

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実施状況報告書(平成24年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	がん遺伝子産物RASによる広範な染色体領域にわたる転写抑制機構の解明
研究機関・ 部局・職名	東北大学・大学院医学系研究科・教授
氏名	中山 啓子

1. 当該年度の研究目的

Fas 遺伝子の RAS による発現抑制に関わる遺伝子群を網羅的に探索し、最も中心的な役割を果たす遺伝子を抽出する。前年度までの予備実験で、RAS によって *Fas* 遺伝子の発現は抑制され、それに伴って細胞表面の *Fas* 分子量も減少すること、この減少はフローサイトメーターを用いて測定可能であることがわかった。そこで、*Fas* の細胞表面タンパク質量の減少を解除するような分子の探索を行う。具体的には shRNA ライブラリーを用いて *Fas* の細胞表面タンパク質量が増加するようなクローンをフローサイトメーターによってソーティングし、その細胞群に含まれる shRNA をスクリーニングし、*Fas* 遺伝子転写抑制のシグナル経路を明らかとする。

第二点目は、転写抑制とエピゲノム状態の変化の時間的關係について調べる。まず、RAS によって転写が大きく変化する領域での転写の変化を時系列を追って調べる。同時にエピゲノムの変化、特にヒストン H3K27me3 の変化を調べる。予備の実験では、転写の変化がエピゲノム変化に先んじて起こっていた。そこで、このような転写変化とエピゲノム変化の時間的關係について、ゲノムワイドに調べると同時に、その分子メカニズムを基本転写因子や RNA ポリメラーゼ、ヒストン修飾酵素などについて調べる。

また、第二点目の結果を考察し、RAS によるシグナルの活性化によって染色体の構造変化が転写抑制に関わっていることが想定されるならば、染色体の構造変化を網羅的に観察する方法の開発を行う。

2. 研究の実施状況

Fas 遺伝子の RAS による発現抑制に関する遺伝子群の網羅的スクリーニング RAS によって発現が抑制された *Fas* の細胞表面タンパク質量を増加させるような分子の網羅的探索を shRNA ライブラリーとフローサイトメーターによるソーティングによって行った。具体的には、ソーティングで得られた細胞群よりゲノム DNA を抽出し、shRNA ライブラリーに付加されている Tag 数を次世代シーケンサーを用いてカウントすることによって、スクリーニングを行った。その結果、Erk2 の shRNA が特異的に抽出されたことから、このスクリーニングが機能していると判断した。そこで、スクリーニングによって上位にランキングされた shRNA を用いて確認作業を行ったところ、false positive が多数見付き、現在そのような shRNA を効果的に排除する方法について検討を開始した。

転写抑制とエピゲノム状態の変化の関係 これまでに *Fas* 遺伝子領域は RAS によって Histone H3K27me3 の修飾が充進することがわかっている。そこで、これらの変化を網羅的に探索するために、ChIP シークエンスを行った。その結果、RAS 導入によって *Fas* 遺伝子領域のように Histone H3K27me3 の修飾充進と転写抑制される領域と同時に Histone H3K27me3 の修飾低下し転写が充進する領域を発見した。それらの変化は転写の抑制変化後に、Histone H3K27me3 修飾が起こることがわかった。つまり、Histone 修飾によって転写が変化するのではなく、転写が変化することが Histone 修飾を誘導していることが示唆された。このことを Genome wide に調べるために、RAS の導入後に時間経過を追って ChIP sequence と RNA sequence を行った。この解析より、100 以上の遺伝子が修飾変化が誘導されること、そしてその変化は転写の変化後に起こることが判明した。現在、転写がどのように修飾を誘導するのかについて検討を行っている。

3. 研究発表等

雑誌論文	(掲載済み一査読有り) 計 10 件
計 12 件	<ol style="list-style-type: none"> 1. Okae, H., Hiura, H., Nishida, Y., Funayama, R., Tanaka, S., Chiba, H., Yaegashi, N., Nakayama, K., Sasaki, H., Arima, T.: Re-investigation and RNA sequencing-based identification of genes with placenta-specific imprinted expression. <i>Hum Mol Genet.</i> 21, 548-558 (2012). 2. Bargagna-Mohan, P., Paranthan, RR., Hamza, A., Zhan, CG., Lee, DM., Kim, KB., Lau, DL., Srinivasan, C., Nakayama, K., Nakayama, KI., Herrmann, H., Mohan, R.: Corneal antifibrotic switch identified in genetic and pharmacological deficiency of vimentin. <i>J Biol Chem.</i> 287, 989-1006 (2012). 3. Ninomiya, M., Ueno, Y., Funayama, R., Nagashima, T., Nishida, Y., Kondo, Y., Inoue, J., Kakazu, E., Kimura, O., Nakayama, K., Shimosegawa, T.: Use of Illumina deep sequencing technology to differentiate hepatitis C virus variants. <i>J Clin Microbiol.</i> 50, 857-866 (2012). 4. Fukushima, Hidefumi., Matsumoto, Akinobu., Inuzuka, Hiroyuki., Zhai, Bo., Lau, W Alan., Wan, Lixin., Gao, Daming., Shaik, Shavali., Yuan, Min., Gygi, P Steven., Jimi, Eijiro., Asara, M John., Nakayama, Keiko., Nakayama, I Keiichi and Wei, Wenyi.: SCFFbw7 modulates the NFkB signaling pathway by targeting NFkB2 for ubiquitination and destruction. <i>Cell Reports.</i> 1, 434-443 (2012). 5. Inuzuka, H., Gao, D., Finley, LW., Yang, W., Wan, L., Fukushima, H., Chin, YR., Zhai, B., Shaik, S., Lau, AW., Wang, Z., Gygi, SP., Nakayama, K., Teruya-Feldstein, J., Toker, A., Haigis, MC., Pandolfi, PP., Wei, W.: Acetylation-dependent regulation of skp2 function. <i>Cell.</i> 150, 179-193 (2012). 6. Cremasco, V., Decker, CE., Stumpo, D., Blackshear, PJ., Nakayama, KI., Nakayama, K., Lupu, TS., Graham, DB., Novack, DV., Faccio, R.: PKCδ deficiency perturbs bone homeostasis by selective uncoupling of cathepsin K secretion and ruffled border formation in osteoclasts. <i>J Bone Miner Res.</i> 27, 2452-2463 (2012) 7. Hirotsu, Y., Katsuoka, F., Funayama, R., Nagashima, T., Nishida, Y., Nakayama, K., Douglas Engel, J., Yamamoto, M.: Nrf2-MafG heterodimers contribute globally to antioxidant and metabolic networks. <i>Nucleic Acids Res.</i> 40, 10228-10239 (2012) 8. Tateishi, Y., Matsumoto, A., Kanie, T., Hara, E., Nakayama, K., Nakayama KI. : Development of mice without Cip/Kip CDK inhibitors. <i>Biochem Biophys Res Commun.</i> 427, 285-292 (2012) 9. Suzuki, S., Fukasawa, H., Misaki, T., Togawa, A., Ohashi, N., Kitagawa, K., Kotake, Y., Liu, N., Niida, H., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Yamamoto, T. & Kitagawa, M. The Amelioration of Renal Damage in Skp2-Deficient Mice Canceled by p27 (Kip1) Deficiency in Skp2(-/-) p27(-/-) Mice. <i>PLoS one</i> 7, e36249 (2012). 10. Ishikawa, Y., Hosogane, M., Okuyama, R., Aoyama, S., Onoyama, I., Nakayama, KI., Nakayama, K.: Opposing functions of Fbxw7 in keratinocyte growth-differentiation and skin tumorigenesis mediated through negative regulation of c-Myc and Notch. <i>Oncogene.</i> 32, 1921-1932 (2013)
	(掲載済み一査読無し) 計 0 件
	(未掲載) 計 2 件
	<ol style="list-style-type: none"> 11. Izumi, R., Niihori, T., Aoki, Y., Suzuki, N., Kato, M., Warita, H., Takahashi, T., Tateyama, M., Nagashima, T., Funayama, R., Abe, K., Nakayama, K., Aoki, M. & Matsubara, Y.: Exome sequencing identifies a novel TTN mutation in a family with hereditary myopathy with early

様式19 別紙1

	<p>respiratory failure. J Hum Genet (2013) [Epub ahead of print].</p> <p>12. Sun, S., Horino, S., Itoh-Nakadai, A., Kawabe, T., Asao, A., Takahashi, T., So, T., Funayama, R., Kondo, M., Saitsu, H., Matsumoto, N., Nakayama, K., Ishii, N.: Y-Chromosome-linked B- and NK-cell deficiency in mice. J. Immunol, in press (2013).</p>
<p>会議発表 計 13 件</p>	<p>専門家向け 計 12 件</p> <p>1. Kundu, L. R., Nakayama, K. : Analysis of Geminin-deficient mES cells (ポスター発表, 2012 Cold Spring Harbor Laboratory on the Cell Cycle, NY, 2012/5/16).</p> <p>2. Nakayama, K. : Change of Trimethylation of H3K27 Occurs after Ras-mediated Transcriptional Regulation (口頭発表, CSI-GCOE Joint Workshop on Genome Science, Singapore, 2012/8/21).</p> <p>3. Matsumoto, M., Shiraki, T., Burydun, A., Funayama, R., Nishida, Y., Nakayama, K., Yaegashi, N., Igarashi, K. : Bach1-mediated Repression of Ppar γ Suppresses Adipocyte Differentiation of Fibroblasts in vitro (ポスター発表, The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 福岡, 2012/12/11).</p> <p>4. Matsushima, W., Funayama, R., Nagashima, T., Nakayama, K. : Comprehensive Analysis of RAS-mediated Alternative Splicing (ポスター発表, The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 福岡, 2012/12/12).</p> <p>5. Hirotsu, Y., Katsuoka, F., Funayama, R., Nagashima, T., Nishida, Y., Nakayama, K., Engel, JD., Yamamoto, M. : Genome-wide Analysis of Nrf2-small Maf Heterodimer Reveals Gene Regulatory System (ポスター発表, The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 福岡, 2012/12/13).</p> <p>6. Isoshita, R., Onoyama, I., Suzuki, A., Matsumono, A., Tomita, K., Katagiri, H., Oike, Y., Nakayama, K., Nakayama, KI. : Fbxw7 Regulates Lipid Metabolism and Cell Fate Decisions in the Mouse Liver (ポスター発表, The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 福岡, 2012/12/13).</p> <p>7. Funayama, R., Hosogane, M., Nagashima, T., Nakayama, K. : Screening of shRNA Library for Identification of Genes Required for Fas Gene Silencing (ポスター発表, The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 福岡, 2012/12/13)</p> <p>8. Kundu, L R., Nakayama, K. : Regulation of Cell Cycle and Cell Fate Determination by Geminin in mES Cells (口頭発表, The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 福岡, 2012/12/13).</p> <p>9. Kundu, L R., Nakayama, K : Regulation of Cell Cycle and Cell Fate Determination by Geminin in mES Cells (ポスター発表, The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 福岡, 2012/12/13).</p> <p>10. Ishida, N., Iemura, S., Yasui, A., Natsume, T., Nakayama, K. : Regulation of NHEJ Repair by Ubiquitylation of Ku80 (ポスター発表, The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 福岡, 2012/12/14).</p> <p>11. Hosogane, M., Funayama, R., Nishida, Y., Nagashima, T., Nakayama, K. : Change of Tri-methylation of H3K27 Occurs after Ras-mediated Transcriptional Regulation (口頭発表, The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 福岡, 2012/12/14).</p> <p>12. Hosogane, M., Funayama, R., Nishida, Y., Nagashima, T., Nakayama, K. : Change of Tri-methylation of H3K27 Occurs after Ras-mediated Transcriptional Regulation (ポスター</p>

様式19 別紙1

	<p>発表, The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 福岡, 2012/12/14).</p> <p>一般向け 計 1件</p> <p>13. 中山 啓子: 「ゲノム科学から新しい医療へ向けて」日本学術会議第二部及び東北大学主催 市民公開講演会「東北地方の復興・新生に向けて: アカデミアの果たす役割」 (仙台, 2012/8/3)</p>
<p>図書</p> <p>計 0 件</p>	
<p>産業財産権 出願・取得状 況</p> <p>計 0 件</p>	<p>(取得済み) 計 0 件</p> <p>(出願中) 計 0 件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>東北大学大学院医学系研究科 附属創生応用医学研究センターがん医学コアセンター 細胞増殖制御分野 http://www.devgen.med.tohoku.ac.jp/</p> <p>東北大学大学院医学系研究科 附属創生応用医学研究センター http://www.art.med.tohoku.ac.jp/</p>
<p>国民との科 学・技術対話 の実施状況</p>	<p>Facebook により、研究成果の発表を行っている。</p> <p>日本学術会議第二部及び東北大学主催 市民公開講演会において、ゲノムと疾患の関連について講演を行い、ゲノム研究の重要性について述べた。(「ゲノム科学から新しい医療へ向けて」・東北大学片平さくらホール・一般市民対象・80人・2012/8/3)</p>
<p>新聞・一般雑 誌等掲載</p> <p>計 0 件</p>	
<p>その他</p>	

4. その他特記事項

該当なし

実施状況報告書(平成24年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されます

1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の累計)	③当該年度受領額	④(=①-②-③)未受領額	既返還額(前年度迄の累計)
直接経費	132,000,000	41,400,000	47,600,000	43,000,000	0
間接経費	39,600,000	12,420,000	14,280,000	12,900,000	0
合計	171,600,000	53,820,000	61,880,000	55,900,000	0

2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執行額	②当該年度受領額	③当該年度受取利息等額 (未収利息を除く)	④(=①+②+③)当該年度合計収入	⑤当該年度執行額	⑥(=④-⑤)当該年度未執行額	当該年度返還額
直接経費	4,287,316	47,600,000	0	51,887,316	48,378,084	3,509,232	0
間接経費	0	14,280,000	0	14,280,000	14,280,000	0	0
合計	4,287,316	61,880,000	0	66,167,316	62,658,084	3,509,232	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	28,880,600	クリオスタット一式、シーケンサー用試薬ほか消耗品等
旅費	222,500	学会旅費(日本癌学会、日本分子生物学会) (23年度との相殺額61,900円含む)
謝金・人件費等	14,502,058	謝金3名、博士研究員1名、研究補助員2名
その他	4,772,926	動物実験施設維持管理料、機器修理代等
直接経費計	48,378,084	
間接経費計	14,280,000	
合計	62,658,084	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関名
TruSeq PE Cluster Kit	v2-cBot-GA 1flowcell	1	663,862	663,862	2012/11/20	東北大学・細胞増殖制御分野
サーマルサイクラー	Veriti 96-well	1	823,200	823,200	2012/12/26	東北大学・細胞増殖制御分野
倒立型ルーチン顕微鏡	CKX41-31PHP	1	559,151	559,151	2013/1/9	東北大学・細胞増殖制御分野
クリオスタット	CM1950-OUVV	1	5,523,000	5,523,000	2013/3/7	東北大学・細胞増殖制御分野