
高精細アプローチで迫る転写サイクル機構の統一的理解
(略称：転写サイクル)

領域番号 3408

平成24年度～平成28年度
科学研究費助成事業（科学研究費補助金）
（新学術領域研究（研究領域提案型））研究成果報告書

平成29年6月

領域代表者 山口 雄輝
東京工業大学生命理工学院 教授

目 次

はしがき	3
1. 領域概要	
1.1 研究組織	5
1.2 交付決定額	10
1.3 研究発表	
1.3.1 雑誌論文	11
1.3.2 主な学会発表	35
1.3.3 図書・和文総説	49
1.3.4 その他	52
1.4 研究成果による産業財産権の出願・取得状況	58
1.5 研究領域の目的及び概要	60
1.6 研究組織と各研究項目の連携状況	62
1.7 研究領域の達成度	65
1.8 主な研究成果	69
2. 個別研究成果報告	
山口 雄輝 (計画研究 1 代表者)	74
田村 智彦 (計画研究 1 分担者)	76
川内 潤也 (計画研究 1 分担者)	78
高橋 秀尚 (計画研究 1 分担者)	80
伊藤 敬 (計画研究 2 代表者)	82
大熊 芳明 (計画研究 2 分担者)	84
高橋 陽介 (計画研究 3 代表者)	86
緒方 一博 (計画研究 4 代表者)	88
十川久美子 (計画研究 5 代表者)	91
松本 直通 (計画研究 6 代表者)	94
三宅 紀子 (計画研究 6 分担者)	
中村 春木 (計画研究 7 代表者)	96
藤井 聡 (計画研究 7 分担者)	99
秋光 信佳 (公募研究 代表者)	101
井手 聖 (公募研究 代表者)	103
伊藤 寿朗 (公募研究 代表者)	105
井上 康志 (公募研究 代表者)	107
浦 聖恵 (公募研究 代表者)	109
太田 力 (公募研究 代表者)	111
大野 欽司 (公募研究 代表者)	113
黒柳 秀人 (公募研究 代表者)	115
古久保哲朗 (公募研究 代表者)	117
佐藤 政充 (公募研究 代表者)	119
佐藤ゆたか (公募研究 代表者)	121
スタセピッチ テイモン (公募研究 代表者)	123
高田 彰二 (公募研究 代表者)	126
高畑 信也 (公募研究 代表者)	128

原田 昌彦 (公募研究 代表者)	131
坂東 優篤 (公募研究 代表者)	133
平田 章 (公募研究 代表者)	135
藤井 穂高 (公募研究 代表者)	137
別所 康全 (公募研究 代表者)	139
前川 利男 (公募研究 代表者)	141
南 敬 (公募研究 代表者)	143
村上 洋太 (公募研究 代表者)	145
村谷 匡史 (公募研究 代表者)	147
村野 健作 (公募研究 代表者)	149
矢田 哲士 (公募研究 代表者)	151
山本 拓也 (公募研究 代表者)	153
横山 明彦 (公募研究 代表者)	155
米澤 康滋 (公募研究 代表者)	157
和田洋一郎 (公募研究 代表者)	159

はしがき

転写研究の難しさは、その高度な階層性にあります。転写制御のメカニズムを本当に理解するには、個体レベルや細胞レベルから分子レベル、原子レベルに至るまで、各階層の知識を統合する必要がありますが、技術的困難さのため、これまで各階層の研究は独立に進められてきました。本新学術領域研究「高精細アプローチで迫る転写サイクル機構の統一的理解（略称：転写サイクル）」には、これまで各階層で転写研究を行ってきた研究者が結集し、さらに各階層の研究の融合を促進する触媒として、先端的技術を有する研究者と情報・計算科学の専門家が参加しました。本領域で我々は、転写サイクルという新規概念を導入し、「高精細アプローチ」によって、これまで独立に進められてきた転写の各ステップの研究を統合し、転写制御の全体像を定量的に明らかにすることを目的としました。さらに、高精細アプローチによって転写サイクルと高次生命現象とのつながりを明らかにすることを目的としました。研究対象の定性的理解から定量的理解へのシフト、個別事象の理解から包括的理解へのシフトを目指す本研究の取り組みは、生命科学全体の発展につながり、大きな波及効果を持つと考えられます。

本領域の主な研究成果をいくつかご紹介すると、①転写サイクルの一連の粗過程の機能的相互作用に関する解析の結果、従来から知られていた前のステップが後のステップに影響するフィードフォワード制御だけでなく、後のステップが前のステップに影響するフィードバック制御も存在することが新たに分かりました。さらに、複数の分岐過程の制御機構も明らかにしました。②複数の核内因子を同時に1分子観察する技術開発により、生細胞内において転写活性化から転写開始、転写伸長に至る過程でのエピゲノム変化とPol IIの動態をサブ秒オーダーの時間分解能で測定し、反応速度論的な解析を行えるようになりました。③ウェットとドライの融合により、従来のウェット構造解析のみでは捉えられなかった転写因子/DNA複合体の化学修飾による天然変性領域の振る舞いの変化を描出することに成功しました。④iChIP法、enChIP法、ePICH法、Multiplexed 3C-seq法、酵母シングルセル発現解析法といった新規実験法の開発を支援し、多数の研究成果へと結実しました。⑤全エクソームシーケンス法による疾患ゲノム解析のパイプラインを構築し、*ARID1A*、*SMARCB1*、*SOX11*、*KDM6A*等の転写/クロマチン因子をコードする遺伝子の変異が遺伝病を引き起こすことを明らかにしました。⑥転写サイクルと高次生命現象のつながりに関して、血液細胞の分化過程を制御する巧妙なエンハンサー/プロモーター相互作用を明らかにしました。また、癌化を引き起こす新たなヒストン修飾を同定し、植物の成長促進ホルモンであるジベレリンによる転写制御機構を解明しました。詳しくは、5年間の活動成果をまとめた本報告書をご覧くださいと幸いです。

本領域の活動にご尽力いただいた班員その他関係者の皆さま、評価委員の先生方に心より感謝申し上げます。

平成 29 年 6 月 領域代表者 山口雄輝

1. 領域概要

1.1 研究組織

【X00 総括班】

研究代表者	山口 雄輝	東京工業大学・生命理工学院・教授	領域の総括
研究分担者	伊藤 敬	長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授	企画調整 広報
研究分担者	高橋 陽介	広島大学・大学院理学研究科・教授	企画調整 シンポジウム
研究分担者	緒方 一博	横浜市立大学・大学院医学研究科・教授	事務局 ホームページ運営
研究分担者	十川 久美子	東京工業大学・生命理工学院・准教授	技術交流 若手支援
研究分担者	松本 直通	横浜市立大学・大学院医学研究科・教授	技術交流 国際担当
研究分担者	中村 春木	大阪大学・蛋白質研究所・教授	技術交流 シンポジウム
研究協力者	石井 俊輔	理化学研究所・分子遺伝学研究室・上席研究員	領域の評価と助言
研究協力者	佐藤 文俊	東京大学・生産技術研究所・教授	領域の評価と助言
研究協力者	塩見 春彦	慶応義塾大学・医学部・教授	領域の評価と助言
研究協力者	田中 亀代次	大阪大学・大学院生命機能研究科・特任教授	領域の評価と助言 (H24～26年度)
研究協力者	広瀬 進	国立遺伝学研究所・名誉教授	領域の評価と助言 (H27～28年度)

【A01 計画研究】

計画研究 1

P o l 2 の転写伸長・終結・リサイクル過程におけるチェックポイント制御機構の解明

研究代表者	山口 雄輝	東京工業大学・生命理工学院・教授	
研究分担者	田村 智彦	横浜市立大学・大学院医学研究科・教授	
研究分担者	川内 潤也	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教	(H24～26年度)
研究分担者	高橋 秀尚	北海道大学・大学院医学研究院・講師	(H27～28年度)
連携研究者	西山 晃	横浜市立大学・大学院医学研究科・准教授	
連携研究者	中林 潤	横浜市立大学・先端医科学研究センター・准教授	

計画研究 2

遺伝子転写再構築系による転写サイクル制御機構の解明

研究代表者	伊藤 敬	長崎大学・大学院医歯薬総合研究科・教授	
研究分担者	大熊 芳明	長崎大学・大学院医歯薬総合研究科・客員研究員	
研究分担者	廣瀬 豊	富山大学・大学院医学薬学研究部・准教授	(H27~28年度)
連携研究者	田中 重紀	富山大学・大学院医学薬学研究部・助教	
連携研究者	飯田 智	富山大学・大学院医学薬学研究部・特任助教	(H26年度)
連携研究者	水崎 博文	長崎大学・大学院医歯薬総合研究科・助教	
連携研究者	中川 武弥	長崎大学・大学院医歯薬総合研究科・助教	
連携研究者	相原 仁	長崎大学・大学院医歯薬総合研究科・助教	

計画研究 3

植物の成長制御エンハンソームの解析

研究代表者	高橋 陽介	広島大学・大学院理学研究科・教授	
連携研究者	草場 信	広島大学・大学院理学研究科・教授	

計画研究 4

静的・動的分子構造解析を基盤とした転写サイクル制御機構研究

研究代表者	緒方 一博	横浜市立大学・大学院医学研究科・教授	
連携研究者	椎名 政昭	横浜市立大学・大学院医学研究科・助教	
連携研究者	浜田 恵輔	横浜市立大学・大学院医学研究科・助教	

計画研究 5

生細胞核の複数種蛍光1分子イメージング定量解析による転写サイクルの機構解明

研究代表者	十川 久美子	東京工業大学・生命理工学院・准教授	
連携研究者	徳永 万喜洋	東京工業大学・生命理工学院・教授	
連携研究者	木村 宏	東京工業大学・科学技術創成研究院・教授	(H26~28年度)
連携研究者	斉藤 典子	熊本大学・発生医学研究所・准教授	(H26~28年度)

計画研究 6

大量並行シーケンスによるゲノムアッセイ

研究代表者	松本 直通	横浜市立大学・大学院医学研究科・教授	
研究分担者	三宅 紀子	横浜市立大学・大学院医学研究科・准教授	
連携研究者	宮武 聡子	横浜市立大学・医学部	(H24 年度)
連携研究者	大藪 謙次郎	横浜市立大学・医学部	(H25 年度)
連携研究者	今川 英里	横浜市立大学・医学部	(H26 年度)
連携研究者	輿水 江里子	横浜市立大学・医学部	(H27～28 年度)
連携研究者	藤田 京志	横浜市立大学・医学部	(H28 年度)
連携研究者	吉野 恭子	横浜市立大学・医学部	(H26～28 年度)

計画研究 7

計算・情報科学による転写サイクルにおける情報変換機構の解明

研究代表者	中村 春木	大阪大学・蛋白質研究所・教授	
研究分担者	皿井 明倫	九州工業大学・大学院情報工学研究院・教授	(H24 年度)
研究分担者	藤井 聡	九州工業大学・大学院情報工学研究院・助教	(H25～28 年度)
連携研究者	神谷 成敏	兵庫県立大学・大学院シミュレーション学研究科・特任教授	
連携研究者	河野 秀俊	量子科学技術研究開発機構・量子生命科学部・生体分子シミュレーショングループリーダー	
連携研究者	笠原 浩太	立命館大学・生命科学部・助教	

【A01 公募研究 (第1期、平成25~26年度)】

高橋 秀尚	北海道大学・大学院医学研究院・講師	Med26によってリクルートされる新規転写伸長複合体LECの機能解明
村上 洋太	北海道大学・大学院理学研究院・教授	RNAポリメラーゼIIとRNA・クロマチンのクロストーク 連携研究者：高畑 信也 (北大・理学・助教) 加藤 太陽 (島根大・医・助教)
原田 昌彦	東北大学・大学院農学研究科・准教授	転写サイクルにおけるクロマチンリモデリング複合体のリサイクル機構の解明
村野 健作	筑波大学・医学医療系・助教	新規高感度レポーター系を用いたrRNA遺伝子の種特異的転写開始機構の解析 連携研究者：永田 恭介 (筑波大学・学長)
和田 洋一郎	東京大学・アイソトープ総合センター・教授	炎症性刺激で誘導される転写ファクトリーの機能解析
黒柳 秀人	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授	転写産物の高精細プロファイリングによる転写と転写後プロセッシングの共役機構の解明
大野 欽司	名古屋大学・大学院医学系研究科・教授	神経変性疾患関連RNA結合タンパクFUSによる転写抑制機構解明
高田 彰二	京都大学・大学院理学研究科・教授	転写因子DNA探索のエネルギーランドスケープ理論：速度-親和性パラドックス
佐藤 ゆたか	京都大学・大学院理学研究科・准教授	DNAループによる転写調節機構の解明
横山 明彦	京都大学・大学院医学研究科・特定准教授	AEP複合体による転写サイクルの制御メカニズム
藤井 穂高	大阪大学・微生物病研究所・准教授	挿入的クロマチン免疫沈降法(iChIP)による細胞分化制御因子の転写機構の解明
井上 康志	大阪大学・大学院生命機能研究科・教授	転写制御因子によるDNA立体構造変化の光学的ナノ計測法開発
スタセビッチ ティモシー	大阪大学・大学院生命機能研究科・特任研究員	Quantifying epigenetic regulation of the transcription cycle in single living cells
平田 章	愛媛大学・大学院理工学研究科・講師	アーキア(古細菌)RNAポリメラーゼにおける転写開始機構および転写調節機構の解明
古久保 哲朗	横浜市立大学・大学院生命医科学研究科・教	基本転写因子TFIIDを介した転写調節機構の解明
米澤 康滋	近畿大学・先端技術総合研究所・教授	計算科学シミュレーションによるCTDの構造特性から探る転写調節機構
前川 利男	理化学研究所・石井分子遺伝学研究室・研究	次世代のマウスの遺伝子発現に影響を与える転写因子ATF-7の役割
太田 力	国立がん研究センター・多層オミックスバイオインフォマティクス分野・ユニット長	癌細胞における転写サイクルの強制回転の解析

【A01 公募研究 (第2期、平成27~28年度)】

高畑 信也	北海道大学・大学院理学研究院・助教	H P I と F A C T の共役によるグローバルな転写制御機構
原田 昌彦	東北大学・大学院農学研究科・准教授	転写サイクルにおけるクロマチンリモデリング複合体の動的リサイクルの解明
村谷 匡史	筑波大学・医学医療系・准教授	癌特異的クリプティック遺伝子プロモーターの転写サイクルプロファイリング
浦 聖恵	千葉大学・大学院理学研究科・教授	ヒストンH3K36メチル化酵素に着目した転写解剖 連携研究者：田村 隆明 (千葉大・理・教授)
坂東 優篤	東京大学・分子細胞生物学研究所・助教	コヒーシによる転写制御の分子機構の解明 連携研究者：中戸 隆一郎 (東大・分生研・助教)
秋光 信佳	東京大学・アイソトープ総合センター・教授	核内長鎖ノンコーディングRNAによる転写サイクル制御
黒柳 秀人	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授	転写産物の高精細プロファイリングによる転写と転写後プロセッシングの共役機構の解明
高田 彰二	京都大学・大学院理学研究科・教授	クロマチン構造と共役した転写因子動態の分子シミュレーション研究
山本 拓也	京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点講師	細胞分化可塑性を規定する染色体高次構造の解析
藤井 穂高	大阪大学・微生物病研究所・准教授	遺伝子座特異的クロマチン免疫沈降法による細胞分化制御因子の転写機構の解明
別所 康全	奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授	せきつい動物パターン形成における転写制御の同調性維持機構 連携研究者：松井 貴輝 (奈良先端大・バイオ・准教授) 作村 諭一 (奈良先端大・バイオ・准教授) 中畑 泰和 (奈良先端大・バイオ・助教)
伊藤 寿朗	奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授	細胞周期の進行に伴うヒストン修飾による転写制御
平田 章	愛媛大学・大学院理工学研究科・講師	アーキアの転写装置を利用した多段階転写反応の動的メカニズムの解明
矢田 哲士	九州工業大学・大学院情報工学研究院・教授	次世代シーケンサー解析と情報科学解析で迫る転写調節コードの普遍性と多様性 連携研究者：鈴木 稷 (東大・新領域・教授) 入江 拓磨 (東大・新領域・特任助教)
南 敬	熊本大学・生命資源研究支援センター・教授	内皮即時型応答遺伝子の包括的な転写サイクル制御機構のシステム解析 連携研究者：神吉康晴 (東大・アイソトープ総合センター・助教)
佐藤 政充	早稲田大学・先進理工学部・准教授	シングルセル発現解析と核膜変異体ライブラリを用いた転写サイクル始動機構の解明
米澤 康滋	近畿大学・先端技術総合研究所・教授	計算科学と情報科学によるCTD及びCTRの構造空間と転写因子認識機構の研究
井手 聖	国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター・助教	rRNA遺伝子上での包括的なDNA-タンパク相互作用情報の抽出基盤の構築

1.2 交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合 計
平成24年度	246,600,000	73,980,000	320,580,000
平成25年度	236,200,000	70,860,000	307,060,000
平成26年度	232,300,000	69,690,000	301,990,000
平成27年度	237,000,000	71,100,000	308,100,000
平成28年度	238,400,000	71,520,000	309,920,000
総 計	1,190,500,000	357,150,000	1,547,650,000

(金額単位: 円)

	平成24年度	平成25年度	平成26年度	平成27年度	平成28年度	計
X00 総括班	62,500,000	6,600,000	8,100,000	6,600,000	8,000,000	91,800,000
A01 計画研究1	39,900,000	33,100,000	33,300,000	33,100,000	33,100,000	172,500,000
A01 計画研究2	35,200,000	28,800,000	29,000,000	28,800,000	28,800,000	150,600,000
A01 計画研究3	17,600,000	14,400,000	14,500,000	14,400,000	14,400,000	75,300,000
A01 計画研究4	22,000,000	18,000,000	18,100,000	18,000,000	18,000,000	94,100,000
A01 計画研究5	17,600,000	14,400,000	14,500,000	14,400,000	14,400,000	75,300,000
A01 計画研究6	19,500,000	15,500,000	15,600,000	15,500,000	15,500,000	81,600,000
A01 計画研究7	32,300,000	26,100,000	26,300,000	26,200,000	26,200,000	137,100,000
小 計	246,600,000	156,900,000	159,400,000	157,000,000	158,400,000	878,300,000
公募班		79,300,000	72,900,000	80,000,000	80,000,000	312,200,000
総 計	246,600,000	236,200,000	232,300,000	237,000,000	238,400,000	1,190,500,000

1.3 研究発表

1.3.1 雑誌論文

以下はすべて査読ありの国際雑誌論文である。論文を研究者ごとにソートしているため、共著論文には重複がある。

=====

計画研究1 研究代表者：山口雄輝
研究分担者：田村智彦、川内潤也、高橋秀尚
連携研究者：西山晃、中林潤

【計画1・山口雄輝】

- 1 Haem-dependent dimerization of PGRMC1/Sigma-2 receptor facilitates cancer proliferation and chemoresistance. Kabe Y, Nakane T, Koike I, Yamamoto T, Sugiura Y, Harada E, Sugase K, Shimamura T, Ohmura M, Muraoka K, Yamamoto A, Uchida T, Iwata S, Yamaguchi Y, Krayukhina E, Noda M, Handa H, Ishimori K, Uchiyama S, Kobayashi T, Suematsu M, *Nat Commun* 7, 11030 (2016).
- 2 CTCF regulates NELF, DSIF and P-TEFb recruitment during transcription. Laitem C, Zaborowska J, Tellier M, Yamaguchi Y, Cao Q, Egloff S, Handa H, Murphy S, *Transcription* 6, 79-90 (2015).
- 3 Characterization of the Human Transcription Elongation Factor Rtf1: Evidence for Nonoverlapping Functions of Rtf1 and the Paf1 Complex. Cao QF, Yamamoto J, Isobe T, Tateno S, Murase Y, Chen Y, Handa H, Yamaguchi Y, *Mol Cell Biol* 35, 3459-3470 (2015).
- 4 SV40 VP1 major capsid protein in its self-assembled form allows VP1 pentamers to coat various types of artificial beads in vitro regardless of their sizes and shapes. Kawano M, Doi K, Fukuda H, Kita Y, Imai K, Inoue T, Enomoto T, Matsui M, Hatakeyama M, Yamaguchi Y, Handa H, *Biotechnol Rep* 5, 105-111 (2015).
- 5 DSIF and NELF interact with Integrator to specify the correct post-transcriptional fate of snRNA genes. Yamamoto J, Hagiwara Y, Chiba K, Isobe T, Narita T, Handa H, Yamaguchi Y, *Nat Commun* 5, 4263 (2014).
- 6 Magnetically promoted rapid immunoreactions using functionalized fluorescent magnetic beads: a proof of principle. Sakamoto S, Omagari K, Kita Y, Mochizuki Y, Naito Y, Kawata S, Matsuda S, Itano O, Jinno H, Takeuchi H, Yamaguchi Y, Kitagawa Y, Handa H, *Clin Chem* 60, 610-620 (2014).
- 7 Inhibition of protein SUMOylation by davidiin, an ellagitannin from *Davidia involucrata*. Takemoto M, Kawamura Y, Hirohama M, Yamaguchi Y, Handa H, Saitoh H, Nakao Y, Kawada M, Khalid K, Koshino H, Kimura K, Ito A, Yoshida M, *J Antibiot* 67, 335-338 (2014).
- 8 Salicylic acid induces mitochondrial injury by inhibiting ferrochelatase heme biosynthesis activity. Gupta V, Liu S, Ando H, Ishii R, Tateno S, Kaneko Y, Yugami M, Sakamoto S, Yamaguchi Y, Nureki O, Handa H, *Mol Pharmacol* 84, 824-833 (2013).
- 9 Systematic identification of proteins binding to chromatin-embedded ubiquitylated H2B reveals recruitment of SWI/SNF to regulate transcription. Shema-Yacoby E, Nikolov M, Haj-Yahya M, Siman P, Allemand E, Yamaguchi Y, Muchardt C, Urlaub H, Brik A, Oren M, Fischle W, *Cell Rep* 4, 601-608 (2013).
- 10 Viral protein-coating of magnetic nanoparticles using simian virus 40 VP1. Enomoto T, Kawano M, Fukuda H, Sawada W, Inoue T, Haw KC, Kita Y, Sakamoto S, Yamaguchi Y, Imai T, Hatakeyama M, Saito S, Sandhu A, Matsui M, Aoki I, Handa H, *J Biotechnol* 167, 8-15 (2013).
- 11 Vesnarinone suppresses TNF α mRNA expression by inhibiting valosin-containing protein. Hotta K, Nashimoto A, Yasumura E, Suzuki M, Azuma M, Iizumi Y, Shima D, Nabeshima R, Hiramoto M, Okada A, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, Ito T, Ando H, Sakamoto S, Kabe Y, Aizawa S, Imai T, Yamaguchi Y, Watanabe H, Handa H, *Mol Pharmacol* 83, 930-938 (2013).
- 12 Transcription elongation factors DSIF and NELF: promoter-proximal pausing and beyond. Yamaguchi Y, Shibata H, Handa H, *Biochim Biophys Acta* 1829, 98-104 (2013).

- 13 Systematic changes to the apparent diffusion tensor of in vivo rat brain measured with an oscillating-gradient spin-echo sequence. Kershaw J, Leuze C, Aoki I, Obata T, Kanno I, Ito H, Yamaguchi Y, Handa H, *Neuroimage* 70, 10-20 (2012).
- 14 Vitamin K2 covalently binds to Bak and induces Bak-mediated apoptosis. Karasawa S, Azuma M, Kasama T, Sakamoto S, Kabe Y, Imai T, Yamaguchi Y, Miyazawa K, Handa H, *Mol Pharmacol* 83, 613-20 (2012).
- 15 Identification of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) as a novel target of bisphenol A. Ito Y, Ito T, Karasawa S, Enomoto T, Nashimoto A, Hase Y, Sakamoto S, Mimori T, Matsumoto Y, Yamaguchi Y, Handa H, *PLoS One* 7, e50481 (2012).
- 16 DSIF restricts NF- κ B signaling by coordinating elongation with mRNA processing of negative feedback genes. Diamant G, Amir-Zilberstein L, Yamaguchi Y, Handa H, Dikstein R, *Cell Rep* 2, 722-731 (2012).

【計画 1・田村智彦】

- 1 Phos-tag immunoblot analysis for detecting IRF5 phosphorylation. Sato GR, Ban T, Tamura T, *Bio-protocol* 7, e2295 (2017).
- 2 Transcriptional control of monocyte and macrophage development. Kurotaki D, Sasaki H, Tamura T, *Int Immunol* 29, 97-107 (2017).
- 3 Down-regulation of Irf8 by Lyz2-cre/loxP accelerates osteoclast differentiation in vitro. Saito E, Suzuki D, Kurotaki D, Mochizuki A, Manome Y, Suzawa T, Toyoshima Y, Ichikawa T, Funatsu T, Inoue T, Takami M, Tamura T, Inagaki K, Kamijo R, *Cytotechnology* 69, 443-450 (2017).
- 4 Biallelic TBCD mutations cause early-onset neurodegenerative encephalopathy. Miyake N, Fukui R, Ohba C, Chihara T, Miura M, Shimizu H, Kakita A, Imagawa E, Shiina M, Ogata K, Okuno-Yuguchi J, Fueki N, Ogiso Y, Suzumura H, Watabe Y, Imataka G, Leong HY, Fattal-Valevski A, Kramer U, Miyatake S, Kato M, Okamoto N, Sato Y, Mitsuhashi S, Nishino I, Kaneko N, Nishiyama A, Tamura T, Mizuguchi T, Nakashima M, Tanaka F, Saitsu H, Matsumoto N, *Am J Hum Genet* 99, 950-961 (2016).
- 5 Lyn kinase suppresses the transcriptional activity of IRF5 in the TLR-MyD88 pathway to restrain the development of autoimmunity. Ban T, Sato GR, Nishiyama A, Akiyama A, Takasuna M, Umehara M, Suzuki S, Ichino M, Matsunaga S, Kimura A, Kimura Y, Yanai H, Miyashita S, Kuromitsu J, Tsukahara K, Yoshimatsu K, Endo I, Yamamoto T, Hirano H, Ryo A, Taniguchi T, Tamura T, *Immunity* 45, 319-332 (2016).
- 6 Transcriptional and epigenetic regulation of innate immune cell development by the transcription factor IRF8. Kurotaki D, Tamura T, *J Interferon Cytokine Res* 36, 433-441 (2016).
- 7 Regulation of basophil and mast cell development by transcription factors. Sasaki H, Kurotaki D, Tamura T, *Allergol Int* 65, 127-134 (2016).
- 8 High infiltration of mast cells positive to tryptase predicts worse outcome following resection of colorectal liver metastases. Suzuki S, Ichikawa Y, Nakagawa K, Kumamoto T, Mori R, Matsuyama R, Takeda K, Ota M, Tanaka K, Tamura T, Endo I, *BMC Cancer* 15, 840 (2015).
- 9 Epac1 Deficiency Attenuated Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Neointimal Formation. Kato Y, Yokoyama U, Yanai C, Ishige R, Kurotaki D, Umemura M, Fujita T, Kubota T, Okumura S, Sata M, Tamura T, Ishikawa Y, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35, 2617-2625 (2015).
- 10 Transcription factor IRF1 is responsible for IRF8-mediated IL-1 β expression in reactive microglia. Masuda T, Iwamoto S, Mikuriya S, Tozaki-Saitoh H, Tamura T, Tsuda M, Inoue K, *J Pharmacol Sci* 128, 216-220 (2015).
- 11 ASK1 restores the antiviral activity of APOBEC3G by disrupting HIV-1 Vif-mediated counteraction. Miyakawa K, Matsunaga S, Kanou K, Matsuzawa A, Morishita R, Kudoh A, Shindo K, Yokoyama M, Sato H, Kimura H, Tamura T, Yamamoto N, Ichijo H, Takaori-Kondo A, Ryo A, *Nat Commun* 6, 6945 (2015).
- 12 Anti-Semaphorin 3A neutralization monoclonal antibody prevents sepsis development in lipopolysaccharide-treated mice. Yamashita N, Jitsuki-Takahashi A, Ogawara M, Ohkubo W, Araki T, Hotta C, Tamura T, Hashimoto SI, Yabuki T, Tsuji T, Sasakura Y, Okumura H, Takaiwa A, Koyama C, Murakami K, Goshima Y, *Int Immunol* 27, 459-466 (2015).
- 13 Guest editorial: Transcriptional control in myeloid cell development and related diseases. Tamura T, *Int J Hematol* 101, 317-318 (2015).

- 14 Regulation of myelopoiesis by the transcription factor IRF8. Tamura T, Kurotaki D, Koizumi S, *Int J Hematol* 101, 342351 (2015).
- 15 Functions and development of red pulp macrophages. Kurotaki D, Uede T, Tamura T, *Microbial Immunol* 59, 55-62 (2015).
- 16 Transcription factor IRF8 plays a critical role in the development of murine basophils and mast cells. Sasaki H, Kurotaki D, Osato N, Sato H, Sasaki I, Koizumi S, Wang H, Kaneda C, Nishiyama A, Kaisho T, Aburatani H, Morse HC 3rd, Ozato K, Tamura T, *Blood* 125, 358-369 (2015).
- 17 Interferon regulatory factor 8 expressed in microglia contributes to tactile allodynia induced by repeated cold stress in rodents. Akagi T, Matsumura Y, Yasui M, Minami E, Inoue H, Masuda T, Tozaki-Saitoh H, Tamura T, Mizumura K, Tsuda M, Kiyama H, Inoue K, *J Pharmacol Sci* 126, 172-176 (2014).
- 18 IRF8 inhibits C/EBP α activity to restrain mononuclear phagocyte progenitors from differentiating into neutrophils. Kurotaki D, Yamamoto M, Nishiyama A, Uno K, Ban T, Ichino M, Sasaki H, Matsunaga S, Yoshinari M, Ryo A, Nakazawa M, Ozato K, Tamura T, *Nat Commun* 5, 4978 (2014).
- 19 Recognition of tumor cells by Dectin-1 orchestrates innate immune cells for anti-tumor responses. Chiba S, Ikushima H, Ueki H, Yanai H, Kimura Y, Hangai S, Nishio J, Negishi H, Tamura T, Saijo S, Iwakura Y, Taniguchi T, *eLife* 3, e04177 (2014).
- 20 Transcription factor IRF5 drives P2X4R(+)-reactive microglia gating neuropathic pain. Masuda T, Iwamoto S, Yoshinaga R, Tozaki-Saitoh H, Nishiyama A, Mak TW, Tamura T, Tsuda M, Inoue K, *Nat Commun* 5, 3771 (2014).
- 21 IRF8 is a transcriptional determinant for microglial motility. Masuda T, Nishimoto N, Tomiyama D, Matsuda T, Tozaki-Saitoh H, Tamura T, Kohsaka S, Tsuda M, Inoue K, *Purinergic Signal* 10, 515-521 (2014).
- 22 The transcription factor IRF8 counteracts BCR-ABL to rescue dendritic cell development in chronic myeloid leukemia. Watanabe T, Hotta C, Koizumi S, Miyashita K, Nakabayashi J, Kurotaki D, Sato GR, Yamamoto M, Nakazawa M, Fujita H, Sakai R, Fujisawa S, Nishiyama A, Ikezawa Z, Aihara M, Ishigatsubo Y, Tamura T, *Cancer Res* 73, 6642-6653 (2013).
- 23 WHSC1 links transcription elongation to HIRA-mediated histone H3.3 deposition. Sarai N, Nimura K, Tamura T, Kanno T, Patel MC, Heightman TD, Ura K, Ozato K, *EMBO J* 32, 2392-2406 (2013).
- 24 BRD4 coordinates recruitment of pause-release factor P-TEFb and the pausing complex NELF/DSIF to regulate transcription elongation of interferon stimulated genes. Patel MC, Debrosse M, Smith M, Dey A, Huynh W, Sarai N, Heightman TD, Tamura T, Ozato K, *Mol Cell Biol* 33, 2497-2507 (2013).
- 25 Egr-2 transcription factor is required for Blimp-1 mediated IL-10 production in IL-27 stimulated CD4(+) T cells. Iwasaki Y, Fujio K, Okamura T, Yanai A, Sumitomo S, Shoda H, Tamura T, Yoshida H, Charnay P, Yamamoto K, *Eur J Immunol* 43, 1-11 (2013).
- 26 Essential role of the IRF8-KLF4 transcription factor cascade in murine monocyte differentiation. Kurotaki D, Osato N, Nishiyama A, Yamamoto M, Ban T, Sato H, Nakabayashi J, Umehara M, Miyake N, Matsumoto N, Nakazawa M, Ozato K, Tamura T, *Blood* 121, 1839-1849 (2013).
- 27 Activation of JNK triggers release of Brd4 from mitotic chromosomes and mediates protection from drug-induced mitotic stress. Nishiyama A, Dey A, Tamura T, Ko M, Ozato K, *PLoS One* 7, e34719 (2012).
- 28 IRF8 is a critical transcription factor for transforming microglia into a reactive phenotype. Masuda T, Tsuda M, Yoshinaga R, Tozaki-Saitoh H, Ozato K, Tamura T, Inoue K, *Cell Rep* 1, 334 (2012).

【計画 1・川内潤也】

- 1 Role of activating transcription factor 3 (ATF3) in endoplasmic reticulum (ER) stress-induced sensitization of p53-deficient human colon cancer cells to tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis through up-regulation of death receptor 5 (DR5) by zerumbone and celecoxib. Edagawa M, Kawauchi J, Hirata M, Goshima H, Inoue M, Okamoto T, Murakami A, Maehara Y, Kitajima S, *J Biol Chem* 289, 21544-21561 (2014).
- 2 Transcriptional properties of mammalian elongin A and its role in stress response. Kawauchi J, Inoue M, Fukuda M, Uchida Y, Yasukawa T, Conaway RC, Conaway JW, Aso T, Kitajima S, *J Biol Chem* 288, 24302-24315 (2013).
- 3 Transcriptional elongation factor elongin A regulates retinoic acid-induced gene expression during neuronal differentiation. Yasukawa T, Bhatt S, Takeuchi T, Kawauchi J, Takahashi H, Tsutsui A, Muraoka

- T, Inoue M, Tsuda M, Kitajima S, Conaway RC, Conaway JW, Trainor PA, Aso T, *Cell Rep* 2, 1129-1136 (2012).
- 4 Key role of ATF3 in p53-dependent DR5 induction upon DNA damage of human colon cancer cells. Taketani K, Kawauchi J, Tanaka-Okamoto M, Ishizaki H, Tanaka Y, Sakai T, Miyoshi J, Maehara Y, Kitajima S, *Oncogene* 31, 2210-2221 (2011).

【計画1・高橋秀尚】

- 1 The novel heart-specific RING finger protein 207 is involved in energy metabolism in cardiomyocytes. Mizushima W, Takahashi H, Watanabe M, Kinugawa S, Matsushima S, Takada S, Yokota T, Furihata T, Matsumoto J, Tsuda M, Chiba I, Nagashima S, Yanagi S, Matsumoto M, Nakayama K, Tsutsui H, Hatakeyama S, *J Mol Cell Cardiol* 100, 43-53 (2016).
- 2 p53 represses the transcription of snRNA genes by preventing the formation of little elongation complex. Anwar D, Takahashi H, Watanabe M, Suzuki M, Fukuda S, Hatakeyama S, *BBA Gene Regulatory Mechanisms* 1859, 975-982 (2016).
- 3 Ribophorin II is involved in the tissue factor expression mediated by phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibody on monocytes. Fujieda Y, Amengual O, Matsumoto M, Kuroki K, Takahashi H, Kono M, Kurita Y, Otomo K, Kato M, Oku K, Bohgaki T, Horita T, Yasuda S, Maenaka K, Hatakeyama S, Nakayama KI, Atsumi T, *Rheumatology* 55, 1117-1126 (2016).
- 4 TRIM39 negatively regulates the NFκB-mediated signaling pathway through stabilization of cactin. Suzuki M, Watanabe M, Nakamaru Y, Takagi D, Takahashi H, Fukuda S, Hatakeyama S, *Cell Mol Life Sci* 73, 1085-1101 (2016).
- 5 Chd5 Regulates MuERV-L/MERVL Expression in Mouse Embryonic Stem Cells Via H3K27me3 Modification and Histone H3.1/H3.2. Hayashi M, Maehara K, Harada A, Semba Y, Kudo K, Takahashi H, Oki S, Meno C, Ichiyangi K, Akashi K, Ohkawa Y, *J Cell Biochem* 117, 780-792 (2016).
- 6 TRIM29 regulates the assembly of DNA repair proteins into damaged chromatin. Masuda Y, Takahashi H, Sato S, Tomomori-Sato C, Saraf A, Washburn MP, Florens L, Conaway RC, Conaway JW, Hatakeyama S, *Nat Commun* 6, 7299 (2015).
- 7 TRIM29 regulates the p63-mediated pathway in cervical cancer cells. Masuda, Y, Takahashi H, Hatakeyama S, *Biochim Biophys Acta* 1853, 2296-2305 (2015).
- 8 The E3 ubiquitin ligase TRIM23 regulates adipocyte differentiation via stabilization of the adipogenic activator PPARγ. Watanabe M, Takahashi H, Saeki Y, Ozaki T, Itoh S, Suzuki M, Mizushima W, Tanaka K, Hatakeyama S, *eLife* 4, e05615 (2015).
- 9 Molecular role of RNF43 in canonical and noncanonical Wnt signaling. Tsukiyama T, Fukui A, Terai S, Fujioka Y, Shinada K, Takahashi H, Yamaguchi TP, Ohba Y, Hatakeyama S, *Mol Cell Biol* 35, 2007-2023 (2015).
- 10 MED26 regulates the transcription of snRNA genes through the recruitment of little elongation complex. Takahashi H, Takigawa I, Watanabe M, Anwar D, Shibata M, Tomomori-Sato C, Sato S, Ranjan A, Seidel CW, Tsukiyama T, Mizushima W, Hayashi M, Ohkawa Y, Conaway JW, Conaway RC, Hatakeyama S, *Nat Commun* 6, 5941 (2015).
- 11 The TRIM-FLMN protein TRIM45 directly interacts with RACK1 and negatively regulates PKC-mediated signaling pathway. Sato T, Takahashi H, Hatakeyama S, Iguchi A, Ariga T, *Oncogene* 34, 1280-1291 (2015).
- 12 Pathology of frontotemporal dementia with limb girdle muscular dystrophy caused by a DNAJB6 mutation. Yabe I, Tanino M, Yaguchi H, Takiyama A, Cai H, Kanno H, Takahashi I, Hayashi Y, Watanabe M, Takahashi H, Hatakeyama S, Tanaka S, Sasaki H, *Clin Neurol Neurosur* 127, 10-12 (2014).
- 13 Identification of anti-Sez612 antibody in a patient with cerebellar ataxia and retinopathy. Yaguchi H, Yabe I, Takahashi H, Okumura F, Takeuchi A, Horiuchi K, Kano T, Kanda A, Saito W, Matsumoto M, Nakayama KI, Hatakeyama S, Sasaki H, *J Neurol* 261, 224-226 (2014).

=====
計画研究2 研究代表者：伊藤敬
研究分担者：大熊芳明、廣瀬豊

【計画 2・伊藤敬】

- 1 Histone H2A T120 phosphorylation promotes oncogenic transformation via upregulation of cyclin D1. Aihara H, Nakagawa T, Mizusaki H, Yoneda M, Kato M, Doiguchi M, Imamura Y, Higashi M, Ikura T, Hayashi T, Kodama Y, Oki M, Nakayama T, Cheung E, Abratani H, Takayama K, Koseki H, Inoue S, Takeshima Y, Ito T, *Mol Cell* 64, 176-188 (2016).
- 2 SMARCAD1 is an ATP-dependent stimulator of nucleosomal H2A acetylation via CBP, resulting in transcriptional regulation. Doiguchi M, Nakagawa T, Imamura Y, Yoneda M, Higashi M, Kubota K, Yamashita S, Asahara H, Iida M, Fujii S, Ikura T, Liu Z, Nandu T, Kraus W L, Ueda H, Ito T, *Sci Rep* 6, 20179 (2016).
- 3 Dzip3 regulates developmental genes in mouse embryonic stem cells by reorganizing 3D chromatin conformation. Inoue D, Aihara H, Sato T, Mizusaki H, Doiguchi M, Higashi M, Imamura Y, Yoneda M, Miyanishi T, Fujii S, Okuda A, Nakagawa T, Ito T, *Sci Rep* 5, 16567 (2015).
- 4 Enhancer of Acetyltransferase Chameau (EACHm) Is a Novel Transcriptional Co-Activator. Nakagawa T, Ikehara T, Doiguchi M, Imamura Y, Higashi M, Yoneda M, Ito T, *PLoS One* 10, e0142305 (2015).
- 5 The Specification and Global Reprogramming of Histone Epigenetic Marks during Gamete Formation and Early Embryo Development in *C. elegans*. Samson M, Jow MM, Wong CC, Fitzpatrick C, Aslanian A, Saucedo I, Estrada R, Ito T, Park SK, Yates JR 3rd, Chu DS, *PLoS Genet* 10, e1004588 (2014).
- 6 The USP21 Short Variant (USP21SV) Lacking NES, Located Mostly in the Nucleus In Vivo, Activates Transcription by Deubiquitylating ubH2A In Vitro. Okuda H, Ohdan H, Nakayama M, Koseki H, Nakagawa T, Ito T, *PLoS One* 8, e79813. (2013).
- 7 Histone H2A Mono-Ubiquitination Is a Crucial Step to Mediate PRC1-Dependent Repression of Developmental Genes to Maintain ES Cell Identity. Endoh M, Endo TA, Endoh T, Isono K, Sharif J, Ohara O, Toyoda T, Ito T, Eskeland R, Bickmore WA, Vidal M, Bernstein BE, Koseki H, *PLoS Genet* 8, e1002774 (2012).
- 8 Histone Monoubiquitylation Position Determines Specificity and Direction of Enzymatic Cross-talk with Histone Methyltransferases Dot1L and PRC2. Whitcomb SJ, Fierz B, McGinty RK, Holt M, Ito T, Muir TW, Allis CD, *J Biol Chem* 287, 23718-23725 (2012).

【計画 2・大熊芳明、廣瀬豊】

- 1 Mediator cyclin-dependent kinases upregulate transcription of inflammatory genes in cooperation with NF- κ B and C/EBP β on stimulation of Toll-like receptor 9. Yamamoto S, Hagihara T, Horiuchi Y, Okui A, Wani S, Yoshida T, Inoue T, Tanaka A, Ito T, Hirose Y, Ohkuma Y, *Genes Cells* 22, 265-276 (2017).
- 2 Crystal Structure of Human General Transcription Factor TFIIE at Atomic Resolution. Miwa K, Kojima R, Obita T, Ohkuma Y, Tamura Y, Mizuguchi M, *J Mol Biol* 428, 4258-4266 (2016).
- 3 Human SCP4 is a chromatin-associated CTD phosphatase and exhibits the dynamic translocation during erythroid differentiation. Wani S, Sugita A, Ohkuma Y, Hirose Y, *J Biochem* 160, 111-120 (2016).
- 4 Mediator complex cooperatively regulates transcription of retinoic acid target genes with Polycomb Repressive Complex 2 during neuronal differentiation. Fukasawa R, Iida S, Tsutsui T, Hirose Y, Ohkuma Y, *J Biochem* 158, 373-384 (2015).
- 5 Calorie restriction-mediated restoration of hypothalamic signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) phosphorylation is not effective for lowering the body weight set point in IRS-2 knockout obese mice. Senda S, Inoue A, Mahmood A, Suzuki R, Kamei N, Kubota N, Watanabe T, Aoyama M, Tsuneyama K, Koshimizu Y, Usui I, Saeki K, Ohkuma Y, Kadowaki T, Tobe K, *Diabetol Int* 6, 321-335 (2015).
- 6 Pharmacological characterization of [trans-5'-(4-amino-7,7-dimethyl-2-trifluoromethyl-7H-pyrimido[4,5-b][1,4]oxazin-6-yl)-2',3'-dihydrospiro(cyclohexane-1,1'-inden)-4-yl] acetic acid monobenzenesulfonate (JTT-553), a novel acyl CoA:diacylglycerol transferase (DGAT) 1 inhibitor. Tomimoto D, Okuma C, Ishii Y, Akiyama Y, Ohta T, Kakutani M, Ohkuma Y, Ogawa N, *Biol Pharm Bull* 38, 263-269 (2015).
- 7 PRDM16 enhances nuclear receptor-dependent transcription of the brown fat-specific Ucp1 gene through interactions with Mediator subunit MED1. Iida S, Chen W, Nakadai T, Ohkuma Y, Roeder RG, *Genes Dev* 29, 308-321 (2015).

- 8 Association of the Winged Helix Motif of the TFIIE α Subunit of TFIIE with Either the TFIIE β Subunit or TFIIB Distinguishes Its Functions in Transcription. Tanaka A, Akimoto Y, Kobayashi S, Hisatake K, Hanaoka F, Ohkuma Y, *Genes Cells* 20, 203-216 (2015).
- 9 Human Mediator MED17 Subunit Plays Essential Roles in Gene Regulation by Associating with both Transcription and DNA Repair Machineries. Kikuchi Y, Umemura H, Nishitani S, Iida S, Fukasawa R, Hayashi H, Hirose Y, Tanaka A, Sugasawa K, Ohkuma Y, *Genes Cells* 20, 191-202 (2015).
- 10 Human RNA polymerase II-associated protein 2 (RPAP2) interacts directly with the RNA polymerase II subunit Rpb6 and participates in pre-mRNA 3'-end formation. Wani S, Hirose Y, Ohkuma Y, *Drug Discov Ther* 8, 255-261 (2014).
- 11 Human mediator subunit MED15 promotes transcriptional activation. Nakatsubo T, Nishitani S, Kikuchi Y, Iida S, Fukasawa R, Tanaka A, Ohkuma Y, *Drug Discov Ther* 8, 212-217 (2014).
- 12 Transcription Cofactor PC4 Plays Essential Roles in Collaboration with the Small Subunit of General Transcription Factor TFIIE. Akimoto Y, Yamamoto S, Iida S, Hirose Y, Tanaka A, Hanaoka F, Ohkuma Y, *Genes Cells* 19, 582-593 (2014).
- 13 Ssu72 regulates and coordinates 3' end formation of RNAs transcribed by RNA polymerase II in vertebrates. Wani S, Yuda M, Fujiwara Y, Yamamoto M, Harada F, Ohkuma Y, Hirose Y, *PLoS One* 9, e106040 (2014).
- 14 Mediator MED18 Subunit Plays a Negative Role in Transcription via the CDK/Cyclin Module. Kumafuji M, Umemura H, Furumoto T, Fukasawa R, Tanaka A, Ohkuma Y, *Genes Cells* 19, 582-593 (2014).
- 15 Mediator complex recruits epigenetic regulators through its two CDK subunits to repress transcription of immune response genes. Tsutsui T, Fukasawa R, Shinmyouzu K, Nakagawa R, Tobe K, Tanaka A, Ohkuma Y, *J Biol Chem* 288, 20955-20965 (2013).
- 16 Mediator CDK Subunits Are Platforms for Interactions with Various Chromatin Regulatory Complexes. Fukasawa R, Tsutsui T, Hirose Y, Tanaka A, Ohkuma Y, *J Biochem* 152, 241-249 (2012).

=====
 計画研究3 研究代表者：高橋陽介
 連携研究者：草場信

- 1 Autophosphorylation affects substrate-binding affinity of tobacco Ca²⁺-dependent protein kinase1. Ito T, Ishida S, Oe S, Fukazawa J, Takahashi Y, *Plant Physiol*, in press.
- 2 DELLA-GAF1 complex is a main component in gibberellin feedback regulation of GA20ox2 in Arabidopsis. Fukazawa J, Mori M, Watanabe S, Miyamoto C, Ito T, Takahashi Y, *Plant Physiol*, in press.
- 3 The non-Mendelian green cotyledon gene in soybean encodes a small subunit of photosystem II. Kohzuma K, Sato Y, Ito H, Okuzaki A, Watanabe M, Kobayashi H, Nakano M, Yamatani H, Masuda Y, Nagashima Y, Fukuoka H, Yamada T, Kanazawa A, Kitamura K, Tabei Y, Ikeuchi M, Sakamoto W, Tanaka A, Kusaba M, *Plant Physiol* 55, 1763-1771 (2017).
- 4 Binding of GID1 to DELLAs promotes dissociation of GAF1 from DELLA in GA dependent manner. Fukazawa J Ito, T Kamiya, Y Yamaguchi, S, Takahashi Y, *Plant Signal Behav* 10, e1052923 (2015).
- 5 Phosphatase protection assay: 14-3-3 binding protects the phosphate group of RSG from λ protein phosphatase. Ito T, Takahashi Y, *Bio-protocol* 5, e1395 (2015).
- 6 Strigolactone regulates leaf senescence in concert with ethylene in Arabidopsis. Ueda H, Kusaba M, *Plant Physiol* 169,138-147 (2015).
- 7 Phosphorylation-independent binding of 14-3-3 to NtCDPK1 by a new mode. Ito T, Nakata M, Fukazawa J, Ishida S, Takahashi Y, *Plant Signal Behav* 9, e977721 (2014).
- 8 DELLAs function as coactivators of GAI ASSOCIATED FACTOR1 in regulation of GA homeostasis and signaling in Arabidopsis. Fukazawa J, Teramura H, Murakoshi S, Nasuno K, Nishida N, Ito T, Yoshida M, Kamiya Y, Yamaguchi S, Takahashi Y, *Plant Cell* 26, 2920-2938 (2014).
- 9 Scaffold function of Ca²⁺-dependent protein kinase: NtCDPK1 transfers 14-3-3 to the substrate RSG after phosphorylation. Ito T, Nakata M, Fukazawa J, Ishida S, Takahashi Y, *Plant Physiol* 165, 1737-1750 (2014).

- 10 A green-cotyledon/stay-green mutant exemplifies the ancient whole-genome duplications in soybean. Nakano M, Yamada T, Masuda Y, Sato Y, Kobayashi H, Ueda H, Morita R, Nishimura M, Kitamura K, Kusaba M, *Plant Cell Physiol* 55, 1763-1771 (2014).
- 11 Stay-green plants: what do they tell us about the molecular mechanism of leaf senescence. Kusaba M, Tanaka A, Tanaka R, *Photosynth Res* 117, 221-234 (2013).
- 12 NYC4, the rice ortholog of Arabidopsis THF1, is involved in the degradation of chlorophyll-protein complexes during leaf senescence. Yamatani H, Sato Y Masuda, Y Kato, Y Morita, R Fukunaga K, Nagamura Y, Nishimura M, Sakamoto W, Tanaka A, Kusaba M, *Plant J* 74, 652-662 (2013).

=====

計画研究4 研究代表者：緒方一博
 連携研究者：椎名政昭、浜田恵輔

- 1 A novel GFI1B mutation at the first zinc finger domain causes congenital macrothrombocytopenia. Uchiyama Y, Ogawa Y, Kunishima S, Shiina M, Nakashima M, Yanagisawa K, Yokohama A, Imagawa E, Miyatake S, Mizuguchi T, Takata A, Miyake N, Ogata K, Handa H, Matsumoto N, *Br J Haematol*, in press.
- 2 Biallelic Mutations in MYPN, Encoding Myopalladin, Are Associated with Childhood-Onset, Slowly Progressive Nemaline Myopathy. Miyatake S, Mitsunashi S, Hayashi YK, Purejav E, Nishikawa A, Koshimizu E, Suzuki M, Yatabe K, Tanaka Y, Ogata K, Kuru S, Shiina M, Tsurusaki Y, Nakashima M, Mizuguchi T, Miyake N, Saitsu H, Ogata K, Kawai M, Towbin J, Nonaka I, Nishino I, Matsumoto N, *Am J Hum Genet* 100, 169-178 (2017).
- 3 Biallelic Mutations in the 3' Exonuclease TOE1 Cause Pontocerebellar Hypoplasia and Uncover a Role in snRNA Processing. Lardelli RM, Schaffer AE, Eggens VR, Zaki MS, Grainger S, Sathe S, Van Nostrand EL, Schlachetzki Z, Rosti B, Akizu N, Scott E, Silhavy JL, Heckman LD, Rosti RO, Dikoglu E, Gregor A, Guemez-Gamboa A, Musaev D, Mande R, Widjaja A, Shaw TL, Markmiller S, Marin-Valencia I, Davies JH, de Meirleir L, Kayserili H, Altunoglu U, Freckmann ML11, Warwick L, Chitayat D, Blaser S, Çağlayan AO, Bilguvar K, Per H, Fagerberg C, Christesen HT, Kibaek M, Aldinger KA, Manchester D, Matsumoto N, Muramatsu K, Saitsu H, Shiina M, Ogata K, Foulds N, Dobyns WB, Chi NC, Traver D, Spaccini L, Bova SM, Gabriel SB, Gunel M, Valente EM, Nassogne MC, Bennett EJ1, Yeo GW, Baas F, Lykke-Andersen J, Gleeson JG, *Nat Genet* 49, 457-464 (2017).
- 4 The first report of Japanese patients with asparagine synthetase deficiency. Yamamoto T, Endo W, Ohnishi H, Kubota K, Kawamoto N, Inui T, Imamura A, Takanashi JI, Shiina M, Saitsu H, Ogata K, Matsumoto N, Haginoya K, Fukao T, *Brain Dev* 39, 236-242 (2017).
- 5 Molecular mechanisms of cooperative binding of transcription factors Runx1–CBFβ– Ets1 on the TCRα gene enhancer. Kasahara K, Shiina M, Fukuda I, Ogata K, Nakamura H, *PLoS One* 12, e0172654 (2017).
- 6 PARS2 and NARS2 mutations in infantile-onset neurodegenerative disorder. Mizuguchi T, Nakashima M, Kato M, Yamada K, Okanishi T, Ekhilevitch N, Mandel H, Eran A, Toyono M, Sawaishi Y, Motoi H, Shiina M, Ogata K, Miyatake S, Miyake N, Saitsu H, Matsumoto N, *J Hum Genet* 62, 525-529 (2017).
- 7 Distal arthrogryposis with variable clinical expression caused by TNNI2 mutation. Čulić V, Miyake N, Janković S, Petrović D, Šimunović M, Đapić T, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, *Hum Genome Var* 3, 16035 (2016).
- 8 A PLK4 mutation causing azoospermia in a man with Sertoli cell-only syndrome. Miyamoto T, Bando Y, Koh E, Tsujimura A, Miyagawa Y, Iijima M, Namiki M, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, Sengoku K, *Andrology* 4, 75-81 (2016).
- 9 De novo DNMI mutations in two cases of epileptic encephalopathy. Nakashima M, Kouga T, Lourenço CM, Shiina M, Goto T, Tsurusak Yi, Miyatake S, Miyake N, Saitsu H, Ogata K, Osaka H, Matsumoto N, *Epilepsia* 57, e18-e23 (2016).
- 10 Phenotypic spectrum of GNAO1 variants: epileptic encephalopathy to involuntary movements with severe developmental delay. Saitsu H, Fukai R, Ben-Zeev B, Sakai Y, Mimaki M, Okamoto N, Suzuki Y, Monden Y, Saito H, Tziperman B, Torio M, Akamine S, Takahashi N, Osaka H, Yamagata T, Nakamura

- K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, *Eur J Immunol* 24, 129-134 (2016).
- 11 De novo missense mutations in NALCN cause developmental and intellectual impairment with hypotonia. Fukai R, Saitsu H, Okamoto N, Sakai Y, Fattal-Valevski A, Shiina M, Kitai Y, Torio M, Kojima-Ishii K, Ihara K, Chernuha V, Nakashima M, Miyatake S, Tanaka F, Miyake N, Matsumoto N, *J Hum Genet* 61, 451-455 (2016).
 - 12 Biallelic TBCD mutations cause early-onset neurodegenerative encephalopathy. Miyake N, Fukai R, Ohba C, Chihara T, Miura M, Shimizu H, Kakita A, Imagawa E, Shiina M, Ogata K, Okuno-Yuguchi J, Fueki N, Ogiso Y, Suzumura H, Watabe Y, Imataka G, Leong HY, Fattal-Valevski A, Kramer U, Miyatake S, Kato M, Okamoto N, Sato Y, Mitsunashi S, Nishino I, Kaneko N, Nishiyama A, Tamura T, Mizuguchi T, Nakashima M, Tanaka F, Saitsu H, Matsumoto N, *Am J Hum Genet* 99, 950-961 (2016).
 - 13 Biallelic mutations in nuclear pore complex subunit NUP107 cause early-childhood-onset steroid-resistant nephrotic syndrome. Miyake N, Tsukaguchi H, Koshimizu E, Shono A, Matsunaga S, Shiina M, Mimura Y, Imamura S, Hirose T, Okudela K, Nozu K, Akioka Y, Hattori M, Yoshikawa N, Kitamura A, Cheong HI, Kagami S, Yamashita M, Fujita A, Miyatake S, Tsurusaki Y, Nakashima M, Saitsu H, Ohashi K, Imamoto N, Ryo A, Ogata K, Iijima K, Matsumoto N, *Am J Hum Genet* 97, 555-566 (2015).
 - 14 Identification of HOXD4 Mutations in Spinal Extradural Arachnoid Cyst. Ogura Y, Miyake N, Kou I, Iida A, Nakajima M, Takeda K, Fujibayashi S, Shiina M, Okada E, Toyama Y, Iwanami A, Ishii K, Ogata K, Asahara H, Matsumoto N, Nakamura M, Matsumoto M, Ikegawa S, *PLoS One* 10, e0142126 (2015).
 - 15 Short-lasting unilateral neuralgiform headache attacks with ipsilateral facial flushing is a new variant of paroxysmal extreme pain disorder. Imai N, Miyake N, Saito Y, Kobayashi E, Ikawa M, Manaka S, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, *J Headache Pain* 16, 519 (2015).
 - 16 A novel allosteric mechanism on protein-DNA interactions underlying the phosphorylation-dependent regulation of Ets1 target gene expressions. Shiina M, Hamada K, Inoue-Bungo T, Shimamura M, Uchiyama A, Baba S, Sato K, Yamamoto M, Ogata K, *J Mol Biol* 427, 1655-1669 (2015).
 - 17 GRIN1 mutations cause encephalopathy with infantile-onset epilepsy, and hyperkinetic and stereotyped movement disorders. Ohba C, Shiina M, Tohyama J, Haginoya K, Lerman-Sagie T, Okamoto N, Blumkin L, Lev D, Mukaida S, Nozaki F, Uematsu M, Onuma A, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Tanaka F, Kato M, Ogata K, Saitsu H, Matsumoto N, *Epilepsia* 56, 841-848 (2015).
 - 18 Somatic mutations in the MTOR gene cause focal cortical dysplasia type IIb. Nakashima M, Saitsu H, Takei N, Tohyama J, Kato M, Kitaura H, Shiina M, Shirozu H, Masuda H, Watanabe K, Ohba C, Tsurusaki Y, Miyake N, Zheng Y, Sato T, Takebayashi H, Ogata K, Kameyama S, Kakita A, Matsumoto N, *Ann Neurol* 78, 375-386 (2015).
 - 19 Novel compound heterozygous LIAS mutations cause glycine encephalopathy. Tsurusaki Y, Tanaka R, Shimada S, Shimojima K, Shiina M, Nakashima M, Saitsu H, Miyake N, Ogata K, Yamamoto T, Matsumoto N, *J Hum Genet* 60, 631-635 (2015).
 - 20 Late-onset spastic ataxia phenotype in a patient with a homozygous DDHD2 mutation. Doi H, Ushiyama M, Baba T, Tani K, Shiina M, Ogata K, Miyatake S, Fukuda-Yuzawa Y, Tsuji S, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Ikeda S, Tanaka F, Matsumoto N, Yoshida K, *Sci Rep* 4, 7132 (2014).
 - 21 A hemizygous GYG2 mutation and Leigh syndrome: a possible link? Imagawa E, Osaka H, Yamashita A, Shiina M, Takahashi E, Sugie H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Ogata K, Matsumoto N, Miyake N, *Hum Genet* 133, 225-234 (2014).
 - 22 De novo SOX11 mutations cause Coffin-Siris syndrome. Tsurusaki Y, Koshimizu E, Ohashi H, Phadke S, Kou I, Shiina M, Suzuki T, Okamoto N, Imamura S, Yamashita M, Watanabe S, Yoshiura K, Kodera H, Miyatake S, Nakashima M, Saitsu H, Ogata K, Ikegawa S, Miyake N, Matsumoto N, *Nat Commun* 5, 4011 (2014).
 - 23 Expanding the phenotypic spectrum of TUBB4A-associated hypomyelinating leukoencephalopathies. Miyatake S, Osaka H, Shiina M, Sasaki M, Takanashi J, Haginoya K, Wada T, Morimoto M, Ando N, Ikuta Y, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Ogata K, Matsumoto N, Saitsu H, *Neurology* 82, 2230-2237 (2014).
 - 24 Deep sequencing detects very-low-grade somatic mosaicism in the unaffected mother of siblings with nemaline myopathy. Miyatake S, Koshimizu E, Hayashi YK, Miya K, Shiina M, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Ogata K, Nishino I, Matsumoto N, *Neuromuscul Disord* 24, 642-647 (2014).

- 25 Crystallization of the Ets1-Runx1-CBF β -DNA complex formed on the TCR α gene enhancer. Shiina M, Hamada K, Inoue-Bungo T, Shimamura M, Baba S, Sato K, Ogata K, *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* 70, 1380-1384 (2014).
- 26 KDM6A point mutations cause Kabuki syndrome. Miyake N, Mizuno S, Okamoto N, Ohashi H, Shiina M, Ogata K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Saitsu H, Niikawa N, Matsumoto N, *Hum Mut* 34, 108-110 (2013).
- 27 Mitochondrial complex III deficiency caused by a homozygous UQCRC2 mutation presenting with neonatal-onset recurrent metabolic decompensation. Miyake N, Yano S, Sakai C, Hatakeyama H, Matsushima Y, Shiina M, Watanabe Y, Bartley J, Abdenur JE, Wang RY, Chang R, Tsurusaki Y, Doi H, Nakashima M, Saitsu H, Ogata K, Goto Y, Matsumoto N, *Hum Mut* 34, 446-452 (2013).
- 28 Exome sequencing identifies a novel INPPL1 mutation in opsismodysplasia. Iida A, Okamoto N, Miyake N, Nishimura G, Minami S, Sugimoto T, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Shiina M, Ogata K, Watanabe S, Ohashi H, Matsumoto N, Ikegawa S, *J Hum Genet* 58, 391-394 (2013).
- 29 Mutations in KLHL40 are a frequent cause of severe autosomal-recessive nemaline myopathy. Ravenscroft G, Miyatake S, Lehtokari VL, Todd EJ, Vornanen P, Yau KS, Hayashi YK, Miyake N, Tsurusaki Y, Doi H, Saitsu H, Osaka H, Yamashita S, Ohya T, Sakamoto Y, Koshimizu E, Imamura S, Yamashita M, Ogata K, Shiina M, Bryson-Richardson RJ, Vaz R, Ceyhan O, Brownstein CA, Swanson LC, Monnot S, Romero NB, Amthor H, Kresoje N, Sivadorai P, Kiraly-Borri C, Haliloglu G, Talim B, Orhan D, Kale G, Charles AK, Fabian VA, Davis MR, Lammens M, Sewry CA, Manzur A, Muntoni F, Clarke NF, North KN, Bertini E, Nevo Y, Willichowski E, Silberg IE, Topaloglu H, Beggs AH, Allcock RJ, Nishino I, Wallgren-Pettersson C, Matsumoto N, Laing NG, *Am J Hum Genet* 93, 6-18 (2013).
- 30 De Novo mutations in GNAO1, encoding a G α subunit of heterotrimeric G proteins, cause epileptic encephalopathy. Nakamura K, Kadera H, Akita T, Shiina M, Kato M, Hoshino H, Terashima H, Osaka H, Nakamura S, Tohyama J, Kumada T, Furukawa T, Iwata S, Shiihara T, Kubota M, Miyatake S, Koshimizu E, Nishiyama K, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Hayasaka K, Ogata K, Fukuda A, Matsumoto N, Saitsu H, *Am J Hum Genet* 93, 496-505 (2013).
- 31 FOXC2 mutations in familial and sporadic spinal extradural arachnoid cyst. Ogura Y, Yabuki S, Iida A, Kou I, Nakajima M, Kano H, Shiina M, Kikuchi S, Toyama Y, Ogata K, Nakamura M, Matsumoto M, Ikegawa S, *PLoS One* 8, e80548 (2013).
- 32 Identification of KLHL41 mutations implicates BTB-Kelch-mediated ubiquitination as an alternate pathway to myofibrillar disruption in nemaline myopathy. Gupta V, Ravenscroft G, Shaheen R, Todd EJ, Swanson L, Shiina M, Ogata K, Hsu C, Clarke N, Darras B, Farrar M, Hashem A, Manton N, Muntoni F, North K, Sandaradura S, Nishino I, Hayashi YK, Sewry C, Thompson E, Yau K, Brownstein C, Yu T, Allcock R, Davis M, Wallgren-Pettersson C, Matsumoto N, Alkuraya F, Laing N, Beggs N, *Am J Hum Genet* 93, 1108-1117 (2013).
- 33 Missense mutations in the DNA-binding/dimerization domain of NFIX cause Sotos-like features. Yoneda Y, Saitsu H, Touyama M, Makita Y, Miyamoto A, Hamada K, Kurotaki N, Tomita H, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Ogata K, Naritomi K, Matsumoto N, *J Hum Genet* 57, 207-211 (2012).
- 34 Mutations affecting components of the SWI/SNF complex cause Coffin-Siris syndrome. Tsurusaki Y, Okamoto N, Ohashi H, Kosho T, Imai Y, Hibi-Ko Y, Kaname T, Naritomi K, Kawame H, Wakui K, Fukushima Y, Homma T, Kato M, Hiraki Y, Yamagata T, Yano S, Mizuno S, Sakazume S, Ishii T, Nagai T, Shiina M, Ogata K, Ohta T, Niikawa N, Miyatake S, Okada I, Mizuguchi T, Doi H, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N, *Nat Genet* 44, 376-378 (2012).

=====

計画研究5 研究代表者：十川久美子
 連携研究者：徳永万喜洋、木村宏、斉藤典子

- 1 MKRN2 is a novel ubiquitin E3 ligase for the p65 subunit of NF- κ B and negatively regulates inflammatory responses. Shin C, Ito Y, Ichikawa S, Tokunaga M, Sakata-Sogawa K, Tanaka T, *Sci Rep* 7, 46097 (2017).

- 2 Conformational changes in inhibitory PAS domain protein associated with binding of HIF-1 α and Bcl-xL in living cells. Kasai S, Kajimoto S, Ito Y, Saito T, Yasumoto K, Tokunaga M, Sakata-Sogawa K, Fukumura H, Sogawa K, *J Biochem* 161, 291-296 (2017).
- 3 Analysis of estrogen receptor beta gene methylation in autistic males in a Chinese Han population. Wang X, Liang S, Sun Y, Li H, Endo F, Nakao M, Saitoh N, Wu L, *Metab Brain Dis* (2017).
- 4 The SETD8/PR-Set7 Methyltransferase Functions as a Barrier to Prevent Senescence-Associated Metabolic Remodeling. Tanaka H, Takebayashi SI, Sakamoto A, Igata T, Nakatsu Y, Saitoh N, Hino S, Nakao M, *Cell Rep* 18, 2148-2161 (2017).
- 5 Roles of long non-coding RNAs in chromosome domains. Tomita S, Abdalla MOA, Fujiwara S, Yamamoto T, Iwase H, Nakao M, Saitoh N, *Wiley Interdiscip Rev RNA* 8 (2017).
- 6 Nuclear extrusion precedes discharge of genomic DNA fibers during tunicamycin-induced neutrophil extracellular trap-osis (NETosis)-like cell death in cultured human leukemia cells. Nakayama T, Saitoh N, Morotomi-Yano K, Yano KI, Nakao M, Saitoh N, *Cell Biol Int* 40, 597-602 (2016).
- 7 Loss of the integral nuclear envelope protein SUN1 induces alteration of nucleoli. Matsumoto A, Sakamoto C, Matsumori H, Katahira J, Yasuda Y, Yoshidome K, Tsujimoto M, Goldberg IG, Matsuura N, Nakao M, Saitoh N, Hieda M, *Nucleus* 7, 68-83 (2016).
- 8 Histone H3K36 trimethylation is essential for multiple silencing mechanisms in fission yeast. Suzuki S, Kato H, Suzuki Y, Chikashige Y, Hiraoka Y, Kimura H, Nagao K, Obuse C, Takahata S, Murakami Y, *Nucleic Acids Res* 44, 4147-4162 (2016).
- 9 The actin family protein ARP6 contributes to the structure and the function of the nucleolus. Kitamura H, Matsumori H, Kalendova A, Hozak P, Goldberg IG, Nakao M, Saitoh N, Harata M, *Biochem Biophys Res Commun* 464, 554-560 (2015).
- 10 A cluster of noncoding RNAs activates the ESR1 locus during breast cancer adaptation. Tomita S, Abdalla MOA, Fujiwara S, Matsumori H, Maehara K, Ohkawa Y, Iwase H, Saitoh N, Nakao M, *Nat Commun* 6, 6966 (2015).
- 11 Methylation of RNA polymerase II non-consensus Lysine residues marks early transcription in mammalian cells. Dias JD, Rito T, Torlai Triglia E, Kukalev A, Ferrai C, Chotalia M, Brookes E, Kimura H, Pombo A, *eLife* 4, e1125 (2015).
- 12 Distribution of histone H4 modifications as revealed by a panel of specific monoclonal antibodies. Hayashi-Takanaka Y, Maehara K, Harada A, Umehara T, Yokoyama S, Obuse C, Ohkawa Y, Nozaki N, Kimura H, *Chromosome Res* 23, 753-766 (2015).
- 13 Visualizing posttranslational and epigenetic modifications of endogenous proteins in vivo. Kimura H, Hayashi-Takanaka Y, Stasevich TJ, Sato Y, *Histochem Cell Biol* 144, 101-109 (2015).
- 14 Mammalian NET-Seq Reveals Genome-wide Nascent Transcription Coupled to RNA Processing. Nojima T, Gomes T, Grosso AR, Kimura H, Dye MJ, Dhir S, Carmo-Fonseca M, Proudfoot NJ, *Cell* 161, 526-540 (2015).
- 15 Hierarchical molecular events driven by oocyte-specific factors lead to rapid and extensive reprogramming. Jullien J, Miyamoto K, Pasque V, Allen GE, Bradshaw CR, Garrett NJ, Halley-Stott RP, Kimura H, Ohsumi K, Gurdon JB, *Mol Cell* 55, 524-536 (2015).
- 16 Computational image analysis of colony and nuclear morphology to evaluate human induced pluripotent stem cells. Tokunaga K, Saitoh N, Goldberg IG, Sakamoto C, Yasuda Y, Yoshida Y, Yamanaka S, Nakao M, *Sci Rep* 4, 6996 (2014).
- 17 Quantifying histone and RNA polymerase II post-translational modification dynamics in mother and daughter cells. Stasevich TJ, Sato Y, Nozaki N, Kimura H, *Methods* 70, 77-88 (2014).
- 18 A Facile Preparation of Glass-supported Lipid Bilayers for Analyzing Molecular Dynamics. Ito Y, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, *Anal Sci* 30, 1103-1106 (2014).
- 19 Regulation of RNA polymerase II activation by histone acetylation in single living cells. Stasevich TJ, Hayashi-Takanaka Y, Sato Y, Maehara K, Ohkawa Y, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, Nagase T, Nozaki N, McNally JG, Kimura H, *Nature* 516, 272-275 (2014).
- 20 Nuclear actin activates human transcription factor genes including the OCT4 gene. Yamazaki S, Yamamoto K, Tokunaga M, Sakata-Sogawa K, Harata M, *Biosci Biotechnol Biochem* 79, 242-246 (2014).

- 21 Characterization of nuclear pore complex components in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Asakawa H, Yang HJ, Yamamoto TG, Ohtsuki C, Chikashige Y, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, Iwamoto M, Hiraoka Y, Haraguchi T, *Nucleus* 5, 1-14 (2014).
- 22 Vesnarinone suppresses TNF α mRNA expression by inhibiting valosin-containing protein. Hotta K, Nashimoto A, Yasumura E, Suzuki M, Azuma M, Iizumi Y, Shima D, Nabeshima R, Hiramoto M, Okada A, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, Ito T, Ando H, Sakamoto S, Kabe Y, Aizawa S, Imai T, Yamaguchi Y, Watanabe H, Handa H, *Mol Pharmacol* 83, 930-938 (2013).

=====

計画研究 6 研究代表者：松本直通
 研究分担者：三宅紀子
 連携研究者：宮武聡子、大藪謙次郎、今川英里、輿水江里子、藤田京志、吉野恭子

- 1 Mutations in genes encoding polycomb repressive complex 2 subunits cause Weaver syndrome. Imagawa E, Higashimoto K, Sakai Y, Numakura C, Okamoto N, Matsunaga S, Ryo A, Sato Y, Sanefuji M, Ihara K, Takada Y, Nishimura G, Saitsu H, Mizuguchi T, Miyatake S, Nakashima M, Miyake N, Soejima H, Matsumoto N, *Hum Mut* 38, 637-648 (2017).
- 2 Ultra-sensitive droplet digital PCR for detecting a low-prevalence somatic GNAQ mutation in Sturge-Weber syndrome. Uchiyama Y, Nakashima M, Watanabe S, Miyajima M, Taguri M, Miyatake S, Miyake N, Saitsu H, Mishima H, Kinoshita A, Arai H, Yoshiura K, Matsumoto N, *Sci Rep* 6, 22985 (2017).
- 3 FDG-PET study of patients with Leigh syndrome. Haginoya K, Kaneta T, Togashi N, Hino-Fukuyo N, Kobayashi T, Uematsu M, Kitamura T, Inui T, Okubo Y, Takezawa Y, Anzai M, Endo W, Miyake N, Saitsu H, Matsumoto N, Kure S, *J Neurol Sci* 362, 309-313 (2016).
- 4 Detection of low-prevalence somatic TSC2 mutations in sporadic pulmonary lymphangiomyomatosis tissues by deep sequencing. Fujita A, Ando K, Kobayashi E, Mitani K, Okudera K, Nakashima N, Miyatake S, Tsurusaki Y, Saitsu H, Seyama K, Miyake N, Matsumoto N, *Hum Genet* 135, 61-68 (2016).
- 5 Homozygous p.V116* mutation in C12orf65 results in Leigh syndrome. Imagawa E, Fattal-Valevski A, Eyal O, Miyatake S, Saada A, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N, *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 87, 212-216 (2016).
- 6 De novo DNMI mutations in two cases of epileptic encephalopathy. Nakashima M, Kouga T, Lourenço CM, Shiina M, Goto T, Tsurusaki Y, Miyatake S, Miyake N, Saitsu H, Ogata K, Osaka H, Matsumoto N, *Epilepsia* 57, e18-e23 (2016).
- 7 Panventriculomegaly with a wide foramen of Magendie and large cisterna magna. Kageyama H, Miyajima M, Ogino I, Nakajima M, Shimoji K, Fukai R, Miyake N, Nishiyama K, Matsumoto N, Arai H, *J Neurosurg* 124, 1858-1866 (2016).
- 8 De novo missense mutations in NALCN cause developmental and intellectual impairment with hypotonia. Fukai R, Saitsu H, Okamoto N, Sakai Y, Fattal-Valevski A, Masaaki S, Kitai Y, Torio M, Kojima-Ishii K, Ihara K, Nakashima M, Miyatake S, Tanaka F, Miyake N, Matsumoto N, *J Hum Genet* 61, 451-455 (2016).
- 9 De novo KCNH1 mutations in four patients with syndromic developmental delay, hypotonia and seizures. Fukai R, Saitsu H, Tsurusaki Y, Sakai Y, Haginoya K, Takahashi K, Hubshman MW, Okamoto N, Nakashima M, Tanaka F, Miyake N, Matsumoto N, *J Hum Genet* 61, 381-387 (2016).
- 10 Impaired neuronal KCC2 function by biallelic SLC12A5 mutations in migrating focal seizures and severe developmental delay. Saitsu H, Watanabe M, Akita T, Ohba C, Sugai K, Ong WP, Shiraishi H, Yuasa S, Matsumoto H, Beng KT, Saitoh S, Miyatake S, Nakashima M, Miyake N, Kato M, Fukuda A, Matsumoto N, *Sci Rep* 6, 30072 (2016).
- 11 Biallelic TBCD mutations cause early-onset neurodegenerative encephalopathy. Miyake N, Fukai R, Ohba C, Chihara T, Miura M, Shimizu H, Kakita A, Imagawa E, Shiina M, Ogata K, Okuno-Yuguchi J, Fueki N, Ogiso Y, Suzumura H, Watabe Y, Imataka G, Leong HY, Fattal-Valevski A, Kramer U, Miyatake S, Kato M, Okamoto N, Sato Y, Mitsuhashi S, Nishino I, Kaneko N, Nishiyama A, Tamura T, Mizuguchi T, Nakashima M, Tanaka F, Saitsu H, Matsumoto N, *Am J Hum Genet* 99, 950-961 (2016).

- 12 Molecular genetic analysis of 30 families with Joubert syndrome. Suzuki T, Miyake N, Tsurusaki Y, Okamoto N, Alkindy A, Inaba A, Sato M, Ito S, Muramatsu K, Kimura S, Ieda D, Saitoh S, Hiyane M, Suzumura H, Yagyu K, Shiraishi H, Nakajima M, Fueki N, Habata Y, Ueda Y, Komatsu Y, Yan K, Shimoda K, Shitara Y, Mizuno S, Ichinomiya K, Sameshima K, Tsuyusaki Y, Kurosawa K, Sakai S, Haginoya K, Kobayashi Y, Yoshizawa C, Hisano M, Nakashima M, Saitsu H, Takeda S, Matsumoto M, *Clin Genet* 90, 526-535 (2016).
- 13 De novo MEIS2 mutation causes syndromic developmental delay with persistent gastro-esophageal reflux. Fujita A, Isidor B, Piloquet H, Corre P, Okamoto N, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N, *J Hum Genet* 61, 835-838 (2016).
- 14 WDR45 mutations in three male patients with West syndrome. Nakashima M, Takano K, Tsuyusaki Y, Yoshitomi S, Shimono M, Aoki Y, Kato M, Aida N, Mizuguchi T, Miyatake S, Miyake N, Osaka H, Saitsu H, Matsumoto N, *J Hum Genet* 61, 653-661 (2016).
- 15 Milder progressive cerebellar atrophy caused by biallelic SEPSECS mutations. Iwama K, Sasaki M, Hirabayashi S, Ohba C, Iwabuchi E, Miyatake S, Nakashima M, Miyake N, Ito S, Saitsu H, Matsumoto N, *J Hum Genet* 61, 527-531 (2016).
- 16 Clinical features of SMARCA2 duplication overlap with Coffin-Siris syndrome. Miyake N, Abdel-Salam G, Yamagata T, Eid MM, Osaka H, Okamoto N, Mohamed AM, Ikeda T, Afifi HH, Piard J, van Maldergem L, Mizuguchi T, Miyatake S, Tsurusaki Y, Matsumoto N, *Am J Med Genet A* 170, 2662-2670 (2016).
- 17 SMARCE1, a rare cause of Coffin-Siris Syndrome: Clinical description of three additional cases. Zarate YA, Bhoj E, Kaylor J, Li D, Tsurusaki Y, Miyake N, Matsumoto N, Phadke S, Escobar L, Irani A, Hakonarson H, Schrier Vergano SA, *Am J Med Genet A* 170, 1967-1973 (2016).
- 18 Delineation of clinical features in Wiedemann-Steiner syndrome caused by KMT2A mutations. Miyake N, Tsurusaki Y, Koshimizu E, Okamoto N, Kosho T, Brown NJ, Tan TY, Yap PJ, Suzumura H, Tanaka T, Nagai T, Nakashima M, Saitsu H, Niikawa N, Matsumoto N, *Clin Genet* 89,115-9. (2016).
- 19 De novo SHANK3 mutation causes Rett syndrome-like phenotype in a female patient. Hara M, Ohba C, Yamashita Y, Saitsu H, Matsumoto N, Matsuishi T, *Am J Med Genet A* 167, 1593-1596 (2015).
- 20 Mutations in the glutaminyl-tRNA synthetase gene cause early-onset epileptic encephalopathy. Kodera H, Osaka H, Iai M, Aida N, Yamashita A, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Saitsu H Matsumoto N, *J Hum Genet* 60, 97-101 (2015).
- 21 Detecting copy number variations in whole exome sequencing data using the eXome Hidden Markov Model: an “exome-first” approach. Miyatake S, Koshimizu E, Fujita A, Fukai R, Imagawa E, Ohba C, Kuki I, Nukui M, Araki A, Makita Y, Ogata T, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Matsumoto N, *J Hum Genet* 60, 175-182 (2015).
- 22 GRIN1 mutations cause encephalopathy with infantile-onset epilepsy, and hyperkinetic and stereotyped movement disorders. Ohba C, Shiina M, Tohyama J, Haginoya K, Lerman-Sagie T, Okamoto N, Blumkin L, Lev D, Mukaida S, Nozaki F, Uematsu M, Onuma A, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Tanaka F, Kato M, Ogata K Saitsu H, Matsumoto N, *Epilepsia* 56, 841-848 (2015).
- 23 Sporadic infantile-onset spinocerebellar ataxia caused by missense mutations of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor type 1 gene. Sasaki M, Ohba C, Iai M, Hirabayashi S, Osaka H, Hiraide T, Saitsu H, Matsumoto N, *J Neurol* 262, 1278-1284 (2015).
- 24 A Japanese case of cerebellar ataxia, spastic paraparesis, and deep sensory impairment associated with a novel homozygous TTC19 mutation. Kunii M, Doi H, Higashiyama Y, Kugimoto C, Ueda N, Hirata J, Tomita-Katsumoto A, Kashikura-Kojima M, Kubota S, Taniguchi M, Murayama K, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Matsumoto N, Tanaka F, *J Hum Genet* 60, 187-191 (2015).
- 25 A case of autism spectrum disorder arising from a de novo missense mutation in POGZ. Fukai R, Hiraki Y, Yofune H, Tsurusaki Y, Nakashima M, Saitsu H, Tanaka F, Miyake N, Matsumoto N, *J Hum Genet* 60, 277-279 (2015).
- 26 An Aberrant Splice Acceptor Site Due to a Novel Intronic Nucleotide Substitution in MSX1 Gene Is the Cause of Congenital Tooth Agenesis in a Japanese Family. Tatematsu T, Kimura M, Nakashima M, Machida J, Yamaguchi S, Shibata A, Goto H, Nakayama A, Higashi Y, Miyachi H, Shimozato K, Matsumoto N, Tokita Y, *PLoS One* 10, e0128227 (2015).

- 27 Dominant mutations in ORAI1 cause tubular aggregate myopathy with hypocalcemia via constitutive activation of store-operated Ca²⁺ channels. Endo Y, Noguchi S, Hara Y, Hayashi YK, Motomura K, Miyatake S, Murakami N, Tanaka S, Yamashita S, Kizu R, Bamba M, Goto Y, Matsumoto N, Nonaka I, Nishino I, *Hum Mol Genet* 24, 637-648 (2015).
- 28 Predominant cerebellar phenotype in spastic paraplegia 7 (SPG7). Yahikozawa H, Yoshida K, Sato S, Hanyu N, Doi H, Miyatake S, Matsumoto N, *Hum Genome Var* 2, 15012 (2015).
- 29 Somatic mutations in the MTOR gene cause focal cortical dysplasia type IIb. Nakashima M, Saitsu H, Takei N, Tohyama J, Kato M, Kitaura H, Shiina M, Shirozu H, Masuda H, Watanabe K, Ohba C, Tsurusaki Y, Miyake N, Zheng Y, Sato T, Takebayashi H, Ogata K, Kameyama S, Kakita A, Matsumoto N, *Ann Neurol* 78, 375-386 (2015).
- 30 Two novel homozygous RAB3GAP1 mutations cause Warburg micro syndrome. Imagawa E, Fukai R, Behnam M, Goyal M, Nouri N, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Salehi M, Kapoor S, Tanaka F, Miyake N, Matsumoto N, *Hum Genome Var* 2, 15034 (2015).
- 31 DNA methylation and gene expression dynamics during spermatogonial stem cell differentiation in the early postnatal testis. Kubo N, Toh H, Shirane K, Shirakawa T, Kobayashi H, Sato T, Sone H, Sato Y, Tomizawa S, Tsurusaki Y, Shibata H, Saitsu H, Suzuki Y, Matsumoto N, Suyama M, Kono T, Ohbo K, Sasak H, *BMC Genomics* 16, 624 (2015).
- 32 De Novo 17q24.2-q24.3 microdeletion presenting with generalized hypertrichosis terminalis, gingival fibromatous hyperplasia, and distinctive facial features. Afifi H, Fukai R, Miyake N, Gamal E, Din A, Eid M, Eid O, Thomas M, El-Badry T, Tosson A, Abdel-Salam G Matsumoto N, *Am J Med Genet A* 167, 2418-2424 (2015).
- 33 Biallelic mutations in nuclear pore complex subunit NUP107 cause early-childhood-onset steroid-resistant nephrotic syndrome. Miyake N, Tsukaguchi Y, Koshimizu E, Shono A, Matsunaga S, Shiina M, Mimura Y, Imamura S, Hirose T, Okudela K, Nozu K, Akioka Y, Hattori M, Yoshikawa N, Kitamura A, Cheong HI, Kagami S, Yamashita M, Fujita A, Miyatake S, Tsurusaki Y, Nakashima M, Saitsu H, Ohashi K, Imamoto N, Ryo A, Ogata K, Iijima K, Matsumoto N, *Am J Hum Genet* 97, 555-566 (2015).
- 34 De novo KCNB1 mutations in infantile epilepsy inhibit repetitive neuronal firing. Saitsu H, Akita T, Tohyama J, Goldberg-Stern H, Kobayashi Y, Cohen R, Kato M, Ohba C, Miyatake S, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Fukuda A, Matsumoto N, *Sci Rep* 5, 15199 (2015).
- 35 AKT3 and PIK3R2 mutations in two patients with megalencephaly-related syndromes: MCAP and MPPH. Nakamura K, Kato M, Tohyama J, Shiohama T, Hayasaka K, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Matsumoto N, Saitsu H, *Clin Genet* 85, 396-398 (2015).
- 36 A de novo CASK mutation in pontocerebellar hypoplasia type 3 with early myoclonic epilepsy and tetralogy of Fallot. Nakamura K, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Matsumoto N, Saitsu H, Jinnou H, Ohki S, Yokochi K, Okanishi T, Enoki H, *Brain Dev* 36, 272-273 (2014).
- 37 A hemizygous GYG2 mutation and Leigh syndrome: a possible link? Imagawa E, Osaka H, Yamashita A, Shiina M, Takahashi E, Sugie H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Ogata K, Matsumoto N, Miyake N, *Hum Genet* 133, 225-234 (2014).
- 38 Whole exome sequencing revealed biallelic IFT122 mutations in a family with CED1 and recurrent pregnancy loss. Tsurusaki Y, Yonezawa R, Furuya M, Nishimura G, Pooh RK, Nakashima M, Saitsu H, Miyake N, Saito S, Matsumoto N, *Clin Genet* 85, 592-594 (2014).
- 39 Coffin-Siris syndrome is a SWI/SNF complex disorder. Tsurusaki Y, Okamoto N, Ohashi H, Mizuno S, Matsumoto N, Makita Y, Fukuda M, Isidor B, Perrier J, Aggarwal S, Dalal AB, Al-Kindy A, Liebelt J, Mowat D, Nakashima M, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N, *Clin Genet* 85, 548-554 (2014).
- 40 De novo SOX11 mutations cause Coffin-Siris syndrome. Tsurusaki Y, Koshimizu E, Ohashi H, Phadke S, Kou I, Shiina M, Suzuki T, Okamoto N, Imamura S, Yamashita M, Watanabe S, Yoshiura K, Kodera H, Miyatake S, Nakashima M, Saitsu H, Ogata K, Ikegawa S, Miyake N, Matsumoto N, *Nat Commun* 5, 4011 (2014).
- 41 Expanding the phenotypic spectrum of TUBB4A-associated hypomyelinating leukoencephalopathies. Miyatake S, Osaka H, Shiina M, Sasaki M, Takanashi J, Haginoya K, Wada T, Morimoto M, Ando N, Ikuta Y, Nakashima N, Tsurusaki Y, Miyake N, Ogata K, Matsumoto N, Saitsu H, *Neurology* 82, 2230-2237 (2014).

- 42 Genetics: Clinical exome sequencing in neurology practice. Miyatake S, Matsumoto N, *Nat Rev Neurol* 10, 676-678 (2014).
- 43 Aortic aneurysm and craniosynostosis in a family with Cantu syndrome. Hiraki Y, Miyatake S, Hayashidani M, Nishimura Y, Matsuura H, Kamada M, Kawagoe T, Yunoki K, Okamoto N, Yofune H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitu H, Murakami A, Miyake N, Nishimura G, Matsumoto N, *Am J Med Genet A* 164, 231-236 (2014).
- 44 Coffin-Siris syndrome and related disorders involving components of the BAF (mSWI/SNF) complex: historical review and recent advances using next generation sequencing. Kosho T, Miyake N, Carey JC, *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 166C, 241-251 (2014).
- 45 Numerous BAF complex genes are mutated in Coffin-Siris syndrome. Miyake N, Tsurusaki Y, Matsumoto N, *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 166C, 257-61. (2014).
- 46 De novo SOX11 mutations cause Coffin-Siris syndrome. Tsurusaki Y, Koshimizu E, Ohashi H, Phadke S, Kou I, Shiina M, Suzuki T, Okamoto N, Imamura S, Yamashita M, Watanabe S, Yoshiura K, Kodera H, Miyatake S, Nakashima M, Saitu H, Ogata K, Ikegawa S, Miyake N, Matsumoto N, *Nat Commun* 5, 4011 (2014).
- 47 Coffin-Siris syndrome is a SWI/SNF complex disorder. Tsurusaki Y, Okamoto N, Ohashi H, Mizuno S, Matsumoto N, Makita Y, Fukuda M, Isidor B, Perrier J, Aggarwal S, Dalal AB, Al-Kindy A, Liebelt J, Mowat D, Nakashima M, Saitu H, Miyake N, Matsumoto N, *Clin Genet* 85, 548-554 (2014).
- 48 A de novo deletion at 16q24.3 involving ANKRD11 in a Japanese patient with KBG syndrome. Miyatake S, Murakami A, Okamoto N, Sakamoto M, Miyake N, Saitu H, Matsumoto N, *Am J Med Genet A* 161A, 1073-1077 (2013).
- 49 Whole-exome sequencing identified a homozygous FNBP4 mutation in a family with a condition microphthalmia with limb anomalies. Kondo Y, Koshimizu E, Megarbane A, Hamanoue H, Okada I, Nishiyama K, Kodera H, Miyatake S, Tsurusaki Y, Nakashima M, Doi H, Miyake N, Saitu H, Matsumoto N, *Am J Med Genet A* 161A, 1543-1546 (2013).
- 50 Mitochondrial complex III deficiency caused by a homozygous UQCRC2 mutation presenting with neonatal-onset recurrent metabolic decompensation. Miyake N, Yano S, Sakai C, Hatakeyama H, Shiina M, Watanabe Y, Bartley J, Abdenur JE, Wang RY, Chang R, Tsurusaki Y, Doi H, Nakashima M, Saitu H, Ogata K, Goto Y, Matsumoto N, *Hum Mut* 34, 446-452 (2013).
- 51 De novo mutations in the autophagy gene WDR45 cause static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood. Saitu H, Nishimura T, Muramatsu K, Kodera H, Kumada S, Sugai K, Kasai-Yoshida E, Sawaura N, Nishida H, Hoshino A, Ryujin F, Yoshioka S, Nishiyama K, Kondo Y, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Arakawa H, Kato M, Mizushima, Matsumoto N, *Nat Genet* 45, 445-449 (2013).
- 52 Pathogenic mutations in two families with congenital cataract identified by whole-exome sequencing. Kondo Y, Saitu H, Miyamoto T, Lee BJ, Nishiyama K, Mitsuko Nakashima1, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Kim JH, Yu YS, Matsumoto N, *Mol Vis* 19, 384-389 (2013).
- 53 Performance comparison of bench-top next generation sequencers using microdroplet PCR-based enrichment for targeted sequencing in patients with autism spectrum disorder. Koshimizu E, Miyatake S, Okamoto N, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitu H, Matsumoto N, *PLoS One* 8, e74167 (2013).
- 54 Co-occurrence of 22q11 deletion syndrome and HDR Syndrome. Fukai R, Ochi N, Murakami A, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitu H, Matsumoto N, Miyake N, *Am J Med Genet A* 161, 2576-2581 (2013).
- 55 Clinical consequences of mutations affecting six components of the SWI/SNF complex: detailed description of 21 patients and a review of the literature. Kosho T, Okamoto N, Ohashi H, Tsurusaki Y, Imai Y, Hibi-Ko Y, Kawame H, Homma T, Tanabe S, Kato M, Hiraki Y, Yamagata T, Yano S, Sakazume S, Ishii T, Nagai T, Ohta T, Niikawa N, Mizuno S, Kaname T, Naritomi K, Narumi Y, Wakui K, Fukushima Y, Miyatake S, Mizuguchi T, Saitu H, Miyake N, Matsumoto N, *Am J Med Genet A* 161, 1221-1237 (2013).
- 56 Exome sequencing identifies a novel INPPL1 mutation in opsismodysplasia. Iida A, Okamoto N, Miyake N, Nishimura G, Minami S, Sugimoto T, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitu H, Shiina M, Ogata K, Watanabe S, Ohashi H, Matsumoto N, Ikegawa S, *J Hum Genet* 58, 391-394 (2013).

- 57 Whole genome sequencing in patients with retinitis pigmentosa reveals pathogenic DNA structural changes and NEK2 as a new disease gene. Nishiguchi KM, Tearle RG, Liu Y, Oh EC, Miyake N, Benaglio P, Harper S, Koskiniemi-Kuendig H, Venturini G, Sharon D, Koenekoop RK, Nakamura M, Kondo M, Ueno S, Yasuma TR, Beckmann JS, Ikegawa S, Matsumoto N, Terasaki H, Berson EL, Katsanis N, Rivolta C, *Proc Nat Acad Sci USA* 110, 16139-16144 (2013).
- 58 Target capture and sequencing for detection of mutations causing early onset epileptic encephalopathy. Kodera H, Kato M, Nord AS, Walsh T, Lee M, Yamanaka G, Tohyama J, Nakamura K, Nakagawa E, Ikeda T, Ben-Zeev B, Lev D, Lerman-Sagie T, Strausberg R, Tanabe S, Ueda K, Amamoto M, Ohta S, Nododa Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Hayasaka K, King M-C, Matsumoto N, Saitsu H, *Epilepsia* 54, 1262-1269 (2013).
- 59 Mutations in KLHL40 are a frequent cause of severe autosomal-recessive nemaline myopathy. Ravenscroft G, Miyatake S, Lehtokari VL, Todd EJ, Vornanen P, Yau KS, Hayashi YK, Miyake N, Tsurusaki Y, Doi H, Saitsu H, Osaka H, Yamashita S, Ohya T, Sakamoto Y, Koshimizu E, Imamura S, Yamashita M, Ogata K, Shiina M, Bryson-Richardson RJ, Vaz R, Ceyhan O, Brownstein CA, Swanson LC, Monnot S, Romero NB, Amthor H, Kresoje N, Sivadurai P, Kiraly-Borri C, Haliloglu G, Talim B, Orhan D, Kale G, Charles AK, Fabian VA, Davis MR, Lammens M, Sewry CA, Manzur A, Muntoni F, Clarke NF, North KN, Bertini E, Nevo Y, Willichowski E, Silberg IE, Topaloglu H, Beggs AH, Allcock RJ, Nishino I, Wallgren-Pettersson C, Matsumoto N, Laing NG, *Am J Hum Genet* 93, 6-18 (2013).
- 60 Y Chromosome-linked B and NK cell deficiency in mice. Sun SL, 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, *J Immunol* 190, 6209-6220 (2013).
- 61 Identification of a novel homozygous SPG7 mutation in a Japanese patient with spastic ataxia: making an efficient diagnosis using exome sequencing for autosomal recessive cerebellar ataxia and spastic paraplegia. Doi H, Ohba C, Tsurusaki Y, Miyatake S, Miyake N, Saitsu H, Kawamoto Y, Yoshida T, Koyano S, Suzuki Y, Kuroiwa Y, Tanaka F, Matsumoto N, *Intern Med* 52, 1629-1633 (2013).
- 62 De Novo mutations in GNAO1, encoding a G α subunit of heterotrimeric G proteins, cause epileptic encephalopathy. Nakamura K, Kodera H, Akita T, Shiina M, Kato M, Hoshino H, Terashima H, Osaka H, Nakamura S, Tohyama T, Kumada T, Furukawa T, Iwata S, Shiihara T, Kubota M, Miyatake S, Koshimizu E, Nishiyama K, Nakashima N, Tsurusaki Y, Miyake N, Hayasaka K, Ogata K, Fukuda A, Matsumoto N, Saitsu H, *Am J Hum Genet* 93, 496-505 (2013).
- 63 De novo mutations in SLC35A2 encoding a UDP-galactose transporter cause early-onset epileptic encephalopathy. Kodera H, Nakamura K, Osaka H, Maegaki Y, Haginoya K, Mizumoto S, Kato M, Okamoto N, Iai M, Kondo Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Hayasaka K, Sugahara K, Yuasa I, Wada Y, Matsumoto N, Saitsu H, *Hum Mut* 34, 1708-1714 (2013).
- 64 Diagnostic utility of whole exome sequencing in cerebellar atrophy in childhood. Ohba C, Osaka H, Iai M, Yamashita S, Suzuki Y, Aida N, Shimosawa N, Takamura A, Doi H, Tomita-Katsumoto A, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Eto Y, Tanaka F, Matsumoto N, Saitsu H, *Neurogenet* 14, 225-232 (2013).
- 65 Novel FIG4 mutations in Yunis-Varon syndrome. Nakajima J, Okamoto N, Shiraishi J, Nishimura G, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Kawashima H, Matsumoto N, Miyake N, *J Hum Genet* 58, 822-824 (2013).
- 66 Clinical spectrum of early-onset epileptic encephalopathies caused by KCNQ2 mutations. Kato M, Yamagata T, Kubota M, Arai H, Yamashita S, Nakagawa T, Fujii T, Sugai K, Imai K, Uster T, Chitayat D, Weiss S, Kashii H, Kusano R, Matsumoto A, Nakamura K, Oyazato Y, Maeno M, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saito K, Hayasaka K, Matsumoto N, Saitsu H, *Epilepsia* 54, 1282-1287 (2013).
- 67 MLL2 and KDM6A mutations in patients with Kabuki syndrome. Miyake N, Koshimizu E, Okamoto N, Mizuno S, Ogata T, Nagai T, Kosho T, Ohashi H, Kato M, Sasaki G, Mabe H, Watanabe Y, Yoshino M, Matsuishi T, Takanashi J, Shotelersuk V, Tekin M, Ochi N, Kubota M, Ito N, Ihara K, Hara T, Tonoki H, Ohta T, Saito K, Matsuo M, Urano M, Enokizono T, Sato A, Tanaka H, Ogawa A, Fujita T, Hiraki Y, Kitanaka S, Matsubara Y, Makita T, Taguri M, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Yoshiura K, Matsumoto N, Niikawa N, *Am J Med Genet A* 161A, 2234-2243 (2013).

- 68 KDM6A point mutations cause Kabuki syndrome. Miyake N, Mizuno S, Okamoto N, Ohashi H, Shiina M, Ogata K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Saitsu H, Niikawa N, Matsumoto N, *Hum Mut* 34, 108-110 (2013).
- 69 Hypothalamic pituitary complications in Kabuki syndrome. Ito N, Ihara K, Tsutsumi Y, Miyake N, Matsumoto N, Hara T, *Pituitary* 16, 133-138 (2013).
- 70 Whole exome sequencing identifies KCNQ2 mutations in Ohtahara syndrome. Saitsu H, Kato M, Koide A, Goto T, Fujita T, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Hayasaka K, Matsumoto N, *Ann Neurol* 72, 298-300 (2012).
- 71 A DYNC1H1 mutation causes a dominant spinal muscular atrophy with lower extremity predominance. Tsurusaki Y, Saitoh S, Tomizawa K, Sudo A, Asahina N, Shiraiishi H, Ito J, Tanaka H, Doi H, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N, *Neurogenet* 13, 327-332 (2012).
- 72 Sibling cases of moyamoya disease having homozygous and heterozygous c.14576G>A variant in RNF213 showed varying clinical course and severity. Miyatake S1, Touho H, Miyake N, Ohba C, Doi H, Saitsu H, Taguri M, Morita S, Matsumoto N, *J Hum Genet* 57, 804-806 (2012).
- 73 Mutations affecting components of the SWI/SNF complex cause Coffin-Siris syndrome. Tsurusaki Y, Okamoto N, Ohashi H, Kosho T, Imai Y, Hibi-Ko Y, Kaname T, Naritomi K, Kawame H, Wakui K, Fukushima Y, Homma T, Kato M, Hiraki Y, Yamagata T, Yano S, Mizuno S, Sakazume S, Ishii T, Nagai T, Shiina M, Ogata K, Ohta T, Niikawa N, Miyatake S, Okada I, Mizuguchi T, Doi H, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N, *Nat Genet* 44, 376-378 (2012).

=====
 計画研究 7 研究代表者：中村春木
 研究分担者：皿井明倫、藤井聡
 連携研究者：神谷成敏、河野秀俊、笠原浩太

【計画 7・中村春木】

- 1 Molecular mechanisms of cooperative binding of transcription factors Runx1–CBFβ– Ets1 on the TCRα gene enhancer. Kasahara K, Shiina M, Fukuda I, Ogata K, Nakamura H, *PLoS One* 12, e0172654 (2017).
- 2 Enhancement of canonical sampling by virtual-state transitions. Higo J, Kasahara K, Dasgupta B, Nakamura H, *J Chem Phys* 146, 044104 (2017).
- 3 Variation of Free-Energy Landscape of the p53 C-terminal Domain Induced by Acetylation: Enhanced Conformational Sampling. Iida S, Mashimo T, Kurosawa T, Hojo H, Muta H, Goto Y, Fukunishi Y, Nakamura H, Higo J, *J Comput Chem* 37, 2687-2700 (2016).
- 4 myPresto/omegagene: a GPU-accelerated molecular dynamics simulator tailored for enhanced conformational sampling methods with a non-Ewald electrostatic scheme. Kasahara K, Ma B, Goto K, Dasgupta B, Higo J, Fukuda I, Mashimo T, Akiyama Y, Nakamura H, *Biophys Physicobiol* 13, 209-216 (2016).
- 5 Revisiting Antibody Modeling Assessment for CDR-H3 loop. Nishigami H, Kamiya N, Nakamura H, *Protein Eng Design Selection* 29, 477-484 (2016).
- 6 mDCC_tools: Characterizing Multi-modal Atomic Motions in Molecular Dynamics Trajectories. Kasahara K, Mohan N, Fukuda I, Nakamura H, *Bioinformatics* 32, 2531-2533 (2016).
- 7 A critical appraisal of the zero-multipole method: Structural, thermodynamic, dielectric, and dynamical properties of a water system. Wang H, Nakamura H, Fukuda I, *J Chem Phys* 144, 114503 (2016).
- 8 Virtual-system coupled adaptive umbrella sampling to compute free-energy landscape for flexible molecular docking. Higo J, Dasgupta B, Mashimo T, Kasahara K, Fukunishi Y, Nakamura H, *J Comput Chem* 36, 1489-1501 (2015).
- 9 A Novel Approach of Dynamic Cross Correlation Analysis on Molecular Dynamics Simulations and its Application to Ets1 dimer-DNA Complex. Kasahara K, Fukuda I, Nakamura H, *PLoS One* 9, e112419 (2014).
- 10 The Zero-multipole summation method for estimating electrostatic interactions in molecular dynamics: analysis of the accuracy and application to liquid systems. Fukuda I, Kamiya N, Nakamura H, *J Chem Phys* 140, 194307 (2014).

- 11 Molecular Dynamics Simulations Accelerated by GPU for Biological Macromolecules with a Non-Ewald Scheme for Electrostatic Interactions. Mashimo T, Fukunishi F, Kamiya N, Takano Y, Fukuda I, Nakamura H, *J Chem Theory Comput* 9, 5599-5609 (2013).
- 12 Molecular dynamics simulations of a double-stranded DNA in an explicit solvent model with zero-dipole summation method. Arakawa T, Kamiya N, Nakamura H, Fukuda I, *PLoS One* 8, e76606 (2013).

【計画 7・皿井明倫、藤井聡】

- 1 SMARCAD1 is an ATP-dependent stimulator of nucleosomal H2A acetylation via CBP, resulting in transcriptional regulation. Doiguchi M, Nakagawa T, Imamura Y, Yoneda M, Higashi M, Kubota K, Yamashita S, Asahara H, Iida M, Fujii S, Ikura T, Liu Z, Nandu T, Kraus WL, Ueda H, Ito T, *Sci Rep* 6, 20179 (2016).
- 2 Dzip3 regulates developmental genes in mouse embryonic stem cells by reorganizing 3D chromatin conformation. Inoue D, Aihara H, Sato T, Mizusaki H, Doiguchi M, Higashi M, Imamura Y, Yoneda M, Miyanishi T, Fujii S, Okuda A, Nakagawa T, Ito T, *Sci Rep* 5, 16567 (2016).
- 3 NF-E2 p45 is important for establishing normal function of platelets. Fujita R, Takayama-Tsujimoto M, Satoh H, Gutiérrez L, Aburatani H, Fujii S, Sarai A, Bresnick EH, Yamamoto M, Motohashi H, *Mol Cell Biol* 33, 2659-2670 (2013).

=====

公募研究(50音順)

【公募・秋光信佳】

- 1 A GC-rich sequence feature in the 3' UTR directs UPF1-dependent mRNA decay in mammalian cells. Imamachi N, Salam KA, Suzuki Y, Akimitsu N, *Genome Res* 27, 407-418 (2017).
- 2 Oncofetal protein IGF2BP3 facilitates the activity of proto-oncogene protein eIF4E through the destabilization of EIF4E-BP2 mRNA. Mizutani R, Imamachi N, Suzuki Y, Yoshida H, Tochigi N, Oonishi T, Suzuki Y, Akimitsu N, *Oncogene* 35, 3495-3502 (2016).

【公募・井手聖】

- 1 Targeting 24 bp within Telomere Repeat Sequences with Tandem Tetramer Pyrrole-Imidazole Polyamide Probes. Kawamoto Y, Sasaki A, Chandrana A, Hashiya K, Ide S, Bando T, Maeshima K, Sugiyama H, *J Am Chem Soc* 138, 14100-14107 (2016).
- 2 Telomere Visualization in Tissue Sections Using Pyrrole-Imidazole Polyamide Probes. Sasaki A, Ide S, Kawamoto Y, Bando T, Murata Y, Shimura, M Yamada K, Hirata A, Nokihara K, Hirata T, Sugiyama H, Maeshima K, *Sci Rep* 6, 2926 (2016).
- 3 Liquid-like behavior of chromatin. Maeshima K, Ide S, Hibino K, Sasai M, *Curr Opin Genet Dev* 37, 36-45 (2016).
- 4 Tandem trimer pyrrole-imidazole polyamide probes targetting 18base pairs in human telomere sequences. Kawamoto Y, Sasaki A, Hashiya K, Ide S, Bando T, Maeshima K, Sugiyama H, *Chem Sci* 6, 2307-2312 (2015).

【公募・伊藤寿朗】

- 1 Analysis of the Arabidopsis superman allelic series and the interactions with other genes demonstrate developmental robustness and joint specification of male-female boundary, flower meristem termination, and carpel compartmentalization. Breuil-Broyer S, Trehin C, Morel P, Boltz V, Sun B, Chambrier P, Ito T, Negritiu I, *Ann Bot* 117, 905-923 (2015).
- 2 Dynamics of H3K27me3 methylation and demethylation in plant development. Gan E-S, Xu Y, Ito T, *Plant Signal Behav* 10, e1027851 (2015).
- 3 Regulation of Floral Stem Cell Termination in Arabidopsis. Sun B, Ito T, *Front Plant Sci* 6, 17 (2015).
- 4 Co-ordination of flower development through epigenetic regulation in two model species: rice and Arabidopsis. Guo S, Sun B, Looi L-S, Xu Y, Gan E-S, Huang J, Ito T, *Plant Cell Physiol* 56, 830-842 (2015).

【公募・井上康志】

- 1 Facile and environment-friendly preparation of platinum nanoclusters with different emission wavelengths and their application for sensitive Co²⁺ ion detection. Huang X, Aoki K, Ishitobi H, Inouye Y, *ChemPhysChem* 15, 642-646 (2014).
- 2 From “there’s plenty of room at the bottom” to seeing what is actually there. Fitzpatrick J AJ, Inouye Y, Manley S, Moerner WE, *ChemPhysChem* 15, 547-549 (2014).
- 3 Nanomovement of Azo Polymers Induced by Longitudinal Fields. Ishitobi H, Nakamura I, Kobayashi T, Hayazawa N, Sekkat Z, Kawata S, Inouye T, *ACS Photonics* 1, 190-197 (2014).
- 4 Nano-Analysis of DNA Conformation Changes Induced by Transcription Factor Complex Binding Using Plasmonic Nanodimers. Morimura H, Tanaka S, Ishitobi H, Mikami T, Kamachi Y, Kondoh H, Inouye Y, *ACS Nano* 7, 10733-10740 (2013).
- 5 Synthesis of green-emitting Pt8 nanoclusters for biomedical imaging by pre-equilibrated Pt/PAMAM (G4-OH) and mild reduction. Tanaka S, Aoki K, Muratsugu A, Ishitobi H, Jin T, Inouye Y, *Optical Materials Express* 3, 157-165 (2013).

【公募・浦聖恵】

- 1 Wolf-Hirschhorn Syndrome Candidate 1 Is Necessary for Correct Hematopoietic and B Cell Development. Campos-Sanchez E, Deleyto-Seldas N, Dominguez V, Carrillo-de-Santa-Pau E, Ura K, Rocha PP, Kim J, Aljoufi A, Esteve-Codina A, Dabad M, Gut M, Heyn H, Kaneda Y, Nimura K, Skok JA, Martinez-Frias ML, Cobaleda C, *Cell Rep* 19, 1586-1601 (2017).
- 2 Auditory hair cell defects as potential cause for sensorineural deafness in Wolf-Hirschhorn syndrome. Ahmed M, Ura K, Streit A, *Dis Model Mech* 6, 1027-1035 (2015).
- 3 TBP-like protein (TLP) interferes with Taspase1-mediated processing of TFIIA and represses TATA box gene expression. Suzuki H, Isogai M, Maeda R, Ura K, Tamura TA, *Nucleic Acids Res* 43, 6285-98 (2015).

【公募・太田力】

- 1 A rare polymorphic variant of NBS1 reduces DNA repair activity and elevates chromosomal instability. Yamamoto Y, Miyamoto M, Tatsuda D, Kubo M, Nakagama H, Nakamura Y, Satoh H, Matsuda K, Watanabe T, Ohta T. *Cancer Res* 74, 3707-3715 (2014).

【公募・大野欽司】

- 1 Position-specific binding of FUS to nascent RNA regulates mRNA length. Masuda A, Takeda J, Okuno T, Okamoto T, Ohkawara B, Ito M, Ishigaki S, Sobue G, Ohno K, *Genes Dev* 29, 1045-1057 (2015).
- 2 Decoding abnormal splicing code in human diseases. Rahman MA, Nasrin F, Masuda A, Ohno K, *J Invest Genomics* 2, 00016 (2015).
- 3 HnRNP C, YB-1 and hnRNP L coordinately enhance skipping of human MUSK exon 10 to generate a Wnt-insensitive MuSK isoform. Nasrin F, Rahman MA, Masuda A, Ohe K, Takeda J, Ohno K, *Sci Rep* 4, 6841 (2014).
- 4 LDB3 splicing abnormalities are specific to skeletal muscles of patients with myotonic dystrophy type 1 and alter its PKC binding affinity. Yamashita Y, Matsuura T, Kurosaki T, Amakusa Y, Kinoshita M, Ibi T, Sahashi K, Ohno K, *Neurobiol Dis* 69, 200-205 (2014).
- 5 HnRNP L and hnRNP LL antagonistically modulate PTB-mediated splicing suppression of CHRNA1 pre-mRNA. Rahman MA, Masuda A, Ohe K, Ito M, Hutchinson DO, Mayeda A, Engel AG, Ohno K, *Sci Rep* 3, 2931 (2013).
- 6 FUS-regulated region- and cell-type-specific transcriptome is associated with cell selectivity in ALS/FTLD. Fujioka Y, Ishigaki S, Masuda A, Iguchi Y, Udagawa T, Watanabe H, Katsuno M, Ohno K, Sobue G, *Sci Rep* 3, 2388 (2013).

【公募・黒柳秀人】

- 1 An emerging model organism *Caenorhabditis elegans* for alternative pre-mRNA processing in vivo. Wani S, Kuroyanagi H, *Wiley Interdiscip Rev RNA*, in press.

- 2 Splicing factors control *C. elegans* behavioural learning in a single neuron by producing DAF-2c receptor. Tomioka M, Naito Y, Kuroyanagi H, Iino Y, *Nat Commun* 7, 11645 (2016).
- 3 Evolutionarily conserved autoregulation of alternative pre-mRNA splicing by ribosomal protein L10a. Takei S, Togo-Ohno M, Suzuki Y, Kuroyanagi H, *Nucleic Acids Res* 44, 5585 (2016).
- 4 RBFOX and SUP-12 sandwich a G base to cooperatively regulate tissue-specific splicing. Kuwasako K, Takahashi M, Unzai S, Tsuda K, Yoshikawa S, He F, Kobayashi N, Güntert P, Shirouzu M, Ito T, Tanaka A, Yokoyama S, Hagiwara M, Kuroyanagi H, Muto Y, *Nat Struct Mol Biol* 21, 778 (2014).

【公募・古久保哲朗】

- 1 The physical size of transcription factors is key to transcriptional regulation in chromatin domains. Maeshima K, Kaizu K, Tamura S, Nozaki T, Kokubo T, Takahashi K, *J Phys Condens Matter* 27, 064116 (2015).
- 2 Both HMG boxes in Hmo1 are essential for DNA binding in vitro and in vivo. Higashino A, Shiwa Y, Yoshikawa H, Kokubo T, Kasahara K, *Biosci Biotechnol Biochem* 79, 384-393 (2015).
- 3 High-resolution structure of TBP with TAF1 reveals anchoring patterns in transcriptional regulation. Anandapadamanaban M, Andresen C, Helander S, Ohyama Y, Siponen MI, Lundström P, Kokubo T, Ikura M, Moche M, Sunnerhagen M, *Nat Struct Mol Biol* 20, 1008-1014 (2013).

【公募・佐藤ゆたか】

- 1 Antagonism between β -catenin and Gata.a sequentially segregates the germ layers of ascidian embryos. Imai K S, Hudson C, Oda-Ishii I, Yasuo H, Satou Y, *Development* 143, 4167-4172 (2016).
- 2 A Maternal System Initiating the Zygotic Developmental Program through Combinatorial Repression in the Ascidian Embryo. Oda-Ishii I, Kubo A, Kari W, Suzuki N, Rothbacher U, Satou Y, *PLoS Genet* 12, e1006045 (2016).
- 3 Genetic pathways for differentiation of the peripheral nervous system in ascidians. Waki K, Imai K S, Satou Y, *Nat Commun* 6, 8719 (2015).
- 4 A Boolean Function for Neural Induction Reveals a Critical Role of Direct Intercellular Interactions in Patterning the Ectoderm of the Ascidian Embryo. Ohta N, Waki K, Mochizuki A, Satou Y, *PLoS Comput Biol* 11, e1004687 (2015).
- 5 Gene regulatory systems that control gene expression in the *Ciona* embryo. Satou Y, Imai KS, *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 91, 33-51 (2015).
- 6 Multiple signaling pathways coordinate to induce a threshold response in a chordate embryo. Ohta N, Satou Y, *PLoS Genet* 9, e1003818 (2013).
- 7 A time delay gene circuit is required for palp formation in the ascidian embryo. Ikeda T, Matsuoka T, Satou Y, *Development* 140, 4703-4708 (2013).

【公募・スタセビッチティモシー】

- 1 Visualizing posttranslational and epigenetic modifications of endogenous proteins in vivo. Kimura H, Hayashi-Takanaka Y, Stasevich TJ, Sato Y, *Histochem Cell Biol* 144, 101-109 (2015).
- 2 Regulation of RNA polymerase II activation by histone acetylation in single living cells. Stasevich TJ, Hayashi-Takanaka Y, Sato Y, Maehara K, Ohkawa Y, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, Nagase T, Nozaki N, McNally JG, Kimura H, *Nature* 516, 272-275 (2014).
- 3 Quantifying histone and RNA polymerase II post-translational modification dynamics in mother and daughter cells. Stasevich TJ, Sato Y, Nozaki N, Kimura H, *Methods* 70, 77-88 (2014).

【公募・高田彰二】

- 1 Near-atomic structural model for bacterial DNA replication initiation complex and its functional insights. Shimizu M, Noguchi Y, Sakiyama Y, Kawakami H, Katayama T, Takada S, *Proc Nat Acad Sci USA* 113, E8021-E8030 (2016).
- 2 Histone acetylation dependent energy landscapes in tri-nucleosome revealed by residue-resolved molecular simulations. Chang L, Takada S, *Sci Rep* 6, 34441 (2016).
- 3 Dynamic Coupling among Protein Binding, Sliding, and DNA Bending Revealed by Molecular Dynamics. Tan C, Terakawa T, Takada S, *J Am Chem Soc* 138, 8512-8522 (2016).

- 4 Modeling Structural Dynamics of Biomolecular Complexes by Coarse-Grained Molecular Simulations. Takada S, Kanada R, Tan C, Terakawa T, Li W, Kenzaki H, *Acc Chem Res* 48, 3026-3035 (2015).
- 5 p53 dynamics upon response element recognition explored by molecular simulations. Terakawa T, Takada S, *Sci Rep* 5, 17107(2015).
- 6 Partial Unwrapping and Histone Tail Dynamics in Nucleosome Revealed by Coarse-Grained Molecular Simulations. Kenzaki H, Takada S, *PLoS Comput Biol* 11, e1004443 (2015).
- 7 RESPAC: Method to Determine Partial Charges in Coarse-Grained Protein Model and Its Application to DNA-Binding Proteins. Terakawa T, Takada S, *J Chem Theory Comput* 10, 711-721 (2014).
- 8 Drug Uptake Pathways of Multidrug Transporter AcrB Studied by Molecular Simulations and Site-Directed Mutagenesis Experiments. Yao X, Kimura N, Murakami S, Takada S, *J Am Chem Soc* 135, 7474-7485 (2013).

【公募・高畑信也】

- 1 H3K36 methylation state and associated silencing mechanisms. Suzuki S, Murakami Y, Takahata S, *Transcription* 8, 36-41 (2017).
- 2 Inner nuclear membrane protein Lem2 augments heterochromatin formation in response to nutritional conditions. Tange Y, Chikashige Y, Takahata S, Kawakami K, Higashi M, Mori C, Kojidani T, Hirano Y, Asakawa H, Murakami Y, Haraguchi T, Hiraoka Y, *Genes Cells* 21, 812-832 (2016).
- 3 Histone H3K36 trimethylation is essential for multiple silencing mechanisms in fission yeast. Suzuki S, Kato H, Suzuki Y, Chikashige Y, Hiraoka Y, Kimura H, Nagao K, Obuse C, Takahata S, Murakami Y, *Nucleic Acids Res* 44, 4147-4162 (2016).

【公募・原田昌彦】

- 1 Quantitative regulation of histone variant H2A.Z during cell cycle by ubiquitin proteasome system and SUMO-targeted ubiquitin ligases. Takahashi D, Orihara Y, Kitagawa S, Kusakabe M, Shintani T, Oma Y, Harata M, *Biosci Biotechnol Biochem*, in press.
- 2 Multivalent binding of PWWP2A to H2A.Z regulates mitosis and neural crest differentiation. Pünzeler S, Wommelsdorf S, Spitzer RMM, Leidescher S, Markaki Y, Mentele E, Regnard C, Schneider K, Takahashi D, Vardabasso C, Zink LM, Straub T, Bernstein E, Harata M, Leonhardt H, Mann M, Rupp R, Hake SB, *EMBO J*, in press.
- 3 Actin Family Proteins in the Human INO80 Chromatin Remodeling Complex Exhibit Functional Roles in the Induction of Heme Oxygenase-1 with Hemin. Takahashi Y, Murakami H, Akiyama Y, Katoh Y, Oma Y, Nishijima H, Shibahara KI, Igarashi K, Harata M, *Front Genet* 8, 7 (2017).
- 4 Nuclear F-actin enhances the transcriptional activity of β -catenin by increasing its nuclear localization and binding to chromatin. Yamazaki S, Yamamoto K, de Lanerolle P, Harata M, *Histochem Cell Biol* 145, 388-399 (2016).
- 5 Genetic complementation analysis showed distinct contributions of the N-terminal tail of H2A.Z to epigenetic regulations. Kusakabe M, Oku H, Matsuda R, Hori T, Muto A, Igarashi K, Fukagawa T, Harata M, *Genes Cells* 21, 122-135 (2016).
- 6 Contribution of nuclear actin to transcription regulation. Yamazaki S, Yamamoto K, Harata M, *Genom Data* 4, 127-129 (2015).
- 7 The actin family protein ARP6 contributes to the structure and the function of the nucleolus. Kitamura H, Matsumori H, Kalendova A, Hozak P, Goldberg IG, Nakao M, Saitoh N, Harata M, *Biochem Biophys Res Commun* 464, 554-560 (2015).
- 8 Nuclear actin activates human transcription factor genes including the OCT4 gene. Yamazaki S, Yamamoto K, Tokunaga M, Sakata-Sogawa K, Harata M, *Biosci Biotechnol Biochem* 79, 242-246 (2015).
- 9 DNA binding properties of the actin-related protein Arp8 and its role in DNA repair. Osakabe A, Takahashi Y, Murakami H, Otawa K, Tachiwana H, Oma Y, Nishijima H, Shibahara K, Kurumizaka H, Harata M, *PLoS One* 9, e108354 (2014).
- 10 SWR1 and INO80 chromatin remodelers contribute to DNA double-strand break perinuclear anchorage site choice. Horigome C, Oma Y, Konishi T, Schmid R, Marcomini I, Hauer MH, Dion V, Harata M, Gasser SM, *Mol Cell* 55, 626-639 (2014).

- 11 Nuclear actin filaments recruit cofilin and actin-related protein 3, and their formation is connected with a mitotic block. Kalendova A, Kalasova I, Yamazaki S, Ulicna L, Harata M, Hozak P, *Histochem Cell Biol* 142, 139-152 (2014).
- 12 Possible involvement of LKB1-AMPK signaling in non-homologous end joining. Ui A, Ogiwara H, Nakajima S, Kanno S, Watanabe R, Harata M, Okayama H, Harris CC, Yokota J, Yasui A, Kohno T, *Oncogene* 33, 1640-1648 (2014).
- 13 Reorganization of damaged chromatin by the exchange of histone variant H2A.Z-2. Nishibuchi I, Suzuki H, Kinomura A, Sun J, Liu NA, Horikoshi Y, Shima H, Kusakabe M, Harata M, Fukagawa T, Tashiro K, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 89, 736-744 (2014).
- 14 Improvement of the transformation efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* by altering carbon sources in pre-culture. Konishi T, Harata M, *Biosci Biotechnol Biochem* 78, 1090-1093 (2014).
- 15 Structural polymorphism in the L1 loop regions of human H2A.Z.1 and H2A.Z.2. Horikoshi N, Sato K, Shimada K, Arimura Y, Osakabe A, Tachiwana H, Hayashi-Takanaka Y, Iwasaki W, Kagawa W, Harata M, Kurumizaka H, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 69, 2431-2439 (2013).

【公募・坂東優篤】

- 1 DNMT3A R882 mutants interact with polycomb proteins to block haematopoietic stem and leukaemic cell differentiation. Koya J, Kataoka K, Sato T, Bando M, Kato Y, Tsuruta-Kishino T, Kobayashi H, Narukawa K, Miyoshi H, Shirahige K, Kurokawa M, *Nat Commun* 7, 10924 (2016).
- 2 Condensin targets and reduces unwound DNA structures associated with transcription in mitotic chromosome. Sutani T, Sakata T, Nakato R, Masuda K, Ishibashi M, Yamashita D, Suzuki Y, Hirano T, Bando M, Shirahige K, *Nat Commun* 6, 7815 (2015).
- 3 The Deubiquitinating Enzyme USP7 Regulates Androgen Receptor Activity by Modulating Its Binding to Chromatin. Chen ST, Okada M, Nakato R, Izumi K, Bando M, Shirahige K, *J Biol Chem* 290, 21713-21723 (2015).
- 4 Esco1 Acetylates Cohesin via a Mechanism Different from That of Esco2. Minamino M, Ishibashi M, Nakato R, Akiyama K, Tanaka H, Kato Y, Negishi L, Hirota T, Sutani T, Bando M, Shirahige K, *Curr Biol* 25, 1694-1706 (2015).
- 5 Germline gain-of-function mutations in AFF4 cause a developmental syndrome functionally linking the super elongation complex and cohesin. Izumi K, Nakato R, Zhang Z, Edmondson AC, Noon S, Dulik MC, Rajagopalan R, Venditti CP, Gripp K, Samanich J, Zackai EH, Deardorff MA, Clark D, Allen JL, Dorsett D, Misulovin Z, Komata M, Bando M, Kaur M, Katou Y, Shirahige K, Krantz ID, *Nat Genet* 47, 338-344 (2015).

【公募・平田章】

- 1 A structural sketch of RcdA, a transcription factor controlling the master regulator of biofilm formation. Sugino A, Usui T, Shimada T, Nakano M, Ogasawara H, Ishihama A, Hirata A, *FEBS Lett*, in press.
- 2 The X-ray crystal structure of the euryarchaeal RNA polymerase in an open-clamp configuration. Jun SH, Hirata A, Kanai T, Santangelo TJ, Imanaka T, Murakami KS, *Nat Commun* 5, 5132 (2014).

【公募・藤井穂高】

- 1 Locus-specific ChIP combined with NGS analysis reveals genomic regulatory regions that physically interact with the Pax5 promoter in a chicken B cell line. Fujita T, Kitaura F, Yuno M, Suzuki Y, Sugano S, Fujii H, *DNA Res*, in press.
- 2 Identification of physical interactions between genomic regions by enChIP-Seq. Fujita T, Yuno M, Suzuki Y, Sugano S, Fujii H, *Genes Cells*, in press.
- 3 Allele-specific locus binding and genome editing by CRISPR at the p16INK4a locus. Fujita T, Yuno M, Fujii H, *Sci Rep* 6, 30485 (2016).
- 4 Efficient sequence-specific isolation of DNA fragments and chromatin by in vitro enChIP technology using recombinant CRISPR ribonucleoproteins. Fujita T, Yuno M, Fujii H, *Genes Cells* 21, 370-377 (2016).
- 5 Isolation of specific genomic regions and identification of associated molecules by enChIP. Fujita T, Fujii H, *J Vis Exp* 107, 53478 (2016).

- 6 Biochemical analysis of genome functions using locus-specific chromatin immunoprecipitation technologies. Fujita T, Fujii H, *Gene Regul Syst Bio Suppl* 1, 1-9 (2016).
- 7 Identification of non-coding RNAs associated with telomeres by enChIP-RNA-Seq. Fujita T, Yuno M, Okuzaki D, Ohki R, Fujii H, *PLoS One* 10, e0123387 (2015).
- 8 A critical role of the Thy28-MYH9 axis in B cell-specific expression of the Pax5 gene revealed by iChIP-SILAC. Fujita T, Kitaura F, Fujii H, *PLoS One* 10, e0116579 (2015).
- 9 Applications of engineered DNA-binding molecules such as TAL proteins and the CRISPR/Cas system in biology research. Fujita T, Fujii H, *Int J Mol Sci* 16, 23143-23164 (2015).
- 10 Isolation of specific genomic regions and identification of their associated molecules by engineered DNA-Binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP) using the CRISPR system and TAL proteins. Fujii H, Fujita T, *Int J Mol Sci* 16, 21802-21812 (2015).
- 11 Efficient isolation of specific genomic regions retaining molecular interactions by the iChIP system using recombinant exogenous DNA-binding proteins. Fujita T, Fujii H, *BMC Mol Biol* 15, 26 (2014).
- 12 Identification of proteins associated with an IFN γ -responsive promoter by a retroviral expression system for enChIP using CRISPR. Fujita T, Fujii H, *PLoS One* 9, e103084 (2014).
- 13 Identification of proteins interacting with genomic regions of interest in vivo using engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP). Fujita T, Fujii H, *Bio-protocol* 4, e1124 (2014).
- 14 Identification of telomere-associated molecules by engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP). Fujita T, Asano Y, Ohtsuka J, Takada Y, Saito K, Ohki R, Fujii H, *Sci Rep* 3, 3171 (2013).
- 15 Efficient isolation of specific genomic regions and identification of associated proteins by engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP) using CRISPR. Fujita T, Fujii H, *Biochem Biophys Res Commun* 439, 132-136 (2013).

【公募・別所康全】

- 1 The Circadian NAD⁺ Metabolism: Impact on Chromatin Remodeling and Aging. Nakahata Y, Bessho Y, *Biomed Res Int* 2016, 3208429 (2016).
- 2 Analyzing ERK Signal Dynamics During Zebrafish Somitogenesis. Matsui T, Bessho Y, *Methods Mol Biol* 1487, 367-378 (2016).
- 3 Cell collectivity regulation within migrating cell cluster during Kupffer's vesicle formation in zebrafish. Matsui T, Ishikawa H, Bessho Y, *Front Cell Dev Biol* 3, 27 (2015).

【公募・前川利男】

- 1 ATF7 ablation prevents diet-induced obesity and insulin resistance. Liu Y, Maekawa T, Yoshida K, Furuse T, Kaneda H, Wakana S, Ishii S, *Biochem Biophys Res Commun* 478, 696-702 (2016).
- 2 In utero TNF- α treatment induces telomere shortening in young adult mice in an ATF7-dependent manner. Liu B, Maekawa T, Chatton B, Ishii S, *FEBS Open Bio* 6, 56-63 (2016).
- 3 The transcription factor ATF7 mediates lipopolysaccharide-induced epigenetic changes in macrophages involved in innate immunological memory. Yoshida K, Maekawa T, Zhu Y, Renard-Guillet C, Chatton B, Inoue K, Uchiyama T, Ishibashi K, Yamada T, Ohno N, Shirahige K, Okada-Hatakeyama M, Ishii S, *Nat Immunol* 16, 1034-1043 (2015).

【公募・南敬】

- 1 Dynamically and epigenetically coordinated GATA/ETS/SOX transcription factor expression is indispensable for endothelial cell differentiation. Kanki Y, Nakaki R, Shimamura T, Matsunaga T, Yamamizu K, Katayama S, Suehiro JI, Osawa T, Aburatani H, Kodama T, Wada Y, Yamashita JK, Minami T, *Nucleic Acids Res* 45, 4344-4358 (2017).
- 2 Oncogenic combined calcineurin-NFAT and TLR signals in colon. Muramatsu M, Minami T, *Trans Cancer Res* 5, Supple3 (2016).
- 3 Emerging role of VEGFC in pathological angiogenesis. Nagai N, Minami T, *EBioMedicine* 11, 1588-1589 (2015).

【公募・村上洋太】

- 1 H3K36 methylation state and associated silencing mechanisms. Suzuki S, Murakami Y, Takahata S, *Transcription* 8, 26-31 (2017).
- 2 Histone H3K36 trimethylation is essential for multiple silencing mechanisms in fission yeast. Suzuki S, Kato H, Suzuki Y, Chikashige Y, Hiraoka Y, Kimura H, Nagao K, Obuse C, Takahata S, Murakami Y, *Nucleic Acids Res* 44, 4147-4162 (2016).
- 3 A novel method for purification of the endogenously expressed fission yeast Set2 complex. Suzuki S, Nagao K, Obuse C, Murakami Y, Takahata S, *Protein Expr Purif* 97, 44-49 (2014).
- 4 Mediator directs co-transcriptional heterochromatin assembly by RNA interference-dependent and -independent pathways. Oya E, Kato H, Chikashige Y, Tsutsumi C, Hiraoka Y, Murakami Y, *PLoS Genet* 9, e1003677 (2013).

【公募・村谷匡史】

- 1 The transcription factor MAFK induces EMT and malignant progression of triple-negative breast cancer cells through its target GPNMB. Okita Y, Kimura M, Xie R, Chen C, Shen LT, Kojima Y, Suzuki H, Muratani M, Saitoh M, Semba K, Heldin CH, Kato M, *Sci Signal* 10, 474 (2017).
- 2 Conservation of the Nrf2-Mediated Gene Regulation of Proteasome Subunits and Glucose Metabolism in Zebrafish. Nguyen VT, Fuse Y, Tamaoki J, Akiyama SI, Muratani M, Tamaru Y, Kobayashi M, *Oxid Med Cell Longev* 2016, 5720574 (2016).
- 3 Comprehensive benchmarking reveals H2BK20 acetylation as a distinctive signature of cell-state-specific enhancers and promoters. Kumar V, Rayan NA, Muratani M, Lim S, Elanggovan B, Xin L, Lu T, Makhija H, Poschmann J, Lufkin T, Ng HH, Prabhakar S, *Genome Res* 26, 612-623 (2016).

【公募・村野健作】

- 1 Mitotic phosphorylation of CCCTC-binding factor (CTCF) reduces its DNA binding activity. Sekiya T, Murano K, Kato K, Kawaguchi A, Nagata K, *FEBS Open Bio* 7, 397-404 (2017).
- 2 Piwi Modulates Chromatin Accessibility by Regulating Multiple Factors Including Histone H1 to Repress Transposons. Iwasaki YW, Murano K, Ishizu H, Shibuya A, Iyoda Y, Siomi MC, Siomi H, Saito K, *Mol Cell* 63, 408-419 (2016).
- 3 Oseltamivir Expands Quasispecies of Influenza Virus through Cell-to-cell Transmission. Mori K, Murano K, Ohniwa RL, Kawaguchi A, Nagata K, *Sci Rep* 5, 9163 (2015).
- 4 Reconstitution of human rRNA gene transcription in mouse cells by a complete SL1 complex. Murano K, Okuwaki M, Momose F, Kumakura M, Ueshima S, Newbold RF, Nagata K, *J Cell Sci* 127, 3309-3319 (2014).

【公募・矢田哲士】

- 1 A new computational method to predict transcriptional activity of a DNA sequence from diverse datasets of massively parallel reporter assays. Liu Y, Irie T, Yada T, Suzuki Y, *Nucleic Acids Res*, in press.
- 2 Estimating optimal sparseness of developmental gene networks using a semi-quantitative model. Ichinose N, Yada T, Wada H, *PLoS One* 12, e0176492, (2017).
- 3 General continuous-time Markov model of sequence evolution via insertions/deletions: local alignment probability computation. Ezawa K, *BMC Bioinform* 17, 397 (2016).
- 4 General continuous-time Markov model of sequence evolution via insertions/deletions: are alignment probabilities factorable? Ezawa K, *BMC Bioinform* 17, 304 (2016).
- 5 Analysis of RNA decay factor mediated RNA stability contributions on RNA abundance. Maekawa S, Imamachi N, Irie T, Tani H, Matsumoto K, Mizutani R, Imamura K, Kakeda M, Yada T, Sugano S, Suzuki Y, Akimitsu N, *BMC Genomics* 16, 154 (2015).

【公募・山本拓也】

- 1 Antagonistic interactions between ERK MAP kinase and retinoic acid receptor signaling in colorectal cancer cells. Imajo M, Kondoh K, Yamamoto T, Nakayama K, Nakajima-Koyama M, Nishida E, *Mol Cell Biol*, in press.

- 2 In vitro expansion of mouse primordial germ cell-like cells recapitulates an epigenetic blank slate. Ohta H, Kurimoto K, Okamoto I, Nakamura T, Yabuta Y, Miyauchi H, Yamamoto T, Okuno Y, Hagiwara M, Shirane K, Sasaki H, Saitou M, *EMBO J*, in press.
- 3 Clonal Variation of Human Induced Pluripotent Stem Cells for Induction into the Germ Cell Fate. Yokobayashi S, Okita K, Nakagawa M, Nakamura T, Yabuta Y, Yamamoto T, Saitou M, *Biol Reprod*, in press.
- 4 The Src/c-Abl pathway is a potential therapeutic target in amyotrophic lateral sclerosis. Imamura K, Izumi Y, Watanabe A, Tsukita K, Woltjen K, Yamamoto T, Hotta A, Kondo T, Kitaoka S, Ohta A, Tanaka A, Watanabe D, Morita M, Takuma H, Tamaoka A, Kunath T, Wray S, Furuya H, Era T, Makioka K, Okamoto K, Fujisawa T, Nishitoh H, Homma K, Ichijo H, Julien J-P, Obata N, Hosokawa M, Akiyama H, Kaneko S, Ayaki T, Ito H, Kaji R, Takahashi R, Yamanaka S, Inoue H, *Science Transl Med* 9, eaaf3962 (2017).
- 5 Hybrid Cellular Metabolism Coordinated by Zic3 and Esrrb Synergistically Enhances Induction of Naive Pluripotency. Sone M, Morone N, Nakamura T, Tanaka A, Okita K, Woltjen K, Nakagawa M, Heuser JE, Yamada Y, Yamanaka S, Yamamoto T, *Cell Metab* 25, 1103-1117 (2017).
- 6 Discrimination of Stem Cell Status after Subjecting Cynomolgus Monkey Pluripotent Stem Cells to Naïve Conversion. Honda A, Kawano Y, Izu H, Chojjookhuu N, Honsho K, Nakamura T, Yabuta Y, Yamamoto T, Takashima Y, Hirose M, Sankai T, Hishikawa Y, Ogura A, Saitou M, *Sci Rep* 7, 45285 (2017).
- 7 Proteasome impairment in neural cells derived from HMSN-P patient iPSCs. Murakami N, Imamura K, Izumi Y, Egawa N, Tsukita K, Enami T, Yamamoto T, Kawarai T, Kaji R, Inoue H, *Mol Brain* 10, 7 (2017).
- 8 Activin A in combination with ERK1/2 MAPK pathway inhibition sustains propagation of mouse embryonic stem cells. Ashida Y, Nakajima-Koyama M, Hirota A, Yamamoto T, Nishida E, *Genes Cells* 22, 189-202 (2017).
- 9 Cellular context-dependent consequences of Apc mutations on gene regulation and cellular behavior. Hashimoto K, Yamada Y, Semi K, Yagi M, Tanaka A, Itakura F, Aoki H, Kunisada T, Woltjen K, Haga H, Sakai Y, Yamamoto T, Yamada Y, *Proc Nat Acad Sci USA* 114, 758-763 (2017).
- 10 Nat1 promotes translation of specific proteins that induce differentiation of mouse embryonic stem cells. Sugiyama H, Takahashi K, Yamamoto T, Iwasaki M, Narita M, Nakamura M, Rand TA, Nakagawa M, Watanabe A, Yamanaka S, *Proc Nat Acad Sci USA* 114, 340-345 (2017).
- 11 In Vitro Derivation and Propagation of Spermatogonial Stem Cell Activity from Mouse Pluripotent Stem Cells. Ishikura Y, Yabuta Y, Ohta H, Hayashi K, Nakamura T, Okamoto I, Yamamoto T, Kurimoto K, Shirane K, Sasaki H, Saitou M, *Cell Rep* 17, 2789-2804 (2016).
- 12 Shifting transcriptional machinery is required for long-term memory maintenance and modification in Drosophila mushroom bodies. Hirano Y, Ihara K, Masuda T, Yamamoto T, Iwata I, Takahashi A, Awata H, Nakamura N, Takakura M, Suzuki Y, Horiuchi J, Okuno H, Saitoe M, *Nat Commun* 7, 13471 (2016).
- 13 The Germ Cell Fate of Cynomolgus Monkeys Is Specified in the Nascent Amnion. Sasaki K, Nakamura T, Okamoto I, Yabuta Y, Iwatani C, Tsuchiya H, Seita Y, Nakamura S, Shiraki N, Takakuwa T, Yamamoto T, Saitou M, *Dev Cell* 39, 169-185 (2016).
- 14 A developmental coordinate of pluripotency among mice, monkeys, and humans. Nakamura T, Okamoto I, Sasaki K, Yabuta Y, Iwatani C, Tsuchiya H, Seita Y, Nakamura S, Yamamoto T, Saitou M, *Nature* 537, 57-62 (2016).
- 15 Identification of MMP1 as a novel risk factor for intracranial aneurysms in ADPKD using iPSC models. Ameku T, Taura D, Sone M, Numata T, Nakamura M, Shiota F, Toyoda T, Matsui S, Araoka T, Yasuno T, Mae S, Kobayashi H, Kondo N, Kitaoka F, Amano N, Arai S, Ichisaka T, Matsuura N, Inoue S, Yamamoto T, Takahashi K, Asaka I, Yamada Y, Ubara Y, Muso E, Fukatsu A, Watanabe A, Sato Y, Nakahata T, Mori Y, Koizumi A, Nakao K, Yamanaka S, Osafune K, *Sci Rep* 6, 30013 (2016).
- 16 An EWS-FLI1-Induced Osteosarcoma Model Unveiled a Crucial Role of Impaired Osteogenic Differentiation on Osteosarcoma Development. Komura S, Semi K, Itakura F, Shibata H, Ohno T, Hotta A, Woltjen K, Yamamoto T, Akiyama H, Yamada Y, *Stem Cell Rep* 6, 592-606 (2016).
- 17 Induction of Pluripotency in Astrocytes through a Neural Stem Cell-Like State. Nakajima-Koyama M, Lee J, Ohta S, Yamamoto T, Nishida E, *J Biol Chem* 290, 31173-31188 (2015).

- 18 Persistent Requirement and Alteration of the Key Targets of PRDM1 During Primordial Germ Cell Development in Mice. Yamashiro C, Hirota T, Kurimoto K, Nakamura T, Yabuta Y, Nagaoka SI, Ohta H, Yamamoto T, Saitou M, *Biol Reprod* 94, 7 (2015).
- 19 Secreted Ephrin Receptor A7 Promotes Somatic Cell Reprogramming by Inducing ERK Activity Reduction. Lee J, Nakajima-Koyama M, Sone M, Koga M, Ebisuya M, Yamamoto T, Nishida, E, *Stem Cell Rep* 5, 480-489 (2015).
- 20 Robust In Vitro Induction of Human Germ Cell Fate from Pluripotent Stem Cells. Sasaki K, Yokobayashi S, Nakamura T, Okamoto I, Yabuta Y, Kurimoto K, Ohta H, Moritoki Y, Iwatani C, Tsuchiya H, Nakamura S, Sekiguchi K, Sakuma T, Yamamoto T, Mori T, Woltjen K, Nakagawa M, Yamamoto T, Takahashi K, Yamanaka S, Saitou M, *Cell Stem Cell* 17, 178-194 (2015).

【公募・横山明彦】

- 1 Transcriptional activation by MLL fusion proteins in leukemogenesis. Yokoyama A, *Exp Hematol* 6, 21-30 (2017).
- 2 TBP loading by AF4 through SL1 is the major rate-limiting step in MLL fusion-dependent transcription. Okuda H, Takahashi S, Takaori-Kondo A, Yokoyama A, *Cell Cycle* 15, 2712-2722 (2016).
- 3 AF4 utilizes the SL1 components of RNAP1 machinery to initiate MLL fusion- and AEP-dependent transcription. Okuda H, Kanai A, Ito S, Matsui H, Yokoyama A, *Nat Commun* 6, 8869 (2015).
- 4 MLL fusion proteins link transcriptional coactivators to previously active CpG-rich promoters. Okuda H, Kawaguchi M, Kanai A, Matsui H, Kawamura T, Inaba T, Kitabayashi I, Yokoyama A, *Nucleic Acids Res* 42, 4241-4256 (2014).

【公募・米澤康滋】

- 1 A Method for Predicting Protein Conformational Pathways by Using Molecular Dynamics Simulations Guided by Difference Distance Matrices. Yonezawa Y, *J Comput Chem* 37, 1139-1146 (2016).
- 2 Development of Massive Multilevel Molecular Dynamics Simulation Program, Platypus (PLATform for dYnamic Protein Unified Simulation), for the Elucidation of Protein Functions. Takano Y, Nakata K, Yonezawa Y, Nakamura H, *J Comput Chem* 37, 1125-1132 (2016).
- 3 Direct Interaction between the Voltage Sensors Produces Cooperative Sustained Deactivation in Voltage-gated H Channel Dimers. Okuda DH, Yonezawa Y, Takano Y, Okamura Y, Fujiwara Y, *J Biol Chem* 291, 5935-5947 (2016).
- 4 Molecular Dynamics Study of the Phosphorylation Effect on the Conformational States of the C-terminal Domain of RNA Polymerase II. Yonezawa Y, *J Phys Chem B* 118, 4471-4478 (2014).

【公募・和田洋一郎】

- 1 Cross-enhancement of ANGPTL4 transcription by HIF1 alpha and PPAR beta/delta is the result of the conformational proximity of two response elements. Inoue T, Kohro T, Tanaka T, Kanki Y, Li G, Poh HM, Mimura I, Kobayashi M, Taguchi A, Maejima T, Suehiro JI, Sugiyama A, Kaneki K, Aruga H, Dong S, Stevens JF, Yamamoto S, Tsutsumi S, Fujita T, Ruan X, Aburatani H, Nangaku M, Ruan Y, Kodama T, Wada Y, *Genome Biol* 15, R63 (2014).
- 2 Direct Evidence for Pitavastatin Induced Chromatin Structure Change in the KLF4 Gene in Endothelial Cells. Maejima T, Inoue T, Kanki Y, Kohro T, Li G, Ohta Y, Kimura H, Kobayashi K, Taguchi A, Tsutsumi S, Iwanari H, Yamamoto S, Aruga H, Dong S, Stevens JF, Poh HM, Yamamoto K, Kawamura T, Mimura I, Suehiro J, Sugiyama A, Kaneki K, Shibata H, Yoshinaka Y, Doi T, Asanuma A, Tanabe T, Tanaka T, Minami T, Hamakubo T, Sakai J, Nozaki N, Aburatani H, Nangaku M, Ruan X, Tanabe H, Ruan T, Ihara S, Endo A, Kodama T, Wada Y, *PLoS One* 9, e96005 (2014).

1.3.2 主な学会発表

【計画1・山口雄輝】

- 1 Zukeran A, Yamamoto J, Yamaguchi Y, How Pol II termination and 3' processing sites are

- precisely determined in higher eukaryotes. 第 39 回日本分子生物学会年会 (招待講演), 2016 年 11 月 30 日~12 月 2 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).
- 山口雄輝, Pol II の転写伸長と運命決定制御のメカニズム. 第 2 回北陸エピジェネティクス研究会 (招待講演), 2015 年 11 月 10 日, 富山大学 (富山県富山市).
 - Yamaguchi Y, Yamamoto J. Regulatory mechanisms for Pol II termination sites and 3' processing pathways in higher eukaryotes. CSHL meeting on Mechanisms of Eukaryotic Transcription, 2015 年 8 月 27 日, コールドスプリングハーバー (アメリカ).
 - Yamaguchi Y, Yamamoto J, Handa H. DSIF and NELF interact with Integrator and participate in 3' processing of snRNA genes: a possible mechanism controlling the fate of Pol II. CSHL meeting on Mechanisms of Eukaryotic Transcription, 2013 年 8 月 27 日~31 日, コールドスプリングハーバー (アメリカ).

【計画 1・田村智彦】

- Tamura T, IRF transcription factors in the development and function of mononuclear phagocytes. The 2017 Japan-NIH joint Symposium. The 2017 Japan-NIH Joint Symposium (招待講演), 2017 年 2 月 16 日, 東北大学星陵オーデトリウム (宮城県仙台市).
- Tamura T, The transcription factor IRF8 and enhancer landscape dynamics in the development of mononuclear phagocytes. 第 78 回日本血液学会学術集会 (招待講演), 2016 年 10 月 13 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).
- Tamura T, Epigenetic regulation of monocyte and dendritic cell development by the transcription factor IRF8. The 24th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages (招待講演), 2016 年 6 月 4 日, ソラシティカンファレンスセンター (東京都千代田区).
- 田村智彦, ミエロイド系細胞の分化と転写因子. 第 77 回日本血液学会学術集会 (招待講演), 2015 年 10 月 18 日, ホテル金沢 (石川県金沢市).
- Tamura T, BCR-ABL inactivates the distal enhancer of the Irf8 gene and represses its expression. 第 76 回日本血液学会学術集会, 2014 年 11 月 1 日, 大阪国際会議場 (大阪府大阪市).
- Tamura T, 転写因子 IRF8 は CML において BCR-ABL による樹状細胞分化不全を救済する. 造血器腫瘍研究会, 2014 年 2 月 7 日, がん研究会がん研究所 (東京都江東区).
- Tamura T, The transcription factor IRF8 in the pathogenesis and therapy of chronic myelogenous leukemia. 第 71 回日本癌学会学術総会 (招待講演), 2012 年 9 月 21 日, ロイトン札幌 (北海道札幌市).

【計画 1・川内潤也】

- 福本悟史, 川内潤也, 北嶋繁孝, Pol II 脱リン酸化酵素 FCP1 の p53 を介した細胞増殖における役割. 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 25 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).
- 安川孝史, 村岡拓也, 筒井文, 佐藤チエリ, 佐藤滋生, 川内潤也, 井上充, 北嶋繁孝, RC Conaway, JW Conaway, 麻生悌二郎, 感覚神経系の発生・分化における Elongin A の標的遺伝子の同定. 第 87 回日本生化学会大会, 2014 年 10 月 16 日, 国立京都国際会館 (京都府京都市).
- 井上充, 藤沢晃久, 枝川真, 川内潤也, 関根茂樹, 北嶋繁孝, p53 存在下での ATF3 の機能. 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 3 日, 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市).
- 福本悟史, 高屋俊輔, 小高愛未, 川内潤也, 北嶋繁孝, Pol II CTD 脱リン酸化酵素 FCP1 の DNA Damage Response における役割. 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 3 日, 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市).

【計画 1・高橋秀尚】

- 高橋秀尚, 畠山鎮次, Regulation of transcription termination by human Mediator complex. 第 39 回日本分子生物学会年会 (招待講演), 2016 年 11 月 30 日~12 月 2 日, パシフィコ横浜

(神奈川県横浜市).

- 2 高橋秀尚, 畠山鎮次, メディエーター複合体による転写制御機構. 第 89 回日本生化学会大会, 2016 年 9 月 25 日~27 日, 東北大学川内キャンパス (宮城県仙台市).
- 3 Takahashi H, Conaway JW, Conaway RC, Hatakeyama S, Role of human Mediator subunit Med26 in transcription elongation. 第 38 回日本分子生物学会年会 (招待講演), 2015 年 12 月 1 日~4 日, 神戸ポートピアホテル (兵庫県神戸市).
- 4 高橋秀尚, 畠山鎮次, Med26 は Little elongation complex をリクルートすることで small nuclear RNA 遺伝子の発現を制御する. 第 17 回日本 RNA 学会年会 (招待講演), 2015 年 7 月 15 日~17 日, ホテルライフオーポート札幌 (北海道札幌市).

【計画 2・伊藤敬】

- 1 伊藤敬, ヒストン H2A T120 のリン酸化はサイクリン D1 発現促進により癌化を引き起こす. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 11 月 30 日~12 月 2 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).
- 2 土井口真康, 中川武弥, 伊藤敬, SMARCD1 は ATP 依存的なクロマチンリモデリング因子で CBP によるヒストンアセチル化を刺激し転写を亢進する. 第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会大会合同大会, 2015 年 12 月 1 日~4 日, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市).
- 3 Mizusaki H, Aihara H, Ito T, Histone H2A Thr 120 phosphorylation results in cancer via up regulation of Cyclin D1. 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 25 日~27 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).
- 4 Mizusaki H, Aihara H, Ito T, Histone H2A Thr 120 phosphorylation results in cancer via up regulation of Cyclin D1. CSHL meeting on Epigenetics and Chromatin, 2014 年 9 月 9 日~13 日, コールドスプリングハーバー (アメリカ).
- 5 Aihara H, Mizusaki H, Nakagawa T, Ito T, Histone H2A mutation might play roles in carcinogenesis. CSHL meeting on Epigenetics and Chromatin, 2014 年 9 月 9 日~13 日, コールドスプリングハーバー (アメリカ).
- 6 Ito T, ATP-Dependent stimulator of nucleosomal histone acetylation (ASNA) plays a role in transcriptional regulation together with CBP/p300. 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 3 日~6 日, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市).

【計画 2・大熊芳明、廣瀬豊】

- 1 Ohkuma Y, Nakamura T, Akimoto Y, Fukuoka M, Sogawa K, Hirose Y, Tanaka A, Dynamic Switch Mechanism of RNA polymerase II by general transcription factor TFIIE from transcription initiation to the transition step from initiation to elongation. 第 39 回日本分子生物学会, 2016 年 11 月 30 日~12 月 2 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).
- 2 中村考秀, 田中亜紀, 福岡瑞希, 廣瀬豊, 大熊芳明, 基本転写因子 TFIIE による転写開始から伸長への移行の制御機構解析. 第 39 回日本分子生物学会, 2016 年 11 月 30 日~12 月 2 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).
- 3 杉田愛, 柳澤奈月, 石黒尋保, 田淵圭章, 大熊芳明, 廣瀬豊, リン酸化 CTD 結合因子 PCIF1 による遺伝子発現調節機構. 第 39 回日本分子生物学会, 2016 年 11 月 30 日~12 月 2 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).
- 4 藤田智陽, 安倍光姫, 山崎愛実, 深澤力也, 廣瀬豊, 大熊芳明, ヒトメディエーター複合体 Kinase モジュール構成サブユニット CDK8/19 の新規結合因子の同定. 第 39 回日本分子生物学会, 2016 年 11 月 30 日~12 月 2 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).
- 5 林裕人, 深澤力也, 田中亜紀, 廣瀬豊, 大熊芳明, メディエーター複合体と神経細胞分化の関係. 第 89 回日本生化学会大会, 2016 年 9 月 25 日~27 日, 仙台国際センター (宮城県仙台市).

【計画 3・高橋陽介】

- 1 Fukazawa J, Ito T, Takahashi Y, DELLA-GAF1/IDD2 complex regulates gibberellin

- homeostasis and signaling. 22nd International Plant Growth Substances Association Conference, 2016年6月21日～25日, トロント (カナダ).
- 2 勝部隆義, 伊藤岳, 深澤壽太郎, 高橋陽介, GAF1 複合体による GA 生合成酵素遺伝子の転写抑制機構の解析. 第73回中国四国植物学会, 2016年5月14日, 米子コンベンションセンター (鳥取県米子市).
 - 3 Fukazawa J, Fujiki T, Mori M, Miyamoto C, Mishima Y, Kamiya Y, Yamaguchi S, Takahashi Y, GAF1, a DELLA interacting protein, regulates gibberellin homeostasis and signaling. 25th International Conference on Arabidopsis Research, 2014年7月28日～8月1日, バンクーバー (カナダ).
 - 4 Ito T., Nakata M., Fukazawa J., Ishida S, Takahashi Y, Scaffold function of Ca²⁺-dependent protein kinase: NtCDPK1 transfers 14-3-3 to the substrate RSG after phosphorylation. Plant Biology 2014, 2014年7月12日～16日, ポートランド (アメリカ).
 - 5 Fukazawa J, Fujiki T, Mori M, Miyamoto C, Kamiya Y, Yamaguchi S, Takahashi Y, GAF1, a DELLA interacting protein, regulates gibberellin homeostasis and signaling in arabidopsis. 21th International Plant Growth Substances Association Conference, 2013年6月21日, 上海 (中国).

【計画4・緒方一博】

- 1 Shiina M, Baba S, Uchiyama A, Okada C, Tanaka T, Ikeda K, Kawakita S, Matsuzaki T, Komatsu H, Hosoda M, Ogata K, Search for anti-leukemic drugs targeting the transcription factor Runx1 by INTENDD. The 137th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, 3rd International Symposium for Medicinal Sciences (招待講演), 2017年3月24日～25日, 東北大学川内北キャンパス (宮城県仙台市).
- 2 Ogata K, Shiina M, Kasahara K, Higo J, Hamada K, Nakamura H, Molecular behavior of a higher-order complex of multiple transcription factors on enhancer site upon phosphorylation. 6th International Conference on Structural Biology (招待講演), 2016年8月22日～23日, ニューオーリンズ (アメリカ).
- 3 Ogata K, Shiina M, Kasahara K, Higo J, Hamada K, Nakamura H, Molecular mechanism for modulation of a multiple transcription factor complex formed on enhancer site up on phosphorylation. 5th International Conference and Exhibition on Metabolomics (招待講演), 2016年5月16日～18日, ハイアットリージェンシー大阪 (大阪府住之江区).
- 4 椎名政昭, 浜田恵輔, 井上豊後泰子, 嶋村麻利子, 馬場しほ, 内山晃子, 鈴木香絵, タヒロフ タヒール, 緒方一博, Regulation of DNA binding of Ets1 by phosphorylation in an intrinsic disordered region. 第14回日本蛋白質科学会年会 (招待講演), 2014年6月25日～27日, ワークピア横浜 (神奈川県横浜市).
- 5 Shiina M, DNA-mediated allosteric regulation in a complex of multiple transcription factors with DNA. 4th International Symposium on Diffraction Structural Biology (招待講演), 2013年5月28日, 名古屋市中小企業振興会館 (愛知県名古屋市).

【計画5・十川久美子】

- 1 Sakata-Sogawa K, Ito Y, Tokunaga M, Integrated imaging approach of transcription regulatory proteins in living cells. UK/RoI-Japan Symposium on frontier technologies: from single molecules to cells and tissues (招待講演), 2016年7月4日～5日, レスター (イギリス).
- 2 十川久美子, 1分子顕微鏡で観る免疫細胞活性化の初期過程, 宇都宮大学オプトバイオシンポジウム (招待講演), 2015年12月21日, 宇都宮大学 (栃木県宇都宮市).
- 3 十川久美子, 伊藤由馬, 深川暁宏, 原田昌彦, 木村宏, 徳永万喜洋, Integrated imaging approach to the study of dynamics of chromatin. 第52回日本生物物理学会年会 (招待講演), 2014年9月25日～27日, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市).
- 4 Ito Y, Inaba N, Harata M, Kimura H, Tokunaga M, Sakata-Sogawa K, Quantitative imaging

analysis of molecular dynamics of actin-related protein in the nucleus. 58th Annual Meeting of Biophysical Society (USA), 2014年2月15日～19日, サンフランシスコ (アメリカ).

- 5 十川久美子, 徳永万喜洋, Quantitative analysis of single molecule imaging of physicochemical field for genetic activities. 第50回日本生物物理学会年会 (招待講演), 2012年9月22日～24日, 名古屋大学 (愛知県名古屋市).

【計画6・松本直通】

- 1 Matsumoto N, Rare variants in human diseases, The 2016 Annual Meeting of The Chinese Society of Medical Genetics (CSMG) (基調講演), 2016年11月6日, 杭州 (中国).
- 2 Matsumoto N, Somatic mutation in Sturge Weber syndrome, The 11th Asian & Oceanian Epilepsy Congress (AOEC) (招待講演), 2016年5月16日, 香港 (中国).
- 3 Matsumoto N, Next Generation Sequencing Dissecting Human Genetic Diseases, International Congress of Human Genetics 2016 (ICHG2016) (招待講演), 2016年4月6日, 京都国際会館 (京都府京都市).
- 4 Matsumoto N, Next Generation Sequencing Dissecting Human “Genetic” Diseases, The VI Croatian Congress of Human Genetics (招待講演), 2015年11月6日, スプリト (クロアチア).
- 5 Matsumoto N, Medelian exome, The 12th annual meeting of East Asian Union of Human Genetics Societies, 2012年11月29日, ソウル (韓国).
- 6 Matsumoto N, Exome sequencing in mendelian disorders, Translational Genomics Conference 2012 (基調講演), 2012年10月13日, チェジュ (韓国).

【計画6・三宅紀子】

- 1 Miyake N, Tsurusaki Y, Koshimizu E, Niikawa N, Matsumoto N, Clinical and genetic analysis of Wiedemann–Steiner syndrome caused by KMT2A mutations, American Society of Human Genetics 2015 Annual Meeting, 2015年10月9日, ボルチモア (アメリカ).
- 2 Miyake N, Koshimizu E, Matsumoto N, Niikawa N, Clinical comparison of Kabuki syndrome with KMT2D and KDM6A mutations, American Society of Human Genetics 2014 Annual Meeting, 2014年10月20日, サンディエゴ (アメリカ).
- 3 Miyake N, Koshimizu E, Matsumoto N, Niikawa N, KMT2D and KDM6A mutations in patients with Kabuki syndrome, European Human Genetics Conference 2014, 2014年5月31日～6月3日, ミラノ (イタリア).
- 4 Miyake N, Mutations of histone modification genes in Kabuki syndrome, The 13th Annual Meeting of East Asian Union of Human Genetics Societies in conjunction with the 9th National Congress of Genetics Society of China, 2013年9月20日, ハルビン (中国).
- 5 Miyake N, NGS application for rare congenital diseases. 7th International Symposium of Rare Diseases, 2013年8月23日, ソウル (韓国).

【計画7・中村春木】

- 1 Nakamura H, Computational approaches to coupled folding and binding in protein-protein interactions. 11th International Symposium of the Protein Society of Thailand (Keynote Lecture, 招待講演), 2016年8月3日, バンコク (タイ).
- 2 Nakamura H, Computational approaches to coupled folding and binding in protein-protein interactions. 21st Biophysics Conference (Plenary Lecture, 招待講演), 2016年5月21日, National Tsing Hua University (台湾).
- 3 Nakamura H, Computational approaches to coupled folding and binding in protein-protein interactions. 19th Korean Peptide Protein Symposium (Plenary Lecture, 招待講演), 2015年7月7日, Resom Ocean Castle Resort (韓国).
- 4 Nakamura H, Prediction of protein-protein and protein-ligand interactions, and application

- to drug discovery. The 9th Asian Biophysics Association Symposium (招待講演), 2015年5月10日, 杭州 (中国).
- 5 Nakamura H, A new non-Ewald scheme for molecular dynamics simulation and its application to a free energy landscape for protein-protein interaction, 2nd International Conference on Computational Science and Engineering (招待講演), 2014年8月23日, ホーチミン (ベトナム).
 - 6 Nakamura H, New non-ewald scheme for molecular dynamics simulation and application to free energy calculation. Bioinformatics in Torun 2014 (招待講演), 2014年6月12日, トルン (ポーランド).
 - 7 Nakamura H, New approach to electrostatic properties of proteins and protein-protein interactions, The 4th Asia Pacific Protein Association (基調講演), 2014年5月18日, チェジュ (韓国).
 - 8 中村春木, ゲノム情報 (1D) から蛋白質の動的構造情報 (4D) へ. 日本学術会議公開シンポジウム (招待講演), 2013年9月17日, 日本学術会議講堂 (東京都港区).
 - 9 Nakamura H, Prediction of protein-protein complex structures. International Conference on Biomolecular Forms and Functions (招待講演), 2013年1月10日, バンガロール (インド).

【計画7・藤井聡】

- 1 藤井聡, プール型 shRNA シークエンス (shRNA-seq) スクリーニングデータ解析法の開発. NGS 現場の会第4回研究会 (招待講演), 2015年7月1日~3日, つくば国際会議場 (茨城県つくば市).
- 2 飯田緑, 館野峻平, 山口雄輝, 藤井聡, Collecta 社製プール型レンチウイルス shRNA ライブラリーを用いたスクリーニングデータの解析法の開発, 第3回生命医薬情報学連合大会 (IIBMP2014), 2014年10月, 仙台国際センター (宮城県仙台市).
- 3 Iida M, Fujii S, Uchida M, Nakamura H, Kagami Y, Bak SM, Kim EY, Shima Y, Iwata H, Transcriptome Analysis of Red Seabream (*Pagrus major*) Embryos Treated with 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD). Society of Toxicology, 2014年3月23日~27日, アリゾナ (アメリカ).
- 4 Yamasaki S, Terada T, Kono H, Shimizu K, Sarai A, A New method for evaluating the specificity of indirect readout in protein-DNA recognition. European Conference on Computational Biology, 2012年9月9日~12日, バーゼル (スイス).

【公募・秋光信佳】

- 1 秋光信佳, 核内長鎖ノンコーディング RNA の分解制御を通じた病原体抵抗機構, 第34回染色体ワークショップ・第15回核ダイナミクス研究会, 2017年1月11日~13日, かずさ DNA 研究所 (千葉県木更津市).
- 2 秋光信佳, 転写後制御を通じた病原体-宿主の攻防戦略, 第39回日本分子生物学会年会シンポジウム, 2016年11月30日~12月2日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).
- 3 秋光信佳, 病原体と戦うノンコーディング RNA, 国立医薬品食品衛生研究所セミナー (招待講演), 2016年10月26日, 国立医薬品食品衛生研究所 (東京都世田谷区).
- 4 秋光信佳, RNA 分解制御を通じた核内長鎖ノンコーディング RNA の発現制御と病原体抵抗機構, 第89回日本生化学会大会 (招待講演), 2016年9月25日~27日, 仙台国際センター (宮城県仙台市).
- 5 秋光信佳, ストレスに応答した RNA 分解制御に関する研究, 第10回臨床ストレス 応答学会大会ランチョンセミナー (招待講演), 2015年11月6日~7日, 東京農工大 (東京都府中市).

【公募・井手聖】

- 1 井手聖, 前島一博, 核小体クロマチンの動態と形態, 遺伝研研究会, 2016年10月28日, 国立遺伝学研究所 (静岡県三島市).

- 2 Ide S, Dejardin J, A method to dissect protein composition on regulatory DNA sequence and the future, 第 38 回日本分子生物学会年会, 2015 年 12 月 1 日~4 日, 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市).
- 3 Ide S, Dejardin J, Transcription regulation of mammalian ribosomal RNA gene revealed by proteomic analysis for local chromatin configuration, International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function, 2015 年 8 月 23 日~26 日, 淡路夢舞台 (兵庫県淡路市).

【公募・伊藤寿朗】

- 1 伊藤寿朗, Bio-timer controlling terminal differentiation of floral stem cells. International Plant Meeting in Kyoto 2016 (招待講演), 2016 年 11 月 25 日, 京都産業大学 (京都府京都市).
- 2 伊藤寿朗, 花幹細胞の終末分化における細胞周期制御, 基生研研究会「細胞分化を誘導する細胞周期制御システム」(招待講演), 2016 年 11 月 21 日~22 日, 基礎生物学研究所 (愛知県岡崎市).
- 3 伊藤寿朗, Multi-step termination of floral stem cells in Arabidopsis. RIKEN CSRS Yokohama Seminar Series (招待講演), 2016 年 10 月 17 日, 理化学研究所 (神奈川県横浜市).
- 4 伊藤寿朗, 花はどうして儂いのか?. 長浜バイオ大学特別セミナー (招待講演), 2016 年 7 月 26 日~27 日, 長浜バイオ大学 (滋賀県長浜市).
- 5 伊藤寿朗, Epigenetic-mediated heat response in Arabidopsis. ICAR2016KOREA (招待講演), 2016 年 6 月 30 日, 慶州 (韓国).

【公募・井上康志】

- 1 Somekawa K, Ishitobi H, Inouye Y, Single molecule FRET combined with defocus imaging. 第 75 回応用物理学会秋季学術講演会, 2014 年 09 月 17 日~20 日, 北海道大学 (北海道札幌市).
- 2 Huang X, Ishitobi H, Inouye Y, Polymer ligand protected fluorescent platinum nanoclusters and their application. International Symposium on Small Particles and Inorganic Clusters, 2014 年 09 月 7 日~12 日, 九州大学 (福岡県福岡市).
- 3 Morimura H, Oki M, Ishitobi H, Inouye Y, Optical nano-investigation of DNA conformation change induced by transcription factors. UK-Japan workshop on Nanophotonics, Metamaterials and Plasmonics, 2014 年 03 月 14 日, 大阪大学フォトニクスセンター (大阪府吹田市).
- 4 Oki M, Morimura H, Ishitobi H, Inouye Y, Plasmonic nanodimers for investigation of DNA conformation change induced by transcription factors. Japan Taiwan Bilateral Conference on Biomedical and Plasmonic Imaging, 2014 年 2 月 25 日~26 日, 台北 (台湾).
- 5 Morimura H, Ishitobi H, Inouye Y, Real-time observation of DNA conformation change using plasmonic nanodimers. International Workshop on Atomically Controlled Fabrication Technology, 2014 年 2 月 5 日~6 日, 大阪大学中之島センター (大阪府大阪市).

【公募・浦聖恵】

- 1 樫尾牧子、横田貴文、藤木亮次、杉尾ジュリー、鈴木慈、前田亮、岩間厚志、浦聖恵、メチル化転移酵素 Nsd2 の DNA 損傷修復機能の解明, 第 34 回染色体ワークショップ・第 15 回核ダイナミクス研究会, 2017 年 1 月 13 日, かずさ DNA 研究所 (千葉県木更津市).
- 2 Ura K, Histone H3 lysine 36 methyltransferase controls the programmed DNA-damage response, Gordon Research Conference, Chromatin Structure and Function, 2016 年 5 月 22 日~28 日, レ・ディアブルレ (スイス).
- 3 鈴木慈、前田亮、樫尾牧子、杉尾ジュリー、足立典隆、岩間厚志、浦聖恵、ヒストン転写領域のゲノム維持を担う H3K36 メチル化酵素を介したゲノム維持機構転写領域のゲノム維持を担う, 第 10 回日本エピジェネティクス研究会, 2016 年 5 月 19 日, 千里ライフサイエンスセンター (大阪府吹田市).
- 4 浦聖恵、鈴木慈、杉尾ジュリー、樫尾牧子、プログラムされた DNA 損傷修復を担う H3K36 メ

チル化酵素, 第 33 回染色体ワークショップ・第 14 回核ダイナミクス研究会, 2016 年 1 月 12 日, 松島一の坊 (宮城県松島).

- 5 Ura K, Histone H3 lysine 36 methyltransferase controls the programmed DNA-damage response, The 5th Meeting of the Asian Forum of Chromosome and Chromatin Biology (招待講演), 2015 年 1 月 15 日~18 日, バンガロール (インド).

【公募・太田力】

- 1 板坂大輔、渡邊博太郎、大野麻美子、村上康文、太田力, 転写因子 Nrf2 の転写制御機構の解明, 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 25 日~27 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).
- 2 渡邊博太郎, 大野 (宮本) 麻美子, 田中佑, 渡邊俊樹, 太田力, 転写因子 Nrf2 の転写活性化機構の解明, 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 25 日~27 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).

【公募・大野欽司】

- 1 大野欽司, 増田章男, CLIP-seq, RNA-seq, exon array, ChIP-seq, CAGE-seq の統合的解析による RNA 結合タンパクの機能解明. 第 36 回日本分子生物学会年会 (招待講演), 2013 年 12 月 3 日~6 日, 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市).
- 2 Ohno K, RNA diseases caused by defects in cis-acting elements and trans-acting factors. Danish-Japanese joint seminar on aberrant RNA splicing in neuromuscular disease (招待講演), 2013 年 3 月 7 日, University of Southern Denmark (デンマーク).

【公募・黒柳秀人】

- 1 Kuroyanagi H, "Non-coding mRNAs" from protein-coding genes through alternative pre-mRNA splicing, 19th Tokyo RNA Club, 2016 年 4 月 12 日, 東京大学浅野キャンパス (東京都文京区).
- 2 Kuroyanagi H, RBFOX and SUP-12 cooperatively regulate muscle-specific alternative splicing to determine ligand-binding specificity of FGF receptors in *C. elegans*, 理研シンポジウム「Noncoding RNA Regulation」, 2014 年 10 月 1 日, 理化学研究所和光キャンパス (埼玉県和光市).
- 3 Kuroyanagi H, Cooperative regulation of tissue-specific alternative splicing by multiple splicing factors determines ligand-binding specificity of FGF receptors. The 9th International Symposium of the Institute Network, 2014 年 6 月 19 日, 大阪大学 (大阪府吹田市).
- 4 Kuroyanagi H, Togo M, Watanabe Y, Hoshina M, Suzuki Y, Hagiwara M, Multi-domain protein LST-3 regulates pre-mRNA transcription and alternative splicing in *C. elegans*, CSHL meeting on Eukaryotic mRNA Processing, 2013 年 8 月 20 日~24 日, コールドスプリングハーバー (アメリカ).

【公募・古久保哲朗】

- 1 岩見亮, 大山良文, 高井直樹, 古久保哲朗, 出芽酵母において gal2 変異とミトコンドリア機能阻害が誘起するガラクトース培地特異的な生育阻害効果. 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 26 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).
- 2 渡邊清, 矢部誠, 古久保哲朗, ハイスループット型レポーターシステムを用いた出芽酵母由来の新規コアプロモーターエレメントの同定及びその機能解析. 第 14 回日本蛋白質科学会年会, 2014 年 6 月 27 日, 横浜産貿ホール (神奈川県横浜市).
- 3 東野綺子, 雲財悟, 中山理紗, 土屋奈穂, 吉川博文, 古久保哲朗, 笠原浩司, リボソーム構成因子の発現調節に関わる酵母 Hmo1 タンパク質の DNA 結合機構. 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 4 日, ポートピアホテル (兵庫県神戸市).

- 4 矢部誠, 大山良文, 高井直樹, 古久保哲朗, 出芽酵母におけるTFIIDを介したGAL遺伝子群の脱抑制機構. 第36回日本分子生物学会年会, 2013年12月3日, ポートピアホテル (兵庫県神戸市).

【公募・佐藤政充】

- 1 露崎隼, 岡田直幸, 佐藤政充, 分裂酵母のシングルセル発現解析を用いた細胞周期開始機構の解明, 産総研・早大 生体システムビッグデータ解析オープンイノベーションラボラトリ 平成 28 年度成果報告会, 2017 年 3 月, 東京都中央区.
- 2 Tsuyuzaki H, Okada N, Sato M, Elucidation of the cell cycle initiation mechanism with the single cell transcriptome of fission yeast. International Conference on Single Cell Research 2016, 2016 年 11 月, 東京大学伊藤国際学術研究センター (東京都文京区).
- 3 露崎隼, 岡田直幸, 佐藤政充, 分裂酵母のシングルセル転写プロファイル解析, 第 33 回 染色体ワークショップ・第 14 回 核ダイナミクス研究会, 2016 年 1 月, 松島一の坊 (宮城県宮城郡).

【公募・佐藤ゆたか】

- 1 池田達郎, 佐藤ゆたか, ホヤ初期胚における遺伝子発現と細胞分裂の同期機構の解析. 日本動物学会第 85 回大会, 2014 年 9 月 11~13 日, 東北大学川内北キャンパス (宮城県仙台市).
- 2 小田いずみ, 佐藤ゆたか, Tcf は β -catenin, Macho1 および GATAa と相互作用し, 胚の最初のパターン形成を行う. 日本動物学会第 85 回大会, 2014 年 9 月 11 日~13 日, 東北大学川内北キャンパス (宮城県仙台市).
- 3 佐藤ゆたか, ホヤの背腹の境界をつくるための DNA ループによる転写調節. 日本遺伝学会 85 回大会, 2013 年 9 月 19 日, 慶應義塾大学 (神奈川県横浜市).
- 4 今井薫, 佐藤ゆたか, A genomewide survey identified a novel BMP antagonist Pinhead, and a novel cis-regulatory transcriptional repression mechanism. 日本生化学会第 86 回大会, 2013 年 9 月 12 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).
- 5 今井薫, 大道裕, 日下部岳広, 佐藤ゆたか, Identification and transcriptional regulation of a gene encoding a novel BMP-antagonist Pinhead. 7th Tunicate Meeting, 2013 年 7 月 23 日, ナポリ (イタリア).

【公募・高田彰二】

- 1 Takada S, Coarse-Grained Molecular Dynamics Simulations for Giant Protein-DNA complexes. The American Physical Society March Meeting (招待講演), 2017 年 3 月 ニューオーリンズ (アメリカ).
- 2 Takada S, Multiscale Modeling of Flexible Biomolecular Complex. International Conference of Molecular Simulations (招待講演), 2016 年 10 月, 上海 (中国).
- 3 Takada S, IDP in protein-DNA interactions studied by coarse-grained simulations. Intrinsically Disordered Proteins-Bringing together Physics, Computation and Biology (招待講演), 2015 年 8 月 21 日, チューリッヒ (スイス).
- 4 Takada S, Coarse-grained modeling of protein-DNA complexes. The Workshop: Coarse-Graining as a Frontier of Statistical Mechanics (招待講演), 2014 年 6 月, サンタフェ (アメリカ).
- 5 Takada S, Functional dynamics of disordered regions in multi-domain proteins. Gordon Research Conference "Protein Folding Dynamics" (招待講演), 2014 年 1 月, ガルベストーン (アメリカ).

【公募・高畑信也】

- 1 Takahata S, Suzuki S, Ohnuma A, Chida S, Murakami Y, HP1 and FACT cooperatively regulate global gene expression. The International Conference on Transcription Cycle 2016 (招待講演), 2016 年 12 月 3 日, 東京大学小柴ホール (東京都文京区).

- 2 高畑信也, 鈴木詔大, 村上洋太, H3K9me 非依存的に働く HP1/Swi6 の解析. 転写サイクル班会議, 2016年9月5日~6日, 松島一の坊 (宮城県宮城郡).
- 3 高畑信也, 大沼葵, 村上洋太, ヘテロクロマチンタンパク質 HP1 と結合する FACT の相互作用領域の解析. 第38回日本分子生物学会, 2015年12月1日~4日, 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市).
- 4 Takahata S, Chida S, Murakami Y, Roles of FACT for heterochromatin regulation in fission yeast. The 40th Naito Conference Epigenetics, 2015年9月15日~18日, シャトレーゼガトーキングダム (北海道札幌市).
- 5 Takahata S, Chida S, Murakami Y, Roles of FACT for heterochromatin regulation in fission yeast. The 8th International Fission Yeast Meeting, 2015年6月21日~26日, 生田神社 (兵庫県神戸市).

【公募・原田昌彦】

- 1 原田昌彦, クロマチンおよび細胞核の構造による遺伝子発現の階層的制御. 第89回日本生化学会大会 (招待講演), 2016年9月25日~27日, 東北大学川内キャンパス (宮城県仙台市).
- 2 Harata M, Modulating gene functions for immunity and susceptibility to diseases: Towards epigenetic control of innate immunity. Lorentz Center Workshop (招待講演), 2016年9月19日~23日, Leiden University (オランダ).
- 3 Harata M, H2A.Z and actin family proteins in functional chromatin organization. Colorado Chromatin Meeting (招待講演), 2016年8月8日, Colorado State University (アメリカ).
- 4 Harata M, Roles of actin family proteins in chromatin and nuclear organization. 24th Wilhelm Bernhard Workshop on the Cell Nucleus and 57th Symposium of the Society for Histochemistry, 2015年8月17日~22日, Schloss Wilhelminenberg (オーストリア).
- 5 原田昌彦, アクチンファミリーによる細胞核・クロマチンの機能構造形成. 第86回日本生化学会大会シンポジウム「細胞核内構造体の構築原理と高次生命機能」(招待講演), 2013年9月11日, 京都国際会議場 (京都府京都市).

【公募・坂東優篤】

- 1 Bando M, Akiyama K, Nakato R, Shirahige K, Cohesin loader regulates transition from to elongation of RNA PolIII. CSHL meeting on Epigenetics and chromatin, 2016年9月13日~17日, コールドスプリングハーバー (アメリカ).
- 2 坂東優篤, コヒーシンによる転写伸長反応の制御. 第68回日本細胞生物学会大会, 2014年6月14日~17日, 京都テルサ (京都府京都市).
- 3 Bando M, Nakato R, Akiyama K, Tanaka T, Kato Y, Shirahige K, The role of cohesin and cohesin loader in transcriptional regulation. EMBO workshop "SMC protein", 2015年5月12日~15日, Research Institute of Molecular Pathology (オーストリア).

【公募・平田章】

- 1 Mohan N, Kasahara K, Hirata A, Nakamura H, Insights derived from molecular dynamics simulations into the subunit assembly and clamp motions of thermococcus kodakarensis RNA polymerase. 第16回日本蛋白質科学会年会, 2016年6月7日~9日, 福岡国際会議場 (福岡県福岡市).
- 2 Hirata A, Jun SH, Kanai T, Santangelo TJ, Imanaka T, Murakami KS, X-ray crystal structure of euryarchaeal RNA polymerase (RNAP) from a hyperthermophilic archaeon Thermococcus kodakarensis: Insights into the molecular evolution of the archaeal/eukaryotic RNAP and molecular mechanism underlying the clamp-open state in the presence of the stalk. Thermophiles 2015, 2015年8月30日~9月4日, University of Santiago (チリ).

- 3 平田章, ユーリアーキア RNA ポリメラーゼの X 線結晶構造から視えた真核生物 RNA ポリメラーゼ II 構造の進化 第 37 回日本分子生物学会年会 (招待講演), 2014 年 11 月 25 日~27 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).
- 4 平田章, アーキアの RNA 合成・編集加工を担う分子装置の構造基盤の解明. 第 15 回極限環境生物学会 (招待講演), 2014 年 11 月 1 日~3 日, 今帰仁村コミュニティーセンター (沖縄県国頭郡).
- 5 平田章, Jun SH, 金井保, Santangelo TJ, 今中忠行, 村上勝彦, 超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* RNA polymerase の X 線結晶構造. 第 27 回日本 Archaea 研究会, 2014 年 7 月 25 日~26 日, 立命館大学びわこ・くさつキャンパス エポック立命 21 エポックホール (滋賀県草津市).

【公募・藤井穂高】

- 1 Fujii H, Biochemical analysis of genome functions using locus-specific chromatin immunoprecipitation technologies: iChIP and enChIP. The International Conference on Transcription Cycle 2016, 2016 年 12 月 3 日, 東京大学理学部小柴ホール (東京都文京区).
- 2 Fujii H, Locus-specific biochemical analysis of genome functions using enChIP: an application of CRISPR/Cas and TAL to purification of specific genomic regions. TGE2015 Conference on Transposition and Genome Engineering 2015, 2015 年 11 月 17 日, 奈良春日野国際フォーラム (奈良県奈良市).
- 3 Fujita T, Fujii H, Locus-specific biochemical analysis of genome functions using enChIP: an application of CRISPR/Cas and TAL to purification of specific genomic regions. FASEB Science Research Conference "Transcription, Chromatin, and Epigenetics", 2015 年 6 月 28 日~7 月 3 日, ウエストパームビーチ (アメリカ).
- 4 藤田敏次, 藤井穂高, Capturing chromatin: biochemical analysis of genome functions using the locus-specific chromatin immunoprecipitation technologies. 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 26 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).
- 5 藤井穂高, Engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP) 法による特定ゲノム領域の単離と結合分子の同定. 第 4 回ゲノム編集研究会, 2014 年 10 月 7 日, 広島国際会議場 (広島県広島市).
- 6 Fujii H, Biochemical analysis of lymphocyte lineage commitment using the locus-specific chromatin immunoprecipitation technologies (iChIP and enChIP). 2nd International Molecular Immunology & Immunogenetics Congress, 2014 年 4 月 27 日~30 日, アンタルヤ (トルコ).

【公募・別所康全】

- 1 Bessho Y, Dynamics of cellular behavior during zebrafish development. KRIPIK-SciFiMaS 2016 International Conference (招待講演), 2016 年 5 月 26 日, Jenderal Soedirman University (インドネシア).
- 2 Ishikawa H, Yamada S, Iino T, Bessho Y, Hosokawa Y, Matsui T, Organ size regulation Zebrafish laterality organ. CDB Symposium 2016, 2016 年 3 月 28 日, 理化学研究所多細胞システム形成研究センター (兵庫県神戸市).
- 3 山田壮平, 別所康全, 細川陽一郎, 松井貴輝, 弾性性質を利用した創傷治癒機構の解明. 第 5 回細胞競合コロキウム, 2016 年 3 月 18 日, 北海道大学医学部学友会館フラテ (北海道札幌市).
- 4 Yamada S, Iino T, Bessho Y, Hosokawa Y, Matsui T, Mechanical property of epithelial cells affects speed of wound healing. 1st International Symposium on Cell Competition. 2015 年 9 月 10 日, 京都大学芝蘭会館 (京都府京都市).
- 5 Bessho Y, The mechanism of the biological clock that controls animal development. The 4th International Conference on Pharmacy and Advanced Pharmaceutical Sciences (招待講演), 2015 年 9 月 8 日, Sheraton Mustika Yogyakarta Resort and Spa Hotel (インドネシア).

【公募・前川利男】

- 1 吉田圭介, 前川利男, Zhu Y, Guillet CR, Chatton B, 井上健太郎, 内山健, 石橋健一, 山田拓司, 大野尚仁, 白鬚克彦, 岡田眞里子, 石井俊輔, ATF7 はエピジェネティック記憶を通じて、自然免疫記憶を制御する. 第 38 回日本分子生物学会, 2015 年 12 月 1~4 日, 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市).
- 2 Liu B, Maekawa T, Ishii S, TNF-alpha treatment in fathers programs telomere shortening in mouse offspring. 第 38 回日本分子生物学会, 2015 年 12 月 1~4 日, 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市).
- 3 前川利男, Liu B, 吉田圭介, 仲村賢一, 田久保海誉, 石井俊輔, 転写因子 ATF-7 を介したストレスによるテロメアの長さの制御. 第 37 回日本分子生物学会, 2014 年 11 月 25~27 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).
- 4 前川利男, Liu B, 吉田圭介, 仲村賢一, 田久保海誉, 石井俊輔, 転写因子 ATF-7 を介したストレスによるテロメアの長さの制御. 第 36 回日本分子生物学会, 2013 年 12 月 3~6 日, 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市).
- 5 前川利男, 石井俊輔, ストレスによるエピゲノム変化の遺伝. 第 7 回日本エピジェネティクス研究会 (招待講演), 2013 年 5 月 31 日, 奈良県新公会堂 (奈良県奈良市).

【公募・南敬】

- 1 Minami T, Thresholds of Down syndrome critical region (Dscr)-1 expression levels are critical for regulation of proper vessel formation and vascular integrity. 第 89 回日本生化学会大会 (招待講演), 2016 年 10 月 7 日~8 日, 仙台国際センター (宮城県仙台市).
- 2 南敬, ダウン症因子 DSCR-1 の血管機能~両刃の剣~. 日本薬学会シンポジウム, 2016 年 3 月 26 日~29 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).
- 3 Minami T, Genome-wide analysis for endothelial cell activation. Wide Vascular Biology Seminar Series (招待講演), 2016 年 3 月 17 日, Harvard 大学 Folkman Auditorium (アメリカ).
- 4 南敬, VEGF 活性化内皮細胞における動的なエピゲノム転写機構解析. BMB2015, 2015 年 12 月 1 日~4 日, 神戸ポートピアホテル (兵庫県神戸市).
- 5 Minami T, NFAT-related Down syndrome and epigenome factors regulated VEGF-endothelium activation switch in tumor microenvironment. 日本がん学会指定シンポジウム (招待講演), 2015 年 10 月 8 日~10 日, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市).
- 6 Minami T, The Down syndrome critical region (DSCR) gene 1 is critical for the regulation of proper vessel formation and vascular inflammation. 1st International Conference of Trisomy 21 Research Society. (招待講演), 2015 年 7 月 4 日~7 日, パリ (フランス).
- 7 Minami T, The Down syndrome critical region (Dscr) gene-1 is critical for regulation of proper vessel formation and vascular-lipid homeostasis. 6th Molecular Cardiovascular Conference II. 2015 年 9 月 4 日~5 日, ヒルトン福岡シーホーク (福岡県福岡市).

【公募・村上洋太】

- 1 Suzuki S, Shimada A, Takahata S, Murakami Y, H3K36 tri-methylation but not H3K36 di-methylation is required for gene silencing in Schizosaccharomyces pombe. 11th EMBL Conference Transcription and Chromatin, 2014 年 8 月 23 日~26 日, ハイデルベルグ (ドイツ).
- 2 Kajitani T, Hermmand D, Murakami Y, Ser7 phosphorylation of RNAPII-CTD ensures on-chromatin retention of nascent ncRNAs triggering RNAi-dependent heterochromatin formation, Cell Symposia on Transcription Regulation in Development, 2014 年 7 月 13 日~16 日, シカゴ (アメリカ).
- 3 梶谷卓也, 川上慶, 大屋恵梨子, Hermmand D, 村上洋太, ヘテロクロマチン形成に必要な siRNA は転写と共役して核膜近傍で形成される, 第 36 回日本分子生物学会年会 (招待講演), 2013 年 12 月 3 日~6 日, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

- 4 Kajitani T, Hermmand D, Obuse C, Shuman S, Murakami Y. Regulation of RNAi-directed heterochromatin by CTD-phosphorylation of RNA polymerase II. 'th international Fission Yeast Meeting (招待講演), 2013年6月24日~6月29日, ロンドン (イギリス).
- 5 高畑信也、千田早織、村上洋太, ヒストン H2A/H2B シャペロン FACT 複合体によるヘテロクロマチンサイレンシング機構, 第 65 回日本細胞生物学会年会 (招待講演), 2013年6月19日~21日, ウイング愛知 (愛知県名古屋市)

【公募・村谷匡史】

- 1 村谷匡史, ChIP-sequencing 法を用いた臨床検体のゲノム・エピゲノム統合解析, 第 29 回関東臨床細胞学会学術集会 (招待講演), 2015年9月26日, つくば国際会議場 (茨城県つくば市).
- 2 村谷匡史, ChIP-sequencing を用いた臨床組織検体のゲノム・エピゲノム統合解析. 新学術領域「癌研究分野の特性等を踏まえた支援活動」公開シンポジウム (招待講演), 2015年9月9日, 一橋講堂・学術総合センター (東京都千代田区).
- 3 村谷匡史, 臨床検体のゲノム・エピゲノム統合解析で探る疾患メカニズム. 第 29 回関東臨床細胞学会学術集会 (招待講演), 2015年7月25日~26日, ホテルフルーツ・フラワー (兵庫県神戸市).

【公募・村野健作】

- 1 村野健作, 永田恭介, ヒト細胞内におけるマウス rRNA 遺伝子転写の再構成. 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014年11月25日~27日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).
- 2 関屋健史, 村野健作, 永田恭介, M 期における CTCF の DNA 結合領域. 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014年11月25日~27日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).
- 3 森幸太郎, 川口敦史, 村野健作, 永田恭介, インフルエンザウイルス cell-to-cell 感染によるウイルスゲノムの多様化. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014年11月10日~12日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).
- 4 Murano K, Okuwaki M, Nagata K, Overcoming the species-specific barrier in the rRNA gene transcription by reconstitution of complete SL1 complex. The 13th Asian Conference on Transcription. 2014年2月19日~21日, メルボルン (オーストラリア).
- 5 村野健作, 永田恭介, rRNA 遺伝子の種特異的転写機構の解析. 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013年12月3日~6日, 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市).

【公募・矢田哲士】

- 1 入江拓磨, 劉瑩, 榊原雄太, 門城拓, 関真秀, 菅野純夫, 矢田哲士, 鈴木穰, 次世代シーケンサーを用いた変異プロモーターの網羅的解析. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016年11月30日~12月2日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).
- 2 Yada T, Taniguchi T, Irie T, Suzuki Y, Functional dissection of human promoters at single-base resolution and its application to rational design of promoter sequences. 第 5 回生命医薬情報連合大会, 2016年9月29日~10月1日, 東京国際交流館プラザ平成 (東京都江東区).
- 3 Yada T, A putative scenario for de novo gene birth in *Saccharomyces cerevisiae* genome. BIT 2016 (招待講演), 2016年3月3日~4日, Yang-Ming University (台湾).
- 4 Yada T, A putative scenario for de novo gene origination in *Saccharomyces cerevisiae* genome. 日本進化学会 2016 年年会, 2016年8月25日~28日, 東京工業大学大岡山キャンパス (東京都目黒区).
- 5 劉瑩, 入江拓磨, 門城拓, 矢田哲士, 鈴木穰, 変異導入プロモーターの転写活性データを用いて転写制御コードを解読する. 第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会大会 合同大会, 2015年12月1日~4日, 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市).

【公募・山本拓也】

- 1 Sone M, Yamanaka S, Yamamoto T, Hybrid cellular metabolism coordinated by Zic3 and Esrrb synergistically enhances somatic cell reprogramming, ISSCR2016, 2016年6月22日～25日, サンフランシスコ (米国).
- 2 Sone M, Yamanaka S, Yamamoto T, Hybrid Cellular Metabolism Coordinated by Zic3 and Esrrb Synergistically Enhance somatic cell reprogramming, CiRA/ISSCR 2016 International Symposia, 2016年3月22日～24日, 京都大学 (京都府京都市).
- 3 Ikeda H, Sone M, Yamanaka S, Yamamoto T, Chromatin interactions at developmental gene loci are reestablished by somatic cell reprogramming, 第13回ISSCR, 2015年6月24日～27日, ストックホルム (スウェーデン).
- 4 Sone M, Yamanaka S, Yamamoto T, Orphan nuclear receptor and Zic family transcription factors synergistically enhance somatic cell reprogramming. 第13回ISSCR, 2015年6月24日～27日, ストックホルム (スウェーデン).

【公募・横山明彦】

- 1 Yokoyama A, The molecular mechanisms of MLL fusion-dependent leukemic transformation. The 5th JSH International Symposium (招待講演), 2014年5月24日～25日, アクティシティ浜松 (静岡県浜松市).
- 2 横山明彦, Molecular mechanism of MLL-associated leukemia. 第72回日本癌学会学術総会 (招待講演), 2013年10月3日～5日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).

【公募・米澤康滋】

- 1 米澤康滋, 分子動力学シミュレーションと多変量解析による転写因子足場蛋白質の研究. 第30回分子シミュレーション討論会2016, 2016年11月30日, 豊中キャンパス (大阪府豊中市).
- 2 米澤康滋, 蛋白質構造変化探索の手法. 第16回蛋白質科学会2016, 2016年6月7日, 福岡国際会議場 (福岡県福岡市).
- 3 米澤康滋, 分子動力学シミュレーションによる Spt5-CTR 領域構造へのリン酸化の影響. 分子科学討論会2016, 2016年9月14日, 神戸ファッションマート (兵庫県神戸市).
- 4 米澤康滋, 差分距離行列情報によるたんぱく質のコンフォメーション変化探索法. 蛋白研セミナー「構造を基盤とする蛋白質科学における未解決問題」(招待講演), 2016年3月3日, 東京大学駒場キャンパス, エネオスホール (東京都目黒区).
- 5 米澤康滋, 蛋白質構造変化経路探索の手法. 計算統計物理学研究会 (招待講演), 2015年11月22日, 名古屋大学 ES ホール (愛知県名古屋市).

【公募・和田洋一郎】

- 1 和田洋一郎, エピゲノム解析の国際標準化に向けた新技術の創出, 応用物理学会放射線分科会医療放射線技術研究会, 2014年12月9日, 武田ホール (東京都文京区).
- 2 和田洋一郎, 高精度クロマチン相互作用解析による転写メカニズムの解明, 生命ダイナミクスの数理とその応用: 異分野とのさらなる融合, 2014年12月4日, 東京大学駒場キャンパス (東京都目黒区).
- 3 和田洋一郎, ゲノム・エピゲノム解析手法による放射線影響の探索, 第57回日本放射線影響学会, 2014年10月1日, かがしま県民交流センター (鹿児島県鹿児島市).
- 4 和田洋一郎, ヒト細胞に由来するエピゲノム情報の網羅的取得とその意義, 第57回日本腎臓学会学術集会, 2014年7月4日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).
- 5 和田洋一郎, 内皮細胞において観察される転写の波が示唆する転写複合体によるクロマチン構造変化, 日本遺伝学会第85回大会, 2013年9月19日, 慶応大学日吉キャンパス (神奈川県横浜市).

1.3.3 図書・和文総説

【計画1・山口雄輝】

- 1 山口雄輝 (2017) 「転写反応の生化学」, 和田洋一郎, 秋光信佳編 『生体の科学』, 医学書院, 68(3).
- 2 山口雄輝ほか (2017) 「転写開始後の過程」, 田村隆明, 浦聖恵編著 『遺伝子発現制御機構—クロマチン, 転写制御, エピジェネティクス』, 東京化学同人.
- 3 山口雄輝 (2015) 「RNA ポリメラーゼ II 転写産物の長さを決めるプロセシングの制御機構」 『バイオサイエンスとインダストリー』, バイオインダストリー協会, 73: 137-139.
- 4 山口雄輝, 成田央 (2014) 『基礎からしっかり学ぶ生化学』, 羊土社.
- 5 半田宏, 山口雄輝ほか (2014) 『新しい遺伝子工学 新版』, 朝倉書店.
- 6 Yamaguchi Y (2013) 「Transcription elongation, mechanisms」他, 多数の項執筆, Dubitzky W, Wolkenhauer O, Cho KH, Yokota H (Eds.) 『Encyclopedia of Systems Biology』, Springer.

【計画1・田村智彦】

- 1 藩龍馬, 田村智彦 (2017) 「転写因子 IRF5 の活性を選択的に阻害する分子 Lyn の同定と全身性エリテマトーデス」 『臨床免疫・アレルギー科』, 科学評論社, 67(5): 532-538.
- 2 黒滝大翼, 佐々木悠, 田村智彦 (2017) 「赤脾髄マクロファージの分化と機能」 『細胞』, ニュー・サイエンス社, 49: 163-166.
- 3 田村智彦, 西山晃 (2016) 「転写因子によるミエロイド系細胞の分化制御」 『日本臨床』, 日本臨牀社, 74: 481-486.
- 4 田村智彦, 小泉真一, 黒滝大翼 (2015) 「ミエロイド系細胞の分化と転写因子」 『臨床血液』, 日本血液学会, 56: 1861-1870.
- 5 小泉真一, 田村智彦 (2014) 「転写因子による樹状細胞の分化制御」 『臨床免疫・アレルギー科』, 科学評論社, 62: 510-518.
- 6 黒滝大翼, 田村智彦 (2013) 「IRF8-KLF4 転写因子カスケードによる単球分化制御」 『実験医学』, 羊土社, 31: 2971-2975.

【計画1・高橋秀尚】

- 1 高橋秀尚 (2017) 「新規転写伸長制御因子 Med26 の腫瘍性疾患への関与」 『最新医学』, 最新医学社, 72(3): 455-460.
- 2 高橋秀尚, 畠山鎮次 (2015) 「メディエーター複合体のサブユニット MED26 は little elongation complex をリクルートすることで snRNA 遺伝子の転写を制御する」 『細胞工学』, 学研メディカル秀潤社, 34(5): 514-515.
- 3 高橋秀尚 (2012) 「メディエーターのサブユニット Med26 による転写伸長制御」 『生化学』, 日本生化学会, 84(7): 577-581.

【計画2・伊藤敬】

- 1 相原仁, 伊藤敬 (2017) 「ヒストンアセチル化・ユビキチン化」, 田村隆明, 浦聖恵編著 『遺伝子発現制御機構—クロマチン, 転写制御, エピジェネティクス』, 東京化学同人, 35-45.
- 2 Mizusaki H, Aihara H, Ito T (2014) 「Histone Phosphorylation and Chromatin Dynamics」, Workman JL, Abmayr SM (Eds.) 『Fundamentals of Chromatin』, Springer, 341-354.

【計画2・大熊芳明】

- 1 大熊芳明 (2016) 「エネルギー代謝とメディエーター複合体」, 矢作直也編 『実験医学増刊 遺伝子制御の新たな主役 栄養シグナル』, 羊土社, 110-118.
- 2 飯田智, 大熊芳明 (2015) 「エネルギー代謝とメディエーター複合体」 『The Lipid』, メディカルレビュー社, 26: 68-74.

【計画3・高橋陽介】

- 1 桜井英博、柴岡弘郎、高橋陽介、小関良宏、藤田知道 (2017) 『植物生理学概論第二版』, 培風館 (印刷中)

【計画4・緒方一博】

- 1 椎名政昭、緒方一博 (2014) 「生命科学研究へのタンパク質構造の利用」, 中村春木編『見てわかる構造生命科学』, 化学同人, 133-160.

【計画5・十川久美子】

- 1 木村宏 (2017) 「ヒストン修飾のイメージング」, 牛島俊和, 眞貝洋一, 塩見春彦編『実験医学別冊 エピジェネティクス実験スタンダード』, 羊土社.
- 2 山本達郎、中尾光善、斉藤典子 (2017) 「クロマチンを制御するノンコーディングRNA」, 和田洋一郎、秋光信佳編『生体の科学』, 医学書院, 68(3).
- 3 山本達郎、中尾光善、斉藤典子 (2017) 「クロマチンから核構造へ」, 田村隆明, 浦聖恵編著『遺伝子発現制御機構—クロマチン, 転写制御, エピジェネティクス』, 東京化学同人, 231-242.
- 4 木村宏 (2015) 「転写」『生体の科学』, 医学書院, 66: 468-469.
- 5 十川久美子 (2014) 「免疫細胞における受容体の動態」, 原田慶恵, 石渡信一編『1分子生物学』, 化学同人, 147-153.
- 6 徳永万喜洋 (2014) 「1分子操作」, 原田慶恵, 石渡信一編『1分子生物学』 化学同人, 215-227. 「1分子操作:補足」化学同人ホームページ, 16-26 <<http://www.kagakudojin.co.jp/appendices/c28024/c28024-17.pdf>>
- 7 斉藤典子、坂本智代美、松森はるか、中尾光善、Ilya G. Goldberg (2014) 「機械学習による細胞形態の分類と推定」, 小林徹也、青木一洋編『バイオ画像解析 手とり足とりガイド』, 羊土社, 195-207.
- 8 安田洋子、斉藤典子、藤原沙織、Mohamed O. Abdalla、松森はるか、坂本智代美、中尾光善 (2014) 「クロマチン構造と核異型」『病理と臨床』, 分光堂, 32(7): 789-795.

【計画7・中村春木】

- 1 中村春木編 (2014) 『見てわかる構造生命科学』, 化学同人.

【公募・秋光信佳】

- 1 和田洋一郎、秋光信佳編 (2017) 『生体の科学』, 医学書院, 68(3).

【公募・井手聖】

- 1 井手聖 (2017) 「特定のクロマチン領域に結合するタンパク質の網羅的解析 PICh 法など」, 牛島俊和、眞貝洋一、塩見春彦編『実験医学別冊 エピジェネティクス実験スタンダード』, 羊土社.

【公募・伊藤寿朗】

- 1 角谷侑香、山口暢俊、伊藤寿朗 (2017) 「花の形づくりを決める遺伝子ネットワーク」, 日本農芸化学会編『化学と生物』, 国際文献社 (印刷中).

【公募・浦聖恵】

- 1 田村隆明、浦聖恵編著『遺伝子発現制御機構—クロマチン, 転写制御, エピジェネティクス』, 東京化学同人.
- 2 浦聖恵 (2017) 「再構成ヌクレオソームを用いたヒストンメチル化活性測定」, 牛島俊和、眞貝洋一、塩見春彦編『実験医学別冊 エピジェネティクス実験スタンダード』, 羊土社.

【公募・大野欽司】

- 1 Ohe K, Masuda A, Ohno K. (2013) 「Intronic and exonic nucleotide variations that affect RNA splicing in humans」 『Genomics I—Humans, Animals and Plants』 iConcept Press, 29-46.

【公募・黒柳秀人】

- 1 黒柳秀人 (2017) 「転写と転写後の共役」, 田村隆明、浦聖恵編著 『遺伝子発現制御機構—クロマチン, 転写制御, エピジェネティクス』, 東京化学同人.
- 2 黒柳秀人 (2016) 「デコイ ncRNA」, 廣瀬哲郎、泊幸秀編 『ノンコーディング RNA—RNA 分子の全体像を俯瞰する—』, 化学同人.
- 3 木村まり子、黒柳秀人 (2013) 「New Technology 選択的スプライシング可視化システム」 『Medical Science Digest』, ニュー・サイエンス社, 39: 502-503.

【公募・古久保哲朗】

1. Kokubo T (2013) 「Mechanisms of Transcriptional Activation and Repression」 他, 多数の項執筆, Dubitzky W, Wolkenhauer O, Cho KH, Yokota H (Eds.) 『Encyclopedia of Systems Biology』, Springer.

【公募・原田昌彦】

- 1 原田昌彦 (2017) 「アクチンファミリーによるクロマチン・細胞核機能の制御」 宇理須恒雄編著 『ナノバイオ・メディシン—遺伝子工学の革命ゲノム編集』, 近代科学社.
- 2 原田昌彦、山崎祥他、尾間由佳子 (2015) 「アクチンファミリー分子によるクロマチン・細胞核機能制御」 『生化学』, 日本生化学会, 87: 629-632.
- 3 山崎祥他、尾間由佳子、原田昌彦 (2015) 「アクチンファミリーによる細胞核・クロマチンの機能構造形成」 『The bulletin of the Society of Nano Science and Technology』, ナノ学会, 13: 73-77.
- 4 原田昌彦 (2013) 「核タンパク質と核骨格」, 平岡泰, 原口徳子編 『染色体と細胞核のダイナミクス』, 化学同人.
- 5 原田昌彦 (2013) 「翻訳の調節」, 東仲川徹, 大山隆, 清水光弘編 『ベーシックマスター分子生物学 改訂2版』, オーム社.

【公募・坂東優篤】

- 1 加藤由起、坂東優篤、白髭克彦 (2017) 「ChIP-Seq」, 牛島俊和、眞貝洋一、塩見春彦編 『実験医学別冊 エピジェネティクス実験スタンダード』, 羊土社.
- 2 坂東優篤、秋山和弘、白髭克彦 他 (2015) 「コヒーシン、コヒーシンローダーと転写制御」 『細胞工学』, 学研メディカル秀潤社, 34: 1029-1033.

【公募・藤井穂高】

- 1 Fujita T, Fujii H (2017) 「New directions for epigenetics: application of engineered DNA-binding molecules to locus-specific epigenetic research」, Tollefsbol T (Ed.) 『Handbook of Epigenetics 2nd edition』, in press.
- 2 藤井穂高 (2016) 「遺伝子座特異的クロマチン免疫沈降法を用いたエピジェネティック作動薬・抗感染症薬の開発 —バイオベンチャー『Epigeneron』の取り組み」, 真下知士, 山本卓編 『実験医学増刊 All About ゲノム編集』, 羊土社, 185-191.
- 3 藤井穂高 (2015) 「遺伝子座特異的クロマチン免疫沈降法によるエピジェネティック創薬」 『化学工業』, 化学工業社, 66(12): 28-34.
- 4 藤井穂高 (2015) 「CRISPR/Cas9を用いた enChIP 法による遺伝子座特異的ゲノム機能解析」, 真下知士、城石俊彦 監修 「進化するゲノム編集技術」, エヌ・ティー・エス.

- 5 Fujita T, Fujii H (2015) 「Isolation of specific genomic regions and identification of associated molecules by engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP) using CRISPR」, Chellappan SP (Ed.) 『Methods Mol. Biol. Chromatin Protocols Third Edition』 1288: 43-52.
- 6 藤田敏次、藤井穂高 (2014) 「CRISPR/Cas のゲノム編集以外への応用」 『実験医学』, 羊土社 32(11): 1732-1736.
- 7 藤井穂高 (2014) 「TAL や CRISPR を用いた enChIP 法による特定ゲノム領域の単離と結合分子の同定」, 山本卓編 『実験医学別冊 今すぐ始めるゲノム編集』, 羊土社, 42-43.
- 8 藤田敏次、藤井穂高 (2013) 「挿入的クロマチン免疫沈降法 (iChIP) による特定ゲノム領域結合分子の網羅的同定」 『実験医学』, 羊土社, 31(16): 2629-2636.
- 9 藤井穂高 (2013) 「iChIP 法による特定ゲノム領域の単離と結合分子の同定」, 中尾光善、中島欽一編、佐々木裕之 監修 『遺伝子医学 Mook エピジェネティクスと病気』, メディカルドゥ社, 25: 254-259.

【公募・南敬】

- 1 南敬 (2016) 「NFAT-ANG-2 による内皮活性化とダウン症因子 DSCR-1:アクセル/ブレーキ内皮恒常性システムと抗がん制御」 『細胞工学』, 学研メディカル秀潤社, 35: 27-32.

【公募・矢田哲士】

- 1 矢田哲士 他 (2017) 「遺伝子発見」, 人工知能学編 『人工知能学事典』, 共立出版 (印刷中).

1.3.4 その他

➤ 主催シンポジウム

【班会議】

- 1 「転写サイクル合同班会議 2016」, 松島一の坊 (宮城県), 2016 年 9 月 5 日~7 日.
- 2 「転写サイクル合同班会議 2015」, ホテル暖香園 (静岡県), 2015 年 8 月 3 日~5 日.
- 3 「転写サイクル合同班会議 2014」, 慶山 (山梨県), 2014 年 8 月 4 日~6 日.
- 4 「転写サイクル合同班会議 2013」, ホテルおかだ (神奈川県), 2013 年 8 月 5 日~7 日.
- 5 「転写サイクル班会議キックオフミーティング」, 長崎大学 (長崎県), 2012 年 10 月 29 日~30 日.

【国際会議】

- 1 「The International Conference on Transcription Cycle 2016」, 東京大学小柴ホール (東京都), 2016 年 12 月 3 日.
- 2 「The International Conference on Transcription Cycle 2014」, 東京工業大学蔵前会館 (神奈川県), 2014 年 11 月 24 日.

【冬の若手ワークショップ】

- 1 「冬の若手ワークショップ 2017」, 一宮シーサイドオーツカ (千葉県), 2017 年 1 月 30 日~2 月 1 日.
- 2 「冬の若手ワークショップ 2016」, ホテル清溪 (山梨県), 2016 年 2 月 4 日~6 日.
- 3 「冬の若手ワークショップ 2014」, 磯部ガーデンホテル (群馬県), 2014 年 1 月 30 日~2 月 1 日.

【転写サイクルセミナー】

- 1 伊藤敬「ヒストン H2A のリン酸化はサイクリン D1 発現を促進し癌化を引き起こす」東京医科歯科大 M&D タワー（東京都）2016 年 12 月 5 日.
- 2 Becker PB「Marking the X chromosome for global transcription regulation」, ホスト: 藤井穂高, 大阪大学吹田キャンパス（大阪府）, 2016 年 12 月 5 日.
- 3 Kadonaga J「Noncanonical histone-containing particles in dynamic chromatin」, ホスト: 伊藤敬, 長崎大良順会館（長崎県）, 2015 年 12 月 2 日.
- 4 Roeder RG「Transcriptional Regulatory Mechanisms in Animal Cells」, ホスト: 大熊芳明, 富山大学医薬系キャンパス（富山県）, 2014 年 11 月 27 日.
- 5 今清水正彦「Transcription elongation: heterogeneous tracking of RNA polymerase and its biological consequence」, ホスト: 山口雄輝, 東京工業大学すずかけ台キャンパス（神奈川県）, 2014 年 9 月 12 日.

【トレーニングワークショップ】

- 1 村谷匡史「初級向けインフォマティクス講習会 — ウェブツールで始められる RNAseq, ChIPseq, 発現アレイデータの解析・比較—」『第 3 回トレーニングワークショップ』, 筑波大学医学地区（茨城県）, 2015 年 11 月 4 日～5 日. <<https://usegalaxy.org/api/histories/3ef744a4d2c38ad9/contents/bbd44e69cb8906b555ec4671f3e63910/display>>
- 2 飯田緑、藤井聡、矢田哲士、大川恭行「ChIP-seq データ解析」他, 『第 2 回トレーニングワークショップ』, 九州工業大学飯塚キャンパス（福岡県）, 2014 年 3 月 6 日～7 日. <<http://dna00.bio.kyutech.ac.jp/chipseqTW/>>
- 3 深川暁宏、伊藤由馬、十川久美子「ライブセル蛍光 1 分子イメージング」『第 1 回トレーニングワークショップ』, 東京工業大学すずかけ台キャンパス（神奈川県）, 2013 年 12 月 18 日～19 日.

➤ アウトリーチ活動

【計画 1・山口雄輝】

- 1 山口雄輝, 出前授業, 小山高専（栃木県）, 2016 年 10 月 7 日.
- 2 山口雄輝, 出前授業, 小山高専（栃木県）, 2015 年 12 月 9 日.
- 3 山口雄輝, 「東工大知の追求講座」, 河合塾（東京都）, 2015 年 6 月 20 日.
- 4 山口雄輝, 出前授業, 小山高専（栃木県）, 2014 年 12 月 10 日.
- 5 山口雄輝, 出前授業, 小山高専（栃木県）, 2013 年 12 月 13 日.
- 6 山口雄輝, 出前授業, 星美学園高校（東京都）, 2013 年 11 月 9 日.
- 7 山口雄輝, 出前授業, 小山高専（栃木県）, 2012 年 11 月 13 日.
- 8 山口雄輝, 出前授業, 佐世保高専（長崎県）, 2012 年 10 月 31 日.

【計画 1・田村智彦】

- 1 田村智彦「のぞいてみよう！免疫のしくみ—大食い細胞マクロファージの働き—」, 『日本学術振興会 ひらめき☆ときめきサイエンス』, 横浜市大福浦キャンパス（神奈川県）, 2012 年 8 月 4 日.

【計画 1・高橋秀尚】

- 1 高橋秀尚, アウトリーチ活動, 立命館慶祥中学（北海道）, 2015 年 11 月 18 日.
- 2 高橋秀尚, アウトリーチ活動, 帯広市音更町文化センター・帯広市立第八中学校・帯広柏葉高校（北海道）, 2012 年 9 月 17 日.

【計画 3・高橋陽介】

- 1 高橋陽介 (2017) 広島県科学オリンピックの審査・講評委員, 2017 年 1 月 28 日.

- 2 高橋陽介 (2016) 「遺伝子のはたらき」, 『第2回広島県科学セミナー』, 広島大学 (広島県), 2016年8月10日.

【計画5・十川久美子】

- 1 十川久美子, スーパーサイエンスハイスクール東京研修講義 (大阪府立大手前高校), 東工大すずかけ台キャンパス (神奈川県), 2016年10月6日.
- 2 十川久美子, スーパーサイエンスハイスクール東京研修講義 (大阪府立大手前高校), 東工大すずかけ台キャンパス (神奈川県), 2015年10月7日.
- 3 十川久美子, スーパーサイエンスハイスクール東京研修講義 (大阪府立大手前高校), 東工大すずかけ台キャンパス (神奈川県), 2014年10月10日.
- 4 十川久美子, 「第22回高校生のための夏休み特別講習会」 (実習担当), 東工大すずかけ台キャンパス (神奈川県), 2014年7月31日~8月1日.
- 5 十川久美子, スーパーサイエンスハイスクール東京研修講義 (大阪府立大手前高校), 東工大すずかけ台キャンパス (神奈川県), 2013年10月3日.
- 6 十川久美子, スーパーサイエンスハイスクール東京研修講義 (大阪府立大手前高校), 東工大すずかけ台キャンパス (神奈川県), 2012年10月4日.

【計画6・松本直通】

- 1 松本直通, 「遺伝性難病の遺伝子解析最前線」, 『第43回先端医科学研究センター市民講座』, ウィング横浜 (神奈川県), 2016年6月21日.
- 2 松本直通, 「次世代シーケンスと遺伝性疾患」, 『プレ先端科学特論』 (市立札幌開成中等教育学校の高校1年生に対して), 北海道医療大学 (北海道), 2016年1月7日.
- 3 松本直通, 「難病を解き明かすヒト全遺伝子・全ゲノム解析」, 『横浜市立大学先端医科学研究センター市民講座』, ウィリング横浜 (神奈川県), 2014年8月7日.
- 4 松本直通, 「難病研究と創薬」 「希少疾患ゲノム研究の現状と将来」, 『市民・研究者シンポジウム 第3回』, 千里ライフサイエンスセンター (大阪府), 2013年1月27日.

【公募・井上康志】

- 1 井上康志, 「第5回こども科学の教室 スーパー光塾」, 阪大吹田キャンパス銀杏会館 (大阪府), 2014年11月24日.

【公募・黒柳秀人】

- 1 黒柳秀人, 難治疾患研究所企画「博士大学院生との対話: 研究者の卵の道を選んだ理由」, 東京医科歯科大学全学オープンキャンパス (東京都), 2016年7月28日~29日.
- 2 黒柳秀人, キャリア研修, 高田高校 (津市) の生徒が研究室訪問, 東京医科歯科大 (東京都), 2016年7月26日.
- 3 黒柳秀人, 「Deciphering Cellular Codes for Pre-mRNA Processing」, スーパーサイエンスハイスクール分子生物学講座 (東京都立日比谷高校), (東京都), 2015年7月21日.

【公募・古久保哲朗】

- 1 古久保哲郎, 「転写一遺伝情報を取り出すしくみ」, 『平成26年度バイオエキスパート研究体験シリーズ』 (社会人/学生対象), 横浜立学鶴見キャンパス (神奈川県), 2014年6月7日.
- 2 古久保哲郎, 「転写一遺伝情報を取り出すしくみ」, 『平成25年度バイオエキスパート研究体験シリーズ』 (社会人/学生対象), 横浜市大鶴見キャンパス (神奈川県), 2013年6月1日.

【公募・原田昌彦】

- 1 原田昌彦, 出前授業, 大田原高校 (栃木県), 2015年10月22日.
- 2 原田昌彦, 出前授業, 長野高校 (長野県), 2014年10月25日.
- 3 原田昌彦, みやぎ県民大学 (宮城県), 2014年9月24日.

4 原田昌彦, 進路講話, 諏訪清陵高校 (長野県), 2013年10月5日.

【公募・平田章】

1 平田章, 高大連携プログラム・出張講義, 松山北高校 (愛媛県), 2017年3月16日.

【公募・前川利男】

1 前川利男, 理研バイオリソースセンター一般公開 (茨城県), 2014年4月18日~19日.

2 前川利男, 理研バイオリソースセンター一般公開 (茨城県), 2013年4月19日~20日.

【公募・山本拓也】

1 山本拓也, 「細胞と遺伝子」, 『YCAM バイオ・リサーチ・オープンデイ vol 6』, 山口情報芸術センター (山口県), 2017年2月11日.

2 山本拓也, 「iPSの誕生とその未来」, 『東海高校・中学サタデープログラム 29th』 (土曜市民公開講座), 東海高校・中学校 (愛知県), 2016年6月25日.

3 山本拓也, 出前授業, 「未来のサイエンティスト養成事業」, 「科学の子育成事業」, 京大 iPS 細胞研究所, 2015年7月29日.

➤ ホームページ・新聞等

新学術領域研究「転写サイクル」ホームページ <<http://transcriptioncycle.org>> を立ち上げ、研究概要、研究組織、活動状況、研究成果、公募情報などを公開した。また、ニュースレターを発行した。

【計画1・山口雄輝】

1 「Japanese Author: 遺伝情報の転写時に、短い RNA が作られる仕組みを解明!」, nature digest, 2014年10月号.

2 東京工業大学プレスリリース「転写時の RNA の長さを制御する仕組みが明らかに」, 2014年6月26日.

3 東京工業大学プレスリリース「過剰な炎症反応を抑える仕組みを解明」, 2012年10月5日.

【計画1・田村智彦】

1 藩龍馬、田村智彦, 「Lyn は Toll 様受容体-MyD88 シグナル伝達経路において転写因子 IRF5 を抑制することにより自己免疫疾患の発症を阻止する」, ライフサイエンス新着論文レビュー <<http://first.lifesciencedb.jp/archives/13227>>, 2016年8月30日.

2 「新薬開発へ拠点活用 産学連携最前線 横浜市大先端研」, 神奈川新聞, 2015年4月17日.

3 「転写因子—病気との関係を解明—未来医療への架け橋 市大先端研究」, 神奈川新聞, 2014年1月9日.

4 横浜市立大学プレスリリース「免疫学 田村教授ら研究グループが自然免疫の過剰な反応を防ぐ新たなしくみを発見し、その破綻と自己免疫疾患の関わりを解明!」, 2016年8月8日.

5 横浜市立大学プレスリリース「免疫学 田村智彦教授らの研究グループが、アレルギー疾患を引き起こす免疫細胞である好塩基球やマスト細胞の産生・分化の仕組みを解明!」, 2014年11月19日.

6 横浜市立大学プレスリリース「免疫学 田村智彦教授らの研究グループが、白血球の分化において貪食細胞への運命を決定するタンパク質の働きを解明 ~免疫不全症や慢性骨髄性白血病の病態理解にヒント~」, 2014年9月17日.

7 横浜市立大学プレスリリース「大学院医学研究科 免疫学 田村智彦教授らの研究グループが、慢性骨髄性白血病に関わる分子の働きを解明!—新規治療法の開発につながる可能性を示唆—」, 2013年11月11日.

- 8 横浜市立大学プレスリリース「田村智彦教授らの研究グループが、体の免疫やがんの増悪化に関与する細胞「単球」のできる仕組みを解明!」, 2013年1月17日.
- 9 横浜市立大学広報誌 Innovation「産学連携 オープンイノベーションの理想型」, 2014年8月12日.
- 10 横浜市立大学広報誌 Innovation「バイオインフォマティクス最前線」, 2014年4月30日.

【計画2・伊藤敬】

- 1 『長崎新聞』, 2016年10月18日, 社会面.

【計画5・十川久美子】

- 1 「分子光らせ1つずつ観察」, 日経産業新聞, 2014年10月27日.
- 2 東京工業大学プレスリリース「遺伝子活性化の仕組みを生きた細胞内で観察 一転写制御にはたらくヒストン標識の役割を解明」, 2014年9月24日.

【計画6・松本直通】

- 1 村松一洋, 松本直通「WDR45 遺伝子の de novo 変異によるオートファジーによる障害が神経変性のひとつ SENDA を引き起こす」, ライフサイエンス新着論文レビュー <<http://first.lifesciencedb.jp/archives/6706>>, 2013年3月25日.

【計画7・中村春木】

- 1 「今週の研究ハイライト」, CMSI 週間ニュース <<http://cmsi-news.blogspot.jp/2014/12/cmsivol3712262014.html>>, 2014年12月26日.

【計画7・藤井聡】

- 1 第2回トレーニングワークショップ「ChIP-seq データ解析講習会」(2014年3月6日~7日)開催のためにウェブページ <<http://dna00.bio.kyutech.ac.jp/chipseqTW/>> を立ち上げ、さらに講習会で使用したツール Transcription factor annotation tool を公開した <<http://dna00.bio.kyutech.ac.jp/tfanno/>>.

【公募・伊藤寿朗】

- 1 「はかなくて強い幹細胞」読売新聞, 2017年4月19日.

【公募・黒柳秀人】

- 1 黒柳秀人, 「ニューリーダーからの一冊」, みらいぶプラス <<https://www.milive-plus.net/newleader/049/>>, 2017年4月21日.
- 2 黒柳秀人, 「飢餓の記憶の形成に必要な分子が作られるしくみ」, UTokyo Research <<http://www.u-tokyo.ac.jp/ja/utokyo-research/research-news/production-of-a-molecule-for-memory-of-salt-concentration.html>>, 2016年6月23日.
- 3 桑迫香奈子, 高橋真梨, 黒柳秀人, 武藤裕, 「組織特異的にスプライシング反応を制御する RBFOX ファミリーRNA 結合タンパク質および SUP-12 による RNA の協働的な認識の機構」, ライフサイエンス新着論文レビュー <<http://first.lifesciencedb.jp/archives/9218>>, 2014年9月12日.

【公募・藤井穂高】

- 1 大阪大学 微生物研究所 藤井穂高研究室ホームページにて iChIP/enChIP に関するプロトコルや FAQs, 研究試料等を公開 <<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/lab/microimm/fujii/top/index.html>>
- 2 「エビジェネ創薬の Epigeneron 社、阪大発のベンチャーが始動」, 日経バイオテック, 2015年7月15日.

- 3 「阪大微研の藤井准教授、標的ゲノム領域を単離できる新 CHIP 技術でベンチャー設立へ」, 日経バイオテク, 2015年2月9日.
- 4 「Interview: Hodaka Fujii on enChIP, New CRISPR Tools, and More」 Addgene's Blog <<http://blog.addgene.org/interview-hodaka-fujii-on-enchip-new-crispr-tools-and-more>>, 2014年12月3日.

【公募・山本拓也】

- 1 曾根正光、山本拓也, 「転写因子 Zic3 および Esrrb が代謝系を制御することによりナイーブ型の多能性幹細胞への初期化が相乗的に促進される」, ライフサイエンス新着論文レビュー <<http://first.lifesciencedb.jp/archives/16496>>, 2017年5月30日.
- 2 「iPS の作製効率向上 新規遺伝子加えマウスで 50%に」, 神戸新聞, 2017年5月3日, 26面.
- 3 「iPS 作製効率向上の 2 遺伝子 京大グループ発見」, 京都新聞朝刊, 2017年5月3日, 23面.
- 4 「iPS 作製 効率 10 倍 マウス実験で京大チームが開発」, 読売新聞朝刊, 2017年5月3日, 29面.
- 5 「iPS 細胞作製効率数%→50%に向上、京大新手法 マウスで確認」, 産経新聞朝刊, 2017年5月3日, 20面.
- 6 「iPS の作製効率向上 京大講師らチーム 2 遺伝子加え」, 中日新聞朝刊, 2017年5月3日, 24面.
- 7 「2 種細胞代謝バランス iPS 作製に重要 京大が発見」, 日刊工業新聞朝刊, 2017年5月3日, 17面.
- 8 「iPS の作製効率向上 マウス実験 2 種の遺伝子加える」, 日経新聞朝刊, 2017年5月3日, 34面.
- 9 「iPS 細胞作製 成功率 5 割に 京大研究所 マウス実験 遺伝子組み合わせ発見」, 毎日新聞朝刊, 2017年5月3日, 29面.
- 10 「iPS 細胞作製 成功率 50%超に 京大グループ、マウス実験」, 朝日新聞朝刊, 2017年5月3日, 3面.

【公募・横山明彦】

- 1 日刊工業新聞, 2015年12月4日, 21面.
- 2 京都新聞, 2015年11月25日, 29面.
- 3 産経新聞, 2015年11月24日, 26面.

1.4 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

【特許出願】

- 1 名称：コフィン-サイリス症候群の検出方法
発明者：松本直通、鶴崎美徳
権利者：横浜市立大学
番号：PCT/JP2014/082086
出願年月日：2014年12月4日
国内外の別：外国

- 2 名称：重度の知的障害及び運動発達遅滞を伴う難治性てんかんの検出方法
発明者：松本直通、才津浩智
権利者：横浜市立大学
番号：特願 2015-522766、PCT/JP2014/065217
出願年月日：2014年6月9日
国内外の別：日本／外国

- 3 名称：内在性 DNA 配列特異的結合分子を用いる特定ゲノム領域の単離方法
発明者：藤井穂高、藤田敏次
権利者：大阪大学
出願番号：PCT/JP2013/074107
出願日：2013年9月6日
国内外の別：外国

- 4 名称：ミトコンドリア複合体 I I I 欠乏症患者又は保因者の検出方法
発明者：松本直通、三宅紀子
権利者：横浜市立大学
番号：特願 2014-530538、PCT/JP2013/071620
出願年月日：2013年8月9日
国内外の別：日本／外国

- 5 名称：ケトン血症を伴うリー脳症患者又は保因者の検出方法
発明者：松本直通、三宅紀子
権利者：横浜市立大学
番号：特開 2015-27261
出願年月日：2013年7月30日
国内外の別：日本

【特許取得】

- 1 名称：内在性 DNA 配列特異的結合分子を用いる特定ゲノム領域の単離方法
発明者：藤井穂高、藤田敏次
権利者：大阪大学
出願番号：特願 2013-26310 (日本)
登録番号：第 5954808 号 (日本)
出願日：2013年2月14日
国内外の別：日本

- 2 名称：コフィン-シリリス症候群の検出方法
発明者：松本直通、鶴崎美徳

権利者：横浜市立大学
出願番号：特願 2013-552406
登録番号：第 6004287 号
出願年月日：2012 年 12 月 20 日
国内外の別：日本

- 3 名称：孔脳症又は脳出血のリスクを予測する方法
発明者：松本直通、才津浩智
権利者：横浜市立大学
出願番号：特願 2013-542930(P2013-542930)、PCT/JP2012/077903
登録番号：第 6052811 号（日本）、9,580,753 B2（米国）
出願年月日：2012 年 10 月 29 日
国内外の別：日本／外国

1.5 研究領域の目的及び概要

研究の学術的背景

真核生物の転写研究は RNA ポリメラーゼの精製 (Roeder, 1969)、ヌクレオソームの同定 (Kornberg, 1974)、*in vitro* 転写系の確立 (Roeder, 1979) といった揺籃期を経て 1990 年代以降、開花した。転写やクロマチン因子が多数同定され、プレイヤーは出揃いつつあるが、転写のメカニズムは今なお不明な点が多い。たとえば転写は、開始前複合体 PIC の形成、開始、伸長、終結という 4 つの段階からなるが、どの段階が律速で転写制御の標的となっているのか、という基本的な問いにすら未だ正確に答えることができない。実は 2000 年頃まで、転写の律速はもっぱら PIC 形成の段階だと広く信じられていた。ところが、領域代表者の山口らによる転写伸長因子群の同定・解析が契機となって、今や転写伸長が転写開始と並んで重要な制御段階と考えられるようになった (Yamaguchi *et al.* *Cell* 1999, Guo *et al.* *Nature* 2000, Yamaguchi *et al.* *Science* 2001, Wu *et al.* *G&D* 2003, Yamada *et al.* *Molecular Cell* 2006, Narita *et al.* *Molecular Cell* 2007, Chen *et al.* *G&D* 2009)。立ち後れていた転写開始後の研究は 2000 年以降、急速に進展し、伸長や終結過程のメカニズムも解明されつつある。さらに、遺伝子のプロモーター領域だけでなくコード領域にも転写と共役して種々のヒストン修飾やクロマチンリモデリングが起こることや、キャッピング、スプライシング、ポリ(A)付加といった RNA プロセッシングが転写と密接に共役して進行すること、すなわち RNA プロセッシングまで含めた RNA 合成の各段階が互いに影響を及ぼし合いつつ、一体となって進行することが分かってきている。従来の教科書的な転写機構モデルの大幅な書き直しが迫られる中、転写の全過程の統一的理解を目指す研究が求められている。

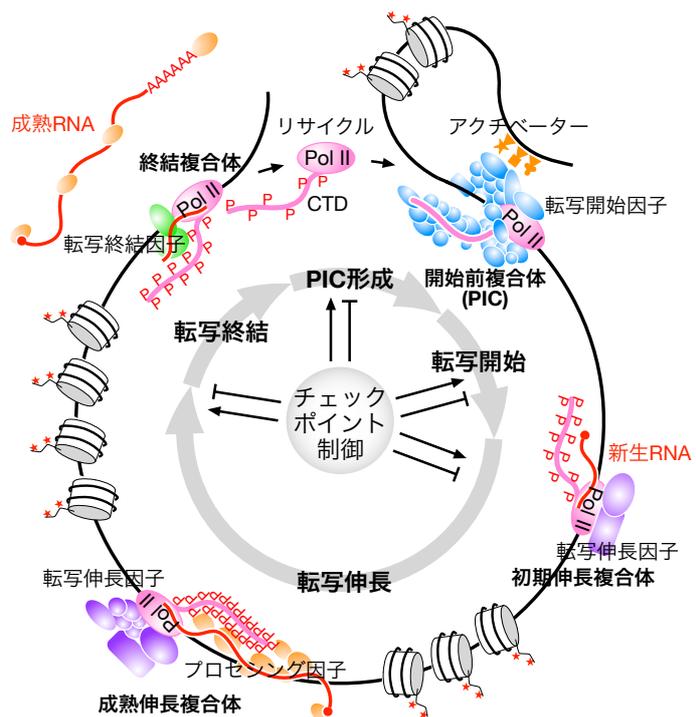
目的の概要

転写研究の難しさは、その高度な階層性にある。転写制御のメカニズムを本当に理解するには一つまり「何がどうなると、こうなる」という因果の連鎖を論理の隙なく理解するには、個体レベルや細胞レベルから複合体・分子レベル (転写因子、DNA、RNA)、原子レベル (転写因子の化学修飾、相互作用) に至るまで、各階層の知識を統合する必要がある。しかし技術的困難さのため、これまで各階層の研究は独立に進められてきた。本領域は、各階層で転写研究を行ってきた研究者を横断的に結集することで組織されている。そして、それらの融合を促進する触媒として、先端的技術を有する研究者と情報・計算科学の専門家が参加している。

本領域の目的は『転写サイクル』の制御機構を明らかにし、その知見を高次生命現象の理解へとつなげることである。転写サイクルは cell cycle に倣った言葉で、転写の全過程を表している。最近の知見から、転写は様々な点で cell cycle に類似していると考えられる。

- ・ 活性な遺伝子は 5'末端と 3'末端がループを形成し、Pol II はリサイクルされると考えられる。
- ・ 転写過程全体が緊密に共役しており、前の反応が次の反応に影響を及ぼしつつ進行する。
- ・ サイクルの途中にいくつかのチェックポイントが存在する。
- ・ サイクルの様々な段階でキナーゼやホスファターゼ等が働き、サイクルの進行が制御される。

cell cycle 同様、転写サイクルも外的環境に応じて時空間的な制御を受け、サイクルの様々な段階にチェックポイントが存在する。これらのチェックポイントが損なわれると発生や分化、成長に異常



が生じ、がん等の疾患に至る点でも両者は似通っている。さらに、両者は実際に一部の制御因子が共有されており、生命の基幹を支える2つのシステムは機能的に関連し合っていると考えられる。

本領域で我々は、転写サイクルという新規概念を導入し、高精細アプローチ（後述）によって、これまで独立に進められてきた転写の各ステップの研究を統合し、転写制御の全体像を定量的に明らかにする。さらに、個々の遺伝子の転写サイクルが積み重なってできる細胞レベルあるいは個体レベルの転写サイクルを、高精細アプローチによって高次生命現象と結びつけ、その理解を深める。

研究期間内に何をどこまで明らかにしようとするのか

転写サイクルのような複雑な対象を統一的に理解するには、生化学や遺伝学といった既存の研究アプローチでは不十分であり、先端的技術の開発・導入が欠かせない。具体的にはゲノムワイドの解析手法や動的制御を解析する手法、その他の定量的な解析手法が必要となる。さらに、大量に生み出される情報を処理するバイオインフォマティクスや、動的解析を支援する計算科学の導入も必要となる。本領域では、生細胞1分子イメージングや動的構造解析、次世代シーケンサーを用いたChIP-seqやRNA-seq解析等を実施する国内拠点（共同利用システム）を立ち上げる。そして既存の研究アプローチ、先端的技術、情報・計算科学を3本柱とした「高精細アプローチ」で、転写サイクル研究を推進する。なお、高精細という言葉には、先端的技術や情報・計算科学の導入によって研究対象を細部まで描き出したい、という意味が込められている。本領域ではまず、転写サイクルという概念を定式化する。そのために、

- ・転写過程に沿った転写複合体のリモデリングサイクルを明らかにする。
- ・転写過程に沿ったPol IIのリン酸化サイクルを明らかにする。
- ・転写過程に沿ったヒストン化学修飾サイクル・クロマチンリモデリングサイクルを明らかにする。
- ・遺伝子ルーピングによる転写制御機構を明らかにする。
- ・チェックポイント制御等による転写過程全体の動的制御機構を明らかにする。

上記の知見が統合されたものが、本領域の思い描く『転写サイクル』である。重要な点は、本領域のゴールが定性的なモデル図を描くことではなく、定量的解析・包括的解析を通じてその全体像を詳細に描き出すことにある、ということである。その点で、本領域の提案内容は従来の転写研究とは一線を画している。転写サイクル全体の詳細な理解は、その次に待ち受ける、システム生物学的アプローチによる遺伝子発現変化のシミュレーション・予測に欠かせない。そして、さらにその先にはゲノム創薬やエピゲノム創薬への道が開かれている。

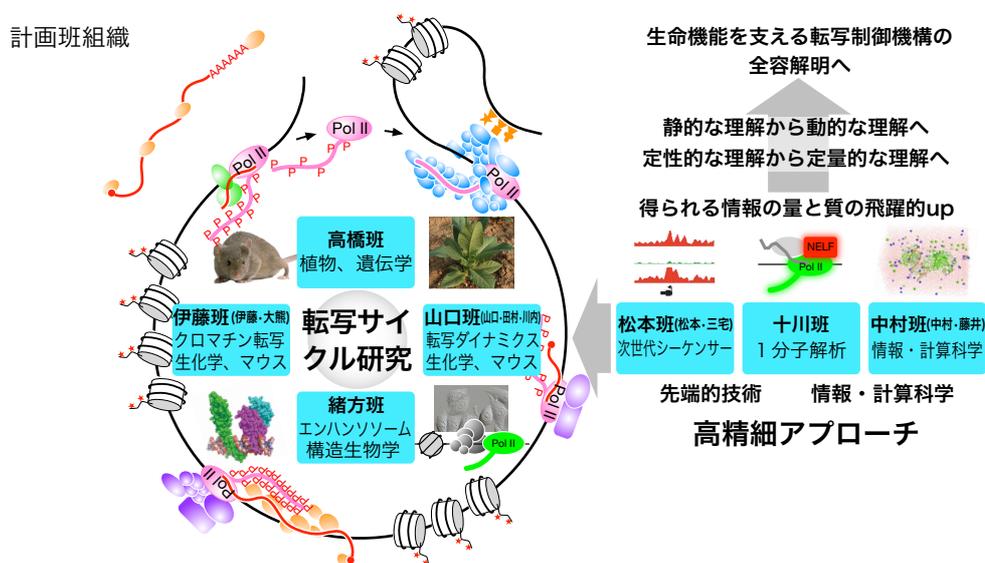
本領域ではさらに、転写サイクルと高次生命現象とのつながりを明らかにする。高精細アプローチによって異なる階層の知見を結びつけ、本領域の班員が研究対象とする幹細胞の増殖・分化、がんや遺伝病等の疾患、植物の成長制御等を支える転写制御機構を明らかにする。

本研究が我が国の学術水準の向上・強化につながる点

本領域は、異分野の研究者が連携して行う共同研究の推進によって転写研究の発展を目指すので「対象2」に該当する。また、多様な先端的技術を開発・導入し、2010年代の新たな転写機構論の確立を目指すので「対象3」に該当する。さらに、転写制御という世界的に競争が激しい研究分野で新しいサイエンスの基準を確立することは生命科学全体の発展につながるので「対象4」にも該当する。

本研究が我が国の学術水準の向上・強化につながる点を列挙する。第1に、本領域の取り組みは転写分野にとどまらず、より幅広い意義がある。本領域が目指しているのは、研究対象の定性的理解から定量的理解へのシフト、個別事象の理解から包括的理解へのシフトである。異分野融合型の本領域の取り組みは、生命科学全体の発展につながり、大きな波及効果を持つ。第2に、単独の研究室では導入・運用の困難な先端的技術・装置、たとえば次世代シーケンサーや1分子蛍光顕微鏡などの拠点を形成し、国内での利用・普及を促すことで、我が国の学術水準の向上に寄与する。第3に、若手研究者と経験豊富なシニア研究者がバランスよく配置された本領域は、若手研究者の支援も行っていく。公募班で若手を積極的に登用し、我が国の生命科学を担う次世代リーダーを育成する。

1.6 研究組織と各研究項目の連携状況



第1期公募班組織 (平成25~26年度)

氏名	研究課題名
高橋 秀尚 (北大・医)	Med26によってリクルートされる新規転写伸長複合体LECの機能解明
村上 洋太 (北大・理)	RNAポリメラーゼIIとRNA・クロマチンのクロストーク
原田 昌彦 (東北大・農)	転写サイクルにおけるクロマチンリモデリング複体のリサイクル機構の解明
村野 健作 (筑波大・医)	新規高感度レポーター系を用いたrRNA遺伝子の種特異的転写開始機構の解析
前川 利男 (理研・筑波)	次世代のマウスの遺伝子発現に影響を与える転写因子ATF-7の役割
和田 洋一郎 (東大・アイソトープ)	炎症性刺激で誘導される転写ファクトリーの機能解析
黒柳 秀人 (医科歯科大・難治研)	転写産物の高精細プロファイリングによる転写と転写後プロセッシングの共役機構の解明
太田 力 (がんセンター)	癌細胞における転写サイクルの強制回転の解析
古久保 哲朗 (横浜市大・生命医)	基本転写因子TFIIDを介した転写調節機構の解明
大野 欽司 (名大・医)	神経変性疾患関連RNA結合タンパクFUSによる転写抑制機構解明
高田 彰二 (京大・理)	転写因子DNA探索のエネルギーランドスケープ理論：速度-親和性パラドックス
佐藤 ゆたか (京大・理)	DNAループによる転写調節機構の解明
横山 明彦 (京大・医)	AEP複合体による転写サイクルの制御メカニズム
藤井 穂高 (阪大・微研)	挿入のクロマチン免疫沈降法(iChIP)による細胞分化制御因子の転写機構の解明
井上 康志 (阪大・生命)	転写制御因子によるDNA立体構造変化の光学的ナノ計測法開発
ティモシー スタセビッチ (阪大・生命)	Quantifying epigenetic regulation of the transcription cycle in single living cells
米澤 康滋 (近大・先端研)	計算科学シミュレーションによるCTDの構造特性から探る転写調節機構
平田 章 (愛媛大・理工)	アーキア(古細菌)RNAポリメラーゼにおける転写開始機構および転写調節機構の解明

第2期公募班組織 (平成27~28年度)

氏名	研究課題名
高畑 信也 (北大・理)	HP1とFACTの共役によるグローバルな転写制御機構
原田 昌彦 (東北大・農)	転写サイクルにおけるクロマチンリモデリング複体の動的リサイクルの解明
村谷 匡史 (筑波大・医)	癌特異的クリプティック遺伝子プロモーターの転写サイクルプロファイリング
浦 聖恵 (千葉大・理)	ヒストンH3K36メチル化酵素に着目した転写解剖
坂東 優篤 (東大・分生研)	コヒーシンの転写制御の分子機構の解明
秋光 信佳 (東大・アイソトープ)	核内長鎖ノンコーディングRNAによる転写サイクル制御
黒柳 秀人 (東医歯大・難治研)	転写産物の高精細プロファイリングによる転写と転写後プロセッシングの共役機構の解明
高田 彰二 (京大・理)	クロマチン構造と共役した転写因子動態の分子シミュレーション研究
山本 拓也 (京大・iPS研)	細胞分化可塑性を規定する染色体高次構造の解析
藤井 穂高 (阪大・微研)	遺伝子座特異的クロマチン免疫沈降法による細胞分化制御因子の転写機構の解明
別所 康全 (奈良先端大・バイオ)	せきつい動物パターン形成における転写制御の同調性維持機構
伊藤 寿朗 (奈良先端大・バイオ)	細胞周期の進行に伴うヒストン修飾による転写制御
平田 章 (愛媛大・理工)	アーキアの転写装置を利用した多段階転写反応の動的メカニズムの解明
矢田 哲士 (九工大・情報工)	次世代シーケンサー解析と情報科学解析で迫る転写調節コードの普遍性と多様性
南 敬 (熊大・生命資源)	内皮即時型応答遺伝子の包括的な転写サイクル制御機構のシステム解析
佐藤 政充 (早稲田大・先進理工)	シングルセル発現解析と核膜変異体ライブラリを用いた転写サイクル始動機構の解明
米澤 康滋 (近大・先端研)	計算科学と情報科学によるCTD及びCTRの構造空間と転写因子認識機構の研究
井手 聖 (遺伝研・構造遺伝)	rRNA遺伝子上での包括的なDNA-タンパク相互作用情報の抽出基盤の構築

本領域には 7 つの計画研究課題がある。これらのうち松本班、十川班、中村班の 3 つは「高精細アプローチ」をメインで担い、それぞれ次世代シーケンサーを用いたゲノムワイド解析、1 分子解析、情報・計算科学によって転写サイクル研究を支援する。残る山口班、緒方班、伊藤班、高橋(陽)班はハードコアな転写・クロマチン研究グループであり、生化学、構造生物学、遺伝学といった既存の研究アプローチをバックグラウンドとして有している。これらのグループも松本班、十川班、中村班等と共同で新しい技術の開発・導入を行いつつ研究を進め、転写サイクルの「動的」「定量的」理解を目指す。領域全体が一体的に活動することが重要と考え、研究項目は A01 の 1 つしか設けていない。

公募研究の役割は主に 2 つある。第 1 に転写機構研究の多面的展開、第 2 に若手支援である。転写研究は個体レベルから分子・原子レベルまで幅広く、それらすべてを計画班でカバーするのは困難なので、様々な分野を専門とする研究グループを公募し、幅と厚みのある転写機構研究を推進する必要がある。具体的には分子レベルの知見を個体レベルの生命現象と結びつけるような課題、転写とその他の生化学的プロセスの共役に注目して核内反応の統一的理解を目指す課題、新しい技術の開発や利用を通じて転写機構の解明を目指す課題、プロテオミクスやシステム生物学等、計画班では十分にカバーできていない専門性から転写機構にアプローチする課題等である。以上を踏まえて平成 25 年度に第 1 期の公募を行った。応募額 500 万円/年以下で 16 件程度の公募だったが、18 件（うち 39 歳以下は 4 名）を採択することができた（前頁）。採択者には転写伸長・終結段階の機構研究を専門とする気鋭の若手研究者、高橋秀尚（北大・医）、エピジェネティクス分野で独創的な研究を展開してきた村上洋太（北大・理）や前川利男（理研・筑波）、神経変性疾患と転写・RNA プロセッシング異常について取り組んでいた大野欽司（名大・医）、iChIP や enChIP という新しい実験手法を開発中の藤井穂高（阪大・微研）らが含まれる。同様に平成 27 年度の第 2 期でも 18 件（うち 39 歳以下は 4 名）を採択した（前頁）。第 2 期では、中間評価結果のコメントに従い、ウェットとドライの融合の先にあるシステム生物的展開を前倒しして進めるためシステム生物学の研究者の採択を目指すとともに、転写サイクルから多様な高次生命現象への研究展開をより重視し、血管形成のシステムバイオロジー的展開を目指す南敬（熊大・生命資源）、iPS 細胞の細胞分化可塑性の研究に取り組む山本拓也（京大・iPS 研）、脊椎動物のパターン形成の転写制御に取り組む別所康全（奈良先端大・バイオ）、植物のエピジェネティクス研究に取り組む伊藤寿朗（奈良先端大・バイオ）らを採択した。

総括班では班員間の連携を図るべく、以下の活動を行ってきた。

(1) 先端的技術の領域内共同利用システムの構築と運用

先端的技術を開発・導入することは本領域の核心であり、その媒体となるべく領域内共同利用システムを立ち上げた。同システムを構築するため、平成 24 年度に以下の装置を総括班の予算で導入した。

●生体分子 X 線解析システム R-AXIS VII/VariMax HF 一式

27,877,500 円、設置場所：横浜市大（緒方班）

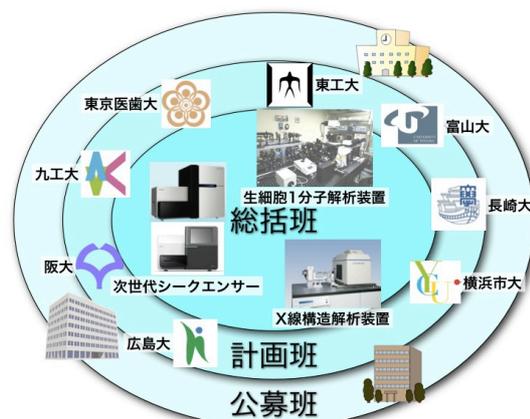
●Life Technologies Ion Proton シーケンサー一式

18,699,975 円、設置場所：横浜市大（松本班）

●オリンパス電動倒立型 2 ポート蛍光顕微鏡システム、および、浜松ホトニクス背面照射型電子増倍カメラシステム一式

8,999,917 円、設置場所：東工大（十川班）

それぞれの技術に精通している計画班の緒方、松本、十川が各装置の管理責任者となって平成 24 年度に装置の立ち上げを行なった。平成 25 年度には領域内共同利用システムの運用ルールを策定し、同システムの運用を開始した。運用は、1 分子蛍光顕微鏡と構造解析用装置に関しては、技術的困難さに鑑み、担当研究室との共同研究ベースで装置利用を進めることとした。一方、次世代シーケンサーについては希望研究室が予約をとった上で自由に利用できるようにした。これらの装置は転写サイクル領域の班員を主な利用者とし、余裕があれば各装置の管理責任者の判断で領域外の研究者も利用で



きることとした。また、利用に際して消耗品類は利用者が負担し、装置の保守等の費用は総括班の予算で負担することとした。

(2) 領域内外の連携推進

総括班では以下の取り組みを通じて領域内のみならず領域外の研究者との連携を推進してきた。

①班会議の開催。年 1 回、8 月頃に総括班会議を兼ねた全体班会議を 3 日間（初年度のみ 2 日間）の合宿形式で開催した。領域の最も重要なイベントであり、口頭発表に加えてポスターセッションも行うことで領域内の若手研究者に発表の機会を与えた。

②国際シンポジウムならびに転写サイクルセミナーの開催。平成 26 年度と 28 年度に、それぞれ国際シンポジウムを都内で開催した。平成 26 年度にはラスカー賞受賞者の Robert G. Roeder 博士（Rockefeller 大）らを招聘し、当該研究分野で注目を集めた。さらに毎年、外国人研究者を 2 名程度招聘して、国内数カ所で「転写サイクルセミナー」を開催した。これらのイベント開催を通じて領域内の研究成果を国内外に発信するとともに、最新の研究成果を共有し、かつ、人的交流を深めた。

③トレーニングワークショップ（TWS）の開催。先端的技術の導入やウェットとドライの融合が領域の目標達成に欠かせないが、先端的技術や計算科学は一般のウェット系研究者にはなじみが薄い。異分野融合を果たすため、班員ならびに関係者を対象とした TWS を不定期に開催してきた。以下に開催の概要を記す。いずれも実技や演習に多くの時間が割かれ、よく練られた講習内容だったと参加者から好評だった。

- ・第 1 回：1 分子イメージング講習会 2013 年 12 月 17 日～18 日 オーガナイザー：十川
- ・第 2 回：ChIP-seq データ解析講習会 2014 年 3 月 6 日～7 日 オーガナイザー：藤井(聡)
- ・第 3 回：初級者向けインフォマティクス講習会 2015 年 11 月 14 日～15 日 オーガナイザー：村谷

④その他の会議開催支援。関連分野の会議、具体的には日本遺伝学会や染色体ワークショップ・核ダイナミクス研究会が主催する会議に共催し、旅費等を支援するとともに班員の参加を促すことで、領域内外の研究交流を促進した。

(3) 若手研究者支援

総括班では以下の 2 つの若手研究者支援活動を行ってきた。

①冬の若手ワークショップ開催。班会議とは別に若手主体の「冬の若手ワークショップ」を毎年 1～2 月に 3 日間の日程で開催し、大学院生～助教クラスを中心に口頭発表とポスター発表の機会を提供してきた。

②若手海外派遣。これは若手研究者が海外の学会に参加し発表するための旅費や学会参加費を、領域内公募を経て総括班予算からサポートする制度である。帰国後はレポートを提出してもらい、領域ニュースレターに掲載した。

以上の結果、計画班に留まらず、公募班をも巻き込んで広範に共同研究が進められた。

1.7 研究領域の達成度

応募時に設定した「研究の対象」は以下の3つである。

- ②異なる学問分野の研究者が連携して行う共同研究等の推進により、当該研究領域の発展を目指すもの。
- ③多様な研究者による新たな手法による共同研究等の推進により、当該研究領域の新たな展開を目指すもの。
- ④当該領域の研究の発展が他の研究領域の研究の発展に大きな波及効果をもたらすもの。

観点1：先端的技術の開発・普及

本領域では総括班が中心となって領域内共同利用システムを立ち上げ、運用した。国内で立ち後れていた次世代シーケンサーを用いたゲノムワイド研究の推進に努めたほか、X線構造解析と1分子観察用の装置をそれぞれ管理担当班員の研究室に導入し、共同利用できるようにした。その結果、計画班員の松本（次世代シーケンサー）、緒方（構造解析）、十川（1分子観察）を中心とした共同研究のネットワークが構築され、計画班から発表された全研究論文の約13%（28/218）が領域内の共同研究から生まれた。たとえば、計画班員の松本、三宅らは全エクソームシーケンシング法による疾患ゲノム解析のパイプラインを構築し、*ARID1A*、*SMARCB1*、*SOX11*、*KDM6A*等の転写/クロマチン因子をコードする遺伝子の変異が遺伝病の原因となっていることを突き止めた。さらに、計画班員の十川らは公募班員のスタセビッチとともに複数の核内因子ならびにヒストンやPol IIの翻訳後修飾状態を同時に1分子観察する技術を開発し、生細胞内において転写活性化から転写開始、転写伸長に至る過程でのエピゲノム変化とPol IIの動態をサブ秒オーダーの時間分解能で測定し、反応速度論的な解析を行えるようになった（研究の対象③④）。

国際雑誌論文（査読あり）

出版年度	計画研究	公募研究	計
平成24年度	13(2)	0(0)	13(2)
平成25年度	43(6)	14(0)	57(6)
平成26年度	47(8)	32(5)	76(10)
平成27年度	51(6)	36(2)	85(6)
平成28年度	61(6)	53(5)	113(10)
平成29年度	3(0)	8(1)	11(1)
計	218(28)	143(13)	355(35)

括弧内は領域内の共同研究成果（内数）。計画班員と公募班員の共著論文はダブルカウントした上で、計からは除いた。

本領域ではさらに、萌芽的な新技術——具体的にはiChIP法とenChIP法（公募班員の藤井(穂)）、ePiCh法（公募班員の井手）、Multiplexed 3C-seq法（公募班員の山本）、酵母シングルセル発現解析法（公募班員の佐藤(政)）等——の開発・普及を推進した。領域の設定期間内に特許出願や論文発表に至らなかったものもある一方、2期連続で支援を受けた公募班員 藤井(穂)が開発したiChIP法とenChIP法は実証研究を経て普及の段階に入った。本法は、DNA上の反応を研究する者にとって長年の悲願とも言える、細胞核内の特定の遺伝子座に結合するタンパク質複合体を単離・同定する技術である。藤井(穂)はアカデミア年向けにはAddgeneというNPOを通じて世界数百ヶ所の研究機関に研究試料を無償配布する一方、本法をコア技術とした創業支援ベンチャーEpigeneronを立ち上げ、研究成果の社会還元を進めた（研究の対象③④）。

観点2：ウェットとドライの融合

総括班の様々な取り組みを通じて領域内のウェット研究者とドライ研究者の相互理解・交流を促した。その結果、両者間の共同研究が多数醸成され、国際誌に掲載された全研究論文の20%（71/355）をウェットとドライの融合研究論文が占めるに至った（H29年度の融合論文5報を含む）。たとえば、X線やNMRによる構造解析を専門とする計画班員の緒方と計算科学を専門とする計画班員の中村らの共同研究により、従来のウェット構造解析のみでは捉えられなかった転写因子/DNA複合体の化学修飾による天然変性領域の振る舞いの変化を描出することに成功した。本領域の活動を通じて、ウェット研究者とドライ研究者の連携がこれまでになく深まったと判断できる（研究の対象②④）。

観点3：新規概念の創出

本領域ではこうした先端的技術と情報・計算科学とを合わせた「高精細アプローチ」により転写サイクルに関する新規概念の創出を目指した。その結果、転写の各ステップが密接に影響し合っており、以前から知られていた前のステップが後のステップに影響するフィードフォワード制御だけでなく、後のステップが前のステップに影響するフィードバック制御も存在することが新たに示唆された。さ

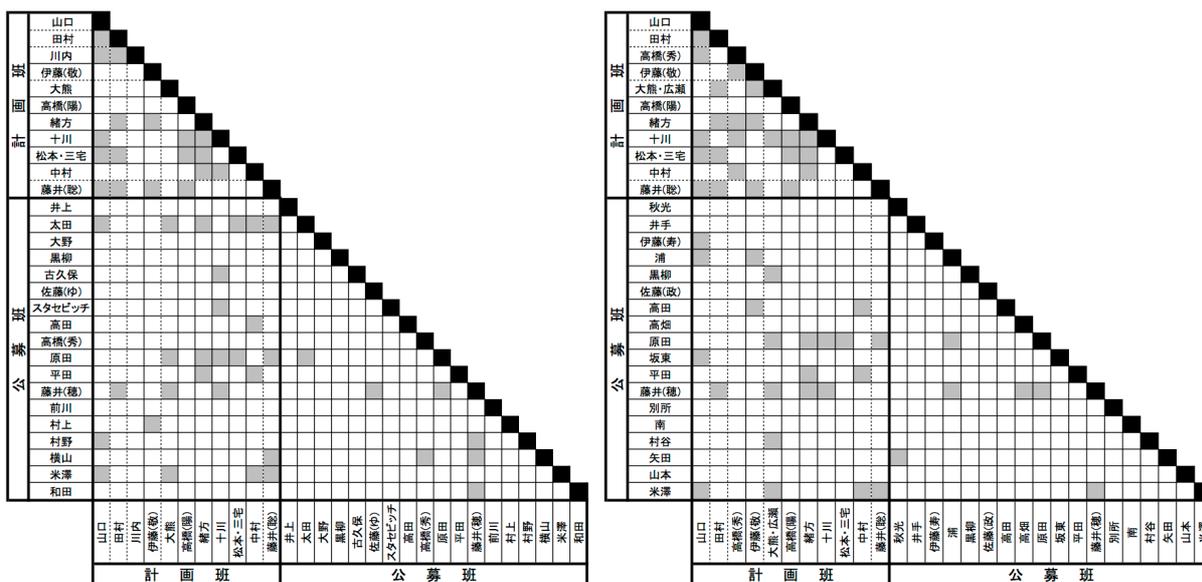
らに、転写サイクルの過程に存在する分岐過程（チェックポイント）の存在が新たに示された（計画班員の山口、川内、高橋(秀)らの研究成果）（研究の対象④）。

観点4：転写サイクルと高次生命現象

本領域では、転写サイクルと高次生命現象の関係解明を目指す研究も推進した。その結果、血液細胞の分化過程を制御する巧妙なエンハンサー/プロモーター相互作用を明らかにした（計画班員の田村）。また、個体レベルで癌化を引き起こす新たなヒストン修飾を同定し（計画班員の伊藤(敬)）、植物の成長促進ホルモンであるジベレリンによる転写制御機構を解明した（計画班員の高橋(陽)）。公募班でも、神経発生や神経変性疾患（大野）、脊椎動物のパターン形成（別所）、炎症応答刺激（和田、南）、多能性幹細胞の分化（山本）、発癌（太田、横山、村谷）等に関する多様な研究が進められた（研究の対象④）。

観点5：研究成果の質と量

研究期間内に査読ありの国際雑誌論文を 355 報発表することができ（前頁）、中間評価時から大きく上乗せすることができた。（この数字には平成 29 年 4～6 月に公表された論文ならびに印刷中の論文 11 報が含まれている。また、review article 22 報が含まれている。）そのうち IF が 10 以上の論文は 53 報だった（Cell 1 報、Genes Dev 2 報、JACS 3 報、Molecular Cell 4 報、Nature 2 報、Nature Commun 16 報、Nature Genet 4 報、Nature SMB 2 報を含む）。また、領域内全体の共同研究実施状況を以下にまとめた。本図から、計画班に留まらず公募班をも巻き込んで共同研究が進められたことが分かる。以上の理由から、本領域は研究の対象②、③、④に沿って着実に進められ、当初の目標を十分に達成できたと自己評価している。



平成 24～26 年度（左）ならびに平成 27～28 年度（右）の領域内共同研究の実施状況

7 つの計画研究課題、個々の達成状況を以下にまとめた。

【計画研究 1】本研究では、新規な Pol II 相互作用因子の同定・解析と生細胞内でのカイネティクス解析を通じて、Pol II 複合体のリモデリング過程とその過程に存在するチェックポイントの制御機構の解明を目指した。その結果、転写の各ステップ間のフィードフォワード制御のみならず、フィードバック制御の存在を新たに示すことができた。たとえばメディエーターの構成サブユニット Med26 が 3'プロセッシング/転写終結を制御していることを見出した (Takahashi *et al.* 2015)。反対に、転写伸長因子 Elongin の KO マウスの解析から、Elongin が転写開始にも影響することが示唆された (Yasukawa *et al.* 2012)。さらに血球細胞分化系を用いた高精細なエピゲノム解析から、従来考えられてきたエンハンサーからプロモーターへの一方的な活性化機構とは異なり、エンハンサーとプロモ

ーター/遺伝子が相互に働いて転写活性化を導くという新しい機構が導出された (Kurotaki *et al.* 2013, Nishiyama *et al.* 投稿準備中)。さらに、少なくとも3つ存在する3'プロセッシング/転写終結経路が遺伝子ごとに適切に選択される機構に転写伸長因子 NELF、キャップ結合因子 CBC、NEXT複合体が関与していることを明らかにし、Pol II が遺伝子ごとに正しい長さの転写産物を生み出す機構の一端を解明した (Yamamoto *et al.* 2014, Zukeran *et al.* 投稿準備中)。

【計画研究2】本研究では転写再構築系により転写サイクルによる遺伝子転写開始機構を明らかにすることを目的とした。①遺伝子転写再構築系及びがん細胞を用いてヒストンのリン酸化ががん化を引き起こすことを明らかにした。我々はヒストンタンパク質の翻訳後化学修飾の中でも特にリン酸化に注目しヒストン H2A の C 末端リン酸化が種々のがん細胞において亢進していることを明らかにした。これらのリン酸化は我々が同定したショウジョウバエ NHK-1 のヒトホモログ VRK1 により触媒されることを証明した。培養細胞を用いてヒストンリン酸化酵素である VRK1 をノックダウンすると種々の遺伝子発現が低下しがん細胞増殖も低下する。がん細胞増殖と関連する Cyclin D1 の遺伝子発現を調節するプロモーター領域では VRK1 の局在とヒストン H2A の C 末端リン酸化を認めた。ヒストン修飾酵素の異常ががん化を引き起こすエピジェネティックなメカニズムを証明することができた (Aihara *et al.* 2017)。②Pol II が構成する転写開始複合体と転写制御因子を橋渡しするメディエーター複合体が引き起こす転写活性化と抑制のスイッチ機構を解明として自然免疫に関わる TLR9 活性化にメディエーターが重要な役割を果たすことを明らかにした (Tsutsui *et al.* 2013)。さらに、基本転写因子 TFIIIE の結晶構造を決定し、その機能メカニズムが詳細に理解できるようになった (Miwa *et al.* 2016)。

【計画研究3】本研究では植物の成長を調節する転写制御複合体の機能と動態の解析を目的とした。我々は転写因子 GAF1 が、成長促進ホルモンのジベレリン (GA) 濃度が低い時は植物の成長抑制因子 DELLA と共に転写促進複合体を形成し、GA の濃度が高くなると転写抑制複合体を形成することを見出した。この GA による転写制御複合体の機能転換により、従来は説明不能だった GA 生合成酵素のフィードバック制御や GA による負の転写制御を分子レベルで説明できるようになった。さらに RNA-seq と ChIP-seq により GAF1 の標的遺伝子を探索し、直接の標的と考えられる *ALP1059* (仮名) を同定した。*ALP1059* の機能喪失型変異体を取得して、その表現型を解析した。変異体は GA を投与されたかのような徒長形質を示し、さらに花成が促進されていた。*ALP1059* は GA による成長と花成の制御に関与する遺伝子と考えられた。本研究により成長を調節する転写制御複合体の機能転換のメカニズムが明らかになり、さらに次世代シーケンサーを用いた解析で重要な標的遺伝子が同定されたので、当初の目的はほぼ達成されたと考える。

【計画研究4】本研究では、細胞シグナルにより転写因子の化学修飾として核内に伝達された情報が、特異的な遺伝子発現制御の情報に変換される分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。転写因子の化学修飾は、天然変性領域に起こるため、安定な立体構造の解明を目的とする従来の実験的手法では解析が難しいため、中村班との共同研究により分子シミュレーションによって問題に取り組んだ。その結果、従来法では捉えることができなかった、転写因子 Ets1 の天然変性領域の化学修飾によって形成される DNA 非結合型のコンフォメーションの存在を明らかにした。さらに、従来、単独の転写因子にのみ注目して展開されてきた化学修飾による転写因子の活性変化について、エンハンソーム中において分子構造レベルで解析し、化学修飾を受けた転写因子の活性変化は、その転写因子が協調的に DNA に結合するパートナー転写因子の種類によって異なることを見出した。その分子メカニズムは、修飾をうけた転写因子の特異的コンフォメーションのみを、パートナー転写因子が選択的にエンハンソームに取り込むことにあることを示した。

【計画研究5】本研究では、生細胞1分子蛍光イメージングと定量解析により、転写サイクルの「動的」「定量的」理解をめざし、顕微鏡法および解析法の開発と実用化を進めてきた。核内の局所照明により蛍光1分子を鮮明に観察できる独自開発の顕微鏡技術を中心に、FRAP 法や超解像顕微鏡法との統合顕微鏡システムの開発により、転写開始前複合体や転写伸長複合体について、どのような因子

がどのタイミングで関与するかというダイナミクス解明を目標とした。領域内の共同研究により、(1) 転写伸長因子 DSIF の複合体結合に P-TEFb および Cdk9 によるリン酸化の役割 (山口班との共同研究)、(2) エンハンソソーム構成タンパク質因子の 1 分子定量解析による核内滞在時間解析 (緒方班椎名との共同研究)、(3) 核小体構成タンパク質の動態解析による核小体構造形成メカニズム解明 (連携研究者 斉藤との共同研究) (4) ヒストン H3 アセチル化の転写開始および転写伸長における役割解明 (連携研究者 木村との共同研究) (5) メディエータータンパク質 Med26 の構造と機能の解析 (山口班 高橋(秀)との共同研究) などを進め、統合顕微鏡システムによる研究成果をあげることができた。

【計画研究6】 新型シーケンサー Ion Proton を新規に導入し、その特性を生かした安価な機能的ゲノム解析システムを構築し、新しい生命現象のメカニズム解明に資する情報を提供することを目的の一つとした。Ion Proton 発売時に、PII チップの発売が予定されていたが、研究期間を通じて発売がなされることなく当初予定していたシーケンス出力 (60 Gb) が得られず、その運用については制限が生じた。一方で、出力制限はあるものの Ion Proton を用いて計画研究1の代表研究者・山口らと RNA-seq を中心とした解析を進めた。さらに Illumina 社のシーケンサーを用いて計画研究1の分担研究者・田村らと ChIP-seq の解析を進め一定の成果を得た (Blood 2013)。本研究班の分担である三宅は、Coffin-Siris 症候群における BAF 複合体関連遺伝子 6 種 (Tsurusaki *et al.* 2012, Tsurusaki *et al.* 2014)、Kabuki 症候群における *KDM6A* 遺伝子 (Kodera *et al.* 2013) を世界に先駆けて報告した。全体の達成度は、Ion Proton での PII チップの未発売で計画変更を余儀なくされた部分を差し引くが、転写に関わる遺伝子異常 2 疾患で責任遺伝子を単離する等順調に推移し 95%程度とする。

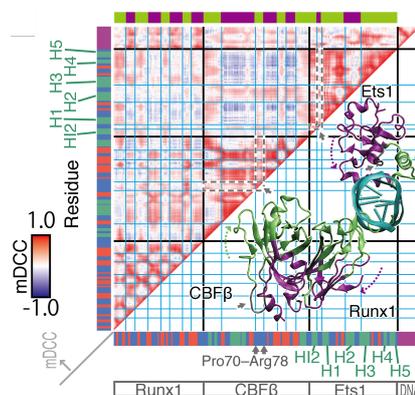
【計画研究7】 転写サイクルにおける情報変換機構のダイナミクスを解明することを目的として、コンピュータ解析を活用した計算・情報科学のアプローチによる研究を実施した。計算科学的アプローチとしては、新規な分子シミュレーション計算法を開発し長時間シミュレーションによる多様な構造のサンプリングとその解析を可能として、エンハンソソームにおける転写制御因子間やヌクレオソームとの相互作用に対して、それらの動的構造変化とその安定性を解析しその制御メカニズムを解明できた。情報科学的なアプローチでは、公共のゲノムクスデータを収集しバイオインフォマティクス技術を駆使して統合的に解析することにより、転写制御における転写因子同士の協同的な制御やヒストン修飾によるエピゲノム制御を解析する手法を考案した。その解析結果をウェットの研究者にフィードバックする一方、領域内で数多くあったドライ解析へ対するニーズに答え、生物的に意味のある情報や知見を引き出すオリジナルな情報解析やツールの開発を行った。申請時の計画はほぼ達成され上記の多くの研究は共同研究として論文発表されたが、研究期間中に成果公表にまで至れなかったものも多少残った。

1.8 主な研究成果

<A01 計画研究>

- Molecular mechanisms of cooperative binding of transcription factors Runx1-CBF β -Ets1 on the TCR α gene enhancer. *Kasahara K, Shiina M, Fukuda I, Ogata K, Nakamura H. *PLoS One* 12, e0172654 (2017).

これは計画班の中村と計画班の緒方らの共同研究成果である。緒方らが決定した Ets1-Runx1-CBF β -DNA 複合体に対する Zero-dipole summation 法による高速 MD シミュレーションを中村らが実施し、その結果に対し mDCC 法と複雑ネットワーク解析分野で用いられる中心性解析技術とによって原子間の相関ネットワークを解析した。Runx1-CBF β ヘテロダイマーとの結合によって DNA の構造変化が起こり、これが Ets1 ループ領域との相互作用を不安定化してループの揺らぎが増大し、複数の構造を過渡的に形成するという、Ets1-Runx1-CBF β -DNA 複合体における転写因子間のアロステリックな情報伝達の分子機構を原子レベルで解明できた。



- Lyn kinase suppresses the transcriptional activity of IRF5 in the TLR-MyD88 pathway to restrain the development of autoimmunity. Ban T, Sato GR, Nishiyama A, Akiyama A, Takasuna M, Umehara M, Suzuki S, Ichino M, Matsunaga S, Kimura A, Kimura Y, Yanai H, Miyashita S, Kuromitsu J, Tsukahara K, Yoshimatsu K, Endo I, Yamamoto T, Hirano H, Ryo A, Taniguchi T, *Tamura T. *Immunity* 45, 319-332 (2016).

遺伝子発現の精密な制御機構の破綻と疾患との関連に着目し、転写因子 IRF5 が関わる全身性エリテマトーデスをモデルとして、転写因子の活性制御機構の解析を行った。IRF5 の抑制因子として Lyn チロシンキナーゼを同定し、リン酸化能に依存しない抑制機構を見出した。Lyn も SLE との関連が報告されており、Lyn による IRF5 の制御機構が破綻すると、IRF5 が恒常的に活性化して、SLE 様病態の発症を招くことを実証した。

- Histone H2A T120 phosphorylation promotes oncogenic transformation via upregulation of cyclin D1. Aihara H, Nakagawa T, Mizusaki H, Yoneda M, Kato M, Doiguchi M, Imamura Y, Higashi M, Ikura T, Hayashi T, Kodama Y, Oki M, Nakayama T, Cheung E, Abratani H, Takayama K, Koseki H, Inoue S, Takeshima Y, *Ito T. *Mol Cell* 64, 176-188 (2016).

ヒストンH2AのC末端T120のリン酸化が種々のがん細胞において亢進していることを明らかにした。がん細胞増殖と関連するCyclin D1の遺伝子発現を調節するプロモーター領域ではVRK1の局在とヒストンH2AのC末端リン酸化を認めた。これらの所見はヒストン修飾酵素の異常ががん化を引き起こすエピジェネティックなメカニズムを証明したものである。



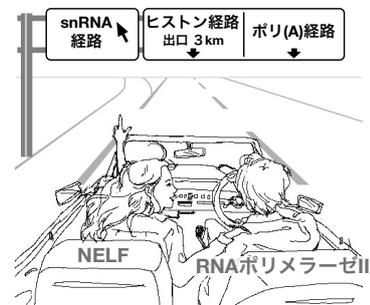
- MED26 regulates the transcription of snRNA genes through the recruitment of little elongation complex. Takahashi H, Takigawa I, Watanabe M, Anwar D, Shibata M, Tomomori-Sato C, Sato S, Ranjan A, Seidel CW, Tsukiyama T, Mizushima W, Hayashi M, Ohkawa Y, Conaway JW, Conaway RC, *Hatakeyama S. *Nat Commun* 6, 5941 (2015).

Pol II が RNA 合成を再開するためには、転写伸長因子が遺伝子領域へとリクルートされ、Pol II の一時停止が解除される必要がある。高橋(秀)らは、転写伸長複合体 LEC を同定し、メディエーター転写複合体のサブユニット Med26 が LEC を snRNA などの non-coding RNA 遺伝子領域にリクル

ートし、その発現を促進することを明らかにした。本研究によって、Med26 は 2 つの異なる転写伸長複合体 SEC と LEC を異なる遺伝子領域にリクルートすることを明らかにした。

- DSIF and NELF interact with Integrator to specify the correct post-transcriptional fate of snRNA genes. Yamamoto J, Hagiwara Y, Chiba K, Isobe T, Narita T, Handa H, *Yamaguchi Y. *Nat Commun* 5, 4263 (2014).

Pol II 転写産物に起こる 3 種類の 3'末端プロセッシング経路——大部分の mRNA に起こるポリ(A)付加、ヒストン mRNA 特異的なプロセッシング、snRNA 特異的なプロセッシング——に注目し、特定の経路が選択されるしくみを研究した。snRNA は本来ポリ(A)付加を受けないが、転写伸長因子 NELF をロックダウンしたり Pol II CTD のリン酸化を阻害するとポリ(A)型の snRNA が生じ、プロセッシング経路が転写伸長の途上で active に選択されていることが明らかとなった。さらに詳しい解析から、NELF はポリ(A)付加因子 CstF のリクルートを妨げており、プロセッシング経路の“運命決定因子”として働いていることが分かった。



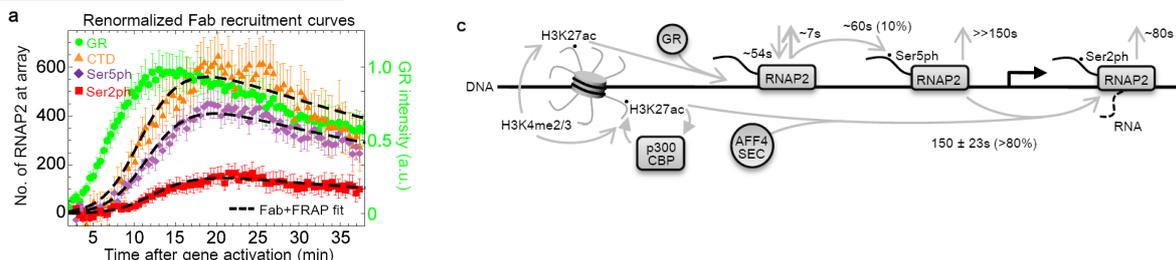
- DELLAs function as coactivators of GAI-ASSOCIATED FACTOR1 in regulation of gibberellin homeostasis and signaling in Arabidopsis. Fukazawa J, Teramura H, Murakoshi S, Nasuno K, Nishida N, Ito T, Yoshida M, Kamiya Y, Yamaguchi S, *Takahashi Y. *Plant Cell* 26, 2920-2938 (2014).

従来の GA による転写制御モデルでは、ジベレリン (GA) による転写促進しか説明できなかったが、GA は一群の遺伝子の転写を抑制する。高橋(陽)らは GAF1 転写促進複合体が GA 刺激によって転写抑制複合体に機能転換することを証明し、この問題を解決した。



- Regulation of RNA polymerase II activation by histone acetylation in single living cells. *Stasevich TJ, Hayashi-Takanaka Y, Sato Y, Maehara K, Ohkawa Y, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, Nagase T, Nozaki N, McNally JG, *Kimura H. *Nature* 516, 272-275 (2014).

遺伝子活性化の指標であるヒストン H3 アセチル化と活性化型の RNA ポリメラーゼ II を同時に生細胞で可視化定量解析し、数理モデルと併用することにより、ヒストン H3 アセチル化が転写因子の DNA への結合と転写伸長反応の両方に働くことを明らかにした。これは計画班の十川と公募班のスタセビッチらの共同研究成果である。



- Essential role of the IRF8-KLF4 transcription factor cascade in murine monocyte differentiation. Kurotaki D, Osato N, Nishiyama A, Yamamoto M, Ban T, Sato H, Nakabayashi J, Umehara M, Miyake N, Matsumoto N, Nakazawa M, Ozato K, *Tamura T. *Blood* 121, 1839-1849 (2013).

分化における細胞系譜特異的な転写制御機構と普遍的な転写サイクル制御装置の結びつきに着目し、免疫系細胞の分化をモデルとして、転写因子や各種修飾ヒストンの ChIP-seq 解析やマイクロアレイ発現解析を行なった。その結果、単球分化において遠位エンハンサーを創出する系譜特異的な転写因子 IRF8 を同定し、さらに網羅的データと *in silico* DNA モチーフ解析によって転写因子カスケード

「IRF8-KLF4 軸」を予測、その実証を行ない、これが生体レベルで炎症性単球サブセットの分化に必須であることを見出した。これは計画班の田村と計画班の松本・三宅らの共同研究成果である。

- Mutations affecting components of the SWI/SNF complex cause Coffin-Siris syndrome. Tsurusaki Y, Okamoto N, Ohashi H, Kosho T, Imai Y, Hibi-Ko Y, Kaname T, Naritomi K, Kawame H, Wakui K, Fukushima Y, Homma T, Kato M, Hiraki Y, Yamagata T, Yano S, Mizuno S, Sakazume S, Ishii T, Nagai T, Shiina M, Ogata K, Ohta T, Niikawa N, Miyatake S, Okada I, Mizuguchi T, Doi H, Saito H, *Miyake N, *Matsumoto N. *Nat Genet* 44, 376-378 (2012).



Coffin-Siris症候群の原因として、クロマチンリモデリング複合体BAFを構成する5つのサブユニット、すなわちSMARCB1、SMARCA4、SMARCE1、ARID1A、ARID1Bのいずれかの遺伝子変異によって惹起されることを突き止めた。これは計画班の松本・三宅と計画班の緒方らの共同研究成果である。本成果で得られた知見について2012年に国内ならびに国際出願を行い、国内特許は2016年に成立した（特許第6004287号）。

<A01 公募研究>

- Multivalent binding of PWWP2A to H2A.Z regulates mitosis and neural crest differentiation Pünzeler S, Wommelsdorf S, Spitzer RMM, Leidescher S, Markaki Y, Mentele E, Regnard C, Schneider K, Takahashi D, Vardabasso C, Zink LM, Straub T, Bernstein E, Harata M, Leonhardt H, Mann M, Rupp R, *Hake SB. *EMBO J*, in press (2017).

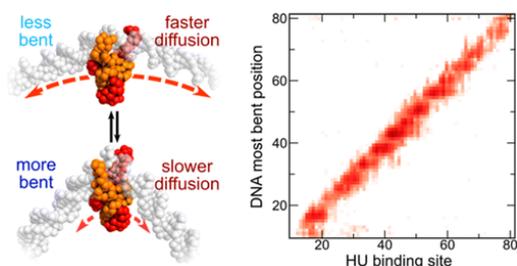
ヒストン H2A のバリエーションである H2A.Z が転写制御におけるクロマチンダイナミクスに関与していることが知られている。クロマチンに導入された H2A.Z の C 末端領域が転写因子 PWWP2A と相互作用しており、この相互作用が転写制御に重要な役割を果たすことを示した。

- Hybrid cellular metabolism coordinated by Zic3 and Esrrb synergistically enhances induction of naive pluripotency. Sone M, Morone N, Nakamura T, Tanaka A, Okita K, Woltjen K, Nakagawa M, Heuser JE, Yamada Y, Yamanaka S, *Yamamoto T. *Cell Metab* 25, 1103-1117 (2017).

山中因子に加え、Zic3 と Esrrb の2つの転写因子を同時にマウスの線維芽細胞に導入すると初期化効率が劇的に上昇することを明らかにした。さらに、Zic3 と Esrrb は協調的に解糖系の代謝を上昇させること、Zic3 は酸化的リン酸化を抑制する一方、Esrrb は酸化的リン酸化を活性化することを見出した。これらの結果は、転写ネットワークと代謝ネットワークが密接に関連し、体細胞の初期化を促していることを意味する。

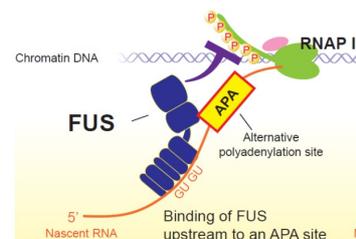
- Dynamic coupling among protein binding, sliding, and DNA bending revealed by molecular dynamics. Tan C, Terakawa T, *Takada S. *J Am Chem Soc* 138, 8512-8522 (2016).

転写因子のDNAへの結合、スライディングとDNAの曲げの共役について、分子シミュレーションを用いて解析した。例として用いたHUは、非特異的に結合したDNA部位を曲げる。HUのスライディングとDNAの屈曲は強く共役している。興味深いことに、HUが結合してDNAがいったん大きく屈曲するとHUはそこにトラップされ拡散が一時中止する。長い時間を経てDNAの曲がり解消されるとHUが拡散を再開する。転写因子のDNA上の移動は、DNAの曲がりなどの構造変化に大きく左右されることが分かった。



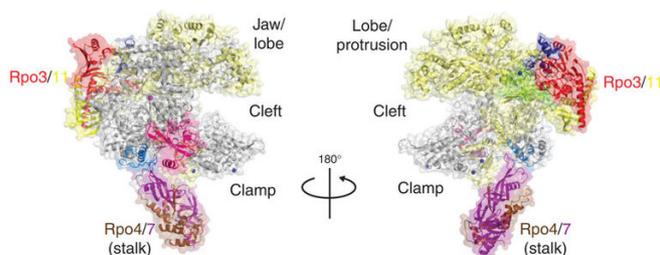
- Position-specific binding of FUS to nascent RNA regulates mRNA length. Masuda A, Takeda J, Okuno T, Okamoto T, Ohkawara B, Ito M, Ishigaki S, Sobue G, *Ohno K. *Genes Dev* 29, 1045-1057 (2015).

筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子の 1 つである FUS の機能を、各種次世代シーケンサー技術を用いて解析し、FUS が、神経細胞に発現する 6 割以上の遺伝子の mRNA 長の調節により神経分化を制御することを明らかにした。本研究成果は原因不明である神経変性疾患の発症機序解明に役立つことが期待される。



- The X-ray crystal structure of the euryarchaeal RNA polymerase in an open-clamp configuration. Jun SH, Hirata A, Kanai T, Santangelo TJ, Imanaka T, Murakami KS, *Nat Commun* 5, 5132 (2014).

平田らは、11 個のサブユニットで構成されたユーリアーキア RNA ポリメラーゼの X 線結晶構造の決定に成功した。本酵素と真核生物 RNA ポリメラーゼ II の立体構造を詳細に比較した結果、両酵素の全体構造は酷似しており、また、真核生物 RNA ポリメラーゼ II のみに保存された特異的挿入領域が、基本転写因子である TFIIF や TFIIF およびメディエーターとの相互作用に重要であることが明らかになった。



進化的に見ると、真核生物 RNA ポリメラーゼはユーリアーキア RNA ポリメラーゼを基盤にして、特異的挿入領域を獲得することで高次生命現象を制御することができるようになったことが示唆された。

- SWR1 and INO80 chromatin remodelers contribute to DNA double-strand break anchorage site choice at the nuclear periphery. Horigome C, Oma Y, Konishi T, Schmid R, Marcomini I, Hauer M, Dion V, Harata M, Gasser SM. *Mol Cell* 55, 626-39 (2014).

ゲノム機能の制御には核構造とクロマチンとの相互作用が関与している。本研究で、クロマチンリモデリング複合体の SWR1 と INO80 が、核膜の近傍におけるクロマチンダイナミクスに関わっていることが明らかとなった。

- Mediator directs co-transcriptional heterochromatin assembly by RNA interference-dependent and -independent pathways. Oya E, Kato H, Chikashige Y, Tsutsumi C, Hiraoka Y, Murakami Y. *PLoS Genet* 9, e1003677 (2013).

村上らの過去の研究から、分裂酵母ヘテロクロマチンの形成には、当該染色体領域が Pol II によって転写されることが重要であり、また RNAi に依存的な経路と非依存的な経路があることが分かってきた。本研究で新たに、Pol II の転写開始に関わるメディエーター複合体がヘテロクロマチン形成に必須であり、RNAi に依存的な経路と非依存的な経路の両方にメディエーターが関わっていることが分かった。

- Identification of telomere-associated molecules by engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP). Fujita T, Asano Y, Ohtsuka J, Takada Y, Saito K, Ohki R, Fujii H. *Sci Rep* 3, 3171 (2013).

藤井らは、転写をはじめとするゲノム機能発現の分子機構を生化学的に解析するため、分子間相互作用を保持したまま解析対象ゲノム領域を単離するための技術として、engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP) 法を世界に先駆けて開発した。本法に関して 2013 年に国内ならびに国際出願を行い、国内特許は 2016 年に成立した (特許第 5954808 号)。

2. 個別研究成果報告

山口 雄輝 領域代表者、計画研究 1 代表者
東京工業大学・生命理工学院・教授

研究課題名：Pol2 の転写伸長・終結・リサイクル過程におけるチェックポイント制御機構の解明

【研究目的】

転写開始後の過程については依然として未解決の課題が数多く残されている。たとえば、転写サイクル過程には複数のチェックポイントが存在することが分かってきたが、それらがどのように影響しあって転写サイクルを制御しているのか不明である。また、遺伝子の 5'末端と 3'末端が物理的・機能的に相互作用していることが分かってきたが、遺伝子ルーピングの機能や普遍性、その分子的基盤は不明である。さらに、"CTD コード"の解読や、転写サイクル制御が高次生命現象に果たす役割の解明も不十分である。解析手法の限界がその障害となっている。そこで本計画研究では以下の 4 つの課題に取り組んだ。

課題 1: ダイナミクスを解析可能な新規実験アプローチの開発

課題 2: 転写サイクルのダイナミクス解析

課題 3: Pol II のリン酸化サイクルの解明

課題 4: 普遍的な転写伸長装置が細胞の運命決定に果たす役割の解明

本稿では計画代表者の山口が中心となって取り組んだ研究成果を報告する。

【研究成果】

完全長 RNA を合成する上で、正しい位置からの転写開始と同じく、正しい位置での転写終結が重要だが、転写終結部位が正しく選び取られる機構はまだ十分に理解されていない。我々は、少なくとも 3 つ存在する 3'プロセッシング/転写終結経路が遺伝子ごとに適切に選択される機構の解明を進め、転写伸長因子 NELF (negative elongation factor) が競合する過程であるポリ(A)付加経路を阻害することによって、マイナーな経路であるステムループ依存的経路 (ヒストン遺伝子群) や 3' box 依存的経路 (snRNA 遺伝子群) を促進していることを見出した (図 1、Yamamoto *et al.* 2014)。さら

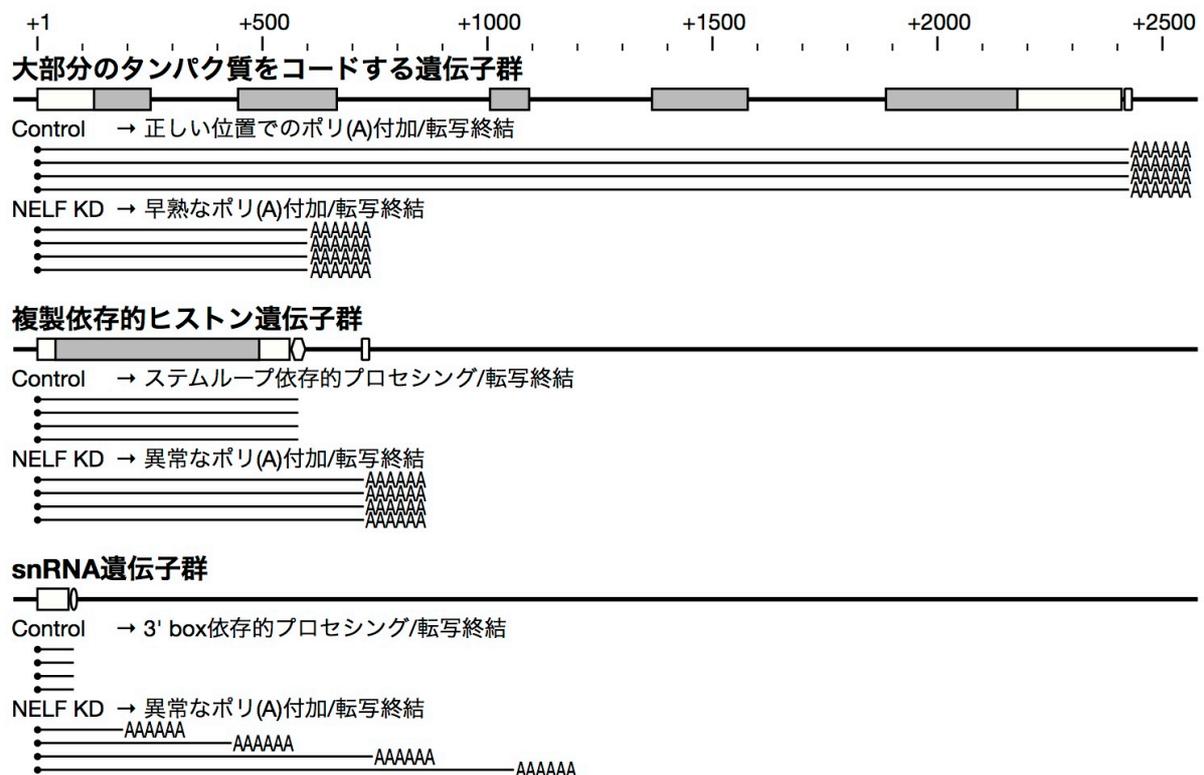


図 1. 3つの 3'プロセッシング/転写終結経路における NELF の役割

に「経路選択機構」の全容解明を目指して、focused shRNA library screening を行い、CBC (cap-binding complex) や NEXT (nuclear exosome targeting) complex が NELF と類似した機能を果たしていることを見出した (Zukeran *et al.* 投稿準備中)。

一般的なタンパク質をコードする遺伝子にも潜在的なポリ(A)付加部位が複数あることが多い。そこで次に、こうしたポリ(A)付加部位の選択機構も視野に入れて、転写終結部位のゲノムワイドマッピングを行った。その結果、NELF、CBC、NEXT のノックダウンは非常に類似した表現型を示し、数百の「遺伝子内部の隠れたポリ(A)付加部位」におけるポリ(A)付加/転写終結を誘導することが分かった。このことから、NELF、CBC、NEXT は共通した機構により遺伝子内部でのポリ(A)付加/転写終結を抑制し、完全長 mRNA の合成を可能にしていると考えられる (Zukeran *et al.* 投稿準備中)。

Pol II は転写伸長因子や転写終結因子、RNA プロセッシング因子等、多数の因子と相互作用しながら転写を進めており、転写複合体のリン酸化やクロマチンの翻訳後修飾がこの過程を制御していると考えられる。この複雑な制御過程について解析を進めてきた。たとえば、active な転写伸長のマークであるヒストン H2B-K120 モノユビキチン化 (H2Bub) の機能解明を目指して、化学合成した H2Bub で再構成したクロマチンと非修飾クロマチンとで差別的に結合するタンパク質を SILAC 法により探索し、SWI/SNF、DSIF、NELF、Integrator 等を H2Bub 結合タンパク質として同定した (Shema-Yaacoby *et al.* 2013)。また、H2Bub 修飾に重要な転写伸長因子 PAF1 複合体に注目して、PAF1 複合体の 6 つのサブユニットの比較解析を行ったところ、Rtf1 が他の 5 つのサブユニットとは異なる挙動を示し、独立した転写伸長因子として働いていることが示唆された (Cao *et al.* 2015)。さらに、エンハンサー・プロモーターのクロマチンループ形成に重要といわれる CTCF の機能解析を行った。その結果、CTCF は遺伝子コード領域において NELF と共局在し、NELF 依存的な Pol II の一時停止を制御していることを見出した (Laitem *et al.* 2015)。

【本研究課題に関する主要論文】

- Systematic identification of proteins binding to chromatin-embedded ubiquitylated H2B reveals recruitment of SWI/SNF to regulate transcription. Shema-Yaacoby E, Nikolov M, Haj-Yahya M, Siman P, Allemand E, Yamaguchi Y, Muchardt C, Urlaub H, Brik A, Oren M, Fischle W, *Cell Rep* 4, 601-8 (2013).
- DSIF and NELF interact with Integrator to specify the correct post-transcriptional fate of snRNA genes. Yamamoto J, Hagiwara Y, Chiba K, Isobe T, Narita T, Handa H, Yamaguchi Y, *Nat Commun* 5, 4263 (2014).
- CTCF regulates NELF, DSIF and P-TEFb recruitment during transcription. Laitem C, Zaborowska J, Tellier M, Yamaguchi Y, Cao Q, Egloff S, Handa H, Murphy S, *Transcription* 6, 79-90 (2015).
- Characterization of the Human Transcription Elongation Factor Rtf1: Evidence for Nonoverlapping Functions of Rtf1 and the Paf1 Complex. Cao QF, Yamamoto J, Isobe T, Tateno S, Murase Y, Chen Y, Handa H, Yamaguchi Y, *Mol Cell Biol* 35, 3459-70 (2015).

田村 智彦 計画研究 1 分担者
横浜市立大学・大学院医学研究科・教授

研究課題名：Pol2 の転写伸長・終結・リサイクル過程におけるチェックポイント制御機構の解明

【研究目的】

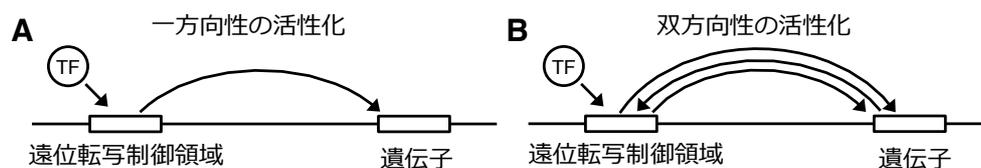
転写開始や転写伸長は、全ての遺伝子発現に必須な普遍的機構である。一方、細胞分化においては系譜特異的な遺伝子発現が不可欠である。しかしながら、この系譜「特異的」な遺伝子発現機構がどのように「普遍的」な転写装置と結びつき、分化に必要な遺伝子発現を導くかについては依然として不明な点が数多く残っている。

我々はこれまでに、Interferon Regulatory Factor (IRF) ファミリー転写因子による自然免疫担当細胞の分化制御や白血病との関連について研究を展開してきた (Tamura *et al. Annu Rev Immunol* 26:535, 2008)。特に IRF8 は血球特異的に発現する転写因子であり、単球を含む単核貪食細胞群の分化に重要な役割を持つ。

本研究では、系譜特異的な機構と普遍的機構の連携を導く基本原理の解明を目指し、IRF8 による血球分化をモデルにして、エピゲノムやトランスクリプトームなどの網羅的解析、ならびにバイオインフォマティクス解析を駆使し検討を行った。

【研究成果】

まず単球分化での、IRF8 による標的遺伝子の発現誘導機構を検証するため、横浜市立大の松本、三宅ら (研究計画 6) と共同でエピゲノム解析を行った。その結果、IRF8 が遠位エンハンサーを創出することによって、標的遺伝子の発現を導くことを見出した。さらに *in silico* DNA モチーフ解析によって転写因子カスケード「IRF8-KLF4 軸」を予測し、これが生体レベルでの単球分化に必須であることを明らかにした (Kurotaki *et al.* 2013)。次に、IRF8 によるエンハンサー形成と、普遍的な転写制御機構とがどのように結びつくかを検討するために、九州工業大学の藤井 (研究計画 7) とゲノム規模で、かつ定量的なエピゲノム解析を進めると共に、Klf4 遺伝子をモデルにした経時的に高精度なエピゲノム解析を行った。その結果、従来考えられてきた転写活性化機構とは異なり、エンハンサーと遺伝子が相互に活性化するという、新しい遺伝子発現機構を見出した (第 1 図)。この双方向性の活性化は、大阪大学の藤井 (公募班) と共同で作出した変異細胞株の解析によって確認され、さらに公共データベースに登録されているヒト血球細胞分化系のエピゲノムデータの解析によって、普遍性をもつ転写制御機構であることが判明した (西山ら、論文投稿準備中)。



第1図 A) 従来考えられている一方向性の遺伝子発現誘導のモデル。

B) 本研究にて見出された、多段階かつ双方向性の遺伝子発現誘導のモデル。

IRF8 は単球分化を誘導する際に好中球分化を抑制することによって系譜選択を行っている。この分子機構についても、トランスクリプトーム解析とパスウェイ解析によって IRF8 による転写因子 C/EBP α の活性阻害を予測し、これが好中球分化の抑制に重要であることを実証した (Kurotaki *et al.* 2014)。また単球に加え、アレルギーを引き起こす好塩基球とマスト細胞の分化においても IRF8 が必要な分子であることを示した。トランスクリプトーム解析と *in silico* DNA モチーフ解析によって IRF8 と GATA2 が形成する転写因子カスケードを予測し、これが好塩基球の産生に必須であることを明らかにした (Sasaki *et al.* 2015)。

さらに、IRF 転写因子ファミリーである IRF5 が関わる自然免疫応答、ならびに自己免疫疾患についても、網羅的解析を活用し研究を行った。まず IRF5 の抑制因子として Lyn チロシンキナーゼを同

定した。さらに Lyn による IRF5 の抑制機構が破綻すると IRF5 が恒常的に活性化してしまい、自己免疫疾患である全身性エリテマトーデスの発症を招くことを明らかにした (Ban *et al.* 2016)。

本研究においては、血球の分化ならびに応答について、網羅的解析とバイオインフォマティクス解析を活用し研究を進めた。中でも、本研究で見出した遠位エンハンサーとプロモーターの相互活性化という新しい転写制御機構については、現在、転写伸長との関連について計画研究代表者の山口らと研究を進めつつある。

【本研究課題に関する主要論文】

- Lyn kinase suppresses the transcriptional activity of IRF5 in the TLR-MyD88 pathway to restrain the development of autoimmunity. Ban T, Sato GR, Nishiyama A, Akiyama A, Takasuna M, Umehara M, Suzuki S, Ichino M, Matsunaga S, Kimura A, Kimura Y, Yanai H, Miyashita S, Kuromitsu J, Tsukahara K, Yoshimatsu K, Endo I, Yamamoto T, Hirano H, Ryo A, Taniguchi T, Tamura T, *Immunity* 45, 319-32 (2016).
- Transcription factor IRF8 plays a critical role in the development of murine basophils and mast cells. Sasaki H, Kurotaki D, Osato N, Sato H, Sasaki I, Koizumi S, Wang H, Kaneda C, Nishiyama A, Kaisho T, Aburatani H, Morse HC 3rd, Ozato K, Tamura T, *Blood* 125, 358-69 (2015).
- IRF8 inhibits C/EBP α activity to restrain mononuclear phagocyte progenitors from differentiating into neutrophils. Kurotaki D, Yamamoto M, Nishiyama A, Uno K, Ban T, Ichino M, Sasaki H, Matsunaga S, Yoshinari M, Ryo A, Nakazawa M, Ozato K, Tamura T, *Nat Commun* 5, 4978 (2014).
- Essential role of the IRF8-KLF4 transcription factor cascade in murine monocyte differentiation. Kurotaki D, Osato N, Nishiyama A, Yamamoto M, Ban T, Sato H, Nakabayashi J, Umehara M, Miyake N, Matsumoto N, Nakazawa M, Ozato K, Tamura T, *Blood* 121, 1839-49 (2013).

川内 潤也 計画研究 1 分担者 (H24~26)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究課題名：Pol2 の転写伸長・終結・リサイクル過程におけるチェックポイント制御機構の解明

【研究目的】

研究分担者の一人である川内は、本計画研究の課題のうち3.「Pol II のリン酸化サイクルの解明」および4.「普遍的な転写伸長装置が細胞の運命決定に果たす役割の解明」に取り組んでいる。転写サイクルの後半部分に相当する終結・リサイクリングは未解明の部分が非常に多い。Pol II リサイクリングと合致する現象としては Pol II CTD は脱リン酸化されることと、遺伝子が5'-3'でループ構造をとっているなどがあるが、転写サイクル内におけるリサイクリングに関しては世界的に見てもその解析系さえ存在していないといえる。終結・リサイクルまでを包括的に評価できる系が確立されれば、転写サイクルにおける各フェーズすべてを解析できることとなり、転写メカニズムに関する理解が大きく進歩するになる。一方、伸長、終結、リサイクルに関わる因子の *in vivo* での機能、変異による疾患なども報告されてきており、「普遍的な転写制御装置が細胞運命決定に果たす役割」を明らかにすることはこれら難治疾患への臨床応用も期待される。

転写伸張装置に関わる報告はこれまで転写再構築系など *in vitro* 系における研究からのものが主流であったが、実際の核内での機能についてはあまり明らかになっていないことが多い。一方、von Hippel-Lindau 病におけるエロンガンや Congenital Cataracts, Facial Dysmorphism, Neuropathy (CCFDN) における FCP1 など様々な難病に普遍的な転写装置に関わる疾患が明らかにされつつある。*in vivo* でのこれら分子の機能を明らかにすることは、疾患の病態解明と治療戦略への応用に結びつく基盤的な情報を提供することになる。

【研究成果】

川内は、転写サイクルのうち転写開始後の伸長・終結・リサイクリングについて研究している。転写伸長因子の一つであるエロンガン A は、これまで *in vivo* での機能はほとんど未解明であった。エロンガン A の *in vivo* 機能について解析を行い、細胞レベルとしては1) 転写伸長因子エロンガン A は迅速なストレス応答遺伝子発現に重要な役割を演じており、転写のフェーズにおける機能発揮の場は、伸長後期であることが示唆され、(2) ストレス応答遺伝子発現においては、エロンガン A のもう一つの機能である Pol II ユビキチン活性は必須ではないこと、を見いだした (Kawauchi *et al.* 2013)。また個体レベルの解析として、公募班の高橋らとともに行った共同研究で、エロンガン A ノックアウトマウスは胎生致死であるが、発生段階においてエロンガン A は神経堤細胞からの感覚神経への分化の制御に重要な役割を果たしていることを報告した。これら遺伝子における Pol II のリクルートを解析した結果、エロンガン A は転写伸長活性のみならず、Pol II そのもののプロモーターへのリクルートもしくは転写開始複合体の安定性にも重要な役割を演じている可能性が示された (Yasukawa *et al.* 2012)。伸長因子が転写開始に与える影響と言う点で興味深く、転写は各フェーズが影響を与えつつ全体として転写量を制御するサイクルであるという一つの知見と考えられる。

【本研究課題に関する主要論文】

- Role of activating transcription factor 3 (ATF3) in endoplasmic reticulum (ER) stress-induced sensitization of p53-deficient human colon cancer cells to tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis through up-regulation of death receptor 5 (DR5) by zerumbone and celecoxib. Edagawa M, Kawauchi J, Hirata M, Goshima H, Inoue M, Okamoto T, Murakami A, Maehara Y, Kitajima S, *J Biol Chem* 289, 21544-61 (2014).
- Transcriptional properties of mammalian elongin A and its role in stress response. Kawauchi J, Inoue M, Fukuda M, Uchida Y, Yasukawa T, Conaway RC, Conaway JW, Aso T, Kitajima S, *J Biol Chem* 288, 24302-15 (2013).

- Transcriptional elongation factor elongin A regulates retinoic acid-induced gene expression during neuronal differentiation. Yasukawa T, Bhatt S, Takeuchi T, Kawauchi J, Takahashi H, Tsutsui A, Muraoka T, Inoue M, Tsuda M, Kitajima S, Conaway RC, Conaway JW, Trainor PA, Aso T, *Cell Rep* 2, 1129-36 (2012).
- Key role of ATF3 in p53-dependent DR5 induction upon DNA damage of human colon cancer cells. Taketani K, Kawauchi J, Tanaka-Okamoto M, Ishizaki H, Tanaka Y, Sakai T, Miyoshi J, Maehara Y, Kitajima S, *Oncogene* 31, 2210-21 (2012).

高橋 秀尚 公募研究代表者 (H25~26)、計画研究 1 分担者 (H27~28)
北海道大学・大学院医学研究院・講師

研究課題名：Med26 によってリクルートされる新規転写伸長因子複合体 LEC の機能解明 (H25~26)、Pol2 の転写伸長・終結・リサイクル過程におけるチェックポイント制御機構の解明 (H27~28)

【研究目的】

多くのヒト遺伝子で RNA ポリメラーゼ II (Pol II) が転写開始直後に一時停止していることがわかり、遺伝子発現において転写伸長の過程が重要な役割を果たしていることがわかってきた。Pol II の一時停止が解除され、Pol II が RNA 合成を再開するためには、転写伸長因子が遺伝子領域へとリクルートされ、Pol II の一時停止を解除する必要がある。私はメディエーター複合体のサブユニット Med26 が転写伸長因子複合体” Super elongation complex” (SEC) と結合し、SEC を c-Myc や Hsp70 などの遺伝子領域にリクルートし、それらの遺伝子の転写伸長を促進することを明らかにした (Takahashi *et al.* 2011)。さらに、私は Med26 に結合するもう一つの転写伸長因子複合体” Little elongation complex” (LEC) も同定した。本研究では、Med26 が LEC をどのような遺伝子領域にリクルートし、転写伸長を制御するのかについて解明することを目的とする。

【研究成果】

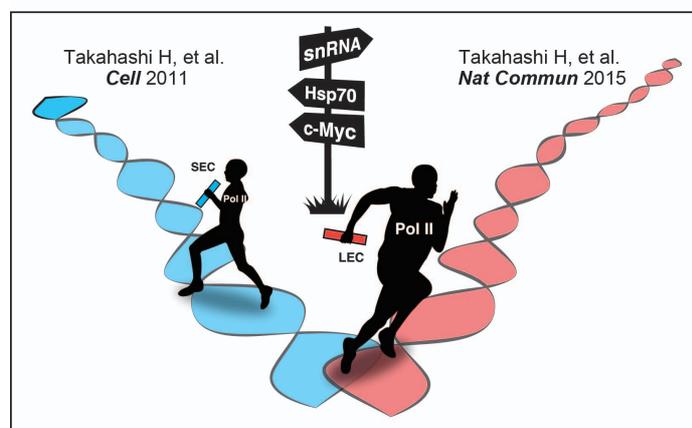
SEC は転写伸長因子 ELL/EAF、P-TEFb に加え、MLL 融合パートナー因子と呼ばれる AF4、AFF4、AF9 や ENL をコンポーネントとして有し、混合型急性白血病 (MLL) の発症に関与している。一方で、LEC は、転写伸長因子 ELL/EAF と機能未知の ICE1 や ICE2、ZC3H8 をサブユニットとして有す。

本研究によって、Med26 は LEC を small nuclear RNA (snRNA) などの non-coding RNA 遺伝子領域にリクルートし、それらの遺伝子の発現を促進することがわかった。このように Med26 は、遺伝子領域で Pol II に手渡す転写伸長因子複合体 (SEC と LEC) を使い分けることによって、異なる遺伝子の発現を制御する可能性が示唆された (図参照)。

さらに、本研究によって、Med26 と LEC は、snRNA 遺伝子だけではなく、複製依存的ヒストン (Replication dependent Histone) 遺伝子の転写制御

にも機能することがわかった。snRNA 遺伝子や複製依存的ヒストン遺伝子の mRNA は、ポリアデニル化 (ポリ A 付加) されない。本研究によって、Med26 と LEC は、ポリ A のない遺伝子の転写を正常に終結させることによって、mRNA へのポリ A の付加を抑制する可能性が示唆された。

Pol II に手渡されたバトン (SEC か LEC か) によって進む道 (発現遺伝子) が変わる。



【本研究課題に関する主要論文】

- p53 represses the transcription of snRNA genes by preventing the formation of little elongation complex. Anwar D, Takahashi H, Watanabe M, Suzuki M, Fukuda S, *Hatakeyama S, **BBA Gene Regulatory Mechanisms** 1859, 975-82 (2016).
- TRIM29 regulates the assembly of DNA repair proteins into damaged chromatin. Masuda Y, Takahashi H, Sato S, Tomomori-Sato C, Saraf A, Washburn MP, Florens L, Conaway RC, Conaway JW, Hatakeyama S. **Nat Commun** 6, 7299 (2015).

- MED26 regulates the transcription of snRNA genes through the recruitment of little elongation complex. Takahashi H, Takigawa I, Watanabe M, Anwar D, Shibata M, Tomomori-Sato C, Sato S, Ranjan A, Seidel CW, Tsukiyama T, Mizushima W, Hayashi M, Ohkawa Y, Conaway JW, Conaway RC, Hatakeyama S. *Nat Commun* 6, 5941 (2015).

伊藤 敬 計画研究2 代表者
長崎大学・大学院医歯薬総合研究科・教授

研究課題名：遺伝子転写再構築系による転写サイクル制御機構の解明

【研究目的】

遺伝子転写再構築系により転写サイクルによる遺伝子転写開始機構を明らかにする。特にヒストンの翻訳後修飾とクロマチン構造と転写の間のクロストークを解明することによって、生体内での転写サイクルと生命現象との接点を探る。

①転写サイクルにおいてダイナミックに変化するヒストン翻訳後修飾がクロマチン構造変換と遺伝子転写開始のネットワーク制御機構に与える影響を *in vitro* 再構築系にて明らかにする。

②領域全体での共同研究により、試験管内で明らかにした機構をゲノムワイドの機構に対比させ、生理現象との関連を解析する。

【研究成果】

遺伝子転写再構築系及びがん細胞を用いてヒストンのリン酸化が癌化を引き起こすことを明らかにした。我々はヒストン蛋白の翻訳後化学修飾の中でも特にリン酸化に注目しヒストン H2A の C 末端リン酸化が種々の癌細胞において亢進していることを明らかにした。これらのリン酸化は我々が同定したショウジョウバエ NHK-1 のヒトホモログーVRK1 により触媒されることを証明した。培養細胞を用いてヒストンリン酸化酵素である VRK1 をノックダウンすると種々の遺伝子発現が低下し癌細胞増殖も低下する。複数の細胞で共通して発現が低下し、癌細胞増殖と関連し癌遺伝子と考えられているものとして Cyclin D1 を見いだした。Cyclin D1 の遺伝子発現を調節するプロモーター領域では VRK1 の局在とヒストン H2A の C 末端リン酸化を認めた (図1)。

ヒストン H2A の C 末端リン酸化の癌化への役割を明らかにするため、ヒストン H2A Thr120 をリン酸化トレオニンの模倣であるアスパラギン酸で置換し NIH3T3 に導入し高発現とした。変異ヒストンの発現は NIH3T3 を悪性転化トランスフォームすることを明らかにした。これらの所

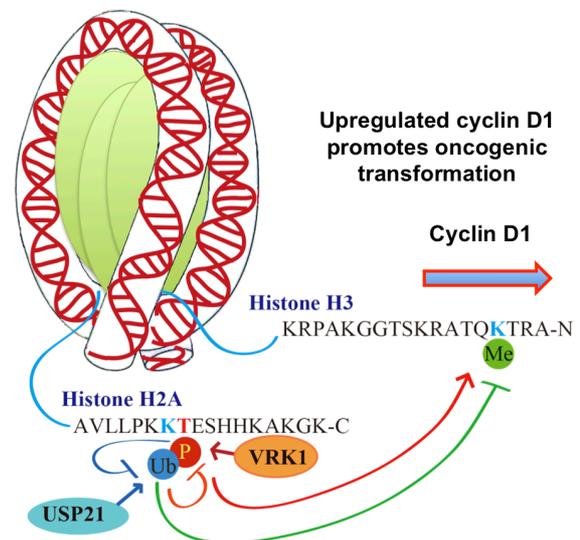
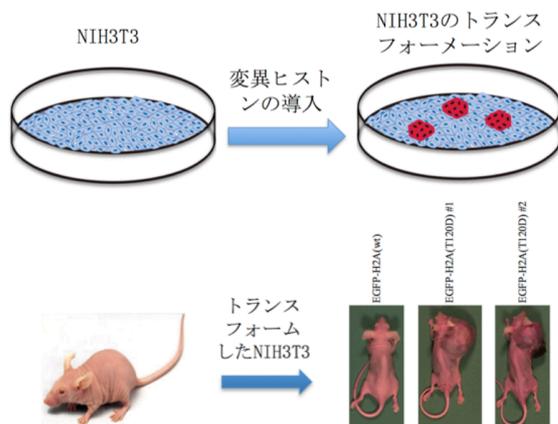


図1 VRK1 はヒストン H2AT120 のリン酸化を触媒し間接的にヒストン H2AK119 のユビキチン化を抑制する。細胞内においてもヒストン H2A のリン酸化は直接的間接的にプロモーター領域ヒストン H3K4 のメチル化を促進する事により CyclinD1 などの発現を上昇させ発癌に関与する事を明らかにした (Aihara *et al.* 2016)。

図2:ヒストン H2AT120 の変異そのものが発癌を引き起こす事を明らかにした (Aihara *et al.* 2016)。

見はヒストン修飾酵素の異常が癌化を引き起こすエピジェネティックなメカニズムを証明したものである (図2) (Aihara *et al.* 2016)。

【本研究課題に関する主要論文】

- Histone H2A T120 phosphorylation promotes oncogenic transformation via upregulation of cyclin D1. Aihara H, Nakagawa T, Mizusaki H, Yoneda M, Kato M, Doiguchi M, Imamura Y, Higashi M, Ikura T, Hayashi T, Kodama Y, Oki M, Nakayama T, Cheung E, Abratani H, Takayama K, Koseki H, Inoue S, Takeshima Y, Ito T, *Mol Cell* 64, 176-88 (2016).
- SMARCAD1 is an ATP-dependent stimulator of nucleosomal H2A acetylation via CBP, resulting in transcriptional regulation. Doiguchi M, Nakagawa T, Imamura Y, Yoneda M, Higashi M, Kubota K, Yamashita S, Asahara H, Iida M, Fujii S, Ikura T, Liu Z, Nandu T, Kraus W. L., Ueda H, Ito T, *Sci Rep* 6, 20179 (2016).
- Dzip3 regulates developmental genes in mouse embryonic stem cells by reorganizing 3D chromatin conformation. Inoue D, Aihara H, Sato T, Mizusaki H, Doiguchi M, Higashi M, Imamura Y, Yoneda M, Miyanishi T, Fujii S, Okuda A, Nakagawa T, Ito T, *Sci Rep* 5, 16567 (2015).
- Enhancer of Acetyltransferase Chameau (EACm) Is a Novel Transcriptional Co-Activator. Nakagawa T, Ikehara T, Doiguchi M, Imamura Y, Higashi M, Yoneda M, Ito T, *PLoS One* 10, e0142305 (2015).

大熊 芳明 計画研究2分担者
長崎大学・大学院医歯薬総合研究科・客員研究員

研究課題名：遺伝子転写再構成系による転写サイクル制御機構の解明

【研究目的】

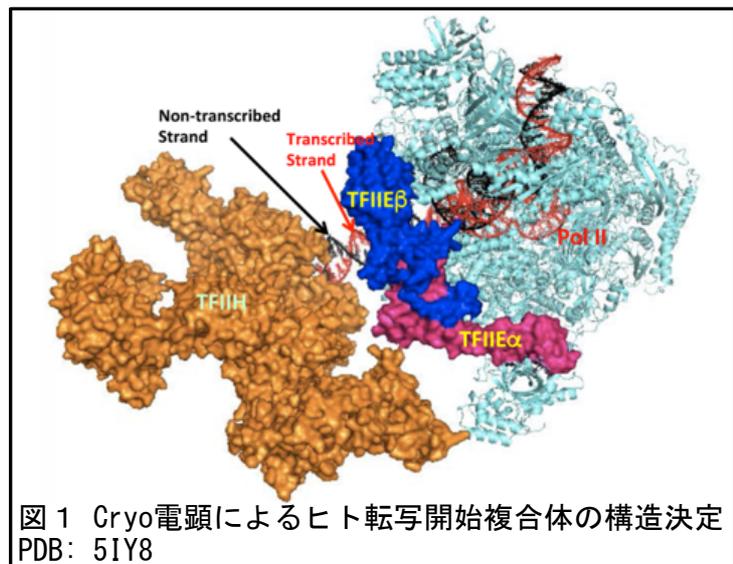
ヒトなどの高等真核生物では、遺伝子は生体内で時空間的に厳密に発現制御されている。中でも遺伝子発現の第一段階である転写は、多くの転写関連因子のターゲットとなる重要な過程である。そこで本研究課題では、転写サイクルにおける転写開始と開始から伸長への移行段階の際に、タンパクをコードする全遺伝子の転写を担う RNA ポリメラーゼ II (Pol II) に引き起こされる構造と機能のダイナミックな変換における基本転写因子 TFIIE と TFIIH の役割と、転写共役複合体であるメディエーター複合体による転写サイクルとシグナルネットワークの制御により引き起こされる生命現象の解明を目的とした。

【研究成果】

1. Pol II の転写開始と開始から伸長への移行段階における基本転写因子 TFIIE と TFIIH の役割

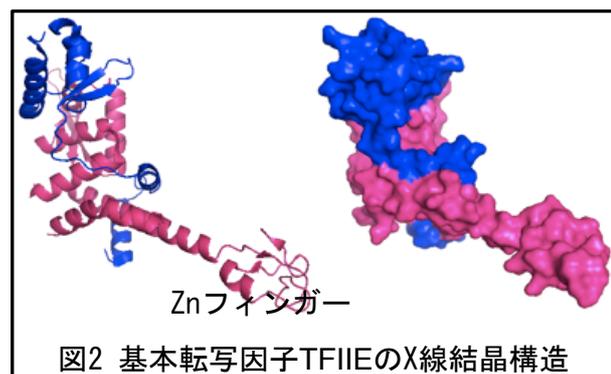
Pol II は、必要な遺伝子を転写する際に正確、効率的に転写を開始するために遺伝子のプロモーター上でダイナミックな構造変換と活性化を起こす。この際に酵素活性を持つ 1 基本転写因子 TFIIH と、これをリクルートする 2 サブユニットの TFIIE は Pol II 最大サブユニット C 末の CTD 領域をリン酸化し、さらに TFIIE が Pol II クランプと柄の領域に結合して構造変換を起こすことが我々の機能解析と構造生物学のグループによる成果から明らかになってきた (図 1) (Tanaka *et al.* 2015, He *et al.* 2016)。

図 1 Nogales らは、転写鎖 transcribed strand (赤) と非転写鎖 non-transcribed strand (黒) からなるプロモーター上のヒト転写開始複合体を構造決定した。TFIIE の 2 サブユニット α と β は、 β が Pol II (水色) の DNA を挟む上部(上顎)領域と結合し、 α で下部(クランプ)領域に結合することで上下を橋渡しし、開閉を制御する。TFIIE が複合体にリクルートする TFIIH は赤茶色で示した。



この Cryo 電顕による構造解析は、その解像度は 3.9~8.6Å と複合体内の領域ごとに異なり、原子レベルでの構造の理解はできないが、我々はヒト TFIIE の 2 サブユニットの部分構造 (α : 1-217aa, β : 141-244aa) を X 線構造解析により 2.1Å の原子レベルで決定することができた (図 2) (Miwa *et al.* 2016, PDB ID: 5GPY)。

図 2 ヒト TFIIE を大腸菌で発現し、X 線結晶解析した。PyMol を用い左にリボン構造、右は表面構造を示す。 α は右下の Zn フィンガーで Pol II の柄 (Stalk) と結合し、C 末側で折返して β との結合方向に向かっている。



2. メディエーター複合体による転写サイクルとシグナルネットワークの制御により引き起こされる生命現象の解明

メディエーター複合体は、30 個のサブユニットからなる真核生物で保存された複合体で、転写開始複合体に結合して転写制御因子からのシグナルを Pol II に伝える。我々は PMA で HeLa 細胞を刺激して免疫活性化すると、平常時にはプロモーターの転写開始領域に結合して転写を抑えているメディエーターキナーゼモジュールが解離することで転写が活性化されること、その際にヒストンをアルギニンメチル化する転写抑制因子 PRMT5 も解離すること、可逆的に平常時は PRMT5 がキナーゼモジュールに結合して転写を抑制していることを明らかにした (図 3) (Tsutsui *et al.* 2013)。

脂肪細胞には褐色、白色、ベージュの3種あり、褐色とベージュ細胞は脂肪の分解に関与する。我々はロックフェラー大学 Roeder 教授の研究室と共同で、これら脂肪細胞への分化に関わる転写活性化因子 PRDM16 が、メディエーターのミドルモジュールに含まれる MED1 サブユニットを介してメディエーターと協調的に褐色細胞分化に必要な Ucp1 遺伝子の転写を活性化することを明らかにした (Iida *et al.* 2015)。

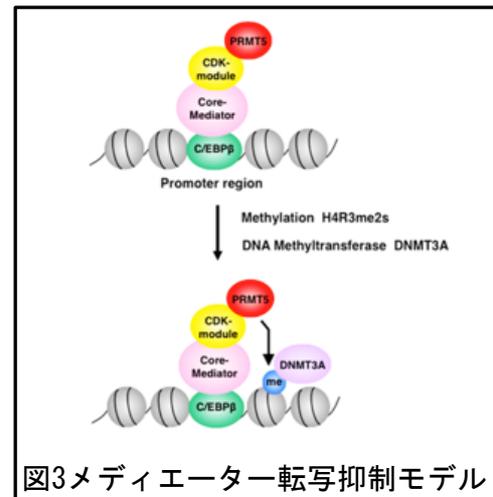


図3メディエーター転写抑制モデル

【本研究課題に関する主要論文】

- i) Pol II の転写開始と開始から伸長への移行の際の基本転写因子の機能の解析
 - Crystal Structure of Human General Transcription Factor TFIIE at Atomic Resolution. Miwa K, Kojima R, Obita T, Ohkuma Y, Tamura Y, Mizuguchi M, *J Mol Biol* 428, 4258-66 (2016).
 - Association of the Winged Helix Motif of the TFIIE α Subunit of TFIIE with Either the TFIIE β Subunit or TFIIB Distinguishes Its Functions in Transcription. Tanaka A, Akimoto Y, Kobayashi S, Hisatake K, Hanaoka F, Ohkuma Y, *Genes Cells* 20, 203-16 (2015).
 - Ssu72 regulates and coordinates 3' end formation of RNAs transcribed by RNA polymerase II in vertebrates. Wani S, Yuda M, Fujiwara Y, Yamamoto M, Haada F, Ohkuma Y, Hirose Y, *PLoS ONE* 9, e106040 (2014).
- ii) メディエーター複合体による転写サイクルとシグナルネットワークの制御の解析
 - PRDM16 enhances nuclear receptor-dependent transcription of the brown fat-specific Ucp1 gene through interactions with Mediator subunit MED1. Iida S, Chen W, Nakadai T, Ohkuma Y, Roeder, RG, *Genes Dev* 29, 308-321 (2015).
 - Mediator complex recruits epigenetic regulators through its two CDK subunits to repress transcription of immune response genes. Tsutsui T, Fukasawa R, Shinmyouzu K, Nakagawa R, Tobe K, Tanaka A, Ohkuma Y, *J Biol Chem* 288, 20955-65 (2013).

高橋 陽介 計画研究3代表者
 広島大学・大学院理学研究科・教授

研究課題名：植物の成長制御エンハンソームの解析

【研究目的】

光エネルギーを化合物に転換することで、地球上における他のすべての生命を支える植物は、自らは移動せず、大地に根を張り、外部環境の激しい変化を克服して生育する。周囲の環境変化に適応し太陽光の捕捉効率を最適化するために、柔軟に形態を変化させる機構は陸上植物の繁栄に必須であった。ジベレリン（GA）は植物の成長に顕著な促進作用を示す植物ホルモンである。GA は外部環境との関連が深く、光や温度は GA 生合成酵素遺伝子の発現に影響を与える。GA 信号伝達のスイッチである DELLA タンパク質は、GA 信号伝達の負の制御因子として同定されたが、むしろ成長抑制因子として捉えた方がより正確である。たとえば塩ストレスや植物ホルモン ABA は DELLA の安定化により成長を抑制する。GA は DELLA のユビキチン化による分解を介して成長を促進する。したがって DELLA は複数の信号伝達経路のノード（node, 節点）である。胚軸伸長において光は抑制的であり、GA は促進的である。光は受容体のフィトクロムを介して転写因子 PIF を分解し、胚軸伸長を抑制する。一方 DELLA は PIF と結合しその機能を抑制している。GA は DELLA の分解により PIF の抑制を解除し胚軸の伸長を促進する。しかし PIF が分解される明条件においても GA は明確な伸長成長を引き起こすので、PIF 以外に、より重要な未知の DELLA の標的タンパク質が存在しているはずである。

本研究では信号伝達のクロストークの分子の実体を、転写因子複合体の再構成と捉え、未知の DELLA 結合タンパク質を同定し転写制御における複合体の機能と動態の解析を目的とした。

【研究成果】

これまで GA による転写制御は GA が DELLA による転写活性化因子の抑制を解除し転写を促進するモデルで説明されてきた。しかしこのモデルは GA による転写への影響は主に抑制的であるというゲノムワイドの解析結果と矛盾している他、GA 生合成酵素遺伝子のフィードバック制御の分子機構を説明出来なかった。GA の内生量が低下し、DELLA が安定な状況で転写を促進するメカニズムが存在するはずである。我々は DELLA と特異的に結合する転写因子 GAF1 を同定し、DELLA が GAF1 のコアクティベーターとして機能することを発見した。GAF1 は植物のコリプレッサー TPR とともに *in vivo* において結合することを明らかにした。さらに GAF1-DELLA 転写活性化複合体は GA 刺激を受けると GAF1-TPR 転写抑制複合体に機能転換することを明らかにした。GA 生合成酵素遺伝子上の GAF1 結合配列に変異を導入すると植物体における GA 生合成酵素遺伝子のフィードバック制御が失われた。これらの結果は従来の GA による転写制御モデルの矛盾を一挙に解決するものである。すなわち DELLA はタイトレーションとコアクティベーションの二つの機能で GA に関連した二つの遺伝子群の一方を OFF に、他方を ON に、同時に統括制御しているのである（図 1）。

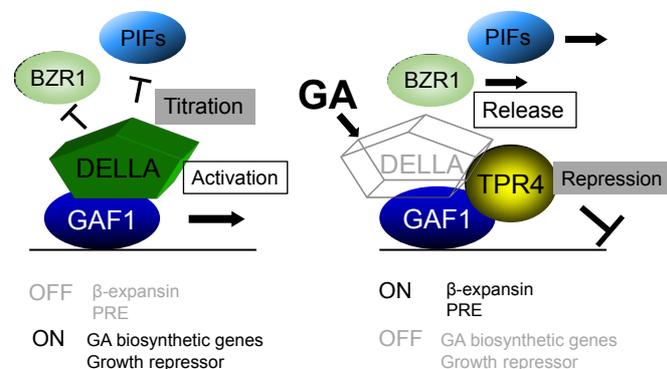


図 1 DELLA による GA 依存的な正と負の転写制御モデル

GA の内生量が低い時 DELLA は PIF などの転写活性化因子と結合し DNA への結合を阻害すると同時に GAF1 と複合体を形成し GA 生合成遺伝子などの転写を促進する。GA の内生量が増大すると、DELLA が分解され PIF などは伸長成長に関与する遺伝子の転写が促進され、GAF1-TPR 複合体により GA 生合成遺伝子などの転写が抑制される。

次に GAF1 複合体の花成における標的遺伝子を探索した。花成は栄養成長から生殖成長への転換であり、植物の生活環において最も重要な局面の一つである。花成は 4 つの経路により制御されていると考えられており、その一つが GA 経路である。GAF1 の過剰発現体では花成の促進が、*gaf1 gaf2* 二重変異体では逆に花成の抑制が観察された。GA 刺激を受けると GAF1 は転写抑制複合体を形成するので、GAF1 は負の花成制御遺伝子の転写抑制を介して花成を促進すると予想された。花成制御における GAF1 の標的遺伝子を同定するために GAF1 の発現を人為的に誘導可能な形質転換植物を作製した。GAF1 の発現を誘導した後、RNA-seq と ChIP-seq を行った。GAF1 の標的遺伝子と考えられる ALP1059 (仮名) の機能喪失型変異体を取得して、その表現型を解析した。ALP1059 の欠損により、植物体は GA を投与されたかのような徒長形質を示し、さらに花成が促進されていた。ALP1059 は GA による成長と花成の制御に関与する遺伝子と考えられた。

【本研究課題に関する主要論文】

- Autophosphorylation affects substrate-binding affinity of tobacco Ca^{2+} -dependent protein kinase1. Ito T, Ishida S, Oe S, Fukazawa J, Takahashi Y, *Plant Physiol*, in press.
- DELLA-GAF1 complex is a main component in gibberellin feedback regulation of *GA20ox2* in *Arabidopsis*. Fukazawa J, Mori M, Watanabe S, Miyamoto C, Ito T, Takahashi Y, *Plant Physiol*, in press.
- DELLAs function as coactivators of GAI ASSOCIATED FACTOR1 in regulation of GA homeostasis and signaling in *Arabidopsis*. Fukazawa J, Teramura H, Murakoshi S, Nasuno K, Nishida N, Ito T, Yoshida M, Kamiya Y, Yamaguchi S, Takahashi, Y, *Plant Cell* 26, 2920-38 (2014).
- Scaffold function of Ca^{2+} -dependent protein kinase: NtCDPK1 transfers 14-3-3 to the substrate RSG after phosphorylation. Ito T, Nakata M, Fukazawa J, Ishida S, Takahashi Y, *Plant Physiol* 165, 1737-50 (2014).



図 2 GAF1 の標的遺伝子 ALP1059 の欠損変異体の表現型

GAF1 の標的遺伝子 ALP1059 が欠損した変異体は GA が投与されたかのような徒長形質を示し、花成も促進されていた。ALP1059 は成長と花成の抑制因子であり、GA は ALP1059 の転写抑制を介して成長と花成を促進していると考えられた。

緒方 一博 計画研究 4 代表者
横浜市立大学・大学院医学研究科・教授

研究課題名：静的・動的分子構造解析を基盤とした転写サイクル制御機構研究

【研究目的】

転写因子は、遺伝子発現制御の引き金となるタンパク質で、標的遺伝子のエンハンサー上にエンハンソームと呼ばれる転写因子高次複合体を形成することで、細胞分化誘導を始めとする細胞の機能発現における根源的な役割を果たすと考えられる。標的エンハンサー上に形成されるエンハンソームは、標的遺伝子の発現を制御するのみならず、細胞内情報伝達系としての化学修飾カスケードの終着点でもあり、多様な細胞内情報カスケードの統合の場としても機能していると想定される。すなわち、転写因子は多様な組み合わせでエンハンサー-DNA に結合するとともに、細胞環境に応じた特異的な細胞シグナルにより転写因子が化学修飾を受けることで、エンハンソームの形成が制御されていると考えられる。しかしこの複雑かつ動的な複合体の分子構造—機能相関についての知見は極めて乏しく、例えばがんにおいて、その最大の原因分子と目される転写因子の分子変異による発症の分子機構などについては、ほとんど解明されていない状況にある。

本研究では、細胞シグナルの存在下でのエンハンソームの形成・解離の動的な過程を分子構造レベルで解析し、転写因子の化学修飾による遺伝子発現制御機構を分子構造レベルで解明することを目指す。

【研究成果】

(1) *tcrα* エンハンソームにおける転写因子のリン酸化の影響の解析

T 細胞抗原受容体 α 鎖遺伝子(*tcrα*)のエンハンサー上に形成される Ets1-Runx1-CBF β -DNA 複合体を例にとり、Ets1 のリン酸化が、転写因子-DNA 高次複合体形成に与える影響を、分子構造解析と機能解析の両面から調べた。*tcrα* エンハンサーは、転写因子 Runx1 と Ets1 が隣接して協調的に結合する、高度に保存された DNA 配列を含んでいる。Ets1 は、DNA 結合ドメイン近傍に DNA 結合活性の制御領域を持ち、この領域がカルシウムシグナル依存的にリン酸化を受けることによって、Ets1 の DNA 結合活性は強く抑制され、標的遺伝子の転写が抑制されることが知られている。

我々は、*tcrα* エンハンソームのコアとなる Ets1-Runx1/CBF β -DNA 4 者複合体に及ぼす Ets1 のリン酸化の影響について、ゲルシフトアッセイおよび転写活性化実験により調べたところ、予想に反して Ets1 は DNA から解離せず、維持されることを見出した。つまり、パートナー転写因子 Runx1

が、Ets1 のリン酸化の効果を打ち消している可能性が考えられた。Ets1 と協調的に DNA に結合するパートナー転写因子としては、Runx1 以外に B 細胞の分化に関わる *mb1* 遺伝子のエンハンサーに結合する転写因子 Pax5 が知られている。また、Ets1 は *stromelysin-1* のエンハンサー-DNA に Ets1 自身をパートナーとして協調的に結合する。ところが、これらの複合体においてはパートナー転写因子の存在下にも関わらず、リン酸化 Ets1 の DNA 結合は抑制され、標的遺伝子の転写活性も低下し

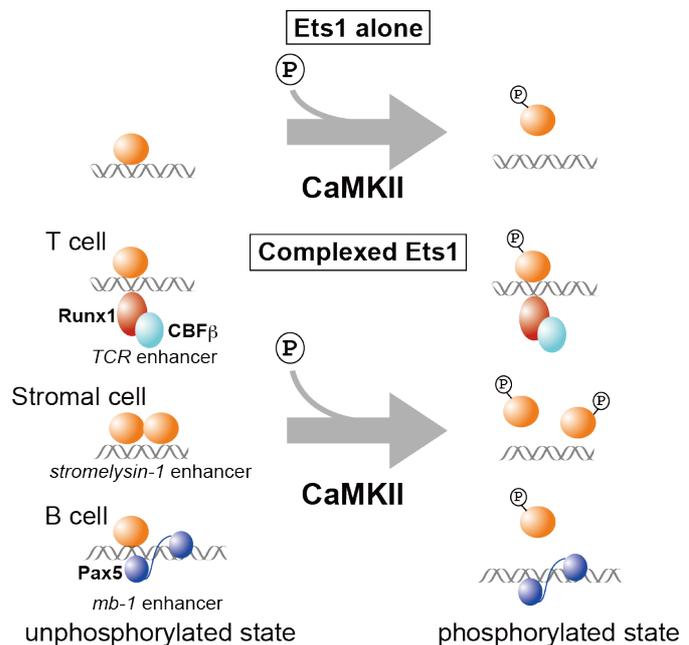


図 1. パートナー転写因子に依存的な Ets1 のリン酸化の作用

た(図1)。以上のことから、Ets1 のリン酸化による DNA 結合および転写活性の制御効果は、標的エンハンサー上で協調的に DNA に結合するパートナー転写因子の種類によって異なることが明らかになった。

Runx1 が Ets1 のリン酸化の効果を打ち消す分子機構を解明するため、我々は Ets1-Runx1/CBF β -DNA 4 者複合体の X 線結晶構造を明らかにした(図2)。すでに他グループによって報告されている Ets1-Pax5-DNA 複合体、あるいは Ets1-Ets1-DNA 複合体中の Ets1 の分子構造と比較したところ、Ets1 の DNA 結合の調節領域に Runx1 依存的な特異的構造の誘起を認め、この構造誘起がエンハンソソームの安定性を強固にしていると考えられた。すなわち Ets1 が、パートナー転写因子依存的に自身のコンフォメーションを変換し、Ets1 のリン酸化による効果を制御する可能性が考えられた。この分子機構の詳細に迫るため Ets1 のリン酸化による DNA 結合の抑制効果の分子機構の解明を目指し、次の研究を行った。

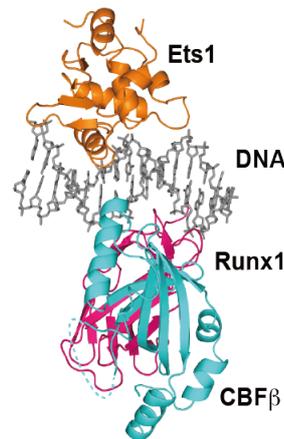


図2. X線結晶構造解析により決定された Ets1-Runx1/CBF β -DNA 四者複合体の分子構造

(2) Ets1 の天然変性領域のリン酸化による DNA 結合抑制作用の分子機構の解析

Ets1 のリン酸化による DNA 結合の抑制効果は、Runx1 と協調することにより解除され、この解除の分子メカニズムとして、Runx1 依存的に誘起される Ets1 の特異的なコンフォメーションの関与が想定された。Runx1 によって選択される Ets1 の特異的コンフォメーションが、リン酸化による Ets1 の DNA 結合抑制を免れる機構を明らかにするためには、Ets1 のリン酸化が、Ets1 の DNA 結合を抑制する分子機構を分子構造レベルで詳細に紐解く必要がある。そこで、リン酸化 Ets1 単体およびリン酸化 Ets1-Runx1/CBF β -DNA 複合体の結晶構造解析を行い、分子構造を明らかにした。しかし、リン酸化部位を含む Ets1 の DNA 結合制御領域の電子密度は観測されなかった。この結果は、リン酸化された制御領域は、分子内あるいは分子間で少なくとも安定な相互作用には関与していないことを示唆している。この例が示すように、動的に不安定な相互作用を分子構造レベルで描出することは従来の実験的な構造解析手法では限界がある。そこで、転写サイクル班員の中村との共同研究により、分子シミュレーションの手法を用いて解析を行った。具体的には、マルチカノニカル分子動力学法 (McMD) により、リン酸化された Ets1 の活性制御領域のコンフォメーション空間を探索した。その結果、Ets1 の DNA 結合面にリン酸化領域が相互作用しているコンフォマーが、高い割合で存在していることが見出された(中村班との共同研究として投稿準備中)。この DNA 結合抑制型ともいえる Ets1 コンフォマーは、リン酸化されたセリンを巻き込んだヘリックス形成を伴っており、リン酸化依存的であると考えられた。この Ets1 の DNA 結合面に相互作用したリン酸化領域が、DNA に対して拮抗的に作用し、DNA 結合を抑制すると考えられた。興味深いことに、Runx1 と協調的に DNA に結合する Ets1 のコンフォマーは、McMD で捉えられた DNA 結合抑制型のコンフォマーとは大きく異なっており、Ets1 のリン酸化領域が DNA 結合面に相互作用することができないために DNA 結合の抑制効果を発揮しないことが想定された。すなわち、Runx1 は、tcr α エンハンサー上でリン酸化による DNA 結合の抑制効果を免れた Ets1 コンフォマーを特異的に安定化することにより、tcr 遺伝子の発現特異性を確定していると考えられた。

【本研究課題に関する主要論文】

- Molecular mechanisms of cooperative binding of transcription factors Runx1-CBF β -Ets1 on the TCR α gene enhancer. Kasahara K, Shiina M, Fukuda I, Ogata K, Nakamura H, *PLoS One* 12, e0172654 (2017).
- A novel allosteric mechanism on protein-DNA interactions underlying the phosphorylation-dependent regulation of Ets1 target gene expressions. Shiina M, Hamada K, Inoue-Bungo T,

- Shimamura M, Uchiyama A, Baba S, Sato K, Yamamoto M, Ogata K, *J Mol Biol* 427, 1655-69 (2015).
- Crystallization of the Ets1-Runx1-CBF β -DNA complex formed on the TCR α gene enhancer. Shiina M, Hamada K, Inoue-Bungo T, Shimamura M, Baba S, Sato K, Ogata K, *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* F70, 1380-84 (2014).

十川 久美子 計画研究5 代表者
東京工業大学・生命理工学院・准教授

研究課題名：生細胞核の複数種蛍光 1 分子イメージング定量解析による転写サイクルの機構解明

【研究目的】

1 分子イメージング観察と定量解析を、転写サイクルの動態観察のために最適化する。開発した技術を駆使し、転写に関わるタンパク質群の個々の振る舞いや相互作用を、時空間の関数として高精細計量する。転写反応では RNA ポリメラーゼ、転写因子群の多くのタンパク質が複合体を形成し機能している。複合体は一定不変でなく、細胞刺激応答によりダイナミックに変化している。しかも、特定の時期に DNA の特定の場所に限定し段階的に起きる。複雑な時空間制御を適切に計測する方法が無いために未解明の点が多い。個々のタンパク質を直接観察計測できる 1 分子イメージング定量技術の特性を生かし、核内での転写サイクルの時空間制御解明に迫ることを目的とした。

【研究成果】

(1) 細胞の活性化に伴う転写因子の細胞質から核への移行を解析する目的で、核膜孔複合体の 3 色同時 1 分子イメージングの観察系を確立した。核膜孔複合体構成タンパク質を位置マーカーとして、核膜通過時のタンパク質の定量解析が可能になった。また、分裂酵母の核膜孔複合体構成タンパク質の蛍光 1 分子定量解析により、発芽酵母やヒトと異なる特徴的な組成を示すことが分かった (Asakawa *et al.* 2014)。

(2) 転写開始におけるヌクレオソームリモデリングの役割解明のために、INO80 複合体構成タンパク質について、1 分子イメージング解析と FRAP (光褪色後蛍光回復法) を組み合わせた解析を進めた。領域内の原田昌彦および連携研究者の木村宏との共同研究により、構成タンパク質である Ino80, Arp4, Arp8 の解析を進めた。1 分子動態の高精細な軌跡追跡法を開発することにより、細胞内 ATP が複合体への結合解離に重要な役割を果たしていることを明らかにした (伊藤、光塾、2016)。また、原田昌彦らとの共同研究により、構成タンパク質である核内アクチンの可視化を進め、核内アクチンが OCT4 などの転写因子の発現を活性化することを明らかにした (Yamazaki *et al.* 2014)。

(3) RNA ポリメラーゼ II の最大サブユニット C 末端 (CTD) の繰返し配列 (YSPTSPS) 中にあるセリンのリン酸化状態は、転写開始点結合時 (非リン酸化状態)、転写開始時 (5 番目のセリンリン酸化)、転写伸長時 (2 番目のセリンリン酸化) で変化する。木村宏らとの共同研究により、リン酸化セリンに対する蛍光抗体フラグメントを用いて、転写開始型と転写伸長型に対する結合タンパク質の推移を解析した。ホルモン添加時に、ホルモン誘導性遺伝子の繰返し配列 (遺伝子アレイ) における遺伝子活性化を可視化した。この方法により、ヒストン H3 アセチル化が転写因子の DNA への結合と転写伸長反応の両方に働くことを明らかにした (図 1) (Stasevich *et al.* 2014)。

(4) 核内転写関連タンパク質の動態は、細胞外からの刺激に応答し変化しているために、細胞表面での刺激受容体分子の動態解析も重要な情報である。特に免疫細胞などの浮遊細胞では、細胞表面分子の本来の動きを維持しながら細胞を観察用のディッシュに保持することが求められる。このために、ガラス支持脂質二重膜を簡便に構築する方法を確立した

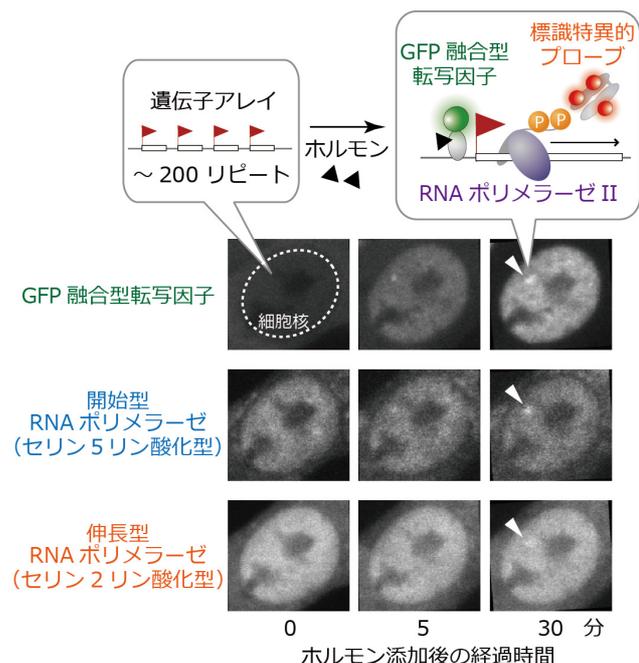


図 1. ホルモン添加による遺伝子活性化

(Ito *et al.* 2014)。この方法により、細胞表面から核内へのシグナル伝達を含めて、核内転写関連タンパク質の刺激応答の詳細な解析が可能になった。

(5) 転写伸長因子 NELF と DSIF は、転写の開始から伸長を経て終結にいたるまで、RNA ポリメラーゼ IICTD のセリンリン酸化に関連して、相互作用のタイミングが異なると考えられている。領域内の山口雄輝らとの共同研究により、リン酸化阻害剤および DSIF の各種ドメイン欠失変異体を用いた 1 分子イメージングおよび FRAP 解析により、転写伸長因子のダイナミクス解明を進めた (伊藤、池田、生物物理学会、2015)。さらにリン酸化阻害剤存在下での FRAP 解析を行い、リン酸化部位による相互作用安定性の違いを明らかにした (國見、生物物理学会、2016)。

(6) 核小体は核内に存在する最も大きな構造体であるが、生体膜に囲まれずに構造を維持しているという特徴を持ち、タンパク質および RNA を含んでいる。また、核小体は RNA 結合タンパク質と結合していることが知られている。核小体ではリボソーム合成を行うという重要な役割があるにもかかわらず、膜がない状態でそのような構造を取るメカニズムは未だにわかっていない。連携研究者の齊藤典子との共同研究により、RNA 結合タンパク質ノックダウン条件下での核小体構成タンパク質の動態を解析し、核小体構造維持への関与を明らかにした (松本、生物物理学会、2016)。

(7) 転写因子 IPAS は、低酸素状態で HIF 依存的に抑制性の転写因子として機能する一方、酸化ストレスに対応して、ミトコンドリアのアポトーシスを誘導するという 2 つの機能を有する。東北大学の十川和博との共同研究により、IPAS とミトコンドリア局在マーカーの 1 分子 2 色同時イメージング解析を行い、IPAS の細胞内局在を詳細に解析することにより、IPAS が核内構造およびミトコンドリア膜タンパク質と相互作用していることを明らかにした。さらに核内因子 HIF-1 α およびミトコンドリア局在の IPAS 結合タンパク質 Bcl-X_L 共発現下での FLIM-FRET の結果と合わせて、これらのタンパク質の結合により、IPAS の構造変化が引き起こされることを明らかにした (Kasai *et al.* 2017)。

(8) 炎症反応は、病原体侵入に対抗する生体防御反応として重要な免疫応答である。一方で、過剰な炎症反応は、自己免疫疾患やアレルギー疾患の原因となるため、活性化と同時に抑制が不可欠となる。そのための機構の一つとして、炎症反応抑制タンパク質 PDLIM2 が核内において炎症性転写因子である NF- κ B をポリユビキチン化し、核内プロテアソームで分解する機構が明らかになったが、PDLIM2 の活性制御の分子メカニズムはまだ不明である。2 色同時 1 分子イメージング解析により、PDLIM2 の LIM ドメインが核内での分解に寄与していることを明らかにした (伊藤、瀧本、アメリカ生物物理学会、2014)。さらに、炎症抑制因子 MKRN2 を発見し、PDLIM2 と協同的に NF- κ B のユビキチン化と分解に作用することを明らかにした (Shin *et al.* 2017)。

(9) 転写反応を始め多くの細胞内反応において、タンパク質複合体が形成され、しかも細胞刺激応答によりダイナミックに変化している。タンパク質因子が複合体に結合・解離する様子は、1 分子イメージングで可視化することが可能である。一方で、イメージングデータから個々のタンパク質因子がどのように複合体と相互作用しているかを解析する方法が求められている。この解析のモデル系として、免疫細胞活性化初期過程に重要な役割を果たしている T 細胞受容体マイクロクラスターを用い、1 分子軌跡追跡による時空間動態と結合解離を定量する解析法を開発した。3 種類の TCR シグナルタンパク質因子による 3 色同時 1 分子観察を行い、マイクロクラスター内外での各タンパク質因子の結合解離を解析したところ、マイクロクラスター内外でのタンパク質因子の動態の詳細な定量データを得ることができた (論文投稿中)。この方法により、核内での転写因子の結合解離のダイナミクスや、リモデリング複合体構成タンパク質の核内構造との相互作用ダイナミクスの解析が可能になった。

【本研究課題に関する主要論文】

- Characterization of nuclear pore complex components in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Asakawa H, Yang HJ, Yamamoto TG, Ohtsuki C, Chikashige Y, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, Iwamoto M, Hiraoka Y, Haraguchi T, *Nucleus* 5, 1-14 (2014).
- Nuclear actin activates human transcription factor genes including the OCT4 gene. Yamazaki S, Yamamoto K, Tokunaga M, Sakata-Sogawa K, Harata M, *Biosci Biotechnol Biochem* 79, 242-46 (2014).

- Regulation of RNA polymerase II activation by histone acetylation in single living cells. *Stasevich TJ, Hayashi-Takanaka Y, Sato Y, Maehara K, Ohkawa Y, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, Nagase T, Nozaki N, McNally JG, Kimura H, *Nature* 516, 272-75 (2014).
- A Facile Preparation of Glass-supported Lipid Bilayers for Analyzing Molecular Dynamics. Ito Y, *Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, *Anal Sci* 30, 1103-6 (2014).
- Conformational changes in inhibitory PAS domain protein associated with binding of HIF-1 α and Bcl-xL in living cells. Kasai S, Kajimoto S, Ito Y, Saito T, Yasumoto K, Tokunaga M, Sakata-Sogawa K, Fukumura H, Sogawa K, *J Biochem* 161, 291-96 (2017).
- MKRN2 is a novel ubiquitin E3 ligase for the p65 subunit of NF- κ B and negatively regulates inflammatory responses. Shin C, Ito Y, Ichikawa S, Tokunaga M, Sakata-Sogawa K, Tanaka T, *Sci Rep* 7, 46097 (2017).

松本 直通 計画研究 6 代表者
横浜市立大学・大学院医学研究科・教授

三宅 紀子 計画研究 6 分担者
横浜市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究課題名：大量並行シーケンスによるゲノムアッセイ

【研究目的】

本研究班が目指す転写サイクル機構研究にもゲノムワイドな視点が不可欠である。ヌクレオソームの位置と DNA およびヒストンのダイナミックな修飾が相互に関与しながら遺伝子制御や発達・分化を導く。その中で特にタンパク質複合体とゲノム DNA との相互作用を網羅的に明らかにする手法として、次世代シーケンサーを用いた ChIP-seq 等が有用で、本研究領域でも転写サイクルに関わるゲノムワイドな情報の網羅的収集が重要となる。領域内では転写サイクル機構をゲノムワイドな視点から解析する。新たに安価で迅速、かつ長いリード長 (200-400 bp) が期待できる Ion Proton シーケンサーを導入し、PII チップ (未発売) を用いることで一気に 10 万円程度のコストでヒト全ゲノム解析が可能な出力 (60 Gb) が期待された。本シーケンサーが II チップで十分に稼働した場合は、安価で迅速なゲノムワイドなゲノムアッセイ系が実現する。ただし、Ion PGM と Ion Proton はイルミナ社の合成シーケンス系とは異なる半導体パイロシーケンス法を採用しているため、そのシーケンス特性についてはまだ十分な評価ができない状況で、本研究では半導体パイロシーケンス法の特徴についても評価を行う。Chip-seq 解析は、研究班内の緊密な協力体制のもと、タンパク質・DNA・RNA の各レベルにおける制御メカニズムが、ゲノムワイドにどのように展開され、細胞の生理的振る舞いに繋がるのかを明らかにすることを目指す。さらに転写サイクルに関連する遺伝子の異常で惹起されるヒト疾患の探索型研究を行い、転写サイクル異常が関与する疾患の分子病態基盤を明らかにする。

【研究成果】

新型シーケンサー Ion Proton を新規に導入し、その特性を生かした安価な機能的ゲノム解析システムを構築し、新しい生命現象のメカニズム解明に資する情報を提供することを重要な目的の一つとした。しかし Ion Proton 発売時に、当初予定されていた PII チップが、全研究期間を通じてついに発売がなされるまで当初予定していたシーケンス出力 (60 Gb) が得られず、計画していた積極的運用については制限が生じた。一方で、出力制限はあるものの Ion Proton を用いて計画研究 1 の代表研究者・山口らと RNA-seq を中心とした解析を積極的に進めた。さらに Illumina 社のシーケンサー (HiSeq や MiSeq) を用いて計画研究 1 の分担研究者・田村らと ChIP-seq の解析を進め一定の成果を得、手法の確立の目処がたった (Kurotaki *et al.* 2013)。計画研究班で進めた転写サイクル異常が引き起こすヒト疾患の解明は、Coffin-Siris 症候群における BAF 複合体関連遺伝子 6 種 (Tsurusaki *et al.* 2012, Tsurusaki *et al.* 2014)、Kabuki 症候群における KDM6A 遺伝子 (Kodera *et al.* 2013)、限局生皮質形成異常 IIb 型 (Nakashima *et al.* 2015) を世界に先駆けて報告した。さらに Coffin-Siris 様症候群において BAF 複合体サブユニットの一つである *SMARCA2* の重複例を 2 例同定した。このことは BAF 複合体は、それぞれのサブユニットが機能的に正常のみならず、量的な微細なバランスでクロマチンリモデリングを司る可能性を強く示唆する結果となった。

【本研究課題に関する主要論文】

- Clinical features of SMARCA2 Duplication Overlap with Coffin–Siris Syndrome. Miyake N, Abdel-Salam G, Yamagata T, Eid MM, Osaka H, Okamoto N, Mohamed AM, Ikeda T, Afifi HH, Piard J, van Maldergem L, Mizuguchi T, Miyatake S, Tsurusaki Y, Matsumoto N, *Am J Med Genet A* 170, 2662-70 (2016).
- Somatic Mutations in the MTOR Gene Cause Focal Cortical Dysplasia Type IIb. Nakashima M, Saito H, Takei N, Tohyama J, Kato M, Kitaura H, Shiina M, Shirozu H, Masuda H, Watanabe K,

- Ohba C, Tsurusaki Y, Miyake N, Zheng Y, Sato T, Takebayashi H, Ogata K, Kameyama S, Kakita A, Matsumoto N, *Ann Neurol* 78, 375-86 (2015).
- *De novo SOX11* mutations cause Coffin-Siris syndrome. Tsurusaki Y, Ohashi H, Phadke S, Koshimizu E, Kou I, Shiina M, Suzuki T, Okamoto N, Imamura S, Yamashita M, Watanabe S, Yoshiura K-i, Kodera H, Miyatake S, Nakashima N, Saitsu H, Ogata K, Ikegawa S, Miyake N, Matsumoto N, *Nat Commun* 5, 4011 (2014).
 - Essential role of the IRF8-KLF4 transcription factor cascade in murine monocyte differentiation. Kurotaki D, Osato N, Nishiyama A, Yamamoto M, Ban T, Sato H, Nakabayashi J, Umehara M, Miyake N, Matsumoto N, Nakazawa M, Ozato K, Tamura T, *Blood* 121, 1839-49 (2013).
 - Mutations affecting components of the SWI/SNF complex cause Coffin-Siris syndrome. Tsurusaki Y, Okamoto N, Ohashi H, Kosho T, Imai Y, Hibi-Ko Y, Kaname T, Naritomi K, Kawame H, Wakui K, Fukushima Y, Homma T, Kato M, Hiraki Y, Yamagata T, Yano S, Mizuno S, Sakazume S, Ishii T, Nagai T, Shiina M, Ogata K, Ohta T, Niikawa N, Miyatake S, Okada I, Mizuguchi T, Doi H, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N, *Nat Genet* 44, 376-78 (2012).

中村 春木 計画研究 7 代表者
大阪大学・蛋白質研究所・教授

研究課題名：計算・情報科学による転写サイクルにおける情報変換機構の解明

【研究目的】

転写サイクルでは多岐にわたる生体高分子が複雑に相互作用して情報変換を行いながら、一連の反応過程を順序よく実行していくことで転写を実現する。精緻な解析のためには原子分解能でのダイナミクスの解析が欠かせないが、 μ 秒を超える長時間分子シミュレーション技術が出現してきた。本計画研究では、転写サイクルにおける情報変換機構のダイナミクスを解明することを目的として、コンピュータ解析による計算・情報科学のアプローチでエンハンソームにおける転写制御因子間やヌクレオソームとの関係等に対して、それら超分子複合体の動的構造変化とその安定性を解析し、転写サイクルのメカニズム解明に取り組んだ。

【研究成果】

(1) 超分子複合体に適した分子動力学 (MD) シミュレーション・アルゴリズムと解析ソフトウェアの開発

転写サイクルを制御する系は荷電に富んだ超分子複合体であり、従来の周期境界条件に基づく MD 手法 (Ewald 法) は必ずしもリアルな描像を与えない。代表研究者らは、結晶や液体の純水の系等の均質系において理論的に精度よく静電相互作用を算出できる非 Ewald 法である Zero-Multipole summation 法のアルゴリズムを開発した。本研究により、まず非均質的な蛋白質の系や二重鎖 DNA の系においても、特に Zero-Dipole summation 法が良い精度で MD 計算を実施できることが確認された。逆空間での計算が不要であるこのアルゴリズムの特徴を活かして、比較的安価で並列化も容易な GPU による高速計算用のプログラム (psygene-G) も構築し、本研究によって導入した GPU サーバを用いてさらなる高速化を図った。

さらに静的な分子間相互作用だけでなくダイナミックな相互作用に関する情報を抽出するため、新たに Multi-modal Dynamic Cross Correlation (mDCC) 法を開発した。通常の相互作用の解析においては、原子が単一の平均座標の周辺で振動している単純な動きを仮定しているため側鎖のフリップのような動きの特徴を捉えることができない。新規の手法では、原子の座標分布を混合正規分布に当てはめ原子の動きを複数のモードの重ね合わせとして記述し、各モード間の相関を個々に解析して、従来は平均化によって見過ごされてしまった詳細なダイナミックな原子間の相関を抽出できることが示された。

(2) 転写サイクルを制御する新規な超分子複合体構造に対する MD 計算の実施とダイナミクスの解析

①横浜市大・医・緒方一博との共同研究により、主要な転写因子のひとつである Ets1 を対象とした転写因子-制御エレメント複合体形成メカニズムの原子レベルからの解析を実施した。彼らが決定した Ets1-Runx1-CBF β -DNA 複合体について MD 計算を行い、DNA を介して Ets1 とパートナー転写因子が連動する分子機構を解析した。MD シミュレーションの結果に mDCC 法を適用しモデル内の全原子ペアでの相関を解析した。また複雑ネットワーク解析の分野で用いられる中心性解析技術を応用して原子間の相関ネットワークを可視化し、分子複合体における転写因子同士や DNA との相互作用を解析した。その結果、Runx1-CBF β ヘテロダイマーが存在する場合は DNA における特定の塩基のコンフォメーションが有意に変化することが分かった。この塩基は Ets1 の HI2、HI ヘリックス間のループ領域と相互作用しているが、Ets1-DNA のみの状態では Ets1-Runx1-CBF β -DNA 複合体と比べ、このループの相互作用がより安定であった。すなわち Runx1-CBF β ヘテロダイマーとの結合によって DNA のコンフォメーション変化が起こり、これが Ets1 ループ領域との相互作用を不安定化していると言える。これによってループの揺らぎが増大し、複数のコンフォメーションを過渡的に形成する現象が観測された。さらにループから N 末端側の自己阻害モジュールの顕著な不安定化が観測された。すなわち Runx1-CBF β ヘテロダイマーの結合が自己阻害モジュールによる

DNA 結合阻害を弱めているものと考えられる。さらに mDCC 法による解析では、Runx1-CBF β から DNA を介して Ets1 に至る動的相関のネットワークを確認できた。これより、Ets1-Runx1-CBF β -DNA 複合体における転写因子間のアロステリックな情報伝達の分子機構を原子レベルで解明できたと言える。

②横浜市大・医・緒方一博との共同研究により、転写因子 Ets1 における ETS ドメイン上流の部位のリン酸化が与える転写制御への影響を調べるため、全長 164 残基のうち大きな構造変化のない Lys318 以降の残基は拘束した上で、不規則構造(IDR)となる Gln278 から Asp317 の 40 残基部分を解析した。IDR 領域の 2 つの Ser がリン酸化された場合とリン酸化されない場合の構造多型を調べるため、psygene-G による構造サンプリングを行って自由エネルギー地形を描いた。その結果多数の安定構造が予測されたが、リン酸化されない IDR は ETS ドメインの DNA 結合領域と fuzzy な相互作用をしているのが観測された一方、リン酸化された IDR ではその DNA 結合領域との特異的な結合が観測された。この研究から提案した Ets1 のアミノ酸変異による DNA 結合実験が緒方一博のグループによってなされ、分子シミュレーションの結果を強く示唆する結果となった。

③愛媛大・理工・平田 章との共同研究により、彼らが決定した *Thermococcus kodakarensis* 由来 RNA ポリメラーゼ (Tko RNAP) に対するダイナミクス解析を行った。約 70 万原子からなる RNAP11 量体について psygene-G による 150 ns の MD 計算を行った。さらに D/L サブユニットを人為的に除いた 9 量体モデルについても同様の計算を行い、11 量体モデルとの比較を行った。mDCC 法による動的相関解析も行った結果、クランプの開閉運動の規模については D/L サブユニットの有無による有意な差は見られなかった。D/L サブユニットが 11 量体の会合の際に足場としての役割を果たしていることはこれまでに報告されていたが、11 量体形成後に D/L サブユニットを取り除いてもクランプの開閉運動を直ちに損なうことはないことが示された。ただし複合体内部の動的相関には違いが見られ、特に触媒サブユニットを介した運動に影響が見られた。

④北大・医・高橋秀尚との共同研究によって、Med26 についてホモロジーモデリングを行い、パートナー分子については IDR であるとの予測に基づいて十数残基のペプチドとして扱った。Med26-EAF1、Med26-TAF7、Med26-AFF4 それぞれの系を独立に用意し、V-McMD によって分子複合体の自由エネルギー地形を描写した。AFF4 については解析が完了していないが、TAF7 と EAF1 については異なる結合様式が再安定構造であると予測された (図 1 A、B)。結合による分子スイッチは同じ結合部位に対して競争的におこるのではなく、相手によって異なる結合部位を使い分けるメカニズムが推定された。

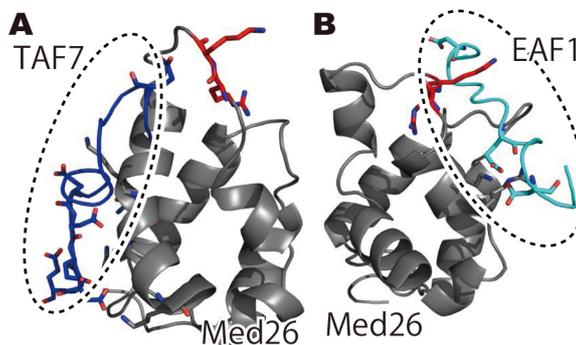


図1 MDシミュレーションによる予測構造 A) Med26-TAF7, B) Med26-EAF1

【本研究課題に関する主要論文】

- Molecular mechanisms of cooperative binding of transcription factors Runx1-CBF β -Ets1 on the TCR α gene enhancer. Kasahara K, Shiina M, Fukuda I, Ogata K, Nakamura H, *PLoS One* 12, e0172654 (2017).
- Enhancement of canonical sampling by virtual-state transitions. Higo J, Kasahara K, Dasgupta B, Nakamura H, *J Chem Phys* 146, 044104 (2017).
- mDCC_tools: characterizing multi-modal atomic motions in molecular dynamics trajectories. Kasahara K, Mohan N, Fukuda I, Nakamura H, *Bioinformatics* 32, 2531-3 (2016).
- A novel approach of dynamic cross correlation analysis on molecular dynamics simulations and its application to Ets1 dimer-DNA complex. Kasahara K, Fukuda I, Nakamura H, *PLoS One* 9, e112419 (2014).

- The Zero-multipole summation method for estimating electrostatic interactions in molecular dynamics: analysis of the accuracy and application to liquid systems. Fukuda I, Kamiya N, Nakamura H, *J Chem Phys* 140, 194307 (2014).
- Molecular dynamics simulations accelerated by GPU for biological macromolecules with a non-Ewald scheme for electrostatic interactions. Mashimo T, Fukunishi Y, Kamiya N, Takano Y, Fukuda I, Nakamura H, *J Chem Theory Comput* 9, 5599-609 (2013).

藤井 聡 計画研究7分担者
九州工業大学・大学院情報工学研究院・助教

研究課題名：計算・情報科学による転写サイクルにおける情報変換機構の解明

【研究目的】

マイクロアレイ、次世代シーケンサーなどの実験技術が開発され、遺伝情報の発現制御をゲノムスケールに網羅的に解析することが可能となってきた。このようにゲノムスケールに大規模に生成されるデータに対して情報科学というドライのアプローチにより統合的に解析が行われることが求められている。そこで本研究では、(1)マイクロアレイや RNA-Seq、ChIP-seq などの実験データをバイオインフォマティクス技術により解析・統合化し、転写サイクルを考察・解析を行う。(2)また、本領域のさまざまな実験グループから生成されるゲノムワイドに解析された膨大なデータから生物的に意味のある情報や知見を引き出すための情報解析技術やツールの開発を行う。以上2つを目的として研究を進めた。

【研究成果】

(1) 公共データベースの ChIP-Seq データの統合解析による転写における協同的制御機構の解析

公共のデータを活用し、ゲノムワイドにおける転写因子の複合体形成状態やそれに伴うヒストン修飾の局在状態を解析するために各種 ChIP-Seq データを収集して統合的に解析を行った。mouse ES cell に関してピークの共起状態を調べるためにアソシエーション分析を行うことで、例えば既知の事実ではあるが発生・分化に関わる polycomb complex と bivalent domain の関係を収集したデータと情報解析だけで見出すことができた。しかし、非常に膨大な数の相関ルールが抽出されており絞り込みが不十分である。尤もらしい既知のルールは見つけることができているが、まだ見つけられていない新規のルールはどう絞り込んでいくかが問題点として残っており今後の課題となる。また、この手法を利用して長崎大学の伊藤先生の研究対象である ES 細胞の Sox2、横浜市立大学の田村先生の造血系細胞における IRF8、東京工業大学の山口先生の Hela 細胞における NELF・DSIF に対して、他の転写因子やヒストン修飾との関係を解析し、興味対象の転写因子と関係がありそうな共起関係をリストアップしフィードバックしている。

(2) ウェットの研究者からの実験結果をモデルケースとした転写制御機構の解析

① 長崎大学伊藤先生との共同研究により、mouse ES cell における転写因子 Dzip3 と Ring1B とユビキチン化ヒストン ubH2A の ChIP-Seq のデータに対して、Dzip3 と Ring1B の協同的制御によりヒストンのユビキチン化が行われている部位を特定した。他の実験と合わせて論文として公表された(Inoue *et al.* 2016)

② 長崎大学伊藤先生との共同研究により、mouse ES cell における転写因子 SMARCA1 と CBP の ChIP-Seq のデータを解析することにより、転写因子 SMARCA1 と CBP による協同的な制御が TSS 付近で行われていることを見出した。他の実験と合わせて論文として公表された(Doiguchi *et al.* 2016)

③ 横浜市立大学田村先生との共同研究により、転写因子 IRF8 導入による単球・マクロファージ分化におけるヒストン修飾の局在状態変化と遺伝子発現量の変化の関係を解析した。広範囲のヒストンの局在状態を解析するために NMF (Non-Negative Factorization)を用いた。その解析の結果、H3K4me3 の TSS から下流領域(-10 kb)における局在状態の上昇 (H3K4me3 のピークが下流側へプロードに伸びるような変化) が遺伝子発現量の上昇に強く影響していることが分かった。

④ 東京工業大学の山口先生との共同研究により、リン酸化型 DSIF に特異的に結合する Dom3z の KO 株、WT 株それぞれにおける PolII の ChIP-Seq、nascent RNA の発現量を解析した 4sU-Seq、mRNA 発現量を示す RNA-Seq のデータを解析した。遺伝子に対する PolII の局在から nascent RNA を介して最終的にプロセッシングされた mRNA に至るまでの一連の転写制御を解析し、Dom3z が

合成・分解での制御に関わっているか解析を行った。Dom3z の影響により合成・分解量に変化する遺伝子は非常に少なかったが存在していた。それらの遺伝子はリストアップした。

⑤ プール型 short hairpin RNA シークエンス (shRNA-Seq) を解析法の検討を東京工業大学の山口先生との共同研究により行った。shRNA-Seq を用いたゲノムワイドスクリーニング法は、近年急速に発展してきた強力な遺伝子機能解析法である。本研究では順位によるノンパラメトリックな手法を応用して同一遺伝子に対する複数の shRNA の効果を評価する方法を開発した。実際の生物学データに本手法を適用したところ、これまで採用されてきた最も濃縮された shRNA で該当する標的遺伝子を代表させる方法よりも精度が良いことが明らかとなった。また、多発性骨髄腫由来のヒト OPM-2 細胞に Collecta 社製プール型レンチウイルス shRNA ライブラリーを導入し、ポマリドマイド処理をおこなった細胞とポマリドマイド処理していない細胞の shRNA-seq データに対して本解析手法を適用することにより、ポマリドマイドにより変動する遺伝子をリストアップした。

【本研究課題に関する主要論文】

- SMARCD1 is an ATP-dependent stimulator of nucleosomal H2A acetylation via CBP, resulting in transcriptional regulation. Doiguchi M, Nakagawa T, Imamura Y, Yoneda M, Higashi M, Kubota K, Yamashita S, Asahara H, Iida M, Fujii S, Ikura T, Liu Z, Nandu T, Kraus WL, Ueda H, Ito T, *Sci Rep* 6, 20179 (2016).
- Dzip3 regulates developmental genes in mouse embryonic stem cells by reorganizing 3D chromatin conformation, Inoue D, Aihara H, Sato T, Mizusaki H, Doiguchi M, Higashi M, Imamura Y, Yoneda M, Miyanishi T, Fujii S, Okuda A, Nakagawa T, Ito T, *Sci Rep* 5, 16567 (2015).

秋光 信佳 公募研究代表者 (H27～28 年度)

東京大学・アイソトープ総合センター・教授

研究課題名：核内長鎖ノンコーディング RNA による転写サイクル制御機構の解明

【研究目的】

長鎖ノンコーディング RNA とは、タンパク質のアミノ酸一次配列情報をコードしていない RNA の総称である。申請者は、NEAT1 と呼ばれ、パラスペックル（転写制御を担う核内 RNA-タンパク質巨大複合体）の構造形成に必須な核局在型の長鎖ノンコーディング RNA が転写リプレッサー SFPQ との相互作用を通じてサイトカイン遺伝子群の転写制御を調節し、自然免疫応答を制御することを明らかにした (Imamura *et al.* 2014)。この成果をもとに、病原性微生物に感染したときの宿主細胞側で誘導される長鎖ノンコーディング RNA に着目し、これら長鎖ノンコーディング RNA による転写サイクル制御の解明を目指すため、本研究を推進した。また同時に、遺伝子発現制御のコントロールでは RNA 分解も重要な役割を果たすため、転写サイクル制御を補完するプロジェクトとして、RNA 分解制御に関する研究も一部推進した。

【研究成果】

まず、細胞侵入性細菌であるサルモネラに感染した HeLa 細胞で発現増加する長鎖ノンコーディング RNA を検索した。その結果、145 種類の長鎖ノンコーディング RNA をサルモネラ誘導性長鎖ノンコーディング RNA として同定した。近年、エンハンサー領域からも多数のノンコーディング RNA が発現し、興味深い機能を持つことが報告されてきた。そこで、ヒストン修飾 (H3K4me1/H3K4me4, H3K27Ac) を指標として、同定した 145 種類のノンコーディング RNA をエンハンサー領域に発現する RNA と遺伝子間領域に発現する RNA に大別した。その結果、26 種類のノンコーディング RNA がエンハンサー領域から発現する RNA (すなわち、エンハンサー RNA) であることが分かった (図 1)。

エンハンサーは隣接遺伝子の転写活性化と密接な関係がある。そこで、サルモネラ感染で誘導された 26 種類のエンハンサー RNA の隣接遺伝子がサルモネラ感染で転写活性化されているかを meta-gene 解析した。その結果、サルモネラ感染で誘導されないエンハンサー RNA の隣接遺伝子は転写活性化されていないのに対し、サルモネラ感染で増加するエンハンサー RNA の隣接遺伝子は転写活性化されていることが分かった (図 2)。

大変興味深いことに、サルモネラ感染で増加したエンハンサー RNA は該当エンハンサー領域の転写活性化ではなく、核内 RNA 分解が抑制され、その結果、RNA が蓄積して増加していたためであることが分かった (図 3)。この結果は、エンハンサー領域の転写活性化が隣接遺伝子を活性化しているのではなく、RNA 分解抑制により蓄積したエンハンサー RNA が隣接遺伝子を転写活性化したことを示している。重要な点は、核内 RNA 分解経路がエンハンサーという転写サイクル制御の重要エレメントの機能を制御するという点で有る。すなわち、核内の転写サイクル制御に核内 RNA 分解が重要な役割を果たすことを示したことが本研究の重要な成果である。

また、本研究から転写サイクル制御における RNA 分解制御の重要性が判明したため、哺乳動物細胞における RNA 分解制御についても平行して進めた。その結果、UPF1 RNA ヘリケースの基質認識に関する新しいモデル構築に成功した (Imamachi *et al.* 2017)。さらに、IMP3 RNA 結合タンパク質によって分解性制御される標的 mRNA の探索から、IMP3 による癌増殖促進の分子基盤を明らかにすることができた (Mizutani *et al.* 2016)。

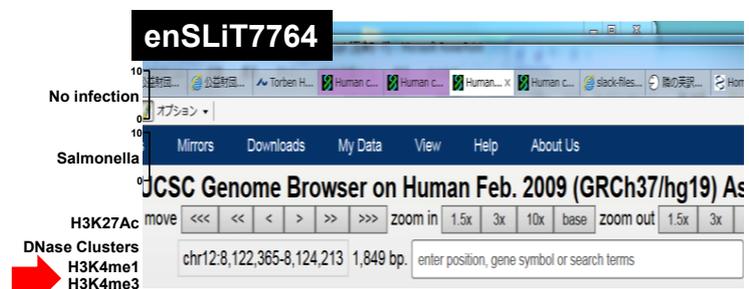


図1 :サルモネラ感染で誘導されるエンハンサーRNAの例

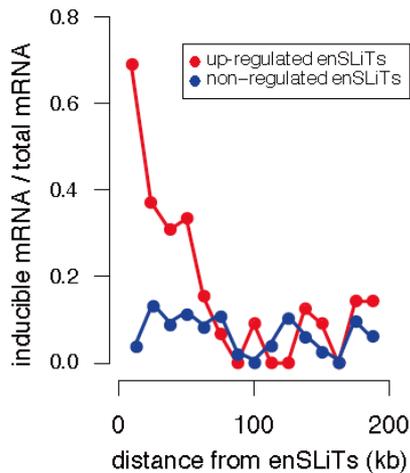


図2 :サルモネラ感染で誘導されるエンハンサーRNAの隣接遺伝子は転写活性化される。

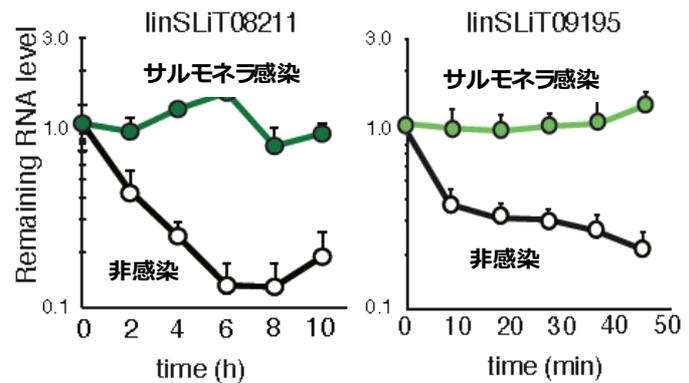


図3 :サルモネラ感染で誘導されるエンハンサーRNAの安定化

【本研究課題に関する主要論文】

- A GC-rich sequence feature in the 3' UTR directs UPF1-dependent mRNA decay in mammalian cells. Imachi N, Salam KA, Suzuki Y, Akimitsu N. *Genome Res* 27, 407-18 (2017).
- Oncofetal protein IGF2BP3 facilitates the activity of proto-oncogene protein eIF4E through the destabilization of EIF4E-BP2 mRNA. Mizutani R, Imachi N, Suzuki Y, Yoshida H, Tochigi N, Oonishi T, Suzuki Y, Akimitsu N. *Oncogene* 35, 3495-502 (2016).

井手 聖 公募研究代表者 (H27~28 年度)
 国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター・助教

研究課題名：rRNA 遺伝子上での包括的な DNA-タンパク相互作用情報の抽出基盤の構築

【研究目的】

転写サイクル（開始・伸長・終結・リサイクル）の精細な理解には、転写の各過程が起こっている現場、つまり鋳型となっている DNA 上に結合している多数のタンパク群を網羅的に捕捉することが欠かすことができない。ePICH 法（配列特異的クロマチンプロテオミクス法）は、代表者が開発に携わってきた手法で、人工核酸プローブを用い、特定の DNA 配列に結合しているクロマチンタンパクを精製し、マスペクトメトリーでその構成因子を網羅的に同定することが可能である。この新しいテクニックにより、RNA ポリメラーゼ I により転写される、リボソーム RNA 遺伝子（rRNA 遺伝子）の各制御配列上のタンパクを包括的にマッピングする。このプロテオミクス情報を用いて、新たな転写制御機構を明らかにする。

【研究成果】

DNA-タンパク相互作用情報の抽出系の開発

代表者は自ら開発してきた ePICH 法を用い、rRNA 遺伝子上での包括的な DNA-タンパク相互作用情報の抽出基盤を構築するために、ターミネーターとエンハンサーに対する ePICH 法ためのプローブをデザインした。コスト削減のため、留学先で合成していた人工核酸 LNA に代わり、異なる 2 つの人工核酸（ENA と 2'-FluoroRNA オリゴ核酸）を東京工業大学清尾先生の協力の元、合成に成功した。それぞれの人工核酸が標的 DNA 配列をプルダウンし濃縮できるかを試験管内で調べたところ、ENA は LNA と同じように効率よく標的 DNA を濃縮できたが、2'-Fluoro RNA はプルダウン効率が 1/10 程度であった。現在、人工核酸とクロマチン抽出液を混ぜてエンハンサーとターミネーターのクロマチンの精製を試みている。またプローブとして人工核酸の代わりに、DNA の副溝内から塩基を特異的に結合する化合物を用いたクロマチン精製系の開発にも従事した。

抽出された相互作用情報をもとに生体内での機能解析

プロジェクトの遅延に備えたバックアッププラン、rRNA 遺伝子のプロモーター領域に結合している新規因子（TopBP1 と THUMP1）の機能解析を押し進めた。TopBP1 は DNA 損傷が生じた時に、損傷部位を認識し、リン酸化のカスケードを促進する役割を果たす。これまで rRNA 遺伝子の転写との関係についての報告はなかったため、免疫染色によって局在を調べたところ、RNA ポリメラーゼ I (RNA pol I) の一部、大きな塊が形成されているところにのみ共局在していた。TopBP1 が局在している rRNA 遺伝子の周辺では転写が起きて

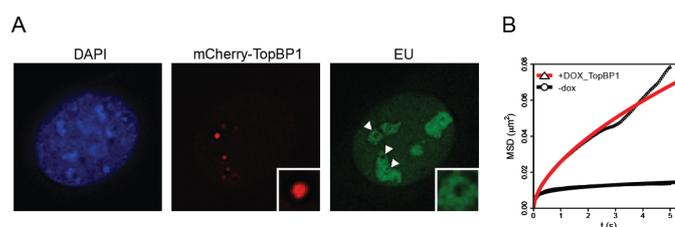


図1 TopBP1 fociでは転写が止まっており(A, EUの矢印)、RNAポリメラーゼIの分子はブラウン運動により激しく動いている(B)。A: mCherry-TopBP1を誘導した時に新規に合成されるRNA量(転写量)をEUの取り込みでラベルし可視化した。B: 一分子顕微鏡を用いて、RNAポリメラーゼIの各分子の動いた距離(MSD)を時間(秒)でプロットした。TopBP1誘導前後でのRNAポリメラーゼIの動きを比較した。

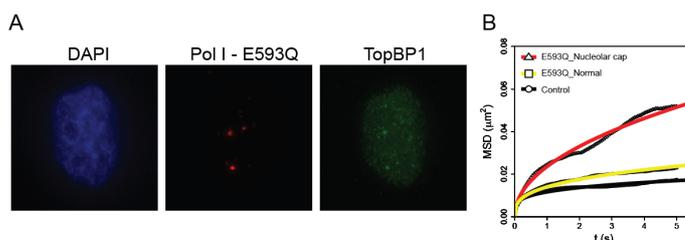


図2 変異型RNA pol I (E593Q)は核小体周辺で塊をつくりTopBP1と共局在し(A)、その中でRNAポリメラーゼIの分子がブラウン運動により激しく動いている(B)。A: Pol I-E593Qを誘導し、TopBP1の局在を免疫染色法により調べた。B: 一分子顕微鏡を用いて、RNAポリメラーゼIの各分子の動いた距離(MSD)を時間(秒)でプロットした。Pol I-E593Q誘導前後でのRNAポリメラーゼIの動きを比較した。

おらず、RNA pol Iが激しく動き回り、ブラウン運動していることが一分子顕微鏡により観察された(図1)。次に、ヒト遺伝病の一つトリーチャー・コリンズ症候群の原因となっている変異を挿入した不活性型 RNA pol I (Pol I-E593Q) を異所的に発現させたところ、核小体周辺に塊を作り、TopBP1 もそこに呼び込まれていた(図2 A)。不活性型 RNA pol I の塊の中には内在性の野生型の RNA pol I も集まり、激しくブラウン運動していた(図2 B)。このことから、RNA pol I は、分子が絶えず動きながら自己集合しまとまる、所謂液滴を形成する性質を保有しており、TopBP1 は、液滴化のスイッチとして働く分子の一つであることが判明した(図3)。トリーチャー・コリンズ症候群では、原因遺伝子がわかっていない症例もあり、TopBP1 の発現量のバランスがその一因になっている可能性が示唆される。また、このように RNA ポリメラーゼ複合体の物理的性質を利用した迅速な転写の制御の例は、これまでにない概念である。

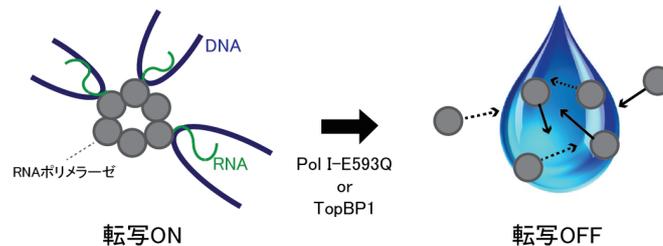


図3 転写が起きている時に固い転写ファクトリーが形成される。一方、転写が止まると分子が絶えず動きながら自己集合しまとまる、所謂液滴を作る。

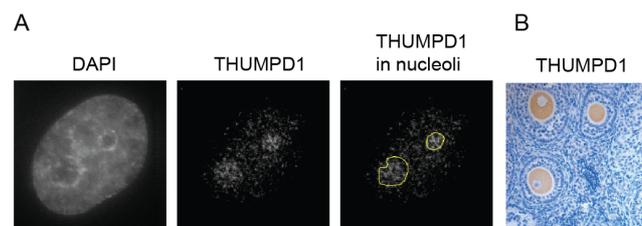


図4 THUMP1にGFPタグを付加し、免疫染色した結果。THUMP1は核全体に分布し、核小体により多く局在している(A、黄色囲いは核小体)。免疫組織化学法による卵巣内でのTHUMP1の発現パターン解析。卵母細胞(大きな細胞)に特異的に高発現している(B)。

これまでプロモーター配列に結合する因子として同定したものの中で、siRNA を用いたスクリーニングによる網羅的にノックダウンすることで、転写活性に必要な新規因子として THUMP1 を見出した。内在性の THUMP1 遺伝子の C 末端にゲノム編集を用い GFP タグを挿入し、その局在を調べたところ、核全体に分布し、かつ核小体内により有意に蓄積していた(図4 A)。rRNA の転写量は細胞の増殖速度や細胞のサイズに比例することが知られている。最近、生殖系列の卵母細胞の成熟過程で RNA pol I の転写の制御が注目されている。そこでエディンバラ大学の LIN 博士との共同研究により、THUMP1 が卵母細胞に特異的に高発現していることを見出した(図4 B)。THUMP1 の転写における機能についてはまだ不明であるが、RNA ポリメラーゼ I が組織特異的に働いている可能性が示唆される。

【本研究課題に関する主要論文】

- Telomere Visualization in Tissue Sections Using Pyrrole-Imidazole Polyamide Probes. Sasaki A, Ide S, Kawamoto Y, Bando T, Murata Y, Shimura M, Yamada K, Hirata A, Nokihara K, Hirata T, Sugiyama H, Maeshima K, *Sci Rep* 6, 2926 (2016).

伊藤 寿朗 公募研究代表者 (H27~28 年度)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

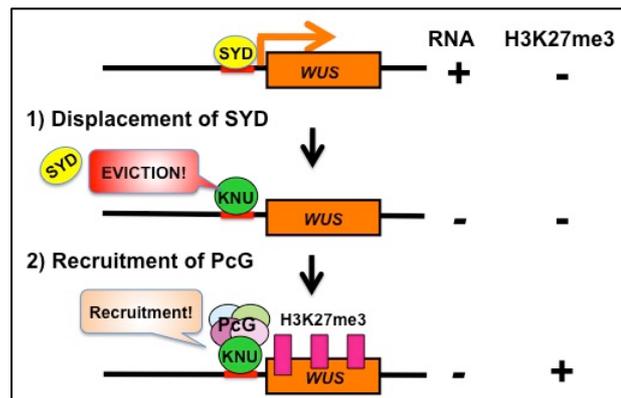
研究課題名：細胞周期の進行に伴うヒストン修飾による転写制御

【研究目的】

本研究は、花幹細胞の増殖を抑制する機能を持つ *KNU* 遺伝子のバイオタイマー制御系をモデルとして、細胞周期とヒストン修飾のかかわりを単一細胞レベルで解析することを提案する。具体的には、1) 培養細胞にて細胞周期プローブを活用して細胞周期の進行を可視化し、レポーター遺伝子の発現のタイミングやヒストン修飾との相関を調べる。2) 遺伝子発現の数理解析によるモデルと合成プロモーターによる検証。さらに、3) 花幹細胞において、温度、日長、植物ホルモンなどの外環境からの細胞分裂にもとづく時間特異的な転写制御への影響を解析する。最後に 4) 単一細胞単一遺伝子におけるヒストン修飾状態を可視化する新技術の開発に取り組む。

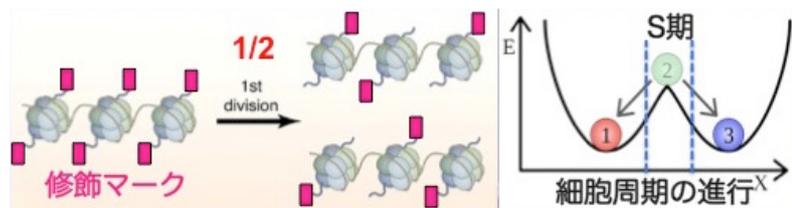
【研究成果】

本研究は、花幹細胞の増殖を抑制する機能を持つ *KNU* 遺伝子のバイオタイマー制御系をモデルとして、細胞周期とヒストン修飾のかかわりを単一細胞レベルで解析すること、*KNU* の作用機構を明らかにすることを目指して研究を行ってきた。具体的には、*KNU* による *WUS* の転写抑制メカニズムを解明するために、*KNU* の発現とヒストンの修飾 H3K27me3 状態の変化を花発生時期特異的にとらえた。その結果、H3K27me3 の蓄積よりも先に転写レベルでの抑制が始まっていることを見いだした。すなわち、抑制的ヒストン修飾は抑制状態の維持に必要なであるが、転写抑制の開始には他のメカニズムがあることが示唆された。そこで我々は *KNU* は *WUS* の活性化に必要な因子の結合阻害の機能を持つとの作業仮説のもと、*WUS* の既知の活性化因子である SWI/SNF 複合体である SPLAYED (SYD) の結合性を調べた。その結果、*KNU* の誘導後、即座に SYD の結合阻害が確認された。上記の観察にもとづき、*KNU* による *WUS* の二段階の転写抑制機構を提案するための論文を作成し、*PNAS* に投稿した (右まとめ図)。現在、レフェリーのコメントにもとづき、実験を補足している。



また、*KNU* 遺伝子とは別経路で作用する *SUP* 遺伝子はその下流において *TRN2* 遺伝子を抑制していることを示した。*TRN2* は膜タンパク質であり、オーキシンの輸送を介して、花幹細胞の増殖抑制に機能している。現在、*Nature Commun.*にてリバイズ中である。

われわれは、*KNU* の誘導タイミングは、細胞分裂時に半保存的に分配される抑制的修飾ヌクレオソームの希釈によってもたらされることを提唱した (Sun *et al.* 2014)。そのため、*KNU* 発現誘導は修飾を受けているヌクレオソームの数の対数に比例するとの数理モデルを導き、その実証実験をトランスジェニック植物を用いて解析した。その結果、修飾を受けるヌクレオソームを増やしたレポーター遺伝子の発現時期の遅れたものや、まったく発現しなくなるものが得られた。合成生物学的に数理モデルを検証し、細胞周期の進行およびレポーター遺伝子のイメージング解析と組み合わせて解析を進めており、こちらも近々投稿予定である。



【本研究課題に関する主要論文】

- Analysis of the Arabidopsis superman allelic series and the interactions with other genes demonstrate developmental robustness and joint specification of male-female boundary, flower meristem termination, and carpel compartmentalization. Breuil-Broyer S, Trehin C, Morel P, Boltz V, Sun B, Chambrier P, Ito T, Negrutiu I, *Ann Bot* 117, 905-23 (2016).
- Dynamics of H3K27me3 methylation and demethylation in plant development. Gan ES, Xu Y, Ito T, *Plant Signal Behav* 10, e1027851 (2015).
- Regulation of Floral Stem Cell Termination in Arabidopsis. Sun B, Ito T, *Front Plant Sci* 6, 17 (2015).
- Co-ordination of flower development through epigenetic regulation in two model species: rice and Arabidopsis. Guo S, Sun B, Looi LS, Xu Y, Gan ES, Huang J, Ito T, *Plant Cell Physiol* 56, 830-42 (2015).

井上 康志 公募研究代表者 (H25～26 年度)
大阪大学・大学院生命機能研究科・教授

研究課題名：転写制御因子による DNA 立体構造変化の光学的ナノ計測法開発

【研究目的】

転写制御因子が認識し結合する塩基配列を含んだ二重鎖 DNA の両端に金ナノ粒子を固定した二量体（ナノダイマー）をプローブとして用い、転写制御因子の結合により DNA が屈曲する構造変化を実時間で計測するシステムを開発するとともに、転写反応の素過程を分子レベルで詳細に観察し、解明することを目的とする。計測速度の究極化を図り、結合過程およびそれに伴う構造変化のダイナミクスを明らかにする。さらに、1 分子計測によるマイクロな計測だけではなく、分子系のアンサンブル（平均、集団的）・ダイナミクスをマクロに評価する計測系の確立も図り、生体内での転写制御メカニズムを *in vitro* でシミュレート模擬することで、個々のイベントが協同的に作用することにより発現する機構の解明も目指す。

【研究成果】

転写制御因子が DNA の特定の塩基配列上に結合し、DNA の構造が変化する過程を、DNA がブリッジした2つの金ナノ粒子（ナノダイマー）のプラズモン共鳴波長の変化を観察することで、実時間で計測する装置の設計・開発を行った。倒立型光学顕微鏡をベースに白色光源、暗視野照明系とダイクロミックミラー、EM (Electron Multiplying) CCD カメラあるいは光電子増倍管 (PMT) から構成し、ダイクロミックミラーは中心波長 591nm のものを用いた。EM CCD カメラでは、ナノダイマーの暗視野像をダイクロミックミラーで2波長に分割することで、2波長成分の暗視野像を空間的に分離して、CCD カメラ上で、同時に観察した。カバーガラス上にナノダイマーを固定し、試作した装置により SOX2 の DNA への結合を実時間観察し、DNA 構造変化の 1 分子計測が可能であることを示した。図 1 に SOX2 結合前後の散乱スペクトルを示す。緑色で示すスペクトルが結合前、オレンジ色で示すスペクトルが結合後のスペクトルである。結合前後の過渡的な構造変化を詳細に観察するために、ダイクロミックミラーで2分割した暗視野像を PMT で各々検出する系を用いて、DNA 構造変化を計測した。図 2 に示すように、PMT からの信号を 1.1kHz のサンプリングレート相当で検出した結果、SOX2 結合後（65.7 秒）、構造変化した DNA が定常状態になるまで（65.8 秒）の過渡的な過程を観察できることを明らかにした。

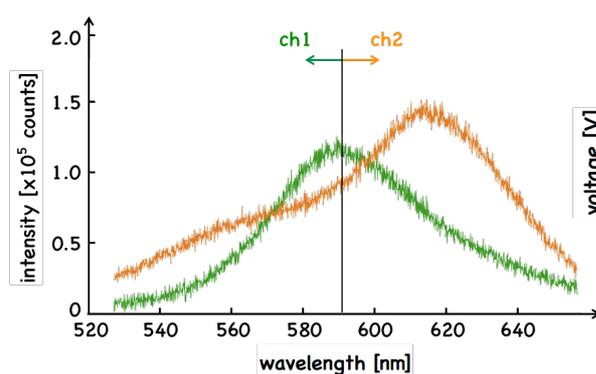


図 1 SOX 結合前後の散乱スペクトル

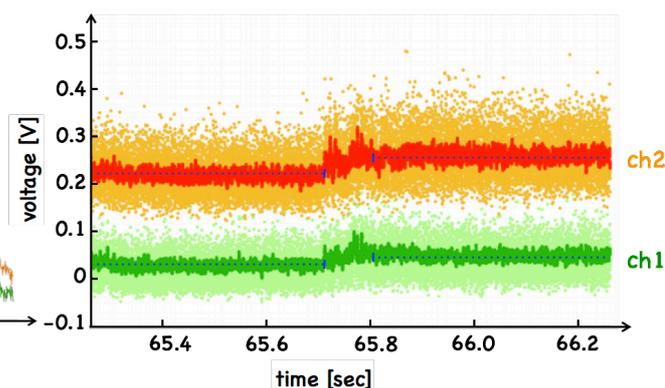


図 2 DC5 への SOX2 結合による散乱光強度の過渡的变化

また、これまでに、DC5 配列を含む DNA を用いて、SOX2-PAX6 の複合体による構造変化を観察することに成功していたが、PAX6 の結合能が高い一方、転写を活性化しない DC5 コンセンサス配列 (DC5-con) についても構造変化の観察を試みた。その結果、図 3 に示すように、SOX2-PAX6 の複合体との結合による DNA の構造変化は DC5 と比べて DC5-con の方が小さいことを明らかにし

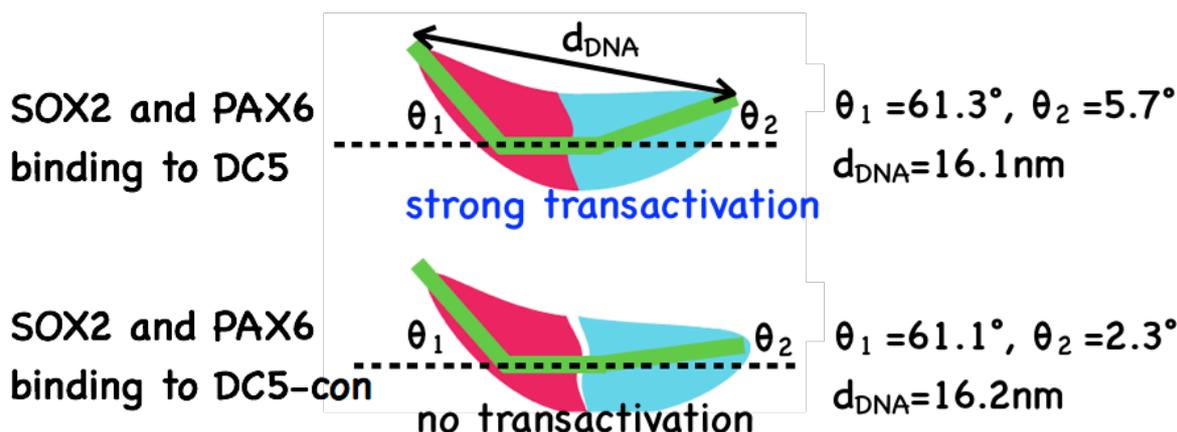


図3 DC5 および DC5-con への SOX2-PAX6 複合体結合モデル

た。このことから、DC5 は SOX2-PAX6 複合体と強く相互作用することで、転写が活性化されることが示唆された。

さらに、金ナノ粒子と DNA から構成されるナノダイマーを、おもりとバネとみなした振動力学系として捉え、転写制御因子結合による DNA 構造変化前後での振動状態の変化からダイナミクスを解析する方法の確立を目指し、ナノダイマーの振動計測法の検討と装置の開発を進めた。レーザー光（波長：575 nm）を電気光学変調器（EOM: Electro-Optic Modulator）で強度変調し、液中のナノダイマーに照射することで、ポンプ光としてナノダイマーを励振させた。同時に、異なる波長のレーザー光（532 nm）をプローブ光としてナノダイマーに入射し、振動するナノダイマーにより変調を受けた散乱光をアバランシェフォトダイオードにより検出し、ロックインアンプにより振動成分のみを抽出した。ポンプ光とプローブ光の各々の進行方向は直交、同軸など幾つか実験を通して検討した結果、同軸が適していると結論づけた。0次透過光はマスクで除去し、散乱光成分のみを検出し、検出器のダイナミックレンジを確保した。検出した散乱光の信号はナノダイマーを理想的な調和振動子とみなしたときの共鳴周波数近傍付近を含む 100 kHz から 10 MHz までの間で振動周波数を連続的に掃引し、ロックイン検出を行った。ナノダイマーを含んだ溶液では、864.79 kHz および 864.85 kHz で振動ピークが観察され、ピーク幅はどちらも約 100 Hz 程度であると同時に、振動ピークの前で位相が 180° 変化することも確認した。また、溶液中に金ナノ粒子だけを分散した系、一本鎖 DNA が結合した金ナノ粒子だけを分散した系、純水だけの系、それぞれで同様の振動計測を行ったが、振動ピークは観察されなかった。これらのことから、ナノダイマーの共鳴振動により変調を受けたプローブ光だけを干渉信号として検出できることを見出した。

【本研究課題に関する主要論文】

- Nano-Analysis of DNA Conformation Changes Induced by Transcription Factor Complex Binding Using Plasmonic Nanodimers. Morimura H, Tanaka S, Ishitobi H, Mikami T, Kamachi Y, Kondoh H, Inouye Y, *ACS Nano* 7, 10733-40 (2013).

浦 聖恵 公募研究代表者 (H27~28 年度)
千葉大学・大学院理学研究科・教授

研究課題名：ヒストン H3K36 メチル化酵素に着目した転写解剖御機構の解明

【研究目的】

種を越えて、転写活性領域に分布するヒストン H3K36 メチル化 (H3K36me) は、その特徴的な分布から転写サイクル機構に密接に関わることが想像されるが、高等真核生物では転写制御との具体的な繋がりはまだに不明である。哺乳類には少なくとも 5 種類のヒストン H3K36 メチル化酵素が存在する。その中で、申請者らが 4p-症候群 (Wolf-Hirschhorn syndrome, WHS) の主要な原因遺伝子として同定したヒストン H3K36me 酵素の WHSC1 (別名 NSD2, MMSET) は、遺伝子欠損マウスにおいては広範な分化異常をひきおこし、転写調節因子と協調して転写調節に関与する。しかし従来の転写産物の解析からは、具体的な分子機能は見えて来ない。そこで遺伝子欠損マウスの様々な分化異常の中で、最も顕著な成長異常を示す B 細胞に着目し、造血幹細胞からほぼ均一な B 細胞への *ex vivo* 分化系を用いて、クロマチンおよび転写の生化学研究を進め、高等真核生物の転写サイクル機構を細胞分化過程で捉えることを研究目標とした。具体的には Whsc1 欠損による転写異常を、新規に合成された RNA に着目して解析し、Whsc1 複合体因子の挙動と照らし合わせることによって、転写サイクル機構に迫ることを目指した。

【研究成果】

造血幹細胞をストローマ細胞と IL7 存在下で共培養することによってほぼ 9 割の細胞を B 細胞に分化させることができる。この *ex vivo* 分化系を用いて、マウス胎仔の肝細胞から Whsc1 欠損による分化異常を詳細に調べたところ、分化誘導後 8 日の proB 細胞の時期に細胞増殖や細胞周期の異常が顕著に認められた。そこで分化誘導後 8 日の B 細胞を回収して、Whsc1 の (I) 複合体、(II) ChIP-seq 解析、(III) RNA-seq 解析を行った。

(I) B 細胞における Whsc1 複合体解析

DTME と DSP の 2 種類のクロスリンカーを用いて架橋を行い、Whsc1 特異的な抗体を用いた免疫沈降によって Whsc1 複合体を精製した。そして液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて Whsc1 複合体に含まれるタンパク質を同定した。その結果、Whsc1 との結合が示唆されたタンパク質は RNA プロセッシング、DNA 複製、DNA 修復、細胞周期などに異なる DNA 代謝反応に関わるものが多数を占めていることが明らかになった。この結果から、Whsc1 がそのヒストンメチル化酵素活性を介して、転写の微調整を行うとともに、転写活性化領域の DNA 複製及び DNA 修復をも担う可能性が示唆された。

(II) Whsc1 のゲノム上の作用領域の解明

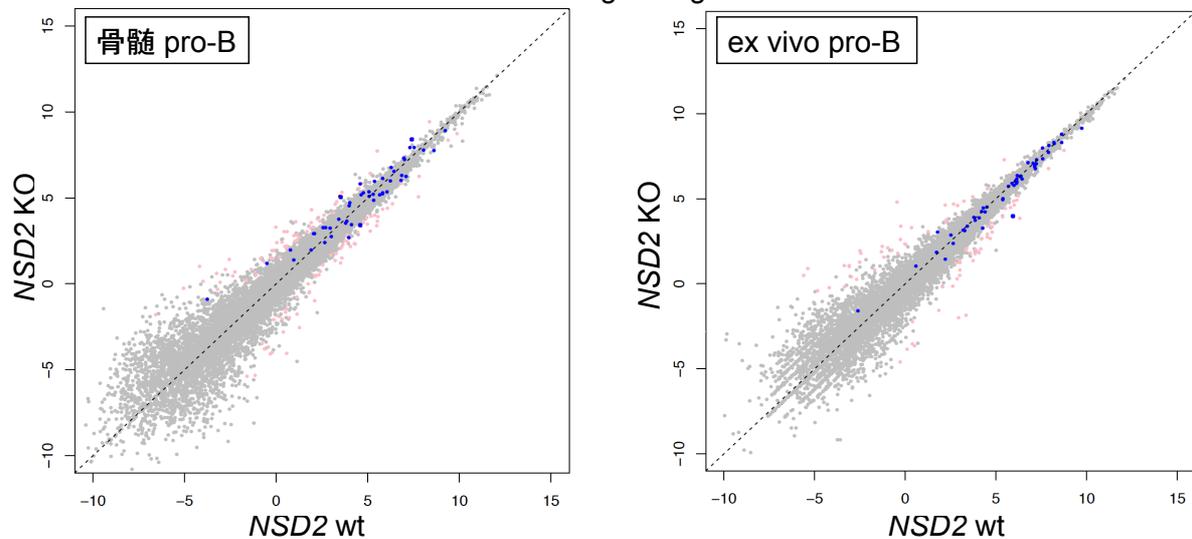
B 細胞では Whsc1 が分解されやすく、Whsc1 抗体を用いたクロマチン免疫沈降実験が難しかった。が、タンパク分解抑制処理の工夫によって問題を克服して、Whsc1 が転写活性の高い遺伝子の転写開始点近傍に広く分散して集積する傾向があることが次第に分かってきた (論文作成中)。

(III) Whsc1 欠損による転写異常解析

Whsc1 の転写制御への関わりをより直接的に明らかにするために、従来の細胞質に蓄積した mRNA の網羅的な RNA-seq 解析に加えて、チオウラシルで進行中の転写産物をパルスラベルしてピオチン化して新生 RNA の網羅的解析 (nascent RNA-seq) を行った。まず、通常の RNA-seq 解析の結果、Whsc1 欠損マウスでは B 細胞の分化異常が認められるが、これまでに報告されている 44 の B 細胞分化制御因子の発現に大きな変動は認められなかった。特に B 細胞で転写活性が高く、Whsc1 の集積が認められる Igh 遺伝子座で nascent RNA-seq 解析結果を野生型と Whsc1 欠損 B 細胞で比較したが、顕著な進行中の転写異常は残念ながら見いだせなかった。これまでに Igh 遺伝子座

における V(D)J 組み換え異常が認められているので、H3K36 メチル化酵素 Whsc1 は転写活性領域の DNA 切断修復を担うと考えられる。

• 44 B cell-regulate genes



【本研究課題に関する主要論文】

- Auditory hair cell defects as potential cause for sensorineural deafness in Wolf-Hirschhorn syndrome. Ahmed M, Ura K, Streit A, *Dis Models Mech* 6, 1027-35 (2015).
- Wolf-Hirschhorn Syndrome Candidate 1 Is Necessary for Correct Hematopoietic and B Cell Development. Campos-Sanchez E, Deleyto-Seldas N, Dominguez V, Carrillo-de-Santa-Pau E, Ura K, Rocha PP, Kim J, Aljoufi A, Esteve-Codina A, Dabad M, Gut M, Heyn H, Kaneda Y, Nimura K, Skok JA, Martinez-Frias ML, Cobaleda C, *Cell Rep* 19, 1586-601 (2017).

太田 力 公募研究代表者 (H25～26 年度)

国立がん研究センター研究所・多層オミックスバイオインフォマティクス分野・ユニット長

研究課題名：癌細胞における転写サイクルの強制回転の解析

【研究目的】

日本では毎年 7 万人以上が肺癌によって死亡しており、更にその死亡率、罹患率は増加傾向にある。肺癌に対する抗癌剤の効果は未だ不十分であり、有効な抗癌剤開発や抗癌剤の効果を増進する技術開発が強く望まれている。最近、申請者らは転写因子 NRF2 や転写抑制因子 KEAP1 遺伝子に変異が導入された肺癌細胞は、転写因子 NRF2 による転写サイクルを強制的に回転させ、ROS の抑制および細胞増殖因子の活性化を引き起こしていることを見出した。従って、NRF2 による転写サイクルを停止させること、つまり、転写因子 NRF2 の活性阻害は、癌治療の有効な手段となる可能性が出て来た。従って、転写因子 NRF2 の核内における転写活性化の分子機構の解明は、癌細胞で暴走している NRF2 による転写サイクルを止める転写サイクルチェックの方法を見出すこと、つまり、NRF2 に対する分子標的薬の作用点を絞り込むことに非常に有用であることが予想される。しかし、核内での転写因子 Nrf2 の作用機序に関しては、小 MAF とヘテロダイマーを形成すること、他の転写因子 ATF4 や p300 と協調的に働くことが示されているに過ぎず、その詳細はよくわかっていない。そこで、本研究は NRF2 蛋白質の立体構造解析、Nrf2 蛋白質複合体の単離、および、それら複合体の時間的・空間的な高次構造の変化と、基質である標的遺伝子のプロモーター上のクロマチン構造（ヒストン修飾やヒストンのポジショニング）の変化を階層的に捉えることにより、転写因子 NRF2 の機能発現・制御機構を分子レベルで解明することを目的とした。

【研究成果】**1. NRF2 蛋白質複合体の単離・精製および構成因子の同定：**

細胞核内での転写因子 NRF2 の作用機序に関しては、小 MAF とヘテロダイマーを形成すること、他の転写因子 ATF4 や p300 と協調的に働くことが示されているに過ぎず、その詳細はよくわかっていない。そこで、細胞核内において形成される転写因子 NRF2 蛋白質複合体を単離し、質量分析器によって、その構成因子を明らかにする。我々は正常な KEAP1 蛋白質があっても細胞核内に移行する NRF2 (アミノ酸変異を伴う NRF2) をヒトの癌患者で発見しており、その変異を導入したタグ付き NRF2 を恒常的に発現する HeLa 細胞の樹立に成功した。この細胞を用いたスモールスケールでの実験結果では、細胞核内移行型 NRF2 蛋白質複合体は分子量 2Md 以上と非常に大きな複合体を形成していることを見出した。そこで、タグ付き細胞核内移行型 NRF2 を一過的に発現させ、タグに対するアフィニティーカラムを用いて細胞核内移行型 NRF2 蛋白質複合体を単離・精製し、質量分析器によって構成因子を明らかにした。約 20 種類の蛋白質が見出されたが、蛋白質分解酵素複合体が大半を占めていることがわかった。

そこで、NRF2 の欠失変異体を用いて、これら蛋白質分解酵素複合体が結合するドメインの探索を行った。その結果、蛋白質分解酵素複合体が結合するドメインは NRF2 の転写活性化には影響しないドメインであることがわかった。そこで、再度このドメインを欠いたタグ付き細胞核内移行型 NRF2 を一過的に発現させ、タグに対するアフィニティーカラムを用いて細胞核内移行型 NRF2 蛋白質複合体を単離・精製し、質量分析器によって構成因子を明らかにした。その結果、新規に約 10 種類の結合因子を見出すことに成功した。

現在、これら NRF2 結合因子の中から転写因子として作用することが知られている 2 因子に焦点をあてて、それら因子の機能解析を行っているところである。

2. NRF2 の蛋白質修飾の解析：

最近、申請者は抗癌剤抵抗性肺癌細胞株の NRF2 は複数の部位がリン酸化されていることを見出した。多くの NRF2 欠失ミュータントの解析から、NRF2 の約 50 アミノ酸の領域中に 3 か所の主要なリン酸化部位が存在することを突き止めた。そこで、この約 50 アミノ酸の領域中のリン酸化可能

なアミノ酸を網羅的に Ala 置換し、リン酸化に影響を与えるのか解析を行った。その結果、これら 3 カ所は全てリン酸化に影響を与えることが判明した。

次に、これらリン酸化に影響を与えるアミノ酸を一カ所ずつ、2 カ所ずつ、あるいは 3 カ所全て Ala 置換した NRF2 の cDNA を作成し、転写活性化に影響があるのか一過性のレポーターアッセイを用いて解析を行った。しかし、残念ながらこれらの部位を Ala 置換した NRF2 ではレポーターアッセイによる転写活性化には影響を与えることはないことがわかった。

現在、これら Ala 置換した NRF2 の cDNA をゲノムに挿入した細胞株の樹立を試みており、今後、転写活性化に影響がでるのか解析を進めるつもりである。

3. NRF2-MAFG-DNA 複合体の構造解析：

細胞核内での転写因子 NRF2 の作用機序に関しては、3 種類の小 MAF (MAFG,MAFK,MAFF) の一つとヘテロダイマーを形成し、DNA を認識して結合することが知られている。申請者は、NRF2 は肺癌細胞内では主に MAFG と結合していることを免疫沈降法によって見出した。そこで、大腸菌を用いて、NRF2 および MAFG を大量に発現・精製し、認識配列を含む 2 本鎖 DNA と結合させ、NRF2-MAFG-DNA 複合体の結晶化に成功した。現在、X 線を用いて立体構造解析を進めており（横浜市立大学・緒方一博先生との共同研究）、今後、NRF2 の転写活性化機構の詳細な解析を行う予定である。

大野 欽司 公募研究代表者 (H25～26 年度)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究課題名：神経変性疾患関連 RNA 結合タンパク FUS による転写抑制機構解明

【研究目的】

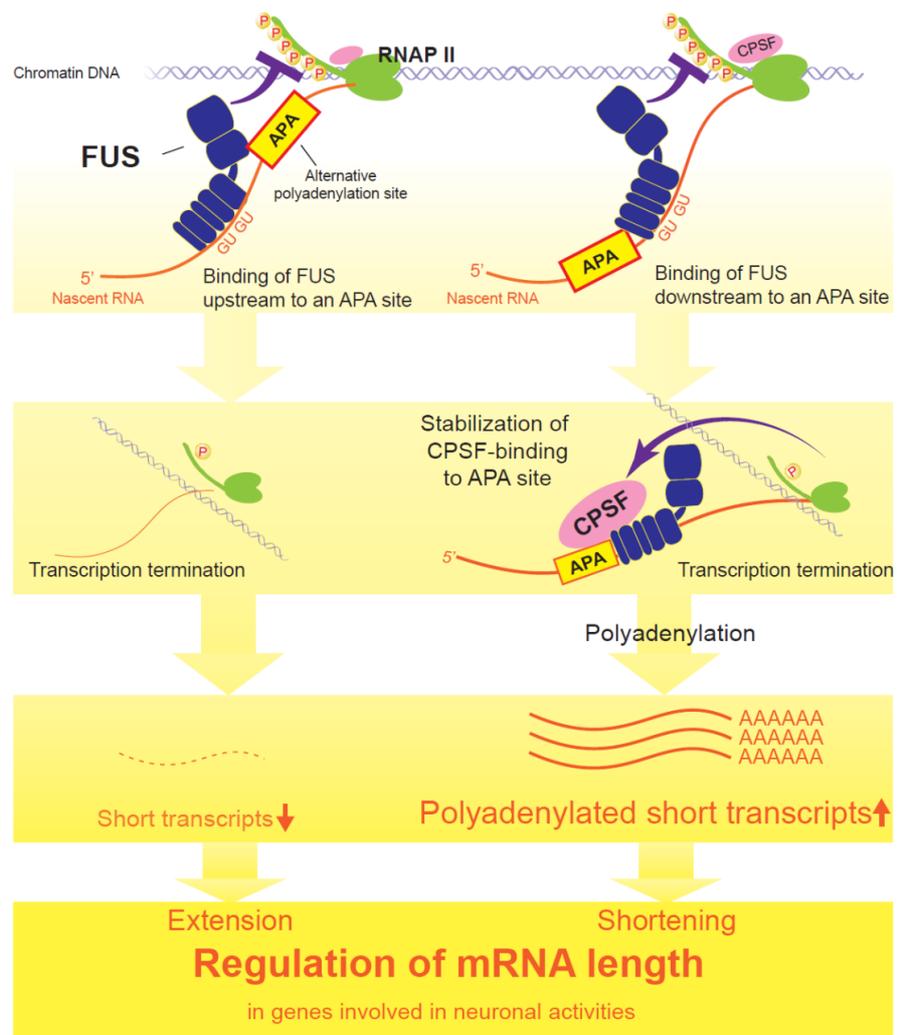
本研究の目的は、筋委縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) と前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration, FTL) の原因に関わる RNA 結合タンパク FUS による RNA polymerase II (RNAPII) 活性抑制分子機構を明らかにすることである。

申請者らは CLIP-seq と exon array の複合解析により、FUS が標的遺伝子 promoter region の antisense noncoding RNA (ncRNA) に FUS が結合し転写を抑制することを 2012 年に報告した。さらに、FUS CLIP-seq と RNAP II ChIP-seq の複合解析により、FUS が RNAPII を抑制することを見出している。本研究は、この分子制御機構のさらなる解明を行う。

【研究成果】

RNA 結合タンパク FUS による RNA polymerase II (RNAPII) 活性抑制分子機構を明らかにするため、RNA 結合部位を網羅的に同定する CLIP-seq、RNAP II 集積を解析する RNAP II ChIP-seq、転写開始点変化を明らかにする CAGE-seq、スプライシング変化を明らかにする directional mRNA-seq、転写終結点変化を明らかにする polyA-seq、転写中の RNA を明らかにする nascent-seq の 6 種の high throughput sequencing を行い、その統合解析を行った。それぞれ、CAGE-seq, 9.4 万個の転写開始点; RNA-seq, 1.4 万個の exon; polyA-seq, 11.9 万個の転写終結点を検出し、bioinformatics 解析を実施した。

CLIP-seq では、3 万か所を超える FUS-RNA 結合集積領域が見いだされ、これらの領域で FUS 依存的に、ChIP-seq で RNAP II のうっ滞が、Nascent-seq で新生 RNA 量の減少が認められた。すなわち、FUS は合成途中の RNA への結合を介して、局所的に RNAP II の転写速度を減弱させ、RNA 新生を抑制していることが判明した。Fus knockdown 細胞



を用いた RNA-seq 解析では、数百個の遺伝子に mRNA 発現量の変化は認められるものの、ほとんどの遺伝子で 2 倍以内の変化という軽度の発現変化であった。RNAPII の集積は、転写スピードの減速により生じ、様々な RNA processing 変化をもたらすことが知られている。CAGE-seq, polyA-seq, CLIP-seq の統合解析を行ったところ、転写開始点やスプライスサイトに比べ圧倒的に多くのポリアダニル化部位 (PolyA site) が FUS-RNA 結合周囲に集積していることが見出された。また、Fus knockdown により、3000 か所を超える PolyA site が 4 倍以上発現変化するなど、FUS が RNA 結合を介し、積極的にポリアダニル化制御を行っていることが明らかとなった。PolyA site と FUS-RNA 結合の位置関係には明瞭な傾向が認められ、PolyA site 下流への FUS 結合はポリアダニル化を促進し、逆に上流への結合は抑制する (図)。MS2 tethering による、polyadenylation site 下流への FUS 強制結合を行った細胞実験でも、同様の結果が得られた。PolyA site 下流への FUS 結合時には、FUS は、RNAP II 転写抑制作用により転写を終結を進めるとともに、CPSF160 との協調作用によりポリアダニル化を促進する。逆に、PolyA site 上流への結合時は、本来、PolyA site 下流で生じるべき RNAP II 転写抑制が早期に上流で生じ、タイミングのずれからポリアダニル化が障害される。本研究により、FUS が polyadenylation 制御因子であることを明らかにするとともに、その RNA 結合部位特異的な制御機構の詳細を、初めて明らかにした。

【本研究課題に関する主要論文】

- Position-specific binding of FUS to nascent RNA regulates mRNA length. Masuda A, Takeda J, Okuno T, Okamoto T, Ohkawara B, Ito M, Ishigaki S, Sobue G, Ohno K, *Genes Dev* 29, 1045-57 (2015).
- FUS-regulated region- and cell-type-specific transcriptome is associated with cell selectivity in ALS/FTLD. Fujioka Y, Ishigaki S, Masuda A, Iguchi Y, Udagawa T, Watanabe H, Katsuno M, Ohno K, Sobue G, *Sci Rep* 3, 2388 (2013).

黒柳 秀人 公募研究代表者 (H25～28 年度)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究課題名：転写産物の高精細プロファイリングによる転写と転写後プロセシングの共役機構の解明 (H25～26 年度、H27～28 年度)

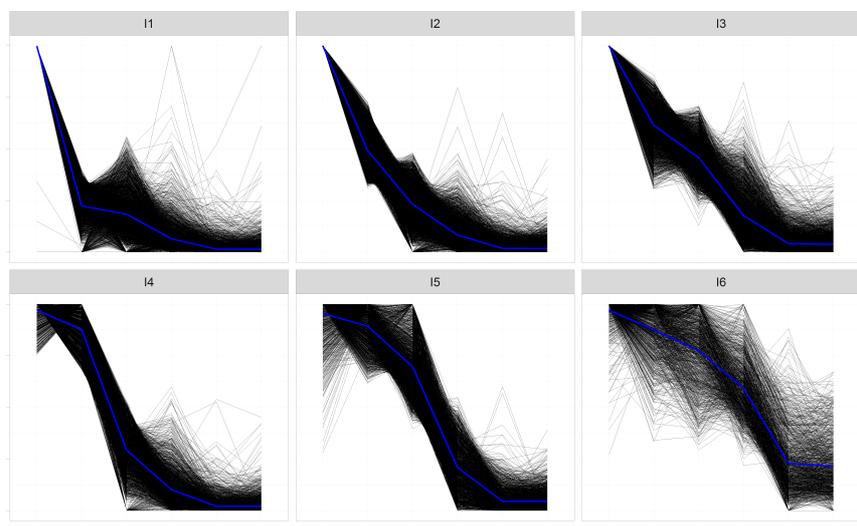
【研究目的】

タンパク質をコードする遺伝子の発現において、mRNA 前駆体の転写と共役して転写後プロセシングが行われる。両者を機能的に共役して遺伝子発現を巧妙に制御するための分子機構が明らかにされつつあるが、これまでの知見は主に培養細胞を用いた実験系から得られたものであり、多細胞生物の生体での遺伝子発現制御における共役機構の詳細は依然不明である。代表者はこれまでに、線虫 *C. elegans* で RNA ポリメラーゼ II (Pol II) と会合して自身の遺伝子の転写とスプライシングを制御する特異な制御因子 LST-3 を見出しているが、多細胞生物の生体で転写から転写後プロセシングまでの mRNA の動的成熟過程を一貫して高精細にモニターして制御因子の機能を解析する適切な実験系がなく、LST-3 の個体レベルでの機能を適切に解析できていなかった。

本研究課題では、多細胞モデル生物の mRNA 前駆体が核内で転写され、転写後プロセシングを経て成熟 mRNA として細胞質へ到達する動的成熟過程を高精細にゲノムワイドで明らかにすること、および転写サイクルとプロセシングの共役における新奇の制御因子 LST-3 の機能ならびに転写速度の影響を個体レベルで解明することを目的とする。そのために、線虫を用いて、新生 RNA を短時間パルス標識し継時的に抽出して定量的にゲノムワイドに解析する実験系を構築する。新生 RNA のパルス標識と細胞分画を組み合わせ、mRNA 動的成熟過程プロファイルをゲノムワイドに高精細に明らかにし、遺伝子群ごとの特徴を明らかにする。lst-3 変異体と野生型線虫の mRNA 動的成熟過程プロファイルを比較して、生体における LST-3 の機能を解明する。

【研究成果】

液体培地で同調飼育した L1 幼虫期の線虫を液体窒素で凍結後に乳鉢ですり潰し、遠心分離することで、細胞核画分と細胞質画分に分画する方法、さらに核画分の尿素処理により可溶性の核質画分と不溶性に画分に分離し、それぞれの画分から全 RNA を調製する方法を確立した。また、4-チオウリジン (4SU) を用いて線虫生体内で新生 RNA を短時間代謝標識し、全 RNA を抽出後にチオ標識



RNA をビオチン化して磁気ビーズで濃縮・精製する方法を確立した。そして、これらを組み合わせ、野生型株の新生 RNA を 4SU で 5, 10, 30, 90 分間代謝標識し、細胞分画後に得たクロマチン画分全 RNA から標識 RNA を精製し、クロマチン画分・核質画分・細胞質画分の rRNA を除去した全 RNA とともに、新学術領域研究「先進ゲノム支援」の支援を受けて大規模シーケンシング解析を行い、得られたシーケンスデータの生物情報学的解析を行った。その結果、意外にもクロマチン画分の全 RNA ではイントロンリードはあまり検出されず、クロマチン画分から精製した新生 RNA ではイントロンリードが期待どおり濃縮されていたことから、見かけ上は成熟している mRNA がクロマチン画分に大量にまたは長時間留まっていることが示唆された。また、代謝標識された RNA のシーケ

ンスデータや RT-PCR 解析の結果、標識 RNA には mRNA 前駆体や一部のイントロンのみが除去されたプロセッシング途中 RNA が濃縮されており、プロセッシングの経時的な動態が解析できることが確認された。そこで、個々のイントロンが除去されていく経時変化についてゲノムワイドにクラスタリング解析を行い、イントロン除去の効率によってイントロンが数種類に分類された（右図）。そして、RT-PCR 解析により、同一遺伝子の中でも速く除去されるイントロンと除去に時間を要するイントロンが混在していることが示された。また、イントロン除去効率と相関する指標として、イントロンの長さ、スプライス部位の強弱に加えて、遺伝子内の相対的な位置が関係することが見いだされた。

各遺伝子のクロマチン画分の新生 RNA における比率とクロマチン・核質・細胞質画分の全 RNA における比率をクラスタリング解析することで、各遺伝子の mRNA の安定性やクロマチン画分にとどまる時間が長いなどの特徴で遺伝子を分類できることが分かった。そして、安定な mRNA にはリボソームタンパク質遺伝子が、不安定な mRNA には転写因子の遺伝子が濃縮していること、クロマチン滞在時間が長い遺伝子にはミオシンなど筋組織の比較的大きな遺伝子が濃縮していることを見出した。

LST-3 については、ChIP-seq 解析を行ったところ、転写の自己制御を行う *lst-3* 遺伝子自身のプロモーター領域だけでなく、発現している遺伝子のプロモーター領域に普遍的に結合していることが明らかとなった。本課題は平成 29 年度への繰越が認められており、*lst-3* 変異体における新生 RNA の大規模シーケンス解析についてすでに「先進ゲノム支援」からデータを得て、現在も引き続き解析を行っている。

【本研究課題に関する主要論文】

- An emerging model organism *Caenorhabditis elegans* for alternative pre-mRNA processing in vivo. Wani S, Kuroyanagi H, *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, in press.
- Splicing factors control *C. elegans* behavioural learning in a single neuron by producing DAF-2c receptor. Tomioka M, Naito Y, Kuroyanagi H, Iino Y, *Nat Commun* 7, 11645 (2016).
- Evolutionarily conserved autoregulation of alternative pre-mRNA splicing by ribosomal protein L10a. Takei S, Togo-Ohno M, Suzuki Y, Kuroyanagi H. *Nucleic Acids Res* 44, 5585 (2016).
- RBFOX and SUP-12 sandwich a G base to cooperatively regulate tissue-specific splicing. Kuwasako K, Takahashi M, Unzai S, Tsuda K, Yoshikawa S, He F, Kobayashi N, Güntert P, Shirouzu M, Ito T, Tanaka A, Yokoyama S, Hagiwara M, Kuroyanagi H, Muto Y, *Nat Struct Mol Biol* 21, 778 (2014).

古久保 哲朗 公募研究代表者 (H25~26 年度)
横浜市立大学・大学院生命医科学研究科・教授

研究課題名：基本転写因子 TFIID を介した転写調節機構の解明

【研究目的】

コアプロモーター構造を認識する TFIID は、TATA 結合タンパク質 (TBP) と 14 種類の TBP 随伴タンパク質 (TAF) から成る巨大なタンパク質複合体である。また TFIID は、転写開始前複合体のアッセムブリーに際して核となる分子であり、転写調節因子から受け取った信号を転写量の増減へと変換する上で中心的な役割を果たす。我々は、これまで主に発芽酵母を用いて TAF の生体内機能について解析を進めてきたが、その過程で、TAF1 の N 末端に存在する TBP 機能阻害領域 (TAND; TAF1 N-terminal domain) が TFIID による転写活性化の分子スイッチとして機能することを見出し、"二段階ハンドオフモデル"と呼ぶ転写活性化の分子モデルを構築した。このモデルでは、転写活性化ドメイン (AD) が TAND の構造を分子的に擬態することによって TAND-TBP 間の負の相互作用を解除し、最終的には TBP を TATA ボックスに送り込むことにより転写を活性化すると考えているが、その詳細については未だ不明な点が多い。本研究では、構造解析や遺伝学的解析を通じて、上記"二段階ハンドオフモデル"のさらなる検証と TAND 機能の全容解明を目指す。

【研究成果】

1. TAND の分子構造

発芽酵母由来の TAND-TBP 複合体の構造を高解像度 (1.97Å) で決定することに成功し、Myc 由来の AD が TAND-TBP 間の相互作用を不安定にすることを明らかにした (海外のグループとの共同研究による; 図 1)。また今回初めて TAND2 の構造が明らかとなり、Brl1 (TFIIIB サブユニット)、Mot1, TFIIA と TBP 上の相互作用部位を共有していることから、当該相互作用部位は、種々の転写因子に対する TBP の分子スイッチとして機能する可能性が高いと考えられる。

2. TAF 遺伝子の一過的なシャットオフによる TAND 依存的な細胞分化現象

TAF11 or TAF12の上流にGAL1プロモーター (GAL1pro) を組み込み、別途プラスミド上に存在するTAF11 or TAF12にランダムな変異を導入し、グルコース培地上での生育の有無を調べることにより、TAND欠失変異に対して合成致死性を示すtaf11 or taf12変異の探索・同定を試みた。その過程において、①宿主として用いたGAL1pro-TAF11 or TAF12株のうち、前者のみがグルコース培地上でも生育可能であること、②GAL1pro-TAF11株のグルコース培地上での生育はTAND依存的であること、③GAL1pro-TAF11株において、グルコース培地シフト後のGAL1proの一過的な転写抑制は正常に起こるものの、その後徐々に転写抑制が解除されることが明らかとなった。さらに解析を進めたところ、④本現象にはTAF特異性があること (GAL1pro-TAF2, 7, 11, 13株はグルコース培地上で生育可能、GAL1pro-TAF1, 4, 5, 6, 9, 12株は生育不可能、GAL1pro-TAF3, 8, 10株は両者の中間的な性質を示すこと)、⑤少なくともGAL1pro-TAF11株については、シャットオフ後に形態の異なる二種類の異形細胞が出現すること、が明らかとなった。興味深いことに、これらの異形細胞はガラクトース培地上で生育させても元の状態に戻ることはなく、何らかのエピジェネティックな分子機構により、細胞の状態が固定されてしまったものと考えられる。ヒトTFIIDの発現量は、未分化な状態ほど高く、分化に伴い低下することが知られている。TAF11の発現をシャットオフすることにより生じた異形細胞は、一種の分化状態にあるとも考えられることから、本現象の分子基盤の解明は、多能性幹細胞の関連研究分野に対しても大きな波及効果をもたらすことが期待される。

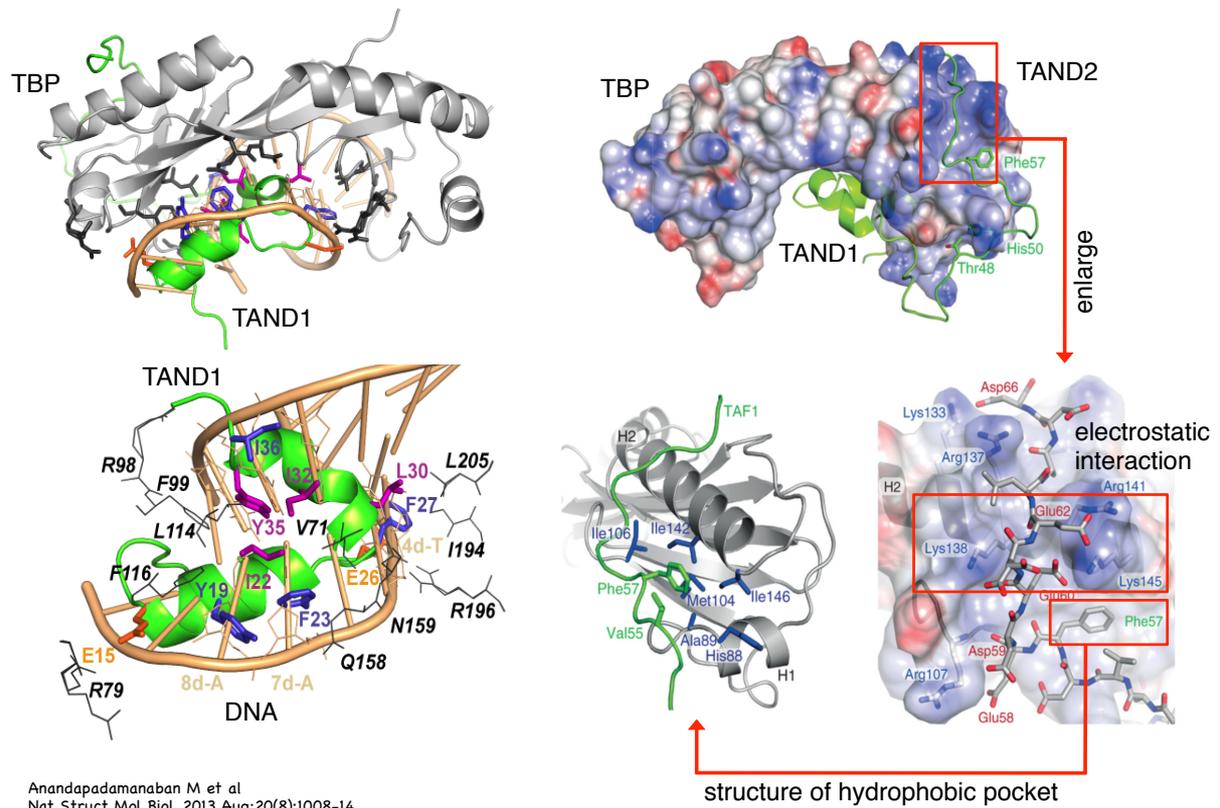


図1 出芽酵母由来の TAND と TBP の複合体構造

【本研究課題に関する主要論文】

- The physical size of transcription factors is key to transcriptional regulation in chromatin domains. Maeshima K, Kaizu K, Tamura S, Kokubo T, Takahashi K, *J Phys Condens Matter* 27, 064116 (2015).
- Both HMG boxes in Hmo1 are essential for DNA binding in vitro and in vivo. Higashino A, Shiwa Y, Yoshikawa H, Kokubo T, Kasahara K, *Biosci Biotechnol Biochem* 79, 384-93 (2015).
- High-resolution structure of TBP with TAF1 reveals anchoring patterns in transcriptional regulation. Anandapadamanaban M, Andresen C, Helander S, Ohshima Y, Siponen MI, Lundström P, Kokubo T, Ikura M, Moche M, Sunnerhagen M, *Nat Struct Mol Biol* 20, 1008-14 (2013).

佐藤 政充 公募研究代表者 (H27~28 年度)
早稲田大学・先進理工学部・准教授

研究課題名：シングルセル発現解析と核膜変異体ライブラリを用いた転写サイクル始動機構の解明

【研究目的】

細胞はリアルタイムに周囲の環境を認識して、時々刻々と遺伝子発現を変化させることによって、環境への適応を可能としている。個々の細胞はその存在場所によって異なる環境に接しているため、すべての細胞は異なる応答を示し、結果的に遺伝子発現の変化が異なってくると考えられる。したがって、細胞が環境にどのように応答していくかを解析するためには、個々の細胞内での遺伝子発現の変化をモニターする必要がある。

しかしながら、転写研究の現状では、1細胞から RNA を単離することは技術的に困難であり、かわりに多数の細胞からなる集団から RNA を大量調製することで、トランスクリプトームを作成している状況である。このようなバルク RNA からのトランスクリプトームの作成はこれまで数多くの成果を生み出してきたものの、個々の細胞において生じた個体差が細胞の運命決定に及ぼす影響を判定して未知の分子メカニズムの解明を目指すためには、単一細胞（シングルセル）からの RNA 単離とトランスクリプトーム作成を実行する必要がある。

そこで本研究では、これまで遺伝学を武器に転写研究に多大な貢献を果たしてきた分裂酵母 *S. pombe* に注目して、世界初の「酵母シングルセル発現解析」を可能とする技術開発を目指した。当技術を開発することによって、これまで細胞集団が持つ「平均値」として示されてきたトランスクリプトームとはまったく異なる「個体差」を解析する時代が迎えられるであろう。

【研究成果】

これまで酵母を用いたシングルセル発現解析は世界広しといえども1例も存在しない。その第一の理由は、酵母では RNA 転写量が極めて少ない（平均して 0.5~2 コピー/遺伝子）ためであろう。また第二に、強固な細胞壁の存在が細胞内 RNA 抽出の際の障害となることが背景にあると考えられる。本研究ではまずこの2つの問題点を解決するための手法を開発することに専念した。

様々な材料を用いて、分裂酵母単一細胞からの RNA 抽出と cDNA 増幅の条件を検討しながら次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析をおこなった結果、発現解析に適した細胞溶解の条件を決定することができた。

次に、栄養増殖中の細胞を1個単離して、この溶解条件下で実際にシングルセル・トランスクリプトームを作成した。これを、既存の細胞集団から作成したバルク・トランスクリプトーム (Marguerat *et al.* 2012) と比較したところ、両者は非常に高い相関を示した。このことは、本手法が作成するシングルセル・トランスクリプトームが一定のクオリティをもつことを実証している。

では、本研究が開発する酵母シングルセル発現解析の手法は、あまり劇的に変化しないと思われる一般的な増殖中の細胞について有効であるのみならず、環境の変化に応じて起きる劇的な遺伝子発現の変動を正確に検出することはできるだろうか。

分裂酵母は培地中の栄養源（特に窒素源）の枯渇に応じて遺伝子発現を劇的に変動させて性分化（接合・減数分裂・胞子形成などの一連の過程）をおこなうことが知られている。本研究では、この窒素源飢餓状態における遺伝子発現の変動をシングルセル発現解析の手法で検出できるかを試みた。

まず、窒素源に反応する野生型細胞を単一細胞としてピックアップするにあたり、窒素源飢餓反応遺伝子として知られる *ste11* の発現・局在を指標として細胞を選別することにした。すなわち、*Ste11-GFP* 発現株を野生型相当株として飢餓誘導し、*Ste11-GFP* の核局在が顕著な細胞をピックアップすることで、確実に窒素源飢餓に反応した細胞のトランスクリプトーム作成をおこなうことにした。

窒素源飢餓状態の細胞に対して、上述の増殖細胞の場合と同様の条件下で細胞破碎と RNA 抽出をおこなったところ、窒素源飢餓状態の細胞は効率良く破碎できないことが分かった。窒素源飢餓状態では細胞壁が強化される可能性があるため、再度細胞破碎のための条件を検討し直した。このように、

酵母シングルセル発現解析を今後別の環境に適用していく際は、細胞溶解の効率をモニターしながら、適宜条件検討をおこなう必要があるといえる。

このような条件改善後のサンプルに対して次世代シーケンサーを用いた RNA-seq をおこなったところ、窒素源飢餓に応答することが既に知られている遺伝子群の発現が検出された。これらの結果から、本研究が開発した分裂酵母シングルセル発現解析の手法は、細胞集団から得られるトランスクリプトームと遜色ないレベルでの遺伝子発現を検出できることが明らかになった。本手法の技術的な正当性が示されたことで、今後はシングルセルからでなければ達成できないような難培養条件下でのトランスクリプトームを作成し、これまで研究できなかった条件下での遺伝子発現の仕組みを探っていく。

本研究では研究協力者として、露崎隼（早大・院先進・生命医科学）が酵母を用いた部分の実験をおこない、次世代シーケンサー部分の実験と解析は竹山春子教授（早大・先進理工・生命医科学）との共同研究でおこなった。これまでの成果をまとめた投稿論文を現在準備中であり、さらに別の環境下でのシングルセル発現解析を進めている。また、成果の一部は、酵母遺伝学フォーラム、染色体ワークショップ・核ダイナミクス研究会、国際シングルセルシンポジウムにおいて学会発表された。

佐藤 ゆたか 公募研究代表者 (H25~H26 年度)
 京都大学・大学院理学研究科・准教授

研究課題名：DNA ループによる転写調節機構の解明

【研究目的】

近年の Chromatin Conformation Capture などを用いた研究で、ゲノム DNA は細胞の核内で三次元構造を取ることが明らかにされてきた。その三次元構造と転写調節機構の関連について多くの示唆が与えられているが、具体的な分子レベルでの関連性についてはほとんど明らかになっていない。我々はこうした DNA ループの形成によって、Admp と Pinhead という隣接する二つの遺伝子のうちの一方の転写が他方の転写を抑制するという新しいメカニズムを見出した (Imai *et al.* 2012)。この遺伝子クラスターは進化的に保存されているが、これはこの転写機構が進化的制約となっているからだと考えられる。進化的に保存された遺伝子クラスターは他にも多数存在し、少なくともこのうちの一部には同様の機構が存在することが予想される。そこで、この機構がどの程度広く我々生物のゲノムの調節をおこなっているのかを調べ、更に詳しいメカニズムを明らかにしていくことが本研究提案の目的である。

【研究成果】

Admp/Pinhead のような転写調節機構が働いているとすれば、進化的な制約となり、遺伝子クラスターとして進化的に保存されることが期待できる。そこで、公開されているゲノム情報を用いて、カタウレイボヤとヒト、マウス、カエル、フグ、ゼブラフィッシュ、線虫、ショウジョウバエ、ミジンコ、ネマトステラの間で比較をおこない、マイクロシンテニーを探索した。

探索されたマイクロシンテニーの中から 41 の遺伝子対について、*in situ* ハイブリダイゼーションによって発生における遺伝子発現パターンを調べた。Admp/Pinhead のマイクロシンテニーに見られるような DNA ループによる相互排他的な転写調節機構が働いているとすれば、遺伝子発現パターンは相互に排他的になるはずである。遺伝子対の両方が胚性のゲノムから発現しているものは 6 対だけであり、これら 6 対の遺伝子はそれぞれ対となる遺伝子とは異なる組織で発現していた。これらの遺伝子群は、Admp/Pinhead のような転写調節機構が働いている候補である。残りの遺伝子については、胚発生においては一方の遺伝子のみ発現しか観察されなかった。

遺伝子対の両方が胚性のゲノムから発現しているもののうち、1 つを例にとり、転写調節のレベルで関連があるかどうかを調べるため、遺伝子対のいずれか一方を強制的に発現させる条件で、他方の遺伝子の発現を観察したところ、一方の遺伝子が転写されるときには他方の転写が抑制される関係が認められた。このことは、相互排他的な転写調節機構の存在を更に強く示唆している。

加えて、ホヤの系統で遺伝子重複によって生じたと考えられる Twist 遺伝子についても同様の解析をおこなった。Twist1 および Twist2 は同じ組織で発現するものの、Twist1 の発現のほうが早い。Twist2 の発現は Twist1 によって調節され、Twist1 の転写が終了すると同時に開始する。この発現パターンをレポーターコンストラクトで再現することに成功した。空間的な排他性だけでなく、時間的な排他性にも関与している可能性を示すものである。

同定した複数の動物間で保存されたマイクロシンテニーのうち、Admp/Pinhead のような相互排他的な転写調節機構が存在する可能性のある 6 対の遺伝子対について、ホヤ胚を用いて、解析をすすめた。このうちの 1 対の遺伝子については、下流側の遺伝子の転写開始点が複数存在し、内胚葉細胞で発現するときに使われる転写開始点は、上流側の遺伝子の転写開始点よりも上流に存在していた（つまり、下流遺伝子の内胚葉細胞のアイソフォームでは、第一イントロン内に上流側の遺伝子がコードされる）。この転写開始点の使い分けによって、下流遺伝子の転写時には上流遺伝子の発現が抑制されることがわかった。遺伝子の転写が、周囲の遺伝子の転写に影響をあたえるという意味で、Admp/Pinhead のローカスでの転写調節に似ているが、実際に働く機構については、同じではなかった。しかし一方で、そうした調節機構が進化的に遺伝子の並びが保存されるマイクロシンテニーの理由となっていることを示している。

また、以下に挙げるように本研究領域の研究で得られた成果は、発生における転写制御と進化の研究の重要な基礎データとなり、実際に別の研究の基礎データとして利用され発展して成果をあげている。Admp/Pinhead に類似の機構を持つと考えられた遺伝子座の一つに BMP2/4 / Gdf1/3-r があつた。この2つの遺伝子の発現調節機構の詳細を研究している過程で、BMP2/4 の発現領域の詳細が明らかとなり、それを契機として、感覚神経系の進化の過程の一端が明らかとなった。また、Gdf1/3-r の調節機構の解析は、この遺伝子が母性因子によって直接制御される機構が明らかとなる端緒となり、また、Gdf1/3-r がシグナル分子としてホヤ初期胚におけるパターン形成をおこなっている仕組みを明らかにする端緒となった。また、本領域研究の中で得られたアドバイスや議論によって、クロマチン免疫沈降の技術が進歩し、発生と進化に関する研究に大きく貢献した。

【本研究課題に関する主要論文】

- A time delay gene circuit is required for palp formation in the ascidian embryo. Ikeda T, Matsuoka T, Satou Y, *Development* 140, 4703-8 (2013).
- Gene regulatory systems that control gene expression in the *Ciona* embryo. Satou Y, Imai KS, *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 91, 33-51 (2015).

スタセビッチ ティモシー 公募研究代表者 (H25 年度)

大阪大学・大学院生命機能研究科・特任研究員

研究課題名：Quantifying epigenetic regulation of the transcription cycle in single living cells

【研究目的】

The goal of the proposed research was to monitor and quantitatively analyze the dynamics of endogenous modifications to RNA polymerase II (RNAP2) and histones in single living cells. With the aid of mathematical modeling, we hoped to more precisely pinpoint the temporal ordering and causality of epigenetic histone modifications during transcriptional gene activation and throughout the cell cycle. For this, we chose to utilize FabLEM (Fab based imaging of Live, Endogenous Modifications), a new technology that had been recently developed in the lab of my co-investigator Professor Hiroshi Kimura.

【研究成果】

After receiving support from the MEXT grant-in-aid for the Transcription Cycle research group, we were highly successful in applying our proposed technology to better understand the role of RNAP2 and histone modifications in gene regulation. In particular, two major publications came directly out of our work, the first in the journal *Nature* (Stasevich *et al.* 2014, in collaboration with Drs. Makio Tokunaga and Kumiko Sakata-Sogawa) and the second in the journal *Methods* (Stasevich *et al.* 2014). These works have had broad impact in the field of gene regulation and have already been cited over 80 times according to Google Scholar (June 2017). Major results are summarized below:

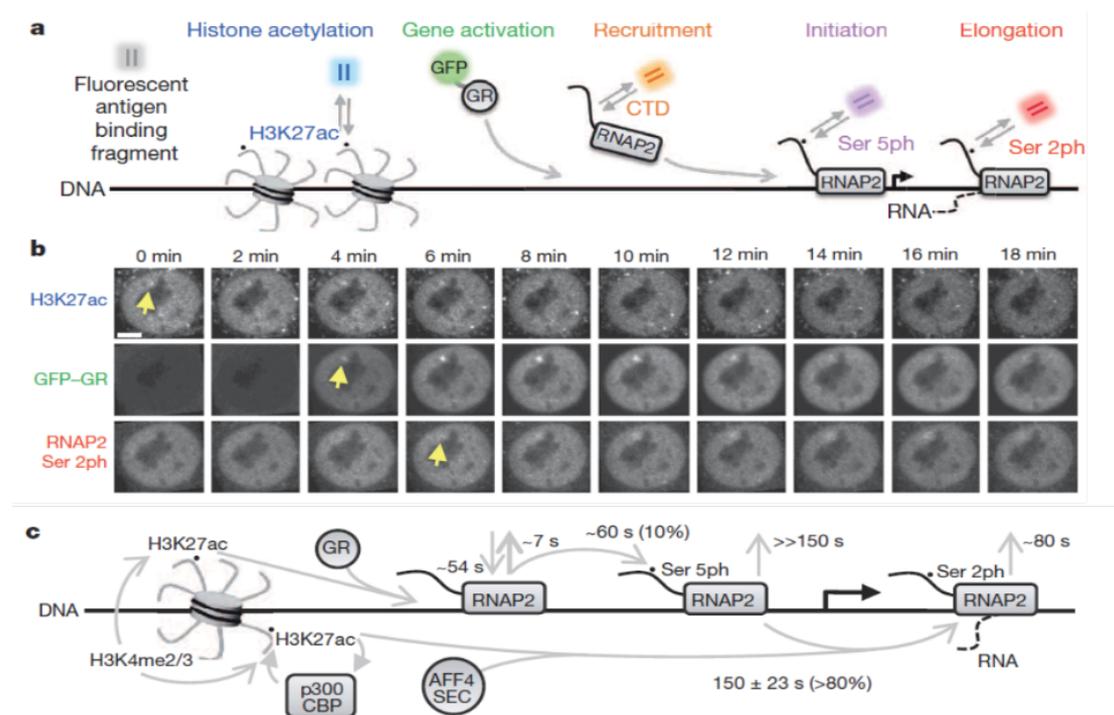


Fig. 1 (a) Schematic of FabLEM strategy to image histone modification dynamics throughout the RNAP2 transcription cycle. (b) Sample data showing histone H3 Lysine 27 acetylation (H3K27ac) together with RNAP2 Serine 2 phosphorylation (Ser2ph) upon induced gene activation at a tandem gene array (yellow arrow) by GFP-GR. The acetylation premarks the gene array and is predictive of the transcriptional response. (c) Summary of measured transcription kinetics. Adapted from Stasevich *et al.*, *Nature* 2014.

I. Causality of histone modifications in gene activation

One of the main issues we wished to address in our research was to directly test by live-cell imaging whether or not the presence of specific histone modifications at an inactive gene locus could predict the transcriptional output of that locus after it is activated. As Fig. 1 demonstrates, we accomplished this by co-imaging specific histone modifications at a tandem MMTV (mouse mammary tumor virus) gene array. This gene array could be temporally activated by addition of the hormone dexamethasone to the cell media. Immunostaining revealed that the gene array was pre-marked with histone H3 Lysine 4 methylation and Lysine 27 acetylation. To see the impact of these marks on gene activation, we co-imaged their dynamic together with RNAP2 phosphorylation before and throughout the gene activation process (Fig. 1b).

This work revealed for the first time that histone acetylation facilitates two distinct phases of the transcription cycle: (i) the recruitment of the transcriptional activator GR and (ii) the efficiency of promoter escape. Perturbation experiments further revealed that the histone acetylation was dependent on histone H3 Lysine 4 methylation and that it was required for a rapid and robust transcriptional activation response (Fig. 1c).

This work had broad impact because it was the first to demonstrate in a direct manner that histone modifications can causally influence gene expression dynamics. Although this had been anticipated by a variety of bulk assay earlier, our ability to image the process in single cells at a single well-defined genetic locus provided a more straight-forward demonstration of this principle, further strengthening the long-held notion of an epigenetic histone “code” that regulates gene expression on top of the more familiar genetic code.

II. Role of histone modifications in regulating transcription throughout the cell cycle

Another major issue we wanted to address with our imaging system was how histone modification dynamics influence global cellular transcription throughout the cell cycle and from one generation of cells to the next. FabLEM provided an ideal imaging modality to address this question because global histone and RNAP2 modifications can be easily quantified by simply measuring the ratio of nuclear to cytoplasmic Fab signal. By monitoring this signal across multiple cellular division cycles, we could measure how different histone modifications correlate with cellular transcription levels at distinct phases of the cell cycle and furthermore measure how modifications are inherited by daughter cells from their mother cells.

The heritability of histone modifications is a critical and necessary component of the epigenetic histone code hypothesis, but a direct test of this hypothesis via live-cell imaging had not yet been developed. We therefore decided to image histone H3 acetylation and RNAP2 phosphorylation across multiple generations of cells, keeping

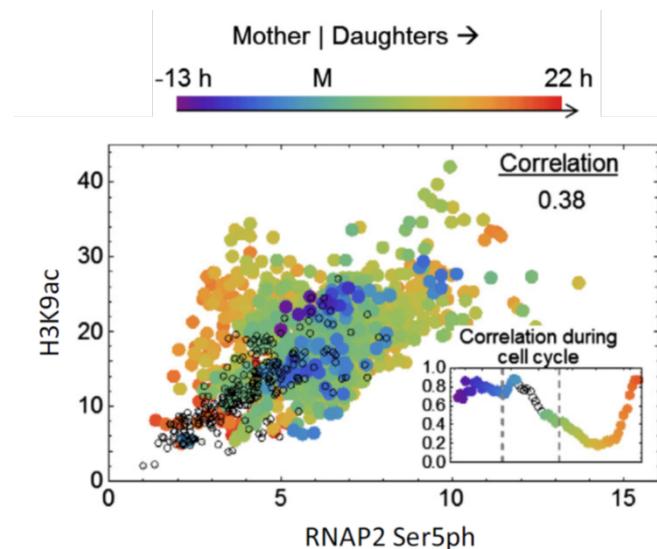


Fig. 2 A scatterplot showing the correlation between histone H3 Lysine 9 acetylation (H3K9ac) and RNAP2 Serine 5 phosphorylation (Ser5ph) in single cells tracked across a single cell division, from mother to two daughter cells. Each point represents a single cell at a specific time. Time across the cell cycle is color coded from purple to red. As the inset shows, the correlation peaks to over 0.9 just before cell division, suggesting histone acetylation occurs at actively transcribed genes just before division, possibly to bookmark them for rapid re-initiation after M phase, Adapted from Stasevich et al, *Methods* 2014.

track of daughter and mother cells. In combination with correlation analyses, this uncovered significant correlations that span cell generations, with relatively strong correlations observed between histone H3 Lysine 9 acetylation and RNAP2 Serine 5 phosphorylation (Fig. 2). As this correlation peaks a few hours before mitosis, we speculated that it could reflect the bookmarking of genes for efficient re-initiation posts cell division.

Together, these two studies have helped lay the groundwork for quantitative live-cell analyses of histone modification dynamics throughout the transcription cycle. We anticipate that this work will help clarify how histone modifications dynamically contribute to gene regulation in living systems.

【本研究課題に関する主要論文】

- Regulation of RNA polymerase II activation by histone acetylation in single living cells. Stasevich TJ, Hayashi-Takanaka Y, Sato Y, Maehara K, Ohkawa Y, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, Nagase T, Nozaki N, McNally JG, Kimura H, *Nature* 516, 272-75 (2014).
- Quantifying histone and RNA polymerase II post-translational modification dynamics in mother and daughter cells. Stasevich, TJ, Sato Y, Nozaki N, Kimura H, *Methods* 70, 77-88 (2014).

高田 彰二 公募研究代表者 (H25~28 年度)
京都大学・大学院理学研究科・教授

研究課題名：転写因子 DNA 探索のエネルギーランドスケープ理論：速度-親和性パラドックス (H25~26 年度)、クロマチン構造と共役した転写因子動態の分子シミュレーション研究 (H27~28 年度)

【研究目的】

第1期は、転写因子のDNA 探索過程に着目して研究を行った。転写因子のDNA 探索過程が通常の3 次元拡散よりも100 倍速い促進拡散であることが示されて以来、幾多の実験・理論研究にもかかわらず、転写因子のDNA 探索機構はいまだに未解明な部分が多い。1 次元拡散、3 次元拡散各々の実験・理論的見積もりが揺らいでおり、それらの組合せ機構はさらに混乱している。 μm スケールの探索の速度論と高分解構造情報とのギャップが大きな一つの課題である。構造情報に基づく探索過程の研究が必須である。ここでの目的は、構造に基づく分子シミュレーションと数理モデリングとによって、転写因子のDNA 探索機構の新しい描像を構築することである。

第2期では、転写因子の認識配列への特異結合に着目して研究を行った。ChIP-seq 等の出現により、クロマチン構造と転写制御の研究は一新し、*in vivo* におけるゲノム上のヌクレオソーム占有位置や各転写因子の結合状態が高解像度で記述可能になった。しかし、これらの情報と構造レベルの研究にはギャップがある。ChIP-seq 等のトランスクリプトームと構造生物学的知見を融合して、転写制御を3次元的に理解することは今後の大きな課題である。この目的は、1) 独自の粗視化分子シミュレーション技法にChIP-seqのデータを取り込む新しい方法を開発し、2) クロマチン構造が転写因子動態に及ぼす影響、およびその逆を、分子構造に基づいて高い時間空間分解能で明らかにすることである。

【研究成果】

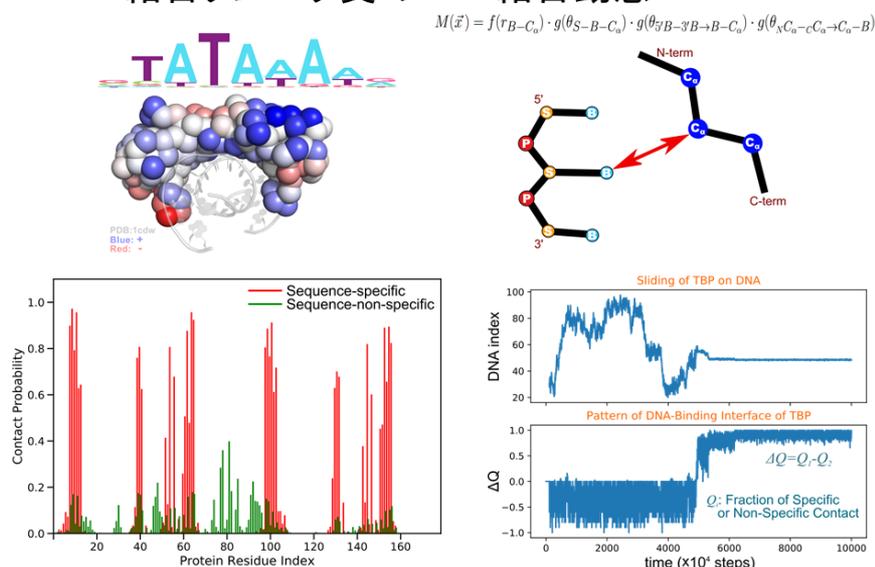
1) 粗視化分子シミュレーション技法に ChIP-seq データを取り込む方法の開発：

当初、*in vivo* の ChIP-seq データを取り込む予定であったが、これでは転写因子と様々な DNA 塩基配列間の相対的親和性しか見積もることが出来ないこと、*in vivo* データはクロマチン環境を複雑に反映した結果であることから、必ずしも取り込むのに最適なデータではないことが判明した。そこで、*in vitro* の蛋白質 DNA 結合データとして、protein-binding microarray のデータが position-weight-matrix (PWM) の形で UniPROBE データベースから取得できるため、本研究ではこれを利用することに変更した。

PWM データを用いて分子シミュレーションを実現するためのポテンシャル関数形を検討し、アミノ酸とヌクレオチドの距離に加えて、3つの角度情報の積を加味した関数(図参照)が適切であると結論付けた。

新しい相互作用モデルのテストとして、転写因子 PO.1 と TATA 結合蛋白質の分子シミュレーションを行い、結合動態を解析した。興味深いことに TATA

タンパク質DNA特異相互作用による TATA結合タンパク質のDNA結合動態



結合蛋白質は、非特異的な配列に対しては静電相互作用を通じて、特異的な結合面と反対の側を向けて相互作用する確率が比較的高かった(図・右下)。そのため、特異配列に到達しても、結合面が異なるために特異配列を通過する現象がみられた。

2) まず、2本鎖DNA上に様々な蛋白質が結合している混雑環境が、転写因子の拡散にどのような影響を与えるかの検討を開始した。2本鎖DNA上に、障害物としてEcoRIを結合させた初期条件から、小型の転写因子の動態を分子シミュレーションにより解析した。転写因子は、障害物であるEcoRIを飛び越えてDNA上を拡散することが極めて難しく、DNA上に結合したEcoRIは、転写因子の拡散にとって大きな障害となる。一方、障害物をテトラサイクリンリプレッサーにした場合、同じ小型の転写因子は障害物を容易に通過することが出来た。これは、障害物の大きさ、形状と関係しており、EcoRIがDNAを巻くように結合してことに起因している。

【本研究課題に関する主要論文】

- Near-atomic structural model for bacterial DNA replication initiation complex and its functional insights. Shimizu M, Noguchi Y, Sakiyama Y, Kawakami H, Katayama T, Takada S, *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E8021-30 (2016).
- Histone acetylation dependent energy landscapes in tri-nucleosome revealed by residue-resolved molecular simulations. Chang L, Takada S, *Sci Rep* 6, 34441 (2016).
- Dynamic Coupling among Protein Binding, Sliding, and DNA Bending Revealed by Molecular Dynamics. Tan C, Terakawa T, Takada S, *J Am Chem Soc* 138, 8512-22 (2016).
- Modeling Structural Dynamics of Biomolecular Complexes by Coarse-Grained Molecular Simulations. Takada S, Kanada R, Tan C, Terakawa T, Li W, Kenzaki H, *Acc Chem Res* 48, 3026-35 (2015).
- p53 dynamics upon response element recognition explored by molecular simulations. Terakawa T, Takada S, *Sci Rep* 5, 17107 (2015).

高畑 信也 公募研究代表者 (H27~28 年度)
北海道大学・大学院理学研究院・助教

研究課題名：HP1 と FACT の共役によるグローバルな転写制御機構

【研究目的】

ヘテロクロマチンは RNA polymerase II によって一過的に転写される lncRNA を反応基質とする RNAi に依存して確立する特徴を持ち、いったん確立されたヘテロクロマチンは多くのエフェクタータンパク質によって維持モードに移行する。興味深い事に FACT 変異株がヘテロクロマチン依存的なサイレンシングの脱抑制を起こす事が他の研究グループから報告されたが、その分子メカニズムに関しては全くの未知であった。申請者らはこの分子メカニズムを解明する為に行った先行研究で H3K9me に結合するヘテロクロマチンタンパク質 HP1 が FACT と物理的に結合してヘテロクロマチン領域のサイレンシング維持に大きく寄与する事を発見した (図 1)。またトランスクリプトーム解析を行いグローバルな転写産物の影響をコーディング遺伝子とノンコーディング遺伝子で分けて解析した所、HP1 変異株と FACT 変異株で変動する遺伝子群が両者

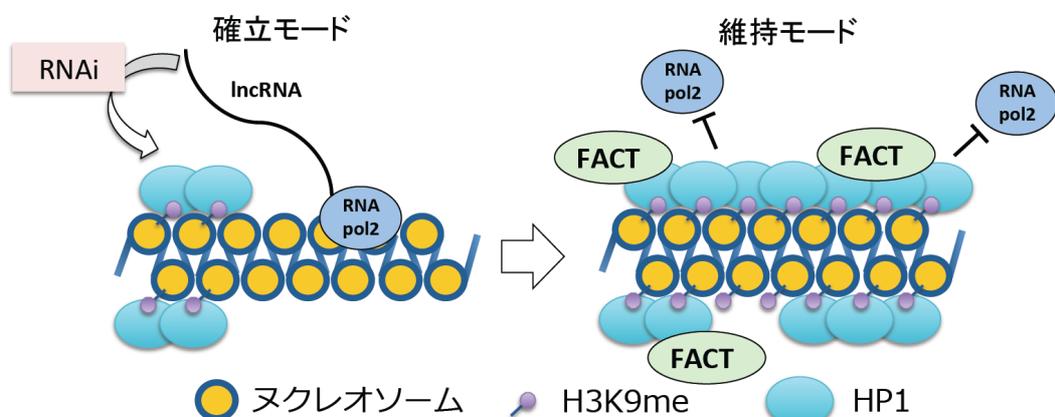


図1 lncRNA転写によるヘテロクロマチン確立とFACTによる維持
変異型FACTではH3K9me、HP1に変化は無いがヌクレオソームの変質を伴う
維持モードのヘテロクロマチン高次構造崩壊が観察される。

ともに極めて似ている事を見出した。他にも ChIP-qPCR 解析からも HP1 が FACT と共役してヘテロクロマチンのみならず、ヒストン H3K9me 非依存的にユークロマチン上の RNA 発現をも制御する事を示すデータを得ている。近年の報告によると減数分裂制御遺伝子や糖代謝に関わる遺伝子群が富栄養条件下においてヘテロクロマチン形成機構に似たサイレンシングを受けている事が示唆されており ncRNA が制御するグローバルな遺伝子発現制御機構の新しい局面が切り開かれつつある。そこで本研究計画では以下の目的を掲げて研究を推進する。

(1) FACT と HP1 分裂酵母ホモログ Swi6 の相互作用解析

先行研究から FACT 構成因子 Spt16 と Swi6 の物理的相互作用が明らかとなっており、結合領域の限局をイーストツーハイブリッド法で行う。最終的には生化学的な実験の裏付けを元にして両者の結合を切る変異を得て分裂酵母を用いた遺伝学的解析に繋げる。

(2) swi6 破壊株と pob3 破壊株を用いた RNA-sequencing

先行研究でマイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析を行ったが、更に詳細な転写産物を sense RNA と anti-sense RNA に分けてモニターする為に RNA-sequencing を行い変異株間で lncRNA (主に antisense-RNA や poly A less RNA)の比較を行う。RNA-sequencing のライブラリー作製はオリゴハイブリダイゼーションによってリボソームのみを特異的に除去したものを鋳型として逆転写を行い、Oligo-dT 濃縮では観察できない RNA も解析対象とする。

(3) ヒストン H3K9me 非依存的な HP1 タンパク質結合領域の解析

ChIP-sequencing による HP1 結合領域の解析を行う。ChIP-sequencing に用いる抗体は市販のものが十分な品質を持たないため、自作のポリクローナル抗体を濃縮精製して用いる。先行研究で

我々はすでに H3K9me の ChIP-sequencing 解析を行っており、この結果を HP1 の ChIP-sequencing 結果と比較して H3K9me 非依存的に染色体上に結合する HP1 を検索する。またトランスクリプトーム解析結果を元にして *swi6Δ* で大きく発現上昇した ncRNA 遺伝子座を ChIP-qPCR で網羅的に解析する。

(4) ヒストン H3K9me 非依存的 HP1 転写制御レポーター株の構築と遺伝学的解析

(2)と(3)から割り出した遺伝子座にレポーター遺伝子を挿入し、簡易的にサイレンシング状態を観察できる酵母株を作成する。またこの酵母株を用いて脱サイレンシングする変異株の単離を試み且つ遺伝学的な解析を行いサイレンシングの分子メカニズム理解に繋げる。分裂酵母の HP1 ホモログ Swi6 は自身のクロモドメインを介してヒストン H3K9me に結合してクロマチン構造を凝集させ転写を抑制するが、上述したように申請者の先行研究から Swi6 は H3K9me 非依存的な転写調節機構も備えている事が解明されつつある。本研究を推進する事で種を通した HP1 と FACT の共役による転写制御系の分子レベルでの具体像に迫る事が可能であり、将来的により高等な生物を用いた研究に繋がれると考える。

【研究成果】

(1) FACT と HP1 分裂酵母ホモログ Swi6 の相互作用解析

初期の研究計画に従ってはじめにイーストツーハイブリッド法にて HP1/Swi6 と FACT の結合様式解析を試みたが Gal4DB-Swi6 を発現する出芽酵母株が生育異常を示したため *in vivo* での相互作用解析を諦め、GST タグを融合したりコンビナントタンパク質を発現精製して *in vitro* における HP1/Swi6 と FACT の相互作用解析を行い、HP1/Swi6 のクロモシャドウドメインと FACT 構成因子 Spt16 の N 末端領域が静電的に相互作用していることを解明した。この結果を受けて HP1/Swi6 結合能を欠損させた分裂酵母 Spt16 変異株を作成して遺伝学的解析を行ったところ、Spt16 が HP1/Swi6 依存的にヘテロクロマチン上にリクルートされていることを明らかにした。

(2) *swi6* 破壊株と *pob3* 破壊株を用いた RNA-sequencing

ヘテロクロマチンタンパク質 *swi6* 遺伝子破壊株と FACT 構成因子 *pob3* 遺伝子破壊株から RNA を抽出して RNA-sequencing を行い、両者のプロファイリングを行ったところ、共通して一部の遺伝子群で sense RNA の発現量は大きく変化がないにも関わらず、anti-sense RNA の転写量が上昇していることを見出した。この結果は生体内において HP1 と FACT が共役してヒストン H3K9me 非依存的に何らかの分子メカニズムに基づいて転写を抑制している可能性を示唆している。

(3) ヒストン H3K9me 非依存的な HP1 タンパク質結合領域の解析

自作した抗 Swi6 抗体を用いて野生型株とヒストン H3K9 メチル化酵素 *clr4* 遺伝子破壊株の HP1/Swi6 ChIP-sequencing を行ったところ、多くの遺伝子で転写集結点近傍への濃縮が確認された。この濃縮は野生株と *clr4* 遺伝子破壊株の両方で確認されており HP1/Swi6 の転写集結点への結合がヒストン H3K9me 非依存的であるという事が明らかとなった。加えて FACT の変異体では HP1/Swi6 の染色体上への結合パターンに大きな変動を示していないことから HP1/Swi6 が未知の分子メカニズムによって染色体上の特定の領域に局在して FACT を転写集結点へ呼び込むと推測される。

(4) ヒストン H3K9me 非依存的 HP1 転写制御レポーター株の構築と遺伝学的解析

(2)と(3)の結果を受けて H3K9me 非依存的に HP1/Swi6 と FACT が転写を抑制する遺伝子を複数同定することができた。この転写抑制メカニズムに関わる他の因子をスクリーニングによって同定すべく今後は候補遺伝子に対して antisense 側にレポーターとなる遺伝子の組込みを試みる。

【本研究課題に関する主要論文】

- H3K36 methylation state and associated silencing mechanism. Suzuki S, Murakami Y, Takahata S, *Transcription* 8, 36-41 (2017).
- Inner nuclear membrane protein Lem2 augments heterochromatin formation in response to nutritional conditions. Tange Y, Chikashige Y, Takahata S, Kawakami K, Higashi M, Mori C, Kojidani T, Hirano Y, Asakawa H, Murakami Y, Haraguchi T, Hiraoka Y, *Genes Cells* 21, 812-32 (2016).

- Histone H3K36 trimethylation is essential for multiple silencing mechanisms in fission yeast. Suzuki S, Kato H, Suzuki Y, Chikashige Y, Hiraoka Y, Kimura H, Nagao K, Obuse C, Takahata S, Murakami Y, *Nucleic Acids Res* 44, 4147-62 (2016).

原田 昌彦 公募研究代表者 (H25～28 年度)
東北大学 大学院農学研究科・准教授

研究課題名：転写サイクルにおけるクロマチンリモデリング複合体のリサイクル機構の解明 (H25～26 年度)、転写サイクルにおけるクロマチンリモデリング複合体の動的リサイクルの解明 (H27～28 年度)

【研究目的】

ゲノムが細胞核内で形成するクロマチン構造は、転写開始、伸長を含む様々な転写サイクル過程を制御している。ATP 加水分解のエネルギーを用いてクロマチン構造を変換するクロマチンリモデリング複合体が転写サイクル制御に関与することが報告されており、多くの遺伝子領域の 5'および 3'領域、gene body など広い範囲にリモデリング複合体の結合が認められる。しかし、細胞あたりのリモデリング複合体の分子数はこれらの多様な機能に比べて著しく少なく、例えば出芽酵母では 1 遺伝子あたり 1 個以下と見積もられている。

これらの知見は、転写サイクル進行の過程で、リモデリング複合体が、構成因子の解離・再形成を伴ってクロマチンへの結合・解離を繰り返す「リサイクル」を行っていることを示唆している（図 1）。このリサイクルは転写サイクル進行の制御にも深く関与することが予想されるが、そのダイナミクスや機能はほとんど明らかにされていない。我々は、酵母からヒトまで進化的に保存され、多くのリモデリング複合体に含まれる核内アクチンファミリー分子が、このリサイクルに関わる可能性を予想した。アクチンファミリーのメンバーであるアクチン関連タンパク質(Arp)遺伝子破壊細胞、変異を導入した核内アクチンファミリーを発現する細胞の 1 分子イメージング解析、アクチンファミリーに結合する二重環状ペプチド(bicyclic peptide)などを用いることで、リモデリング複合体のリサイクルの分子機構と、転写サイクル過程における機能を明らかにすることを目指した。

【研究成果】

酵母からヒトまで進化的に保存された INO80 クロマチンリモデリング複合体には、酵素サブユニット Ino80 に加えて、4 種のアクチンファミリー分子、actin, Arp4, Arp5, Arp8 が含まれている。このうち Arp8 は、ヒストン結合能および二本鎖および一本鎖 DNA 結合能を有していることを明らかにした。Arp8 遺伝子をノックアウトした(Arp8-KO)ヒト Nalm-6 細胞では、Ino80 のクロマチン結合量の低下が観察されたことから、Arp8 は INO80 複合体のクロマチン結合を機能していることが示された。一方 Arp5 につ

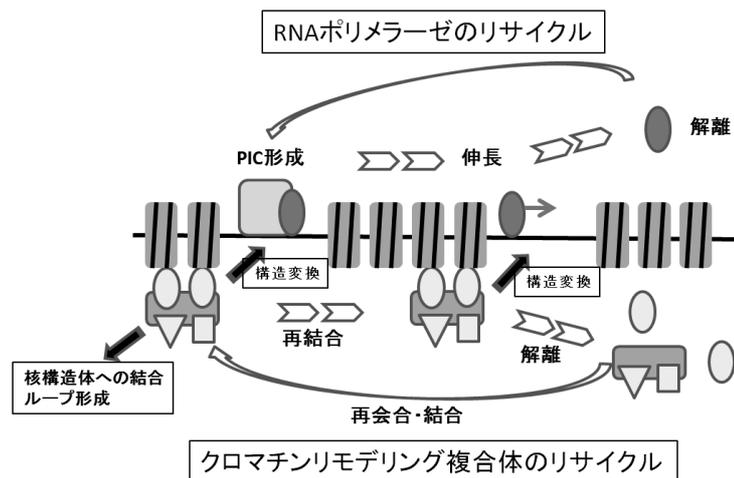


図1、転写サイクルにおけるクロマチンリモデリング複合体のリサイクル

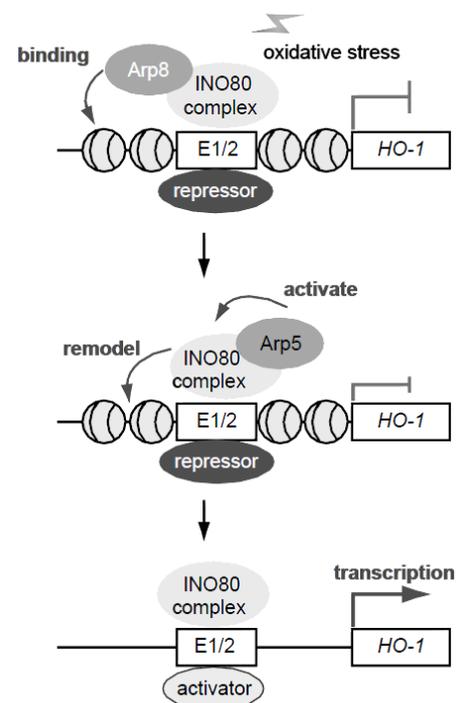


図2、INO80 複合体のダイナミクスにおけるアクチンファミリーの機能

いては、ヒストン、DNA の結合活性は検出されておらず、Arp5-KO 細胞においても Ino80 のクロマチン結合に変化は観察されなかった。しかし、Arp8-KO 細胞、Arp5-KO 細胞共に、酸化ストレスで誘導される heme oxygenase 1 遺伝子 (HO-1) 発現の顕著な低下が観察された。これらの結果から、Arp8 と Arp5 が異なる機構で INO80 複合体のダイナミクス・リサイクルに寄与することで、HO-1 発現を制御していることが示された (図 2)。このモデルは、Arp5, Arp8 の 1 分子イメージングの結果によっても支持された。さらに、Arp5 および Arp8 に結合する低分子ペプチド bicyclic peptides のスクリーニングと解析を行なった。スクリーニングによって得られた Arp5 および Arp8 に高親和結合する bicyclic peptide を細胞に導入したところ、Arp5-KO および Arp8-KO 細胞と同様に、HO-1 発現の低下が観察され、INO80 複合体機能の人為的操作における bicyclic peptide の有用性が示唆された。

【本研究課題に関する主要論文】

- Multivalent binding of PWWP2A to H2A.Z regulates mitosis and neural crest differentiation. Pünzeler S, Wommelsdorf S, Spitzer RMM, Leidescher S, Markaki Y, Mentele E, Regnard C, Schneider K, Takahashi D, Vardabasso C, Zink LM, Straub T, Bernstein E, Harata M, Leonhardt H, Mann M, Rupp R, Hake SB, *EMBO J*, in press.
- Actin family proteins in the human INO80 chromatin remodeling complex exhibit functional roles in the induction of heme oxygenase-1 with hemin. Takahashi Y, Murakami H, Akiyama Y, Katoh Y, Oma Y, Nishijima H, Shibahara KI, Igarashi K, Harata M, *Front Genet* 8, 17 (2017).
- Genetic complementation analysis showed distinct contributions of the N-terminal tail of H2A.Z to epigenetic regulations. Kusakabe M, Oku H, Matsuda R, Hori T, Muto A, Igarashi K, Fukagawa T, Harata M, *Genes Cells* 21, 122-35 (2016).
- DNA binding properties of the actin-related protein Arp8 and its role in DNA repair. Osakabe A, Takahashi Y, Murakami H, Otawa K, Tachiwana H, Oma Y, Nishijima H, Shibahara K, Kurumizaka H, Harata M, *PLoS One* 9, e108354 (2014).
- SWR1 and INO80 chromatin remodelers contribute to DNA double-strand break perinuclear anchorage site choice. Horigome C, Oma Y, Konishi T, Schmid R, Marcomini I, Hauer MH, Dion V, Harata M, Gasser SM, *Mol Cell* 55, 626-39 (2014).

坂東 優篤 公募研究代表者 (H27~H28 年度)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究課題名：コヒーシンによる転写制御の分子機構の解明

【研究目的】

高等真核生物のコヒーシン複合体は、姉妹染色体分体間の接着の基本機能以外に、転写調節で働くことが知られている。ChIP-seq 解析などから、コヒーシンは CTCF (ゲノム立体構造因子) 領域に加えて、コヒーシンローダー (コヒーシンの染色体結合を助ける Nipbl-Mau2 複合体) と共にエンハンサーやプロモーター領域に局在することが明らかにされた。このようなゲノム学的解析による知見と、コヒーシンの特徴的な構造(リング状)から、ゲノム上の異なる領域をコヒーシンが束ねることで立体的に近接させる DNA ループモデルが提唱されている。このモデルが転写調節に一役を担うと考えられているが、その真偽も含め、コヒーシンやコヒーシンローダーがどのように転写調節を行うか、その詳細は明らかでない。本研究は、*in vitro* の転写反応系を用いた生化学的手法と細胞内で起こる転写反応時の分子動態をゲノムワイドに解析する手法を用いて、その機構の分子実体の解明を目指す。

【研究成果】

末端にビオチン付加した DNA (5xGAL4 結合ドメインとプロモーターを含む) に、アクチベータ GAL4-VP16 及び細胞核抽出液 NE を加え、DNA 上に転写開始複合体 (Pre-Initiation Complex; PIC) を形成させた。続いて NTPs を添加することで、転写伸長に移行した複合体 (early elongation complex; EEC) を形成した (図 1)。それぞれの複合体について、質量分析装置 (MS) による網羅的なタンパク同定とウェスタンブロット (WB) 解析を行った。MS 解析から、アクチベータに依存し、Mediator を構成する因子が高スコアで、加えて、RNAPII や一部の転写制御因子が同定された。また、アクチベーターの有無にかかわらず、DNA ダメージ応答タンパクが高スコアで同定された。次に、WB により経時的な解析を行うと、数分以内に Mediator が、続いて基本転写因子、RNAPII、最終的に AFF4 からなる SEC、Nipbl/Mau2 の結合が見られた (図 2)。その後、NTPs を添加すると、RNAPII の CTD の S2 と S5 のリン酸化が誘導された。驚いた事に、S2 のリン酸化は、CDK9 を阻害しても抑制できなかった。しかし、同時に DNAPK 阻害剤を添加すると、S2 のリン酸化は完全に阻害された。このことから、DNA 上に夾雑する DNAPK が ATP により活性化し、RNAPII をリン酸化することが分かった。このアッセイ系では、直鎖状の DNA を使用しているため、DNA 末端から DNA ダメージ応答の反応が引き起こされると考えられた。従って、この反応を抑制するため、DNAPK 阻害剤存在下で常に実験を行う事とした。その他、NTPs 添加によって、PIC を形成する様々な因子がリン酸化され、同時に CDK9 を阻害すると、NELF 複合体が PIC に会合すること、さらには、CDK7 や CDK8 を阻害した解析から、RNAPII の S5 のリン酸化が、両因子により起こる事が分かった。このような様々な状況下においても、PIC に会合する Nipbl-Mau2 の量の変化は見られず、PIC に会合したコヒーシンローダーは転写伸長への移行に伴った状況下でも影響されないことが分かった。続いて、コヒーシンローダーの PIC 形成に対する影響を検討するため、Nipbl、Mau2 を除去した NE を用いて解析を行った。その結果、PIC 形成に対する影響は見いだせなかった。一方で、NTPs の添加による RNAPII の S2、S5 のリン酸化は、コントロールに比べ、増加することが明らかとなった。

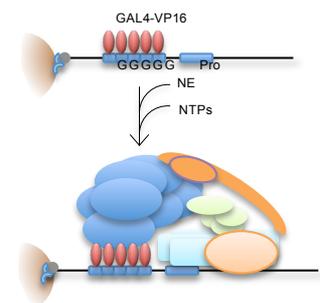


図 1

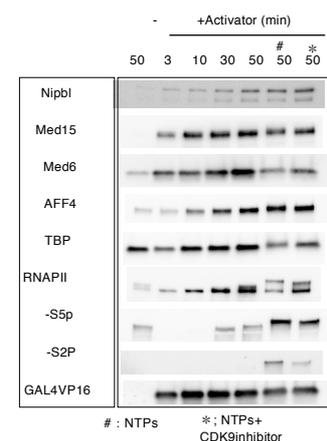


図 2

コヒーシンやコヒーシンローダーのゲノム動態を明らかにするため、RPE 細胞を用いた CDK9 阻害剤処理、血清刺激下によるコヒーシンやコヒーシンローダーの ChIP-seq 解析を行った。その結果、転写変動によるコヒーシンやコヒーシンローダーの局在は弱いものの、その量及びプロファイルに変化が認められた。加えて CDK9 阻害下では、エンハンサーやプロモーターに局在した Nipbl の蓄積が見られた。次に、ChIP-qPCR や RT-PCR で血清刺激により活性化される初期応答遺伝子の発現及び RNAPII、その S2 リン酸化を定量的に検討した。その結果、Nipbl ノックダウンによって、コントロールに対し、発現量の増加、遺伝子領域への RNAPII の結合量の増加が認められた。

転写開始から伸長段階で起こる Mediator (CDK8)、基本転写因子 (CDK7)、転写伸長因子 (CDK9) の協調や連携が、RNAPII の階層的な活性化に重要で、この厳密な制御にコヒーシンローダーが直接的に関与する可能性を示唆する結果を細胞レベルと *in vitro* の解析から得ることが出来た。

【本研究課題に関する主要論文】

- Esco1 Acetylates Cohesin via a Mechanism Different from That of Esco2. Minamino M, Ishibashi M, Nakato R, Akiyama K, Tanaka H, Kato Y, Negishi L, Hirota T, Sutani T, Bando M, Shirahige K, *Curr Biol* 25, 1694-706 (2015).
- Germline gain-of-function mutations in AFF4 cause a developmental syndrome functionally linking the super elongation complex and cohesin. Izumi K, Nakato R, Zhang Z, Edmondson AC, Noon S, Dulik MC, Rajagopalan R, Venditti CP, Gripp K, Samanich J, Zackai EH, Deardorff MA, Clark D, Allen JL, Dorsett D, Misulovin Z, Komata M, Bando M, Kaur M, Katou Y, Shirahige K, Krantz ID, *Nat Genet* 47, 338-44 (2015).

平田 章 公募研究代表者 (H25～28 年度)

愛媛大学・大学院理工学研究科・講師

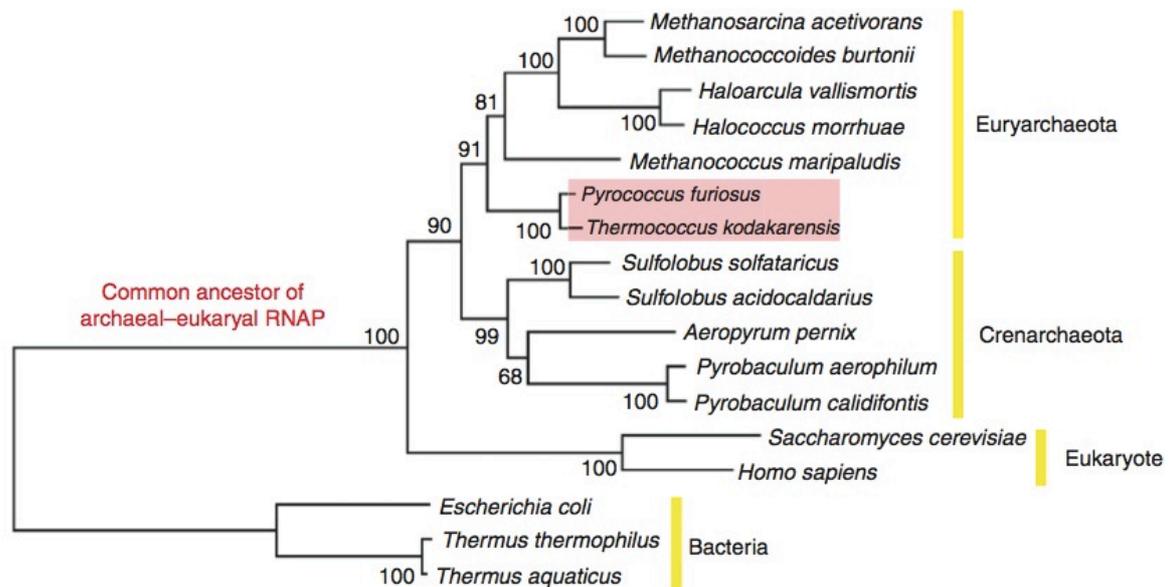
研究課題名：アーキア（古細菌）RNA ポリメラーゼにおける転写開始機構および転写調節機構の解明 (H25～26 年度)、アーキアの転写装置を利用した多段階転写反応の動的メカニズムの解明 (H27～28 年度)

【研究目的】

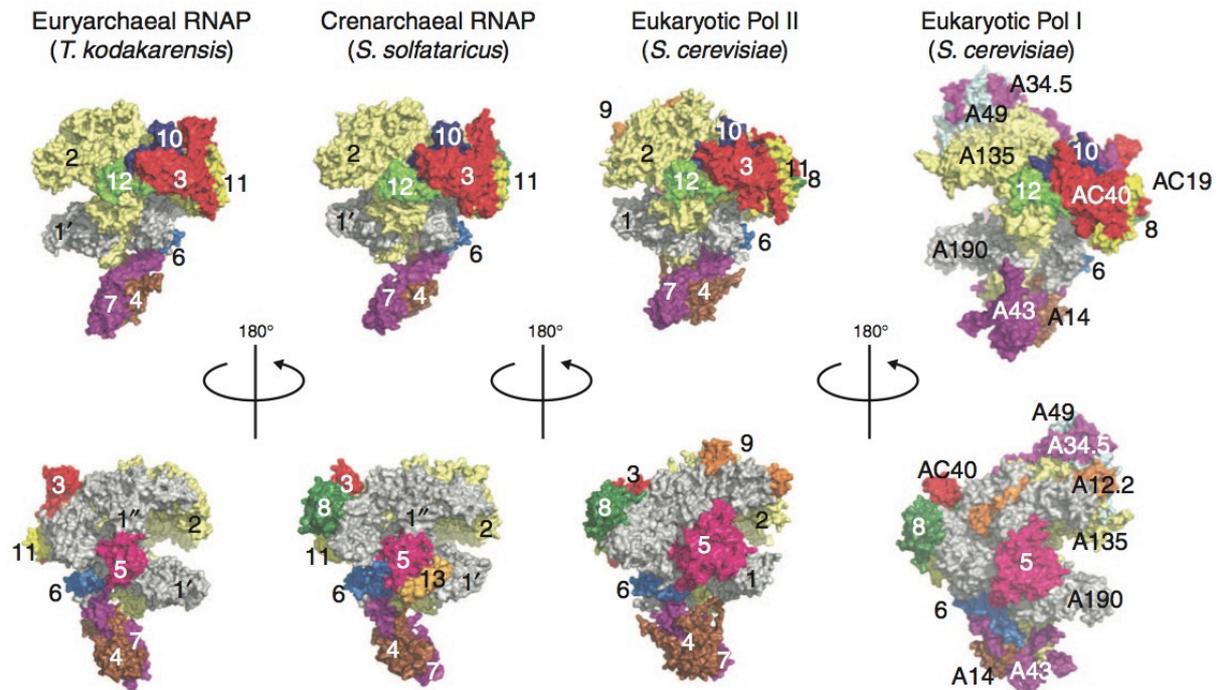
アーキア RNA ポリメラーゼ(RNAP)の構成因子は真核生物 RNA ポリメラーゼ II (Pol II) と比べて、転写反応に最低限必要である因子のみを含むシンプルな構成をしている。すなわち、アーキア RNAP は、Pol II の転写反応に最低限必要な基本原理を共有している。また、アーキアの場合、転写の開始前、開始、伸長、終結といった複雑な多段階反応が、真核生物と比較して、構造的にシンプルな少数の転写因子群によって制御されている。そこで本研究では、アーキア RNAP とその転写システムを用いて、転写開始・転写調節のメカニズムを解析し、アーキア RNAP と Pol II に共通する転写反応の作動原理を解明することにした。

【研究成果】

本研究両課題を遂行する上で必要不可欠な超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* (Tko) RNAP の X 線結晶構造の分子情報を得ることに成功した (Jun *et al.* 2014)。Tko RNAP は、今まで決定されたアーキア/真核生物 RNAP ファミリーの中で 11 個という最小のサブユニット数で構成されていることが判った。そのため、Tko RNAP はアーキア/真核生物 RNAP ファミリーの共通祖先



に極めて近く、Tko RNAP と Pol II の X 線結晶構造を比較した結果、Pol II は Tko RNAP に存在しない「特異的挿入配列」を数多く導入することで、様々な転写因子群と結合できるようになり、高次生命現象（細胞の分化・発生など）を制御するようになったと推察される。Tko RNAP の「カニの爪」の部分である「クランプ」部分は「ストーク」が存在しているにもかかわらず、Pol II とは異なる開いた状態の構造であることが判った。今まで、Pol II において、「ストーク」部分がない場合には「クランプ」が開く、「ストーク」部分がある場合は閉じるなど、「ストーク」の有無で「クランプ」の開閉が制御されていることが常識だった。しかし、本研究結果と以前に報告した研究結果を組み合わせることで、「ストーク」の構造変化に伴い「クランプ」が開閉する新しい分子機構を突きとめることができた。したがって、アーキア/真核生物 RNAP ファミリーは、「ストーク」と「クランプ」が連動して転写反応を行っていることが明らかになった。さらに転写促進因子 TFE が「ストーク」と「クランプ」の間に結合することによって、「クランプ」が開き、その結果、アーキア RNA



ポリメラーゼの転写反応が促進されることを見出した。本研究成果は愛媛大学学報記事の研究トピックスに選ばれプレスリリースを行い愛媛新聞記事にも掲載された。

【本研究課題に関する主要論文】

- A structural sketch of RcdA, a transcription factor controlling the master regulator of biofilm formation. Sugino A, Usui T, Shimada T, Nakano M, Ogasawara H, Ishihama A, Hirata A, *FEBS Lett*, in press.
- The X-ray crystal structure of the euryarchaeal RNA polymerase in an open-clamp configuration. Jun SH, Hirata A, Kanai T, Santangelo TJ, Imanaka T, Murakami KS, *Nat Commun* 5, 5132 (2014).

藤井 穂高 公募研究代表者 (H25～28 年度)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究課題名：挿入的クロマチン免疫沈降法 (iChIP) による細胞分化制御因子の転写機構の解明 (H25～26 年度)、遺伝子座得意的クロマチン免疫沈降法による細胞分化制御因子の転写機構の解明 (H27～28 年度)

【研究目的】

転写制御の分子機構の解明には、転写制御を受けているゲノム領域の生化学的・分子生物学的解析が欠かせない。そのためには当該ゲノム領域の生化学的単離が必要である。申請者らは、これを実現するため、生体内のクロマチン構造を保持したまま特定のゲノム領域を単離する新規な方法として、insertional chromatin immunoprecipitation (iChIP) (Hoshino *et al.* 2009; Fujita *et al.* 2011; 国内・米国特許取得済 2013) と engineered DNA-binding molecule-mediated ChIP (enChIP) (Fujita *et al.* 2013; Fujita *et al.* 2013; Fujita *et al.* 2014; 国内特許取得済 2016, 欧米各国移行中) からなる遺伝子座特異的 ChIP 法を世界に先駆けて開発した。本研究提案では、遺伝子座特異的 ChIP 法を用いて、転写制御を受けている特定ゲノム領域を単離して分子生物学・生化学的解析を行う際の方法論を確立するとともに、これを用いて転写制御機構の解明を目指す。

【研究成果】

1. 技術開発

1-1. enChIP 法の開発を行った。enChIP 法は、iChIP 法と異なり、外来性 DNA 結合分子の認識配列を解析対象ゲノム領域に挿入する必要がないため、解析がより容易になり、広範な応用が期待できる。

1-2. 組換え CRISPR リボヌクレオ蛋白質複合体を利用した *in vitro* enChIP 法を開発した。*in vitro* enChIP 法では、野生型の細胞クロマチンを直接使用できるため、CRISPR 複合体を発現させることが困難な臨床検体や動物個体由来の細胞の解析が可能になった。

2. 遺伝子座特異的 ChIP 法の応用

2-1. Pax5 遺伝子転写調節機構の解明

ニワトリの成熟 B 細胞株である DT40 を用いて、Pax5 遺伝子プロモーター領域結合蛋白質を、iChIP-SILAC 解析により同定した。そして、そのうちの一つである Thy28 蛋白質が MYH9 蛋白質との相互作用を介して、Pax5 遺伝子発現調節に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

また、B 細胞特異的に Pax5 遺伝子プロモーター領域と相互作用

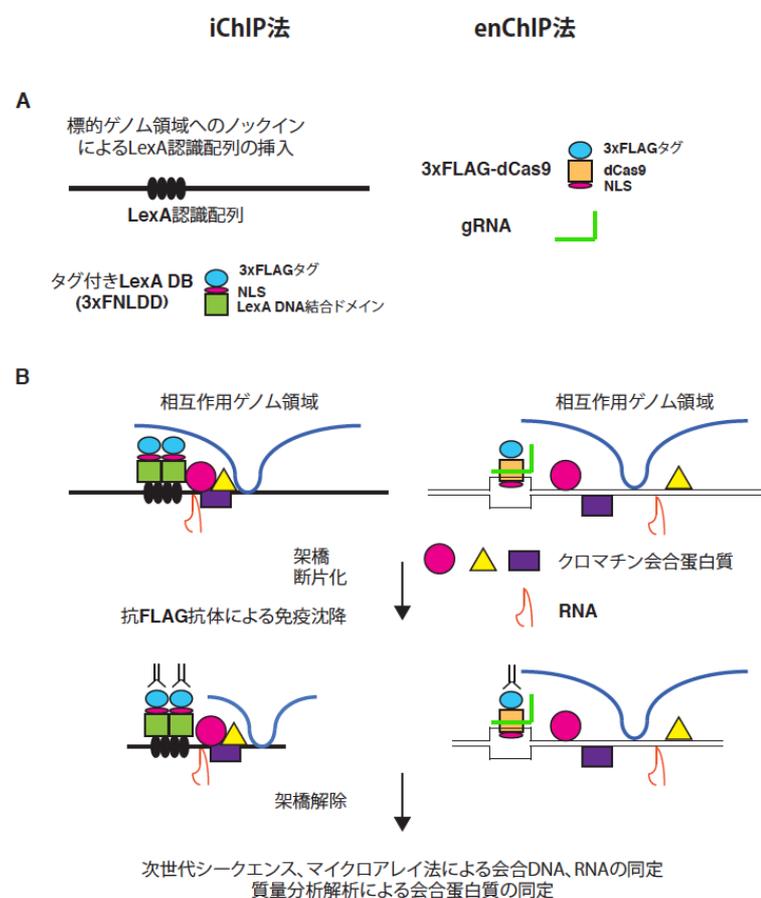


図 1. iChIP 法と enChIP 法のスキーム

しているゲノム領域を、iChIP-Seq 法と *in vitro* enChIP-Seq 法を用いて同定した。その領域を、CRISPR 系を用いて欠失させたところ、Pax5 遺伝子の発現が減少した。また、その領域では、エンハンサー特異的なヒストン修飾が存在していた。この結果から、この領域が Pax5 遺伝子の発現を調節している可能性が示唆された。この成果は、遺伝子座特異的 ChIP 法と次世代シーケンス法 (NGS) を組み合わせることによって、エンハンサー等の遺伝子発現制御領域を同定できることを示した画期的なものである。

2-2. Foxp3 遺伝子転写調節機構の解明

iChIP-Seq 法を用いて、マウス個体から単離した T 細胞で、T-reg 特異的に Foxp3 遺伝子 TSS 近傍に結合するゲノム領域を同定した。それらの領域はエンハンサー等 Foxp3 遺伝子の転写制御領域である可能性がある。現在、*in vitro* enChIP-Seq 法を用いて、iChIP-Seq 解析の結果を確認している。

2-3. 3xFLAG-dCas9 Tg マウスを用いた enChIP 法による転写機構の解析

CAG プロモーターを用いて、全身の細胞で 3xFLAG-dCas9 Tg がゲノム中に挿入されている Tg マウスを作製し、ライン化した。この Tg マウスは、個体由来細胞を用いた enChIP 法の実施に欠かせない重要な研究試料である。

【本研究課題に関する主要論文】

- Locus-specific ChIP combined with NGS analysis reveals genomic regulatory regions that physically interact with the *Pax5* promoter in a chicken B cell line. Fujita T, Kitaura F, Yuno M, Suzuki Y, Sugano S, Fujii H, ***DNA Res***, in press.
- Efficient sequence-specific isolation of DNA fragments and chromatin by *in vitro* enChIP technology using recombinant CRISPR ribonucleoproteins. Fujita T, Yuno M, Fujii H, ***Genes Cells*** 21, 370-77 (2016).
- A critical role of the Thy28-MYH9 axis in B cell-specific expression of the *Pax5* gene revealed by iChIP-SILAC. Fujita T, Kitaura F, Fujii H, ***PLoS One*** 10, e0116579 (2015).
- Identification of proteins associated with an IFN γ -responsive promoter by a retroviral expression system for enChIP using CRISPR. Fujita T, Fujii H, ***PLoS One*** 9, e103084 (2014).
- Efficient isolation of specific genomic regions and identification of associated proteins by engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP) using CRISPR. Fujita T, Fujii H, ***Biochem Biophys Res Commun*** 439, 132-36 (2013).

別所 康全 公募研究代表者 (H27～28 年度)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

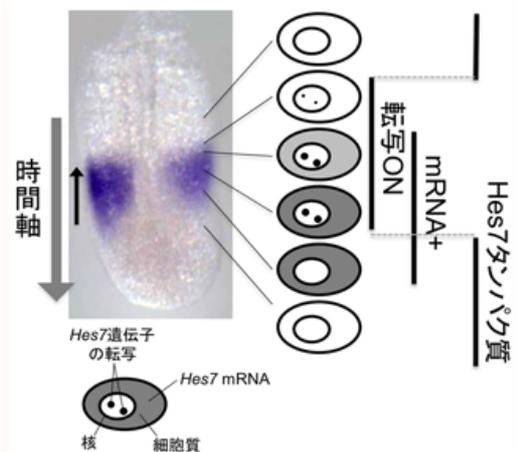
研究課題名：せきつい動物パターン形成における転写制御の同調性維持機構

【研究目的】

多細胞生物の発生過程において、胚はさまざまな外部環境からの攪乱や内部ノイズにさらされているにも関わらず、均整の取れた形態形成が営まれる。個々の細胞の転写制御により細胞のふるまいが規定され、細胞が相互に作用して形態形成がおこることから、それぞれのアレルにおける転写が階層を超えて細胞相互作用を制御し、またその情報が転写活性をフィードバック制御して環境からの攪乱や内部ノイズに対してロバストな形態形成がおこなわれていると考えられる。本研究は発生過程の遺伝子発現振動をモデルとして、転写活性のばらつきを細胞、細胞間、組織のそれぞれのレベルで評価し、転写の同調性のメカニズムを探ることを目的とする。

せきつい動物の体節は、せきつい骨などのプレパターンとして、周期的な分節化により整列する均等な大きさの細胞塊として形成される。体節の原基である未分節中胚葉では、一群の遺伝子の転写が周期的に振動している。すなわち転写因子 Hes7 をはじめとする遺伝子群の転写が ON と OFF を繰り返し、その周期性によって周期的な分節化が制御され、均等な大きさの体節が順々に形成される。また、それぞれの細胞内でおこる遺伝子の転写活性の振動が、細胞間で同調することによって、組織レベルでの振動が生じて、それが形態形成に結びつく。つまり、体節形成ではひとつひとつの細胞で、転写サイクルが繰り返され、それらが同調することにより組織レベルで形態形成が制御されるので、転写が形態形成を制御するよいモデル系である (右図)。

本研究では特に、転写サイクルが細胞間で同調するメカニズムに着目して研究をすすめた。

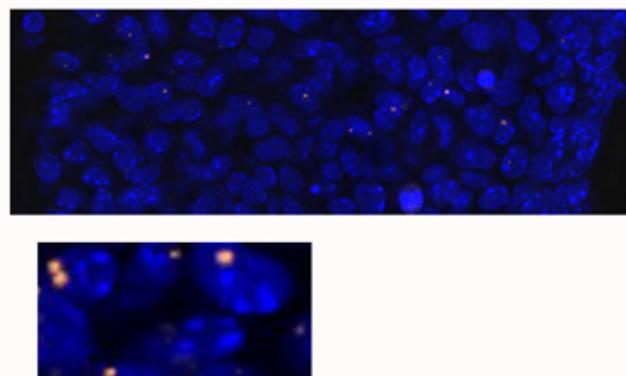


【研究成果】

未分節中胚葉では Notch シグナル活性が高まっており、それに依存して Notch シグナル経路のいくつかの遺伝子の転写活性が振動している。Notch シグナルによって転写が誘導される Notch-regulated ankyrin repeat protein (Nrarp)は、Notch シグナルの活性を抑制するので、フィードバックインヒビターとして Notch シグナル活性を調節していると考えられている。これまでに Nrarp のノックアウトマウスを作製し、形態に軽微な異常があることを見いだしていたので、それが遺伝子の転写の振動の同調性の低下によるものであるという作業仮説を立てて研究をすすめた。

(1) Nrarp KO マウスの形態異常の原因の解析

未分節中胚葉での振動遺伝子の転写活性化のパターン、形成された体節の前後極性、体節から形成される体軸骨格の形態、これらを定量的に計測した。Nrarp KO マウスではこれらすべてが野生型に比べて軽微に乱れていることを明らかにした。転写活性の評価は、遺伝子のイントロンにプローブを設定して、転写直後の転写産物を検出することで評価した(右図)。遺伝子発現振動が体節のパターンを決め、それが骨格の形態を決めるので、未



分節中胚葉での振動遺伝子の発現パターンが最上流である。胚は定常的に微細な環境変化の影響を受けており、それによって細胞間の振動の同調が崩れるが、再同調させるメカニズムによって同調性が保たれていると考えられる。そのことから、Nrarp KO マウスの軽微な異常は、Nrarp の欠失により振動遺伝子の発現が細胞間で同調する能力が低下するためであると推論した。

(2) バルプロ酸投与による胚の外部環境の攪乱

妊娠中の母マウス (E9.5) にバルプロ酸を腹腔内投与することにより、体節形成期の胚をバルプロ酸に暴露した。Nrarp KO 新生マウス、野生型新生マウスともにせきつい骨、肋骨に異常があったが、異常のある範囲は KO 新生マウスの方が広がった。また、バルプロ酸投与から 24 時間後に体節を観察すると、野生型胚では 2-3 体節が、Nrarp KO 胚では 4-7 体節が不整な形態に形成された。これらから、Nrarp KO マウスは環境攪乱に感受性が強く、ロバスト性が失われていることが明らかになった。

バルプロ酸投与から 3 時間では野生型胚、KO 胚ともに、遺伝子発現振動の同調性が大きく崩れていた。8 時間後には野生型胚は再び同調性を取り戻していたが KO 胚は同調性が乱れたままであった。このことから Nrarp KO マウス胚は遺伝子発現振動を同調させるメカニズムが減弱していることが示唆された。

(3) 数理モデルの構築

これまでに Hes7 のフィードバックループに基づいた数理モデルを構築することに成功しているが、そこに Nrarp などのフィードバック制御因子を加えた数理モデルを構築した。Notch シグナル活性強度の微調整により、遺伝子発現振動の細胞間での同調が強められていることを示唆する結果が得られた。このことから Notch シグナル活性強度の微調整が遺伝子発現振動の細胞間の同調のメカニズムの一つであり、形態形成のロバスト性に寄与していることが示唆された。

【本研究課題に関する主要論文】

- Analyzing ERK Signal Dynamics During Zebrafish Somitogenesis. Matsui T, Bessho Y, *Methods Mol Biol* 1487, 367-78 (2016).
- Cell collectivity regulation within migrating cell cluster during Kupffer's vesicle formation in zebrafish. Matsui T, Ishikawa H, Bessho Y, *Front Cell Dev Biol* 3, 27 (2015).

前川 利男 公募研究代表者 (H25～26 年度)

理化学研究所・石井分子遺伝学研究室・研究員

研究課題名：次世代のマウスの遺伝子発現に影響を与える転写因子 ATF7 の役割

【研究目的】

マウス個体を用いて、環境ストレス刺激がストレス応答性の転写因子 ATF7 を介して、次世代の遺伝子発現等、長期に影響するメカニズムをエピジェネティックな制御を中心に探る。

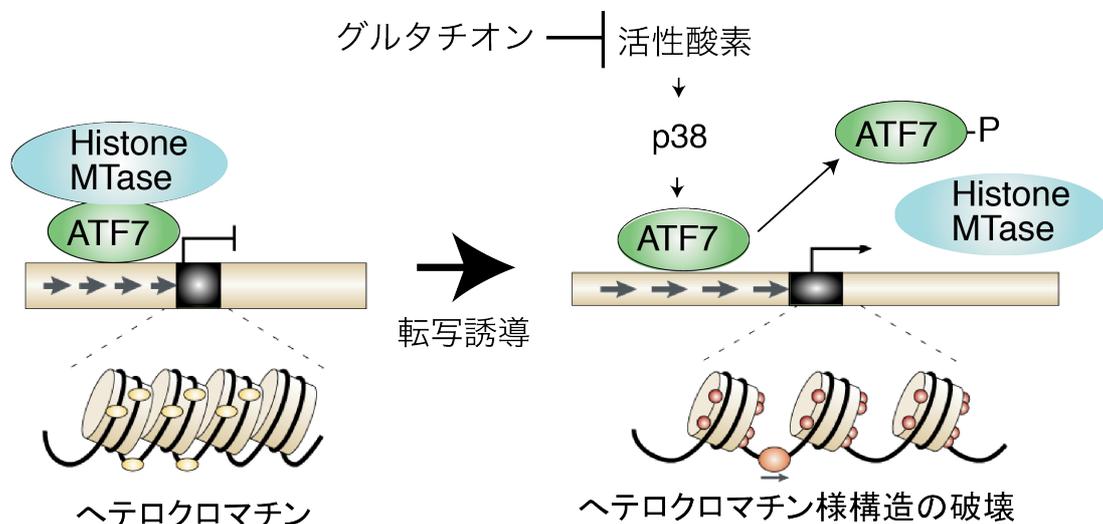
マウスの雄を離乳直後から1～2ヶ月間低蛋白質の餌で飼育して栄養ストレスを与えると、通常の餌の場合と比較して、その子供の世代の肝臓でのコレステロール生合成系の遺伝子発現が上昇することが報告された (Carone *et al.* 2010)。そこで、ATF7 ヘテロノックアウトマウスの雄で同様の実験を行った結果、このコレステロール生合成系の遺伝子の発現上昇が見られず、雄親の餌の違いを区別して子供の肝臓での遺伝子発現に影響を与える機構に ATF7 が関与していることが明らかになった。そこで、親の摂食した餌の情報がどのような経路で精子に書き込まれて子供に伝達されるのか、また、ATF7 ヘテロノックアウトマウスではどのような理由で、その伝達が遮断されるのか、その分子メカニズムをエピジェネティックな修飾を標的にして解析する。

【研究成果】

マウス個体を用いて、様々な環境ストレス刺激が転写因子 ATF7 を介して、次世代の遺伝子発現等、長期に生理的に影響するメカニズムを探っている。最近、3つの系でこの長期に渡って影響する現象を発見し、分子メカニズムを解析した。

1) マウスの雄親を低蛋白質の餌で飼育すると、その子供の肝臓でコレステロール生合成系の遺伝子群の発現の亢進が認められるが、ATF7 のヘテロ変異体の雄を用いた場合、この現象が全く認められないことから、これは完全に ATF7 に依存した現象であることが分かった。

低蛋白質の餌で飼育した雄親の精巣を調べると、活性酸素から細胞を保護するグルタチオンの濃度が有意に低下していた。酸化ストレスを検出する抗体を用いて精巣を免疫組織化学的に解析すると野生型低蛋白質群はもちろん、ATF7 ヘテロ変異体でも酸化のダメージが検出された。また、精巣での ATF7 の ChIP-Seq の解析結果から、ATF7 はミトコンドリアにおける TCA サイクルと ATP 産生に関与する遺伝子の発現調節を制御していることが分かった。以上の結果、低蛋白質によるグルタチオンの濃度の低下によって活性酸素が増加して p38 が活性化されたことが分かった。この経路の活性化によって、コレステロール生合成系の遺伝子に結合して転写を抑制していた ATF7 がリン酸化されてプロモーターから外れ、H3K9 のメチル化の程度が減少してヘテロクロマチンによる抑制が解除されて発現が亢進するメカニズムが明らかになった。



2) 次に、自然免疫系での ATF7 の役割を解析した。マウスの自然免疫系を担うマクロファージでは、ATF7 はヒストン H3K9 のジメチル化酵素 G9a をリクルートして Cxcl2 や Stat1 の転写を抑制している。マウスを予め細菌の細胞壁の成分 LPS で刺激すると p38 の系が活性化されて ATF7 がリン酸化され、H3K9 のジメチル化が減少して転写が活性化される。一時的な活性化は直ぐに抑制されるが、数週間後でもこの H3K9 の低ジメチル化は維持されており、基礎レベルの発現が高くなっていることを見つけた。この基礎発現レベルの上昇によって細菌感染が抑制され、自然免疫に有効に働く生物学的な意味を見出した。この現象は見方によっては自然免疫系の記憶に相当すると考えている。

3) 三つ目に、ストレス刺激がテロメアの長さの短縮を引き起こし、この短縮が次世代にも影響を与えることを見つけた。最近、ATF7 は Ku70/Ku80 と複合体を形成して、染色体末端のテロメアに結合し、テロメラーゼをリクルートしてテロメアの長さを調節していることが分かった。ストレス刺激によってテロメアの長さが短く成る系をマウス個体と培養細胞系で確立し、その分子メカニズムを明らかにした。そこで、雄親にストレスを与えると、精子を介して、次世代のテロメアの長さに影響するかどうかを検討した。その結果、雄親に連続してストレスを与えると、子供の血球細胞のテロメアの長さが有意に短く成る事が確認できた。分子メカニズムを解析した結果、ストレスで TERRA RNA の発現が亢進して、テロメラーゼの活性が阻害され、テロメアの長さの短縮が引き起こされることが明らかになった。

【本研究課題に関する主要論文】

- The transcription factor ATF7 mediates lipopolysaccharide-induced epigenetic changes in macrophages involved in innate immunological memory. Yoshida K, Maekawa T, Zhu Y, Renard-Guillet C, Chatton B, Inoue K, Uchiyama T, Ishibashi K, Yamada T, Ohno N, Shirahige K, Okada-Hatakeyama M, Ishii S, *Nat Immunol* 16, 1034 (2015).

南 敬 公募研究代表者 (H27~28 年度)
熊本大学・生命資源研究支援センター・教授

研究課題名：内皮即時的応答遺伝子の包括的な転写サイクル制御機構のシステム解析

【研究目的】

血管内皮増殖因子 (VEGF) は血管内皮の増殖、血管新生に寄与するのみならず、未分化幹細胞からの内皮分化・維持を誘導するものとして知られる。我々は、この VEGF 刺激における細胞の分化スイッチや活性化スイッチをゲノムワイドに解明することを目的として全ゲノムトランスクリプトームやヒストン抗体を用いた ChIP-seq を行い、シグナル伝達応答の重要な基点となる転写サイクルシステム解明を試みた。本システム解析は先進国の主要死因のきっかけとなり得る血管内皮細胞の分化、増殖、炎症の仕組みやその病的機構の解明に役立つことが期待される。

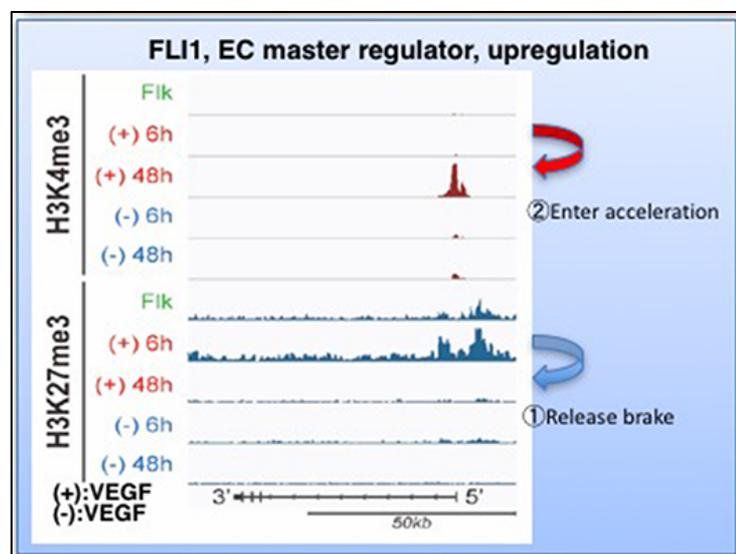
【研究成果】

1. 内皮分化におけるエピゲノムスイッチの同定

ES 細胞を分化培地に変え、4 日後 Flk-1 陽性の中胚葉細胞を分取し、VEGF 刺激を加えることで生じる内皮細胞と VEGF 非存在下での平滑筋様の細胞に分化するシステムを確立させた。次に VEGF 刺激、未刺激条件下、0, 6, 12, 24, 48 時間のトランスクリプトームを解析したところ、中胚葉未分化マーカーである T, Foxc2 は消失し、VEGF 刺激 6 時間において内皮分化のパイオニア因子である Etv2 が発現し、その直後に内皮のマスター制御因子として考えられる GATA2 と Sox7 が発現すること、Etv2 の発現はその後大きく減少するが、代わりに内皮マスター制御因子群である Fli1, Sox17/18 が 24 時間後から発現し始め、VEGF 刺激 48 時間には内皮規定因子 Erg を始め、内皮特異的マーカー遺伝子の発現が例外なく誘導されることを見出した。一方 VEGF 非存在下ではこのような内皮分化を規定するマスター制御転写因子を始め、マーカー遺伝子発現は全く認められなかった。

次にこの発現プロファイルを転写の active mark である H3K4me3 とブレーキマークである H3K27me3 の抗体を用いた ChIP-seq を行い、統合解析を試みた。ゲノム全体で標準化しても内皮遺伝子は VEGF 刺激後 H3K4me3 ピークが上昇し、H3K27me3 の濃縮は減少するが、特に内皮マスター制御因子の発現制御領域で特徴的なエピゲノム変化が認められた。まず、Etv2, GATA2, Fli1, Sox7 では VEGF 刺激 6 時間では制御領域において転写ブレーキ H3K27me3 マークが濃縮しているが、48 時間後には消失し、代わりに転写アクセルマークである H3K4me3 マークが入って発現 ON になることがわかった。

即ち、ES 細胞からの分化制御転写因子群は転写のアクセルとブレーキマークが共存する bivalent 状態から転写が誘導されることが想定されていたが、時間分解能を上げて観察することにより、内皮分化系では bivalent ではなく、スイッチング現象により転写因子誘導が生じることが判明した。更に、分化マスター制御因子ではなく、分化後の内皮維持に関わる転写因子 Erg やマーカー遺伝子群は転写のブレーキマーク H3K27me3 は全く濃縮せず、分化に応じて H3K4me3 アクセルマークのみが制御領域に濃縮し、転写誘導される仕組みがゲノムワイドに判明した。



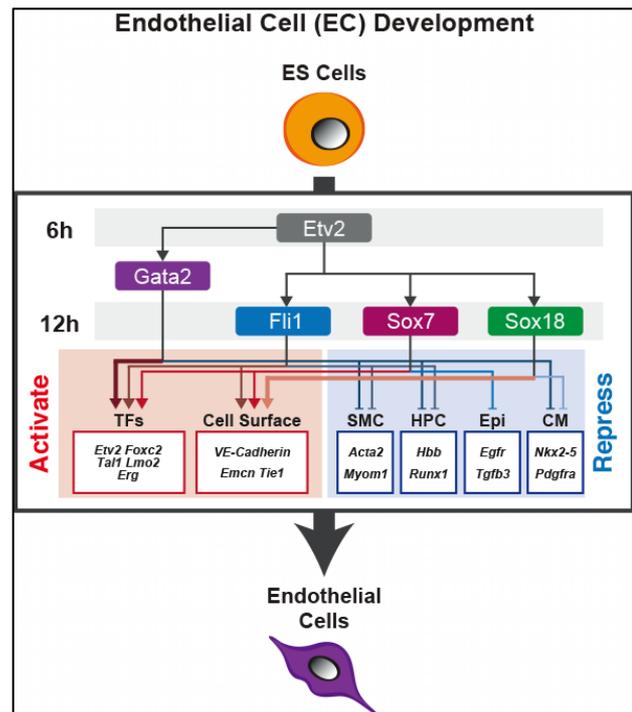
更に Etv2 は内皮分化のきっかけを作った後、消失するが、マスター制御転写因子群である GATA2, Sox7, Sox18 は内皮分化後も構成的に発現している。これらマスター制御因子の発現を siRNA にてノックダウンすると、個々の転写因子抑制により影響を受ける遺伝子はかなりユニークで、オーバーラップしているものが少ないこと、GATA2 制御は分化早期遺伝子群で Sox18 制御は分化の終期で誘導される遺伝子に参与している傾向が明らかとなった。また、全てのマスター制御因子をノックダウンすると、VEGF 存在下でも内皮分化が阻害されるだけでなく、内皮以外の分化を示すマーカー遺伝子の異所的な発現が誘導されることが明らかとなった。

2. 内皮活性化におけるエピゲノムスイッチと急性期転写サイクル制御機構同定

未分化 ES/iPS 細胞と違い、終末分化した内皮細胞では VEGF 刺激を受けることで増殖と炎症誘導を引き起こす。そこで VEGF 刺激 0, 5, 15, 30, 60 分と 4 時間のタイムコースで FAIRE-seq とトランスクリプトームを取得し、解析したところ、VEGF 刺激 5 分後から急性期誘導転写因子ゲノム領域にてクロマチン構造が変化し、NFAT の核内移行と NFAT 制御下の血管新生に必須な転写因子群 (EGR2/3, NR4A1-3, KLF4) が誘導されることが判明した。更にヒストンプロファイリングを網羅的に行い、更に ChIP-reChIP アッセイからもこれら急性期転写因子群の制御領域は H3K4me3 と H3K27me3 が共存する bivalent 状態になり、一過性のリン酸化 Pol II が走る状況を作り出していることが判明した。特に PRCII 複合体の抑制を受けつつも MLL3/4 複合体のリクルートを VEGF 刺激 15 分後に行い、H3K4me3 ピークが持続的に上昇すること、PRCII 複合体の抑制 machinery を一時的に解除する PRCI variant が VEGF 刺激 15 分後に目的領域に濃縮し、H2AK119 ユビキチン化を下げることでクロマチンを開け、一過性に Pol II の介入を許し、VEGF 刺激 60 分後では再び、PRCII-canonical PRCI のブレーキシステムを ON にすることで Pol II からの転写を終結させる新たな機構を見出している (論文作製中)。この一過性転写活性化は Pol II running の前後において H3K27Ac の濃縮を必要としない (恐らく p300 を介さないであろうと推測される) 全く新規の転写システムである。更に、この転写活性化に関与するエピゲノム修飾因子 PTIP や Pcgf variant をノックダウンすると、VEGF 応答性の血管新生が著しく抑制されることも明らかとした。

【本研究課題に関する主要論文】

- Dynamically and epigenetically coordinated GATA/ETS/SOX transcription factor expression is indispensable for endothelial cell differentiation. Kanki Y, Nakaki R, Shimamura T, Matsunaga T, Yamamizu K, Katayama S, Suehiro JI, Osawa T, Aburatani H, Kodama T, Wada Y, Yamashita JK, Minami T, *Nucleic Acids Res* 45, 4344-58 (2017).
- Oncogenic combined calcineurin-nuclear factor of activated T cells and toll-like receptor signals in colon. Muramatsu M, Minami T, *Transl Cancer Res* 5, Supple3 (2016).
- Emerging role of VEGFC in pathological angiogenesis. Nagai N, Minami T, *EBioMedicine* 11, 1588-9 (2015).
- NFAT-ANG-2 による内皮活性化とダウン症因子 DSCR-1:アクセラ/ブレーキ内皮恒常性システムと抗がん制御. 南 敬, 細胞工学 35, 27-32 (2016).



村上 洋太 公募研究代表者 (H25～26 年度)
北海道大学・大学院理学研究院・教授

研究課題名：RNAポリメラーゼ II と RNA・クロマチンのクロストーク

【研究目的】

転写はクロマチン構造制御や転写された RNA のプロセッシングに密接に関連している。たとえば、我々が研究対象とする分裂酵母 RNAi 依存性ヘテロクロマチンシステムでは、siRNA 合成とヘテロクロマチン形成が転写と共役している。さらにヘテロクロマチンでは exosome による RNA 分解系も機能しており、転写と RNA プロセッシング・クロマチン制御のクロストークを解析するよいモデルシステムである。我々は転写開始制御で重要なメディエーターがヘテロクロマチン形成で重要な機能を果たすことを見出した。一方で RNA ポリメラーゼ II の CTD の 2 番目のセリン (CTDS2) のリン酸化がヒストン H3K36 メチル化酵素 Set2 を呼び込み、転写と共役した Set2 による H3K36 トリメチル化 (K36me3) がヘテロクロマチンでの exosome による RNA 分解に必要なことを見いだしている。これらの知見を元に「転写～CTD リン酸化～ヒストン修飾～RNA プロセッシング・クロマチン修飾」の共役の実態の解明を本研究ではめざす。そのために、転写と共役した H3K36 メチル化によるヘテロクロマチン制御の実態を明らかにする。さらに H3K36 メチル化はゲノム全体でおこることから、ゲノムワイドの解析をおこない、このシステムがゲノム他領域で機能する可能性を検討しゲノム上での普遍性を明らかにする。

【研究成果】

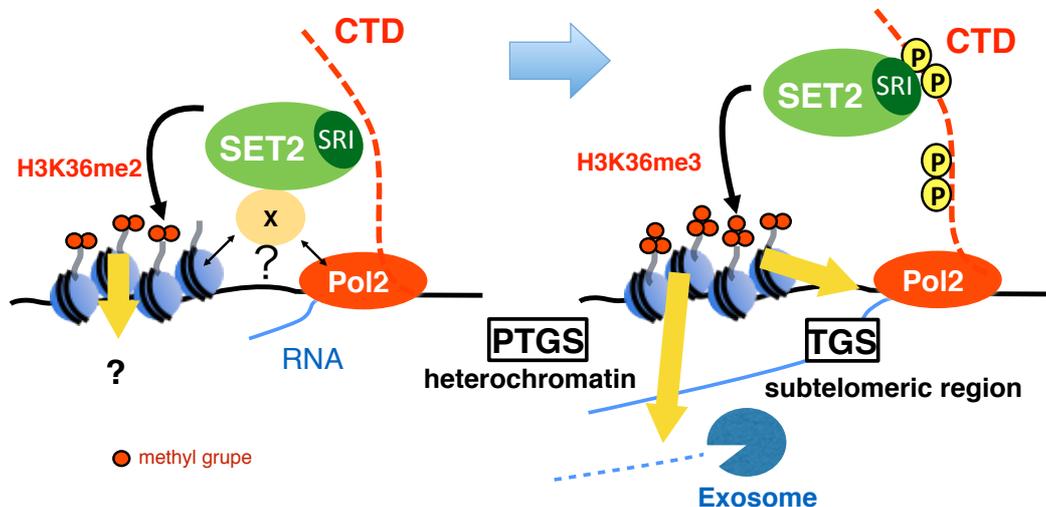
ヒストン H3 の 36 番目のリジン (H3K36) のメチル化 (H3K36me) は、転写ユニットに蓄積するヒストン修飾で、遺伝子中の cryptic な転写を抑制する事が出芽酵母で示されているが、それ以外の機能については不明である。我々は分裂酵母 H3K36 メチル化酵素をコードする遺伝子 set2 の破壊により、ヘテロクロマチンでのサイレンシングが損なわれる事を見だし、分裂酵母 Set2 の機能解析に着手した。

RNA ポリメラーゼ II (RNAPII) の最大サブユニット C 末ドメイン (CTD) は 7 アミノ酸を単位とする繰り返し配列で、真核細胞において良く保存されている。このうち 2 番目と 5 番目のセリンは転写とともにリン酸化され RNA プロセッシングなど転写と共役する様々な過程で機能する。出芽酵母 Set2 はこの 2 番目と 5 番目がリン酸化された CTD と特異的に相互作用し、転写と共役して H3K36 メチル化を行う。分裂酵母においても Set2 が CTD の 2 番目セリンのリン酸化依存的に RNAPII と相互作用することを見出した。出芽酵母との間で保存された Set2 の RNAPII との相互作用に必要な領域の欠失変異体 (set2 Δ SRI) を作成したところ、細胞に存在する、ジメチル化された H3K36 (H3K36me₂) は維持されるがトリメチル化されたもの (H3K36me₃) は消失することがわかった。この時、H3K36me₂ と H3K36me₃ のゲノムワイドな分布を ChIP-sequencing により解析すると、両者共に転写ユニットと重なる形で存在し、set2 Δ SRI では H3K36me₃ が失われるが、me₂ は野生型と同じパターンで局在する。これはジメチル化も転写と共役しておこることを示しており、Set2 が未知のモードで RNAPII と相互作用することを示唆している。

次に、野生型株、set2 破壊株、set2 Δ SRI 株のゲノムワイドな転写をマイクロアレイを用いて解析をおこなった (郵政省通信総合研究所近重裕二博士との共同研究) と、set2 破壊株、set2 Δ SRI 株で見られる発現パターンの変化がほぼ同一であることが判明した。これは前述の ChIP-sequencing の結果を考慮すると H3K36me₃ が遺伝子発現制御に重要で H3K36me₂ は機能を持たないということを示している。また、H3K36me₃ の欠損により、大きく遺伝子発現が上昇する遺伝子の多くが anti-sense RNA と減数分裂期に発現が上昇する遺伝子もしくはサブテロメアに局在する遺伝子であることがわかった。この抑制は RNAPII の局在減少をとともなうことから、転写レベルでの抑制であることがわかる。つまり、H3K36me₃ が特に anti-sense の不要な転写の抑制と、減数分裂特異的遺伝子・サブテロメア領域遺伝子の発現抑制という生理的機能をもつことを示している。

一方、set2 破壊株、set2 Δ SRI 株でヘテロクロマチンでのサイレンシングが損なわれる。解析の結果、Set2 による H3K36me3 化はヘテロクロマチンでは、転写の抑制ではなく、核内エキソソームによる RNA 分解を促進することでサイレンシングに関与する事が判明した。

以上の結果は Set2 が転写と共役した H3K36 トリメチル化を介してゲノムワイドに多面的機能を果たしていることを示している（下図）。



また、本研究で Set2 複合体を精製解析するにあたり、Set2 の多くの部分が遠心により沈殿画分に沈降し精製困難なため、遠心を用いずフィルトレーションにより精製をおこなう方法を開発した。

【本研究課題に関する主要論文】

- A novel method for purification of the endogenously expressed fission yeast Set2 complex. Suzuki S, Nagao K, Obuse C, Murakami Y, Takahata S, *Protein Expr Purif* 97, 44-9 (2014).
- Histone H3K36 trimethylation is essential for multiple silencing mechanisms in fission yeast. Suzuki, S., Kato, H., Suzuki Y, Chikashige Y, Hiraoka Y., Kimura H, Nagao K, Obuse C, Takahata S, Murakami Y, *Nucleic Acids Res* 44, 4147-62 (2016).

村谷 匡史 公募研究代表者 (H27~28 年度)
筑波大学・医学医療系・准教授

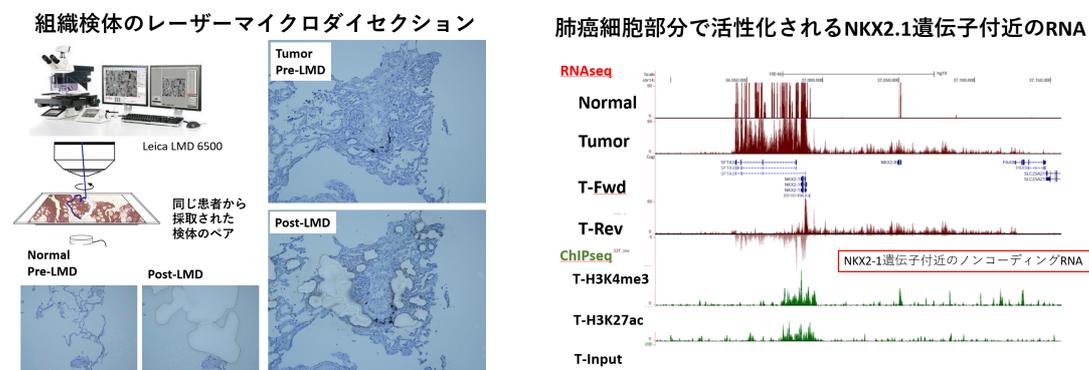
研究課題名：癌特異的クリプティックプロモーターの転写サイクルプロファイリング

【研究目的】

基本転写因子の DNA 結合から、RNA ポリメラーゼ複合体の形成、生産的な転写に至る転写サイクルの過程は、機能的な遺伝子プロモーター領域で進行するが、真核生物におけるプロモーターの特異的な選択については不明な点が多い。ヒト胃癌組織のエピゲノム解析において、我々は、これまでに解析されていなかったクリプティック遺伝子プロモーターが多数活性化されており、特に初期発生に関わる転写因子群について、新規 5' エキソンを持つ mRNA アイソフォームが異所的に発現していることを報告した。本研究では、臨床組織検体の ChIP (クロマチン免疫沈降) seq 解析をもとに転写サイクルプロファイリングを行うことで、癌に特異的なクリプティック遺伝子プロモーター領域の癌細胞での制御状態を明らかにすることを目的とした。

先行研究では、胃がんの組織においてクリプティックプロモーター活性化が起こること、また、このような異常な転写はゲノム上のポリコム複合体の結合標的で高頻度に関与し、癌特異的な遺伝子産物を本来の発現組織とは異なる胃のがん組織で発現している現象が見られた。しかしながら、この研究では癌細胞以外の細胞が混在したバルク組織の解析であったため、結果の解釈が難しかった。そこで、本研究では、レーザーマイクロダイセクションと ChIP 解析を組み合わせる手法によって、組織内の癌細胞のみを単離して解析することを目指した。これによって、他の細胞種からのシグナルが混入しない癌細胞特異的な現象をヒト組織検体で解析した。

【研究成果】



レーザーマイクロダイセクションを用いて癌細胞部分のみを切り出し、RNA 発現及びヒストン修飾を指標としてクロマチン制御を解析する手法を、肺癌検体を用いて確立した。本研究では、肺癌を材料としたが、これは隣接して共同研究を行っている診断病理学研究室の野口雅之教授の研究グループメンバーの支援を受けられることと、胃がん以外の癌でもクリプティックプロモーターの活性化が見られるのかを検証するためである。最初に、組織像での分類や一部ドライバー遺伝子変異 (EGFR, KRAS, ALK 転移) の検査結果が得られる進行癌の検体を、ChIP アッセイを用いてスクリーニングし、解析可能な検体が筑波大学のバイオバンク検体の中にどの程度含まれているのかを確認した。初年度は高品質な検体が 5~10 症例に 1 例程度と、成績が悪く、ルーチンの検体処理の過程を大幅に見直すとともに、ChIPseq のワークフローも DNA 増幅過程を大きく改良した。また、H27 年度後半には産学連携事業「つくば i-Laboratory」の次世代シーケンシング事業を通して NextSeq500 が導入され、技術検討のサイクルを効率よく回すことができ、RNAseq、ChIPseq とともにデータ品質が大きく改善された。新旧両方のワークフローによるデータが混在しているものの、Nkx2-1 のように既知の肺癌関連遺伝子の活性化でも転写産物がプロモーター位置の異常を伴っていることが明らかとなった。このようなプロモーター領域はヒト ES 細胞でポリコム複合体 2 (PRC2) が bivalent domain を形成している箇所であり、癌細胞で未分化な幹細胞で見られる遺伝子活性化の未決定状態

が再び形成された結果としてクリプティックプロモーターが再活性化されている可能性を示唆する結果である。また、これらのプロモーター領域には、これまでに発表されていないものが多数含まれており、多検体で解析した場合にどの程度の頻度で複数症例で共通して見られるのかを解析し、論文化を進めている。

本研究では癌特異的なクリプティックプロモーターにおける転写が、「正常な」転写と異なるのか、転写サイクルの各段階をの指標を用いて評価する計画であったが、特に重要視していた RNA ポリメラーゼ II の C 末端リン酸化パターンの解析が手術検体では ChIP アッセイがうまくいかず、A549 細胞株等のデータを利用した。癌特異的な転写産物では、スプライシング構造の見えない non-coding RNA 様な転写産物や、3'UTR の延長も見られたが、転写の開始点選択とプロセッシング、終結の機能関連については新規性のある発見がまだ十分に掘り下げられておらず、癌特異的な遺伝子セットを利用した研究の切り口を今後も検討する。

本研究で確立できた組織バンキングにおける検体保存ワークフロー、LMD を用いた複雑な組織構造の切り分けと RNAseq、ChIPseq データ取得、インフォマティクスワークフローは、筑波大学トランスポーター医学研究センターで本研究代表者が H28 年度から運営している NGS 解析プラットフォームにも応用されている。したがって、本研究では胃癌での発見をより高精細な LMD を用いた解析で肺癌でも確認するとともに、他の医学・生物学研究解析にも波及する解析技術を確立できた。

【本研究課題に関する主要論文】

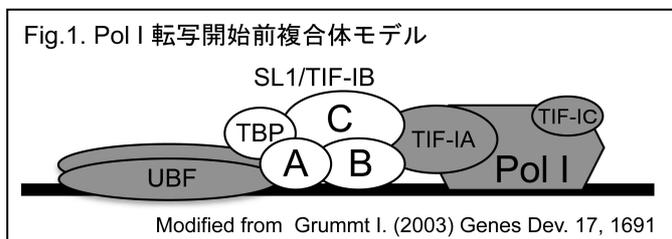
- The transcription factor MAFK induces EMT and malignant progression of triple-negative breast cancer cells through its target GPNMB. Okita Y, Kimura M, Xie R, Chen C, Shen LT, Kojima Y, Suzuki H, Muratani M, Saitoh M, Semba K, Heldin CH, Kato M, *Sci Signal* 10, 474 (2017).
- Conservation of the Nrf2-Mediated Gene Regulation of Proteasome Subunits and Glucose Metabolism in Zebrafish. Nguyen VT, Fuse Y, Tamaoki J, Akiyama SI, Muratani M, Tamaru Y, Kobayashi M, *Oxid Med Cell Longev* 2016, 5720574 (2016).
- Comprehensive benchmarking reveals H2BK20 acetylation as a distinctive signature of cell-state-specific enhancers and promoters. Kumar V, Rayan NA, Muratani M, Lim S, Elanggovan B, Xin L, Lu T, Makhija H, Poschmann J, Lufkin T, Ng HH, Prabhakar S, *Genome Res* 26, 612-23 (2016).

村野 健作 公募研究代表者 (H25～26 年度)
筑波大学・医学医療系・助教

研究課題名：新規高感度レポーター系を用いた rRNA 遺伝子の種特異的転写開始機構の解析

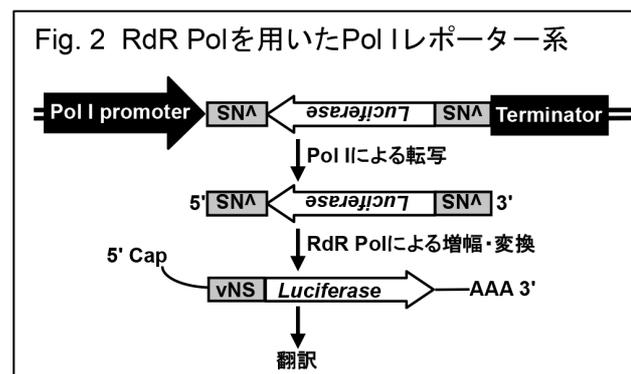
【研究目的】

RNA ポリメラーゼ I (Pol I) による rRNA 遺伝子の転写反応は、Pol II や Pol III と異なり、厳格な種特異性を示す。すなわちヒト rRNA 遺伝子はマウス細胞内で転写されない。Grummt らによって、ヒトとマウスの rRNA 遺伝子の試験管内転写反応には、それぞれの細胞から調製した細胞核抽出液を必要とすることが示された (Grummt *et al.* 1982)。この種特異的な転写反応は、Pol I によるプロモーター認識の違いによって説明されている。TBP を含むタンパク質複合体である SL1 (ヒト) および TIF-IB (マウス) によって種特異的に転写開始点が決定的される (Bell *et al.* 1989, Rudloff *et al.* 1994)。一連の研究から、Fig. 1 に示した転写開始前複合体の主な構成因子のうち、Pol I、UBF、TBP、TIF-IA、および TIF-IC はヒトとマウスで交換可能であることが示されてきた。これまでに SL1 は、TBP と 3 種類の TAF_I (TBP-associated factor I)、TAF_I48/A、TAF_I63/B、TAF_I110/C を含むことが報告されていた (Comai *et al.* 1992)。また、ヒト rRNA 遺伝子の試験管内転写反応の活性を指標に、TBP と 3 種類のヒト TAF_I 組み換えタンパク質を用いて SL1 活性が再構築できることが示された (Zomerdijk *et al.* 1994)。一方、マウス由来の TBP および 3 種類の TAF_I の組換えタンパク質を用いた試験管内系では、マウス rRNA 遺伝子の転写反応を再構築できなかった (Heix *et al.* 1997)。これら 2 つの矛盾する報告のため、SL1/TIF-IB の再構築に関する結論は出ていなかった。ところが 2007 年になって SL1 画分に新しい TAF_I、TAF_I41/D が発見された (Gorski *et al.* 2007)。TAF_I41/D の発見を受けて、本研究では SL1/TIF-IB 活性の再構築に関して結論を出し、rRNA 遺伝子の種特異的な転写開始機構を明らかにする事を目的とした。

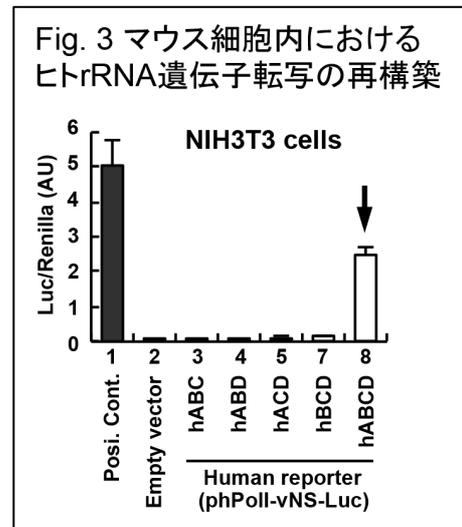


【研究成果】

SL1 活性を再構築する上で、最もシンプルで確実性のある方法として、マウス細胞内においてヒト rRNA 遺伝子の転写反応を再現することだと考えた。そこで、ルシフェラーゼを用いた Pol I レポーター系の構築を目指した。Pol I の転写産物は、基本的には mRNA と異なりタンパク質に翻訳されない。その点を解決するため、インフルエンザウイルスの RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdR Pol) による転写・翻訳機構に着目した (Fig. 2)。インフルエンザウイルス研究では、逆遺伝学的手法により様々な変異ウイルスが作製されている (Neumann *et al.* 1999)。この系ではインフルエンザウイルスを構成するタンパク質を Pol II を用いて 293T 細胞に発現させ、ウイルス RNA ゲノムは Pol I により供給する。インフルエンザウイルス粒子は細胞から放出され培養上清に回収される。このシステムを Pol I のレポーター系として改変した (Fig. 2)。ルシフェラーゼをコードしたアンチセンス RNA (vNS-Luc) は Pol I により供給される。Pol II で供給した RdR Pol は、ウイルス由来の非翻訳領域 (vNS) を介して vNS-Luc を増幅する。さらに RdR Pol は細胞内の mRNA から Cap 構造を奪い取り、Pol I 転写産物を mRNA に変換する。このシステムにより、Pol I 活性をバックグラウンドに比べて 10^4 倍以上の感度で検出することができた。



構築したヒト Pol I レポーター系はヒト培養細胞である HeLa 細胞では機能したが、マウス NIH3T3 細胞ではシグナルを検出することができなかった。一方、同様に構築したマウス Pol I レポーター系は HeLa 細胞では機能せず、NIH3T3 細胞でのみ機能した。以上の結果から、構築した Pol I レポーター系は種特異的な Pol I 転写反応を再現していることが明らかとなった。次にヒト SL1 活性を再構築するため、マウス NIH3T3 細胞にヒト Pol I レポーター系と共に 4 種類のヒト TAF_I (A-D) 発現ベクターを導入したところ、ヒト rRNA 遺伝子プロモーターの活性を検出することができた (Fig. 3, lane 8)。一方、いずれか 3 種類のヒト TAF_I では活性を検出できなかった (Fig. 3, lanes 3-7)。また、ヒト rRNA 遺伝子座をコードするヒト 21 番染色体を保持したマウス A9 細胞に、4 種類のヒト TAF_I 発現ベクターを導入したところ、ヒト rRNA を RT-PCR によって検出することができた。以上の結果から、マウス細胞内において SL1 活性を再構築するには 4 つの TAF_I が必要かつ十分である事が示された。すなわち、ヒト rRNA 遺伝子の転写開始点を決定する機能的 SL1 複合体は、TBP と 4 種類の TAF_I によって形成されている事が明らかとなった。



【本研究課題に関する主要論文】

- Reconstitution of human rRNA gene transcription in mouse cells by a complete SL1 complex. Murano K, Okuwaki M, Momose F, Kumakura M, Ueshima S, Newbold RF, Nagata K, *J Cell Sci* 127, 3309-19 (2014).

矢田 哲士 公募研究代表者 (H27~28 年度)
九州工業大学・大学院情報工学研究科・教授

研究課題名：次世代シーケンサー解析と情報科学解析で迫る転写調節コードの普遍性と多様性

【研究目的】

プロモーターの塩基配列が転写活性に与える影響（転写調節コード）を明らかにすることは、転写サイクルの制御機構を明らかにするための中心的な研究課題のひとつである。ENCODE プロジェクトでは、潤沢なヒトオミックスデータを用い、プロモーター中の機能的な転写因子結合部位 (TFBS) を明らかにし、それらのある/なしによってプロモーターの転写活性を推定する統計モデルを構築した。本研究課題では、次世代シーケンサー解析と情報科学解析を組み合わせることで、統計モデルの解像度を格段に向上させ、1 塩基レベルの解像度でプロモーターの転写活性を推定する統計モデルを構築する。さらに、この統計モデルでは、プロモーター中の機能的な TFBS に加え、プロモーターに潜む潜在的な TFBS も明らかにする。また、TFBS 間の距離が転写活性に与える影響も明らかにする。

【研究成果】

上記の目的を達成するために、まず、野生型のヒトプロモーターについて、error-prone PCR を用いて数%のランダムな変異が導入された数万種類の変異型プロモーターを用意し、それらの転写強度と塩基配列を次世代シーケンサーを用いて体系的に測定した。次に、この測定データを使い、塩基配列からその転写強度を予測する回帰モデルを bolasso (bootstrap LASSO) を用いて導出した。

ここでは、ヒト EF1a1 プロモーターについて、34,000 の変異型プロモーターを用意し、それらの HEK293 における転写強度と塩基配列のデータを取得した。プロモーター長は 1,100nt、変異型プロモーターにおける突然変異率は 1.8%、突然変異の内訳は、置換が 92%、挿入が 1%、欠失が 7%であった。

このデータを用いて導出した転写強度の回帰モデルを図 1(a)に示す。10 分割クロス検定によると、この回帰モデルは相関係数 0.649 で転写強度を予測することができる。また、この回帰モデルは、これまでに報告されているヒト EF1a1 プロモーター中の TFBS が捉えられている (-100.. -82 が EFP1、-64.. -53 が EFP2、-32.. -16 が TATA box、-1.. +21 が転写開始点 (TSS) 近傍のシグナル配列)。この回帰モデルより、-77.. -68 と -45.. -37 には潜在的な TFBS が存在していると考えられる。

次に、これらの中の 3 つの TFBS (-100.. -82, -77.. -68, -45.. -37) に塩基置換を組み合わせて系統的に導入し、各改変プロモーターの転写強度を Luciferase レポーターアッセイにより測定したところ、転写強度の相加的な増大が観察された (図 1(b)左)。また、各改変プロモーターの転写強度の測定値と回帰モデルによる予測値の回帰直線は、 $y=0.96x-0.09$ (ほぼ $y=x$) であった (図 1(b)右)。

これらの結果は、次世代シーケンサー解析と情報科学解析からなる一連の解析がヒト EF1a1 プロモーターに潜む転写調節コードを明らかにしたことを示している。

【本研究課題に関する主要論文】

- A new computational method to predict transcriptional activity of a DNA sequence from diverse datasets of massively parallel reporter assays. Liu Y, Irie T, Yada T, Suzuki Y, *Nucleic Acids Res*, in press.
- Estimating optimal sparseness of developmental gene networks using a semi-quantitative model. Ichinose N, Yada T, Wada H, *PLoS One* 12, e0176492 (2017).
- General continuous-time Markov model of sequence evolution via insertions/deletions: local alignment probability computation. Ezawa K. *BMC Bioinformatics* 17, 397 (2016).
- General continuous-time Markov model of sequence evolution via insertions/deletions: are alignment probabilities factorable?. Ezawa K. *BMC Bioinformatics* 17, 304 (2016).

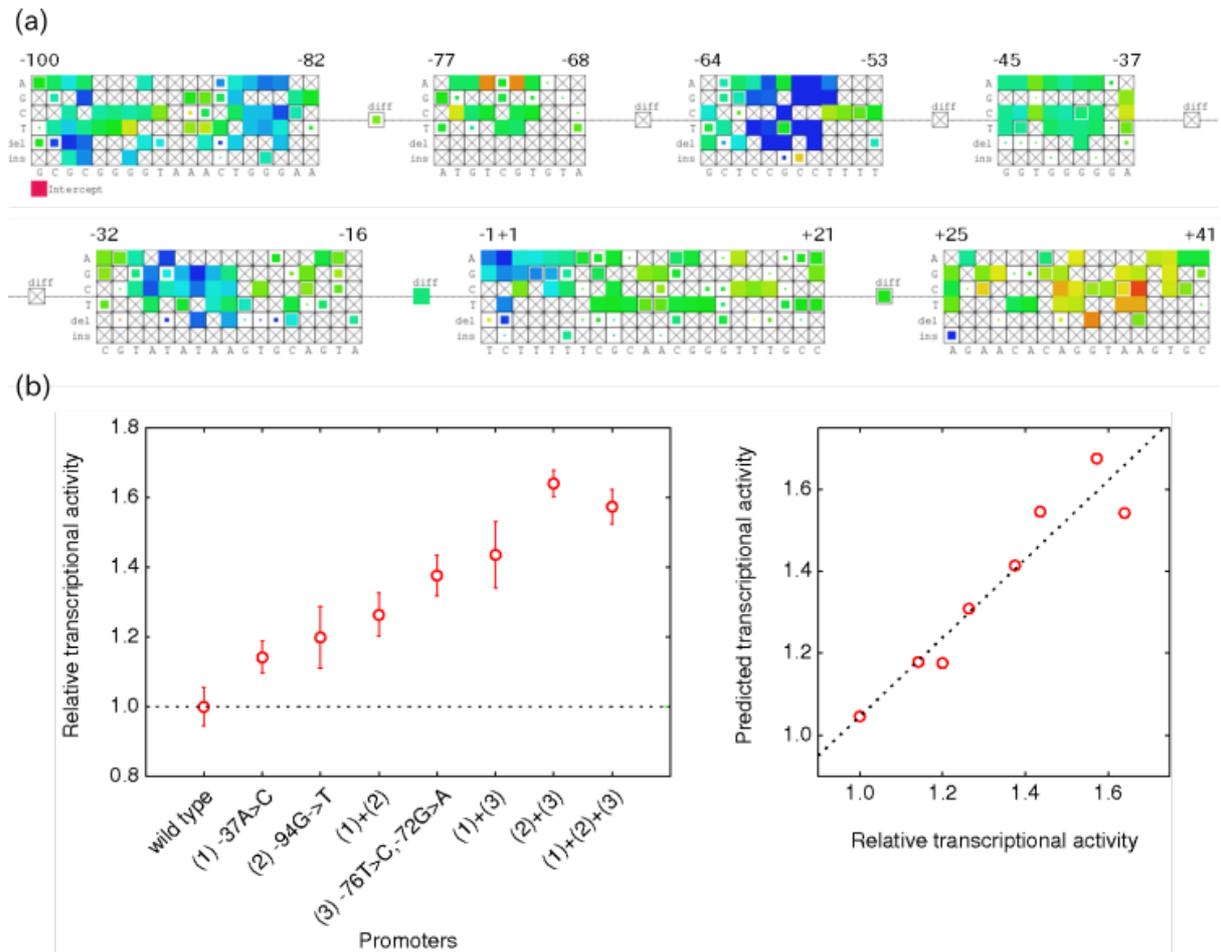


図 1 (a) ヒト EF1a1 プロモーターの転写強度の回帰モデル。回帰モデルは、TFBS 中の各位置における 4 つの塩基と挿入・欠失が転写強度に与える影響と TFBS 間の距離が転写強度に与える影響をプロファイリングしている。セルの色が赤くなるほど大きな正の影響を、青くなるほど大きな負の影響を、×は影響しないことを表す。上段の数字はプロモーター中の位置を (+1 が TSS)、下段の塩基は野生型プロモーターの塩基を表す。(b) 転写強度の回帰モデルに従って、ヒト EF1a1 プロモーターの 3 つの TFBS (-100.. -82, -77.. -68, -45.. -37) に塩基置換を組合せ的に導入し、各々のプロモーターの転写強度を測定した (左)。横軸には、転写強度の増大が見込める昇順で野生型プロモーターと改変プロモーターを並べた。ここでは、野生型プロモーターの転写強度を 1.0 としている。-37A>は、-37 番目の野生型の塩基 A を C に置換したことを表す。エラーバーは標準偏差を表す。さらに、各プロモーターの転写強度の実測値を回帰モデルによる予測値と比較し、それらの間の回帰直線 (点線) を求めた (右)。

山本 拓也 公募研究代表者 (H27~28 年度)

京都大学・iPS 細胞研究所・特定拠点講師

研究課題名：細胞分化可塑性を規定する染色体高次構造の解析

【研究目的】

多能性幹細胞の重要な性質の一つである多分化能の本質は、幹細胞で発現していない遺伝子群が分化刺激に対して、適切に転写を開始できることにある。従って、多能性幹細胞で発現していない分化関連遺伝子群がどのような制御を受け、転写を開始する準備を整えているのかを知ることは重要である。現在までの研究により、多能性幹細胞では発生関連遺伝子の多くがバイバレントなエピジェネティック修飾を受けることが知られている。バイバレントなエピジェネティック修飾とは、遺伝子の制御領域が H3K4 トリメチル化（転写活性化）と H3K27 トリメチル化（転写抑制）の相反する 2 つの修飾を受けていることを指す。この 2 つの修飾により、分化関連遺伝子は、poised 状態になっていると考えられている。体細胞の初期化過程では、Nanog や Oct3/4 といった多能性関連遺伝子の制御領域の染色体高次構造が、その発現に先行して、ダイナミックに変化することが示されているが、多能性幹細胞におけるバイバレントな修飾を受ける染色体の高次構造に関する知見はほとんど得られていない。本研究では、特に多能性幹細胞でバイバレントな修飾を受ける分化関連遺伝子群の制御領域における染色体高次構造を解析し、バイオインフォマティクスを駆使しながら、その制御メカニズムを明らかにすることにより、幹細胞の重要な性質を規定する根本原理に迫ることを目的とした。

【研究成果】

染色体高次構造の解析の中心となる基本手法は、3C (chromatin conformation capture) である。細胞核内にあるタンパク質を介して近傍に位置するクロマチン構造をホルマリンにより固定し、制限酵素によって DNA を切断する。次に切断した DNA 末端同士をライゲーション反応によって結合させることで、核内において近傍に位置していた領域に由来するキメラな DNA 配列 (3C ライブラリー) を作製することができる。このキメラ DNA 配列を PCR によって定量する (3C) あるいは次世代シーケンサーによって決定することにより、3 次元空間上で近傍にあるクロマチン領域を検出することが可能である。我々は、まず、ある特定の注目する領域と相互作用する領域を一度に高精度で特定するため、3C-seq と呼ばれる手法を改良し、1 度の実験で 50~100 程度の領域と相互作用するクロマチン構造をより低バイアスで同定できる手法 (Multiplexed 3C-seq 法) を開発した。次に、この

手法を用いて、多能性幹細胞におけるバイバレント遺伝子の発現制御領域と相互作用するゲノム上の領域を網羅的に同定した。同定した相互作用のいくつかは、3D DNA FISH を用いた単一細胞レベルの解析によって確認した。バイオインフォマティクスを駆使した解析により、体細胞初期化過程において、多能性遺伝子と同様にバイバレント修飾が形成される

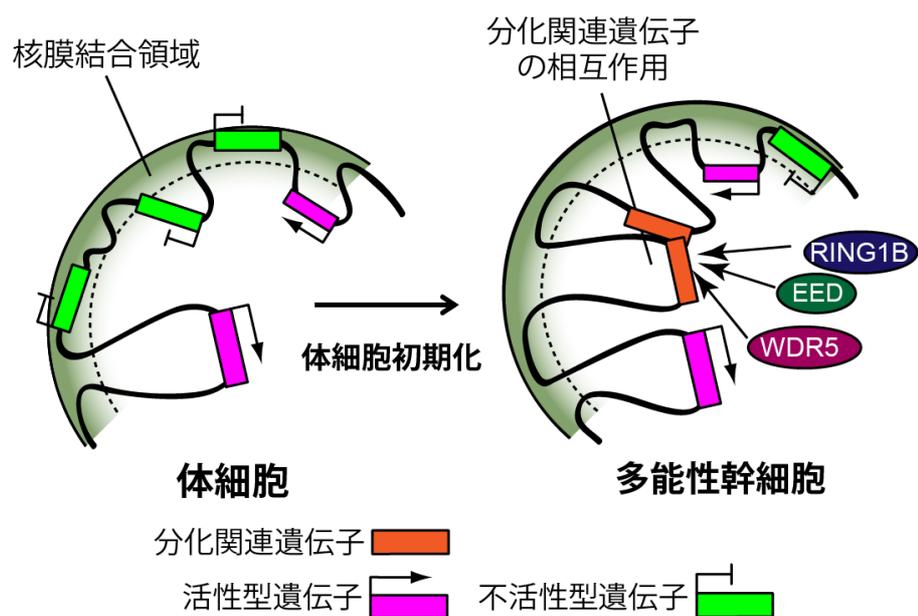


図 体細胞初期化過程におけるバイバレント遺伝子座の変化

遺伝子座においても染色体相互作用の再編が起こることが明らかとなった。さらに、この染色体相互作用の再編はバイバレント遺伝子座の核膜からの離脱と密接に関わり、多能性幹細胞ではバイバレント遺伝子が他のバイバレント遺伝子と相互作用する傾向にあることを見出した。このバイバレント遺伝子の共局在を制御する因子を同定するため、遺伝子の抑制に関わるヒストン修飾複合体 PRC1、PRC2 や活性化に関わるヒストン修飾複合体 TrxG、をそれぞれ構成する因子について、shRNA による発現抑制実験を行った。その結果、PRC1、PRC2、TrxG 複合体すべてがバイバレント遺伝子の共局在へ寄与していることを明らかにした。これは、遺伝子座のヒストン修飾を通してバイバレント遺伝子が協調的に制御されていることを示唆している (in revision)。以上の結果は、体細胞初期化において、多能性関連遺伝子のみならず分化関連遺伝子においても、遺伝子座の核内配置や染色体高次構造が厳密に制御されていることを意味する (図)。

また、本研究で開発したバイオインフォマティクスに関する技術を用いて、体細胞初期化過程における転写ネットワークと代謝ネットワークの関連性の解明 (Sone *et al.* 2017) や多能性幹細胞での imprinting 遺伝子の制御機構の解明に役立てた。

【本研究課題に関する主要論文】

- Hybrid Cellular Metabolism Coordinated by Zic3 and Esrrb Synergistically Enhances Induction of Naive Pluripotency. Sone M, Morone N, Nakamura T, Tanaka A, Okita K, Woltjen K, Nakagawa M, Heuser JE, Yamada Y, Yamanaka S, Yamamoto T, *Cell Metab* 25, 1103-17 (2017).

横山 明彦 公募研究代表者 (H25～26 年度)
京都大学・大学院医学研究科・特定准教授

研究課題名：AEP 複合体による転写サイクルの制御メカニズム

【研究目的】

近年、遺伝子発現の制御が転写開始複合体の形成ではなく、転写伸長を開始する段階で制御されているという知見が得られつつある。その一端を担う転写制御因子として AF4 family, ENL family そして PTEFb からなる AEP 複合体が我々を含めた複数の研究室から報告された (Yokoyama *et al.* 2010)、MLL というエピジェネティック制御因子と AEP の構成因子からなる融合遺伝子産物が白血病を引き起こす。その過程で AEP 構成因子が MLL 標的の遺伝子上に恒常的にリクルートされる事が転写の活性化に繋がり、白血病を引き起こしている。本研究では AEP が転写サイクルを制御するメカニズムを明らかにする事を目指す。具体的にはゲノムワイドな Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) 解析を行い、AEP の標的の遺伝子とそのエピゲノム環境を明らかにすると共に、AEP がクロマチン上で相互作用するタンパク質を同定する。これらの手法を用いる事で、AEP が転写サイクルを制御する分子メカニズムを統合的に明らかにする

【研究成果】

MLL と AEP の融合タンパク質は標的クロマチン上で MLL/AEP ハイブリッド複合体を形成している。MLL-AEP 融合タンパク質をマウス骨髄中の前駆細胞に発現させると、標的遺伝子である HOXA9 を恒常的に活性化し、細胞を不死化する。この実験系を用いて、MLL-AEP 中のどのような構造が転写活性化及び細胞不死化に必要なかを調べた。その結果、ジ・トリメチル化 Histone H3K36 を認識する PWWP ドメインと、非メチル化 CG 配列を認識する CXXC ドメイン、そして AEP 転写活性化複合体の構成因子である AF4 をリクルートする機能ドメインが、転写を活性化する上で必要であることがわかった。

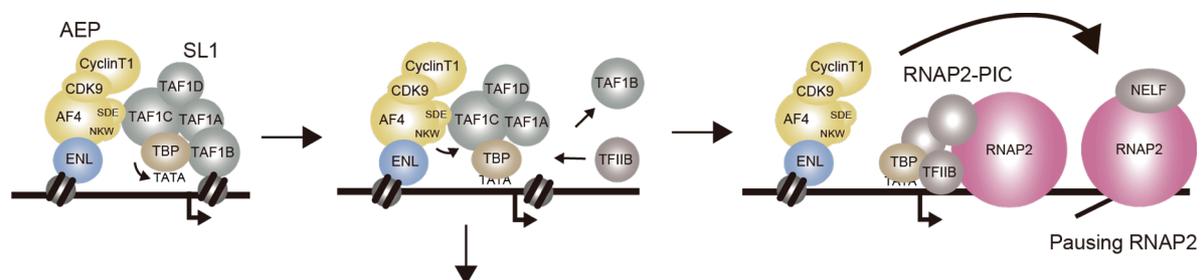


図1 AEP による転写の開始と伸長段階の活性化 (モデル)

次に、AF4 中で転写の活性化及び細胞の不死化に必要な構造を調べた結果、pSER ドメインという構造が必要であることがわかった。この構造は転写を活性化する働きを持つため、何らかの転写コアクティベーターをリクルートすると考えられた。そこで、pSER ドメインと特異的に結合する因子を探索した結果、SL1 複合体が同定された。SL1 複合体は RNAPII 依存的に rRNA を転写活性化する基本転写因子であることが知られていたが、RNAPII 依存的な転写に関わるとは考えられてこなかった。ChIP 解析を行うと、確かに SL1 が MLL 融合タンパク質とプロモーター上で共局在しており、SL1 の構成因子をノックダウンすると MLL 標的の遺伝子の転写が減弱した。SL1 を介した転写活性化能はプロモーター中の TATA 配列を欠損させると無くなることから、SL1 中の TBP が TATA 配列に積み込まれることで転写が活性化されると考えられた。また、pSER ドメイン中の SDE モチーフが SL1 との結合に必要であり、NKW モチーフが TBP の積み込みに必要であることも明らかになった。これらの結果から、AEP は SL1 を介して転写の開始段階を活性化する転写制御因子であると結論した。AEP は P-TEFb という転写の伸長段階を活性化する因子を含むが、P-TEFb をリクルートするドメインは転写活性化も細胞の不死化も引き起こさなかった。これらの結果は、転写の伸長段階を活性化す

ることが MLL 標的遺伝子を活性化する上で律速段階になっているというこれまでの概念は正しくないことを示唆した。本研究によって、AEP は SL1 を介して転写サイクルの開始段階を活性化し、P-TEFb を介して伸長段階を活性化する多機能な転写のコアクティベーターであることが明らかになった。

【本研究課題に関する主要論文】

- Transcriptional activation by MLL fusion proteins in leukemogenesis. Yokoyama A, *Exp Hematol* 6, 21-30 (2017).
- TBP loading by AF4 through SL1 is the major rate-limiting step in MLL fusion-dependent transcription. Okuda H, Takahashi S, Takaori-Kondo A, Yokoyama A, *Cell Cycle* 15, 2712-22 (2016).
- AF4 utilizes the SL1 components of RNAP1 machinery to initiate MLL fusion- and AEP-dependent transcription. Okuda H, Kanai A, Ito S, Matsui H, Yokoyama A, *Nat Commun* 6, 8869 (2015).
- MLL fusion proteins link transcriptional coactivators to previously active CpG-rich promoters. Okuda H, Kawaguchi M, Kanai A, Matsui H, Kawamura T, Inaba T, Kitabayashi I, Yokoyama A, *Nucleic Acids Res* 42, 4241-56 (2014).

米澤 康滋 公募研究代表者 (H25～28 年度)
近畿大学・先端技術総合研究所・教授

研究課題名：計算科学シミュレーションによる CTD の構造特性から探る転写調節機構 (H25～26 年度)、計算科学と情報科学による CTD 及び CTR の構造空間と転写因子認識機構の研究 (H27～28 年度)

【研究目的】

1) 本研究の目的は、計算科学シミュレーションの手法を用いて RNA ポリメラーゼ II 最大サブユニットの C 末端領域 (CTD) が転写システムに関わる分子機構の構造的な理論基盤を解明することにある。具体的には、CTD を構成する 7 アミノ酸繰り返し領域のダイナミックなリン酸化がその構造空間に及ぼす影響を拡張アンサンブル法で解明すると共に、CTD 構造が Pin1 酵素から受けるプロリン異性化の影響を、分子動力学シミュレーションを用いて高精度に明らかにする。

2) 計算・情報科学の手法を用いて RNA ポリメラーゼ II (Pol2) 最大サブユニットの C 末端領域 (CTD) と、Pol2 の転写伸長因子 DSIF のサブユニット Spt5 の C 末端領域 (CTR) が転写サイクルに関わる分子認識機構を解明し転写メカニズムの統一的理解へ貢献する事にある。具体的には、CTD (非コンセンサス配列を含む) 及び CTR の反復繰り返し配列のダイナミックなリン酸化や修飾がその構造空間に及ぼす影響を分子計算と情報解析で解明すると共に、CTD や CTR を基質とする転写因子の認識・結合・解離の分子機構を先進の分子シミュレーションで高精細に明らかにする。

【研究成果】

1) 拡張アンサンブル法の一つであるマルチカノニカル分子動力学シミュレーション法 (McMD) を用いてリン酸化による CTD の構造特性を研究した。研究成果として、コンセンサス配列が一回繰り返す CTD 配列ペプチドに対して McMD を実施した。

その結果、CTD リpeat中の 2,5,7 番目のセリン残基のリン酸化によって局所的な β 構造が誘起されることで転写因子のリクルートに寄与する事実を計算科学解析から明らかにすることができた。さらに CTD 配列中のセリン残基に続くプロリン残基のシス状態への異性化が局所的な β 構造形成を強く抑制して CTD 転写に影響を与える事を明らかにした。このことは Pin1 等のプロリン異性化酵素が CTD を介して転写制御に関わる「リン酸化と異性化のクロストーク」ことを示す重要な成果である。

2) CTR がリン酸化によって転写過程に関わる機能を解明する為に CTR 領域全体を長時間分子動力学シミュレーションして、リン酸化された場合とリン酸化されない場合の 2 次構造変化を解析した。その結果、スレオニン残基のリン酸化は CTR ペプチドの特有の部分に伸長した構造を誘起することを明らかにし、この伸長さ

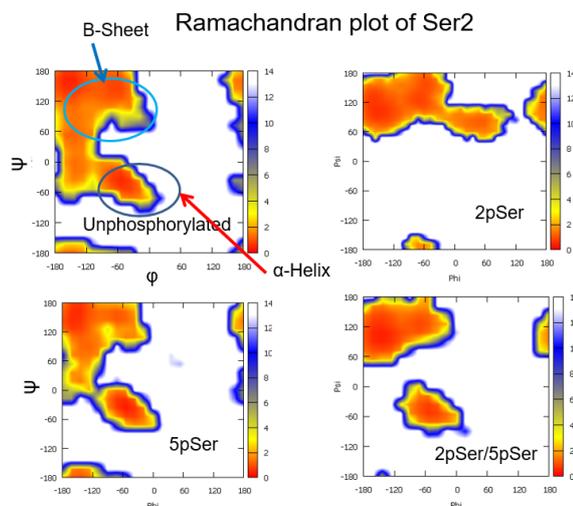


図1 リン酸化による 2pSer 残基のコンフォメーション変化

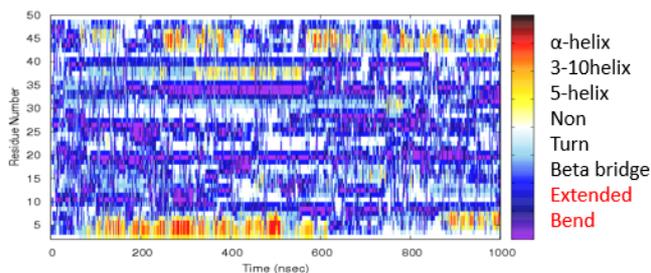


図2 リン酸化された CTR の 2 次構造変化

れた部分を転写因子が認識することで転写過程に関わることを示した。これに加えて CTR と結合する Rtf Plus1 との結合を分子動力学シミュレーションで解析し、結合がこれまでに報告された水素結合ではなく疎水性相互作用で安定化されている事を明らかにした。

長時間分子シミュレーションと機械学習の手法を融合して CTD ペプチドと CTR ペプチドのリン酸化によって誘起されるコンフォメーション変化の特徴を抽出した。長時間分子シミュレーションには最近報告された構造不定蛋白質に適した水モデルを新たに採用してその精度を高めた。機械学習手法には多次元尺度構成法とその非線形空間への拡張版である Isomap 法を用いてリン酸化によるコンフォメーション変化の特徴を低次元空間に射影して解析した。具体的には分子シミュレーションから得られた多次元ビックデータからペプチド構造間の特徴距離尺度を新たに定義して算出し多次元尺度構成法を用いて 2 次元空間に射影するプログラム群を整備した。

さらに分子シミュレーションのデータから得られた距離尺度を非線形空間に射影するプログラムを開発し多次元尺度構成法と組み合わせることで非線形空間分布に対応する Isomap 解析を実現した。多次元尺度構成法と Isomap による解析から CTD ペプチドや CTR ペプチドの特定部位のリン酸化によってペプチドコンフォメーション空間が著しく変化することを明らかにした。

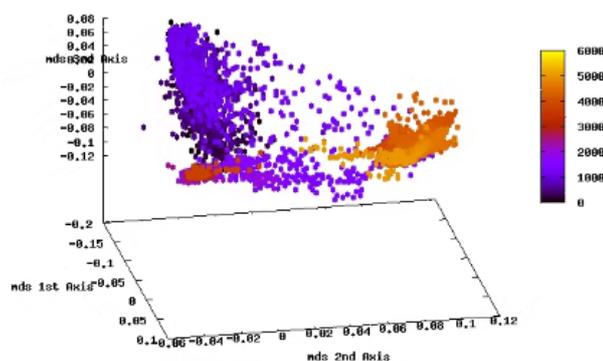


図3 Isomap 法によって 2 次元空間に射影された CTD ペプチドのコンフォメーション

【本研究課題に関する主要論文】

- A Method for Predicting Protein Conformational Pathways by Using Molecular Dynamics Simulations Guided by Difference Distance Matrices. Yonezawa Y, *J Comput Chem* 37, 1139-46 (2016).
- Molecular Dynamics Study of the Phosphorylation Effect on the Conformational States of the C-terminal Domain of RNA Polymerase II. Yonezawa Y, *J Phys Chem B* 118, 4471-8 (2014).

和田 洋一郎 公募研究代表者 (H25~26 年度)
 東京大学・アイソトープ総合センター・教授

研究課題名：炎症性刺激で誘導される転写ファクトリーの機能解析

【研究目的】

“転写の波”という現象によって存在が示唆される、転写ファクトリーは複数の遺伝子群を同時に転写するため、クロマチン相互作用を引き起こすこと、またそれによって転写サイクルにおけるクロマチン構造が大きく変動することが明らかになりつつある。そこで、活性型RNAポリメラーゼII (Pol II) 抗体を用いた網羅的クロマチン相互作用解析 (Chromatin Interaction Analysis using Paired-End Tag sequencing; ChIA-PET) によって、転写複合体を介したクロマチン構造変化の観察を行い、ヒト細胞の転写サイクルにおける転写複合体の役割を明らかにする事を目的として本研究を行った。

【研究成果】

無刺激状態と炎症刺激状態におけるヒト血管内皮細胞における Pol II を介した網羅的な相互作用を観察することに成功した。ChIA-PET によって予測されたクロマチン相互作用点は、実際に 3C, 3D-FISH によって確認された。既に報告した炎症刺激における NFκB、低酸素刺激では HIF1α (図1左上) に留まらず、PPAR リガンド刺激では PPARβ/δ が (Inoue *et al.* 2014、図1左下)、さらにスタチン刺激では MEF2C が (Maejima *et al.* 2014、図1右) 中心となって構成される転写複合体によって、即座にクロマチン構造が変動することを見いだした。このような変化を引き起こす転写複合体を同定するため、クロマチン免沈に続いてショットガンプロテオミクスを行ったところ、Pol II のサブユニット 12 個に加えてクロマチン構造関連蛋白質群が同定された (図2) が、その特異性を確認するため、より高スペックの Pol II 抗体を用いた経時的な測定によって、転写複合体の構造や動態を一層詳細に明らかにすることが期待される。

図1. 転写調節にはクロマチン構造変化が関与する

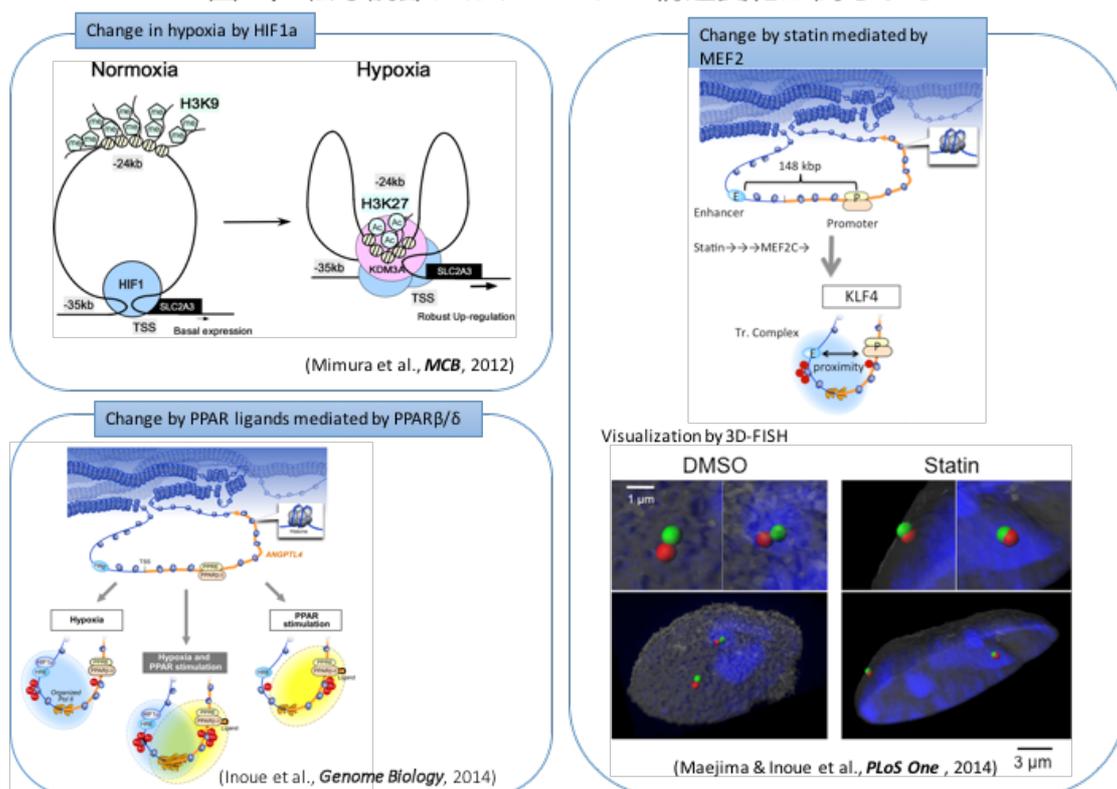


図2. TNFαで刺激後30分のPol II複合体に含まれる蛋白質群

