

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23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。前年度までの解析で、*Fas* 遺伝子の RAS による発現抑制を誘導するには、転写・翻訳の活性が必要なことが判明した。すなわち *Fas* 遺伝子の発現抑制は何らかの遺伝子発現とタンパク質合成を介していると考えられた。そこで、遺伝子発現を網羅的に抑制することができる shRNA ライブラリーを用いて *Fas* 遺伝子の転写抑制を解除するようなクローン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。

転写抑制とエピゲノム状態の変化の関係について調べる。まず、*Fas* 遺伝子領域について ChIP を行い、特徴的な変化の有無を調べる。特に基本転写因子や RNA ポリメラーゼについては、リン酸化などの修飾にも注目する。RAS は細胞外からのシグナルを伝達するが、翻訳後修飾がシグナルとして用いられている可能性が大きいと考えている。同様に、転写が抑制される RAS 導入時の基本転写因子や RNA ポリメラーゼの存在量を調べる。

次に、RAS によるシグナルの活性化によって核内の構造変化を調べる。まず、核内の転写領域と *Fas* 遺伝子の相対位置関係を明らかとし、さらにその領域に集合する染色体群を網羅的に同定することを試みる。

**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 *Fas* は、膜表面抗原であり、生細胞であっても、蛍光色素を標識した抗 *Fas* 抗体を用いて Flowcytometer を用いて発現量を定量化することができる。そこで、ShRNA ライブラリーを NIH3T3 細胞に発現させ、*Fas* の発現量の変化をモニタリングし、RASにより *Fas* のタンパク量が低下するクローンの単離を試みた。まず Flowcytometer による *Fas* タンパク質の認識を効果的に行うために *Fas* タンパク質の発現量が高い細胞の検索を行った。いくつかの候補となる細胞種を得ることができたが、ShRNA ライブラリーの導入効率が低いことが判明し、当初の計画どおり NIH3T3 細胞を用いることに決定した。

**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 の修飾が亢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 の修飾亢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亢進する領域を発見した。また、それらの変化は変異型 RAS や Raf の過剰発現によって転写がまず変化し、ついで Histone H3K27me3 の修飾が変化することを、見いだした。このことは、これまでヒストンの修飾によって転写

様式19 別紙1

活性が変化すると考えられてきたが、むしろ転写活性の変化がヒストンの修飾変化をもたらしていることを示唆する。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 12 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 10 件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Fotovati, A., Abu-Ali, S., Nakayama, K., Nakayama, K.I.: Impaired ovarian development and reduced fertility in female mice deficient in Skp2. <i>J Anat</i> 218: 668-677 (2011).</li> <li>2. Funaki, T., Kon, S., Ronn, R.E., Henmi, Y., Kobayashi, Y., Watanabe, T., Nakayama, K., Tanabe, K., Satake, M.: Localization of SMAP2 to the TGN and its Function in the Regulation of TGN Protein Transport. <i>Cell Struct Funct</i> 36: 83-95 (2011).</li> <li>3. Matsumoto, A., Tateishi, Y., Onoyama, I., Okita, Y., Nakayama, K., Nakayama, K.I.: Fbxw7beta resides in the endoplasmic reticulum membrane and protects cells from oxidative stress. <i>Cancer Sci</i> 102: 749-55 (2011).</li> <li>4. Onoyama, I., Suzuki, A., Matsumoto, A., Tomita, K., Katagiri, H., Oike, Y., Nakayama, K., Nakayama, K.I.: Fbxw7 regulates lipid metabolism and cell fate decisions in the mouse liver. <i>J Clin Invest</i> 121: 342-54 (2011).</li> <li>5. Matsumoto, A., Susaki, E., Onoyama, I., Nakayama, K., Hoshino, M., Nakayama, K.I.: Deregulation of the p57-E2F1-p53 Axis Results in Nonobstructive Hydrocephalus and Cerebellar Malformation in Mice. <i>Mol Cell Biol</i> 31 : 4176-92 (2011).</li> <li>6. Fuster, J. J., Gonzalez-Navarro, H., Vinue, A., Molina, P., Andres-Manzano, M.J., Nakayama, K.I., Nakayama, K., Diez-Juan, A., Bernad, A., Rodriguez, C., Martinez-Gonzalez, J., Andres, V.: Deficient p27 Phosphorylation at Serine 10 Increases Macrophage Foam Cell Formation and Aggravates Atherosclerosis Through a Proliferation-Independent Mechanism. <i>Arterioscler Thromb Vasc Biol</i> 31 : 2455-2463 (2011).</li> <li>7. Zou, P., Yoshihara, H., Hosokawa, K., Tai, I., Shinmyozu, K., Tsukahara, F., Maru, Y., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Suda, T.: p57(Kip2) and p27(Kip1) Cooperate to Maintain Hematopoietic Stem Cell Quiescence through Interactions with Hsc70. <i>Cell Stem Cell</i> 9 : 247-261 (2011)</li> <li>8. 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).</li> <li>9. Bargagna-Mohan, P., Paranthan, R.R., Hamza, A., Zhan, C.G., Lee, D.M., Kim, K.B., Lau, D.L., Srinivasan, C., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Herrmann, H., Mohan, R.: Corneal antifibrotic switch identified in genetic and pharmacological deficiency of vimentin. <i>J Biol Chem.</i> 287, 989-1006 (2012).</li> <li>10. 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).</li> </ol>
------------------------	---

様式19 別紙1

	<p>(掲載済み－査読無し) 計 0 件</p> <p>(未掲載) 計 2 件</p> <p>11. 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> (in press)</p> <p>12. Fukushima, H., Matsumoto, A., Inuzuka, H., Zhai, B., Lau, WA., Wan, L., Gao, D., Shaik, S., Yuan, M., Gygi, PS., Jimi, E., Asara, MJ., Nakayama, K., Nakayama, KI and Wei, W.: SCFFbw7 modulates the NFkB signaling pathway by targeting NFkB2 for ubiquitination and destruction. <i>Cell Reports</i> (in Press)</p>
<p>会議発表 計 12 件</p>	<p>専門家向け 計 11 件</p> <p>1. 中山啓子, 石田典子: Ku80のユビキチン化を介したDNA二重鎖切断修復制御 (第17回国際癌治療増感研究会, 仙台, 2011/6/25)</p> <p>2. 舟山亮, 中山 啓子: RASシグナルによるエピゲノム変化と遺伝子発現制御 (第8回がん・エピゲノム研究会, 仙台・宮城, 2011/7/21)</p> <p>3. Nakayama, K., Onoyama, I., Matsumoto, A., Ishikawa, Y., Aoyama, S., Nakayama, K.: Tissue-specific function of Fbxw7 revealed by conditional gene targeting in multiple mouse organs (Cold Spring Harbor Laboratory 2011 Meeting &amp; Courses "The Ubiquitin Family", NY, USA, 2011/5/19)</p> <p>4. Hosogane, M., Nakayama, K.: H3K27 is tri-methylated after Ras-mediated regional silencing (70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Nagoya, 2011/10/4)</p> <p>5. Nakayama, K.: Cdt1 inhibitor, Geminin negatively regulates thrombopoiesis (The 5th International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest, Okinawa, 2011/10/24)</p> <p>6. Hosogane, M., Funayama, R., Nishida, Y., Nagashima, T., Nakayama, K.: Changes of trimethylation of H3K27 occurs after Ras-mediated transcriptional regulation (The 5th International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest, Okinawa, 2011/10/24)</p> <p>7. 石田典子, 家村俊一郎, 安井明, 夏目徹, 中山啓子 : Ku80のユビキチン化を介したDNA二重鎖切断修復制御 (一般ポスター, 第34回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011/12/15)</p> <p>8. 石田典子, 家村俊一郎, 安井明, 夏目徹, 中山啓子 : Ku80のユビキチン化を介したDNA二重鎖切断修復制御 (一般講演, 第34回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011/12/16)</p> <p>9. Hosogane, M., Funayama, R., Nishida, Y., Nagashima, T., Nakayama, k.: Change of trimethylation of H3K27 occurs after Ras-mediated transcriptional regulation (一般講演, The 34th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 横浜, 2011/12/16)</p> <p>10. Hosogane, M., Funayama, R., Nishida, Y., Nagashima, T., Nakayama, k.: Change of trimethylation of H3K27 occurs after Ras-mediated transcriptional regulation (一般ポスター, The 34th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 横浜, 2011/12/16)</p> <p>11. 松本光代, ブリドン アンドレイ, 中目亜矢子, 舟山亮, 西田有一郎, 中山啓</p>

様式19 別紙1

	<p>子, 八重樫伸生, 五十嵐和彦 : Bach1の転写制御標的遺伝子の同定 (一般ポスター, 第34回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011/12/15)</p> <p>一般向け 計1件</p> <p>1. 中山啓子 : 次世代シーケンサーを用いた変異解析 (東北大学イノベーションフェア2012, 東京, 2012/3/15)</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 <a href="http://www.devgen.med.tohoku.ac.jp/">http://www.devgen.med.tohoku.ac.jp/</a></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 <a href="http://www.art.med.tohoku.ac.jp/">http://www.art.med.tohoku.ac.jp/</a></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>東北大学イノベーションフェアで研究成果を発表した。</p> <p>(場所:東京フォーラム、対象者:企業・一般市民、来場者:591名、研究成果をポスター発表した。)</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23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	0	90,600,000	0
間接経費	39,600,000	12,420,000	0	27,180,000	0
合計	171,600,000	53,820,000	0	117,780,000	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	40,908,915	0	0	40,908,915	36,621,599	4,287,316	0
間接経費	12,270,000	0	0	12,270,000	12,270,000	0	0
合計	53,178,915	0	0	53,178,915	48,891,599	4,287,316	0

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	18,050,738	シークエンサー用試薬、細胞培養用血清、培地ほか消耗品等
旅費	788,350	学会、研究打合せ旅費(日本癌学会、日本分子生物学会等)
謝金・人件費等	13,461,929	謝金1名、博士研究員1名、研究補助員2名
その他	4,320,582	動物実験施設維持管理料、運送料、機器修理代等
直接経費計	36,621,599	
間接経費計	12,270,000	
合計	48,891,599	

## 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
イルミナ TruSeq SBS Kit	V3-HS 200cycle	1	865,200	865,200	2012/3/19	細胞増殖制御分野
				0		
				0		