

200500738A

厚生労働科学研究研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

転写因子E2Fによる癌レギュローム解析から
抗がん剤の安全性予測へ向けた研究開発

平成17年度 総括研究報告書

主任研究者 吉田 健一

平成18(2006)年 4月

目 次

I. 総括研究報告

転写因子E2Fによる癌レギュローム解析から抗がん剤の安全性予測へ向けた研究開発
----- 1

吉田健一

(資料) 網羅的発現解析により同定された転写因子E2Fファミリーの標的遺伝子群

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 17

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 18

(萌芽的先端医療技術推進研究事業)

総括研究報告書

転写因子E2Fによる癌レギュローム解析から抗がん剤の安全性予測へ向けた研究開発

主任研究者 吉田 健一 明治大学農学部 専任講師

研究要旨

抗がん剤により細胞が受ける様々な応答、特に細胞周期停止やDNA修復、あるいは細胞死などを遺伝子レベルで簡便に予測出来れば、抗増殖活性を有する新規化合物による細胞傷害を含めた副作用を検知可能となる。DNAおよび細胞の傷害は癌抑制遺伝子p53に集約され、その下流に位置するp21はG1期からS期への移行において必須であるG1/Sサイクリン-サイクリン依存性キナーゼ活性を阻害する。結果、癌抑制遺伝子pRbはリン酸化されず転写因子E2Fファミリーの機能は不活性のままとなる。一方、最近の報告からDNAダメージがp53とは独立に直接E2F1をリン酸化あるいはアセチル化することでその機能を亢進する事が知られている。結果、E2F1はアポトーシスを誘導する。この様に転写因子E2Fは細胞増殖と運命決定に重要であり、一般的にE2F1-3が転写因子として活性型なのに対し、E2F4-6は抑制型であることが知られている。我々はこれまでの研究から、E2F標的遺伝子のプロモーターに対するE2F1とE2F4の結合が、細胞に対する紫外線照射や抗がん剤投与で変化することを解明した。

本研究ではヒト細胞に抗がん作用を有する化合物を投与した結果、細胞が示す応答性とE2F標的遺伝子プロモーター上でのE2F1とE2F4のアフィニティーとのパラメトリックな関係を網羅的に解析することで、化合物による細胞傷害を効率的に予測する系の確立を目指す。この目的に沿って、平成17年度ではまず転写因子E2F1とE2F4の標的遺伝子を網羅的に同定することを目指した。転写因子E2F1とE2F4の発現を特異的に抑制するsi (short interference) RNAによるRNA阻害 (RNAi) と充実したゲノム情報に立脚した約44,000個の遺伝子・転写産物を搭載するDNAチップにより、E2F標的である多くの新規遺伝子同定に成功した。特に、発現変動を2.5倍以上・以下とした際、E2F1 RNAiで32遺伝子が発現上昇・135遺伝子が発現減少し、E2F4 RNAiでは31遺伝子が発現上昇・90遺伝子が発現減少した。これらの内、共通に発現変動した遺伝子数は17 (上昇) および51 (減少) であった。得られた共通に発現変動した遺伝子は、今後、本研究を推進する上で目的に適う解析候補遺伝子と言える。

A. 研究目的

医薬品候補化合物の早期安全性評価は重要であり、ゲノム科学を応用することで得られる新技術はRegulatory Scienceに大きく貢献する。結果、未然に患者の副作用を軽減でき、これは国民の福祉向上と最善の医療提供へと直結する。

この目的のため、ヒト細胞に抗がん作用を有する化合物を投与した結果、細胞が示す応答性とE2F標的遺伝子プロモーター上でのE2F1とE2F4のアフィニティーとのパラメトリックな関係を網羅的に解析する。即ち、化合物による細胞傷害を効率的に予測する系の確立を本研究では目指す。具体的には、抗がん剤（アルキル化剤・抗がん性抗生物質）の薬効および副作用を予測可能とする研究基盤の確立を目指す。この目的のため、ゲノム情報を活用する。

本年度では、我々が独自に見出した抗がん剤による転写因子E2F1とE2F4による標的遺伝子プロモーターの制御機構を理解する基盤を確立する。具体的には、E2F1とE2F4の標的遺伝子を全ゲノムを対象とした解析手法（DNAチップ解析とクロマチン免疫沈降）で同定する。これにより得られたユニークかつ重要な遺伝子を解析候補対象として、次年度以降の研究開発に役立てる。

B. 研究方法

1. 細胞培養およびDNAトランスフェクション

HeLa細胞（RIKEN Cell Bank）はEarle's modified Eagle's medium（Invitrogen社）に10%牛胎仔血清と抗生物質を添加した培地で、37°C、5% CO₂下で培養した。

2. RT-PCR法およびその他の遺伝子工学的な手法

細胞の全RNAはRNeasy Mini Kit（Qiagen）を用い、HeLa細胞から回収した。逆転写反応は、500 ngのRNA、oligo(dT)プライマー、および1×アニールバッファを

8 µlのRNase/Dnase不含水で溶解し、65°Cで5分間反応後、急冷した。次にcDNA合成のため熱変性させたRNA溶液に、2×反応液とSuperScript III/RNaseOUT酵素混合液（いずれもInvitrogen社）を添加し、総計20 µlとした。直ちに50°Cで50分間、次いで85°Cで5分間反応させ、急冷した。

PCR反応はKOD-Plus-DNAポリメラーゼ（東洋紡）を用い、以下の条件で実施した。94°Cで2分加熱後、94°C（15秒）、58°C（30秒）、68°C（60秒）を30サイクル繰り返した。PCR増幅後、DNA断片は1.2%アガロースゲル/TAEバッファで分離し、紫外線下で可視化した。

3. ウェスタンブロット法

タンパク質回収に際し、細胞はまずRIP A lysis buffer（50 mM Tris-HCl, pH7.6, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, およびそれぞれ1 µg/mlのaprotinin, pepstatin, leupeptin）に溶解し、水中で20分間静置後、遠心分離（12,000 rpm）した上清を以降の実験に供した。タンパク質濃度はBio-Rad protein assay kit（Bio-Rad社）で約50-100 µgに調整し、100 mMのDTTを含むLaemmli sample bufferに溶解後、100°Cで10分間加熱した。タンパク質泳動はNuPAGE 4-12% Bis-TrisゲルとMES running buffer（Invitrogen社）で実施し、その後Hybond-PVDF membrane（Amersham社）に転写した。転写後、PVDF membraneは0.1%のTween 20と5%のnon-fat dried milkを含むTBS溶液内で室温、1時間静置後、GAPDHモノクローナル抗体（6C5、Ambion社）あるいはE2F1 or E2F4モノ；ポリクローナル抗体（Santa Cruz Biotechnology社）を含むTBS溶液内で室温、1時間反応させた。0.1%のTween 20を含むTBSで10分間、3回洗浄後、PVDF membraneにalkaline phosphatase-conjugated anti-mouseあるいはrabbit immunoglobulin（Promega社）を含むTBS溶液内を添加し、室温、1時間反応させた。0.1%のTween 20を含むTBSで10分間、3回洗浄後、PVDF membrane上のシ

グナルはWestern blue stabilized substrate (Promega社) で検出した。

4. RNA阻害によるE2F1およびE2F4発現のノックダウン

細胞の内在性遺伝子発現をノックダウンする目的で、siRNAを合成し細胞に導入した。125 pmolのsiRNA (Ambion社) を250 μ lのOpti-MEM I Reduced Serum Medium (Invitrogen社) に溶解し、別のチューブには2.5 μ lのLipofectamine 2000試薬 (Invitrogen社) を250 μ lのOpti-MEM I Reduced Serum Medium (Invitrogen社) に溶解した。両チューブを混和し、室温で15分間静置した。HeLa細胞を 2×10^5 となるよう調整した6ウェルプレートに、上述した溶液を添加し、24時間後(1日目)に再度siRNAを導入した。ウェスタンブロットによるタンパク発現の確認は2日目以降に実施した。一方、DNAマイクロアレイ用のRNA回収と細胞数計測・ATPアッセイは、それぞれsiRNA導入後4日目、3-5日目に実施した。細胞数の計測はエルマ血球計算盤で、またATPアッセイはCellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega社) のプロトコールに従った。

使用したsiRNAはコントロールsiRNA (Silencer Negative Control#1 Cat. No. 4611, Ambion社) あるいはE2F1およびE2F4に対するPre-designed siRNA ID#114508 (以下、E2F1 #1)、ID#114509 (以下、E2F1 #2)、ID#114194 (以下、E2F4 #1)、ID#146207 (以下、E2F4 #2) 共にAmbion社) である。

E2F1に対するsiRNA配列は、
E2F1 #1 Sense: CGCUAUGAGACCUCACUGAtt
E2F1 #1 Antisense: UCAGUGAGGUCUCAUAGC Ctg
E2F1 #2 Sense: CCUGAUGAAUAUCUGUACUtt
E2F1 #2 Antisense: AGUACAGAAUUAUCAG Gtg

E2F4に対するsiRNA配列は、
E2F4 #1 Sense: CCACGAUUAUAUCUACAACtt
E2F4 #1 Antisense: GUUGUAGAAUUAUCGUG Gtc
E2F4 #2 Sense: GCCUCACGUCCAAUAGUCtt

E2F4 #2 Antisense: GACUAUUUGGACGUGAGG Ctt

である。

5. DNAチップによる網羅的遺伝子発現解析

3種類のtotal RNAサンプル(コントロール、E2F1、およびE2F4ノックダウン細胞)について、遺伝子発現量の差異をアジレント社製Whole Human Genome Oligo Microarray (スポット数44,000、遺伝子・転写産物数約41,000個を一枚のアレイに搭載)を用いた競合ハイブリダイゼーションで解析した。

1) In vitro増幅

Total RNA (5 μ g) に対し、T7プロモーター配列を付加したオリゴ(dT)24プライマーをアニールさせ、まず、First strand DNAを合成した。次に、このFirst strand DNAを鋳型にして、T7プロモーター配列を有するSecond strand DNAを合成した。最後に、Second strand DNAを鋳型にして、aminoallyl-UTP存在下でT7 RNA polymeraseによるRNA合成を実施し、aminoallyl-UTPが導入されたcRNAを作製した。

2) 蛍光標識

上記cRNAに対し、Cy-dye (Cy5あるいはCy3) とのカップリング反応を用いて蛍光標識を実施した。

3) ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーション条件は60°Cで17時間。

4) スキャニング・データ解析

スキャニングはAgilent scanner (アジレント社) で実施した。画像データから数値データへの変換は専用ソフトFeature Extraction (アジレント社) で実施した。バックグラウンドにはnegative controlの蛍光値を用い、各スポットの蛍光値から差し引いた。サンプル・コントロール間のノーマリゼーションは、lowessを用いたグローバルノーマリゼーション法で実施した。スキャニング時のフォトマルのゲインについては、全てのチップでhighとlowの2種類で取得した。High取得時に蛍光強度が飽和していた遺伝子については、low取得時のデータを採用した。

発現変動遺伝子リスト（発現量50以上、発現変動2.5倍以上）を以下の図に示す。

6. クロマチン免疫沈降法（ChIP）によるE2F1結合プロモーター配列の解析

クロマチン免疫沈降法（以下、ChIP）はEZ ChIP kit（Upstate社）のプロトコールに従って実施した。2×10⁶の細胞を一回のChIPに使用した。細胞は最終濃度1%になるようホルムアルデヒドを添加することでDNAとタンパク質を架橋し、プロテアーゼ阻害剤を含むSDS lysis bufferで可溶化後、ソニケーションを実施した（Branson Sonifier II）。ソニケーションによりDNA切断鎖の平均長は500-1,000 bpとした。免疫沈降は2-5 µgの抗E2F1抗体（sc-193、Santa Cruz Biotechnology社）あるいはコントロール抗体として抗Flag抗体（Sigma社）を用いた。4 °Cで一晩反応後、protein G agaroseを添加し、さらに4 °Cで一時間反応後、遠心回収した。4回の洗浄後、ペレットはTEバッファに溶解し、proteinase KとRNase Aを添加後加熱してDNA-タンパク質架橋を外した。フェノール/クロロフォルムおよびエタノール沈殿後、50 µlの蒸留水に溶解し、PCR増幅した。コントロールとして1/200量の免疫沈降前クロマチンもPCR増幅した。PCRプライマーは既知のE2F1標的遺伝子のプロモーター内に設定した（約300-500 bp長）。GAPDHプロモーター内に設定したプライマーをコントロールとした。増幅後、PCR産物は1.2%アガロース電気泳動し、紫外線照射により可視化した。免疫沈降したDNAフラグメントに、*Bst*XIアダプターを付加し、*Bst*XIサイトを保持するプラスミドにクローン化した。5'側からのone-passシーケンス解析に供した。

7. 倫理面への配慮

本研究では該当せず。

C. 研究結果

1. RNAi阻害によるE2F1およびE2F4発現の抑制

本研究で検討したE2F1およびE2F4に対するそれぞれ2種類のsiRNAオリゴの細胞への導入により、効果的な内在性E2F1およびE2F4の発現抑制が確認できた。これはsiRNAオリゴ導入後、2日目のRT-PCRおよび4日目のウェスタンブロットの両方で確認した。発現抑制は2日目以降、8日目まで続いた。siRNAオリゴ導入4日目にRNAを回収し、研究方法に記載したプロトコールに沿って、発現変動を示した遺伝子の網羅的探索を実施した。

2. 高密度DNAマイクロアレイによる網羅的発現解析

約44,000遺伝子・転写産物をこの目的でスクリーニングした。スクヤットプロットとM-Aプロット（HighおよびLow Gain）を以下の図1-1、1-2、2-1および2-2に示す。これらの結果から、全体的な遺伝子の発現が高い相関関係を持って検出された。即ち、相関係数^R2がほぼ1であり、低発現領域でもバラつきが少なく、発現差を高い再現性で確認した。

Control RNAi vs. E2F1 RNAiおよびControl RNAi vs. E2F4 RNAiのそれぞれについて発現量50以上、発現変動2.5倍を目安として多数の候補遺伝子を選定した。内訳として、E2F1 RNAiで32遺伝子が発現上昇・135遺伝子が発現減少し、E2F4 RNAiでは31遺伝子が発現上昇・90遺伝子が発現減少した。これらの内、共通に発現変動した遺伝子数は17（上昇）・51（減少）であった（個々の遺伝子情報については表1-6を参照）。得られた共通に発現変動した遺伝子は、今後、本研究を推進する上で目的に適う解析候補遺伝子と言える。特に発現変化の大きかった遺伝子についてはRT-PCRにより再現性の確認を実施した。

3. E2F1抗体を用いたクロマチン免疫沈降法によるE2F1結合プロモーター配列の同定

E2F1抗体により回収したDNA断片のシーケンス解析から、既知E2F1標的遺伝子を

いくつか同定可能であった。主な内訳として、B-Myb、ORC2、DHFRなどのプロモーターに相当する配列が含まれていた。我々のクロマチン免疫沈降法が正しく機能している傍証である。発現プロファイリングとの結果と併せて、新規な転写因子E2F1標的としてDNA複製開始因子であるMCM2-7ファミリー、MCM8 (Gene, in press) およびMCM9 (BBRC, 2005)、細胞周期に同調した発現パターンを示すZNF18 (International Journal of Molecular Medicine, 2005)、Tome-1 (FEBS Letters, 2005) およびCDCA7 (BBA, in press) を同定することに成功した。特に、MCM8、MCM9 およびCDCA7に関してはルシフェラーゼアッセイおよびクロマチン免疫沈降法によりE2Fファミリーによる制御機構、応答配列、結合性に関する解析を実施した。

D. 考察

本年度は転写因子E2F1およびE2F4の標的遺伝子を近年充実したゲノム情報、即ち44,000個もの遺伝子・転写産物を搭載した高密度DNAチップでスクリーニングした。得られた標的候補遺伝子のいくつかについては、RT-PCRおよびクロマチン免疫沈降法により再現性を確認した。それらの内、多くの遺伝子がこれまで報告されているE2F標的とは異なるユニークなものであった。特に、E2F1とE2F4 RNAiで共通に発現変動した遺伝子数は17（上昇）・51（減少）であり、今後、細胞に抗がん剤を投与した際実施するE2F1およびE2F4によるクロマチン免疫沈降法の最適な解析候補と言える。

これら候補遺伝子はHeLa細胞を用いた解析で得られたもので、今後、転写因子E2F1およびE2F4による普遍的な標的を探索するには他の細胞株でのスクリーニングも必要である。例えばHeLa細胞はがん抑制遺伝子p53が不活性であり、正常細胞を含むp53およびpRbが野生型の細胞が解析対象として最適であろう。次年度以降にはこのような解析と併せて、実際にクロマチン免疫沈降で再現性を見ること

も必要であろう。

E. 結論

以上得られた標的遺伝子を基盤として、次年度以降は実際に細胞に抗がん剤を様々な濃度投与し、転写因子E2F1あるいはE2F4と各遺伝子プロモーターとの結合性を解析する。得られた多くの遺伝子がこれまで報告されていない新規の転写因子E2F1およびE2F4標的であり、特に両者間で共通して発現増強・減少した遺伝子が多数占めた結果は興味深い知見である。これは我々が予想したように、プロモーター近傍に存在するE2F結合コンセンサス配列でE2F1とE2F4が競合的に作用しあうことで特定の遺伝子発現を制御する事実を示唆する。従って、抗がん剤によるDNAダメージや細胞環境の変化を鋭敏に感知したE2F1およびE2F4とクロマチンとの結合性に立脚した本研究計画はこれまでにない抗がん剤の副作用検出系と成りうる可能性が高いと言える。

F. 健康危険情報

本研究では健康危険に関する情報は得られていない。

G. 論文発表

1. Yoshida K. Identification of a novel cell-cycle-induced MCM family protein MCM9. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 331, 669-674 (2005).
2. Yoshida K. Identification and characterization of human ZNF18 gene *in silico*. *International Journal of Molecular Medicine* 15, 545-548 (2005).
3. Yoshida K. Cell-cycle-dependent regulation of the human and mouse Tome-1 promoters. *FEBS Letters* 579, 1488-1492 (2005).

4. Hayashi R, Goto Y, Haga A, Kobayashi D, Ikeda R, Yoshida K*. Comparative genomics of MCM8 orthologous genes reveals transcriptional regulation by transcription factor E2F, *Gene* 367, 126-134 (2006). (*Corresponding author)
5. Goto Y, Hayashi R, Muramatsu T, Ogawa H, Eguchi I, Oshida Y, Ohtani K, Yoshida K. JPO1/CDCA7, a novel transcription factor E2F1-induced protein, possesses intrinsic transcriptional regulator activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, in press (2006). (*Corresponding author).

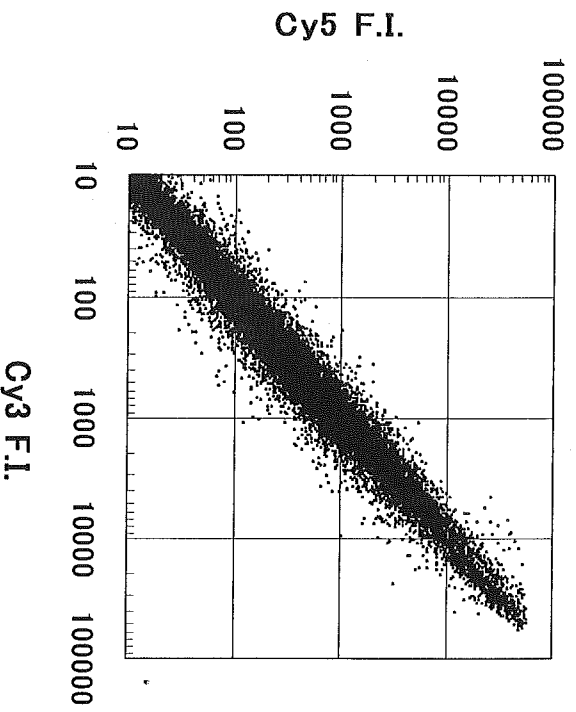
H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

1. 特許取得
吉田健一「転写因子E2F1活性抑制剤」(明治大学、2005年10月24日出願、特願2005-308444)

図1-1 スキヤッタプロットとM-Aプロット(High Gain)

E2F1 (Cy5) v.s. control (Cy3)

Scatter Plot (High Gain)



M-A Plot (High Gain)

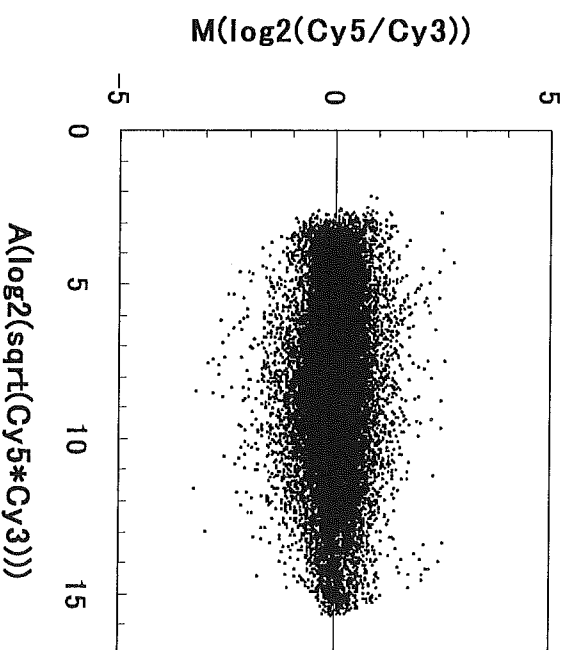


図1-2 スキヤッタプロットとM-Aプロット(Low Gain)

E2F1 (Cy5) v.s. control (Cy3)

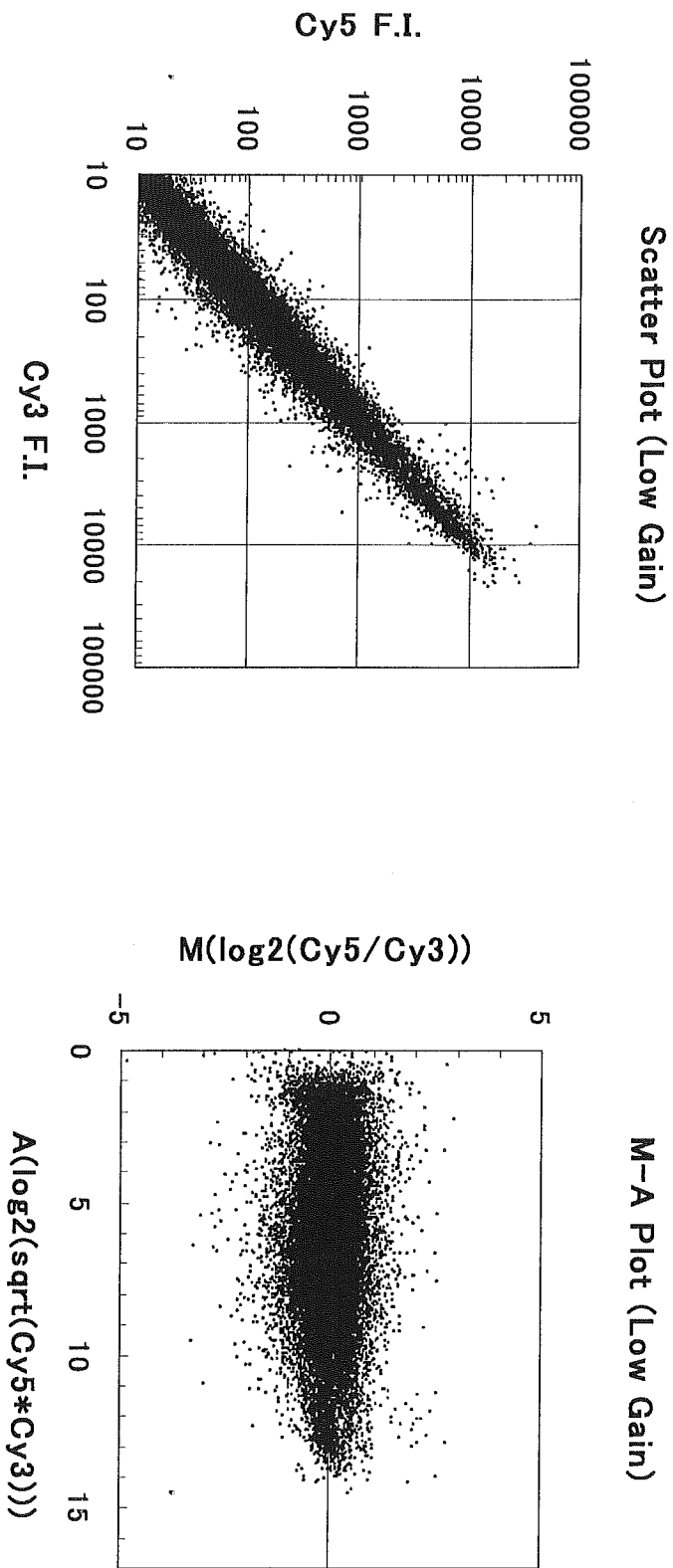
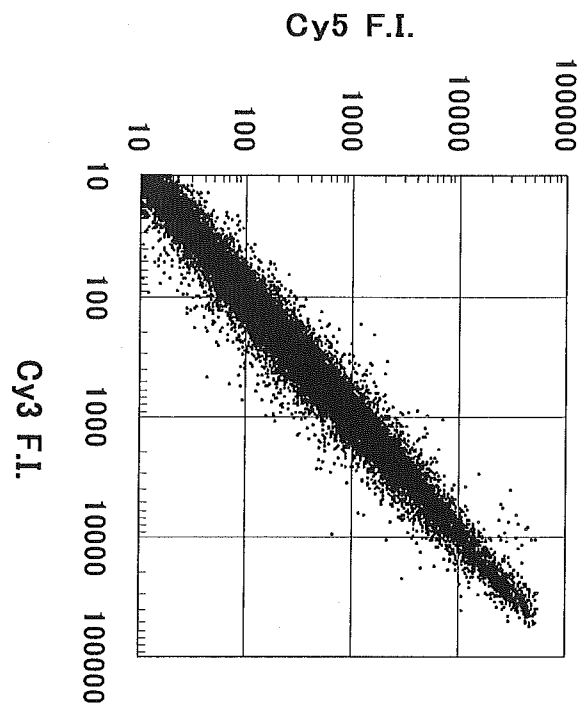


図2-1 スキヤッタフ・プロットとM-Aプロット(High Gain)

E2F4 (Cy5) v.s. control (Cy3)

Scatter Plot (High Gain)



M-A Plot (High Gain)

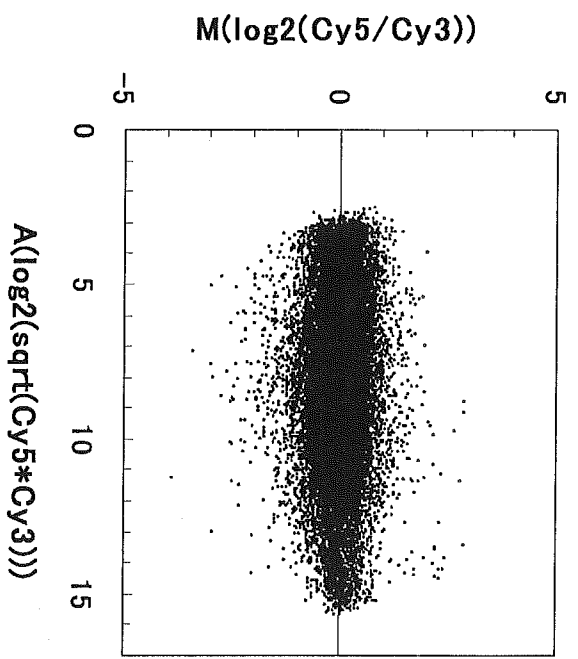


図2-2 スキャッタプロットとM-Aプロット(Low Gain)

E2F4 (Cy5) v.s. control (Cy3)

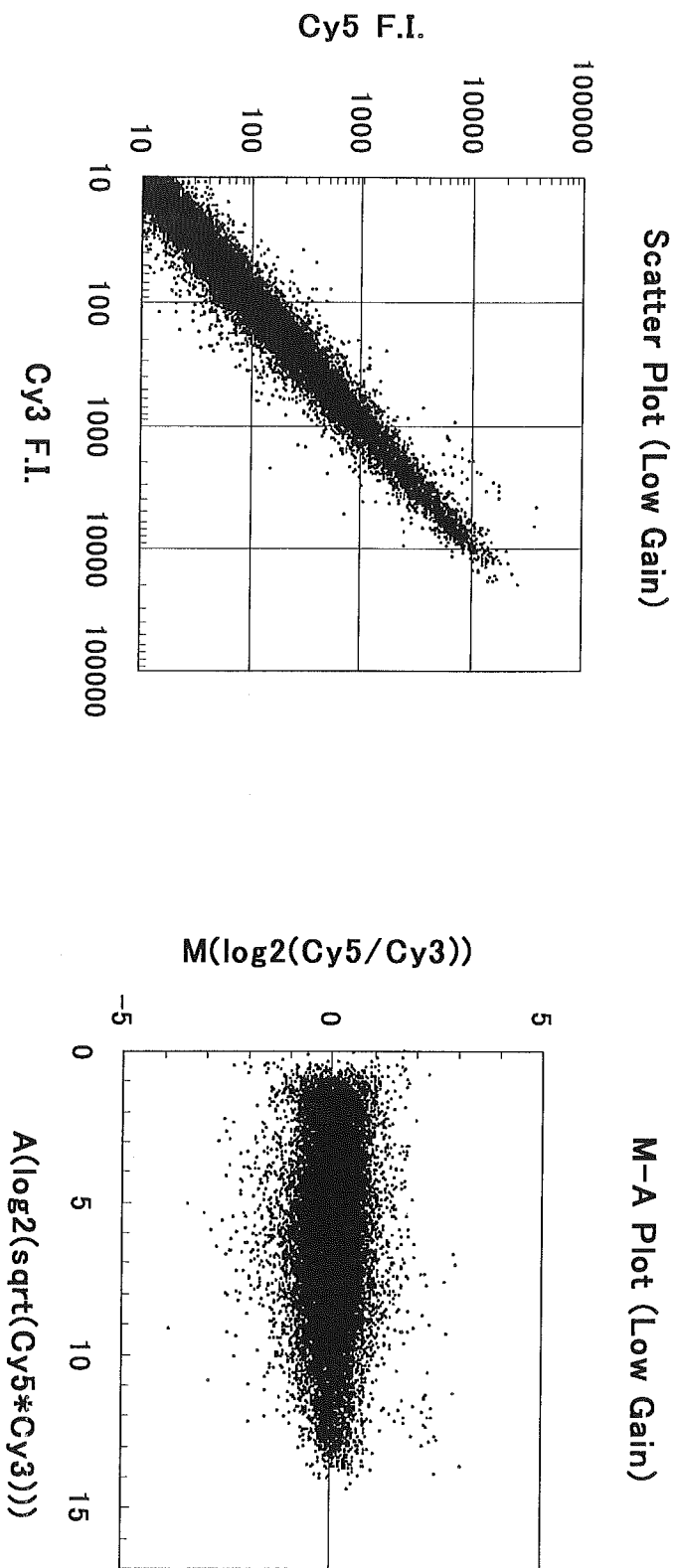


表1. E2F1 およびE2F4 RNAi 細胞で共通に発現上昇した遺伝子群

| Symbol | Name | Category | Refseq No. | Fold change | |
|--------|---|----------------------------|------------|-------------|------|
| | | | | E2F1 | E2F4 |
| TncRNA | trophoblast-derived noncoding RNA | transcriptional regulation | NM_000246 | 5.52 | 7.17 |
| VMP1 | vacuole membrane protein 1 | membrane traffic | NM_030938 | 5.31 | 6.12 |
| PTGER4 | prostaglandin E receptors 4 | arachidonic acid | NM_000958 | 4.38 | 2.55 |
| ATP11C | ATPase, Class VI, type 11C | cation transport | NM_173694 | 3.84 | 2.90 |
| GABRE | GABA A receptor, epsilon | ion channel | NM_004961 | 3.77 | 4.48 |
| TARDBP | TAR DNA binding protein | RNA processing | NM_007375 | 3.73 | 2.96 |
| DATF1 | death associated transcription factor 1 | apoptosis | NM_022105 | 3.67 | 2.68 |
| MALAT1 | metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1, non-coding RNA | cancer-associated | BC063689 | 3.17 | 5.09 |
| TLN1 | talin 1 | cytokinesis | NM_006289 | 3.00 | 2.83 |
| HNRPD | heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D | RNA processing | NM_031370 | 2.93 | 2.66 |
| KIF11 | kinesin family member 11 | cytokinesis | NM_004523 | 2.82 | 2.77 |
| YWHAH | tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta | signal transduction | NM_003405 | 2.73 | 2.72 |
| NUDT15 | nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type | hydrolase activity | NM_018283 | 2.69 | 2.68 |
| POLR2A | polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A | transcription | NM_000937 | 2.67 | 3.32 |
| EMP2 | epithelial membrane protein 2 | signal transduction | NM_001424 | 2.64 | 2.95 |
| NEGR1 | neuronal growth regulator 1 | cell adhesion | NM_173808 | 2.57 | 3.07 |
| CENPF | centromere protein F, 350/400ka (mitosin) | regulation of mitosis | NM_016343 | 2.52 | 2.56 |

表2. E2F1 RNAi 細胞で特異的に発現上昇した遺伝子群

| Symbol | Name | Category | Refseq No. | Fold change |
|---------|---|----------------------------|------------|-------------|
| TFPI2 | tissue factor pathway inhibitor 2 | cytokine | NM_006528 | 5.60 |
| COL16A1 | collagen, type XVI, alpha 1 | extracellular matrix | NM_001856 | 4.55 |
| PFTK1 | PFTAIRE protein kinase 1 | signal transduction | NM_012395 | 3.23 |
| ALDH1A3 | aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3 | lipid metabolism | NM_000693 | 3.04 |
| KCTD12 | potassium channel tetramerisation domain containing | ion channel | NM_138444 | 2.85 |
| HTATIP2 | HIV-1 Tat interactive protein 2 | apoptosis | NM_006410 | 2.79 |
| SNX5 | sorting nexin 5 | protein transport | NM_152227 | 2.72 |
| SIM2 | single-minded homolog 2 (Drosophila) | signal transduction | NM_005069 | 2.70 |
| ANLN | anillin, actin binding protein | cytokinesis | NM_018685 | 2.64 |
| ICF45 | interphase cytoplasmic foci protein 45 | signal transduction | NM_017872 | 2.62 |
| PEX13 | peroxisome biogenesis factor 13 | protein transport | NM_002618 | 2.61 |
| EIF5 | eukaryotic translation initiation factor 5 | protein biosynthesis | NM_001969 | 2.60 |
| ROD1 | regulator of differentiation 1 (S. pombe) | RNA processing | NM_005156 | 2.51 |
| ILF3 | interleukin enhancer binding factor 3 | transcriptional regulation | NM_012218 | 2.51 |
| PLK1 | polo-like kinase 1 (Drosophila) | cell cycle | NM_005030 | 2.50 |

表3. E2F4 RNAi 細胞で特異的に発現上昇した遺伝子群

| Symbol | Name | Category | Refseq No. | Fold change |
|----------|--|----------------------------|------------|-------------|
| ZNF157 | zinc finger protein 157 | transcriptional regulation | NM_003446 | 4.49 |
| SLC22A1 | solute carrier family 22 (organic cation transporter), | cation transporter | | |
| LS | member 1-like antisense | | NM_007105 | 3.15 |
| FBLN5 | fibulin 5 | extracellular matrix | NM_006329 | 3.04 |
| OLFML2 | olfactomedin-like 2A | signal transduction | NM_182487 | 3.00 |
| PANK3 | pantothenate kinase 3 | biosynthesis of coenzyme | NM_024594 | 2.92 |
| GCM1 | glial cells missing homolog 1 (Drosophila) | transcriptional regulation | NM_003643 | 2.86 |
| COL7A1 | collagen, type VII, alpha 1 | extracellular matrix | NM_000094 | 2.86 |
| TPM1 | tropomyosin 1 (alpha) | cytokinesis | NM_000366 | 2.76 |
| SNCB | synuclein, beta | phospholipase inhibitor | NM_003085 | 2.63 |
| PCF11 | pre-mRNA cleavage complex II protein | RNA processing | NM_015885 | 2.61 |
| ASPM | asp (abnormal spindle)-like, microcephaly associated (Drosophila) | regulation of mitosis | NM_018136 | 2.57 |
| SMC4L1 | SMC4 structural maintenance of chromosomes 4-like 1 (yeast) | chromosome organization | NM_005496 | 2.57 |
| SERPINA6 | serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin), member 6 | steroid transport | NM_001756 | 2.54 |
| EDIL3 | EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3 | cell adhesion | NM_005711 | 2.51 |

表4. E2F1 およびE2F4 RNAi 細胞で共通に発現減少した遺伝子群

| Symbol | Name | Category | Refseq No. | Fold change | |
|---------|--|----------------------------|------------|-------------|------|
| | | | | E2F1 | E2F4 |
| GDF15 | growth differentiation factor 15 | cytokine | NM_004864 | 0.10 | 0.07 |
| HERPUD1 | homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1 | stress response | NM_014685 | 0.13 | 0.13 |
| AKR1B10 | aldo-keto reductase family 1, member B10 (aldose reductase) | aldehyde metabolism | NM_020299 | 0.13 | 0.16 |
| SCG2 | secretogranin II (chromogranin C) | protein transport | NM_003469 | 0.14 | 0.18 |
| GALNT13 | UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylglucosaminyltransferase 13 (GalNAc-T13) | protein modification | NM_052917 | 0.15 | 0.19 |
| DDIT3 | DNA-damage-inducible transcript 3 | DNA damage | NM_004083 | 0.16 | 0.15 |
| CREM | cAMP responsive element modulator | transcriptional regulation | NM_181571 | 0.17 | 0.24 |
| KIT | v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene | signal transduction | NM_000222 | 0.17 | 0.24 |
| AREG | amphiregulin (schwannoma-derived growth factor) | cytokine | NM_001657 | 0.19 | 0.13 |
| S100P | S100 calcium binding protein P | protein modification | NM_005980 | 0.21 | 0.25 |
| GPNMB | glycoprotein (transmembrane) nmb | signal transduction | NM_002510 | 0.23 | 0.22 |
| CDKN1A | cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1) | cell cycle | NM_000389 | 0.23 | 0.28 |
| TRIB3 | tribbles homolog 3 (Drosophila) | apoptosis | NM_021158 | 0.23 | 0.21 |
| ASNS | asparagine synthetase | amino acid metabolism | NM_133436 | 0.25 | 0.20 |
| MAWBP | MAWD binding protein | protein modification | NM_022129 | 0.25 | 0.39 |
| BENE | - | unknown | NM_005434 | 0.26 | 0.29 |
| VLDLR | very low density lipoprotein receptor | lipid metabolism | NM_003383 | 0.26 | 0.27 |
| P8 | candidate of metastasis 1 | apoptosis | NM_012385 | 0.26 | 0.29 |
| THSD2 | thrombospondin, type I, domain 2 | signal transduction | NM_032784 | 0.27 | 0.26 |
| GPR1 | G protein-coupled receptor 1 | signal transduction | NM_005279 | 0.27 | 0.28 |
| HSPA5 | heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, interluekin 6 (interferon, beta 2) | protein modification | NM_005347 | 0.28 | 0.25 |
| IL6 | interleukin 6 (interferon, beta 2) | cytokine | NM_000600 | 0.28 | 0.22 |
| MAPK4 | mitogen-activated protein kinase 4 | signal transduction | NM_002747 | 0.29 | 0.36 |
| CDH11 | cadherin 11, type 2, OB-cadherin | cell adhesion | NM_001797 | 0.29 | 0.36 |
| PTGS2 | prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase) | lipid metabolism | NM_000963 | 0.30 | 0.27 |
| SDSL | serine dehydratase-like | amino acid metabolism | NM_138432 | 0.30 | 0.28 |
| SLC2A14 | solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member | glucose transporter | NM_153449 | 0.30 | 0.33 |
| XBP1 | X-box binding protein 1 | transcriptional regulation | NM_005080 | 0.30 | 0.29 |
| STCH | stress 70 protein chaperone, microsomal-associated, 60kDa | protein modification | NM_006948 | 0.30 | 0.36 |
| TM4SF3 | transmembrane 4 superfamily member 3 | signal transduction | NM_004616 | 0.31 | 0.31 |
| G0S2 | G0/G1switch 2 | cell cycle | NM_015714 | 0.32 | 0.30 |
| GPT2 | glutamic pyruvate transaminase (alanine aminotransferase) 2 | protein modification | NM_133443 | 0.32 | 0.26 |
| CTH | cystathionase (cystathionine gamma-lyase) | amino acid metabolism | NM_001902 | 0.33 | 0.34 |
| NKD2 | naked cuticle homolog 2 (Drosophila) | signal transduction | NM_033120 | 0.33 | 0.36 |
| SNCAIP | synuclein, alpha interacting protein (synphilin) | extracellular matrix | NM_005460 | 0.33 | 0.35 |
| MR1 | major histocompatibility complex, class I-related | immune response | NM_001531 | 0.34 | 0.36 |
| STC2 | stanniocalcin 2 | signal transduction | NM_003714 | 0.34 | 0.22 |
| SLC7A11 | solute carrier family 7, (cationic amino acid transporter, y+ system) member 11 | amino acid transporter | NM_014331 | 0.34 | 0.35 |
| DNAJB9 | DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9 | protein modification | NM_012328 | 0.34 | 0.37 |
| PRG1 | proteoglycan 1, secretory granule | extracellular matrix | NM_002727 | 0.35 | 0.35 |
| IL1RAP | interleukin 1 receptor accessory protein | signal transduction | NM_002182 | 0.35 | 0.23 |
| NT5E | 5'-nucleotidase, ecto (CD73) | nucleotide metabolism | NM_002526 | 0.35 | 0.18 |
| VEGFC | vascular endothelial growth factor C | cytokine | NM_005429 | 0.35 | 0.36 |
| MAFK | v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog K (avian) | transcriptional regulation | NM_002360 | 0.35 | 0.39 |
| TMEM2 | transmembrane protein 2 | unknown | NM_013390 | 0.36 | 0.33 |
| ATF3 | activating transcription factor 3 | transcriptional regulation | NM_001674 | 0.37 | 0.26 |
| CLDN1 | claudin 1 | cell adhesion | NM_021101 | 0.38 | 0.17 |
| SLC2A3 | solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member | glucose transporter | NM_006931 | 0.38 | 0.34 |
| CTAGE5 | cutaneous Tcell lymphoma-associated antigen 5 | RNA processing | NM_005930 | 0.38 | 0.39 |
| DDAH1 | dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 | amino acid metabolism | NM_012137 | 0.40 | 0.36 |
| BAMBI | BMP and activin membrane-bound inhibitor homolog (Xenopus laevis) | signal transduction | BC019252 | 0.40 | 0.31 |

表5. E2F1 RNAi 細胞で特異的に発現減少した遺伝子群

| Symbol | Name | Category | Refseq No. | Fold change |
|---------|--|----------------------------|------------|-------------|
| SCEL | scieillin | unknwon | NM_003843 | 0.14 |
| MCP | membrane cofactor protein (CD46, trophoblast-lymphocyte cross-reactive antigen) | immune response | | 0.20 |
| CRLF1 | cytokine receptor-like factor 1 | signal transduction | NM_002389 | |
| CTS2 | cathepsin Z | protein modification | NM_004750 | 0.22 |
| ALPL | alkaline phosphatase, liver/bone/kidney | protein modification | NM_001336 | 0.23 |
| INSL4 | insulin-like 4 (placenta) | protein modification | NM_000478 | 0.23 |
| TSGA14 | testis specific, 14 | signal transduction | NM_002195 | 0.25 |
| BNIP3L | BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like | unknown | NM_018718 | 0.25 |
| AKR1C1 | aldo-keto reductase family 1, member C1 (dihydrodiol dehydrogenase 1; 20-alpha (3-alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase) | apoptosis | NM_004331 | 0.26 |
| | | aldehyde metabolism | | 0.26 |
| KAZALD1 | Kazal-type serine protease inhibitor domain 1 | | NM_001353 | |
| CUTL2 | cut-like 2 (Drosophila) | protein modification | NM_030929 | 0.28 |
| HPD | 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase | transcriptional regulation | NM_015267 | 0.29 |
| ALDH3A1 | aldehyde dehydrogenase 3 family, member A1 | tyrosine metabolism | NM_002150 | 0.30 |
| NQO2 | NAD(P)H dehydrogenase, quinone 2 | carbohydrate metabolism | NM_000891 | 0.30 |
| TDE2L | tumor differentially expressed 2-like | NADH modification | NM_000904 | 0.30 |
| PCSK1 | proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 | cancer-associated | NM_178865 | 0.31 |
| FSTL4 | folistatin-like 4 | protein modification | NM_000439 | 0.32 |
| OAZ3 | ornithine decarboxylase antizyme 3 | protein modification | NM_015082 | 0.32 |
| PPEF1 | protein phosphatase, EF hand calcium-binding domain 1 | polyamine biosynthesis | NM_016178 | 0.32 |
| ULBP2 | UL16 binding protein 2 | protein modification | NM_152223 | 0.32 |
| BCKDHB | branched chain keto acid dehydrogenase E1, beta polypeptide (maale svrup urine disease) | signal transduction | NM_025217 | 0.32 |
| | | amino acid metabolism | | 0.33 |
| LYPLAL1 | lysophospholipase-like 1 | | NM_183050 | |
| CA9 | carbonic anhydrase IX | lipid metabolism | NM_138794 | 0.33 |
| COL8A1 | collagen, type VIII, alpha 1 | carbonate metabolism | NM_001216 | 0.34 |
| ADSSL1 | adenylosuccinate synthase like 1 | extracellular matrix | NM_001850 | 0.34 |
| CD164 | CD164 antigen, sialomucin | nucleotide metabolism | NM_199165 | 0.34 |
| ULBP2 | UL16 binding protein 2 | immune response | NM_008016 | 0.34 |
| CASP9 | caspase 9, apoptosis-related cysteine protease | signal transduction | NM_025217 | 0.34 |
| UTS2 | urotensin 2 | apoptosis | NM_001229 | 0.34 |
| AKR1C3 | aldo-keto reductase family 1, member C3 (3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type II) | cytokinesis | NM_021995 | 0.35 |
| | | aldehyde metabolism | | 0.35 |
| ACYP2 | acylphosphatase 2, muscle type | | NM_003739 | |
| EGR1 | early growth response 1 | phosphate metabolism | NM_138448 | 0.35 |
| PRKCZ | protein kinase C, zeta | transcriptional regulation | NM_001964 | 0.35 |
| HMGCL | 3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase (3-hydroxymethylglutaricaciduria) | signal transduction | NM_002744 | 0.36 |
| | | amino acid metabolism | | 0.36 |
| MAMDC2 | MAM domain containing 2 | | NM_000191 | |
| PIR | pirin, iron-binding nuclear protein | unknown | NM_153267 | 0.36 |
| SMPDL3A | sphingomyelin phosphodiesterase, acid-like 3A | transcriptional regulation | NM_003662 | 0.36 |
| TCEA2 | transcription elongation factor A (SII), 2 | carbohydrate metabolism | NM_006714 | 0.36 |
| PDK1 | pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 1 | transcriptional regulation | NM_003195 | 0.36 |
| PEX6 | peroxisomal biogenesis factor 6 | carbohydrate metabolism | NM_002610 | 0.36 |
| TNFRSF1 | tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19 | peroxisome biogenesis | NM_000287 | 0.36 |
| GGCX | gamma-glutamyl carboxylase | apoptosis | NM_018647 | 0.36 |
| BMP2 | bone morphogenetic protein 2 | protein modification | NM_000821 | 0.36 |
| MAP7 | microtubule-associated protein 7 | cytokine | NM_001200 | 0.37 |
| TNFRSF1 | tumor necrosis factor receptor superfamily, member 14 | cytokinesis | NM_003980 | 0.37 |
| 4 | (herpesvirus entry mediator) | apoptosis | | 0.37 |
| AP1S1 | adaptor-related protein complex 1, sigma 1 subunit | | NM_003820 | |
| CNR1 | cannabinoid receptor 1 (brain) | protein transport | NM_001283 | 0.37 |
| HRMT1L1 | HMT1 hnRNP methyltransferase-like 1 (S. cerevisiae) | signal transduction | NM_016083 | 0.37 |
| KCNJ2 | potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 2 | protein modification | NM_206962 | 0.37 |
| | | channel/pore class | | 0.37 |
| GFPT1 | glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 1 | transporter | NM_000891 | |
| CLIC3 | chloride intracellular channel 3 | glutamate metabolism | NM_002056 | 0.37 |
| EIF2AK3 | eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3 | ion transporter | NM_004669 | 0.38 |
| GLRB | glycine receptor, beta | protein biosynthesis | NM_004836 | 0.38 |
| | | channel/pore class | | 0.38 |
| SLC39A7 | solute carrier family 39 (zinc transporter), member 7 | transporter | NM_000824 | |
| DUSP2 | dual specificity phosphatase 2 | metal ion transporter | NM_006979 | 0.38 |
| ID2 | inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix | protein modification | NM_004418 | 0.38 |
| TNFRSF1 | tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b | signal transduction | NM_002166 | 0.38 |
| 1B | (osteoprotegerin) | apoptosis | | 0.38 |
| CD59 | CD59 antigen p18-20 (antigen identified by monoclonal antibodies 16 3A5, EJ16, EJ30, EL32 and G344) | | NM_002546 | |
| CDS2 | CDP-diacylglycerol synthase (phosphatidate) | immune response | | 0.38 |
| PHKB | phosphorylase kinase, beta | phospholipid biosynthesis | NM_203330 | 0.38 |
| WARS | tryptophanyl-tRNA synthetase | carbohydrate metabolism | NM_003818 | 0.38 |
| RORC | RAR-related orphan receptor C | protein biosynthesis | NM_000293 | 0.38 |
| EPHX1 | epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic) | transcriptional regulation | NM_004184 | 0.38 |
| PTPLA | protein tyrosine phosphatase-like (proline instead of catalytic aranine), member a | transcriptional regulation | NM_005060 | 0.38 |
| | | xenobiotic metabolism | | 0.38 |
| MAPK6 | mitogen-activated protein kinase 6 | signal transduction | NM_000120 | 0.38 |
| OSTM1 | osteopetrosis associated transmembrane protein 1 | | NM_014241 | |
| PDE1A | phosphodiesterase 1A, calmodulin-dependent | signal transduction | NM_002748 | 0.38 |
| INSIG1 | insulin induced gene 1 | unknown | NM_014028 | 0.38 |
| KAZALD1 | Kazal-type serine protease inhibitor domain 1 | signal transduction | NM_005019 | 0.39 |
| ZMPSTE2 | zinc metalloproteinase (STE24 homolog, yeast) | protein modification | NM_005542 | 0.39 |
| STX3A | syntaxin 3A | protein transport | NM_030929 | 0.39 |
| MMD | monocyte to macrophage differentiation-associated | protein modification | NM_005857 | 0.39 |
| OAZ3 | ornithine decarboxylase antizyme 3 | protein transport | NM_004177 | 0.39 |
| GLP2R | glucagon-like peptide 2 receptor | signal transduction | NM_012329 | 0.39 |
| EREG | epiregulin | polyamine biosynthesis | NM_016178 | 0.39 |
| IMMP2L | IMP2 inner mitochondrial membrane protease-like (S. | signal transduction | NM_004246 | 0.39 |
| AGA | aspartylglucosaminidase | signal transduction | NM_001432 | 0.39 |
| CD83 | CD83 antigen (activated B lymphocytes, immunoglobulin superfamily) | protein modification | NM_032549 | 0.39 |
| | | protein modification | | 0.40 |
| TNFAIP1 | tumor necrosis factor, alpha-induced protein 1 (endothelial) | immune response | | 0.40 |
| SEN2 | SUMO1/sentrin/SMT3 specific protease 2 | | NM_004233 | |
| SNCA | synuclein, alpha (non A4 component of amyloid precursor) | signal transduction | NM_021137 | 0.40 |
| ZBED1 | zinc finger, BED domain containing 1 | protein modification | NM_021627 | 0.40 |
| NMNAT1 | nicotinamide nucleotide adenyltransferase 1 | apoptosis | NM_012137 | 0.40 |
| SNAPC5 | small nuclear RNA activating complex, polypeptide 5, 19kDa | transcriptional regulation | NM_004729 | 0.40 |
| | | NAD biosynthesis | | 0.40 |
| | | transcriptional regulation | | 0.40 |

表6. E2F4 RNAi 細胞で特異的に発現減少した遺伝子群

| Symbol | Name | Category | Refseq No. | Fold change |
|---------|--|----------------------------|------------|-------------|
| IGFBP3 | insulin-like growth factor binding protein 3 | signal transduction | NM_000598 | 0.18 |
| CXCL1 | chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha) | chemokine | NM_001511 | 0.18 |
| BIRC3 | baculoviral IAP repeat-containing 3 | apoptosis | NM_001165 | 0.22 |
| CPA4 | carboxypeptidase A4 | protein modification | NM_016352 | 0.27 |
| KCNJ2 | potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 2 | channel/pore class | NM_000891 | 0.27 |
| MAP2 | microtubule-associated protein 2 | transporter | NM_002374 | 0.29 |
| GLRB | glycine receptor, beta | channel/pore class | NM_000824 | 0.30 |
| PTPNS1 | protein tyrosine phosphatase, non-receptor type substrate 1 | protein modification | NM_080792 | 0.31 |
| CASP1 | caspase 1, apoptosis-related cysteine protease (interleukin 1, beta, convertase) | apoptosis | NM_033292 | 0.31 |
| ETV4 | ets variant gene 4 (E1A enhancer binding protein, E1AF) | transcriptional regulation | NM_001986 | 0.31 |
| TM4SF1 | transmembrane 4 superfamily member 1 | signal transduction | NM_014220 | 0.32 |
| CXCL2 | chemokine (C-X-C motif) ligand 2 | chemokine | NM_002089 | 0.32 |
| PSAT1 | phosphoserine aminotransferase 1 | amino acid metabolism | NM_058179 | 0.33 |
| TNNC1 | troponin C, slow | cytokinesis | NM_003280 | 0.33 |
| MBP | myelin basic protein | cytokinesis | NM_002385 | 0.33 |
| SLCO4A1 | solute carrier organic anion transporter family, member 4A1 | anion transporter | NM_016354 | 0.34 |
| SLC1A3 | solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 3 | glutamate transporter | NM_004172 | 0.34 |
| PRSS23 | protease, serine, 23 | protein modification | NM_007173 | 0.34 |
| NTN4 | netrin 4 | extracellular matrix | NM_021229 | 0.34 |
| DNAJC12 | DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 12 | protein modification | NM_021800 | 0.35 |
| CRIM1 | cysteine-rich motor neuron 1 | signal transduction | NM_016441 | 0.35 |
| ENTPD7 | ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 7 | hydrolase activity | NM_020354 | 0.35 |
| PAPPA | pregnancy-associated plasma protein A | protein modification | NM_002581 | 0.35 |
| ANXA3 | annexin A3 | cytokinesis | NM_005139 | 0.35 |
| OPN3 | opsin 3 (encephalopsin, panopsin) | signal transduction | NM_014322 | 0.35 |
| GARS | glycyl-tRNA synthetase | protein biosynthesis | NM_002047 | 0.35 |
| COL25A1 | collagen, type XXV, alpha 1 | extracellular matrix | NM_198721 | 0.36 |
| FAM18B | family with sequence similarity 18, member B | unknown | NM_016078 | 0.36 |
| ITGA2 | integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor) | signal transduction | NM_002203 | 0.36 |
| SPARCL1 | SPARC-like 1 (mast9, hevin) | extracellular matrix | NM_004684 | 0.37 |
| ETV5 | ets variant gene 5 (ets-related molecule) | transcriptional regulation | NM_004454 | 0.37 |
| ATAD1 | ATPase family, AAA domain containing 1 | nucleotide binding | NM_032810 | 0.37 |
| PPEF1 | protein phosphatase, EF hand calcium-binding domain 1 | protein modification | NM_006240 | 0.38 |
| SLC35D2 | solute carrier family 35, member D2 | nucleotide-sugar | NM_007001 | 0.39 |
| SH3KBP1 | SH3-domain kinase binding protein 1 | signal transduction | NM_031892 | 0.39 |
| SNTB1 | syntrophin, beta 1 (dystrophin-associated protein A1, 59kDa, basic component 1) | cytokinesis | NM_021021 | 0.39 |
| C1S | complement component 1, s subcomponent | response to stress | NM_001734 | 0.40 |
| SPRY2 | sprouty homolog 2 (Drosophila) | signal transduction | NM_005842 | 0.40 |
| DUSP5 | dual specificity phosphatase 5 | protein modification | NM_004419 | 0.40 |

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|---|--|-----|-----------|------|
| Yoshida K | Identification of a novel cell-cycle-induced MCM family protein MCM9 | <i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i> | 331 | 669-674 | 2005 |
| Yoshida K | Identification and characterization of human ZNF18 gene <i>in silico</i> | <i>International Journal of Molecular Medicine</i> | 15 | 545-548 | 2005 |
| Yoshida K | Cell-cycle-dependent regulation of the human and mouse Tome-1 promoters | <i>FEBS Letters</i> | 579 | 1488-1492 | 2005 |
| Hayashi R, Goto Y, Haga A, Kobayashi D, Ikeda R, Yoshida K* (*Corresponding author) | Comparative genomics of MCM8 orthologous genes reveals transcriptional regulation by transcription factor E2F | <i>Gene</i> | 367 | 126-134 | 2006 |