

添付資料 1

平成 18 年 3 月 29 日

日本 RNA 学会から再現性に疑惑が指摘された論文に関する最終調査報告

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。

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に反応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 transcription. PLoS Biol. 2004; 2(12): 2511-2519.

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によって、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關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關する特許を購入し、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、 $TD = 0.0016 \times Tc^{-500} < 524e > 11.4 < 415T6b2602f$

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

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。

14日に調査委員最査弧 H * (3日, 改

14日に調査委員最た

" | めば の纏明頂-

発表咽て

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

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。

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

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
認められ無かった。

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: 16

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'-TTTCTGAA TTC

(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、

