

## 論文の内容の要旨

論文題目 B 細胞分化に伴う細胞増殖制御における BTB ZF タンパク質 ZNF131 の役割

氏名 宮内 英満子

獲得免疫系の反応は、遺伝子再構成により形成される抗原受容体を持つ生体内で二種類のリンパ球集団である T 細胞と B 細胞が担う。T 細胞及び B 細胞の分化過程には、抗原受容体の遺伝子再構成も含め、数多くの転写因子が関与する。T、B 細胞分化過程には多くの共通機構と各々に特異的な機構が関わっている。BTB (Broad-complex, Tramtrack and Bric-a-brac) ZF (Zinc Finger) ファミリーに属する ZNF131 は、T 細胞分化に関わる転写因子であることが先行研究で明らかとなった。ZNF131 はアミノ末端側に BTB ドメイン、カルボキシル末端側に ZF ドメインを 5 個または 6 個持つ。BTB ZF ファミリータンパク質は約 50 の転写因子から構成され、いずれも BTB ドメインと C2H2 タイプの ZF を 2 個から 14 個持つ。T 細胞特異的 ZNF131 欠失マウスの解析により、T 細胞の胸腺での分化過程である DN (Double Negative) において ZNF131 を欠失させると、DN から DP (Double Positive) への分化とそれに伴う細胞増殖が阻害されることが明らかになった。

ZNF131 の転写産物は、様々な組織や分化過程で発現が認められるが、ZNF131 に対する良い抗体がないため ZNF131 タンパク質の発現に関する情報は限定されている。ヒトの網羅的プロテオミクス解析により作成されたデータベース (human proteome map) において他のいくつかの BTB ZF ファミリーに属する遺伝子と同様に、T 細胞や B 細胞等のリンパ球で ZNF131 タンパク質の発現が高いことが示されている。本研究では、B 細胞分化過程での ZNF131 の役割について解析を行った。

造血幹細胞から B 細胞の各分化段階における ZNF131 の転写産物の発現変化を Real-Time PCR により解析した。Znf131 mRNA は、造血幹細胞から pre-B 細胞までの全ての段階で発現が認められ、特に pre-pro-B 細胞以降の B 細胞初期分化過程において発現の亢進が認められた。そこで、Znf131-floxed マウスを、pre-pro-B 細胞から pro-B 細胞で cre が発現する mb1-cre マウスと交配し、Znf131 遺伝子が B 細胞特異的に欠失するマウス (ZNF131 KO) を作出した。このマウスでは、ZNF131 の欠失は主に pro-B 細胞で誘導されていた。このマウスを用いて、ZNF131 が B 細胞の初期分化にどのような影響を与えるのか、FACS による各分化過程の細胞集団の解析、初期分化に関与する重要な遺伝子集団の発現解析、BrdU の取り込みによる細胞増殖の解析、細胞周期、

cell death 等の解析、Immunoglobulin heavy chain の遺伝子再構成に対する影響、B 細胞の分化に重要である IL-7 の添加、非添加において pro-B 細胞の培養系での解析を行い、さらにレポーターアッセイによる cdk インヒビターの一つである p21 プロモーターにおける ZNF131 の制御領域の同定を行った。

mb1-cre マウスとの交配により、pro-B 細胞数が減少し、pre-B 細胞以降の分化過程の B 細胞はほぼ消失した。BrdU の取り込みによる細胞増殖の解析から、pro-B 細胞では細胞増殖が盛んに起こっているが、ZNF131 を欠失させると、細胞増殖が完全に抑制された。細胞周期の解析から wild type より減少するものの、ZNF131 KO においても S 期、G2 期が認められ、ZNF131 の欠失は G1 期で細胞周期を抑制させる傾向はあるものの、どの時期においても細胞周期が停止することが示唆された。pro-B 細胞で誘導される Immunoglobulin heavy chain の遺伝子再構成は、ZNF131 KO においても検出され、ZNF131 は遺伝子再構成には必須ではないことが示唆された。

cell death については、pro-B 細胞の過程で分化が抑制されているが、cell death の亢進は認められなかった。cell death を促進する遺伝子 *Puma* (*Bbc3*)、*Bax* 及び、cell death を抑制する遺伝子 *Bcl-2* の発現亢進が ZNF131 KO において認められ、その結果として cell death が抑制されている可能性が考えられる。一方、pro-B 細胞を培養した場合、IL-7 の有無にかかわらず、ZNF131 が欠失すると cell death が強く誘導された。このことから、生体内では IL-7 以外の Flt3 リガンド、c-kit リガンド等のサイトカインシグナル等が pro-B 細胞の生存に重要であり、これらのシグナルが存在しない状況では、ZNF131 も細胞の生存に重要であることが考えられた。今後、様々な培養条件で解析を行う必要がある。

細胞増殖制御に関与する遺伝子集団の解析から、様々な細胞系列で細胞増殖の誘導に必須である *c-myc* の発現亢進と、cell cycle を抑制する p21 の発現亢進が認められた。pre-B 細胞では、pre-B 細胞レセプターのシグナルにより *c-myc* の発現を抑制し、細胞増殖を停止させ、Immunoglobulin light chain の遺伝子再構成を誘導することが知られている。これは転写因子 IRF4 の誘導→転写因子 Ikaros 及び Aiolos の誘導→*c-myc* の抑制という経路である。ZNF131 欠失 pro-B 細胞では、転写因子 IRF4 の抑制→転写因子 Ikaros 及び Aiolos の抑制→*c-myc* の誘導という変化が見られ、このシグナル伝達経路が存在すること、ZNF131 がその制御に関わる可能性が示唆された。

*c-myc* の発現亢進があるにもかかわらず、ZNF131 KO の pro-B 細胞の増殖は強く抑制されており、p21 の発現亢進がその原因の一つと考えられる。分化過程の T 細胞で ZNF131 を欠失させた先行研究においても p21 の発現亢進が認められ、レポーターアッセイにより p21 遺伝子のプロモーターに ZNF131 が転写抑制因子として作用することを報告している。種々の内部欠失を導入することで、ZNF131 の制御領域の同定を行った。同定された現時点での 138 塩基対の領域には癌抑制遺伝子 p53 の結合部位も含まれていた。p53 は p21 を誘導する重要な転写因子であり、DNA

損傷等の遺伝子毒性ストレスに対して、p21等の cell cycle 制御遺伝子の誘導により、細胞増殖を停止させる。ZNF131 欠失 pro-B 細胞で見られた *Puma* (*Bbc3*)、*Bax* 等、cell death を誘導する遺伝子集団も p53 により制御されている。p21 プロモーターに対して ZNF131 と p53 は反対の作用を持つことから、制御領域のより詳細なマッピングの結果、もし制御領域が重複していた場合には、ZNF131 が p53 の制御因子として機能する可能性があり、ZNF131 と p53 の相互作用について解析することが必要である。また、p53 が制御する遺伝子プロモーターは多数知られており、その中で ZNF131 が制御するプロモーターが存在するか、解析を進める必要がある。