

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830064

研究課題名(和文)がん原遺伝子RASの活性化異常が引き起こす遺伝子サイレンシング機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of oncogenic RAS-induced gene silencing

研究代表者

舟山 亮 (Funayama, Ryo)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20452295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞のDNAに起こる突然変異はさまざまな遺伝子の発現パターンを変化させて、がん細胞の増殖能力や生存能力を異常なまでに活性化する。本研究では、がん細胞で最も高頻度で起こるRAS遺伝子の突然変異が細胞死を促す遺伝子の転写を抑制する分子機構を解析した。その結果、Erk2タンパク質のリン酸化酵素活性が転写抑制に必要なことを見出した。また転写が抑制される際には、遺伝子周辺でヒストン修飾などのクロマチン環境が大きく変化するが、これは遺伝子の転写が抑制されたことが引き金となって起きていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Cancer is caused by DNA mutations. Some mutations cause alterations in gene expression, which result in abnormal growth and viability in cancer cells. We uncovered the molecular mechanism of transcriptional repression induced by an oncogenic RAS mutation, one of the most recurrent mutation in cancer. Phosphorylation activity of protein kinase Erk2 is required for RAS-induced transcriptional repression. Moreover, transcriptional repression triggers alteration of chromatin environment including histone modification.

研究分野：細胞生物学

キーワード：転写 エピジェネティクス RAS

1. 研究開始当初の背景

RAS シグナル伝達経路は様々な遺伝子の転写量を調節することにより細胞の増殖と生存を制御している。多くのがん細胞では RAS 遺伝子に活性化型の突然変異が起こり、この変異 RAS タンパク質が発する過剰な増殖・生存シグナルが細胞の発がんや悪性化を引き起こしている。例えば RAS 遺伝子の活性化変異は、がん化に抑制的に働く Fas 遺伝子の転写を抑制することが知られている¹⁾。

Fas の転写が抑制される分子機構を明らかにしようとする試みは、海外の複数の研究グループによりなされている^{1) 2)}。Wajapayee らは、Zfp354B タンパク質が Fas 遺伝子プロモーター領域に DNA メチル化酵素を誘導し、メチル化量を増加させることによって転写を抑制するモデルを提唱した³⁾。しかしながら、このモデルを検証するために我々が行った実験の結果、Fas のプロモーター領域は RAS シグナルが活性化する以前の時点で高度にメチル化されており、RAS シグナルに反応したメチル化量の変化は認められなかった。また、DNA メチル化量が極めて少ない Uhrf1 遺伝子ノックアウト細胞でも Fas の転写抑制は観察された。このことは、Fas の転写抑制には DNA メチル化は必要でなく、DNA メチル化に非依存的な転写抑制機構が存在することを示していた(未発表)。

そこで我々は、RAS シグナルの活性化が引き起こす転写の変化とエピゲノムの変化を解析し、これまでに次の3つの知見を得た。

(1) shRNA ライブラリのスクリーニングにより、Fas の転写を抑制する制御因子を探索し、複数の候補遺伝子を得た。Fas タンパク質は細胞表面の受容体をコードしており、Fas 発現量の高い細胞をフローサイトメトリーにより分取できる。そこで細胞に shRNA ライブラリを導入し、Fas を転写抑制できない(Fas タンパク質を高発現した)細胞を単離した。この細胞がもつ shRNA とその標的遺伝子を決定し、転写抑制に必要な候補遺伝子を得た。

(2) RAS シグナルに反応して転写抑制される遺伝子群を同定した。RAS シグナルの活性化が引き起こすトランスクリプトームの経時変化を RNA-seq により解析した。発現変化のパターンにより遺伝子を分類し、RAS シグナルに反応して転写抑制される遺伝子群を同定した。

(3) RAS シグナルが引き起こすエピゲノムの変化を明らかにした。RAS シグナルに反応して転写抑制される遺伝子の周辺では、ヒストン H3 リシン 27 トリメチル修飾(H3K27me3)が増加することを見出した。このエピゲノム変化を経時的に観察すると、はじめに転写量が変化し、次に H3K27me3 修飾量が変化していた。これは、ヒストン修飾の変化が転写の変化を引き起こすというこれまでの概念を覆すものであった⁴⁾(論文発表済み)。

2. 研究の目的

がん原遺伝子 RAS に起こる活性化型の突然変異が、がん抑制性の遺伝子群を転写抑制する分子機構を解明することを目的として本研究を遂行した。RAS 遺伝子に起こる活性化型の突然変異は Fas 遺伝子をはじめとするがん化に抑制的に働く遺伝子群の発現を転写レベルで抑制するが、その分子機構は不明である。そこで、転写抑制にはたらく制御因子を同定し、その活性が RAS シグナルに反応して変化する仕組みを解明する。また、転写抑制にともなって起こるエピゲノム変化の分子機構とその役割を解明する。

3. 研究の方法

(1) Fas 遺伝子を転写抑制する制御因子の同定と転写抑制機構の解析

RAS の活性化型変異体を発現し、Fas が転写抑制されている NIH3T3 細胞に shRNA ライブラリを導入した。数日間の培養後、Fas タンパク質発現量が増加した細胞(Fas の転写抑制が起こらなくなった細胞)をフローサイトメトリーにより分取し、この細胞がもつ shRNA とその標的遺伝子を、Fas 遺伝子の転写抑制に必要な遺伝子として同定した。

上述のスクリーニングにより得られた Mapk1 (Erk2) 遺伝子が、本当に Fas の転写抑制に必要なかを調べる確認実験では、異なる6種類の Mapk1 shRNA を作製し、Fas の転写抑制に与える影響を調べた。Mapk1 をノックダウンすると Fas の転写抑制が起こらなくなり、ノックダウン効率と転写抑制の効率とが負の相関関係にあることを確認した。さらに、shRNA のオフターゲットの可能性を否定するために shRNA 抵抗性の Mapk1 cDNA を作製した。この cDNA は Mapk1 shRNA の効果をレスキューできることを確認した。

RNA polymerase II (RNP2) のリン酸化状態の解析では、リン酸化状態に関わらず RNP2 を認識するポリクローナル抗体を使用し、SDS ポリアクリルアミド電気泳動による易動度の違いを利用してリン酸化状態を調べた。

Erk2 のリン酸化酵素活性が Fas 遺伝子の転写抑制に必要なかを調べる実験では、Erk2 の ATP 結合部位 (K52) と酵素活性中心 (T183, Y185) の変異体 cDNA を作製した。内在性 Erk2 をノックダウンした NIH3T3 細胞にこの変異体 cDNA または野生型 cDNA を導入し、Fas の転写抑制に与える影響を解析した。Erk2 のクロマチン結合能の解析では、HA 標識 Erk2 を発現した NIH3T3 細胞を作製し、HA 抗体を用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行った。

(2) RAS シグナルの活性化により転写抑制される新規標的遺伝子の同定

NIH3T3 細胞および活性化型 RAS 遺伝子を発現した NIH3T3 細胞のトランスクリプトームを RNA-sequencing により解析した。これら2つのトランスクリプトームの比較により、RAS

シグナルに応答して転写抑制される約 100 個の遺伝子を抽出した。次に野生型 Mapk1 cDNA および不活性化型 Mapk1 cDNA を発現した細胞の RT-qPCR 解析を行い、これら 100 個の遺伝子の中から Erk2 のリン酸化酵素活性に依存して転写が抑制される 30 個の遺伝子を同定した。

(3) 遺伝子サイレンシングにおける H3K27me3 修飾変化の分子機構と役割の解明
CRISPR-Cas9 の実験では、NIH3T3 細胞に CRISPR 発現ベクターと sgRNA 発現ベクターを導入し、安定発現株を作製した。その後、PCR によるスクリーニングを行い、Ephx1 遺伝子の転写開始点付近が欠失した細胞のクローンを得た。Ephx1 遺伝子の発現が喪失していることは RT-qPCR により確認した。また、Ephx1 の転写が、Ephx1 遺伝子領域の H3K27me3 修飾に与える影響を、抗 H3K27me3 抗体を用いた ChIP 解析により調べた。

4. 研究成果

(1) Fas 遺伝子を転写抑制する制御因子の同定と転写抑制機構の解析

がん原遺伝子 RAS の活性化型の突然変異が、Fas 遺伝子をはじめとするがん抑制性の遺伝子群の転写を抑制する分子機構を解明するために、shRNA ライブラリのスクリーニングを行い、Fas 遺伝子の転写抑制に必要な遺伝子を探索した。その結果、RAS シグナルの下流で働くタンパク質リン酸化酵素 Erk2 が Fas 遺伝子の転写抑制に必要であることが明らかになった。

Erk2 タンパク質は基質タンパク質をリン酸化することでさらに下流にシグナルを伝達すると同時に、細胞質から核内へ移行してクロマチンに結合し、遺伝子の発現を直接制御することが報告されている⁵⁾。また、Erk2 のクロマチン結合能は Erk2 のリン酸化活性非依存的に起こる⁵⁾。そこで、リン酸化酵素活性を失った Erk2 変異体 cDNA を作製し、これが Fas 遺伝子の転写を抑制できるか検証した。その結果、Fas 遺伝子の転写抑制には Erk2 のリン酸化酵素活性が必要であることが明らかになった。すなわち、RAS シグナルは下流のリン酸化酵素 Erk2 を介してさらに下流の基質タンパク質をリン酸化することで、Fas 遺伝子の転写を抑制すると考えられた。

Erk2 は多くの基質タンパク質をリン酸化することが知られている。本研究では、Erk2 が RNP2 をリン酸化して、標的遺伝子を転写抑制している可能性を検証した。活性化型 RAS 遺伝子を発現した NIH3T3 細胞では、RNP2 のリン酸化状態が亢進しており、RAS シグナルによって RNP2 がリン酸化されていることが示唆された。そこで ChIP 解析により、転写抑制される標的遺伝子領域に Erk2 が直接結合しているか検証した。しかし本研究では、Erk2 とクロマチンとの結合を示す証拠は得られなかった。Erk2 は核質で遊離の RNP2 を

リン酸化して、そのクロマチン結合能と標的遺伝子の発現パターンを変化させているのかもかもしれない。

(2) RAS シグナルの活性化により転写抑制される新規標的遺伝子の同定

RAS-Erk2 シグナルの活性化に応答して転写抑制される新たな遺伝子を探索した。RAS の活性化型変異体を発現した細胞のトランスクリプトームを解析し、RAS シグナルに応答して転写抑制される遺伝子を約 100 個同定した。このうち RAS 依存的かつ Erk2 のリン酸化酵素活性依存的に転写抑制されている遺伝子は Fas、Ephx1、Col1a1 遺伝子を含む約 30 個であった。一方、これまでに RAS シグナルに応答して転写抑制されることが報告されていた Par4 や Reck 遺伝子^{6) 7)}、Erk2 の酵素活性非依存的に転写抑制されており、PI3K などのほかのシグナル経路によって転写が抑制されていると考えられた。

(3) 遺伝子サイレンシングにおける H3K27me3 修飾変化の分子機構と役割の解明

これまでに我々は、RAS シグナルに応答して転写抑制される遺伝子の周辺で、転写抑制性の H3K27me3 修飾量が増加することを見出し、論文発表した⁴⁾。ここで転写抑制の経時変化を丁寧に観察すると、まず mRNA 発現量が急速に低下し、その後で H3K27me3 修飾量がゆっくりと増加していた。このことは、転写抑制の過程で起こる H3K27me3 修飾量の増加は、RAS シグナルに応答して誘導されるのではなく、転写抑制の結果として起きていることを示唆している。そこで、RAS-Erk2 シグナルが、転写抑制の過程で起こる H3K27me3 修飾量の増加に必要か否か検証した。

CRISPR-Cas9 実験系を用いて、Ephx1 遺伝子の転写開始点周辺の DNA 配列を欠失させ、Ephx1 遺伝子の転写を強制的に停止させた。その結果、転写が停止した Ephx1 遺伝子周辺では、RAS-Erk2 シグナル非依存的に H3K27me3 修飾量が増加した。このことから、転写抑制の過程では RAS シグナルが H3K27me3 修飾量を増加させるのではなく、「転写が停止すること」自体が H3K27me3 修飾量の増加を引き起こしていることが示された。

以上、研究期間全体を通じて、細胞のがん化の過程で起こる RAS 遺伝子変異とそれに伴う細胞増殖シグナルが、がん抑制性の遺伝子を含む遺伝子群を転写抑制する分子機構について新たな知見を得た。

<引用文献>

- Fenton, R., et al. *Cancer Res.* 58: 3391 (1998)
- Gazin, C., et al. *Nature.* 449: 1073 (2007)
- Wajapeyee, N., et al. *Genes Dev.* 27: 2221 (2013)
- Hosogane M, Funayama R, Nishida Y,

Nagashima T, Nakayama K. Ras-Induced Changes in H3K27me3 Occur after Those in Transcriptional Activity. *PLoS Genet.* 2013 Aug;9(8):e1003698.
Hu, S., et al. *Cell.* 139: 610 (2009)
Barradas, M., et al. *EMBO J.* 18: 6362 (1999)
Takahashi, C., et al. *PNAS.* 95: 13221 (1998)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11件)

Higasa K, Miyake N, Yoshimura J, Okamura K, Niihori T, Saito H, Doi K, Shimizu M, Nakabayashi K, Aoki Y, Tsurusaki Y, Morishita S, Kawaguchi T, Migita O, Nakayama K, Nakashima M, Mitsui J, Narahara M, Hayashi K, Funayama R, Yamaguchi D, Ishiura H, Ko WY, Hata K, Nagashima T, Yamada R, Matsubara Y, Umezawa A, Tsuji S, Matsumoto N, Matsuda F. Human genetic variation database, a reference database of genetic variations in the Japanese population. *J Hum Genet.* 2016. in press. doi: 10.1038/jhg.2016.12. 査読有

Matsumoto M, Kondo K, Shiraki T, Brydun A, Funayama R, Nakayama K, Yaegashi N, Katagiri H, Igarashi K. Genomewide approaches for BACH1 target genes in mouse embryonic fibroblasts showed BACH1-Pparg pathway in adipogenesis. *Genes Cells.* 2016. in press. doi: 10.1111/gtc.12365. 査読有

Ninomiya M, Kondo Y, Kimura O, Funayama R, Nagashima T, Kogure T, Morosawa T, Tanaka Y, Nakayama K, Shimosegawa T. The expression of miR-125b-5p is increased in the serum of patients with chronic hepatitis B infection and inhibits the detection of hepatitis B virus surface antigen. *J Viral Hepat.* 2016;23(5):330-9. doi: 10.1111/jvh.12522. 査読有

Wong WF, Kohu K, Nagashima T, Funayama R, Matsumoto M, Movahed E, Tan GM, Yeow TC, Looi CY, Kurokawa M, Osato M, Igarashi K, Nakayama K, Satake M. The artificial loss of Runx1 reduces the expression of quiescence-associated transcription factors in CD4(+) T lymphocytes. *Mol Immunol.* 2015;68(2 Pt A):223-33. doi: 10.1016/j.molimm.2015.08.012. 査読有

Hino-Fukuyo N, Kikuchi A, Arai-Ichinoi N, Niihori T, Sato R, Suzuki T, Kudo H, Sato Y, Nakayama T, Kakisaka Y, Kubota Y, Kobayashi T, Funayama R, Nakayama K, Uematsu M, Aoki Y, Haginoya K, Kure S. Genomic analysis identifies candidate pathogenic variants in 9 of 18 patients with unexplained West syndrome. *Hum Genet.* 2015;134(6):649-58. doi: 10.1007/s00439-015-1553-6. 査読有

Niihori T, Ouchi-Uchiyama M, Sasahara Y, Kaneko T, Hashii Y, Irie M, Sato A, Saito-Nanjo Y, Funayama R, Nagashima T, Inoue S, Nakayama K, Ozono K, Kure S, Matsubara Y, Imaizumi M, Aoki Y. Mutations in MECOM, Encoding Oncoprotein EVI1, Cause Radioulnar Synostosis with Amegakaryocytic Thrombocytopenia. *Am J Hum Genet.* 2015;97(6):848-54. doi:10.1016/j.ajhg.2015.10.010. 査読有

Fujiwara I, Murakami Y, Niihori T, Kanno J, Hakoda A, Sakamoto O, Okamoto N, Funayama R, Nagashima T, Nakayama K, Kinoshita T, Kure S, Matsubara Y, Aoki Y. Mutations in PIGL in a patient with Mabry syndrome. *Am J Med Genet A.* 2015 Apr;167(4):777-85. doi: 10.1002/ajmg.a.36987. 査読有

Izumi R, Niihori T, Suzuki N, Sasahara Y, Rikiishi T, Nishiyama A, Nishiyama S, Endo K, Kato M, Warita H, Konno H, Takahashi T, Tateyama M, Nagashima T, Funayama R, Nakayama K, Kure S, Matsubara Y, Aoki Y, Aoki M. GNE myopathy associated with congenital thrombocytopenia: a report of two siblings. *Neuromuscul Disord.* 2014 Dec;24(12):1068-72. doi: 10.1016/j.nmd.2014.07.008. 査読有

Kondo Y, Ninomiya M, Kimura O, Machida K, Funayama R, Nagashima T, Kobayashi K, Kakazu E, Kato T, Nakayama K, Lai MM, Shimosegawa T. HCV infection enhances Th17 commitment, which could affect the pathogenesis of autoimmune diseases. *PLoS One.* 2014;9(6):e98521. doi: 10.1371/journal.pone.0098521. 査読有

Ogata T, Niihori T, Tanaka N, Kawai M, Nagashima T, Funayama R, Nakayama K, Nakashima S, Kato F, Fukami M, Aoki Y,

Matsubara Y. TBX1 Mutation Identified by Exome Sequencing in a Japanese Family with 22q11.2 Deletion Syndrome-Like Craniofacial Features and Hypocalcemia. *PLoS One*. 2014;9(3):e91598. doi: 10.1371/journal.pone.0091598. 査読有

Fujiwara T, Fukuhara N, Funayama R, Nariai N, Kamata M, Nagashima T, Kojima K, Onishi Y, Sasahara Y, Ishizawa K, Nagasaki M, Nakayama K, Harigae H. Identification of acquired mutations by whole-genome sequencing in GATA-2 deficiency evolving into myelodysplasia and acute leukemia. *Ann Hematol*. 2014 Sep;93(9):1515-22. doi: 10.1007/s00277-014-2090-4. 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

舟山亮, 細金正樹, 長嶋剛史, 中山啓子. がん原遺伝子 RAS による遺伝子サイレンシングの分子機構の解析. 第 38 回日本分子生物学会年会. 2015 年;12 月 1 日. 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市).

中川直, 細金正樹, 舟山亮, 中山啓子. TGF- 刺激による TFIIID 構成因子 TAF7 の分解とその役割の解明. 第 38 回日本分子生物学会年会. 2015 年;12 月 1 日. 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市).

中川直, 細金正樹, 舟山亮, 中山啓子. TGF- 刺激による TFIIID 構成因子 TAF7 の分解とその役割の解明. 第 38 回日本分子生物学会年会. 2015 年;12 月 1 日. 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市).

細金正樹, 舟山亮, 城田松之, 中山啓子. H3K27me3 修飾パターン形成過程の時系列解析. 第 37 回日本分子生物学会年会. 2014 年;11 月 27 日. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 免疫沈降用の内部標準分子および免疫沈降方法

発明者: 五十嵐和彦、落合恭子、中山啓子、木下賢吾、舟山亮、細金正樹、岡村容伸

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2015-035734

出願年月日: 平成 27 年 2 月 25 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

舟山亮 (FUNAYAMA, Ryo)
東北大学大学院・医学系研究科・助教
研究者番号: 20452295

(2) 研究分担者 該当なし

(3) 連携研究者 該当なし

(4) 研究協力者

中山 啓子 (NAKAYAMA, Keiko)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 60294972

長嶋 剛史 (NAGASHIMA, Takeshi)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 80443000

細金 正樹 (HOSOGANE, Masaki)
東北大学・大学院医学系研究科・助手
研究者番号: 30734347