

平成21年 4月16日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19770179  
 研究課題名（和文） 転写因子 E2F1 を軸としたフィードバック・ループによる細胞機能制御の解明  
 研究課題名（英文） Studies on cellular function controlled by E2F1-centered feedback loop  
 研究代表者  
 吉田 健一（YOSHIDA KENICHI）  
 明治大学・農学部・准教授  
 研究者番号：20345036

研究成果の概要：本研究では「細胞周期とアポトーシスを制御する転写因子 E2F1 の転写ネットワークの理解」を目的として、E2F1 を軸としたフィードバック・ループによる細胞機能制御の解明を目指した。特に、E2F1 の新規ヒト標的遺伝子として見出した Geminin ならびに CDCA4 について解析を進めた。E2F1-CDCA4、E2F1-Geminin といったフィードバック・ループにより E2F1 活性が制御される可能性が示唆され、E2F1 を介した細胞増殖・分化や細胞死などの制御を考える上で重要な知見であると推察される。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	0	1,400,000
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	570,000	3,870,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：遺伝子、シグナル伝達、転写因子

## 1. 研究開始当初の背景

細胞周期とアポトーシスを制御する転写因子 E2F1 に関しては、これまで E2F1 の下流に位置する標的遺伝子の同定が精力的に実施されてきた。その結果、E2F1 が多くの重要な細胞機能を制御することが理解されてきた。興味深いことに、標的遺伝子のうちいくつかの遺伝子産物は E2F1 との相互作用により E2F1 結合 DNA 配列近傍で E2F1 の転写活性を制御することで細胞機能を調節している。具体例として、TopBP1 は E2F1 により転写活性

化された後、E2F1 と結合することでアポトーシス関連遺伝子群の転写開始を抑制し、その間に損傷した DNA を修復する (Genes Dev 18:673-86, 2004)。さらに線虫のライフスパンを延長する NAD 依存性脱アセチル化酵素のヒトホモログ遺伝子 SirT1 も、E2F1 に対し抑制的フィードバック・ループを形成する (Nat Cell Biol 8:1025-31, 2006)。この作用により SirT1 は抗癌剤エトポシドによる E2F1 を介したアポトーシスを軽減する。

一方、E2F1 標的遺伝子として我々が転写制

御調節を解析した Geminin (Yoshida et al., *Oncogene* 23:3802-3812, 2004) は DNA 複製開始因子 Cdt1 との結合を介し、細胞周期で一回のみの DNA 複製を許諾する (*Science* 290, 2309-12, 2000)。また、我々は Geminin-Cdt1 のバランス異常と癌化との関連についても解析してきた (Yoshida and Dhar et al., *Cell* 106:287-296, 2001; Yoshida et al., *Oncogene* 23, 58-70, 2004)。海外における最近の研究から、Geminin が DNA 複製開始制御のみならず、Hox 遺伝子群の発現制御を介して初期胚の発生・分化にも重要であると報告されている (*Nature* 427:745-9, 2004; *ibid* 427:749-53, 2004)。即ち、Geminin は一群の Hox・Polycomb タンパク、さらには Hox 遺伝子の転写調節領域に結合し、結果として Hox の胚発生における転写因子としての機能を阻害している。また、Geminin は Six3 タンパクと結合することで眼形成を抑制した (*Nature* 427:745-9, 2004)。更に、SWI/SNF クロマチン再構築因子 BRG1 と結合することでその機能を抑制し、神経分化を阻害すると報告された (*Genes Dev* 19:1723-34, 2005)。さらに Geminin は転写因子 AP4 と結合しヒストン脱アセチル化酵素 3 とともに転写に対して抑制的な複合体を形成することが最近報告された (*Proc Natl Acad Sci USA* 103:13074-13079, 2006)。これらの事実から、Geminin が転写複合体を形成し、DNA 複製制御のみならず転写調整により何らかの重要な細胞機能を制御している可能性が強く示唆されている。

## 2. 研究の目的

Geminin や CDCA4 により E2F1 を制御する新たなフィードバック・ループを形づくる転写複合装置が解明されれば、Geminin や CDCA4 による E2F1 を介した細胞機能の制御を理解する新たな視点が確立できる。また、新たな E2F1 制御タンパク同定に向けたスクリーニングから得られる情報は、転写制御分野のみならず細胞周期や癌化、胚発生・分化といった広く生命科学全般の研究者に有益な情報をもたらすに違いない。SirT1 が抗癌剤エトポシドによる E2F1 を介したアポトーシスを軽減したように、Geminin や CDCA4 がどのようなシグナルに応じて E2F1 を制御するのか理解できれば、細胞増殖の制御不能状態である癌の制御に向けた基礎的理解にも結実すると予想される。今後、E2F1 研究の新たな展開にとってブレークスル

ーとなる可能性が極めて高い。

Geminin の重要性は結合タンパク同定により実証されてきた。即ち、Cdt1 との結合を介した複製前複合体のオリジンでの形成阻害、さらに一群の Hox・Polycomb との結合を介した初期胚発生・分化の阻害などである。従って、Geminin 機能解明のブレークスルーは新規結合タンパクの同定とその機能解析に起因する。本研究において我々が見出した Geminin と E2F1 との相互作用をさらに詳細に解析すれば、E2F1 とともに Geminin の新しい機能解明に直結する可能性が極めて高い。

## 3. 研究の方法

我々の従来の知見に立脚した Geminin と CDCA4 を中心とした機能解析と、もう一つの軸として新たな E2F1 制御因子の同定へ向けたスクリーニングを実施する。具体的には、E2F1 標的遺伝子である Geminin と CDCA4 について、E2F1 に対するフィードバック作用を詳細に解析し、細胞周期を基盤とした細胞の増殖・分化・死との関わりを解明する。

Geminin は BRG1 や AP4 などとの相互作用が知られており、それら以外でも HDAC1~3 や E2F1 の転写活性を促進する p300/CBP なども含めて候補アプローチ的に相互作用を Western blot 法で解析する。また、E2F1 に対して負のフィードバック作用を示す CDCA4 についても検討を加える。細胞を抗癌剤に曝露させた際、CDCA4 と免疫沈降により共沈する E2F1 が増加するかあるいは Ser364 リン酸化が亢進しているか解析する。さらに様々な濃度の抗癌剤投与の結果、ダメージを受けた細胞がアポトーシスへと至るのか、細胞周期停止や DNA 修復へと至るのか解析し、その際、RNA 阻害法により E2F1 や CDCA4 をノックダウンすることでそれら細胞の表現型がいかに変化するか解析する。

## 4. 研究成果

本研究では「細胞周期とアポトーシスを制御する転写因子 E2F1 の転写ネットワークの理解」を目的として、E2F1 を軸としたフィードバック・ループによる細胞機能制御の解明を目指した。特に、E2F1 の新規ヒト標的遺伝子として見出した Geminin ならびに CDCA4 について解析を進め、以下の成果を得た。

(1) ヒト CDCA4 遺伝子プロモーターの E2F1 反応性配列は、転写開始点上流 85~78 bp に確認された。この配列は E2F ファミリー (E2F1~6

)のうちE2F1~4に対してルシフェラーゼ遺伝子の転写を活性化した。

(2) CDCA4転写活性化領域を用いたワン・ハイブリッドアッセイの結果、そのC末端領域(175~241アミノ酸残基)に転写活性を有することが確認された。この活性はE2FファミリーのうちE2F1~4により抑制された。

(3) CDCA4はE2F1依存性の転写活性を抑制した。

(4) E2F1とCDCA4との相互作用部位特定に向け、GFPないしFlgタグ付きのCDCA4発現ベクターを作製し、免疫沈降実験に供した。しかしながら、E2F1とCDCA4との相互作用は検出されなかった。

(5) E2F1転写活性化領域を用いたワン・ハイブリッドアッセイの結果、この活性はGemininも共発現によって活性化された。

以上より、E2F1-CDCA4、E2F1-Gemininといったフィードバック・ループによりE2F1活性が制御される可能性が示唆され、E2F1を介した細胞増殖・分化や細胞死などの制御を考える上で重要な知見であると推察される。今後、より詳細なメカニズムの解明が必要である。

#### 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10件)

- ① Ikeda R, Iwashita K, Sumizawa T, Beppu S, Tabata S, Tajitsu Y, Shimamoto Y, Yoshida K, Furukawa T, Che X, Yamaguchi T, Ushiyama M, Miyawaki A, Takeda Y, Yamamoto M, Zhao H, Shibayama Y, Yamada K, Akiyama S. Hyperosmotic stress up-regulates the expression of major vault protein in SW620 human colon cancer cells. *Experimental Cell Research* 314: 3017-3026 (2008). 査読有
- ② Tategu M, Nakagawa H, Hayashi R, Yoshida K, Transcriptional co-factor CDCA4 participates in the regulation of JUN oncogene expression. *Biochimie* 90: 1515-1522 (2008). 査読有
- ③ Ikeda R, Tajitsu Y, Iwashita KI, Che XF, Yoshida K, Ushiyama M, Furukawa T, Komatsu M, Yamaguchi T, Shibayama Y, Yamamoto M, Zhao HY, Arima J, Takeda Y, Akiyama SI, Yamada K. Thymidine phosphorylase inhibits the expression

of proapoptotic protein BNIP3. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 370: 220-224 (2008). 査読有

- ④ Nakagawa H, Tategu M, Yamauchi R, Sasaki K, Sekimachi S, Yoshida K. Transcriptional regulation of an evolutionary conserved intergenic region of CDT2-INTS7. *PLoS ONE* 3 (1): e1484 (p1-8) (2008). 査読有
- ⑤ Tategu M, Arauchi T, Tanaka R, Nakagawa H, Yoshida K. Puma is a novel target of soy isoflavone genistein but is dispensable for genistein-induced cell fate determination. *Molecular Nutrition and Food Research* 52: 439-446 (2008). 査読有
- ⑥ Tategu M, Nakagawa H, Sasaki K, Yamauchi R, Sekimachi S, Suita Y, Watanabe N, Yoshida K. Transcriptional regulation of polo-like kinases and early mitotic inhibitors. *Journal of Genetics and Genomics* 35: 215-224 (2008). 査読有
- ⑦ Hayashi R, Goto Y, Tanaka R, Oonogi K, Hisasue M, Yoshida K. Transcriptional regulation of human chromatin assembly factor ASF1. *DNA and Cell Biology* 26: 91-99 (2007). 査読有
- ⑧ Ikeda R, Yoshida K, Inoue I. Identification of FAZF as a novel BMP2-induced transcription factor during osteoblastic differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry* 101: 147-154 (2007). 査読有
- ⑨ Tategu M, Arauchi T, Tanaka R, Nakagawa H, Yoshida K. Systems biology-based identification of crosstalk between E2F transcription factors and the Fanconi anemia pathway. *Gene Regulation and Systems Biology* 1: 1-8 (2007). 査読有
- ⑩ Ikeda R, Tsukahara S, Yoshida K, Inoue I. Gene expression changes during the chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Journal of Biological Sciences* 7: 729-736 (2007). 査読有

[学会発表] (計11件)

- ① Yoshida K. Human microRNAs regulated by cancer signaling pathways. The Fifth Asia Pacific Multidisciplinary Meeting for Cancer Research, The Annual Scientific Meeting for Cancer Research Cancer 2009 “microRNA in Cancer Development”. (March 5-6, 2009; Prince of Wales Hospital, Hong Kong, China).
- ② Yoshida K. Promoter evolution of MCM8 orthologous gene in mammalian genome. 22nd International Mammalian Genome Conference. (2-5 Nov. 2008; Institute of Molecular Genetics, Prague, Czech Republic).
- ③ Tategu M, Yoshida K. Regulation of transcription factor E2F1 activity by TRIP-Br family protein CDCA4. The 9<sup>th</sup> International Congress on Cell Biology (Oct. 7-10, 2008; COEX, Seoul, Korea).
- ④ Nakagawa H, Yoshida K. E2F1 regulates mitochondrial biogenesis possibly through mitochondrial topoisomerase I. The 9<sup>th</sup> International Congress on Cell Biology (Oct. 7-10, 2008; COEX, Seoul, Korea).
- ⑤ Yoshida K. Phage display screening of Geminin-binding peptide and validation of its therapeutic use in tumors. 30<sup>th</sup> European Peptide Symposium (Aug. 31-Sep. 5, 2008; Finlandia Hall, Helsinki, Finland).
- ⑥ Yoshida K. Comprehensive analysis of cell-cycle-associated biomarkers induced by genistein. HUPO (Human Proteome Organisation) 7<sup>th</sup> World Congress (Aug. 16-20, 2008; RAI International Convention Center, Amsterdam, Netherlands).
- ⑦ Yoshida K. Gene regulatory link between the Fanconi anemia/BRCA pathway and E2F transcription factors. ISCO (International Society for Cellular Oncology) 2008. (March 5-8, 2008; Vrije Universiteit, Amsterdam, Netherlands).
- ⑧ Yoshida K. Nutriproteomics approach to interpret the biological effect of soybean isoflavone in cell fate determination. Nutrigenomics 2008. (March 13-14, 2008; Faculte de Medecine, Universite Paris V, Paris, France).
- ⑨ Yoshida K. Genetic approach to dissect the molecular mechanism of cell-cycle-associated genes in human cells. 12th World Congress on Advances in Oncology and 10th International Symposium on Molecular Medicine. (11-13 Oct. 2007; Creta Maris Hotel, Hersonissos, Greece).
- ⑩ Yoshida K. Involvement of transcription factor E2F1 in nucleo-mitochondrial crosstalk. 32nd Annual FEBS Congress “Molecular Machines”. (7-12 Jul. 2007; MessezentrumWienNeu, Vienna, Austria).
- ⑪ Yoshida K. Evolutionary conserved CDT2-INTS7 intergenic region acts as a bidirectional promoter and is asymmetrically regulated. 21st International Mammalian Genome Conference. (28 Oct-1 Nov. 2007; Kyoto Terrsa, Kyoto).
- [図書] (計 5 件)
- ① Yoshida K. Spatiotemporal dynamics of E2F transcription factors: Coordinated action but in a characteristic manner. 199-207 (2008). In: Control of Cellular Physiology by Transcription Factors E2F. Ed. Yoshida K. (435 pages, Research Signpost, Kerala)
- ② Yoshida K. Hidden treasures of G1/S cyclins/CDKs/pRb/E2F pathway. 103-111 (2008). In: Trends in Cell Cycle Research. Ed. Yoshida K. (317 pages, Research Signpost, Kerala)
- ③ Yoshida K. Hierarchical order of initiator protein assembly in pre-replication complex. Chapter 5, 201-210 (2008). In: Protein Conformation: New Research. Ed. Roswell LB. (264 pages, Nova Science Publishers, New York)
- ④ Yoshida K. Regulation of cell fate determination by Jun, a component of activator protein 1. 1-8 (2008). In:

Cell Cycle Control: New Research. Ed. Leroy NH and Fournier NT. (496 pages, Nova Science Publishers, New York)

- ⑤ Yoshida K. The beginning of the microRNAs era for cell cycle control. 49-70 (2008). In: Cell Cycle Control: New Research. Ed. Leroy NH and Fournier NT. (496 pages, Nova Science Publishers, New York)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 健一 (YOSHIDA KENICHI)

明治大学・農学部・准教授

研究者番号：20345036

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし