

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月22日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790220

 研究課題名（和文） ウイルス挿入変異法で同定された新規がん関連遺伝子 *JmjC* の機能解析

 研究課題名（英文） Functional analysis of *Jmjd5*, a candidate cancer-related gene identified by retroviral insertional mutagenesis

研究代表者

石村 昭彦 (ISHIMURA AKIHIKO)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：80375261

研究成果の概要（和文）：ウイルス感染モデルマウスを用いたスクリーニングによって、*JmjC* ファミリーに属する遺伝子の約半数が癌の原因遺伝子候補として発見された。そのうちの1つ *Jmjd5* に関して、遺伝子改変マウス (*Jmjd5*^Δ) の表現型解析を行った結果、*Jmjd5* は *p21* 遺伝子発現のエピジェネティックな制御因子の1つとして胚細胞の増殖に必須な遺伝子である事を2012年、Development誌で報告した。

研究成果の概要（英文）：Our retroviral insertional mutagenesis in mice showed frequent identification of *JmjC* family genes as novel candidates cancer-related genes. *Jmjd5*, one of the family genes, was also a target for the retrovirus, and we generated *Jmjd5*-deficient mice (*Jmjd5*^Δ) to investigate the physiological role of *Jmjd5*. We showed that *Jmjd5* was involved in embryonic cell proliferation by fine-tuning the expression of *p21* (Ishimura et al., Development 2012).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：がん生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：遺伝子発現、発生・分化、細胞増殖、癌

1. 研究開始当初の背景

エピジェネティクスとはDNA配列に依存しない遺伝子発現制御機構の1つであり、その機構の破綻は個体の異常発生や癌発症を引き起こす事が知られている。また従来の遺伝子突然変異と異なり、エピジェネティクス異常は回復可能であることから、新しい癌治療法の標的として期待されている。研究代表者が属する研究グループはこれまで、マウス白血病ウイルス感染によりリンパ腫を発症する発癌モデルマウスを用いて癌に関わる遺伝子の網羅的探索を行ってきた。その結果、*JmjC* ファミリーに属する遺伝子の約半数が癌の原因遺伝子候補として発見された。このファミリー遺伝子は、遺伝子構成因子の1つヒストン蛋白質の翻訳後修飾（=メチル化）

を調節し、遺伝子のエピジェネティックな転写制御に関わる事が明らかになっている。これまで研究代表者らは、候補となった *JmjC* ファミリー遺伝子のうち *Jmjd2c* や *Utx* が癌遺伝子 (*Mdm2*) や癌抑制遺伝子 (*Rb*, *Rbl-1*) の発現を制御していることを見出し、腫瘍発症のエピジェネティックな制御メカニズムの一端を明らかにしてきた。

また同じく *JmjC* ファミリーに属する *Jmjd5* 遺伝子についても、癌発症の原因と密接に関わる事が知られているゲノム恒常性維持やDNA修復機構に関与している可能性を報告した。最近、他の研究グループから *Jmjd5* がヒストン H3 の 36 番目リジンのジメチル化 (H3K36me2) に対するヒストン脱メチル化酵素の1つとしてヒト乳がん細胞

MCF7の増殖を制御する、という報告がなされた。しかしこれまでの *Jmjd5* の生理機能に関する研究成果は全て *in vitro* 培養細胞を用いた実験結果に由来するものであり、動物個体を用いた *Jmjd5* の研究は報告されていない。

2. 研究の目的

これまでに若手研究 B の支援で作製した *Jmjd5* 変異マウスを用いた予備的解析から、*Jmjd5* が胚発生における血管新生や細胞増殖、さらには p53 シグナル制御に関与する新しい発現調節因子の1つである可能性が示唆されている。本研究では、*Jmjd5* の個体レベルにおける役割、腫瘍発症との関連性、その作用機序を解明することを主な目的とする。

3. 研究の方法

(1) *Jmjd5* 変異マウスの作製

個体レベルでの *Jmjd5* に関する研究を行うため、Fig. 1 で示した方法で作製された *Jmjd5* コンディショナル・ノックアウトマウス (*Jmjd5^{fllox/fllox}*) を利用し、血管組織特異的 *Jmjd5* 欠損マウス (*Tie2-Cre; Jmjd5^{fllox/fllox}*) や誘導型 *Jmjd5* 欠損マウス (*Mx-Cre; Jmjd5^{fllox/fllox}*) の作製を行った。さらに *Jmjd5^{fllox/fllox}* マウスと精母細胞特異的 Cre 発現マウス (*Pgk2-Cre*) を交配させて樹立した *Jmjd5^{Δ/Δ}* の詳細な表現型解析を行った。

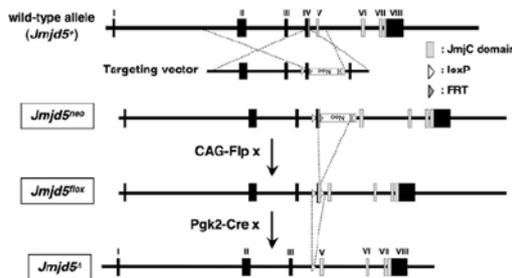


Fig. 1 *Jmjd5* コンディショナル・ノックアウトマウスの作製

(2) *Jmjd5* hypomorphic MEF の作製

細胞レベルで *Jmjd5* の機能解析を行うために、*Jmjd5* 欠損 MEFs を作製した。*Jmjd5^{Δ/Δ}* マウスは妊娠中期に胚性致死となるため、それよりも表現型異常がマイルドな *Jmjd5* hypomorphic 変異マウス (*Jmjd5^{neo/neo}*) より MEFs を樹立した。

4. 研究成果

(1) *Jmjd5^{Δ/Δ}* マウスの表現型解析

Jmjd5^{Δ/Δ} マウス同士の交配によって得られた *Jmjd5^{Δ/Δ}* マウスは、胎生 11 日目後に著しい成長阻害を呈して胚性致死となった。このとき *Jmjd5^{Δ/Δ}* 胚では、心臓浮腫や出血、卵黄膜状を走行する血管分布パターンの異

常といった、典型的な血管新生異常を示した。詳細な表現型解析を行った結果、胎生 7.5 日目以降に初めて成長阻害異常が観察され、胎生 9 日目には明らかな発生の遅れが認められた (Fig. 2)。

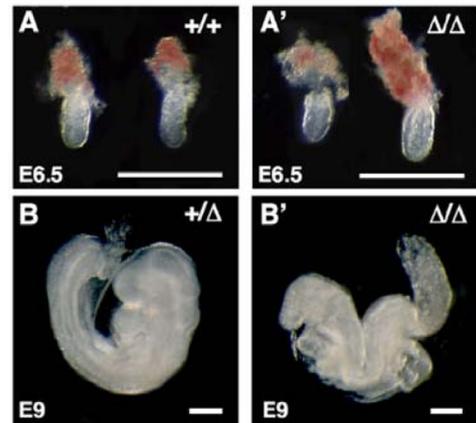


Fig. 2 *Jmjd5^{Δ/Δ}* マウスの表現型観察
胎生 6.5 日目と 9 日目について、コントロール胚 (A and B) と欠損胚 (A' and B') の表現型を比較した。

次に胚性致死の原因が血管新生の異常に起因するか調べるために、*Tie2-Cre; Jmjd5^{fllox/fllox}* マウスの表現型を観察した。その結果、血管特異的に *Jmjd5* を欠損させても胚発生に全く異常が観察されなかった。従って *Jmjd5^{Δ/Δ}* 胚における胚性致死の原因は、血管新生異常でなく、細胞レベルの増殖異常に起因する可能性が示唆された。尚、*Tie2-Cre; Jmjd5^{fllox/fllox}* 成体マウスで腫瘍発症等の異常が観察されるか、継続して飼育中である。

(2) *Jmjd5* hypomorphic MEF を用いた機能解析

Jmjd5 欠損による影響を細胞レベルで調べるために、*Jmjd5^{neo/neo}* MEFs を樹立した。野生型 MEFs との増殖能を比較した結果、*Jmjd5^{neo/neo}* MEFs の増殖能は有意に低下していた。*Jmjd5^{neo/neo}* MEFs における細胞増殖能低下の原因が、アポトーシスや細胞老化の誘発による二次的な影響か検討するために、抗

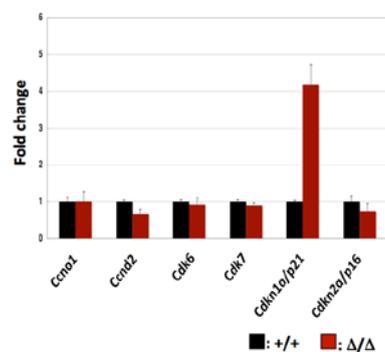


Fig. 3 *Jmjd5^{Δ/Δ}* 胚における遺伝子発現
胎生 8.25 日目の野生型 (黒) と *Jmjd5^{Δ/Δ}* 胚 (赤) について細胞増殖調節因子の発現を定量 PCR 解析によって調べた。

single strand DNA 抗体を用いた免疫染色実験や Senescence-associated β -gal 染色実験を行った。その結果、*Jmjd5*^{neo/neo} MEFs ではアポトーシスや細胞老化が誘導されていなかった。

次に様々な細胞周期調節因子の発現量を定量 PCR 法によって網羅的に比較した結果、*Jmjd5* ^{Δ / Δ} 胚と *Jmjd5*^{neo/neo} MEFs で *p21* (*Cdkn1a*) の発現が著しく上昇していた (Fig. 3)。この細胞増殖低下は、*p21* 特異的 siRNA によって *Jmjd5*^{neo/neo} MEFs 内の *p21* 発現をノックダウンさせたとき有意に回復した。以上より、*Jmjd5* は細胞自律的に *p21* の発現を制御することで、正常胚細胞の増殖を調節していることが強く示唆された。

p21 が *Jmjd5* の直接的なターゲットの 1 つであるかを調べるために、抗 *Jmjd5* 抗体を用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイを行った。また同時に、抗 H3K36me3 抗体を用いた ChIP アッセイによって *p21* 遺伝子座上のヒストンメチル化の性状を調べた。その結果、*Jmjd5*^{neo/neo} MEFs 由来 *p21* 遺伝子座上では、*Jmjd5* 蛋白質のリクルートの減少と H3K36me2 レベルの上昇が観察された (Fig. 4)。このことから、*Jmjd5* は *p21* 遺伝子座上のヒストンメチル化修飾の性状を負に制御することで、胚細胞の正常な増殖に貢献している可能性が示唆された。

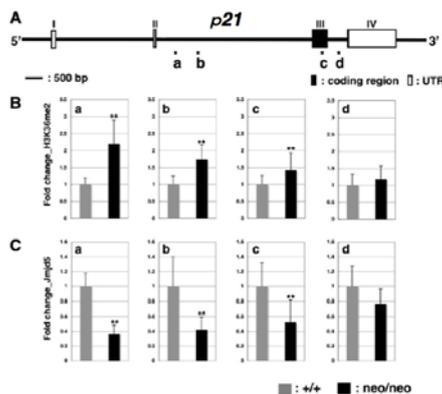


Fig. 4 クロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイ *p21* 遺伝子座上 (A) における H3K36 のメチル化の性状 (B) と内在性 *Jmjd5* 蛋白質のリクルート (C) の変化を、野生型 (灰) と *Jmjd5*^{neo/neo} MEFs (黒) 間で比較した。

(3) *p21* 欠損マウス (*p21* ^{Δ / Δ}) を用いた遺伝学的解析

Jmjd5^{neo/neo}; *p21* ^{Δ / Δ} MEFs を作製し、その増殖能を調べた。その結果、*p21* ^{Δ / Δ} の遺伝学的背景で *Jmjd5*^{neo/neo} MEFs の細胞増殖能は、ノックダウン実験と同様に著しく回復した。一方 *Jmjd5* ^{Δ / Δ} ; *p21* ^{Δ / Δ} ダブル欠損胚を作製したとき、*Jmjd5* ^{Δ / Δ} マウスで観察された成長阻害異常が部分的にレスキューされている事を確認した (Fig. 5)。従って、胎児の生存に重要な *p21* 以外の *Jmjd5* 標的遺伝子の存在が本研究によって新たに示唆された。

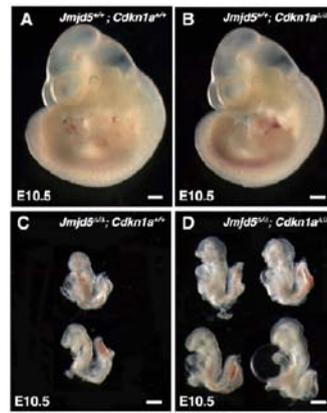


Fig. 5 *Jmjd5* ^{Δ / Δ} ; *p21* ^{Δ / Δ} ダブル欠損マウスの表現型観察

(4) *p53* 欠損マウス (*p53* ^{Δ / Δ}) を用いた遺伝学的解析

p21 の発現亢進が、主要な *p21* 発現誘導因子の 1 つである *p53* の発現量変化に起因しているか検討した。その結果、*p53* 遺伝子由来の mRNA と蛋白質の発現上昇は、*Jmjd5* ^{Δ / Δ} 胚および *Jmjd5*^{neo/neo} MEF、どちらでも認められなかった (Fig. 6)。また *p53* 応答性ルシフェラーゼ解析の結果も同様に、*p53* 転写活性の変化が観察されなかった。よって *Jmjd5* 変異細胞における *p21* の発現上昇は、内在性 *p53* 遺伝子の発現誘導を介さずに引き起こされる可能性が示唆された。今後、内在性 *p53* 蛋白質の *p21* 遺伝子座へのリクルートが *Jmjd5*^{neo/neo} MEF で変化しているか ChIP アッセイによって検討する予定である。同時に内在性 *Jmjd5* と *p53* 間の直接的な分子間相互作用を、抗 *Jmjd5* 抗体または抗 *p53* 抗体を用いた免疫沈降実験によって確認する。さらに *Jmjd5* ^{Δ / Δ} 胚や *Jmjd5*^{neo/neo} MEFs 間で、転写活性に重要な *p53* の翻訳後修飾 (リン酸化など) に変化が生じているかを、ウェスタンブロット解析によって確認する予定である。

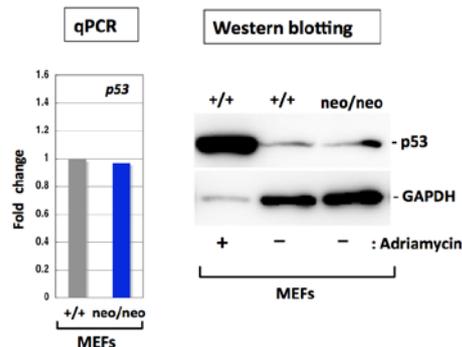


Fig. 6 *Jmjd5*^{neo/neo} MEFs における内在性 *p53* の発現

興味深いことに研究代表者は、既知の *p53* 下流標的遺伝子の幾つかについて定量 PCR 解析を行った結果、*Jmjd5* ^{Δ / Δ} 胚および *Jmjd5*^{neo/neo} MEF の両方で *p21* 以外の複数の *p53* 下流標的遺伝子の発現が *p21* と共に上昇していることを発見した。また *p53* 遺伝子を

同時に欠損させたとき (*Jmjd5^{neo/neo}; p53^{ΔQ4}*)、*Jmjd5^{neo/neo}* MEFs で観察された細胞増殖抑制能は野生型並に回復した。以上より、*Jmjd5* が p53 シグナル全般を調節する新しい調節因子の 1 つである可能性が示唆された。今後、*Jmjd5* と *p53* のダブル欠損マウス (*Jmjd5^{ΔQ4}; p53^{ΔQ4}*) の表現型観察や発現プロファイル解析等を利用して *Jmjd5* が制御する p53 下流標的遺伝子のスクリーニングを行う予定である。そして、*Jmjd5* による p53 下流遺伝子の新しい発現制御機構を解明し、*Jmjd5* の個体レベルにおける役割や癌発症シグナルとの関係性を明らかにしていきたい。

(5) *Jmjd5* とがん発症との関係

Jmjd5^{ΔQ4} マウスは胚性致死のため、成体マウスにおける *Jmjd5* と腫瘍発症の関係性を検証出来ない。よってインターフェロン誘導型 *Jmjd5* 欠損マウス、*Mx-Cre; Jmjd5^{flox/flox}* マウスを利用して上記の可能性を検討した。この変異マウスは任意の時期に pI-pC 処理を行うことで特に肝臓や造血組織で効率よく目的の遺伝子を欠損させることができる。期待に反して、pI-pC 処理を施した *Mx-Cre; Jmjd5^{flox/flox}* マウスでがん発症は全く観察されなかった。さらに既存のがん発症モデルである *p53* 欠損マウスと交配させた *Mx-Cre; Jmjd5^{flox/flox}; p53^{ΔQ4}* マウスでも同様のネガティブな結果であった。しかし成体マウス臓器に関して内在性 *Jmjd5* の発現パターンを定量 PCR によって調べた結果、様々な成体組織で *Jmjd5* の発現が観察された。従って、より広範囲な成体組織で目的の遺伝子を欠損させることが可能な tamoxifen 誘導型 *Jmjd5* コンディショナル・ノックアウトマウス (*ER-Cre; Jmjd5^{flox/flox}*) を作製し、*Jmjd5* とがん発症の関係性を今後検討する予定である。

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 2 件)

① Ishimura A, Minehata K, Terashima M, Kondoh G, Hara T and Suzuki T. *Jmjd5*. an H3K36me2 histone demethylase, modulates embryonic cell proliferation through the regulation of *Cdkn1a* expression. *Development* 139, 749-759, 2012. 査読有 DOI: 10.1242/dev.074138

② Yoshida M, Ishimura A, Terashima M, Enkhbaatar Z, Nozaki N, Satou K and Suzuki T. PLU1 histone demethylase decreases the expression of *KAT5* and enhances the invasive activity of the cells. *Biochemical J.*, 437, 555-564, 2011. 査読有

DOI: 10.1042/BJ20110343

[学会発表] (計 5 件)

① Ishimura A. *Jmjd5*, a JmjC domain containing protein, modulates embryonic cell proliferation through the regulation of p53-target genes expression. 3rd International Symposium on Carcinogenic Spiral and International Symposium in Tumor Biology in Kanazawa. 2013.1.25, 金沢東急エクセルホテル (石川県)

② Ishimura A, Minehata K, Terashima M, Kondoh G, Hara T and Suzuki T. *Jmjd5*, an H3K36me2 histone demethylase, modulates embryonic cell proliferation through the regulation of p53-target genes expression. 第 35 回分子生物学学会年会, 2012.12.13, 福岡国際会議場 (福岡県)

③ Ishimura A, Minehata K, Terashima M, Kondoh G, Hara T and Suzuki T. *Jmjd5*, which is identified by retroviral insertional mutagenesis, regulates embryonic cell proliferation through the epigenetic control of *Cdkn1a*. 第 34 回分子生物学学会年会, 2011.12.13, パシフィコ横浜 (神奈川県)

④ Ishimura A, Minehata K, Terashima M, Hara T and Suzuki T. *Jmjd5*, a candidate cancer-related gene identified by retroviral insertional mutagenesis, regulates the expression of *Cdkn1a* and modulates embryonic cell proliferation. International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa and the 11th Spring Symposium of the Molecular Biology Society of Japan, 2011 年 5.25, 石川県立音楽堂 (石川県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石村 昭彦 (ISHIMURA AKIHIKO)
金沢大学・がん進展制御研究所・助教
研究者番号: 80375261

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし