

学位論文

レトロウイルスベクターの抑制性因子である
ZFP809 の機能および特徴解析

2015 年度

市田 悠

主 論 文 要 旨

報告番号	㊦ 乙 第	号	氏 名	市田 悠
主 論 文 題 目： レトロウイルスベクターの抑制性因子である ZFP809 の機能および特徴解析				
(内容の要旨) Moloney murine leukemia virus (MoMLV) 型 LTR (long terminal repeat) は、胚性幹細胞のような未熟細胞においてその活性が強力に抑制され、その抑制因子としてマウスにおいては zinc finger protein 809 (ZFP809) が同定されている。ZFP809 は Kruppel associated box containing zinc finger proteins (KRAB-ZFPs) ファミリーのメンバーで、N 末端に KRAB ドメイン、C 末端に 7 個の zinc finger (ZF) ドメインを有し、マウス未熟細胞において高発現していることが知られている。ZFP809 の機能としては、LTR 下流にある 18 塩基対のプライマー結合部位 (PBS : primer binding site) に ZF ドメインを介して結合し、同時に KRAB ドメインを介して KRAB associated protein 1 (KAP1) と相互作用することで他の核内転写抑制因子と複合体を形成し、LTR 周囲のヒストン修飾や DNA メチル化を促し、LTR 活性を抑制する。本研究では、ZFP809 の遺伝子発現抑制効果の経時的な解析を可能とする蛍光タンパク質の発現とフローサイトメトリー解析を併用した実験系を構築し、さらに、ZFP809 が遺伝子発現抑制効果を発揮する上で重要なドメインを明らかにした。 第一章 レトロウイルスベクターの利点および問題点について述べ、さらに ZFP809 の構造、機能および発現パターンについてまとめ、本研究を行うことの目的と意義について述べた。 第二章 本章では、ZFP809 によるレトロウイルスベクターの発現抑制効果を経時的に解析する実験系を構築した。蛍光タンパク質の発現とフローサイトメトリーを併用した経時的な解析により、細胞を破壊することなく生細胞を用いて長期的に発現抑制効果をモニタリングすることが可能となった。さらに、ZFP809 により発現抑制されたプロモーターにおけるエピジェネティクス解析を行うことで、ZFP809 によって誘導されるエピジェネティクス修飾において、ヒストンのメチル化はプロモーターに関係なく共通して起こる一方で、DNA のメチル化はプロモーターの種類に依存にして起こることが示された。 第三章 本章では、ZFP809 が遺伝子発現抑制効果を発揮する上でどのドメインが重要であるのかを検証した。ZFP809 の欠損変異体を作製し、細胞内局在、遺伝子発現抑制効果および PBS 配列への結合能について解析した結果、ZFP809 の核局在化には KRAB ドメインと 2 個以上の ZF ドメイン、遺伝子発現抑制効果には KRAB ドメインと 5 個以上の ZF ドメイン、そして、PBS への結合には 5 個以上の ZF ドメインが必要であることが明らかとなった。 第四章 本研究の結論をまとめた。				

SUMMARY OF Ph.D. DISSERTATION

School Fundamental Science and Technology	Student Identification Number	SURNAME, First name ICHIDA, Yu
<p>Title</p> <p>Characterization and functional analysis of ZFP809 for the gene silencing of retroviral vectors</p>		
<p>Abstract</p> <p>Expression of transgenes driven by Moloney murine leukemia virus (MoMLV)-typed LTR (long terminal repeat) is strictly suppressed in immature cells such as embryonic stem cells. Mouse ZFP809 was found to inhibit transgene expression of MoMLV LTR by binding to the primer binding site (PBS) located downstream LTR and inducing inactive histone modifications and <i>de novo</i> DNA methylation at the LTR. And, ZFP809 is a member of Kruppel associated box containing zinc finger proteins (KRAB-ZFPs) and contains the KRAB domain at N-terminus and seven zinc finger domains at C-terminus. In this study, an experimental system that can monitor gene silencing during a long-term cell culture using flow cytometry technology combined with fluorescent reporters was established. Furthermore, it was examined what domains of ZFP809 among the KRAB domain at N-terminus and seven zinc finger domains are critical for gene silencing.</p> <p>Chapter 1 Advantage and disadvantage of retroviral vectors and the structure, function and expression pattern of ZFP809 were summarized, and research objectives and significance for this study were stated.</p> <p>Chapter 2 An experimental system that can monitor gene silencing during a long-term cell culture using flow cytometry technology combined with fluorescent reporters for the expression of ZFP809 and the transgene expression driven by the promoters of interest was established. In epigenetic modifications induced by ZFP809, DNA methylation varies depending on promoter type.</p> <p>Chapter 3 Subcellular localization, gene silencing ability and binding ability to PBS of a series of truncated and mutated ZFP809 proteins were assessed. And, it was revealed that the KRAB A box has the essential role for all functions assessed as well as the cooperative roles of a subset of zinc finger domains.</p> <p>Chapter 4 The major findings of the study was summarized.</p>		