

審査の結果の要旨

氏名 宮内 英満子

本研究は、血液系、特にリンパ球の分化や機能において重要である BTB (Broad-complex, Tramtrack and Bric-a-brac) ZF (Zinc Finger) ファミリーに属する転写因子 ZNF131 の B 細胞初期分化過程における機能を明らかにするため、*Znf131* 遺伝子が B 細胞初期分化過程である pro-B 細胞から欠失するコンディショナルノックアウトマウスを使用し、解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. *Znf131*-floxed マウス (cre により *Znf131* 遺伝子の欠失が誘導) と mb1-cre マウス (B 細胞初期分化過程である pre-pro-B 細胞で cre が発現) の交配により、*Znf131* 遺伝子を、B 細胞初期分化過程において欠失させた (ZNF131 KO)。この ZNF131 KO マウスの脾臓細胞の解析を行ったところ、未成熟 B 細胞以降の分化過程の B 細胞は存在しなかった。mb1-cre により、*Znf131* 遺伝子は pro-B 細胞においてほぼ 100% 欠失した。ZNF131 KO では pro-B 細胞の細胞数が半減し、この分化過程での抑制が認められた。
2. BrdU の取り込みによる DNA 合成の解析や細胞周期の解析により、pro-B 細胞は活発に増殖していることが示されたが、ZNF131 KO の pro-B 細胞では、DNA 合成が強く抑制されていた。ZNF131 は細胞増殖に必須であり、細胞増殖を促進することで細胞分化に関与している可能性が示唆された。
3. ZNF131 KO の pro-B 細胞において、cell death を促進する遺伝子の発現上昇が認められたが、cell death の亢進は認められなかった。しかし、pro-B 細胞を培養したところ、pro-B 細胞の増殖と分化に必須であるサイトカイン IL-7 の存在下であっても、ZNF131 KO の pro-B 細胞では、cell death が強く誘導され、ZNF131 は pro-B 細胞の生存に関与すること、また骨髄に存在する IL-7 以外のサイトカイン (Flt3 リガンド等) や細胞接着分子からのシグナルが、pro-B 細胞の維持に重要であることが示唆された。
4. ZNF131 KO の pro-B 細胞において、B 細胞の分化に中心的な役割を担う遺伝子 *Ebfl*、*Pax5*、*E2a* 等の発現には影響が見られなかった。
5. pro-B 細胞では、Immunoglobulin (Ig) heavy chain の遺伝子再構成が誘導される。Ig heavy chain の遺伝子再構成について PCR-サザンブロット法により解析したところ、ZNF131 KO の pro-B 細胞でも、Ig heavy chain の遺伝子再構成は誘導され、T 細胞における T 細胞受容体β鎖の遺伝子再構成に ZNF131 は関与しないという先行研究の結果は、B 細胞でも同様であることが示された。

6. pre-B 細胞において重要である pre-B 細胞レセプターシグナルは、細胞増殖停止及び Ig light chain の遺伝子再構成を誘導する。そのシグナルを伝達する転写因子の経路 (IRF4 の誘導 → Ikaros 及び Aiolos の誘導 → c-myc の抑制及び surrogate light chain である VpreB 及びλ5 の抑制) が、ZNF131 欠失マウスの pro-B 細胞において、逆の方向のシグナル (IRF4 の抑制 → Ikaros 及び Aiolos の抑制 → c-myc の亢進及び VpreB 及びλ5 の亢進) として伝達されており、pre-B 細胞で機能するシグナル伝達経路が pro-B 細胞で既に準備されているということが示唆された。IRF4 や Ikaros/Aiolos といった転写因子の発現が、ZNF131 により制御されているか検討が必要である。
7. pro-B 細胞における細胞増殖に関わる遺伝子の発現解析を行ったところ、ZNF131 KO の pro-B 細胞では、cell cycle を抑制する cdk インヒビター p21 の発現亢進や、細胞増殖を促進する c-myc の発現亢進が見られた。ZNF131 KO の pro-B 細胞では細胞増殖は停止していることから、c-myc の作用を cell cycle を抑制する p21 の作用が凌駕したと考えられた。
8. 先行研究により、ZNF131 が p21 のプロモーター活性を抑制することが報告されており、p21 は ZNF131 の標的遺伝子であることが示された。レポーターアッセイにより、p21 プロモーターにおける ZNF131 の制御領域を特定したところ、p21 プロモーターを正に制御する癌抑制遺伝子 p53 の結合部位が含まれることが示された。ZNF131 と p53 の p21 プロモーターに対する作用は拮抗することから、この二つの転写因子がどのような相互作用により p21 プロモーター活性を制御しているのか研究を進める必要がある。

以上、本論文は、B 細胞初期分化過程の pro-B 細胞で BTB ZF タンパク質 ZNF131 が欠失するコンディショナルノックアウトマウスを使用した解析から、機能がほぼ未知であった転写因子 ZNF131 がマウス B 細胞初期分化過程の分化、生存及び増殖において重要な役割を持つことを明らかにした。また cdk インヒビター p21 遺伝子のプロモーターを ZNF131 が負に、癌抑制遺伝子として機能する転写因子 p53 が正に制御するが、その制御領域が重複していることが示唆され、ZNF131 と p53 の相互作用の解析が非常に重要であることが考えられた。これらのことが解明されたということについて意義があると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。