

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 2 日現在

機関番号：34504

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06770

研究課題名(和文) がん細胞におけるmRNAの四重鎖形成による転写因子E2F3の発現制御機構

研究課題名(英文) Inhibition of G-quadruplex formation of E2F3 mRNA enhances its expression in cancer cells

研究代表者

荒木 啓吾 (Araki, Keigo)

関西学院大学・理工学部・助教

研究者番号：50756674

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子E2F3は細胞の増殖制御において重要な役割を持つ転写因子であり、多くのがんにおいて「がんの悪性度とE2F3の発現量に相関性がある」ことからがんの悪性度を診断するうえでの分子バイオマーカーとなっている。E2F3遺伝子の翻訳領域には核酸の四重鎖を作るグアニンリッチ領域が含まれているため、本研究ではこのグアニンリッチ領域がE2F3の発現制御に関与しているかを調べた。その結果、正常細胞においてグアニンリッチ領域がE2F3の発現抑制に働いており、この抑制機構はがん細胞において破綻している可能性が示された。このことより、E2F3の発現を制御している新たな分子機構が示された。

研究成果の概要(英文)：E2F3 transcription factor plays a critical role in the control of cellular proliferation. E2F3 is frequently overexpressed in various types of human cancers and considered to be involved in the malignant progression of tumors, especially prostate and bladder cancers. Guanine-rich regions of DNA, which are capable of forming G-quadruplex structures, are included in coding sequence of E2F3 and we examined whether these regions participate in the regulation of E2F3 expression. We found that these guanine-rich regions contribute to suppression of E2F3 expression in normal cells and this suppression mechanism is impaired in cancer cells. These results suggest the possibility that G-quadruplex formation of E2F3 mRNA inhibits its expression in normal cells and this G-quadruplex formation is disrupted in cancer cells. In this study, we revealed a new molecular mechanism for the regulation of E2F3 expression.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：癌 転写因子E2F3 発現制御機構 転写 グアニン四重鎖

1. 研究開始当初の背景

がん細胞では p53 や Rb などのがん抑制因子の発現が低下している。逆に、転写因子 E2F ファミリーや Myc などの細胞増殖促進因子の発現は上昇している。それゆえ、がん関連遺伝子の発現制御機構はがん研究において非常に重要な意味を持ち、タンパク質分解などタンパク質の安定性に関する研究やプロモーターによる転写レベルでの発現制御に関する研究が行われている。

原核細胞の新生 mRNA において自分自身に相補的な配列が含まれている場合、その領域でヘアピン構造をつくり、その高次構造が転写を停止させるシグナルになる。核酸の標準構造は二重鎖構造であるが、化学的な環境の変化に応じて三重鎖や四重鎖、ジャンクションといった非標準構造を形成する。近年になり「核酸の四重鎖形成が DNA 複製の進行に影響を与える」ことが真核細胞において示され、核酸の非標準構造の形成は真核細胞においても遺伝子の転写をプロモーター活性とは異なるレベルで制御している新たな分子機構になる可能性が考えられた。

E2F3 は E2F ファミリーの中でもとりわけ細胞増殖において重要な因子であり、前立腺がんや膀胱がんにおいて悪性度とその発現量に正の相関関係があることから、がんの悪性度を診断するうえでの分子バイオマーカーとなっている。研究代表者は「核酸の非標準構造の形成により E2F3 の転写・発現が制御されているのではないかと考え、この新しい遺伝子発現制御機構をがん研究に取り込むことを発想した。

2. 研究の目的

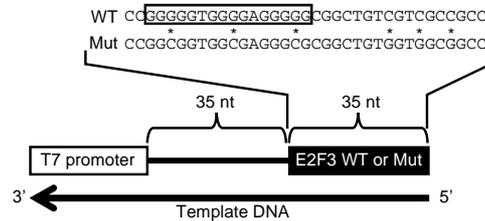
核酸の標準構造は二重鎖構造であるが、化学的な環境変化に応じて三重鎖や四重鎖といった非標準構造を形成する。研究代表者は「転写された mRNA が四重鎖を形成すると転写を停止させるシグナルになる」と考え、真核細胞においても核酸の非標準構造の形成が新たな遺伝子発現制御機構になると考えた。

E2F3 遺伝子には核酸の非標準構造のひとつである四重鎖を形成し得るグアニン残基に富んだ領域が含まれているため、本研究では「mRNA の四重鎖形成を介した E2F3 の転写制御機構の解明」を目的とした。また、「がん性変化によって生じた変化がこの新たな発現制御機構にあたえる影響」を明らかにすることを目的とした。

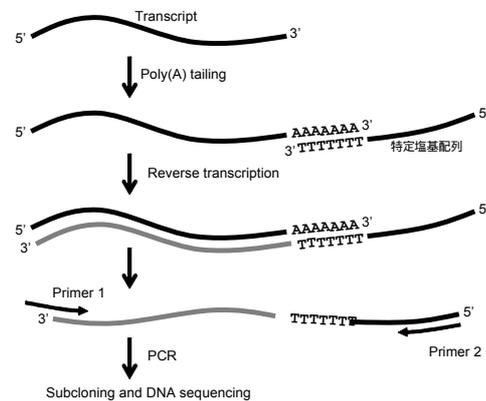
3. 研究の方法

(1) E2F3 のグアニン残基に富んだ領域で転写が終結するかを調べるため、E2F3 のグアニンリッチ領域に対応する領域を T7 プロモーターの下流に繋いだ鋳型 DNA を作製し、in vitro 転写系で産生された転写産物の長さを

測定した(下図参照)。



実際にグアニンリッチ領域において E2F3 の転写が停止しているのかを解析するため、転写産物の 3' 末端に Poly(A) を付加した後、特定の配列 (GTATCAACGCAGAGTA) を含んだオリゴdT プライマーを用いて逆転写を行い、その特定配列と E2F3 に特異的なプライマーを用いて E2F3 転写産物を PCR で増幅した。その後、サブクローニングを行い、塩基配列を DNA シークエンシングにより解析した。さらに、E2F3 のグアニンリッチ領域に対応する領域に変異を入れた鋳型 DNA に関しても同様に in vitro 転写系で解析した(下図参照)。



(2) 正常細胞 (Human Foreskin Fibroblasts; HFF) にアデノウイルス E1A を導入して Rb の機能を抑制し、がん性変化を誘導したときの内在性 E2F3 の発現量を qRT-PCR 法及びウエスタンブロッティング法で比較した。さらに、E2F3 のプロモーターを含んだレポータープラスミドを用いて、アデノウイルス E1A 導入時のレポーターアッセイを行った。次に、native プロモーターで発現が制御されていない外来性の E2F3 を HFF に導入し、さらにアデノウイルス E1A を導入したときの外来性 E2F3 の発現量をウエスタンブロッティング法で比較した。

(3) E2F3 のグアニンリッチ領域のグアニンを翻訳後のアミノ酸配列が変わらないように出来るだけシトシンに置き換えた (CCGGGGGTGGGGAGGGGGCGGCTGTGCTGCGCCGCC を CCGGC GGTGGCGAGGGCGCGGCTGTGTTGGCGGCC に置換) サイレント変異型 E2F3 発現プラスミドを作製した。野生型及びサイレント変異型 E2F3 発現プラスミドを HFF と膀胱がん細胞 (5637 細胞) に導入して発現量をウエスタンブロッティング法で比較した。

(4) グアニンリッチ領域による E2F3 の発現制御機構が核酸の四重鎖形成によるものなのかを検証するため、研究協力者が作製した核酸の四重鎖を認識する抗体 (BG4 抗体) を用いて、HFF とアデノウイルス E1A でがん性変化を誘導した HFF において免疫染色を行った。BG4 抗体のシグナル強度を比較することで、正常細胞とがん性変化を起こした細胞における核酸の四重鎖形成の度合いを評価した。

4. 研究成果

(1) In vitro 転写系において、E2F3 遺伝子のグアニンリッチ領域に対応する領域を鋳型 DNA として用いた場合は転写産物の長さが鋳型 DNA 全長に比べて短くなっていた。転写産物の塩基配列を DNA シークエンシングにより解析した結果、転写の終結点はグアニンリッチ領域付近だった。一方、E2F3 遺伝子のグアニンリッチ領域に対応する領域に変異を入れた鋳型 DNA では転写が最後まで進んだ。これより、in vitro 転写系において E2F3 遺伝子のグアニンリッチ領域が転写終結のシグナルとなる可能性が考えられた。

(2) HFF にアデノウイルス E1A を導入すると内在性 E2F3 の発現量が mRNA レベル及びタンパク質レベルで増加した。E2F3 のプロモーターを用いてレポーターアッセイをした結果、アデノウイルス E1A を導入することで E2F3 のプロモーター活性が約 17 倍活性化された。また、E2F3 遺伝子を外来性に導入した場合でも、アデノウイルス E1A によって外来性 E2F3 の発現が上昇した。このことより、がん性変化によってプロモーター依存的及び非依存的に E2F3 の発現を上昇させる機構があることが明らかになった。

(3) 5637 細胞においては野生型とサイレント変異型 E2F3 の発現量に差は見られなかったが、HFF においては野生型に比べてサイレント変異型 E2F3 の発現量がわずかではあるが高かった。このことより正常細胞において野生型 E2F3 のグアニンリッチ領域が発現抑制に働いており、その発現抑制機構はがん細胞において破綻していると考えられた。

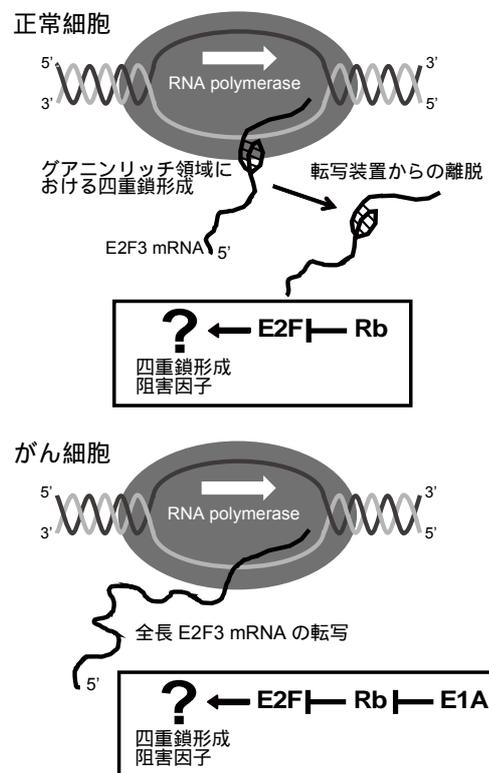
E2F3 のグアニンリッチ領域による発現抑制機構ががん細胞で破綻している理由として、がん細胞で発現が高くなっている E2F 標的遺伝子の中にグアニンリッチ領域による発現抑制効果を阻害する因子が含まれている可能性が考えられた。

(4) がん化した細胞では mRNA の四重鎖形成が抑制され、そのことががん細胞における E2F3 の発現上昇に関わっていると予想したが、BG4 抗体のシグナルはがん性変化を誘導した HFF の方が高かった。

E2F3 の mRNA の総量はがん性変化を誘導す

ることで約 6 倍増加していた。四重鎖を形成している E2F3 mRNA の量を定量解析し、「四重鎖を形成している E2F3 mRNA の量を E2F3 mRNA の総量で割る」ことで、「四重鎖を形成している mRNA の絶対量」ではなく、「mRNA の総量に対する四重鎖を形成している mRNA の割合」として比較・検討する必要性が考えられた。

E2F3 のグアニンリッチ領域において核酸の四重鎖が形成されているという直接の証拠を得ることは出来なかったが、細胞内においてもグアニンリッチ領域が発現制御に関わっており、この発現制御機構ががん化のシグナルによって影響を受けている可能性が示唆された(下図参照)。



野生型とサイレント変異型 E2F3 発現プラスミドを正常細胞に導入して発現量を比べた時、サイレント変異型 E2F3 の発現量が野生型 E2F3 の発現量に比べて高かったが、その差は顕著ではなかった。その理由として、E2F3 が発現することで核酸の四重鎖形成を阻害する因子が発現誘導されたため、野生型 E2F3 のグアニンリッチ領域による発現抑制効果が減弱したためと考えられる。正常細胞に活性化型 Rb を発現させ、E2F 標的遺伝子の発現が誘導されない条件下で野生型とサイレント変異型 E2F3 の発現解析を行う必要性が考えられる。

今後の研究により四重鎖を形成している E2F3 を特異的に検出・定量する方法の開発及びグアニンリッチ領域による発現抑制機構を制御する因子 (核酸の四重鎖形成に影響を与える因子) の同定が重要だと考えられる。

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 4件)

Kenta Kurayoshi, Ayumi Shiromoto, Eiko Ozono, Ritsuko Iwanaga, Andrew P. Bradford, Keigo Araki, Kiyoshi Ohtani
Ectopic expression of the CDK inhibitor p21Cip1 enhances deregulated E2F activity and increases cancer cell-specific cytotoxic gene expression mediated by the ARF tumor suppressor promoter
Biochem Biophys Res Commun. 査読有
2017; 483(1): pp107-114.

Kenta Kurayoshi, Junko Okuno, Eiko Ozono, Ritsuko Iwanaga, Andrew P. Bradford, Kazuyuki Kugawa, Keigo Araki, Kiyoshi Ohtani
The phosphatidylinositol 3 kinase pathway does not suppress activation of the ARF and BIM genes by deregulated E2F1 activity
Biochem Biophys Res Commun. 査読有
2017; 482(4): pp784-790

Masahiko Okuda, Keigo Araki, Kiyoshi Ohtani, Yoshifumi Nishimura
The Interaction Mode of the Acidic Region of the Cell Cycle Transcription Factor DP1 with TFIIH
J Mol Biol. 査読有
2016; 428(24): pp4993-5006

Zhihai Zhao, Song Hui Tan, Hiroaki Machiyama, Keiko Kawauchi, Keigo Araki, Hiroaki Hirata, Yasuhiro Sawada
Association between tensin 1 and p130Cas at focal adhesions links actin inward flux to cell migration
Biol Open. 査読有
2016; 5(4): pp499-506

[学会発表](計 2件)

荒木 啓吾、芳田 亮輔、大谷 清
題名：転写因子 E2F の新たなメンバーである E2F3d はミトコンドリアに局在する
学会名：第 39 回日本分子生物学会年会 (ポスター発表)
場所：パシフィコ横浜・神奈川県横浜市
年月：2016 年 12 月 2 日

荒木 啓吾、服部 拓、行本 愛、川内 敬子、大谷 清
題名：アデノウイルス E1a による転写因子 E2F3 の新たな発現調節機構
学会名：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 (ポスター発表)

場所：神戸ポートアイランド・兵庫県神戸市
年月：2015 年 12 月 2 日

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[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

荒木 啓吾 (ARAKI KEIGO)
関西学院大学・理工学部・助教
研究者番号：50756674

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

川内 敬子 (KAWAUCHI KEIKO)
甲南大学・フロンティアサイエンス学部・講師

建石 寿枝 (TATEISHI HISAE)
甲南大学・先端生命工学研究所・講師