

学 位 論 文 題 名

Molecular Cloning and Characterization of a KRAB-Containing
Zinc Finger Protein, ZNF317, and Its Isoforms

(KRAB ジンクフィンガー蛋白, ZNF317 のクローニングと性状解析)

学位論文内容の要旨

血液細胞の分化、増殖には様々な転写因子が関与するが、その多くは血球系列や、分化段階に特異的に発現している。転写因子の DNA 結合能、蛋白結合能などの機能を司る構造 (ドメイン) の多くは保存的なモチーフによりコードされている。ジンクフィンガー・ドメインは DNA 結合ドメインとして最もよく知られており、多数の転写因子に認められる構造である。ジンクフィンガー・ドメインには、亜鉛原子に配位する 4 つのアミノ酸の組み合わせにより、C4型、C2H2型、C2HC型の 3 種類に分類される。また、C2H2型ジンクフィンガー蛋白のN末端には多くの場合蛋白結合能をもつドメインとして、BTB/POZ、SCAN、KRAB (Kruppel-associated Box) などの構造が知られており、それぞれ転写調節にかかわっていると推定されている。血液細胞に発現するC2H2型ジンクフィンガーとしては、赤芽球系細胞に発現する EKLF、リンパ球系細胞での Ikaros、顆粒球系細胞での MZF などを含む多数の遺伝子が既にクローニングされている。

今回我々は、既知の遺伝子の塩基配列から特異的プライマーを設計し、RT-PCR 法によって得た増幅産物からの新規遺伝子のクローニングを試みた。まず、マウスにおいて赤芽球系と巨核球系に必須の転写因子である FOG-1 (friend of GATA-1) 遺伝子のジンクフィンガー・モチーフの保存的な塩基配列の一部を基に配列特異的プライマーを設計した。次に既に我々が報告している方法で、ヒト CD34陽性細胞から CFU-E 段階のヒト赤芽球系前駆細胞を培養し、total RNA を抽出した。ランダムヘキサマーを用いた逆転写反応により first strand cDNA を合成し、これを鋳型として前述の配列特異的プライマーを用いて PCR を行い、複数の増幅産物を得た。これらのcDNA断片をシーケンスし、既知の遺伝子の塩基配列との類似性を検索することにより、その中からジンクフィンガー・モチーフを含む新規のcDNAを見いだした。さらにRACE法を用いてこのcDNAの全長の塩基配列を決定した。

このcDNAは、全長4078 base pair であり、open reading frame は 1785 bp であった。5' 側に KRAB モチーフ、3' 側に13のジンクフィンガー・モチーフを持ち、既知の遺伝子ではZNF84/HPF2と72%のアミノ酸レベルでの相同性を示した。このcDNAはヒトの新規遺伝子として、

ZNF317 と命名された。

ZNF317 cDNA の配列特異的プライマーを用いてヒト末梢血ゲノム DNA を鋳型とし、PCR 法により増幅されたDNA断片をシーケンスし、得られたゲノム塩基配列とcDNAの塩基配列を比較したところ、ZNF317 遺伝子は7つのエクソンから構成され、ヒト染色体19p13に位置することが示された。この周辺領域にはKRABジンクフィンガーを含む多数のジンクフィンガー遺伝子が集積しているが、その生理学的意義は明らかでない。

またZNF317cDNAの配列特異的プライマーを用いたRT-PCR産物は4つの増幅バンドがみられ、これらをシーケンスした結果、同一の塩基配列が共有されていることから4つのアイソフォームが存在することが明らかとなった。ZNF317-1はKRAB-Aドメインを持つが、KRAB-Bドメインを欠いている。ZNF317-2はZNF317-1にKRAB-Bドメインを挿入したアイソフォームである。またZNF317-3、ZNF317-4はそれぞれZNF317-1、ZNF317-2のKRABドメインの5'側にイントロン3が挿入されていることが明らかとなった。さらに *in vitro* 転写・翻訳反応により、ZNF317-1とZNF317-2については塩基配列から予想される通りそれぞれ分子量 64 kDa, 67 kDa の蛋白質に翻訳されることが明らかとなった。

ZNF317 mRNA のヒト組織における分布をノーザンブロッティング法により解析したところ、ZNF317-1 と ZNF317-2 から構成される約 4.5 kb のバンドは広範な組織に分布していたが、ZNF317-3 と ZNF317-4 から構成される約 5 kb のバンドはリンパ球、肺、脾臓に局限した分布を示した。

次に我々が既に報告しているヒト末梢血 CD34 陽性細胞から赤芽球系前駆細胞への分化誘導の系を用いて、ZNF317 の発現量の変化を解析した。ヒトCD34 陽性細胞ではノーザンブロッティング解析、RT-PCR 法でともにごく弱い発現を認めるのみであった。さらに赤芽球分化のCFU-E以降の段階に対応する、培養開始後8日後から12日後の時期において、競合的 RT-PCR 法を用いてZNF317 mRNA の発現量の変動を定量したところ、ZNF317 の発現は約10分の1に減少することが示された。

また、リンパ球サブセットにおけるZNF317mRNAの発現の度合いを標準化cDNAを鋳型として、配列特異的プライマーを用いたPCR法により半定量した。CD4、CD8、CD19 の各分画において定常状態とマイトジェンによる刺激後とを比較するといずれも刺激後に著明に ZNF317 cDNA の発現量は低下した。

また、DEAE-デキストランを用いた一過性トランスフェクションによりEGFP-ZNF317-2 融合蛋白を COS-7 細胞に強制発現させたところ、明らかな核内への局在が認められ、ZNF317が核内蛋白であることが示唆された。

KRABドメインは蛋白結合ドメインとして知られており、C2H2型ジンクフィンガー遺伝子の約3分の1にみられる構造である。現在のところ、ヒトゲノム中に100から200程度のKRABジンクフィンガー遺伝子が存在すると推定されている。KRABドメインを介してKAP-1などのコファクターが結

合することにより転写抑制機能を示すことが報告されている。また血球系細胞で転写因子として働くジンクフィンガー蛋白が数多く知られている。しかし、赤芽球系で発現量が変化するKRABジンクフィンガー蛋白については、我々の知るかぎりこれまでに報告がない。

ZNF317は赤芽球の成熟過程とリンパ球の増殖において発現量が減少することと、蛋白質の構造上の特徴から転写因子として何らかの機能を持つことが推定される。今後、血液細胞において、ZNF317のジンクフィンガーを介するDNA結合に関与する特異的な塩基配列や、KRABドメインを介する蛋白結合による転写調節機能についての解析の進展が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 守 内 哲 也
副 査 教 授 畠 山 昌 則
副 査 教 授 小 池 隆 夫

学 位 論 文 題 名

Molecular Cloning and Characterization of a KRAB-Containing Zinc Finger Protein, ZNF317, and Its Isoforms

(KRAB ジンクフィンガー蛋白, ZNF317 のクローニングと性状解析)

血液細胞の分化、増殖には様々な転写因子が関与するが、その多くは系列特異的に発現している。転写因子の DNA 結合能、蛋白結合能などの機能を司る構造の多くは保存的なモチーフによりコードされている。ジンクフィンガー・ドメインは DNA 結合ドメインとして最もよく知られており、多数の転写因子に認められ、血液細胞でも多数が既に知られている。

今回我々は、既知の遺伝子の塩基配列から特異的プライマーを設計し、RT-PCR 法によって得た増幅産物からの新規遺伝子のクローニングを試みた。赤芽球系と巨核球系に必須の転写因子である FOG-1 (friend of GATA-1) 遺伝子のジンクフィンガー・モチーフの保存的な塩基配列の一部を基に配列特異的プライマーを設計した。次にヒト CD34 陽性細胞から CFU-E 段階のヒト赤芽球系前駆細胞を培養し、total RNA を抽出した。ランダムヘキサマーを用いた逆転写反応により first strand cDNA を合成し、これを鋳型として配列特異的プライマーを用いて PCR を行い、複数の増幅産物を得た。これらの cDNA 断片をシーケンスし、ジンクフィンガーモチーフを含む新規の cDNA を見いだした。さらに RACE 法を用いて全長を決定した。

この cDNA は、全長 4078 bp であり、open reading frame は 1740 bp であった。5' 側に KRAB モチーフ、3' 側に 13 のジンクフィンガー・モチーフを持ち、ヒトの新規遺伝子として、ZNF317 と命名された。

ヒト末梢血ゲノム DNA を PCR 法により増幅、シーケンスし、cDNA の塩基配列を比較したところ、ZNF317 遺伝子は 7 つのエクソンから構成され、ヒト染色体 19p13 に位置することが示された。

また ZNF317 cDNA の配列特異的プライマーを用いた RT-PCR で 4 つの増幅バンドがみられ、塩基配列が共有されることから 4 つのアイソフォームが存在することが明らかとなった。In vitro 転写・翻訳反応では、ZNF317-1 と ZNF317-2 については塩基配列から予想される通りそれぞれ 64 kDa, 67 kDa の蛋白質に翻訳されることが明らかとなった。

ZNF317 mRNA のヒト組織での分布をノーザンブロット解析したところ、ZNF317-1, ZNF317-2 は広範な組織に分布し、ZNF317-3, ZNF317-4 はリンパ球、肺、脾臓に限局した分布を示した。

ZNF317 蛋白の細胞内局在を、EGFP-ZNF317-2 融合蛋白を COS-7 細胞に一過性トランスフェクションさせ強制発現により調べたところ、核内への局在傾向が認められ、核内蛋白であることが示唆された。

次に赤芽球前駆細胞における ZNF317 の発現量の変化を解析した。競合的 RT-PCR 法により CFU-E から正染性赤芽球へ成熟する間の ZNF317 発現量を定量したところ、約 10 分の 1 に減少した。

また、リンパ球サブセットにおける ZNF317 発現の度合いを標準化 cDNA を鋳型として、配列特異的プライマーを用いた PCR 法により半定量した。CD4、CD8、CD19 の各分画において定常状態とマイトジェンによる刺激後とを比較するといずれも刺激後に著明に ZNF317 cDNA の発現量は低下した。

KRAB ドメインは蛋白結合ドメインとして知られており、C2H2 型ジンクフィンガー遺伝子の約 3 分の 1 にみられる構造である。KRAB ドメインについては KAP-1 などのコファクターが結合することにより転写抑制機能を示すことが報告されている。ZNF317 は赤芽球の成熟過程とリンパ球の増殖において発現量が減少することと、蛋白質の構造上の特徴から転写因子として何らかの機能を持つことが予想され、今後の機能解析の進展が期待される。

質疑応答においては、守内教授から、KRAB ジンクフィンガー蛋白における DNA 結合配列の特異性の有無、マイクロアレイによる解析の有用性についての質問があった。次いで畠山教授から、KRAB ドメインの機能と、活性化ドメインの解析方法についての質問があった。また、小池教授からはヒトにおける組織分布の持つ意味と、ヒト以外でのホモログの存在と、ノックアウトマウス作成の可能性について質問があった。最後に長嶋教授から、胎生期の発現、核移行シグナル、腫瘍細胞での発現や変異などについて質問があった。

いずれの質問に対しても、申請者は、これまでの文献的報告および実験結果を引用し、概ね適切に解答した。

この論文は、新規のヒト遺伝子を同定し、その機能を解析し、赤芽球の成熟に関与する KRAB ジンクフィンガー遺伝子について初めて報告したことで高く評価され、今後の赤芽球を始めとする血液細胞の分化に関する転写因子の機能解析の基礎となると期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。