

## 論文の内容の要旨

論文題目 腫瘍壊死因子 $\alpha$ に誘導される新規ジンクフィンガー  
蛋白質遺伝子の同定と関連遺伝子群

氏名 又木千景

本研究では、遺伝子発現を制御する転写因子の中で特にアミノ酸配列に特徴のある Zn フィンガータンパク質に着目し、DNA マイクロアレイによる解析を行った。一枚の DNA チップ上に搭載されている遺伝子は 6416 個であり、C2H2, LIM, GATA, 核内ホルモン受容体, RING フィンガーなどの Zn フィンガータンパク質の遺伝子 155 個を含んでいた。Zn フィンガーの変動を観察する上で、炎症性サイトカインとして知見の多い TNF $\alpha$ を用いた。TNF $\alpha$ は、感染、炎症、動脈硬化などの病態に関わる主要なサイトカインであり、その反応についての知識を得ることは深い意義がある。TNF $\alpha$ は、マクロファージから放出され、T 細胞、マクロファージ、血管内皮細胞などに影響を及ぼす。本研究ではサイトカインに対して反応性の高い血管内皮細胞に着目し、ヒトさい帯血静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を用いて実験を行った。

HUVEC における Zn フィンガータンパク質は、TNF $\alpha$ 未処理の状態では、16 個の遺伝子に mRNA の高い発現が見られた。DNA チップにのっている Zn フィンガータンパク質のおよそ 10 分の 1 の遺伝子について高い発現が見られたことになる。また、5つの遺伝子について TNF $\alpha$ による明らかな誘導が見られた。5つの遺伝子とは、CLP, RIL, NER/LXR $\beta$ , A20, AC#M88357 であり、特に AC#M88357 は既に TNF $\alpha$ 感受性遺伝子として報告されている A20 の変動よりも大きく誘導された。A20 を除く 4つの遺伝子は、TNF $\alpha$ による

誘導は報告されていなかった。また TNF $\alpha$ 処理によって減少した Zn フィンガータンパク質は、ABLIM, DRAL の2つであり、両者とも TNF $\alpha$ との関連は未報告であった。これら選出された Zn フィンガータンパク質の大半の機能は不明であり、今後の重要な課題となると考えられた。

TNF $\alpha$ によって強く誘導された AC#M88357 のコードする遺伝子に注目し、解析を試みた。AC#M88357 は、全コーディング領域の知られていない新規遺伝子であったため、この遺伝子の機能を調べるために、まず全翻訳領域の同定を行った。RT-PCR によって AC#M88357 は、1470 bp の翻訳領域をコードする遺伝子であることが明らかとなった。配列から予測できるタンパク質は 470 個のアミノ酸から成る。これを EZFIT(Endothelial Zinc Finger protein Induced by TNF $\alpha$ ) と命名し、NCBI の GenBank に登録した (AC#AF269249)。EZFIT がコードするタンパク質には、C2H2 型の Zn フィンガー部位が 13 個含まれていた。また、N 端側 103 番めから 110 番めのアミノ酸に核移行配列(P-P-V-R-R-G-K-N)が予測された。EZFIT

表1 TNF $\alpha$ 4時間刺激によりmRNAが5倍以上誘導された遺伝子群

	遺伝子	未処理 蛍光強度	TNF $\alpha$ 刺激 蛍光強度	倍率
1	ICAM-1	8	833	105.6
2	TRAF1	-6	704	94.9
3	fractalkine	-26	391	62.4
4	IL8	10	602	61.7
5	E-selectin	8	358	45.3
6	lymphotoxin $\beta$	-61	185	41.7
7	VCAM-1	22	756	31.8
8	junB	-1	243	30.0
9	TNFAIP2	17	449	27.0
10	RING4	11	265	26.7
11	I $\kappa$ B	9	170	21.8
12	Sap49	-5	123	19.1
13	<b>M88357</b>	<b>-2</b>	<b>126</b>	<b>19.0</b>
14	MGSA	19	372	17.5
15	A20	16	282	15.1
16	Gro $\beta$	13	157	14.3
17	NFIL $\beta$	10	121	12.7
18	NF $\kappa$ B	26	203	9.2
19	cytokine-inducible kinase	14	102	7.4
20	interferon-induced protein 17	8	164	7.3

の C 端又は N 端に EGFP を結合した融合タンパク質を CHO 細胞に発現したところ核内に局在し, EZFIT は核タンパク質である可能性が高いと考えられた. また 5'RACE により EZFIT の 5'端には 3つの異なる配列が存在しており, アイソフォームをもつことが明らかとなった. いずれの mRNA の場合も, 第 3 エクソンは共通しており, 翻訳領域は保存される. すなわち生成されるタンパク質のアミノ酸配列は不変である. EZFIT のノーザンブロットングによる解析では, EZFIT mRNA 発現は, 4.0 kb と 3.1 kb の 2つのバンドで示され, それぞれ異なる増加傾向を示した. すなわち 4.0 kb は TNF 刺激後 4 時間をピークとした少量の増加を示したが, 3.1 kb は TNF $\alpha$ 刺激 1 時間後より 24 時間後まで連続的に増加した. 3.1 kb は特に顕著な増加を示した. cDNA パネルを用いた PCR によって EZFIT の組織局在の検討を行ったところ, EZFIT mRNA が最も多く検出された組織は胎盤であった. 続いて脳, 精巣, 脾臓, 心臓, 小腸, 筋肉, 子宮, 前立腺, 末梢血中白血球で発現が認められた. さらに同研究センターで行なわれた DNA チップのデータ 20 サンプルを比較したところ, 成人型 T 細胞性白血病の T 細胞において EZFIT mRNA の発現が高いことが明らかとなった. EZFIT mRNA は他にも線維芽細胞, マクロファージ, リンパ球系細胞株である Jurkat において発現が認められ, 血球系細胞に多く発現する遺伝子であることが推定された. 特に EZFIT のコードする 19 番染色体 q13.4 は T 細胞受容体のクラスターアイランドであり興味深い. 続いて EZFIT の転写制御について検討するために, プロモーター領域と想定される第 1 エクソンの 5'端側 2000 塩基対に対して転写因子結合配列を検索した. その結果, 高いスコアで結合する箇所が 12 個あり, 候補転写因子は CdxA, SRY, GATA-1, MZF-1, STATx の 5 つであった. TATA 結合予想配列は, 第 1 エクソンから 1,000bp 以上も離れた箇所に存在しているのみのため, EZFIT は TATAless 遺伝子の可能性が高い.

EZFIT を含む BAC37295 をコード領域予測ソフト GRAIL を用いて検索したところ, Zn フィンガーモチーフをコードするエクソン可能性の高い領域が同定された. これらのエクソン群を一連の翻訳領域を含むグループとして想定し解析した結果, 4つの関連遺伝子の存在の可能性が示された. これら 4つの遺伝子をセントロメアに近い方から ERP1 (EZFIT-related protein 1), ERP2, ERP3, ERP4 と名付け, EZFIT と同様の解析を試みた. 4つの遺伝子とも C2H2 型の Zn フィンガーをもつ Krüppel Zn フィンガータンパク質であり, コード予測領域から判定した有する Zn フィンガーの数は順に 15, 14, 13, 14 であった. GRAIL によって行ったコード領域予測では, ERP1, ERP2, ERP3 はセントロメアからテロメア方向に順向きにコードしているが, ERP4 は逆向きにコードしていた. また NCBI の BLAST 検索によって, ERP2 は KIAA1431 と同じ遺伝子をコードしていることがわかった. KIAA1431 は polyA を含む 4076 bp のフラグメントだが, 開始コドンは決定されていない. クラスターを形成する 5つの遺伝子群は Zn フィンガー部分で相同性が高いが, Zn フ

