

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：34504

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570202

研究課題名(和文) 転写因子 E2F によるがん化抑制機構の解析

研究課題名(英文) Molecular mechanism of tumor suppression mediated by the transcription factor E2F

研究代表者

大谷 清 (Ohtani, Kiyoshi)

関西学院大学・理工学部・教授

研究者番号：30201974

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000 円

研究成果の概要(和文)：がん抑制因子RBの標的である転写因子E2Fは、増殖刺激によって活性化されると細胞増殖を促進する一方、RBの機能不全によって活性化されるとアポトーシスまたは細胞老化を誘導し、がん化を抑制する。E2Fによる細胞増殖とがん化抑制に関わる標的遺伝子の仕分け機構を解析し、E2F1のリン酸化が関与していることを明らかにした。RBの機能不全によって特異的に活性化される新規E2F標的遺伝子をDNAマイクロアレイで検索し、BIMを始めとする9個の新規標的を見出した。E2F1と相互作用する新規因子を免疫沈降の共沈およびYeast two-hybrid法で検索し、DDX5を始めとする52個の候補を見出した。

研究成果の概要(英文)：The transcription factor E2F is the main target of the tumor suppressor RB. E2F plays central role in cell growth upon growth stimulation. E2F also plays important role in tumor suppression by inducing apoptosis or cellular senescence upon dysfunction of RB. We analyzed molecular mechanism of discrimination of target genes involved in cell growth and tumor suppression, and identified involvement of phosphorylation status of E2F1. We searched new target genes specifically activated by dysfunction of RB by using DNA microarray, and identified 9 novel targets including BIM. We searched new interacting proteins of E2F1 by using co-immunoprecipitation coupled with mass spectrometry and yeast two-hybrid system, and identified 52 candidates including DDX5.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：癌 発現制御 E2F RB がん化抑制

## 1. 研究開始当初の背景

転写因子 E2F は、代表的ながん抑制遺伝子産物 RB の主な標的である。E2F は、細胞周期進行や DNA 複製など細胞増殖に関わる遺伝子の発現を制御することにより、細胞増殖に中心的な役割を果たしている (J Cell Physiol, 1997)。RB は主に E2F を抑制することによってがん化を抑制しており、がん性変化によって RB の機能が欠損すると、E2F は増殖関連遺伝子の発現を誘導し、細胞のがん化に貢献すると考えられていた。しかし近年の解析から、E2F 自身にがん化抑制作用があることが明らかとなった。E2F1 ノックアウトマウスは、様々な腫瘍を発症する (Cell, 85, 537, 1996)。また E2F は、増殖とは相反するアポトーシス(細胞死)や細胞周期停止に関わる遺伝子も活性化する (Genes Dev, 2001)。がん抑制因子 p53 の活性化に重要な ARF 遺伝子やサイクリン依存性キナーゼ抑制因子 p27 遺伝子などである。事実、E2F1 の過剰発現は、アポトーシスや細胞老化を引き起こす (PNAS, 1994; Mol Cell Biol, 2000)。従って E2F は、RB の機能欠損に際し、アポトーシスや細胞周期停止に関わる遺伝子の発現を誘導し、がん化抑制に関わっていると考えられている。RB の機能欠損に加えて、これらのがん抑制経路も障害されて初めて、細胞はがん化すると考えられる。しかし、E2F が如何にして増殖関連遺伝子とアポトーシスや細胞周期停止に関わる遺伝子の発現を制御仕分けしているのか、詳細は明らかにされていない。

我々は、ARF および p27 遺伝子が、増殖関連の E2F 標的遺伝子とは異なり、増殖刺激による RB の生理的な不活性化では活性化されず、がん性変化の代表である RB の機能欠損により特異的に活性化されることを見出した (EMBO J, 2005; Genes Cells, 2009)。このことから E2F は、RB の機能欠損と生理的な不活性化とを識別し、増殖関連遺伝子とがん抑制遺伝子の発現を制御し分けしていると予想される。しかし、E2F が RB の機能欠損を特異的に感知する機構は明らかにされていない。また、ARF, p27 遺伝子以外に、RB の機能欠損で特異的に活性化される遺伝子は知られていない。

## 2. 研究の目的

本研究は、E2F によるがん化抑制機構を探るために、E2F が RB の機能欠損を特異的に感知する機構、E2F による増殖関連遺伝子とがん抑制遺伝子の発現の仕分け機構、RB の機能欠損で特異的に活性化される新規 E2F 標的遺伝子を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) E2F による RB の機能欠損の感知機構の解析

生理的な E2F と RB の制御を外れた E2F

### のリン酸化部位の差の解析

我々は、ウエスタンブロット法における移動度の違いから、RB の機能欠損によって RB の制御を外れて活性化された E2F1 は生理的に活性化された E2F1 に比べ低リン酸化型である可能性を見出した。そこで、両者の間でリン酸化の異なるアミノ酸を同定し、リン酸化部位の違いによって RB の機能欠損を感知している可能性を検討する。そのためにまず、E2F1 のリン酸化を受けうるアミノ酸に順次変異を導入した変異体の発現ベクターを作製する。これを細胞に導入して発現させ、ウエスタンブロット法において、生理的な E2F1 に認められる高リン酸化型が現れなくなるアミノ酸部位を見出す。これが同定されれば、この部位のリン酸化部位特異抗体を作製し、この部位が生理的な E2F1 ではリン酸化されているが、RB の制御を外れて活性化された E2F1 ではリン酸化されていないことを確認する。

同定された E2F1 のリン酸化部位の違いが、本当に増殖関連遺伝子とがん抑制遺伝子の制御の仕分けに関わっているか否かを検討する。そのために、野生型およびリン酸化を受けない変異体 E2F1 の発現ベクターを用いて、増殖関連遺伝子およびがん抑制遺伝子 (ARF 遺伝子など)の活性化能の違いを検討する。また、増殖関連遺伝子およびがん抑制遺伝子プロモーターへの結合能の違いを、クロマチン免疫沈降法を用いて調べる。

### RB の機能欠損に特異的に反応するために必要なプロモーター特性の解析

ARF プロモーターの新たな E2F 反応性エレメントを同定したところ、既に同定済みのエレメントを含めて3個のエレメントに共通して「Sp1 結合配列 + GC 繰り返し配列」が認められた。従って、この配列が RB の機能欠損に特異的に反応するために必要な1つのコンセンサス配列である可能性が考えられる。そこで、この配列が本当に RB の制御を外れた E2F を特異的に反応するか否かを検討する。そのために、純粋にこの構造だけでも配列を人工的に合成し、E2F に反応性の全くない SV40 コアプロモーターに接続して、RB の制御を外れた E2F に対する特異的な反応性を付与できるか否かを検討する。また、人工的に合成したこの構造をもった配列が RB の制御を外れた E2F を特異的に結合するか否かを、ゲルシフト法やクロマチン免疫沈降法などを用いて検討する。

我々は、がん抑制遺伝子 TAp73 のプロモーターが、増殖関連遺伝子に見られる典型的な E2F 結合配列を含むにも関わらず、増殖刺激によって誘導された生理的な E2F には活性化されず、制御を外れた E2F に特異的に活性化されることを見出している。E2F 結合配列の位置は、増殖関連遺伝子の多くで転写開始点近傍 100 塩基以内にあるのに対し、TAp73 プロモーターの場合は、約 300 塩基上

流であった。従って、RB の制御を外れた E2F に特異的に反応するためには、反応性配列に特徴がある以外に、反応性エレメントのプロモーター内での位置に特徴がある可能性が考えられる。そこで、生理的な E2F および RB の制御を外れた E2F に反応するために必要な E2F 反応性エレメントの位置を検索する。そのために、増殖関連遺伝子の代表として Cdc6 および E2F1 プロモーターとがん抑制遺伝子の代表として ARF および TAp73 プロモーターの間で、E2F 反応性エレメントを入れ替えることにより、反応特異性とプロモーター内での E2F 反応性エレメントの位置との関連を明らかにする。

RB の制御を外れた E2F と特異的に相互作用する因子の同定

RB の制御を外れた E2F ががん抑制遺伝子を活性化する時には、生理的な E2F が増殖関連遺伝子を活性化する時とは異なる因子と相互作用する可能性が示唆される。E2F1 の N 端領域の欠損で ARF 遺伝子の活性化が特異的に障害されることから、その際に E2F1 の N 端領域が関わっている可能性が高い。そこで、E2F1 の N 端領域と特異的に相互作用する因子を同定する。そのために、E2F1 の N 端領域を用いて yeast two hybrid system で相互作用する因子を検索する。また、N 端領域に限らず RB の制御を外れた E2F1 と特異的に相互作用する因子を検索するために、タグを付けた E2F1 を過剰発現させて RB の制御を外れた E2F1 を生じさせ、これをタグに対する抗体で免疫沈降して特異的に共沈する因子を検索し、質量解析により同定する。

過剰発現した E2F1 と共沈する因子または E2F1 の N 端と結合する因子が同定されたら、その因子が RB の制御を外れた E2F と特異的に相互作用するか否かを検討する。そのためにまず、その因子が本当に RB の制御を外れた E2F と特異的に結合するか否かを調べる。次に、その因子の発現ベクターを作製して過剰発現させ、増殖刺激または E2F1 の過剰発現による標的遺伝子の活性化を増強するか否かを調べる。逆に、それらの因子を、shRNA を用いてノックダウンし、増殖刺激または E2F1 の過剰発現による標的遺伝子の活性化を抑制するか否かを調べる。

(2) RB の制御を外れた E2F で特異的に活性化される新たな標的遺伝子の同定

RB の制御を外れた E2F は、ARF, p27 などの特異な標的遺伝子に加え、生理的な E2F で活性化される増殖関連遺伝子も活性化する。そこで、RB の制御を外れた E2F によって活性化される遺伝子から、増殖刺激で活性化される遺伝子を差し引くことで、RB の制御を外れた E2F で特異的に活性化される遺伝子を検索する。ヒトの正常な線維芽細胞 HFF を用い、内在性の生理的な E2F 活性を抑制するために、増殖刺激となる血清を除く

ことで休止期に同調する。まず組換えアデノウイルスを用いて E2F1 を過剰発現させる、あるいは RB を強制的に不活性化するアデノウイルス E1a を発現させ、RB の制御を外れた E2F 活性を生じさせ、両者で共通して発現誘導される遺伝子を同定する。次に、休止期の HFF に血清刺激を与えることで、増殖刺激によって誘導された生理的な E2F によって活性化される遺伝子を同定する。前者から後者を差し引くことにより、RB の制御を外れた E2F で特異的に活性化される新たな標的遺伝子を同定する。これらの候補遺伝子が本当に RB の制御を外れた E2F で特異的に活性化されるか否かを RT-PCR で確認する。

RB の制御を外れた E2F で特異的に活性化される新たな標的遺伝子が同定されたら、これらの遺伝子が RB の制御を外れた E2F によって誘導されるアポトーシスまたは細胞周期の停止の誘導に関与しているか否かを検討する。そのために、shRNA を用いてこれらの遺伝子発現をノックダウンし、E2F によって誘導される細胞死または細胞周期の停止が抑制されるか否かを検討する。

#### 4. 研究成果

(1) E2F による RB の機能欠損の感知機構の解析

生理的な E2F と RB の制御を外れた E2F のリン酸化部位の差の解析

E2F1 には、リン酸化されうるアミノ酸(セリン・トレオニン・チロシン)が 70 箇所存在する。それら全ての変異体の発現ベクターを作製した(セリン・トレオニンはアラニンに置換、チロシンはフェニルアラニンに置換)。リン酸化されうるアミノ酸が隣接している場合には、同時に変位に導入した。作製した全ての変異体の発現ベクターをヒト正常線維芽細胞 HFF に導入し、抗 E2F1 抗体を用いてウエスタンブロットを行い、移動度の違いからリン酸化の程度を調べた。その結果、変異により移動度の速くなるアミノ酸部位が 2 箇所同定された。そこで、これらの変異体の転写活性化能が野生型に比べて増強されるか否かを、制御を外れた E2F 活性に特異的に応答する ARF プロモーターを用いたレポーターアッセイで検討した。しかし、転写活性化能の明らかな上昇は認められなかった。従って、これらのリン酸化部位は、ウエスタンブロットにおける移動度には影響するものの、転写活性化能には影響しない部位である可能性が示唆された。

そこで、ウエスタンブロットにおける移動度ではなく、レポーターアッセイを用いた転写活性化能を指標にして、制御を外れた E2F 活性を抑制するキナーゼを検索した。キナーゼの発現ベクターを用いて、E2F1 の過剰発現による ARF プロモーターの活性化を抑制するキナーゼをスクリーニングしたところ、サイクリン D1 と CDK4 を共発現することにより、約 1/3 に抑制されることが明らかとな

った。増殖関連遺伝子である CDC6 のプロモーターの活性化はむしろ増強された。従って、制御を外れた E2F1 が CDK4 によってリン酸化されると生理的な E2F1 に変換される可能性が見出された。そこで現在、上記のリン酸化部位変異体を用いて、CDK4 による転写活性の抑制に関わるリン酸化部位をスクリーニングしている。

RB の機能欠損に特異的に反応するために必要なプロモーター特性の解析

ARF プロモーターに同定された 3 個の E2F 反応性エレメントから導かれたコンセンサス配列「Sp1 結合配列 + GC 繰り返し配列」が、RB の機能欠損に特異的に反応するか否か、HFF を用いたレポーターアッセイで検討した。その結果、「Sp1 結合配列 + GC 繰り返し配列」は、血清刺激には反応せず、E2F1 の過剰発現と RB と結合して不活性化するアデノウイルス E1a で活性化された。従って、この配列が RB の制御を外れた E2F に特異的に反応するコンセンサス配列の 1 つであることが分かった。さらに、Sp1 結合配列または GC 繰り返し配列に変異を導入した変異体の解析から、RB の制御を外れた E2F に反応するためには、Sp1 結合配列は重要ではなく、GC 繰り返し配列が重要であることが分かった。このコンセンサス配列が RB の制御を外れた E2F を特異的に結合するか否かは、クロマチン免疫沈降法を用いて検討中である。

生理的な E2F および RB の制御を外れた E2F に反応するために必要な E2F 反応性エレメントの位置の検索に関しては、増殖関連遺伝子の E2F1 プロモーターとがん抑制遺伝子の ARF プロモーターの間で、E2F 反応性エレメントを入れ替えた変異体を作製中である。

RB の制御を外れた E2F と特異的に相互作用する因子の同定

過剰発現させた E2F1 を免疫沈降し、特異的に共沈する因子を質量解析で検索したところ、DDX5 および DDX17 を始めとする数個の因子が同定された。DDX5 は RNA ヘリカーゼとして同定された因子であるが、近年その活性とは独立して転写因子のコファクターとして機能することが報告されている。そこで、DDX5 および DDX17 の発現ベクターを作製し、E2F1 の過剰発現による ARF プロモーターの活性化を増強するか否かを調べたところ、どちらも活性化が認められ、両者をともに導入するとより大きな増強が認められた。逆に、shRNA を用いて DDX5 をノックダウンしたところ、E2F1 の過剰発現による ARF プロモーターの活性化が抑制された。また、DDX5 の過剰発現は、E2F1 の過剰発現による内在性 ARF 遺伝子の活性化を増強し、shRNA を用いた DDX5 のノックダウンは、E2F1 の過剰発現による内在性

ARF 遺伝子の活性化を抑制した。以上から、制御を外れた E2F1 と協調的に働いて ARF 遺伝子の活性化に関わる新規因子として DDX5 が同定された。

E2F1 の N 端領域を用いて yeast two hybrid system で相互作用する因子を検索したところ、DDX5 を含む 51 個の候補因子が同定された。現在これらの因子の cDNA をクローニングして発現ベクターを作製し、過剰発現した E2F1 による ARF プロモーターの活性化に影響を及ぼすか否か検討中である。

(2) RB の制御を外れた E2F で特異的に活性化される新たな標的遺伝子の同定

ヒトの正常な線維芽細胞 HFF を用い、内在性の生理的な E2F 活性を抑制するために、増殖刺激となる血清を除くことで休止期に同調した。まず組換えアデノウイルスを用いて E2F1 を過剰発現させる、あるいは RB を強制的に不活性化するアデノウイルス E1a を発現させ、RB の制御を外れた E2F 活性を生じさせ、両者で共通して発現誘導される遺伝子を DNA マイクロアレイで検索したところ、3457 個同定された。次に、休止期の HFF に血清刺激を与えることで、増殖刺激によって誘導された生理的な E2F によって活性化される遺伝子を同様に検索したところ、2903 個同定された。前者から後者と共通する遺伝子を差し引くことにより、RB の制御を外れた E2F で特異的に活性化される新たな標的遺伝子を検索したところ、2719 個同定された。これらの候補遺伝子の Gene ontology の情報からがん化抑制ないしアポトーシスに関連のありそうな 11 遺伝子に関して、リアルタイム PCR で確認したところ、RB の制御を外れた E2F で特異的に発現誘導される新規遺伝子が 9 個 (*BIM*, *RASSF1*, *PPP1R13B*, *JMY*, *MOAP1*, *RBM38*, *ABTB1*, *RBBP4*, *RBBP7*) 同定された。

これら 9 個の遺伝子から典型的なアポトーシス関連遺伝子 *BIM* を選び、RB の制御を外れた E2F によって誘導されるアポトーシスの誘導に関与しているか否かを検討した。そのために、shRNA を用いて *BIM* 遺伝子発現をノックダウンしたところ、E2F1 によって誘導されるアポトーシスの抑制が認められた。従って、RB の制御を外れた E2F によって特異的に活性化される新規標的遺伝子で、RB の制御を外れた E2F によって誘導されるアポトーシスに貢献している遺伝子として *BIM* が同定されたと考えられる。

## 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 3 件)

1. Kurayoshi K, Ozono E, Iwanaga R, Bradford AP, Komori H, Ohtani K: Cancer cell specific cytotoxic gene expression

- mediated by ARF tumor suppressor promoter constructs. *Biochem Biophys Res Commun*, 450, 240-246, 2014. 査読有り. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.05.102.
2. Moor K, Ohtani K, Myrzakozha D, Zhanserkenova O, Andriana BB, Sato H.: Noninvasive and label-free determination of virus infected cells by Raman spectroscopy. *J Biomed Opt*, 19, 67003, 2014. 査読有り. doi:10.1117/1.JBO.19.6.067003
  3. Ozono E, Komori H, Iwanaga R, Tanaka T, Sakae T, Kitamura H, Yamaoka S, Ohtani K.: Tumor suppressor *TAp73* gene specifically responds to deregulated E2F activity in human normal fibroblasts. *Genes Cells*, 17, 660-672, 2012. 査読有り. doi:10.1111/j.1365-2443.2012.01617.x.

〔学会発表〕(計 16 件)

1. 神谷侑輝、西谷秀男、大谷清: 転写因子E2F1のN末端領域に対する新規相互作用因子の探索と解析. 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. 藤原裕土、西淵剛平、中山潤一、大谷清: 転写因子 E2F1 の新規相互作用因子 DDX5 と DDX17 の解析. 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)
3. 吉村友作、大谷清: ヒト T 細胞白血病ウイルスのがん遺伝産物 Tax による細胞種特異的細胞周期進行機構の解析. 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)
4. 芳田亮輔、大谷清: E2F パートナー-DP1 の発現制御機構. 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)
5. Ohtani, K.: Deregulated E2F activity: A novel means to discriminate between cancer cells and normal growing cells. PCS Global Cancer Conference-2014, 2014.11.1, Athens, Greece 招待講演
6. 倉吉健太、大谷清: ARF プロモーターは細胞傷害性遺伝子のがん細胞特異的発現に有用である. 第 73 回 日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 27 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
7. 倉吉健太、大谷清: pRBの機能不全によって特異的に活性化されるARFプロモーターは、がん細胞特異的にアプローチに有用である. 第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)
8. 植野武弘、藤澤順一、大谷清: ヒトT細胞白血病ウイルスの転写制御因子Taxによる *cdk7* 遺伝子の発現誘導は、Taxによる細胞周期進行の促進に貢献する. 第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3日、神戸国際

- 会議場(兵庫県・神戸市)
9. 城本あゆみ、大谷清: CDK 活性が pRB の制御を外れた E2F 活性に与える影響の解析. 第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)
  10. 後藤泰子、大谷清: pRB の制御を外れた E2F 活性は E2F パートナー-DP1 の要求性が生理的な E2F 活性より低い. 第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)
  11. 奥野潤子、大谷清: PI3K経路は制御を外れたE2FによるBim遺伝子発現を抑制しない. 第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)
  12. Ohtani, K.: Distinct regulation of tumor suppressor genes by the transcription factor E2F in response to growth stimulation and oncogenic changes. BIT7s 6th Annual World Cancer Congress, 2013.5.24, Xian, China 招待講演
  13. 大園瑛子、山岡昇司、大谷清: PI3キナーゼ経路はpRBの制御を外れたE2Fによる癌抑制遺伝子の活性化を妨げない. 第71回日本癌学会総会、2012年9月19日、ロイトン札幌(北海道・札幌市)
  14. 栄喬大、大園瑛子、西淵剛平、中山潤一、大谷清: 転写因子E2F1の新規相互作用因子の探索と解析. 第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11日、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)
  15. 大園瑛子、山岡昇司、大谷清: RBの制御を外れたE2F1の実体の解析. 第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11日、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)
  16. 田中達也、大園瑛子、大谷清: 細胞運命決定における転写因子E2FのN末端領域の役割. 第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11日、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

〔図書〕(計 1 件)

1. Ozono E, Yamaoka S and Ohtani, K.: To grow, stop or die? - Novel tumor-suppressive mechanism regulated by the transcription factor E2F. in "Future Aspects of Tumor Suppressor Gene", Yue Cheng ed., InTech Open Access Publisher, 27 pages, pp17-43, 2013. ISBN 980-953-307-910-8.

〔産業財産権〕

- 出願状況(計 1 件)
- 名称: がん細胞標的ベクター、がん細胞特異的に目的遺伝子を発現させる方法及びがん細胞特異的に目的遺伝子を発現させるための使用
- 発明者: 大谷 清
- 権利者: 学校法人関西学院

種類：特許  
番号：特願 2014 - 091857  
( PCT/JP2015/059699 )  
出願年月日：2014 年 4 月 25 日  
国内外の別：国内外

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://sci-tech.ksc.kwansei.ac.jp/~ohtani/>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

大谷 清 (OHTANI KIYOSHI)  
関西学院大学・理工学部・教授  
研究者番号：30201974

### (3)連携研究者

中山 潤一 (NAKAYAMA JUN-ICHI)  
名古屋市立大学・システム自然科学研究  
科・准教授  
研究者番号：60373338