

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：34504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06957

研究課題名(和文) 転写因子E2Fによる細胞増殖とがん化抑制の仕分け機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of E2F regulation of cell proliferation and tumor suppression

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) 3,800,000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による、増殖関連遺伝子とがん抑制遺伝子の仕分け機構を解析した。がん化抑制に主役を担うE2F1のリン酸化の違いによる可能性を考え、リン酸化されるアミノ酸65箇所全ての変異体を作成し、活性化能の違いを調べた。しかし、明らかな違いを生じる部位は同定されなかった。相互作用因子の違いの可能性を考え、E2F1の新規相互作用因子を共免疫沈降およびYeast two-hybrid法で検索した。それぞれ、3個および20個の候補因子が同定された。それら因子を解析し、E2F1によるがん抑制遺伝子の活性化を増強する因子としてDDX5, WDR1, GTF2H2を同定した。

研究成果の概要(英文)：We examined the molecular mechanism of how the transcription factor E2F, the principal target of the tumor suppressor RB, discriminates between growth-related genes and tumor suppressor genes. We examined the possibility of differential phosphorylation of E2F1, which plays major roles in tumor suppression, by generating mutants of 65 sites that could be phosphorylated. No mutants showed differential ability to activate tumor suppressor genes. We thought of the possibility that different cofactors contribute to activation of growth-related genes and tumor suppressor genes. We explored novel factors, which interacts with E2F1 by co-immunoprecipitation and yeast two-hybrid system. These screening gave 3 and 20 candidates, respectively. We analyzed these factors and found that DDX5, WDR1 and GTF2H2 enhance E2F1 activation of tumor suppressor genes.

研究分野：分子生物学

キーワード：E2F RB ARF p53 がん化抑制 細胞増殖 がん抑制遺伝子

1. 研究開始当初の背景

転写因子 E2F は、代表的ながん抑制因子 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 RB の制御を外れて活性化されて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 自身の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)。がん抑制遺伝子産物 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。

報告者は、がん抑制遺伝子 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、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) (図 1)。

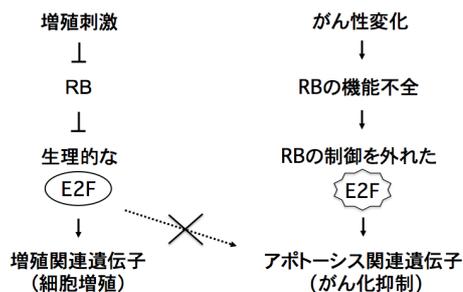


図 1. E2F は細胞増殖とがん化抑制を仕分ける

このことから E2F は、増殖刺激による RB の生理的な不活性化とがん化に関わる RB の機能欠損とを識別し、増殖関連遺伝子とがん抑制遺伝子の発現を仕分けていると予想される (図 1)。しかし、E2F が RB の機能欠損を特異的に感知する機構および相反する作用をもつ標的の発現を仕分ける機構は明らかにされていない。

E2F は 8 つのファミリーメンバーからなるが、そのうちで E2F1 が最もアポトーシス誘導能が強く、E2F によるがん化抑制に最も重要と考えられている。そこで報告者は、E2F1 を代表として解析を行った。その結果、脱リン酸化処理を併用したウェスタンブロットにおける E2F1 の移動度の違いから、増殖刺

激によって誘導された生理的な E2F1 は高度にリン酸化されており、制御を外れた E2F1 活性を生じさせると低リン酸化型の E2F1 分子が現れることを見出した。また、制御を外れた E2F 活性に特異的に反応する ARF プロモーターを用いたレポーターアッセイにより、サイクリン D1/CDK4 を過剰発現させると、E2F1 の過剰発現によって生じた RB の制御を外れた E2F1 活性が顕著に抑制されることを見出した (図 2)。

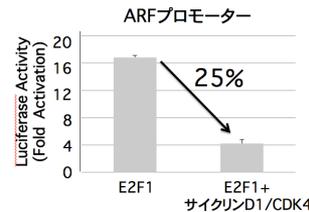


図 2. サイクリン D1/CDK4 は制御を外れた E2F 活性を抑制する

これらのことから、生理的な E2F1 と RB の制御を外れた E2F1 にはリン酸化の違いがあること、さらにこのリン酸化の違いに CDK が関与している可能性が強く示唆される。

更に報告者は、E2F ファミリーメンバーの N 末端領域の役割を探った実験から、E2F1 の N 末端領域の欠失変異体は ARF 遺伝子の活性化能が顕著に低下するのに対し、増殖関連遺伝子の活性化能の強い E2F3a の N 末端領域の欠失変異体は ARF 遺伝子の活性化能が逆に増強することを見出した (図 3)。

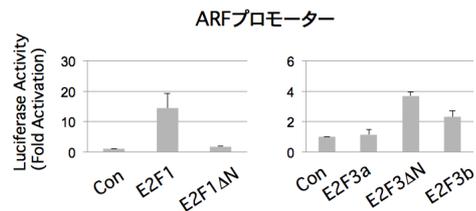


図 3. E2F1 の N 末端領域は ARF プロモーターの活性化に、E2F3a の N 末端領域は抑制に貢献している

これらの欠失変異体は DNA 結合領域や転写活性化領域は保持しているため、標的遺伝子の活性化にその N 末端領域と特異的に相互作用する因子が存在する可能性が示唆される。

以上のことを総合的に考え合わせると、RB の機能不全が生じると低リン酸化型の E2F1 が生じ、増殖関連遺伝子を活性化するとき (X) とは異なった因子 (Y) と相互作用することにより、がん抑制遺伝子を特異的に活性化する可能性が強く示唆される (図 4)。

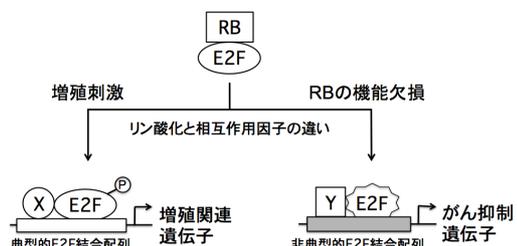


図 4. 生理的な E2F と制御を外れた E2F はリン酸化と相互作用因子が違う

2. 研究の目的

本研究は、E2F によるがん化抑制機構の理解を深めるために、E2F1 によるがん抑制遺伝子 *ARF* 活性化に関わるリン酸化部位と相互作用因子を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 生理的な E2F1 と RB の制御を外れた E2F1 のリン酸化部位の違いの解明

サイクリン D1/CDK4 を過剰発現させると、E2F1 の過剰発現による *ARF* プロモーターの活性化が顕著に抑制される。この系を用いて、*ARF* プロモーターの活性化に関わる E2F1 のリン酸化部位を同定することが可能であると期待される。E2F1 のリン酸化を受けうるアミノ酸を、リン酸化を受けないアミノ酸や擬似リン酸化アミノ酸に置換した変異体を作製・スクリーニングすることにより、この違いに関わるアミノ酸部位を推定し、さらにリン酸化部位特異抗体を作製して確定する。

(2) RB の制御を外れた E2F1 と特異的に相互作用する因子の同定

E2F1 と共免疫沈降する因子を質量解析によって検索したところ、3 個の候補因子を同定している。また、yeast two-hybrid 法を用いて E2F1 の N 末端領域と相互作用する因子をスクリーニングした結果、52 個の候補因子を同定している。そこで、これらの因子の E2F1 によるがん抑制遺伝子や増殖関連遺伝子のプロモーター活性化に及ぼす影響や共免疫沈降を用いた E2F1 との相互作用を解析することにより、RB の制御を外れた E2F1 と特異的に相互作用する因子を同定する。

4. 研究成果

(1) 生理的な E2F1 と RB の制御を外れた E2F1 のリン酸化部位の違いの解明

図 2 に示したように、*ARF* レポータープラスミドを野生型 E2F1 の発現ベクターとともに導入すると *ARF* プロモーターは顕著に活性化されるが、そこに同時にサイクリン D1/CDK4 の発現ベクターを導入すると、野生型 E2F1 による *ARF* プロモーターの活性化は約 25% に抑制される。この系を利用して、E2F1 のリン酸化を受けうるアミノ酸を、リン酸化を受けないアミノ酸に置換した変異体を作製し、その過剰発現による *ARF* プロモーターの活性化がサイクリン D1/CDK4 の過剰発現によって抑制を受けにくくなる変異体をスクリーニングした。この変異体で変異が導入されている部位がサイクリン D1/CDK4 によってリン酸化されると *ARF* プロモーターの活性化能が減弱する部位であると予想される。CDK はセリン・トレオニンキナーゼであるため、E2F1 に 65 箇所存在するセリンまたはトレオニンをそれぞれアラニンに置換した変異体を作成した。これらを全て、上記のアッセイ系でスクリーニングした。結果、サイクリン D1/CDK4 によって

活性化能の減弱が認められる変異体が数個見出された。しかし、ベースの活性化の程度が異なっていたため、発現ベクターの量を振って同じ活性化の程度における抑制度合いを調べたところ、野生型と比べて減弱する変異体は見出されなかった。また、変異部位が DNA 結合領域に含まれる変異体は、恐らく DNA に結合できなくなるため活性化能が失われ、サイクリン D1/CDK4 による抑制を調べる事が出来なかった。以上から、DNA 結合領域のリン酸化は否定できないが、それ以外の領域のリン酸化による可能性は否定的と考えられた。このことは、サイクリン D1/CDK4 による抑制作用が、E2F1 自身のリン酸化によるものではない可能性を示唆しており、今後 E2F1 と相互作用する因子のリン酸化の可能性や E2F1 の局在に及ぼす影響などを検討していく必要性が考えられる。

(2) RB の制御を外れた E2F1 と特異的に相互作用する因子の同定

E2F1 と共免疫沈降する因子を質量解析によって検索したところ、3 個の候補因子を同定していた。これらの発現ベクターを作成し、レポーターアッセイによって、E2F1 による *ARF* プロモーターの活性化に及ぼす影響を検討したところ、それらのうちの 1 つ DDX5 に増強作用が見出された。そこで、DDX5 を発現する組換えアデノウイルスを作成し、E2F1 による内在性 *ARF* 遺伝子の発現誘導に及ぼす影響を検討したところ、同様に増強作用が確認された。逆に DDX5 に対する shRNA の発現ベクターを作成して、DDX5 のノックダウンが E2F1 による *ARF* 遺伝子の活性化に及ぼす影響を検討したところ、レポーターアッセイにおいても内在性遺伝子発現においても抑制が認められた。従って、E2F1 による *ARF* 遺伝子の活性化に関与する相互作用因子として DDX5 が同定された。

一方、yeast two-hybrid 法を用いて E2F1 の N 末端領域と相互作用する因子をスクリーニングした結果、52 個の候補因子が同定されていた。このスクリーニングにおいて、擬陽性を除く操作がまだ行われていなかったため、まず全ての候補因子に対して擬陽性を除く操作を行った。その結果、真に陽性の候補 20 個が同定された。これらの因子に関する既知の情報から、可能性の高いものから順次発現ベクターを作成し、上記と同様にして E2F1 による *ARF* 遺伝子の活性化に及ぼす影響を検討している。現在までのところ、WDR1 がレポーターアッセイおよび内在性遺伝子発現において、E2F1 による *ARF* 遺伝子の活性化を増強することが見出されている。また、GTF2H2 がレポーターアッセイにおいて、E2F1 による *ARF* プロモーターの活性化を増強することが見出されている。したがって、この 2 つの因子は E2F1 による *ARF* 遺伝子の活性化を増強する新たな相互作用因子である可能性が高い。引き続き、物理的な相互作用やこれらの因子のノックダウン

が E2F1 による *ARF* 遺伝子の活性化を減弱させるか、などを検討していく予定である。

これらの因子と E2F1 の N 末端領域が物理的に相互作用するか否かを mammalian two-hybrid 法で検討したところ、意外なことに E2F1 の N 末端領域単独で転写活性化能があることが明らかとなった。これまで E2F1 の転写活性化領域は C 末端領域にしか同定されていなかったため、N 末端領域に新たな転写活性化領域を同定したことになる。上記相互作用因子候補 GTF2H2 は基本転写因子の 1 つであるため、E2F1 の N 末端領域が基本転写因子と相互作用して転写活性化している可能性が示唆される。

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 6 件)

1. Komori, H., Goto, Y., Kurayoshi, K., Ozono, E, Iwanaga, R., Bradford, P., Araki, K. and Ohtani, K.: Differential requirement for dimerization partner DP between E2F-dependent activation of tumor suppressor and growth-related genes. *Scientific Reports*, in press (査読有り)

2. Kurayoshi K, Shiromoto A, Ozono E, Iwanaga R, Bradford AP, Araki K and Ohtani K: Ectopic expression of CDK inhibitor p21^{Cip1} upregulates deregulated E2F activity and enhances cancer cell-specific cytotoxic gene expression mediated by ARF tumor suppressor promoter. *Biochem Biophys Res Commun*, 483, 107-114, 2017.
doi: 10.1016/j.bbrc.2016.12.185. (査読有り)

3. Kurayoshi K, Okuno J, Ozono E, Iwanaga R, Bradford AP, Kugawa K, Araki K, Ohtani K: The phosphatidylinositol 3 kinase pathway does not suppress activation of the *ARF* and *BIM* genes by deregulated E2F1 activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 482, 784-790, 2017.
doi: 10.1016/j.bbrc.2016.11.111. (査読有り)

4. Eiko Ozono, Andrew P. Bradford, Ritsuko Iwanaga, Kenta Kurayoshi, Keigo Araki and Kiyoshi Ohtani: Deregulated E2F activity: Novel targets and therapeutic potential in cancer treatment. *International Biology Review*, No.3, 2016 (KEI Journals) (査読有り)

5. Okuda M, Araki K, Ohtani K, Nishimura Y: The interaction mode of the acidic region of the cell cycle transcription factor DP1

with TFIID. *J Mol Biol*. 428, 4993-5006, 2016.

doi: 10.1016/j.jmb.2016.11.001. (査読有り)

6. Kitamura H, Ozono E, Iwanaga R, Bradford AP, Okuno J, Shimizu E, Kurayoshi K, Kugawa K, Toh H, Ohtani K.: Identification of novel target genes specifically activated by deregulated E2F in human normal fibroblasts. *Genes Cells*. 20, 739-757, 2015.

doi: 10.1111/gtc.12268. (査読有り)

[学会発表](計 14 件)

1. 服部拓、荒木啓吾、大谷清: アデノウイルス E1A による転写因子 E2F3 の新しい発現制御機構、第 40 回日本分子生物学会年会、2017 年 12 月 7 日、神戸

2. 荒木啓吾、大谷清: 新しい E2F ファミリーメンバーである E2F3d はミトコンドリアに局在し、マイトファジーを誘導する、第 40 回日本分子生物学会年会、2017 年 12 月 7 日、神戸

3. 尾田衡弥、荒木啓吾、大谷清: がん抑制遺伝子発現制御における活性化型 E2F の N 末端領域の役割、第 40 回日本分子生物学会年会、2017 年 12 月 6 日、神戸

4. 根岸泰明、荒木啓吾、西谷秀男、大谷清: 転写因子 E2F1 の N 末端領域に対する相互作用因子 WDR1 の機能解析、第 40 回日本分子生物学会年会、2017 年 12 月 6 日、神戸

5. 津田大輔、倉吉健太、荒木啓吾、大谷清: サイクリン依存性キナーゼによる制御を外れた E2F 活性抑制機構の解析、第 40 回日本分子生物学会年会、2017 年 12 月 6 日、神戸

6. 倉吉健太、大谷清: p21^{Cip1} は E2F 活性を増強することによりがん細胞特異的にアポトーシスを誘導する、第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年 9 月 30 日、横浜

7. 荒木啓吾、芳田亮輔、大谷清: 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。第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月 2 日、神戸

8. 倉吉健太、大谷清: Utility of an artificial promoter, ERE73s-ARF core, for driving suicide gene expression specifically in cancer cells. 第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年 10 月 8 日、横浜

9. 倉吉健太、大谷清: DDX5 promotes ARF gene expression and apoptosis induced by deregulated E2F1. 第 100 回米国がん学会年会、2016 年 4 月 18 日、ニューオーリンズ

10. 好川翔平、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 CARM1 遺伝子の発現誘導は、Tax による標的遺伝子発現と細胞周期進行に貢献する。第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 3 日、神戸

11. 脇田かおり、大谷清：転写因子 E2F1 の ARF プロモーター活性化能に関わるリン酸化部位の検索。第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 3 日、神戸

12. 芳田亮輔、西淵剛平、中山潤一、大谷清：DDX5 は pRB の制御を外れた転写因子 E2F1 の転写活性化能を増強する。第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 3 日、神戸

13. 倉吉健太、大谷清：PI3K 経路は制御を外れた E2F1 による Bim および ARF 遺伝子の発現誘導を抑制しない。第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 1 日、神戸

14. 倉吉健太、大谷清：PI3K 経路は E2F による Bim と ARF 遺伝子の発現誘導を阻害しない。第 74 回 日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 10 日、名古屋

〔図書〕(計 1 件)

1. Kenta Kurayoshi, Eiko Ozono, Ritsuko Iwanaga, Andrew P. Bradford, Hideyuki Komori, Keigo Araki and Kiyoshi Ohtani: The key role of E2F in tumor suppression through specific regulation of tumor suppressor genes in response to oncogenic changes. in "Gene Expression and Regulation in Mammalian Cells - Transcription Toward the Establishment of Novel Therapeutics", Allan Sebata ed., InTech Open Access Publisher, pp17-43, 2018.2.28
ISBN: 978-953-51-3868-6

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