

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460266

研究課題名(和文)がん関連遺伝子Jmjd5の新しい遺伝子発現制御機構の解明

研究課題名(英文)A novel role of Jmjd5, a candidate cancer-related gene, during mouse embryogenesis

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

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)：Jumonji C (JmJC)ファミリーに属するJmjd5は、ウイルス感染発がんモデルマウスを用いたスクリーニングによってがん関連遺伝子候補として同定された。これまで私たちは、Jmjd5欠損マウスを用いて細胞増殖抑制因子Cdkn1aの発現を制御することを報告した。本研究では、より詳細な実験の結果、主要ながん抑制遺伝子p53と直接結合することでp53蛋白質の標的遺伝子座へのリクルートを負に制御することを発見した。マウス胚発生においてp53の発現は翻訳レベルで厳密に抑えられていることが知られている。Jmjd5は発生期のp53シグナル抑制機構の一端を担う、新しい遺伝子である可能性が強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：We previously identified Jmjd5 as a candidate cancer-related gene by retroviral mutagenesis. Jmjd5 belongs to Jumonji C (JmJC) family, some of which encode histone demethylase. Our genetic studies using Jmjd5 deficient mice showed that Jmjd5 was a regulator for Cdkn1a expression during mouse embryogenesis. In this study, we found that a subset of p53-regulated genes highly expressed in Jmjd5 knockout embryos. We also showed that Jmjd5 protein could directly associate with p53 protein, one of the most famous tumor suppressor genes, and inhibited the recruitment of endogenous p53 protein at several p53 target loci such as Cdkn1a, Pmaip1 and Mdm2. In general, aberrant activation of p53 signaling leads to embryonic lethality, suggesting that maintaining a fine balance of p53 translational level is important for normal development. Thus, Jmjd5 may keep basal level of p53 signaling in embryonic cells through the control of p53 recruitment at its target genes.

研究分野：がん生物学

キーワード：遺伝子 発生・分化 細胞増殖 がん

1. 研究開始当初の背景

私たちの研究グループはレトロウイルス挿入変異法を用いて、がんに関係する遺伝子の網羅的スクリーニングを行ってきた。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した。このファミリー遺伝子は哺乳類で約30種類報告されているが、その多くは「ヒストン脱メチル化酵素」をコードし、ヒストンのメチル化修飾を調節することで標的遺伝子のエピジェネティックな遺伝子発現制御に関わっている事が明らかとなっている。

これまで私たちは、Jmjcファミリー遺伝子のひとつ *Jmjd5* について、その欠損マウス (*Jmjd5*^{-/-}) の解析を行ってきた。表現型観察の結果、*Jmjd5*^{-/-} 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*^{-/-} 胚では、細胞増殖抑制因子 *Cdkn1a* の発現が亢進していた。次に内在性 *Jmjd5* の発現が約75%低下している *Jmjd5* hypomorphic MEFs (*Jmjd5*^{neo/neo}) を作製し、細胞レベルの解析を試みた。*Jmjd5*^{neo/neo} MEFs の細胞増殖能は野生型 MEFs と比べて低下していた。クロマチン免疫沈降 (ChIP) 実験の結果、*Jmjd5*^{neo/neo} MEFs では *Cdkn1a* 遺伝子座で内在性 *Jmjd5* 蛋白質のリクルートが減少し、ヒストン H3 の 36 番目リジン残基のメチル化修飾が有意に上昇していた。よって *Jmjd5* は、*Cdkn1a* 遺伝子のエピジェネティックな発現制御因子のひとつとして、マウス胚発生に必須な遺伝子であることが示された (Ishimura et al., Development 139, 2012)。しかし *Cdkn1a* を *Jmjd5* と同時にノックアウト (*Jmjd5*^{-/-}; *Cdkn1a*^{-/-}) したとき胎児の発育不全は部分的にのみ解消されたことから、胎児の生存に重要な「*Cdkn1a* 以外の *Jmjd5* 標的遺伝子」の存在が新たに示唆されている。

2. 研究の目的

本研究では、*Cdkn1a* 以外の *Jmjd5* 標的遺伝子を同定し、マウス胚発生における *Jmjd5* の新しい遺伝子発現制御機構を遺伝学的・分子生物学的手法を用いて明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 定量PCR法

Jmjd5^{-/-} 胚および *Jmjd5*^{neo/neo} MEFs より total RNA を抽出し、cDNA を合成する。そして *Cdkn1a* を含む代表的な 16 種類の p53 下流標的遺伝子の発現パターンを定量PCRによって検出する。

(2) *Jmjd5*; *Trp53* ダブル変異マウスの作製

これまで私たちが作製した *Jmjd5*^{+/-} マウスに *Trp53* 欠損マウスを交配させる。そして *Jmjd5*^{-/-}; *Trp53*^{-/-} マウスの表現型観察を行う。また *Jmjd5*^{neo/+} マウスと *Trp53* 欠損マウスを交配させ、*Jmjd5*^{neo/neo}; *Trp53*^{-/-} MEFs

を樹立する。そして、その増殖能を野生型や *Jmjd5*^{neo/neo} MEFs と比較する。

(3) ChIP アッセイ

抗 p53 抗体を用いた ChIP アッセイを行う。そして *Cdkn1a*, *Pmaip1*, *Mdm2* 遺伝子座への内在性 p53 蛋白質のリクルートを野生型 MEFs と *Jmjd5*^{neo/neo} MEFs 間で比較する。

(4) 免疫沈降実験

HEK293T 細胞内で HA 標識した p53 蛋白質 (HA-p53) と FLAG 標識した *Jmjd5* 蛋白質 (*Jmjd5*-F) を一過性発現させ、蛋白質ライセートを回収する。そして抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降を行い、このとき HA-p53 蛋白質が共沈されるかどうか調べる。

4. 研究成果

(1) p53 下流標的遺伝子の発現パターン

まず初めに、*Jmjd5*^{neo/neo} MEFs 内で *Cdkn1a* の主要な発現制御因子のひとつである p53 下流標的遺伝子の発現パターンも変化しているかを定量PCR法によって調べた。その結果、*Cdkn1a* のみならず複数の下流標的遺伝子 (例; *Pmaip1* や *Mdm2*) の発現も同時に上昇していた (図1)。また *Jmjd5*^{-/-} 胚でも同様な結果を得ることが出来た (図2)。よって *Jmjd5* は、マウス胚発生過程で *Cdkn1a* のみならず、より広範な p53 シグナルを制御してい

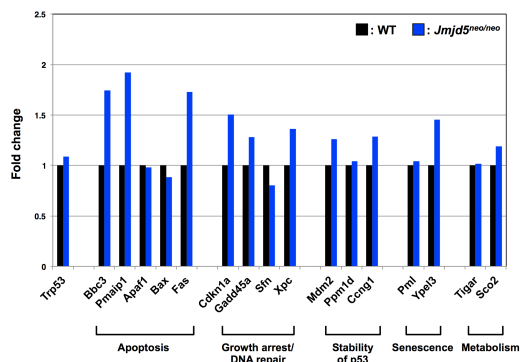


図1 *Jmjd5* hypomorphic MEFs における p53 標的遺伝子の発現パターン
野生型 (WT) と *Jmjd5* hypomorphic MEFs (*Jmjd5*^{neo/neo}) における発現量を定量PCR法によって検出した。

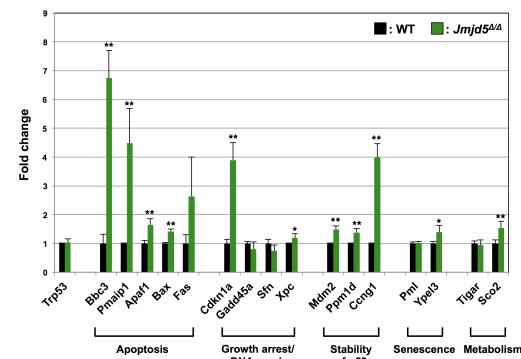


図2 *Jmjd5* 欠損胚における p53 標的遺伝子の発現パターン
野生型 (WT) と *Jmjd5* 欠損胚 (*Jmjd5*^{Δ/Δ}) における発現量を定量PCR法によって検出した。

る可能性が示唆された。

(2) *Jmjd5*; *Trp53* ダブル変異マウスを用いた解析

次に *Jmjd5*^{neo/neo} MEFs で観察された細胞増殖能の低下が、*Trp53*^{-/-} 遺伝学的背景下で回復されるか調べた。その結果、*Jmjd5*^{neo/neo}; *Trp53*^{-/-} MEFs の細胞増殖曲線は野生型 MEFs とほぼ同様な曲線パターンを示した (図 3)。

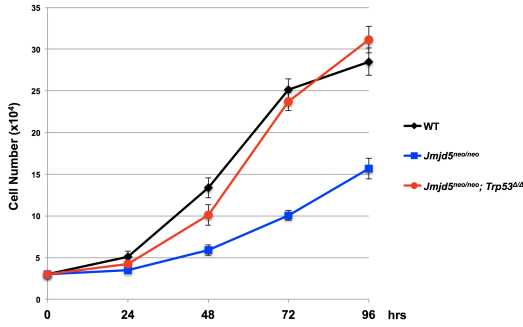


図3 *Jmjd5*; *Trp53* ダブル変異 MEFs の増殖曲線
野生型 (WT) と *Jmjd5*^{neo/neo}、ダブル変異 MEFs (*Jmjd5*^{neo/neo}; *Trp53*^{-/-}) を 12-ウェルプレートに 3 × 10⁴ 細胞を播き、24時間毎に細胞数をカウントした。

一方、*Jmjd5*^{-/-}; *Trp53*^{-/-} 胚の表現型観察を行った。その結果、*Jmjd5*^{-/-} 胚で観察された表現型異常 (成長阻害) が著しく回復していた (図 4)。以上より、*Jmjd5* と *Trp53* 間で非常に強い遺伝学的相互作用が認められた。しかしダブル欠損胚で表現型回復が確認された一方、*Jmjd5*^{-/-} 胚と同様に胚性致死を呈する。よって p53 シグナル制御以外の未知の *Jmjd5* 制御因子の存在も同時に示唆された。

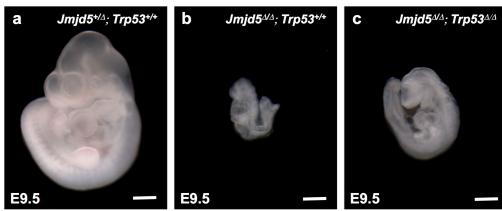


図4 *Jmjd5*; *Trp53* ダブル欠損マウスの表現型観察
胎生 9.5 日目、コントロール (a)、*Jmjd5*^{-/-} 欠損胚 (b)、*Jmjd5*; *Trp53* ダブル欠損胚 (c) の表現型を観察した。スケール・バーの長さは、600 μm。

(3) *Jmjd5* による p53 シグナル制御機構

これまでの研究成果から、*Jmjd5*^{-/-} 胚や *Jmjd5*^{neo/neo} MEFs で *Trp53* 遺伝子の発現誘導は転写・翻訳レベルで観察することが出来なかった (Ishimura et al., 2012)。そこで私たちは、*Jmjd5* が p53 蛋白質の標的遺伝子座へのリクルートを制御する可能性を検討した。抗 p53 抗体を用いた ChIP アッセイの結果、内在性 p53 蛋白質の *Cdkn1a*、*Pmaip1*、*Mdm2* 遺伝子座へのリクルートが *Jmjd5*^{neo/neo} MEFs で有意に上昇していた (図 5b、5c、6)。しかし抗 *Jmjd5* 抗体を用いた ChIP アッセイの結果、内在性 *Jmjd5* 蛋白質は *Cdkn1a* 遺伝子座内の p53 結合ドメイン内にリクルートされていなかった (図 5d)。次に HEK293T 細胞内で

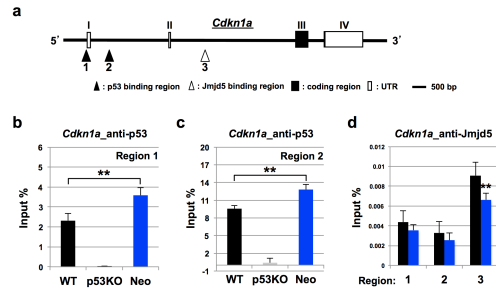


図5 *Cdkn1a* 遺伝子座における内在性 p53 および *Jmjd5* 蛋白質のリクルート
(a) *Cdkn1a* 遺伝子座の構成。▲は内在性 p53 蛋白質の結合領域。△は内在性 *Jmjd5* 蛋白質の結合領域。(b、c) 抗 p53 抗体を用いた ChIP 解析によって野生型 (WT)、*Trp53* 欠損 (*p53*KO)、*Jmjd5*^{neo/neo} MEFs (Neo) における内在性 p53 蛋白質のリクルートを比較した。(d) 抗 *Jmjd5* 抗体を用いた ChIP 解析によって内在性 *Jmjd5* 蛋白質のリクルートを調べた。

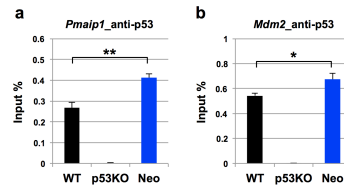


図5 抗 p53 抗体を用いたクロマチン免疫沈降実験
Pmaip1 (a) および *Mdm2* (b) 遺伝子座での内在性 p53 蛋白質のリクルートを野生型 (WT)、*Trp53* 欠損 (*p53*KO)、*Jmjd5*^{neo/neo} MEFs (Neo) 間で比較した。

HA-p53 蛋白質と *Jmjd5*-F 蛋白質を共発現させ、両者の蛋白質間相互作用を免疫沈降実験によって調べた。その結果、両蛋白質間で直接的な結合能が観察することが出来た (図 7)。しかしポジティブ・コントロールとして用いた p53 結合蛋白質 LSD1 と p53 蛋白質間の相互作用に比べると、その結合は弱いものだった。このことから、生体内における *Jmjd5* 蛋白質と p53 蛋白質の結合には、両者の結合を仲立ちする未知のコファクター X の存在が示唆された。

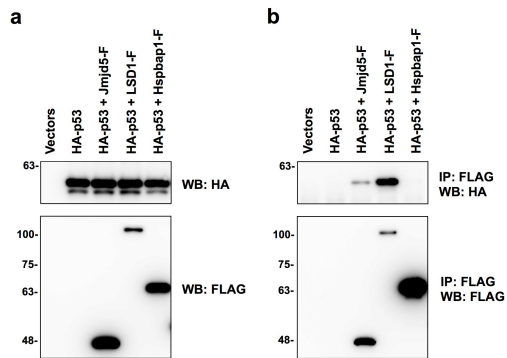


図7 抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降
HEK293T 細胞で HA-p53 と *Jmjd5*-F、LSD1 (ポジティブ・コントロール)、もしくは *Hspbap1*-F (ネガティブ・コントロール) を共発現させ、抗 HA 抗体、抗 FLAG 抗体で検出した (a)。そして抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降を行い、HA-p53 蛋白質が共沈されるか調べた (b)。

以上の研究結果から、*Jmjd5* は p53 蛋白質と相互作用することで p53 シグナルを負に制御する、新しい「p53 制御因子」としてマウス胚発生に必須な遺伝子のひとつであるこ

とが明らかになり、本研究成果は 2016 年に Cell and Tissue Research 誌に掲載された。

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 5 件)

Oktyabri D, Ishimura A, Tange S, Terashima M, Suzuki T. DOT1L histone methyltransferase regulates the expression of BCAT1 and is involved in sphere formation and cell migration of breast cancer cell lines. *Biochimie* 123, 20-31 (2016) 査読有り。
DOI: 10.1016/j.biochi.2016.01.005.

Ishimura A, Terashima M, Tange S, Suzuki T. Jmjd5 functions as a regulator of p53 signaling during mouse embryogenesis. *Cell Tissue Res.* 363, 723-733 (2016) 査読有り。
DOI: 10.1007/s00441-015-2276-7.

Tange S, Oktyabri D, Terashima M, Ishimura A, Suzuki T. JARID2 is involved in transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition of lung and colon cancer cell lines. *PLoS One* 9 (12): e115684 (2014) 査読有り。
DOI: 10.1371/journal.pone.0115684.

Oktyabri D, Tange S, Terashima M, Ishimura A, Suzuki T. EED regulates epithelial-mesenchymal transition of cancer cells induced by TGF- β . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 453, 124-130 (2014) 査読有り。
DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.09.082.

Enkhbaatar Z, Terashima M, Oktyabri D, Tange S, Ishimura A, Yano S, Suzuki T. KDM5B histone demethylase controls epithelial-mesenchymal transition of cancer cells by regulating the expression of the microRNA-200 family. *Cell Cycle* 12, 2100-2012 (2013) 査読有り。
DOI: 10.4161/cc.25142.

[学会発表](計 6 件)

Ishimura A, Terashima M, Tange S and Suzuki T. 「JmJC ドメイン蛋白質 Jmjd5 は、マウス胚発生期の p53 シグナルを負に制御する」第 38 回分子生物学学会年会(神戸、2015 年 12 月)

Ishimura A, Tange S, Terashima M and Suzuki T. 「Identification of JmJC family genes involved in breast cancer

malignancies.」第 74 回日本癌学会学術総会(名古屋、2015 年 10 月)

Ishimura A, Tange S, Oktyabri D, Terashima M and Suzuki T. 「Screening of Histone Modifying Enzymes Involved in Cancer Malignancies.」第 37 回分子生物学学会年会(横浜、2014 年 11 月)

Ishimura A, Tange S, Oktyabri D, Enkhbaatar Z, Hara T, Suzuki T. 「Physiological role of Jmjd5, a novel p53 signal regulator, in embryonic development.」International Symposium in Tumor Biology in Kanazawa & Symposium on Drug Discovery in Academics.(金沢、2014 年 1 月)

Ishimura A, Tange S, Oktyabri D, Enkhbaatar Z, Hara T and Suzuki T. 「Novel function of Jmjd5, a member of the JmJC family, in the expression of p53-related genes.」第 36 回分子生物学学会年会(神戸、2013 年 12 月)

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.(金沢、2013 年 1 月)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ

<http://ganken.cri.kanazawa-u.ac.jp/Genomics/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

石村 昭彦 (ISHIMURA AKIHIKO)

金沢大学・がん研究所・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