

その他

3T3-L1脂肪細胞におけるcAMP系によるZHX2遺伝子の 発現誘導機構の解析と標的遺伝子の検索

山田 一哉・三崎 紀展・吉田 瀬七・小野 萌・田中 高志・冨田 晃司

An Analysis of the Inductive Mechanisms of the *ZHX2* Gene Expression in 3T3-L1
Adipocytes and Exploration of the Target Genes

YAMADA Kazuya, MISAKI Toshinori, YOSHIDA Sena, ONO Moe,
TANAKA Takashi, and TOMITA Koji

要 旨

Zinc-fingers and homeoboxes (ZHX) ファミリータンパク質は、N-末端から2つの zinc-finger モチーフと5つの homeodomain を有する転写抑制因子であり、ZHX1、ZHX2、ZHX3の3種のアイソフォームが存在する。これらのうちZHX2は細胞増殖関連遺伝子の転写を促進する転写因子 nuclear factor-Y (NF-Y) のAサブユニットと相互作用して転写を抑制する。また、多くのがん細胞で悪性度が高くなるにつれてZHX2遺伝子の発現が低下していることが報告されているが、正常細胞での発現や標的遺伝子に関する研究はなされていない。

本研究では、正常細胞のマウス3T3-L1脂肪細胞でcAMP系シグナルによりZHX2遺伝子の発現が上昇することを見いだした。

キーワード

Nuclear factor-Y ZHXファミリー cAMPシグナル 遺伝子発現 3T3-L1脂肪細胞

目 次

I. はじめに

II. cAMPシグナル系によるZHXファミリー遺伝子の発現制御

謝辞

文献

I. はじめに

Nuclear factor-Y (NF-Y) は普遍的に発現している転写因子であり、細胞増殖に関与する多くの遺伝子のプロモーター上に存在している Ybox 配列 (5'-ATTGG-3') に結合して転写を促進する¹⁾。NF-Y は NF-YA、NF-YB、NF-YC のヘテロ3量体から構成される。私どもは、これらのうち転写因子としての機能に最も重要な NF-YA に結合する因子として Zinc-fingers and homeoboxes (ZHX) 1 をクローニングした^{2,3)}。ZHX1 は、マウスで特定のモノクローナル抗体が認識する核内抗原としてクローニングされていたが、生理的役割等については不明であった⁴⁾。しかし、私どもは、ZHX1 がホモ二量体を形成して転写抑制因子として機能することを明らかにした⁵⁾。

一般的に、転写因子は他の転写因子等と相互作用することにより複雑な転写因子ネットワークを構築し、標的遺伝子の発現を制御している。ZHX1 と相互作用する因子を探索するために、酵母のツーハイブリッド法を用いてヒト肝 cDNA ライブラリーをスクリーニングしたところ、ZHX1 に加えて、ZHX1 と構造的に類似した2種類の転写因子をクローニングし、それぞれ ZHX2 および ZHX3 と命名した^{6,7)}。これらのことから、ZHX1 は ZHX2 や ZHX3 とヘテロ二量体を形成することが明らかになった。その後、ZHX2 や ZHX3 もそれぞれホモ二量体およびヘテロ

二量体を形成すること、ならびに NF-YA と相互作用を示すことを明らかにした^{6,8)}。ZHX1、ZHX2 および ZHX3 は構造的に N-末端から2つの Zn²⁺ フィンガーモチーフと5つのホメオドメインを有する転写抑制因子であり、ZHX ファミリーを形成していることが明らかになった(図)。

細胞障害性 T 細胞株である CTLL-2 細胞は、インターロイキン-2 (IL-2) 依存的に細胞増殖を行う。ZHX1 遺伝子の発現は培養液への IL-2 の添加により促進され、IL-2 の除去により抑制される⁹⁾。したがって、ZHX1 遺伝子は IL-2 依存的細胞増殖促進に関与すると考えられる。一方、多発性骨髄腫の患者では、ZHX2 遺伝子の発現低下と同時に NF-Y で制御される遺伝子群の発現上昇が認められる¹⁰⁾。また、正常肝細胞と肝がん細胞における ZHX2 遺伝子の発現を比較したところ、より悪性の肝がん細胞になるにつれ ZHX2 遺伝子の発現が低下する¹¹⁾。加えて、肝がん細胞で高発現を示す解糖系酵素遺伝子の NF-Y 依存的転写を ZHX2 が抑制することから、ZHX2 遺伝子はがん抑制遺伝子として機能すると考えられる。一方、肝がん細胞では、ZHX2 が転写因子 SREBP-1c が介在する新規の脂肪合成を抑制することが報告されている¹²⁾。このように、がん細胞での ZHX ファミリー遺伝子の発現については研究が進んでいる一方、正常細胞での ZHX ファミリー遺伝子の発現調節や標的遺伝子については明らかとなっていない



図. ZHX ファミリー蛋白質の構造の比較

い¹³⁾。そこで、本研究では、正常細胞の一つである3T3-L1脂肪細胞において、*ZHX*ファミリー遺伝子の発現が調節されるかどうかについて検討した。

II. cAMPシグナル系による *ZHX*ファミリー遺伝子の発現 制御

マウス3T3-L1細胞は、条件が与えられると10日前後で脂肪細胞へと分化する。本研究では、正常細胞としてこの3T3-L1脂肪細胞を使用した。

はじめに、cAMPシグナル系のアデニル酸シクラーゼの活性化剤であるForskolin処理を行い、マウス*ZHX*ファミリー遺伝子の発現に対する影響を検討した。その結果、*ZHX1* mRNAと*ZHX3* mRNAの発現に有意な変化は見られなかったが、*ZHX2* mRNAは濃度依存的に増加した(表)。次に、経時的変化を検討したところ、Forskolin処理後2時間という早期かつ一過的に*ZHX2* mRNAの発現が誘導されることが明らかになった。

次に、cAMPシグナル系のセカンドメッセンジャーのcAMPの誘導体である8-Br-cAMPで3T3-L1脂肪細胞を処理した。その結果、8-Br-cAMPでも*ZHX1* mRNAと*ZHX3* mRNAは有意な変化は見られなかったが、*ZHX2* mRNAは濃度依存的に増加した(表)。次に、経時的変化を検討したところ、Forskolinと同様処理後2時間という早期かつ一過的に*ZHX2* mRNAの発現が誘導されることが明らかになった。これらの結果から、アデニル酸シクラーゼ-cAMP軸により*ZHX2*遺伝子の発現が促進されることが明らかになった。

このForskolinによる発現誘導がどのようなメカニズムで生じるか検討するために、2種の阻害剤で処理を行ったところ、Forskolinによる*ZHX2* mRNAの発現誘導は、RNAPolymeraseIIの阻害剤

であるactinomycinDで阻害されたが、翻訳阻害剤であるcycloheximideでは干渉されなかった。したがって、Forskolinによる*ZHX2* mRNAの発現誘導は、*ZHX2*遺伝子の転写レベルで生じ、誘導には新規タンパク質の合成は不要であることが明らかになった。

本研究で、cAMPシグナルによりがん抑制遺伝子の*ZHX2*遺伝子の発現が誘導されたことから、がん細胞において、cAMPシグナル系を刺激したり、*ZHX2*遺伝子を強発現させたりすることにより、がん細胞の増殖抑制へと結びつく可能性が示された。加えて、生理的な機能について検討するには、正常細胞での*ZHX2*の標的遺伝子の検索も重要である。

謝辞

本研究は日本私立学校振興・共済事業団の「2021年度大学間連携等による共同研究」の補助を受けて行われたものである。ご支援いただきました事業団に深く感謝致します。

表 ForskolinおよびcAMPによる*ZHX* familyの遺伝子発現

	Forskolin	8-Br-cAMP
<i>ZHX1</i>	変化なし	変化なし
<i>ZHX2</i>	増加	増加
<i>ZHX3</i>	変化なし	変化なし

文献

- 1) Mantovani R, "The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y", *Gene* 239, pp.15-27(1999).
- 2) Yamada K, Osawa H, and Granner DK, "Identification of proteins that interact with NF-YA", *FEBS Lett* 460, pp.41-45(1999).
- 3) Yamada K, Printz RL, Osawa H, and Granner DK, "Human ZHX1: cloning, chromosomal location, and interaction with transcription factor NF-Y", *Biochem Biophys Res Commun* 261, pp.614-621(1999).
- 4) Barthelemy I, Carramolino L, Gutiérrez J, Barbero JL, Márquez G, and Zaballos A, "zhx-1: a novel mouse homeodomain protein containing two zinc-fingers and five homeodomains", *Biochem Biophys Res Commun* 224, pp.870-876(1996).
- 5) Yamada K, Kawata H, Matsuura K, Shou Z, Hirano S, Mizutani T, Yazawa T, Yoshino M, Sekiguchi T, Kajitani T, and Miyamoto K, "Functional analysis and the molecular dissection of zinc-fingers and homeoboxes 1 (ZHX1)", *Biochem Biophys Res Commun* 297, pp.368-374(2002).
- 6) Kawata H, Yamada K, Shou Z, Mizutani T, Yazawa T, Yoshino M, Sekiguchi T, Kajitani T, and Miyamoto K, "Zinc-fingers and homeoboxes (ZHX) 2, a novel member of the ZHX family, functions as a transcriptional repressor", *Biochem J* 373, pp.747-757(2003).
- 7) Yamada K, Kawata H, Shou Z, Hirano S, Mizutani T, Yazawa T, Sekiguchi T, Yoshino M, Kajitani T, and Miyamoto K, "Analysis of zinc-fingers and homeoboxes (ZHX) -1-interacting proteins: molecular cloning and characterization of a member of the ZHX family, ZHX3", *Biochem J* 373, pp.167-178(2003).
- 8) Kawata H, Yamada K, Shou Z, Mizutani T, and Miyamoto K, "The mouse zinc-fingers and homeoboxes (ZHX) family; ZHX2 forms a heterodimer with ZHX3", *Gene* 323, pp.133-140(2003).
- 9) Shou Z, Yamada K, Kawata H, Yokoyama O, and Miyamoto K, "A mechanism of induction of the mouse zinc-fingers and homeoboxes 1 (ZHX1) gene expression by interleukin-2", *Biochem Biophys Res Commun* 314, pp.885-890(2004).
- 10) Harousseau JL, Shaughnessy J, Jr., and Richardson P, "Multiple myeloma", *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, pp.237-256(2004).
- 11) Yamada K, Ogata-Kawata H, Matsuura K, Kagawa N, Takagi K, Asano K, Haneishi A, and Miyamoto K, "ZHX2 and ZHX3 repress cancer markers in normal hepatocytes", *Front Biosci (Landmark Ed)* 14, pp.3724-3732(2009).
- 12) Yu X, Lin Q, Wu Z, Zhang Y, Wang T, Zhao S, Song X, Chen C, Wang Z, Xu L, Li C, Gao L, Liang X, Yue X, and Ma C, "ZHX2 inhibits SREBP1c-mediated de novo lipogenesis in hepatocellular carcinoma via miR-24-3p", *J Pathol* 252, pp.358-370(2020).
- 13) Li N, Wu Z, and Ma C, "ZHX2 in health and disease", *Front Oncol* 12, pp.1038890(2022).