

2018年度 海外留学補助金交付対象研究に関する研究経過・成果報告書

## 転写因子 E2F 活性レポーターの開発と細胞増殖制御機構の解明

Tobias Meyer Lab, Department of Chemical and Systems Biology,

School of Medicine, Stanford University

小長谷有美

### 1、背景

正しく細胞増殖を行うため、様々な細胞周期関連分子のはたらきによって細胞周期は厳密に制されている。その中でも E2F は細胞周期の進行に伴う遺伝子発現に特に重要な転写因子である[1]。G1 期に Cyclin/Cyclin dependent kinase (CDK)複合体によって Rb がリン酸化されると、Rb と結合していた E2F が遊離する。このようにして活性化された E2F は、S 期の進行や DNA 複製に必要な遺伝子群の発現を誘導する。そして S 期に移行したのち E2F の転写活性は抑制される。E2F 転写制御の破綻はがんの発生や胚発生異常につながるということが知られている。しかし、細胞周期進行に伴って転写活性の変化する E2F がどのように細胞増殖を制御しているのかは未詳である。

### 2、目的

転写因子 E2F 活性レポーターを開発し、E2F が細胞増殖をどのように制御しているのか調べることを目的とした。

### 3、方法

#### 1) E2F 活性レポーターのプロモーター領域の選定

過去に当研究室で行われた RNA-seq のデータセットを用いて、E2F 活性レポーターに適切なプロモーター領域をもつ遺伝子の候補を選定し、候補遺伝子の mRNA 発現量を RT-qPCR により検討した。続いてこれら遺伝子のプロモーター領域をもつレポーターを MCF10A 細胞に導入し、増殖因子に対する応答性および CDK4/6 阻害剤に対する感受性を調べた。

## 2) E2F 活性レポーターの特異性検証

E2F 活性レポーターを導入した MCF10A 細胞を血清飢餓状態においたのち、増殖因子に対する応答をライブイメージングにより調べ、Rb のリン酸化を免疫染色により検討した。なおライブイメージング画像と免疫染色画像を照らし合わせることで同一細胞内の E2F 活性レポーターの挙動と Rb のリン酸化を比較した。

## 3) 細胞増殖における E2F の役割の解析

2) と同様に E2F 活性レポーターを導入した MCF10A 細胞のライブイメージングにより、G1 期から S/G2 期における E2F 活性の変化や細胞周期の長さ、また娘細胞の E2F 活性を検討した。

# 4、結果

## 1) E2F 活性レポーターのプロモーター領域の選定

CDK4/6 阻害剤により発現量が抑制された上位 11 の遺伝子を選定した。増殖因子刺激から 14 時間後、これら 11 遺伝子の mRNA 発現量はどれも CDK4/6 阻害剤により抑制された。さらにこれら遺伝子のプロモーター領域を組み込んだレポーターの結果から、増殖因子に対する応答性および CDK4/6 阻害剤に対する感受性が最も顕著にみられた 3 候補に絞り込んだ。

## 2) E2F 活性レポーターの特異性検証

1) で選定した候補のうち 2 種類のレポーターについて、Rb のリン酸化された細胞特異的にレポーターシグナルの増加を認めた。これら 2 種類のレポーターのうち、シグナルノイズ比の優れた方を最終的に E2F 活性レポーターとした。

## 3) 細胞増殖における E2F の役割の解析

E2F は G1 期に活性化され S/G2 期に抑制されたが、S/G2 期における E2F 活性の抑制の程度は細胞ごとにばらつきが見られた。細胞ごとの動態を解析したところ、S/G2 期における E2F 活性の抑制と DNA 損傷との間には正の相関があることが示唆された。また S/G2 期における E2F 活性が大きく抑制された細胞ほど S/G2 期が長いことを見出した。さらに S/G2 期における E2F 活性が大きく抑制された母細胞ほど、娘細胞の E2F 活性も抑制される傾向が認められた。

#### 4、まとめと考察

本研究では特異性と感受性に優れた E2F 活性レポーターを開発した。この E2F 活性レポーターを用いた解析結果から、DNA 損傷に応答して S/G2 期の E2F 活性が抑制されることで、細胞増殖が抑制されることが明らかとなった。E2F 転写制御の破綻はがんの発生につながることから、E2F 活性を抑制する分子機構はがん細胞に対する治療標的となり得る。

最近、SCF ユビキチンリガーゼの基質認識サブユニットである F box タンパク質 Cyclin F が E2F 活性を抑制することが相次いで報告された[2][3][4]。そこで Cyclin F により S/G2 期における E2F 活性がどの程度抑制されるのか、S/G2 期の長さによどのような影響を与えるのかを検討したいと考えている。また DNA 損傷に応じた Cyclin F の発現量、E2F 活性の解析も今後の課題である。さらに母細胞の S/G2 期における E2F 活性の抑制がなぜ娘細胞の E2F 活性抑制につながるのかを明らかにすべく、母細胞から娘細胞へ引き継がれるサイクリンやサイクリン依存性キナーゼ阻害因子の発現量、半減期等を調べる必要がある。

#### 5、参考文献

- [1] L. N. Kent and G. Leone, “The broken cycle: E2F dysfunction in cancer,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 19, no. 6, pp. 326–338, 2019.
- [2] L. Clijsters *et al.*, “Cyclin F Controls Cell-Cycle Transcriptional Outputs by Directing the Degradation of the Three Activator E2Fs,” *Mol. Cell*, vol. 74, no. 6, pp. 1264-1277.e7, 2019.
- [3] K. Burdova *et al.*, “E2F1 proteolysis via SCF - cyclin F underlies synthetic lethality between cyclin F loss and Chk1 inhibition,” *EMBO J.*, vol. 38, no. 20, pp. 1–18, 2019.
- [4] R. Yuan *et al.*, “Cyclin F - dependent degradation of E2F7 is critical for DNA repair and G2 - phase progression,” *EMBO J.*, vol. 38, no. 20, pp. 1–14, 2019.