

## ヒトがん細胞における *JMJD3* 遺伝子の発現調節機構の解析

先端生命科学専攻 がん先端生命科学分野

学生番号 47-106304 天野 芳隆

指導教員 落合 淳志

キーワード : *JMJD3*、がん、遺伝子発現、プロモーター

### <序論>

がん化やがんの悪性化は様々な遺伝子発現の異常によりおこるとされている。そしてがんの発生・進展に塩基配列の変化を伴わないエピジェネティックな遺伝子発現変化が関わっていることが分かってきている。当研究室でもこれまでに、ヒストンメチル化酵素の *EZH2* に着目し研究がなされてきた。*EZH2* はヒストンのコアタンパク質である H3 の 27 番目のリジン(H3K27) をメチル化し、その領域にある遺伝子の転写を抑制する。また *EZH2* はがん細胞において正常細胞と比較して発現が高く、がん患者の予後不良と *EZH2* の高発現が相関するとの報告がされている。

近年、*EZH2* とは反対に H3K27 特異的に脱メチル化反応を行う酵素である *JMJD3* が同定された。*JMJD3* はがん抑制遺伝子である p16 の発現上昇に関与すること、胚発生に関わる遺伝子の発現を調節することがわかっている。また、これまでに *JMJD3* には、①マクロファージや線維芽細胞での転写開始点 (MF-TSS)、②幹細胞で働く転写開始点 (ESC-TSS)、の 2 種類の存在が報告されている。しかし、ヒトがん細胞において *JMJD3* 遺伝子のどちらの転写開始点の上流領域がプロモーターとして機能し、どの転写因子により発現調節がされているかに関しては明らかになっていない。本研究の目的は、がん細胞において *JMJD3* 遺伝子の 2 種類の転写開始点 MF-TSS、ESC-TSS の上流領域がプロモーターとして機能するかについての解析を行い、*JMJD3* 遺伝子の発現調節機構明らかにすることである。

### <結果>

#### (1) ESC-TSS 及び MF-TSS の上流領域のシーケンシング

ESC-TSS 及び MF-TSS 上流領域をクローニングする際に、ESC-TSS 上流領域ではデータベース上に存在しない塩基配列が確認され、その塩基配列を決定した。また MF-TSS 上流領域はデータベース上の配列と一致した。

#### (2) ESC-TSS 及び MF-TSS 上流領域のデュアルルシフェラーゼアッセイ

がんにおける *JMJD3* 遺伝子の発現に対する活性を測定するため、*JMJD3* 遺伝子の 2 種類の転写開始点上流領域を用いてデュアルルシフェラーゼアッセイを行った。ESC-TSS 上流領域の主なプロモーター活性は -46~+43 bp の間にあることがわかり、その領域の配列を解析すると CREB, p300,

AML-1a の結合配列が含まれていた (図 1)。同様に MF-TSS 上流領域では、MF-3423 プラスミド

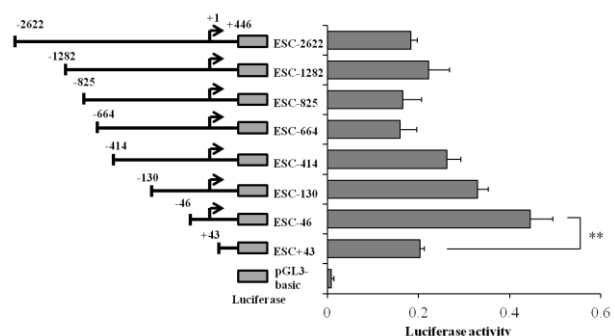


図 1. ESC-TSS 上流領域のデュアル

ルシフェラーゼアッセイの結果 \*\*: p<0.01

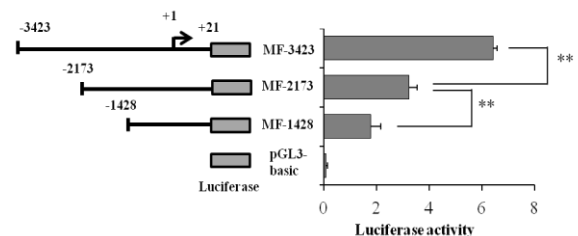


図 2. MF-TSS 上流領域のデュアル

ルシフェラーゼアッセイの結果 \*\*: p<0.01

で最もプロモーター活性が高く、MF-2173 では活性が大きく変化した。このことから-3423 ~ -2173 bp の間に促進的に働く転写因子の結合が示唆され、その領域を解析すると GATA-1, GATA-3, p300, Sp1, AP-1, Oct-1, Evi-1 の結合配列が含まれていた (図 2)。

### (3) *JMJD3* 遺伝子の各エクソン別の mRNA 発現量についての解析

*JMJD3* 遺伝子の各エクソンのプライマーを作製し、定量的 RT-PCR を行った。その結果、がん細胞では Exon 1 mRNA が発現していることがわかった。

### (4) MEK 阻害剤を用いた *JMJD3* mRNA の発現量及びデュアルルシフェラーゼアッセイの活性値の変化について

*JMJD3* とは反対の酵素機能をもつ *EZH2* 遺伝子の発現が、MEK/ERK 経路によって制御されていることからがわかっていて。そこで *JMJD3* 遺伝子への MEK/ERK 経路の関与を調べるため、MEK 阻害剤を作用させ mRNA の発現量の変化を解析した。その結果、各エクソンで発現量が有意に減少した(図 3)。

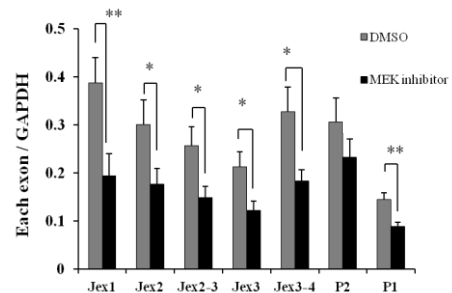


図 3. MEK 阻害剤による各エクソンの *JMJD3* mRNA の発現量の変化

\*:  $p < 0.05$  \*\*:  $p < 0.01$

また、*JMJD3* 遺伝子上流領域において予測された転写因子が実際に作用しているか確認するために MDA-MB-231 細胞を用い、MEK 阻害剤を作用させ、*JMJD3* 遺伝子のプロモーター活性の変化を解析した。その結果 ESC-46, ESC-130, MF-3423 及び MF-2173 のプラスミドを用いた際、MEK 阻害剤処理により活性値が有意に減少した (図 4)。

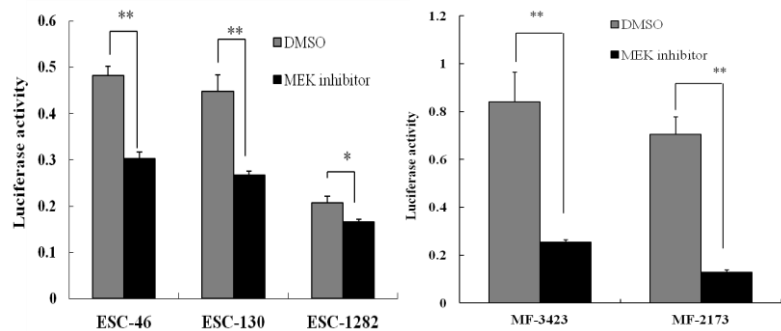


図 4. MEK 阻害剤処理による ESC-TSS 上流領域及び MF-TSS 上流領域のデュアルルシフェラーゼアッセイ \*:  $p < 0.05$  \*\*:  $p < 0.01$

### <考察>

本研究では、*JMJD3* 遺伝子の ESC-TSS 上流領域にデータベース上にない塩基配列の存在を確認し、塩基配列を決定した。がん細胞における各エクソンの *JMJD3* mRNA の発現量の解析結果から、ESC-TSS 上流領域がプロモーターとして機能していることが示唆された。また ESC-TSS 上流領域及び MF-TSS 上流領域を組み込んだコンストラクトプラスミドによるデュアルルシフェラーゼアッセイの解析結果から、どちらもプロモーターとしての機能を有していることがわかった。さらに MEK 阻害剤処理に対して、ルシフェラーゼの活性値が減少し、各エクソンの *JMJD3* mRNA の発現量も減少したことから、*JMJD3* 遺伝子のプロモーター領域に MEK/ERK 経路を介する促進性の転写因子の結合が示唆された。

### <結論>

がん細胞では ESC-TSS, MF-TSS の上流領域が共にプロモーターとして機能を有している可能性を示した。