

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 又木千景

本審査は、予備審査で訂正または付加を指摘された点についての内容と修正点、および結語を口頭発表し、質疑応答を行なった。

予備審査において訂正および付加を指摘された点は以下の通りである。

- (1) 同定した新規遺伝子のタンパク質としての発現を確認する。
- (2) TNF α 刺激後のタイムコースをとったノーザンブロットティングと TNF α 未刺激と刺激4時間で比較したノーザンブロットティングのバンドの強さに差異が見られるため、追試実験を行なう。
- (3) 新規遺伝子の転写開始地点の決定について、その根拠を示す。
- (4) 5'RACE による既知の転写領域 (1.7 kb) とノーザンブロットティングによって検出された mRNA の大きさ (3.1 kb, 4.0 kb) とのギャップについて、3' 端を同定するなどの説明を加える。

これらの指摘を受けて、次のような追加実験が行われ、内容が修正された。

- (1) について、同定した新規遺伝子 EZFIT の全翻訳領域 (1467 bp) を含む塩基配列の C 端又は N 端に EGFP を結合した融合タンパク質を CHO 細胞に発現させた。その結果、GFP 標識 EZFIT は、C 端標識、N 端標識の両方とも核内に局在した。このことから EZFIT は核タンパク質である可能性が高く、したがって EZFIT は転写因子として機能していることが示唆された。
- (2) について、TNF α 処理後の EZFIT mRNA の発現を確認するために、TNF α 処理のタイムコースをとり再実験した。その結果、前回と同様に 4.0 kb と 3.1 kb の2カ所にバンドが検出された。4.0 kb は TNF α 刺激後4時間をピークとして少量の増加を示し、3.1 kb は TNF α 刺激1時間後から24時間後まで連続的に増加した。いずれも TNF α 刺激後に増加し、特に 3.1 kb に検出されたバンドは顕著な増加が認められた。
- (3) について、Primer extension 法を試みたが、逆転写反応によるバンドが検出されず、転写開始地点の決定について証明することはできなかった。しかし、既に5'RACE によって増幅し解読した断片は11個あり、3つのアイソフォームを同定していることから、5'端はほぼ同定してると考えても構わないのではないかと考察し

た。

(4) について、3'RACE を試みたが検出されなかった。しかし、3'端が長い遺伝子は少ないため、終止コドンが決定している場合、既知のゲノム配列から polyA 配列を探すことによって 3'端を決定できる可能性がある。したがってゲノム配列から 3'端を推定する作業を行ない、考察に加えることとした。

結語は以下のように (a) ~ (d) にまとめられ発表された。

(a) DNA マイクロアレイを用い、ヒト血管内皮細胞における 155 個の Zn フィンガーモチーフを含む遺伝子の mRNA について TNF α による変動を解析した結果、最も高い誘導を示した Zn フィンゲータンパク質の遺伝子を発見した。それを EZFIT (endothelial zinc finger protein induced by TNF α) と命名し、翻訳領域を同定した。

(b) EZFIT は、全翻訳領域が 1470 bp の遺伝子であり、13 個の C2H2 型 Zn フィンガーモチーフを有していた。EZFIT mRNA の発現は脳、精巣、膵臓、心臓、小腸、筋肉、子宮、前立腺、末梢血中白血球において認められ、特に T 細胞、マクロファージなど血球系細胞に多く発現していることが明らかとなった。さらに、DNA マイクロアレイのデータでは、成人型 T 細胞性白血病患者の T 細胞において最も高い発現が見られた。

(c) EZFIT 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、核内に局在した。EZFIT は核タンパク質である可能性が高い。したがって EZFIT は転写因子として機能していることが示唆された。

(d) コンピュータによるコード領域予測により、EZFIT がコードされている染色体領域の近傍には、Krüppel Zn フィンゲータンパク質の遺伝子がさらに 4 つコードされていることが予測された。これら 4 つの遺伝子をセントロメアに近い方から ERP1、ERP2、ERP3、ERP4 と名付け、組織分布を検討した。ERP1 の mRNA の発現は膵臓、ERP2 は膵臓と末梢血中白血球、ERP3 は小腸、胃、前立腺、ERP4 は卵巣に検出された。この結果から、ERP 群の 4 つの遺伝子の mRNA が、in vivo で発現していることが確認された。ERP 群 mRNA 発現の組織分布は、それぞれの遺伝子について固有の発現パターンを示し、ERP の各遺伝子は異なる転写制御を受けていることが示唆された。

最後に、審査委員から、論文の第 4 章の構成について指摘を受けた。特に、第 4 章では ERP1~4 を EZFIT の関連遺伝子群として取り上げているが、「関連遺伝子」と位置付けた根拠を明確に記載することを求められた。

質疑応答の後、審査委員で評価を行い、本予備審査委員会として本人は博士の学位を受けるに十分な学識と研究を指導する能力を有するものと認め、新たに指摘さ

れた点を論文に取り入れることで、合格と判定した。

よって本論文は博士（学術）の学位請求論文として合格と認められる。