

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700951

研究課題名(和文)がん原遺伝子RASの新しい遺伝子サイレンシング機能の解明

研究課題名(英文)A novel role of oncogenic RAS in gene silencing

研究代表者

舟山 亮(FUNAYAMA, Ryo)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20452295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：RAS-MAPKシグナルは細胞のがん化を防ぐ遺伝子の発現量を低下させてしまう。これは、細胞のがん抑制機構を崩壊させ、細胞のがん化を促進すると考えられる。本研究課題では、RAS-MAPKシグナルによる遺伝子発現の抑制機構について研究を実施し、発現が抑制される遺伝子領域で特定のヒストンタンパク質の翻訳後修飾が増加することを明らかにした。転写が抑制される遺伝子では、転写量が低下した後このヒストン修飾量が増加していた。また、転写抑制に関わる3種類のクロマチンタンパク質を同定した。

研究成果の概要(英文)：RAS-MAPK signaling regulates cell growth and survival. It is abnormally activated in cancer cells and represses transcription of tumor-suppressive genes to enhance tumorigenesis of the cells. In this study, I investigated the molecular mechanism of RAS-mediated transcriptional repression. RAS-MAPK signaling increases the amount of a histone modification in transcriptionally repressed genes. The alteration of the histone modification occurs after alteration of transcription, suggesting that the histone modification functions to maintain transcriptionally repressed state. Furthermore, I identified three chromatin proteins, which are required for transcriptional repression.

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：エピジェネティクス ヒストン 発がん RAS 転写 サイレンシング shRNA スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

RAS は細胞の増殖を制御するシグナル伝達分子で、下流の MAPK 経路や PI3K 経路などを介して、細胞の増殖や生存に関わる遺伝子の発現を調節している。多くのがん細胞ではこの RAS 遺伝子に異常活性化型の突然変異が起きているため、RAS タンパク質が常に活性化した状態にあって、その結果として細胞の増殖能が亢進している。したがって、RAS-MAPK シグナル経路と細胞のがん・悪性化とは密接に関連している。

このような背景から、RAS-MAPK シグナルによる遺伝子発現制御は古くから研究されており、特に転写活性化される細胞周期関連遺伝子についてはその機能的な役割や転写活性化の分子機構がよく調べられている。これに対して、RAS-MAPK シグナルにより転写抑制される遺伝子については不明な点が多い。例えば、RAS-MAPK シグナルは Fas、Par4、Reck などがん化に抑制的に働く遺伝子群を転写抑制する。このような RAS の遺伝子サイレンシング機能は、がん抑制機構の破綻を引き起こし、細胞のがん化を促進すると考えられている。しかしながら、遺伝子プロモーター領域に着目して行われた先行研究では、遺伝子サイレンシングの分子機構を必ずしも明らかにできていない。

転写活性の変化は、一般に、プロモーター領域で局所的に起こるエピゲノムの変化や、転写因子の活性・局在変化によって制御される。一方で、数百 kb にわたる広範な領域のエピゲノム環境変化とクロマチン構造変化が、転写活性に影響を及ぼすことがある。例えば申請者は、クロマチンの高次構造の形成にはたらくヒストン H1 タンパク質が細胞老化の過程で消失し、これが染色体規模のクロマチン構造変化に関わっていることを報告している。また、クロマチン結合タンパク質 CTCF は、染色体の高次構造を変化させて、周辺遺伝子の発現を調節していることが知られている。

本研究課題に先立って申請者は、RAS-MAPK シグナルに応答して転写抑制される Fas 遺伝子に着目し、転写抑制の分子機構を明らかにするために Fas 遺伝子の全長と上流 100kb を含む BAC レポーター DNA を構築した。これをマウス胎仔由来線維芽細胞である NIH3T3 細胞の染色体に挿入して、RAS-MAPK シグナルを活性化させたが、BAC DNA 上の Fas 遺伝子は部分的にしか転写抑制されなかった。この結果は、RAS-MAPK シグナルに応答した Fas 遺伝子の転写抑制には Fas のプロモーター上の変化だけでは不十分であることを示している。すなわち、Fas 遺伝子の転写抑制は、転写因子の活性・局在変化だけでなく、より広範な染色体領域にわたって起こるエピゲノム変化やクロマチン構造変化が関わっていると考えられた。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は、「RAS-MAPK シグナルの活性化が数百 kb にわたる広範な染色体領域の構造変化を引き起こし、がん抑制性の遺伝子群の転写をサイレンシングする分子機構を明らかにすること」である。これを明らかにできれば、高次のクロマチン構造変化を介した遺伝子発現制御という点で新しい概念を提起できる可能性があり、未知の点が多い核内での染色体高次構造と遺伝子発現制御との関係を分子レベルで明らかにできると期待できる。また、RAS-MAPK シグナルによるがん抑制遺伝子の発現制御機構を明らかにできれば、がん治療の新たな標的を見出すことができると予想され、この点で医学的にも研究の発展が期待できる。

そこで本研究課題では次の 3 つの研究目的を設定し、研究を遂行することとした。

- (1) Fas 遺伝子の転写抑制に関わるエピゲノム環境を明らかにする。RAS-MAPK シグナルが活性化し、Fas 遺伝子が転写抑制される過程で、Fas 遺伝子周辺領域で変化する DNA メチル化やヒストン翻訳後修飾などのエピゲノム修飾を明らかにする。特に RAS-MAPK シグナルに応答したエピゲノム修飾の経時変化に着目して解析を行い、修飾変化と転写変化が起こるタイミングを明らかにする。また、このエピゲノム修飾に関わる責任酵素を明らかにして遺伝子ノックダウン実験を行い、エピゲノム環境変化が転写に及ぼす影響を明らかにする。
- (2) Fas 遺伝子の転写抑制にはたらくクロマチン制御因子を同定する。Fas 遺伝子は細胞表面の受容体タンパク質をコードしているので、抗 Fas 抗体を用いたフローサイトメトリーにより Fas 遺伝子の発現量を細胞が生きたままモニターできる。そこで Fas 遺伝子が転写抑制された細胞に shRNA ライブラリを導入して、Fas 遺伝子が高発現するように変化した細胞を分取する。分取した Fas 高発現細胞では Fas 遺伝子の転写抑制にはたらく因子がノックダウンされていると予想されるので、この細胞がもつ shRNA を決定することによりその標的遺伝子を同定する。また、同定した遺伝子が Fas 遺伝子を転写抑制する作用機構を解明する。
- (3) (2) で同定したクロマチン制御因子のゲノムワイドな局在解析を行い、その標的遺伝子を網羅的に同定する。標的遺伝子の中にがんの抑制に寄与する遺伝子群や、特定の生理機能に働く遺伝子群が存在する可能性を、インフォマティクス解析により検証する。

以上の 3 つの解析から得られた情報を統合して、RAS-MAPK シグナルによる Fas 遺伝子サイレンシングの分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究で使用したマウス胎仔由来線維芽細胞株 NIH3T3 は ATCC から購入した。MEF 細胞は C57BL6 系統のマウス胎仔から樹立した。これらの細胞は 10%FBS 含有 DMEM (Sigma) を用いて培養した。RAS-MAPK シグナルを活性化するために、ヒト HRAS 遺伝子の恒常的活性化型変異体 (G12V) を細胞に導入した。また、RAS-MAPK シグナルを誘導的に活性化するために、RAF 遺伝子と ER 遺伝子の融合遺伝子 RAF-ER を細胞に導入し、4HT (Sigma) 処理により RAF-ER を活性化した。RAS-MAPK シグナルを活性化した細胞で Fas 遺伝子の発現が抑制されていることは、RT-qPCR による mRNA の解析と、抗 Fas 抗体を用いたフローサイトメトリーにより確認した。

Fas 遺伝子の転写抑制に関わるエピゲノム修飾の探索では、当初 BAC レポーターシステムを用いることを計画していたが、内在性の Fas 遺伝子領域のエピゲノム環境を直接解析できる方法に計画を変更した。エピゲノム修飾の解析では DNA メチル化修飾をバイサルファイトシークエンスにより行った。ヒストン翻訳後修飾の解析は特異的な抗ヒストン抗体を用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP) と qPCR により実施した。

全遺伝子の発現定量解析は RNA-seq により行った。また、全ゲノムのヒストン H3 K27 トリメチル (H3K27me3) 修飾の解析では ChIP-seq を実施した。RNA-seq では細胞から total RNA を抽出し、polyA 精製法により mRNA を選択的に回収した。これを 2 段階の逆転写反応により二本鎖 DNA に変換した。ChIP-seq では、免疫沈降により二本鎖 DNA を得た。得られた二本鎖 DNA の両端にアダプター DNA を付加してライブラリを作製し、次世代 DNA シークエンサー SOLiD4 (Life Technologies) および HiSeq2000 (illumina) を用いて塩基配列を読み取った。読み取った配列データは DDBJ Sequence Read Archive (DRA) に登録した (accession number DRA001075)。

shRNA ライブラリのスクリーニングでは、HRAS G12V を導入し、Fas 遺伝子が転写抑制された状態の NIH3T3 細胞を使用した。この細胞に shRNA を発現するレンチウイルス (Celllecta) を感染させ、残存ウイルスをよく除いた後、フローサイトメトリーにより Fas タンパク質発現量を解析した。shRNA を導入した細胞集団の中から Fas タンパク質発現量の高い上位 5% を分取し、約 1 週間培養した。培養した細胞からゲノム DNA を抽出し、shRNA 配列に隣接するバーコード配列を PCR で増幅した。これを次世代 DNA シークエンサー Genome Analyzer IIx または HiSeq2000 (illumina) を用いて読み取り、Fas 高発現細胞がもつ shRNA のコピー数とその標的遺伝子を Deconvoluter ソフトウェア (Celllecta) により解析した。

4. 研究成果

(1) RAS-MAPK シグナルは Fas 遺伝子領域の H3K27me3 修飾量を増加させる。

RAS-MAPK シグナルに応答して Fas 遺伝子周辺領域で変化するエピゲノム修飾を探索した。HRAS G12V 遺伝子またはコントロールベクターを導入した NIH3T3 細胞を用いて、Fas 遺伝子プロモーター領域のバイサルファイトシークエンス解析を実施し、DNA メチル化状態を調べた。しかし、2 つの細胞間で DNA メチル化状態の変化は見られなかった。

そこで、転写抑制性のヒストン H3 修飾である H3 K9 ジメチル (H3K9me2)、H3 K9 トリメチル (H3K9me3) および H3K27me3 修飾の変化を ChIP-qPCR により調べた。その結果、Fas 遺伝子とその周辺遺伝子を含む 100kb 以上にわたるクロマチン領域で H3K27me3 修飾量が増加していることが明らかになった。H3K9me2 および H3K9me3 修飾量に変化は見られなかった。したがって、RAS-MAPK シグナルが活性化して Fas 遺伝子が転写抑制された細胞では、Fas を含む広範な遺伝子領域の H3K27me3 修飾量が増加することが分かった。

この RAS-MAPK シグナルに応答した H3K27me3 修飾量の増加と転写抑制との関係をゲノムワイドで明らかにするために、HRAS 遺伝子導入後の細胞を用いて H3K27me3 の ChIP-seq 解析と RNA-seq 解析を実施した。特に転写変化と修飾変化のタイミングを明らかにするために、HRAS 遺伝子導入後の転写量と修飾量の経時変化を重点的に解析した。その結果、RAS-MAPK シグナルに応答して転写が抑制され、同時に H3K27me3 修飾量が増加する遺伝子が 49 個存在した。これら 49 個の遺伝子の転写変化と修飾変化のタイミングを調べたところ、はじめに転写量が低下し、そのあとで H3K27me3 修飾量が増加することが明らかになった。Fas 遺伝子領域でも同様の変化が起きていた。

転写量がはじめに低下し、そのあとで H3K27me3 修飾量が増加するという以上の結果は、転写抑制には H3K27me3 修飾変化は必要でないことを示唆している。この仮説を検証するために、H3K27me3 修飾酵素である Suz12 をノックダウンして、Fas 遺伝子の転写抑制に及ぼす影響を調べた。その結果、RAS-MAPK シグナルに応答した Fas 遺伝子の転写抑制には H3K27me3 修飾変化は必要でないことが明らかになった。

一般に H3K27me3 修飾はヘテロクロマチンの形成に関わる転写抑制性のヒストン修飾と考えられているので、修飾変化が転写変化の後に起きていること、修飾変化が転写抑制に必要なことは予想外の結果であった。そこでこの興味深い知見を論文発表した (雑誌論文 1)。転写抑制の後に起こる H3K27me3 修飾量の増加は、転写抑制状態の維持に働いているのかもしれない。

(2) Fas 遺伝子の転写抑制にはたらくクロマチン制御因子の同定。

Fas 遺伝子周辺の H3K27me3 修飾量は Fas 遺伝子の転写抑制と一致して増加するが、転写抑制には必要でなかった。そこで、RAS-MAPK シグナルに応答して Fas 遺伝子を転写抑制するクロマチン制御因子を同定するために shRNA ライブラリのスクリーニングを実施した。スクリーニングでは、HRAS 遺伝子を発現し、Fas の転写が抑制されている細胞に shRNA ライブラリを導入した。その後、Fas が高発現するように変化した細胞を、抗 Fas 抗体を用いたフローサイトメトリーにより分取した。

分取した Fas 高発現細胞では Fas 遺伝子の発現量が転写レベルで増加していた。そこで、この細胞からゲノム DNA を抽出し、細胞がもつ shRNA とその標的遺伝子を決定した。その結果、Fas 高発現細胞は Mapk1 遺伝子に対する shRNA を多くもつことが分かった。Mapk1 遺伝子は MAPK シグナル経路を構成する遺伝子で、RAS-MAPK シグナルに応答した Fas の転写抑制に必要である。スクリーニングの結果として Mapk1 遺伝子が得られたことから、スクリーニングの実験系は正しく機能していると考えられた。

Fas 高発現細胞がもつ shRNA をさらに詳しく調べた結果、クロマチンや転写に関わる 16 個の遺伝子を得た。これらの遺伝子に対してさらに複数の shRNA を設計し、Fas 遺伝子の発現に及ぼす影響を調べた結果、ヒストン修飾酵素 K、クロマチン結合タンパク質 M、転写因子 R の 3 個の遺伝子をノックダウンすると、Fas の転写量が増加することが分かった。すなわち、これら 3 個のタンパク質が Fas 遺伝子を転写抑制していると考えられた。特にクロマチン結合タンパク質 M と転写因子 R については、shRNA に非感受性の変異 cDNA を発現させると表現型がレスキューできた。このことから、shRNA が Fas の発現に及ぼす影響はオフターゲット効果による非特異的なものではなく、特異的なものであると考えられた。

また、同定した 3 個のタンパク質のアミノ酸配列を調べた結果、ヒストン修飾酵素 K は MAPK によってリン酸化されるコンセンサスモチーフ PX(S/T)P 配列をもつことが分かった。ヒストン修飾酵素 K は RAS-MAPK シグナルを介したリン酸化によって酵素活性や細胞内局在が制御されている可能性が考えられた。

本研究の結果、Fas 遺伝子の転写抑制にはたらくクロマチン制御因子の有力な候補を得た。現在、候補タンパク質の生化学的な解析を進めており、候補タンパク質が RAS-MAPK シグナルに応答してどのように Fas 遺伝子を転写抑制するのか、その作用機構を明らかにしようとしている。

(3) クロマチン制御因子のゲノムワイドな局在解析。

Fas 遺伝子の転写抑制にはたらく 3 個の候補タンパク質のうち、転写因子 R についてはマウスの細胞を用いたゲノムワイドな局在解析の報告があり、そのデータがパブリックデータベース(NCBI GEO)に登録されていた。そこでこのデータを入手し、Fas 遺伝子周辺領域の転写因子 R の結合部位を調べた結果、転写開始点周辺を含む複数の領域に結合していることが明らかになった。現在、このデータと本研究課題で実施した RNA-seq のデータを統合し、転写因子 R の標的遺伝子を探索している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

Hosogane, M., Funayama, R., Nishida, Y., Nagashima, T. & Nakayama, K. Ras-induced changes in H3K27me3 occur after those in transcriptional activity. *PLoS genetics* 9, e1003698 (2013). 査読有

DOI: 10.1371/journal.pgen.1003698

Ninomiya, M., Kondo, Y., Funayama, R., Nagashima, T., Kogure, T., et al. Distinct MicroRNAs Expression Profile in Primary Biliary Cirrhosis and Evaluation of miR 505-3p and miR197-3p as Novel Biomarkers. *PloS one* 8, e66086 (2013). 査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0066086

舟山亮. ChIP-seq 解析をはじめの人のために-ENCODE の ChIP-seq 解析ガイドライン. *実験医学増刊* 31, 201-205 (2013) 査読無

<https://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/book/9784758103282/index.html>

中山啓子, 舟山亮. Illumina 社製シーケンサーの特徴と可能性. *肝胆膵* 67, 25-33 (2013). 査読無

<http://arcmidm.co.jp/publication02.php?a=201307>

Ninomiya, M., Ueno, Y., Funayama, R., Nagashima, T., Nishida, Y., et al. Use of illumina deep sequencing technology to differentiate hepatitis C virus variants. *J Clin Microbiol* 50, 857-866 (2012). 査読有

DOI: 10.1128/JCM.05715-11.

舟山亮, 長嶋剛史, 中山啓子. 高感度に

多型を検出するためのエキソーム・シーケンシング. 実験医学 30, 629-34 (2012).
査読無
<https://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/book/9784758100816/index.html>

〔学会発表〕(計 10 件)

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, 神戸, 2013 年 12 月 3 日

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, 神戸, 2013 年 12 月 3 日

舟山亮: RAS-MAPK シグナルによる遺伝子発現制御とエピゲノム変化, 疾患エピゲノムコアセンター第 1 回ミニシンポジウム, 仙台, 2013 年 10 月 26 日

Matsushima, W., Funayama, R., Nagashima, T., Nakayama, K. : Comprehensive Analysis of Ras-Mediated Alternative Splicing, NIH-Tohoku University-JSPS Symposium, 仙台, 2013 年 5 月 10 日

Nakayama, K., Hosogane, M., Funayama, R., Nagashima, T. : Change of Trimethylation of H3K27 Occurs after Ras-mediated Transcriptional Regulation, NIH-Tohoku University-JSPS Symposium, 仙台, 2013 年 5 月 9 日

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 による転写制御後に H3K27me3 修飾変化が誘起される, 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡, 2012 年 12 月 14 日

舟山亮, 細金正樹, 長嶋剛史, 中山啓子: shRNA ライブラリのスクリーニングによる遺伝子サイレンシング機構の解析, 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡, 2012 年 12 月 13 日

松島和洋, 舟山亮, 長嶋剛史, 中山啓子: RAS シグナルによる選択的スプライシング変化の網羅的解析, 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡, 2012 年 12 月 12 日

Matsushima, W., Funayama, R., Nagashima, T., Nakayama, K. : Comprehensive analysis of alternative splicing by next-generation sequencer, Winter Camp of GCOE 2012, Tohoku University Global COE for Conquest of Signal Transduction Diseases with "Network Medicine" 仙

台, 2012 年 2 月 4 日

Hosogane, M., Funayama, R., Nishida, Y., Nagashima, T., Nakayama, K. : Change of trimethylation of H3K27 occurs after Ras-mediated transcriptional regulation, Winter Camp of GCOE 2012, Tohoku University Global COE for Conquest of Signal Transduction Diseases with "Network Medicine" 仙台, 2012 年 2 月 4 日

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.devgen.med.tohoku.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

舟山 亮 (FUNAYAMA RYO)

東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 20452295

(2) 研究分担者 該当なし

(3) 連携研究者 該当なし

(4) 研究協力者

長嶋 剛史 (NAGASHIMA TAKESHI)

東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 80443000

細金 正樹 (HOSOGANE MASAKI)

東北大学・大学院医学系研究科・大学院生