

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業：トキシコゲノミクス研究

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17～19年度 総合研究報告書

主任研究者 吉田 健一

平成20（2008）年 4月

目 次

I. 総合研究報告

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

吉田健一

----- 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 23

III. 研究成果の刊行物・別刷

----- 24

(創薬基盤推進研究事業：トキシコゲノミクス研究)

総合研究報告書

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 准教授

研究要旨

細胞運命を制御する多くの重要な遺伝子の発現を制御するp53は多くの癌種で突然変異により不活化されている。本研究ではp53とともに細胞周期やDNA修復、さらには細胞死などを遺伝子レベルで調節する転写因子E2Fに焦点をあてた。最近の報告からある種の抗がん剤がp53とは独立した経路で直接E2F1をリン酸化することでE2F1の標的遺伝子のうちアポトーシスに関する遺伝子の発現を優先的に制御することが明らかとなった。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の競合的かつ選択的結合が、細胞に対する紫外線照射や抗がん剤投与で変化する事実を見出した。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した。この目的に沿って、まず転写因子E2F1とE2F4の標的遺伝子を網羅的に同定した。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。さらに同定した遺伝子プロモーターのいくつかについてE2F1とE2F4の結合を検定する際の条件を確立し、それら結合性の変化と細胞傷害との関係について解析した。特に選定した18遺伝子について、抗がん剤である5-フルオロウラシルおよびエトポシドによりE2F1・E2F4が標的遺伝子プロモーターに対して示す結合パターンの解析を実施した。具体的には、E2F1・E2F4標的遺伝子についてヒト培養細胞を抗がん剤で処理した際、プロモーター上に特異的に結合するE2F1・E2F4をクロマチン免疫沈降により定性・定量解析した。同時に細胞の表現型も観察した。以上より、特定の遺伝子セットの抽出が可能となり、新規化合物の副作用を予測可能なアッセイ系確立に近づいた。

A. 研究目的

医薬品低分子化合物、とくに抗がん剤は薬効と毒性がしばしばオーバーラップする。さらに細胞のもつ遺伝型に薬効が左右されることが珍しくない。抗がん剤として開発される新規低分子化合物が正常細胞に対しては副作用を示さず、一方、がん細胞に対しては増殖に対し抑制的に作用するかどうか、簡便なアッセイで予測できれば未然に医薬品開発のコストを低減できるし、患者に対しても不要な侵襲を防止でき、国民の福祉に貢献可能である。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。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した。

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 (RCB0007, RIKEN) および正常肺線維芽細胞WI-38細胞(IF050075, Health Science Research Resources Bank)はEarle's modified Eagle's medium (Invitrogen) に10%牛胎仔血清(Japan-BioSerum)、1%非必須アミノ酸 (Invitrogen)と抗生物質 (Invitrogen) 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的手法

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5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 µlのOpti-MEM I Reduced Serum Medium (Invitrogen社)に溶解し、別のチューブには2.5 µlのLipofectamine 2000試薬 (Invitrogen社)を250 µl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: CCUGAUGAAUACUGUACUtt
E2F1 #2 Antisense: AGUACAGAUUAUCAUCAG Gtg
E2F4に対するsiRNA配列は、
E2F4 #1 Sense: CCACGAUUUAUCUACAACtt
E2F4 #1 Antisense: GUUGUAGAUAAUUCGUG 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 µg)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時間で実施した。

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)を表1-6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)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(Sigma)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)、抗E2F4抗体(sc-866, 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℃で一晩反応後、protein G アガロースを添加し、さらに4℃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/クロロホ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。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。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℃で2分加熱後、94℃(15秒)、55-60℃(30秒)、68℃(60秒)を27-35サイクル繰り返した。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フラグメントの一部に、BstXIアダプターを付加し、BstXI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. 遺伝子の選定

DNAマイクロアレイで発現変動を示した遺伝子群のリストをもとにした。とくに、ChIP後サブクローニングし塩基配列を決定した遺伝子プロモーター配列を参考にするとともに、E2F結合コンセンサス配列(5'-TTT(G/C)GCGC-3')を転写因子結合予測ソフトTRANSFAC(<http://motif.genome.jp/>)で予測(cutoff >85)した。また、文献情報やNCBI(NIH)に登録されているマイクロアレイデータから抽出した情報、ならびにRT-PCRによりE2F1依存的な発現変動を示した遺伝子、またプロモーター配列をルシフェラーゼ遺伝子の5'上流に挿入しE2F反応性エレメントを決定するなどの実験結果を基に解析候補遺伝子を選定した。

8. PCRプライマー

配列を以下に示す。

GMNN

Sense: 5' -CGCACAGCCTCTAGACGACTCGCTTCCCT-3'

Antisense: 5' -GCCTCGGGAAGTGGCCAGCCAGCCAATAG-3'

TOPBP1

Sense: 5' -GGAGTATTCCTGGCCTGTGGTCCTACTCT-3'

Antisense: 5' -CCCATCTCCAGGAAAAGGCCTGGCTCTGGG-3'

ASF1B

Sense: 5' -TGGGCACCTGTAATCCCAGC-3'

Antisense:

5' -GGAGACTCCAGGTCTCAGAG-3'

EMI1

Sense: 5' -CAGAGCGCGCGTAAATCC-3'

Antisense:

5' -CTATTCAAGCAGGGTGGGGT-3'

TOB2

Sense: 5' -GCTGCAAGGAAAGGAGCGCC-3'

Antisense:

5' -TTGTGCGCGTCGTGTGAGCT-3'

また、これら以外の18遺伝子のPCR解析に使用したプライマー配列は表7に示した。

9. 試薬

抗がん剤として、ピリミジンアナログでDNA合成阻害剤である5-フルオロウラシル(以下、5-FU、068-01401、Wako)と植物アルカロイドでトポイソメラーゼII阻害剤であるエトポシド(以下、VP-16、057-05853、Wako)を用いた。それぞれDMSOに溶解し0.5 mMおよび0.1 mM stock solutionとして-20°C保存し、適宜希釈して用いた。

10. 細胞機能アッセイ

10-1. 細胞生存率

細胞の生存率はWST-1 assay (Roche)およびCellTiter-Glo luminescent cell viability assay (Promega)で測定した。細胞(2×10^5 cells)を6-well plateで一晩培養後、試薬を添加し48時間後にアッセイに供した。コントロールとして、試薬と等量のDMSO(通常培地の1/1,000量)を添加した。

10-2. BrdU 取り込み活性

DNA複製能は5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)の新生DNA鎖ラベルで定量化した(BrdU labeling and detection kit III, Roche)。細胞(3×10^3 cells)を96-well plateで一晩培養後、試薬を添加し、さらに一晩培養後10 μ MのBrdUで14時間ラベルした。冷PBSで2回洗浄後

、70% ethanol/0.5M HClで30分、-20°Cで固定した。さらにPBSで3回洗浄後、ヌクレアーゼ処理を施した。37°Cで30分処置後、PBSで3回洗浄しペルオキシダーゼで化学修飾した抗BrdUモノクローナル抗体を含む1% BSA/PBSで37°C、30分反応させた。PBSにて3回洗浄後、ペルオキシダーゼ基質でBrdUラベルを可視化し、405 nm (-490 nm)で活性をモニターした。

10-3. アポトーシス

アポトーシス活性はCaspase-Glo 3/7 assay kit (Promega)で測定した。細胞(3×10^3 cells)を96-well plateで一晩培養後、試薬を添加し、24時間後にcaspase-3/7基質と30分間、室温で反応させた。活性はluminescence microplate reader (Wallac1420 ARVOsx Multilabel Counter, Perkin Elmer)で測定した。いずれの実験も最低3回実施し、平均±標準偏差で示した。Student's paired t-testで解析し、 $p < 0.05$ を統計学的有意差と判定した。

(倫理面への配慮)

本研究では、個人情報に関わるヒト由来サンプルおよび動物実験を実施していないため、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。スキュットプロットとM-Aプロット (HighおよびLow Gain) の解析結果から、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合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およびMCM9、細胞周期に同調した発現パターンを示すZNF18、Tome-1およびCDCA7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。さらにE2F1に対する抗体でChIPを実施し、回収したDNA断片をベクターにクローン化し塩基配列を決定した (図1)。以上より得られた情報に基づいて、以降の解析に供する遺伝子とした。

4. 5-FUおよびVP-16による細胞機能の変化

5-FUおよびVP-16をHeLaおよびWI-38細胞に投与しWST-1アッセイにより細胞生存率を評価した。細胞の生存率はコントロールを100としたときの相対値 (%) で表した。HeLa細胞において、5-FUでは5 μ Mで細胞生存率は低下を示し、VP-16では10 μ Mで細胞生存率は低下を示した (図2 A)。同等の濃度においてWI-38細胞では細胞生存率に影響はなかった (図2 A)。さらに、HeLa細胞においては5-FU (5 μ M)、VP-16 (10 μ M) 添加で細胞死が検出されたが、WI-38細胞では細胞死は検出されなかった (図2 B)。一段階低い希釈濃度における5-FU (0.5 μ M)、VP-16 (1 μ M) 添加で細胞死は検出されなかった (図2 B)。一方、BedU取り込み活性を指標とした細胞周期G1期停止は、HeLa細胞において5-FU (5 μ M)、VP-16 (10 μ M) 添加で検出され、WI-38細胞でも検出されたものの比較的弱ものであった (図2 C)。以上より、5-FU (5 μ M)、VP-16 (10 μ M) はがん細胞であるHeLa細胞に対してのみ薬効を示し、正常細胞であるWI-38に対してはほとんど副作用を示さなかった。一方、一段階低い希釈濃度においてはHeLa細胞に対してもほとんど作用を示さず、以降の実験においては5-FU (0.5 および5 μ M)、VP-16 (1 および10 μ M) について検討することとした。

5. ChIP

選定した7遺伝子について、HeLa細胞およびWI-38細胞のそれぞれに、5-FU (0

、0.5 および5 μM ）、VP-16 (0、1 およ
び10 μM) を添加しChIPを実施した。WI-3
8細胞に影響を及ぼさなかった5-FU (0.5
 μM)、VP-16 (1 μM) 濃度で、影響を及ぼ
した 5-FU (5 μM)、VP-16 (10 μM) 濃
度のChIPパターンと一致する遺伝子の探
索を目指した。いずれのChIPにおいてもG
APDHプライマーでPCR産物は検出されな
かた (data not shown)。7 遺伝子のう
ち、HeLa細胞ではE2F1によるGMNNおよびT
OPBP1のChIPが、一方、WI-38細胞ではE2F
4によるTOPBP1およびTOB2 のChIPが当初
の目的にかなった遺伝子セットとして抽
出された (図3)。すなわち、HeLa細胞
では細胞死が誘発される前段階である細
胞周期G1停止状態において、GMNNおよびT
OPBP1のプロモーターにE2F1が高度集積す
る可能性が高い。また、WI-38細胞では細
胞周期G1停止状態に至らない5-FU濃度
においてすでにE2F4がTOPBP1およびTOB2
プロモーターに会合を開始する可能性が示
唆された (図4)。

6. 18遺伝子におけるChIP解析

以降の実験においては5-FU (0および5
 μM)、VP-16 (0 および10 μM) につい
て検討することとした。選定した18遺伝子
(FANCA、FANCB、FANCD1、FANCF、FANCG
、FANCJ、FANCM、ZNF367、PSF1、PSF3、
HBO1、FOXM1B、CDCA1、CDCA3、CDT2、
PLK1、PLK4およびSIM2) について、HeLa
細胞およびWI-38細胞のそれぞれに、5-FU
(0および5 μM)、VP-16 (0および10 μM)
) を添加しChIPを実施した。ChIPで増幅
したゲノム領域と5-FU添加細胞における
ChIP結果を図5に示す。いずれのChIPに
おいてもコントロール (GAPDH) プライマ
ーでPCR産物は検出されなかつた。5-FUお
よびVP-16添加細胞におけるChIP結果をパ
ターン化したスコアを表8に示す。18遺伝
子のうち、5-FU添加によってHeLa細胞で
ChIPパターンの変化を示した遺伝子は
FOXM1B (E2F4結合の消失) とSIM2 (E2F1
結合の消失) であった。一方、5-FU添加

によってWI-38細胞でChIPパターンの変化
を示した遺伝子はZNF367 (E2F4結合の検
出) のみであった。さらに、VP-16添加に
よってHeLa細胞でChIPパターンの変化を
示した遺伝子はSIM2 (E2F1結合の消失)
のみであった。一方、VP-16添加によつて
WI-38細胞でChIPパターンの変化を示した
遺伝子はZNF367 (E2F1およびE2F4結合の
検出) であった。

D. 考察

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
る。また、E2Fファミリー (E2F1~E2F6)
は細胞周期G1からS期への進行を調節す
るだけでなくM期をも制御することが最近
の研究から明らかになっている。さらに、
細胞や個体レベルでの発生分化からがん
化・老化といった広範な生理・病理現象
において主要な役割を果たしている。特
に、細胞がダメージを受けた際の遺伝子
レベルでの反応における関与は重要であ
り、E2F1はp53依存性・非依存性の経路で
細胞死を引き起こす。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の競合的かつ選択的結合が、細胞に対する紫外線照射や抗がん剤投与で変化する事実を見出した。

転写因子E2F1およびE2F4の標的遺伝子については、クロマチン免疫沈降法やDNAマイクロアレイを用いた報告が既にある (Ishida et al., Mol Cell Biol. 21: 4684-4699, 2001)。しかし、近年充実度を増したゲノム情報をもとに作製されたDNAマイクロアレイを用いた解析から、これまでにないユニークなE2F1およびE2F4の標的遺伝子およびそれらのプロモーター配列が同定される可能性が高い。実際、我々のこれまでの研究から、まったくユニークなE2F1およびE2F4の標的遺伝子を多数同定できた。E2F1ならびにE2F4のプロモーター結合性に基づく医薬品候補化合物の安全性評価に関する報告はこれまでに見当たらない。また、DNAダメージによる細胞傷害 (細胞死・細胞周期停止など) を予測する際、特定遺伝子の発現解析ではしばしば困難を伴う。しかし、転写因子E2F1およびE2F4の特定遺伝子プロモーターへの結合パターンを指標にすることで、その後の細胞傷害をある程度予測できる可能性がある (Yoshida et al., Oncogene23: 6250-6260, 2004)。転写因子E2F1ならびにE2F4が抗がん作用を示す化合物投与の結果、標的遺伝子プロモーターにどのような結合パターンを示すか、そして細胞はどのような表現型を示すかをゲノムワイドに解析することでより詳細な化合物の安全性評価系が確立できる可能性が高い。

初年度では転写因子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。5-FUをがん細胞に暴露した際には細胞死が、正常細胞に暴露した場合ではG1停止 (修復可能なDNA障害) が惹起される濃度、あるいはそういった状態に細胞が至らない濃度におけるE2F結合パターンを探索・収集し、手始めに検討した7遺伝子の中から、今後有益と考えられる情報を得ることができた。今回、検討を加えた7遺伝子はいずれも細胞周期の制御、DNA複製・修復などに関与することが知られており、機能的な側面からもE2F下流遺伝子として興味深く、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の端緒が示された。個々の薬剤に特化した遺伝子セットの存在も否定できず、未知の化合物の薬効・副作用を予測するためには、さらなる網羅的解析が必要であると考えられる。とくに重点的に実施すべき項目としては、遺伝子の増加 (~30遺伝子)、抗がん剤 (アルキル化剤など) の追加、定量的な解析精度の向上などがあげられる。これらの追加検討項目を実施することで、より再現性の高い、普遍的な遺伝子セットが抽出可能と思われる。さらに検討した18遺伝子における解析から、今後有益と考えられる情報を得ることができた。しかしながら、ChIP法ではPCRによる検出を含むためartifactなPCRバンドを検出している可能性も高い。また、再現性をさらに詳しく検討する必要も高い。いずれにしても、未知の化合物の薬効・副作用を予測するためには、さらなる網羅的解析が必要であると考えられる。より定量的な解析精度の向上が達成できれば、より再現性の高い、普遍的な遺伝子セットが抽出可能と思われる。

E. 結論

細胞に抗がん剤を投与し、細胞機能に影響を与えない濃度においても、影響を与える濃度と同等のE2F1あるいはE2F4と各遺伝子プロモーターとの結合性パターンの抽出が可能であった。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。今回得られた検討結果を基盤として、さらに多数の遺伝子、抗がん剤について情報を蓄積する必要性が高い。本研究から、当初予想したように、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が見出された。抗がん剤として5-FUおよびVP-16、細胞としてHeLaおよびWI-38を用い、選定した18遺伝子プロモーター近傍配列を標的としたChIP解析から、E2F1・E2F4のプロモーター選択性と抗がん剤による細胞障害とのパラメトリックな関係を抽出する系の構築に一步前進した。今後より詳細な検討を加えることで、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抗がん剤の副作用検出系が完成する可能性が高いと言える。今回得られた検討結果を基盤として、さらに多数の遺伝子、抗がん剤について再現性の高い情報を蓄積する必要性が示唆された。

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, Kang D, Yoshida K*. Acute loss of transcription factor E2F1 induces mitochondrial biogenesis in HeLa cells. *Journal of Cellular Physiology* 209: 923-934 (2006). (*Corresponding author)
6. Hayashi R, Goto Y, Tanaka R, Oonogi K, Hisasue M, Yoshida K*. Transcriptional regulation of human chromatin assembly factor ASF1. *DNA and Cell Biology* 26(2): 91-99 (2007). (*Corresponding author)
7. Tategu M, Arauchi T, Tanaka R, Nakagawa H, Yoshida K*. Systems biology-based identification of crosstalk between E2F transcription factors and the

Fanconi anemia pathway, Gene
Regulation and Systems Biology 1:
1-8 (2007). (*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

1. 吉田健一「転写因子E2F1活性抑制剤」
(明治大学、2007年5月10日、特開2007-1
12772)

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.	E2F1	E2F4	Fold change
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), member 1-like antisense	cation transporter		3.15
LS	member 1-like antisense			
FBLN5	fibulin 5	extracellular matrix	NM_007105	3.04
OLFML2	olfactomedin-like 2A	signal transduction	NM_006329	3.00
PANK3	pantothenate kinase 3	biosynthesis of coenzyme	NM_182487	2.92
GCM1	glial cells missing homolog 1 (Drosophila)	transcriptional regulation	NM_024594	2.86
COL7A1	collagen, type VII, alpha 1	extracellular matrix	NM_003643	2.86
TPM1	tropomyosin 1 (alpha)	cytokinesis	NM_000094	2.76
SNCB	synuclein, beta	phospholipase inhibitor	NM_000366	2.63
PCF11	pre-mRNA cleavage complex II protein	RNA processing	NM_003085	2.61
ASPM	asp (abnormal spindle)-like, microcephaly associated (Drosophila)	regulation of mitosis	NM_015885	2.57
SMC4L1	SMC4 structural maintenance of chromosomes 4-like 1 (yeast)	chromosome organization	NM_018136	2.57
SERPINA6	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin, antitrypsin), member 6	steroid transport	NM_005496	2.54
EDIL3	EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3	cell adhesion	NM_001756 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-acetyl-galactosaminyltransferase 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
GPNCB	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,	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	sceillin	unknown	NM_003843	0.14
MCP	membrane cofactor protein (CD46, trophoblast-lymphocyte cross-reactive antigen)	immune response	NM_002389	0.20
CRLF1	cytokine receptor-like factor 1	signal transduction	NM_004750	0.22
CTS2	cathepsin 2	protein modification	NM_001336	0.23
ALPL	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	protein modification	NM_000478	0.23
INSL4	insulin-like 4 (placenta)	signal transduction	NM_002195	0.25
TSGA14	testis specific, 14	unknown	NM_018718	0.25
BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like	apoptosis	NM_004331	0.26
AKR1C1	aldo-keto reductase family 1, member C1 (dihydrodiol dehydrogenase 1; 20-alpha (3-alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase)	aldehyde metabolism	NM_001353	0.28
KAZALD1	Kazal-type serine protease inhibitor domain 1	protein modification	NM_030929	0.28
CUTL2	cut-like 2 (Drosophila)	transcriptional regulation	NM_015267	0.29
HPD	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	tyrosine metabolism	NM_002150	0.30
ALDH3A1	aldehyde dehydrogenase 3 family, member A1	carbohydrate metabolism	NM_000691	0.30
NQO2	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 2	NADH modification	NM_000804	0.30
TDE2L	tumor differentially expressed 2-like	cancer-associated	NM_178865	0.31
PDSK1	proprotein convertase subtilisin/kexin type 1	protein modification	NM_000439	0.32
FSTL4	folistatin-like 4	protein modification	NM_015082	0.32
OAZ3	ornithine decarboxylase antizyme 3	polyamine biosynthesis	NM_018178	0.32
PPEF1	protein phosphatase, EF hand calcium-binding domain 1	protein modification	NM_152223	0.32
ULBP2	UL16 binding protein 2	signal transduction	NM_025217	0.32
BCKDHB	branched chain keto acid dehydrogenase E1, beta polypeptide (maoole svrup urine disease)	amino acid metabolism	NM_183050	0.33
LYPLAL1	lysophospholipase-like 1	lipid metabolism	NM_138794	0.33
CA9	carbonic anhydrase IX	carbonate metabolism	NM_001216	0.34
COL8A1	collagen, type VIII, alpha 1	extracellular matrix	NM_001850	0.34
ADSSL1	adenylosuccinate synthase like 1	nucleotide metabolism	NM_189165	0.34
CD164	CD164 antigen, sialomucin	immune response	NM_008018	0.34
ULBP2	UL16 binding protein 2	signal transduction	NM_025217	0.34
CASP9	caspase 9, apoptosis-related cysteine protease	apoptosis	NM_001229	0.34
UTS2	urotensin 2	cytokinesis	NM_021995	0.35
AKR1C3	aldo-keto reductase family 1, member C3 (3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type II)	aldehyde metabolism	NM_003739	0.35
ACYP2	acylphosphatase 2, muscle type	phosphate metabolism	NM_138448	0.35
EGR1	early growth response 1	transcriptional regulation	NM_001984	0.35
PRKCZ	protein kinase C, zeta	signal transduction	NM_002744	0.36
HMGCL	3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase (hydroxymethylglutaricaciduria)	amino acid metabolism	NM_000191	0.36
MAMDC2	MAM domain containing 2	unknown	NM_153267	0.36
PIR	pirin, iron-binding nuclear protein	transcriptional regulation	NM_003662	0.36
SMPDL3A	sphingomyelin phosphodiesterase, acid-like 3A	carbohydrate metabolism	NM_006714	0.36
TCEA2	transcription elongation factor A (SII), 2	transcriptional regulation	NM_003195	0.36
PDK1	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 1	carbohydrate metabolism	NM_002610	0.36
PEX6	peroxisomal biogenesis factor 6	peroxisome biogenesis	NM_000287	0.36
TNFRSF1	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19	apoptosis	NM_018647	0.36
GGCX	gamma-glutamyl carboxylase	protein modification	NM_000821	0.36
BMP2	bone morphogenetic protein 2	cytokine	NM_001200	0.37
MAP7	microtubule-associated protein 7	cytokinesis	NM_003960	0.37
TNFRSF14	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 14 (herpesvirus entry mediator)	apoptosis	NM_003820	0.37
AP1S1	adaptor-related protein complex 1, sigma 1 subunit	protein transport	NM_001283	0.37
CNR1	cannabinoid receptor 1 (brain)	signal transduction	NM_016083	0.37
HRMT1L1	HMT1 hnRNP methyltransferase-like 1 (S. cerevisiae)	protein modification	NM_206962	0.37
KCNJ2	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 2	channel/pore class	NM_000891	0.37
GFPT1	glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 1	transporter	NM_002056	0.37
CLIC3	chloride intracellular channel 3	glutamate metabolism	NM_004689	0.38
EIF2AK3	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3	ion transporter	NM_004836	0.38
GLRB	glycine receptor, beta	protein biosynthesis	NM_000824	0.38
SLC39A7	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 7	channel/pore class	NM_000879	0.38
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
TNFRSF11B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)	signal transduction	NM_002166	0.38
CD59	CD59 antigen p18-20 (antigen identified by monoclonal antibodies 16.3A5, EJ16, EJ30, EL32 and G344)	apoptosis	NM_002546	0.38
CDS2	CDP-diacylglycerol synthase (phosphatidate)	immune response	NM_203330	0.38
PHKB	phosphorylase kinase, beta	phospholipid biosynthesis	NM_003818	0.38
WARS	tryptophanyl-tRNA synthetase	carbohydrate metabolism	NM_000293	0.38
RORC	RAR-related orphan receptor C	protein biosynthesis	NM_004184	0.38
EPHX1	epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic)	transcriptional regulation	NM_005080	0.38
PTPLA	protein tyrosine phosphatase-like (proline instead of catalytic arginine), member a	xenobiotic metabolism	NM_000120	0.38
MAPK6	mitogen-activated protein kinase 6	signal transduction	NM_014241	0.38
OSTM1	osteopetrosis associated transmembrane protein 1	unknown	NM_002748	0.38
PDE1A	phosphodiesterase 1A, calmodulin-dependent	unknown	NM_014028	0.38
INSIG1	insulin induced gene 1	signal transduction	NM_005019	0.39
KAZALD1	Kazal-type serine protease inhibitor domain 1	signal transduction	NM_005542	0.39
ZMPSTE2	zinc metalloproteinase (STE24 homolog, yeast)	protein modification	NM_030929	0.39
STX3A	syntaxin 3A	protein modification	NM_005857	0.39
MMD	monocyte to macrophage differentiation-associated	protein transport	NM_004177	0.39
OAZ3	ornithine decarboxylase antizyme 3	signal transduction	NM_012329	0.39
GLP2R	glucagon-like peptide 2 receptor	signal transduction	NM_016178	0.39
EREG	epiregulin	signal transduction	NM_004246	0.39
IMMP2L	IMP2 inner mitochondrial membrane protease-like (S.	signal transduction	NM_001432	0.39
AGA	aspartylglucosaminidase	protein modification	NM_032549	0.39
CD83	CD83 antigen (activated B lymphocytes, immunoglobulin superfamily)	protein modification	NM_000027	0.40
TNFAIP1	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 1 (endothelial)	immune response	NM_004233	0.40
SEN2	SUMO1/sentrin/SMT3 specific protease 2	signal transduction	NM_021137	0.40
SNCA	synuclein, alpha (non A4 component of amyloid precursor)	unknown	NM_021627	0.40
ZBED1	zinc finger, BED domain containing 1	apoptosis	NM_012137	0.40
NMNAT1	nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 1	transcriptional regulation	NM_004729	0.40
SNAPC5	small nuclear RNA activating complex, polypeptide 5, 19kDa	NAD biosynthesis	NM_022787	0.40
		transcriptional regulation	NM_006049	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	cytokinesis	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

表7. プライマー配列

Gene	UniGene #	Mapping	Genomic clone #	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
FANCA	Hs.567267	16q24.3	AC005565	5'-GCTTGGTTGGCCAGGTGGT-3'	5'-ATGGCCTTGGEGCCTACAG-3'
FANCB	Hs.554740	Xp22.2	AC140846	5'-AGGCCCTCAGCCTAGGTCC-3'	5'-CAGCGGCAACATACCGGAG-3'
FANCC	Hs.494529	9q22.3	AL157384	5'-AAGAAGCCAGCGCCCCTTC-3'	5'-TGGAATTTTCCCGGGTTCG-3'
FANCD1	Hs.34012	13q12.3	AL445212	5'-CCACCCAAACATGAGCTGG-3'	5'-CTCTGCCGCCTAGTTTCAG-3'
FANCF	Hs.632151	11p15	AC103801	5'-AAGCGCGGAGACGTTTCATG-3'	5'-GCGATCCAGGTGCTGCAGA-3'
FANCG	Hs.591084	9p13	AC004472	5'-GTTAGTTAGGCTGCTTAC-3'	5'-TGGGTTCCCGCTTCCACCGA-3'
FANCI	Hs.532799	17q22-q24	AC060798	5'-TGGATGCCGAAGTTCTCGCC-3'	5'-GAAAGGGCACGAGCCCTCC-3'
FANCM	Hs.509229	14q21.3	AL121809	5'-GAATGAGGCACGTTAGACGC-3'	5'-AGCTCAACCGCTACGGTTC-3'
ZNF367	Hs.494557	9q22	NT_008470	5'-CGCCGGTGCCCATCAGGAC-3'	5'-GTGCCTGCCCGGCTTTTCC-3'
PSF1	Hs.658464	20p11.21	AL353812	5'-GCAGTCCCTACCAGCACTAG-3'	5'-CGGCCTTGCCAACCACTA-3'
PSF3	Hs.47125	16q21	AC009118	5'-TCCTGTCTGATGCGTCCC-3'	5'-TGCCTCCGCTCCAGGAA-3'
HBO1	Hs.21907	17q21.32	AC015795	5'-CAGGCTTCTGCCCAAAC-3'	5'-GCCTCTCAGCTCTGGAG-3'
FOXMI1B	Hs.239	12p13	AC005911	5'-AAGGCTTGGCTTCGGGAGGG-3'	5'-TCAGTTTGTTCGCTGTTG-3'
CDCA1	-	1q23.3	AL592435	5'-CAGCTCCGCGAGCAATGGTT-3'	5'-TTCCTCCGTCTCTCGCGC-3'
CDCA3	Hs.524216	12p13	U47924	5'-GCCACTCGTTAGGGGCATGC-3'	5'-GCTCAACTCCGAAGTTACC-3'
CDT2	Hs.656473	1q32.1-q32.2	NT_021877	5'-GTTTGACGCCATGACCCG-3'	5'-GCCTCCAACCTCCCGCCACT-3'
PLK1	Hs.592049	16p12.1	AC008870	5'-GAGGCCAGACAGTTCGTTG-3'	5'-CAGACCTCGATCCGAGCAGA-3'
PLK4	Hs.172052	4q28	AC107053	5'-AAGGAAGGTCTGCCGCGCAT-3'	5'-TCGAGGCAGCGCTCCAAGCA-3'
SIM2	Hs.146186	21q22.2	AP001726	5'-CGGAGCCGAGGCGCGATGAA-3'	5'-CTCACCCAGCCCTGGACCAG-3'

表8. 18遺伝子プロモーターにおけるE2F1・E2F4のChIP結果

5-FU (microM)	HeLa				WI-38			
	E2F1		E2F4		E2F1		E2F4	
	0	5	0	5	0	5	0	5
FANCA	-	-	-	-	-	-	-	-
FANCB	-	-	-	-	-	-	+	+
FANCD1	+	+	+	+	-	-	-	-
FANCF	+	+	+	+	-	-	-	-
FANCG	+	+	+	+	-	-	-	-
FANCI	+	+	+	+	-	-	-	-
FANCM	+	+	+	+	-	-	-	-
ZNF367	-	-	-	-	-	-	-	+
PSF1	+	+	+	+	-	-	-	-
PSF3	+	+	+	+	-	-	-	-
HBO1	+	+	+	+	+	+	+	+
FOXM1B	+	+	+	-	-	-	-	-
CDCA1	+	+	+	+	-	-	-	-
CDCA3	-	-	-	-	+	+	+	+
CDT2	+	+	+	+	+	+	+	+
PLK1	+	+	+	+	-	-	-	-
PLK4	+	+	+	+	-	-	-	-
SIM2	+	-	+	+	-	-	-	-
Control	-	-	-	-	-	-	-	-

VP-16 (microM)	HeLa				WI-38			
	E2F1		E2F4		E2F1		E2F4	
	0	5	0	5	0	5	0	5
FANCA	-	-	-	-	-	-	-	-
FANCB	-	-	-	-	-	-	+	+
FANCD1	+	+	+	+	-	-	-	-
FANCF	+	+	+	+	-	-	-	-
FANCG	+	+	+	+	-	-	-	-
FANCI	+	+	+	+	-	-	-	-
FANCM	+	+	+	+	-	-	+	+
ZNF367	-	-	-	-	-	+	-	+
PSF1	+	+	+	+	-	-	-	-
PSF3	+	+	+	+	-	-	-	-
HBO1	+	+	+	+	+	+	+	+
FOXM1B	+	+	+	+	-	-	-	-
CDCA1	+	+	+	+	-	-	-	-
CDCA3	-	-	-	-	+	+	+	+
CDT2	+	+	+	+	+	+	+	+
PLK1	+	+	+	+	-	-	-	-
PLK4	+	+	+	+	-	-	-	-
SIM2	+	-	+	+	-	-	-	-
Control	-	-	-	-	-	-	-	-