

課題番号	LS009
------	-------

**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25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。

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 *Fas* の細胞表面タンパク質量は減少するが、この *Fas* の発現が抑制された細胞に shRNA を用いて、タンパク質の発現を抑制し、減少していた *Fas* の発現量が復帰するような shRNA を探索した。その結果、RAS による *Fas* の発現制御に関与していることが予想される、多くの遺伝子を発見することに成功した。その中からさらに二つの転写因子、一つのクロマチンリモデリング因子に注目し、さらに解析を進めた。その結果、RAS が過剰に活性化しているときに限って、この三つの遺伝子の転写を shRNA を用いて抑制すると、*Fas* の発現量を転写レベルでも細胞表面タンパク質量でも増加させることが判明した。このことは、RAS による *Fas* の転写抑制をこれらの分子が制御していることを強く示唆していると考えられる。さらにこれらの遺伝子によってコードされるタンパク質を、shRNA に抵抗性を持つ cDNA を用いて過剰に発現することによって、特異性があることも確認した。

転写抑制とエピゲノム状態の変化の關係 これまでに *Fas* 遺伝子領域は RAS によって Histone H3K27me3 の修飾が亢進することがわかっている。これらの変化を網羅的に探索し、RAS 導入によって Histone H3K27me3 の修飾亢進し転写抑制される領域と同時に Histone H3K27me3 の修飾低下し転写が亢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。Genome wide に調べたところ 100 以上の遺伝子において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。さらにこの修飾変化は、およそ 30 日間をかけて徐々に変化することが判明し、H3K27me3 の修飾は非常に緩慢に変化することが判明した。

3. 研究発表等

雑誌論文 計 13 件	(掲載済み一査読有り) 計 12 件 1. Okae, H., Matoba, S., Nagashima, T., Mizutani, E., Inoue, K., Ogonuki, N., Chiba, H., Funayama, R., Tanaka, S., Yaegashi, N., Nakayama, K., Sasaki, H., Ogura, A. & Arima, T. RNA sequencing-based identification of aberrant imprinting in cloned mice. <i>Human molecular genetics</i> 23, 992-1001 (2014). 2. Ogata, T., Niihori, T., Tanaka, N., Kawai, M., Nagashima, T., Funayama, R., Nakayama, K., Nakashima, S., Kato, F., Fukami, M., Aoki, Y. & Matsubara, Y. TBX1 Mutation Identified by Exome Sequencing in a Japanese Family with 22q11.2 Deletion Syndrome-Like Craniofacial Features and Hypocalcemia. <i>PloS one</i> 9, e91598 (2014). 3. Kotoshiba, S., Gopinathan, L., Pfeifferberger, E., Rahim, A., Vardy, L.A., Nakayama, K., Nakayama, K.I. & Kaldis, P. p27 is regulated independently of Skp2 in the absence of Cdk2. <i>Biochimica et biophysica acta</i> 1843, 436-445 (2014). 4. Zhao, H., Bauzon, F., Fu, H., Lu, Z., Cui, J., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Locker, J. & Zhu, L. Skp2 Deletion Unmasks a p27 Safeguard that Blocks Tumorigenesis in the Absence of pRb and p53 Tumor Suppressors. <i>Cancer cell</i> 24, 645-659 (2013). 5. Susaki, E., Nakayama, K., Yamasaki, L. & Nakayama, K.I. Common and specific roles of the related CDK inhibitors p27 and p57 revealed by a knock-in mouse model. <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> 106(13), 5192-5197 (2013). 6. Sun, S.L., Horino, S., Itoh-Nakadai, A., Kawabe, T., Asao, A., Takahashi, T., So, T., Funayama, R., Kondo, M., Saito, H., Matsumoto, N., Nakayama, K. & Ishii, N. Y chromosome-linked B and NK cell deficiency in mice. <i>J Immunol</i> 190, 6209-6220 (2013). 7. Ninomiya, M., Kondo, Y., Funayama, R., Nagashima, T., Kogure, T., Kakazu, E., Kimura, O., Ueno, Y., Nakayama, K. & Shimosegawa, T. Distinct MicroRNAs Expression Profile in Primary Biliary Cirrhosis and Evaluation of miR 505-3p and miR197-3p as Novel Biomarkers. <i>PloS one</i> 8, e66086 (2013). 8. Khor, E.C., Abel, T., Tickner, J., Chim, S.M., Wang, C., Cheng, T., Ng, B., Ng, P.Y., Teguh, D.A., Kenny, J., Yang, X., Chen, H., Nakayama, K.I., Nakayama, K., Pavlos, N., Zheng, M.H. & Xu, J. Loss of protein kinase C-delta protects against LPS-induced osteolysis owing to an intrinsic defect in osteoclastic bone resorption. <i>PloS one</i> 8, e70815 (2013). 9. 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 respiratory failure. <i>Journal of human genetics</i> 58, 259-266 (2013). 10. Ishikawa, Y., Hosogane, M., Okuyama, R., Aoyama, S., Onoyama, I., Nakayama, K.I. & Nakayama, K. Opposing functions of Fbxw 7 in differentiation and skin tumorigenesis mediated through negative regulation of c-Myc and Notch. <i>Oncogene</i> 32, 1921-1932 (2013). 11. Hosogane, M., Funayama, R., Nishida, Y., Nagashima, T. & Nakayama, K. Ras-induced changes in H3K27me3 occur after those in transcriptional activity. <i>PLoS genetics</i> 9, e1003698 (2013). 12. Aoki, Y., Niihori, T., Banjo, T., Okamoto, N., Mizuno, S., Kurosawa, K., Ogata, T., Takada, F., Yano, M., Ando, T., Hoshika, T., Barnett, C., Ohashi, H., Kawame, H., Hasegawa, T., Okutani, T., Nagashima, T., Hasegawa, S., Funayama, R., Nagashima, T., Nakayama, K., Inoue, S., Watanabe, Y., Ogura, T. & Matsubara, Y. Gain-of-function mutations in RIT1 cause Noonan
----------------	--

	<p>syndrome, a RAS/MAPK pathway syndrome. American journal of human genetics 93, 173-180 (2013).</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計 0 件</p> <p>(未掲載) 計 1 件</p> <p>13. Fujiwara, T., Fukuhara, N., Funayama, T., Takahashi M., Kojima, K., Kamata, M., Nagashima, T., Nariai, N., Onishi U., Sasahara, Y., Ishizawa, K., Yamashita, R., Kinoshita, K., Nagasaki, N., Nakayama, K. & Harigae, H. Identification of acquired mutations by whole-genome sequencing in a patient with germline GATA-2 mutation evolving into myelodysplasia and acute leukaemia. Annals of Hematology (in press, 2014).</p>
<p>会議発表 計 11 件</p>	<p>専門家向け 計 10 件</p> <p>1. 細金正樹, 舟山亮, 西田有一郎, 長嶋剛史, 中山啓子. がん遺伝子Rasによる転写変化後のH3K27me3修飾変化. 第36回日本分子生物学会年会,2013.12.3-12.6 (神戸, 2013).</p> <p>2. 舟山亮, 細金正樹, 長嶋剛史, 中山啓子. Ras-MAPKシグナルを介したFas遺伝子の転写抑制機構の解析. 第36回日本分子生物学会年会,2013.12.3-12.6 (神戸, 2013).</p> <p>3. 中川直, 荒木孝明, 中山啓子. p19Arfの分解を介したユビキチンリガーゼ β-TrCP2による細胞増殖制御. 第36回日本分子生物学会年会2013.12.3-12.6 (神戸, 2013).</p> <p>4. Kundu, L.R., 中山啓子. mES細胞の細胞周期-細胞分化調節におけるGemininの役割. 第36回日本分子生物学会年会,2013.12.3-12.6 (神戸, 2013).</p> <p>5. 中野星児, 遠藤尚博, 中山啓子. E3ユビキチンリガーゼ β-TrCP1および β-TrCP2はマウス精子形成に必須である. 第36回日本分子生物学会年会,2013.12.3-12.6 (神戸, 2013).</p> <p>6. 諸星茜, 中川直, 中山啓子. ユビキチン化によるFACT複合体機能の制御. 第36回日本分子生物学会年会,2013.12.3-12.6 (神戸, 2013).</p> <p>7. 中山啓子. 転写制御とヒストン修飾. 順天堂大学 最先端・次世代シンポジウム,2013.11.30 (東京, 2013).</p> <p>8. Nakayama, K. Functional Analysis of F-box protein in vivo. The 35th Naito Conference Program (第35回内藤コンファレンス) ,2013.7.9-7.12 (札幌, 2013).</p> <p>9. Nakayama, K., Hosogane, M., Funayama, R., Nagashima, T. Change of Trimethylation of H3K27 Occurs after Ras-mediated Transcriptional Regulation. NIH-Tohoku University-JSPS Symposium,2013.5.9-5.10 (仙台, 2013).</p> <p>10. Matsushima, W., Funayama, R., Nagashima, T., Nakayama, K. Comprehensive Analysis of Ras-Mediated Alternative Splicing. NIH-Tohoku University-JSPS Symposium,2013.5.9-5.10 (仙台, 2013).</p> <p>一般向け 計 1 件</p> <p>11. 中山啓子, 細金正樹, 舟山亮, 西田有一郎, 長嶋剛史, がん遺伝子Rasは、転写変化後にH3K27me3修飾を変化させる. FIRSTシンポジウム「『科学技術が拓く2030年』へのシナリオ」内NEXTライフ・イノベーション・ポスターセッション,2014.2.28-3.1 (東京, 2014).</p>

様式19 別紙1

図書 計0件	
産業財産権 出願・取得状 況 計0件	(取得済み) 計0件 (出願中) 計0件
Webページ (URL)	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/ 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/
国民との科 学・技術対話 の実施状況	Facebook により、研究成果の発表を行っている。
新聞・一般雑 誌等掲載 計0件	
その他	なし

4. その他特記事項

該当なし

実施状況報告書(平成25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	89,000,000	43,000,000	0	0
間接経費	39,600,000	26,700,000	12,900,000	0	0
合計	171,600,000	115,700,000	55,900,000	0	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	3,509,232	43,000,000	0	46,509,232	46,509,232	0	0
間接経費	0	12,900,000	0	12,900,000	12,900,000	0	0
合計	3,509,232	55,900,000	0	59,409,232	59,409,232	0	0

3. 当該年度の執行額内訳 (単位:円)

	金額	備考
物品費	26,612,022	遺伝子導入装置、実験試薬ほか消耗品等
旅費	469,660	学会等旅費(日本分子生物学会、 FIRST EXPO2014等)
謝金・人件費等	12,515,513	謝金3名、博士研究員1名、研究補助員3名
その他	6,912,037	動物実験施設等設備・機器使用料、 機器修理代、論文掲載料等
直接経費計	46,509,232	
間接経費計	12,900,000	
合計	59,409,232	

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
遺伝子導入装置 4D-Nucleofector TM システム	ロンザ コアユニット AAF- 1002B Yユニット AAF- 1002Y	1	2,551,500	2,551,500	2014/1/15	東北大学
顕微鏡デジタルカメラ デスクトップPC組合せ	オリンパス DP26-A	1	993,825	993,825	2014/1/21	東北大学
ステリサイクルCO2 インキュベータ	サーモフィツジャーサイエン ティフィック 370 乾熱 滅菌タイプ	2	945,000	1,890,000	2014/1/31	東北大学
4D-Nucleofector X ユニット	ロンザ AAF-1002X	1	1,370,250	1,370,250	2014/2/4	東北大学