

平成 21 年 4 月 13 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19570163

研究課題名（和文） 癌性変化を特異的に感知する E2F による新たな転写制御機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of E2F-mediated transcriptional mechanism, which specifically senses oncogenic changes

研究代表者

大谷 清 (OHTANI KIYOSHI)

東京医科歯科大学・疾患遺伝子実験センター・講師

研究者番号：30201974

研究成果の概要：

代表的な癌抑制遺伝子産物 pRB の標的である転写因子 E2F の癌化抑制に関わる制御機構を解析した。E2F は、pRB の機能が失われると、増殖刺激では活性化されないサイクリン依存性キナーゼ抑制因子 p27^{Kip1} など癌化抑制に関わる遺伝子の発現を誘導することを明らかにした。癌化抑制に関わる制御機構は、結合パートナーである DP に対する依存性が極めて低く、細胞増殖制御に関わる機構とは異なることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：転写・癌化・E2F・pRB・p53・ARF・p27^{Kip1}

1. 研究開始当初の背景

細胞に癌遺伝子の活性化や癌抑制遺伝子の欠失などの癌性変化が生じると、細胞はそれを感知し、アポトーシスや細胞老化を誘導して癌化を防ぐ機構が存在する。しかし、細胞が如何にして正常な増殖刺激と癌化に伴う異常な増殖刺激を識別しているのかは明らかにされていない。癌抑制遺伝子産物 pRB と p53 を中心とする RB 経路と p53 経路は、癌化の抑制に最も重要な二大経路であり、ほとんどの癌で両経路に異常が認められる。転写因子 E2F は pRB の主な標的であり、増殖

刺激による pRB の不活性化を介して活性化され、増殖関連の遺伝子発現を制御することにより細胞増殖に必須の役割を担っている。一方、RB 経路に欠陥が生じると E2F が本来の制御を外れて活性化され、主に癌抑制遺伝子 ARF の発現を誘導することにより p53 経路を活性化し、アポトーシスまたは細胞周期の停止を誘導し、癌化を抑制する。従って E2F は、細胞増殖だけでなく癌化抑制にも重要な働きを担っている。しかし、E2F が如何にして増殖刺激にともなう生理的な pRB の不活性化と癌化の原因となる pRB の機能不全

を識別しているのか、全く明らかにされていなかった。我々は、新規 E2F 標的遺伝子を検索・解析した結果、増殖刺激では発現誘導されない非典型的な E2F 標的遺伝子が存在することを見出した。この事実は、E2F による転写制御に、増殖刺激に依存しない制御機構があることを示唆している。そこで、E2F による ARF 遺伝子の制御機構を解析した結果、pRB の機能不全を特異的に感知する新たな制御機構が存在することを見出した。ARF 遺伝子は、増殖刺激によって誘導された正常な E2F 活性には反応せず、pRB の機能不全によって誘導された制御を外れた E2F 活性を特異的に感知し活性化された。この特異な反応は非典型的な E2F 結合配列 EREA によって仲介され、EREA は制御を外れた E2F に特異的に結合し ARF 遺伝子発現を活性化した。従って、増殖刺激によって活性化された正常な E2F 活性には反応せず、制御を外れた E2F 活性を特異的に感知する新たな制御機構が存在し、この機構が E2F の癌化抑制作用の基盤になっていると考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、癌性変化に伴う制御を外れた E2F 活性を特異的に感知する E2F による新たな転写制御機構の具体的な機序を明らかにすることを目標とする。そのために以下の点を検討する。

(1) ゲルシフト法において、EREA に結合した制御を外れた E2F には、従来 E2F 活性に必須であると考えられていたヘテロダイマーのパートナーである DP が検出されない。従って、新たな制御に DP を必要としない可能性が高いので、この点を検討・確立する。

(2) 制御を外れた E2F は、正常な E2F とは異なった修飾を受けている可能性が考えられる。そこで、制御を外れた E2F が正常な E2F とは異なった修飾を受ける可能性を検討する。

(3) 我々は、E2F の欠失変異体で ARF 遺伝子の活性化能が特異的に障害されているものを見出している。従って、制御を外れた E2F はこの変異体で欠失している部分を介して DP とは異なる他の因子と相互作用して EREA を活性化している可能性が考えられる。しかし、E2F と相互作用する既知の因子で、新たな制御に関わると予想されるものは見出されていない。そこで、制御を外れた E2F が相互作用する新たな因子を検索する。

(4) EREA は単独で制御を外れた E2F に特異的に結合し転写を活性化するので、非典型的な E2F 結合配列そのものが正常な E2F 活性と制御を外れた E2F 活性を識別できる可能性が考えられる。そこで、制御を外れた E2F 活性を特異的に感知するのに必要な、非典型的な E2F 結合配列のコンセンサス配列を検索する。我々は、サイクリン依存性キナーゼ抑制因子 p27^{Kip1} 遺伝子や p53 ファミリーの一つ p73 遺伝子も ARF 遺伝子と同様の制御を受けることを見出している。そこで、これらの遺伝子の非典型的な E2F 反応性エレメントを同定し、EREA と比較することによりコンセンサス配列を同定する。

3. 研究の方法

(1) 新たな制御に DP が必要ないことの確立

レポーターアッセイにより、shRNA による DP 発現のノックダウンが E2F による ARF プロモーターの活性化を抑制するかどうか、また DP の共発現が E2F による ARF プロモーターの活性化に協調的に作用するかどうかを検討する。さらに組換えアデノウイルスを用いてヒト正常繊維芽細胞に DP に対する shRNA を発現させ、DP 発現のノックダウンが E2F による ARF 遺伝子発現を抑制するかどうか、また E2F を介したアポトーシスの誘導を抑制するかどうかを検討する。

(2) 制御を外れた E2F が正常な E2F とは異なった修飾を受ける可能性の検討

E2F が受ける修飾として、アセチル化とリン酸化が知られている。そこで、これらの修飾が新たな制御に及ぼす影響を検討する。E2F は発現量の極めて少ない蛋白であり、正常な E2F 活性の中に混在する制御を外れた E2F 活性に特異的な修飾を生化学的に検索するのは困難であると予想される。そこで、これらの修飾を受けない E2F 変異体を用いて、これらの修飾が新たな制御機構に影響をもつかどうかを検討する。レポーターアッセイにより、各 E2F 変異体の典型的な標的遺伝子のプロモーターおよび ARF プロモーターの活性化能を調べ、ARF プロモーターの活性化能が特異的に障害されている変異体を検索する。

違いのある変異体が同定されれば、実際に細胞内の正常な E2F と制御を逸脱した E2F にその部位の修飾の違いがあるか

どうかを確認する。さらに、その部位の修飾の違いによって、**EREA** などの非典型的な **E2F** 結合配列への結合に差があるかどうかを検討する。

違いのある変異体が見出されなければ、**E2F** が **SUMO** 化やモノユビキチン化などの他の修飾を受ける可能性を検討する。このためにゲルシフト法を用いて、典型的な結合配列に結合した正常な **E2F** と **EREA** に結合した制御を外れた **E2F** が **SUMO** やユビキチンに対する抗体に反応するかどうかを検討する。両方で反応性の違いが見られるものがあれば、その修飾部位を同定し、同様に特異な制御における役割を検討する。

(3) 制御を外れて活性化された **E2F** と相互作用する新たな因子の検索

組換えアデノウイルスを用いて異なる二つのタグを付けた **E2F** を細胞に過剰発現させ、この制御を外れて活性化された **E2F** をそれぞれのタグに対する抗体で順次免疫沈降し、特異的に共沈してくる因子を検索する。また、**ARF** 遺伝子の **EREA** は制御を外れた **E2F** 活性に特異的に結合するので、制御を外れた **E2F** と相互作用する因子も結合する可能性が考えられる。そこで、**EREA** を用いて酵母で **one hybrid screening** を行い、**EREA** に結合する **E2F** 以外の分子を検索する。

E2F と相互作用する新たな因子が同定されれば、その因子の新たな制御への関与を調べる。そのために、発現ベクターを作成し、その因子が制御を外れた **E2F** に優先的に結合するか、その因子が **E2F** と協調的に作用して **EREA** に結合し **ARF** 遺伝子を活性化するか、などを検討する。

(4) 新たな制御に関わる非典型的な **E2F** 結合配列のコンセンサス配列の検索

我々は、制御を外れた **E2F** に特異的に反応する標的遺伝子として、**ARF** 遺伝子に加えて **p27^{Kip1}** および **p73** 遺伝子を同定している。そこで、**p27^{Kip1}** および **p73** 遺伝子の **E2F** 反応性エレメントを同定し、単独で制御を外れた **E2F** に特異的に反応するか検討する。これらも単独で新たな制御に充分であるなら、**EREA** と比較することにより新たな制御に関わる非典型的な **E2F** 結合配列のコンセンサス配列を導き出す。

新たな制御に関わるコンセンサス配列

が導き出されたら、その配列が本当に正常な **E2F** 活性と制御を外れた **E2F** 活性を識別出来るかどうか証明する。このためにレポーターアッセイを用いて、コンセンサス配列の増殖刺激によって誘導された正常な **E2F** 活性に対する反応性と **E2F** の過剰発現およびアデノウイルスの **E1a** や **RB** のノックダウンなどによって誘導された制御を外れた **E2F** 活性に対する反応性を比較検討する。またゲルシフト法を用いて、コンセンサス配列への正常な **E2F** 活性の結合能と制御を外れた **E2F** 活性の結合能を比較検討する。

4. 研究成果

(1) 新たな制御に **DP** 分子が必要ないことの確立

線維芽細胞で主に発現している **DP** ファミリー分子である **DP1** に対する **shRNA** を発現する発現ベクターおよび組換えアデノウイルスを作成し、ヒト正常線維芽細胞を用いて **DP** の発現をノックダウンする系を作成した。レポーターアッセイにより、**DP** のノックダウンは典型的な標的遺伝子である **Cdc6** プロモーターの **E2F1** による活性化は抑制したが、**ARF** プロモーターの活性化は全く抑制しなかった。逆に **DP1** の共発現は、**Cdc6** プロモーターの **E2F1** による活性化には協調的に作用したが、**ARF** プロモーターに対しては協調的に作用しなかった。

組換えアデノウイルスを用いてヒト正常線維芽細胞において **DP** 発現をノックダウンしたところ、**E2F1** またはアデノウイルス **E1a** による内在性 **Cdc6** 遺伝子発現を抑制したが、**ARF** 遺伝子発現は抑制しなかった。さらに、**DP** 発現のノックダウンは、血清刺激による細胞増殖を抑制したが、**E2F1** またはアデノウイルス **E1a** によるアポトーシスの誘導は全く抑制しなかった。

ゲルシフト法およびクロマチン免疫沈降法により、**DP1** のノックダウンは典型的な **E2F** 結合配列に対する **E2F1** の結合を抑制したが、**EREA** に対する結合は抑制しなかった。逆に **DP1** の共発現は、典型的な **E2F** 結合配列に対しては **E2F1** と協調的に作用したが、**EREA** に対しては協調的に作用しなかった。

これらの事実は、制御を外れた **E2F** による **ARF** 遺伝子発現とアポトーシスの誘導は、増殖関連遺伝子発現と細胞増殖の誘導に比べて **DP** に対する依存性が極

めて低いことを示しており、制御を外れた E2F による ARF 遺伝子発現とアポトーシスの誘導には DP を必要としないことを強く示唆している。E2F による増殖関連遺伝子発現と細胞増殖には DP は必須であるので、このことは、E2F による ARF 遺伝子発現とアポトーシスの誘導が細胞増殖の誘導とは異なった機構により制御されていることを示している。この制御機構は癌化抑制に重要であると考えられるので、さらに詳細を明らかにする必要がある。

(2) 制御を外れた E2F が正常な E2F とは異なった修飾を受ける可能性の検討

E2F1 のアセチル化部位の変異体およびリン酸化部位 2 カ所の変異体の発現ベクターを作成し、Cdc6 プロモーターおよび ARF プロモーター活性化能を野性型と比較した。レポーターアッセイにより発現ベクターの量を振って検討したが、両者ともに野性型と明らかに差のある変異体は見出せなかった。従って、制御を外れた E2F にはこれらの修飾は必要ないと考えられる。正常な E2F にこれらの修飾が関わっている可能性は否定できない。

そこで、E2F が SUMO 化やモノユビキチン化などの新たな修飾を受ける可能性を検討した。このためにゲルシフト法を用いて、E2F が SUMO およびユビキチンに対する抗体に反応するかどうかを検討したが、明らかなスーパーシフトは検出されなかった。

以上、調べた範囲では制御を外れた E2F と正常な E2F との間に修飾の差は見出せなかった。E2F は発現量の極めて少ない蛋白で精製には困難が伴うと予測されるが、今後は正常な E2F と制御を外れた E2F をそれぞれ精製し、生化学的な差を検討する必要性が考えられる。

(3) 制御を外れて活性化された E2F と相互作用する新たな因子の検索

組換えアデノウイルスを用いて HA および Flag タグを付けた E2F1 をヒト正常線維芽細胞に過剰発現させ、それぞれのタグに対する抗体で順次免疫沈降し、特異的に共沈してくる因子の同定を試みた。しかし、期待したほど精製度は高くなく特異的に共沈してくる因子の同定は困難であった。

そこで EREA を用いて酵母で one hybrid screening を行ったが、得られた

クローンの中に転写に関わると考えられるものは見出せなかった。

今後これらの系を洗練するか酵母で two hybrid screening を行う必要性が考えられる。

(4) 新たな制御に関わる非典型的な E2F 結合配列のコンセンサス配列の同定

我々は、制御を外れた E2F に特異的に反応する標的遺伝子として、ARF 遺伝子に加えて p27^{Kip1} および p73 遺伝子を同定している。p27^{Kip1} 遺伝子の E2F 反応性エレメントを同定したところ、意外なことに ARF 遺伝子の EREA よりも典型的な E2F 結合配列に類似していた。しかし、p27^{Kip1} 遺伝子の E2F 反応性エレメントは、単独で制御を外れた E2F に特異的に反応し、制御を外れた E2F に優先的に結合した。p73 遺伝子に関しても E2F 反応性領域を同定したが、その中には典型的な E2F 結合配列に類似した配列が存在した。従って、現在までのところ非典型的な E2F 結合配列のコンセンサス配列は得られていない。コンセンサス配列を同定する為には、同様の制御を受ける遺伝子をさらに見出し、その E2F 反応性エレメントを明らかにし、配列を比較する必要がある。

我々は、ARF プロモーターの中に典型的な E2F 結合配列が存在するが、この配列は ARF プロモーターの E2F 反応性に貢献していないことを見出している。従って、正常な E2F と制御を外れた E2F に対する反応性を規定するには、E2F 反応性エレメントの配列だけでなく、プロモーター全体の構成が重要である可能性が示唆される。今後、制御を外れた E2F に特異的に反応するためのプロモーター全体の構成を検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

(1) 太谷清、大園瑛子：染色体DNAの複製と安定性を司るRB/E2F. 蛋白質・核酸・酵素, 54, 327-333, 2009, 査読有

(2) Ozono, E., Komori, H., Iwanaga, R., Ikeda, MA., Iseki, S., and Ohtani, K.: E2F-like elements in p27^{Kip1} promoter specifically sense deregulated E2F activity. Genes Cells, 14, 89-99, 2009, 査

読有

(3) Iwanaga, R., Ozono, E., Fujisawa, J., Ikeda, M.A., Okamura, N., Huang, Y., and Ohtani, K.: Activation of the *cyclin D2* and *cdk6* genes through NF- κ B is critical for cell cycle progression induced by HTLV-I Tax. *Oncogene*, 27, 5635-5642, 2008, 査読有

(4) Hara, T., Matsumura-Arioka, Y., Ohtani, K., and Nakamura, M.: A role of human T-cell leukemia virus type I Tax in expression of the human telomerase reverse transcriptase gene in human T cells. *Cancer Science*, 99, 1155-1163, 2008, 査読有

(5) Gohda, J., Irisawa, M., Tanaka, Y., Sato, S., Ohtani, K., Fujisawa, J., Inoue, J.: HTLV-1 Tax-induced NF κ B activation is independent of Lys-63-linked-type polyubiquitination. *Biochem Biophys Res Commun*, 357, 225-230, 2007, 査読有

[学会発表] (計 4 件)

(1) 大園瑛子、池田正明、井関幸子、大谷清 : 転写因子E2Fによる癌性変化と増殖刺激の識別、第31回日本分子生物学会年会、2008年12月、神戸

(2) Eiko Ozono, Masa-aki Ikeda, Kiyoshi Ohtani: The Cdk inhibitor p27^{Kip1} gene senses pRB dysfunction through E2F. 第67回日本癌学会学術総会、2008年10月、名古屋

(3) 小森英之、中村正孝、大谷清 : E2FのヘテロダイマーパートナーDP1はE2Fが誘導するアポトーシスとp14^{ARF}遺伝子発現には必要ない、第30回日本分子生物学会年回、2007年12月、横浜

(4) Ozono E, Komori H, Ikeda M and Ohtani K: p27^{Kip1} promoter specifically senses deregulated E2F activity. 第66回日本癌学会学術総会、2007年10月、横浜

[図書] (計 1 件)

(1) Ohtani, K., Komori, H., Ozono, E., Ikeda, M-A., and Iwanaga R.: Distinct Transcriptional Regulation by E2F in Cell Growth and Tumor Suppression. in "Control of cellular physiology by the transcription factor E2F", Yoshida, K. ed., *Research Signpost*, pp91-105. 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大谷 清 (OHTANI KIYOSHI)

東京医科歯科大学・疾患遺伝子実験センター・講師

研究者番号 : 30201974

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者