **GAA TTC** TGC TTC CAT CGT GTT GTT GCG AGG CTG ATT CTT CCC AA-3'

残りの 3 種類の DNA プライマー（Kpn I -5' hDicer 及び hDicer 3'-Not I を含む）は 2002 年の 4 月頃に産業技術総合研究所の DNA 合成機で合成したとのことであるが、合成記録は残されていない。また、発現ベクター構築後の hDicer の塩基配列のシーケンシングも行われなかった（本プロトコル提出時の川崎助手からのヒアリングによる情報）。

論文 7 の再実験過程で 10 月中旬に個人的に hDicer を購入したことに関しては、以下の経緯説明が最終報告書、ならびに多比良教授、川崎助手への事情聴取の中で行われた。「川崎助手が実験のポジティブコントロールに用いようと 2005 年 10 月 13 日頃に invitrogen 社の hDicer を購入した。しかし、川崎助手の手元に届く前に多比良教授らにより研究室のフリーザーボックスに貯蔵されていた hDicer と一緒に回収されてしまったため、研究室を通して購入するとまた回収されると思い川崎助手が再度 10 月 26 日頃に個人的に購入した。また、この個人的に購入した hDicer をポジティブコントロールとして使用することにためらいを覚え、未開封のまま川崎助手のフリーザーボックスに保存してあったが、12 月末に再び多比良教授らによって未開封の状態に回収された。そのため、川崎助手による hDicer 発現、活性確認の再実験では市販品の hDicer を使用していない。」

また、論文 1 2、撤回された論文 3 については再実験が終了せず、再実験結果を示すことができなかったと報告された。なお、論文 1 2 の生データとして提出した Bisulphite 法によるメチル化部位の検出のための DNA シークエンスデータに記載された解析ソフトのバージョンの違いについては、2003 年 11 月前後に ABI 社から ver5.1.1 のソフトを個人的にデモとして貰っており、そのソフトを用いて 2003 年 11 月 25 日、28 日の解析結果をプリントしたものであるとの説明が最終報告書で行われた。

4.4 調査結果の分析

(1) 再実験に用いられた hDicer 発現ベクター（Kpn I, Not I サイトでベクターに挿入）が論文 7 投稿前に構築された可能性について

平成 18 年 3 月 20 日提出の最終再実験報告書において、論文 7 記載の hDicer 発現ベクターの構築方法が単純な記載ミスであったとして、新たに hDicer 発現ベクターの構築方法のプロトコルとこれに用いたとする PCR 用の DNA プライマーの塩基配列情報がその合成記録とともに提出さ

れた。ここで示された hDicer 発現ベクターの構築方法のプロトコルは、そこで用いられた DNA プライマーや構築手順などは論文 7 記載のプロトコルとは似ても似つかぬものであり、単純な記載ミスというにはあまりにも異なるものであった。なお、新たに提出されたプロトコルによれば、hDicer のクローニングと発現ベクターの構築には 6 種類の DNA プライマーが用いられている。その中で下記の 3 種類の DNA プライマー TE-1, TE-2, dic-4 はそれぞれ制限酵素 XbaI, EcoT22I, EcoRI の認識塩基配列(赤字)を含むものであり、外部業者に合成を委託し納入されたものである。残りの 3 種類の DNA プライマーには、hDicer 発現ベクターを構築する際に鍵となる DNA プライマー、すなわち Kpn I サイトと hDicer の 5'側上流の配列を連結するための DNA プライマー及び hDicer の 3'側下流の配列と Not I サイトを連結するための DNA プライマーが含まれている。これら 3 種類の DNA プライマーは全て川崎助手が産業総合技術研究所の DNA 合成機で自ら合成したと主張しているが、その具体的な塩基配列情報は全く示されず、また合成記録も残されていない。

外部業者に合成を委託し納入された DNA プライマー TE-1, TE-2, dic-4 は、それぞれ hDicer の遺伝子の中に存在する制限酵素 XbaI, EcoT22I, EcoRI の認識塩基配列のサイトをターゲットとした PCR 用 DNA プライマーである。したがって、これらのプライマーは hDicer のこの制限酵素認識サイト周辺のセンス鎖あるいはアンチセンス鎖の塩基配列と同じ配列、あるいはほぼ同じ配列を有している必要があることは言うまでも無い。しかしながら、以下に示すように、これら 3 種類の DNA プライマーの中で TE-1 プライマーの塩基配列は hDicer の塩基配列とは全く異なり、PCR 用の DNA プライマーになり得ないものであることが判明した。さらに、当該著者らが hDicer 発現ベクターの構築を行ったとしている期間に外部業者から納入された DNA プライマーの塩基配列記録の中にも、hDicer のクローニングに用いることが可能な制限酵素サイトの塩基配列を含む PCR 用 DNA プライマーは存在しなかった。したがって、今回提出された TE-1 プライマーを用いたプロトコルでは、川崎助手が論文 7 の実験および今回の再実験に用いたという hDicer の発現ベクターを構築することはできない。

XbaI サイトを含む Forward プライマー TE-1 と hDicer のセンス鎖との塩基配列の比較
(赤字は XbaI サイト, 青字は配列が異なる部分)

TE-1: 5'-TCT CCC CTA GAT CTA GAT AGA GAC AGC TCT-3'

hDicer (センス鎖): 5'-AGC TGT CTC TAT CTA GAT CTA GGG GAG ACT-3'

EcoT22I サイトを含む Reverse プライマー TE-2 と hDicer のアンチセンス鎖との塩基配列の比較
(赤字は EcoT22I サイト)

TE-2: 5'-CTC TCT TTT GTC CAA GAT GCA TTT ACT TCT-3'

hDicer (アンチセンス鎖): 5'-CTC TCT TTT GTC CAA GAT GCA TTT ACT TCT-3'

EcoRI サイトを含む Reverse プライマー Dic-4 と hDicer のアンチセンス鎖との塩基配列の比較
(赤字は EcoRI サイト, 青字は配列が異なる部分)

Dic-4: 5'-ATG CCT GAA TTC TGC TTC CAT CGT GTT GTT GCG AGG CTG
ATT CTT CCC AA-3'

hDicer (アンチセンス鎖): 5'-TTTCT GAA TTC TGC TTC CAT CGT GTT GTT GCG AGG CTG
ATT CTT CCC AA-3'

発現ベクターの構築の過程で約 400bp から 1400bp 長の DNA 断片が PCR で増幅されており、その過程で変異が入る可能性もあることから、通常はベクター構築後に DNA 塩基配列のシーケンスを確認するのが常識であるが、そのような確認もされていない(発現ベクター構築プロトコル提出時の川崎助手からのヒアリングによる情報)また、三熊氏のノートに記載の hDicer を Kpn I, Not I サイトで切り出した発現ベクターは再実験に用いられた発現ベクターとは異なる無細胞蛋白質合成用のもの(プロメガ社の TNT ベクター)であるため、三熊氏の実験が行われた 2004 年 1 月 7 日に Kpn I, Not I サイトをそれぞれ 5', 3'側に導入した全長の hDicer の遺伝子が存在したことは確かではあるが、再実験に用いられた発現ベクターが論文投稿前の 2002 年 10 月以前に存在したことの証拠にはならない。

以上の調査結果より、今回新たに提出されたプロトコルによって構築された hDicer の完全な発現ベクターが 2002 年 10 月以前に存在したという明確な証拠は無く、論文 7 の hDicer 発現用ベクターの構築に関しては、捏造の可能性が極めて高いと言わざるを得ない。

(2) hDicer 発現と活性確認に関する再実験の結果について

川崎助手の再実験では大腸菌による hDicer の発現と酵素活性の確認に成功したと報告しているが、一方で A 社が同じ実験材料を用いて行った実験では、hDicer の分子量サイズの蛋白質の微量な発現は認められるものの、酵素活性の発現はみられないとの結論が得られている。すなわち、川崎助手の実験結果は再現されていない。

川崎助手が大腸菌による hDicer の発現、活性確認のための再実験を行っている時期に業者に口止めして hDicer を個人購入した事実は、再実験の結果そのものに対して強い疑念を抱かせるものである。多比良教授ならびに川崎助手は、事情聴取において納入された直後の invitrogen 社の hDicer を含めて研究室に有った 3 種類の hDicer を 10 月 13 日頃に回収し、川崎助手が 10 月 26 日頃に個人購入した Stratagene 社の hDicer についても、川崎助手のフリーザーボックスの中に未開封の状態で保管されていたものを 12 月末に発見し、これも回収したと主張している。また、その結果、川崎助手の再実験において市販品の hDicer を使うチャンスは全く無く、不正行為は行われなかったと主張している。しかし、内部調査の結果、10 月 13 日頃に回収されたのは invitrogen 社の hDicer を含めた 2 種類の hDicer のみであり、12 月末に川崎助手のフリーザーボックスから回収されたのは未開封の Stratagene 社の hDicer と開封済みの Stratagene 社の hDicer の 2 種類であったことが判明した。hDicer の発現と活性確認の再実験が行われている 10 月末から 11 月末にかけて、川崎助手らの主張とは異なり、手元に開封済みの hDicer が有った事実は、再実験の過程で不正が行われた可能性を強く示唆するものである。また、全長の分子量サイズの hDicer の発現と酵素活性が確認されたと報告された 2 回目の再実験において、発現を確認した SDS-PAGE ゲルの実験結果では、1 回目の再実験とは異なり 2 本の分子量マーカーとサンプルレーンに 1 本のバンドのみが存在し、他の夾雑蛋白質のバンドが全く見えない極めて不自然なデータが示されており、このことも、2 回目の再実験に市販品の hDicer が使われた可能性を強く示唆するものである。

(3) Bisulphite 法による DNA シークエンシング結果の印字データについて

生データとして提出された DNA シークエンシング結果の印字データは、実験を行った直後にプリントアウトされたものであると川崎助手は事情聴取でも力説している。また、2003 年 11 月前後に ABI 社から ver5.1.1 のソフトを個人的にデモとしてもらったと主張しているが、調査委員会から ABI 社に問い合わせたところ、ver5.1.1 のソフトがデモ用にプレリリースされた事実は無いことが判明した。印字データ中に記載されている塩基配列データ解析用ソフト名 Sequencing Analysis ver5.1.1 は、実験データ取得時の 2003 年 11 月 25 日から 11 月 28 日には多比良研の DNA シーケンサーにはインストールされておらず、2004 年 9 月 16 日に ABI 社の SE によって ver3.7 から ver5.1.1 にバージョンアップされたことが調査の結果明らかとなった。以上のことより、生データとして提出された印字データは捏造されたデータであると判断せざるを得ない。

(4) DNA メチル化の再実験結果について

B 研究員によって行われた再実験は川崎助手によって行われた論文 1 2 の DNA メチル化の結果を再現することはできず、生データとして川崎助手から提出された Bisulphite 法による DNA シークエンシング結果のデータも捏造であれば、科学的には論文 1 2 のデータに信頼をおくことはできない。

5 . 結 論

昨年 4 月日本 RNA 学会より、多比良教授らの論文に関し、再現性、信頼性に疑義があるとの指摘を受け、調査を行ってきた。指摘された 1 2 篇の論文から、多比良教授が責任著者である原著論文で、比較的再現性の検証が容易であると判断された 4 篇について調査を行った。当該著者らに、実験記録と実験試料の提出を求めたが、実験ノート、明確な生データは存在しないことが明らかとなった。当該著者らにかけられた嫌疑を晴らす機会として、論文記載と同じ実験材料・試料を用いて再実験を行い、その詳細な結果と実験のプロトコルを平成 17 年末までに提出するよう要請した。しかしながら、調査委員会で設定した期間内では、実験結果は再現されず、論文 1 2 に関連する生データとして提出されたものの一部は明らかな虚偽であったことが明らかとなった。論文 7 については、論文記載ミスであるとして新たに提出されたプロトコルと DNA プライマーでは、hDicer 発現ベクターの構築はできない事が明らかとなり、論文発表前に構築されたとする実験材料が存在しなかった可能性が明らかとなった。さらに、再実験中に、本来実験によって大腸菌内で合成され、酵素活性が発現するか否かが検証されるべき hDicer が、川崎助手により個人的に購入されていた。また、これとは別に開封済みの hDicer が再実験の期間中に川崎助手のフリーザーに保管されていたという、再実験そのものを疑せしめる事実が調査により発覚した。

再実験の結果については下記のとおりである。論文 3 については、再実験が終了せず、結果を示すには至らなかった。論文 7 については、川崎助手から提出された結果と、A 社から提出された結果は著しく異なっており、再現性は示されなかった。論文 8 については、再実験は行われなかった。論文 12 については、再現実験が B 研究員により行われたが、DNA メチル化の結果は再現されな

かった。

「客観的資料・データ等の管理保存」が行われ、「その論文の正しさを客観的に説明する責任」を果たせなければ、その研究は科学的な意味を持たないことは自明である。今回調査を行った4篇の論文に関しては再現性、信頼性は無いものと判断される。

科学技術において新たな知見を発信しようとするものは、高い科学技術倫理を要求されることは言うまでもない。研究者の責任を果たせないとすれば、それは結果として研究者生命、学者生命を絶つことになる。研究の場においては、自身の行為が正しいかどうかを冷静に判断し得る環境を作ることが重要である。研究者が自由に話し合い、議論できる風通しのよい研究環境を作る努力をし、再発を防ぐ必要がある。個としての研究者が高い倫理観を持つことは勿論のこと、組織としての大学自らが正し、徹底した調査を行い、納得のいく対策を取る、それが日本の研究をリードする本学の責任である事はいうまでも無い。大学は科学研究を行うとともに、それを次世代に伝える責務を教育機関として負っており、その構成員は研究に当たっての行動規範を厳格に守る必要がある。

東京大学憲章 ．学術 6 ．(研究の理念)

東京大学は、真理を探究し、知を創造しようとする構成員の多様にして、自主的かつ創造的な研究活動を尊び、世界最高水準の研究を追求する。東京大学は、研究が人類の平和と福祉の発展に資するべきものであることを認識し、研究の方法および内容をたえず自省する。東京大学は、研究活動を自ら点検し、これを社会に開示するとともに、適切な第三者からの評価を受け、説明責任を果たす。

6．調査委員会

調査委員

松本洋一郎（委員長，副研究科長，教授，機械工学専攻）

田中 知 （副研究科長，教授，システム量子工学専攻）

野崎 京子（専攻長，教授，化学生命工学専攻）

長棟 輝行（教授，化学生命工学専攻）

専門調査委員

饗場 弘二（名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻，教授）

上田 卓也（東京大学新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻，教授）

塩見 春彦（徳島大学ゲノム機能研究センター，教授）

中村 義一（東京大学医科学研究所基礎医科学大部門，教授）