

学 位 論 文 題 名

Developmental expression of the mouse gene coding for the Krüppel-like transcription factor KLF5

(Krüppel 型転写因子 KLF5 のマウス胎児における発現の検討)

学位論文内容の要旨

Krüppel 型転写因子 (Krüppel-like transcription factor: KLF) は転写因子ファミリーを構成し、C 末側には DNA 結合ドメインとしてよく保存された 3 つの zinc finger domain をもち、N 末側には proline や glutamine に富む転写活性化ドメインを持つ。これまでに赤芽球に特異的な発現を示す EKLF (Erythroid KLF) をはじめとして、7 つの KLF が同定されている。これらは組織特異的な発現を示すものが多く、また造血系など発生や分化と深く関わっている可能性の高い転写因子である。

この論文において筆者らは、KLF の zinc finger 部分をコードする部分の degenerate primer を利用した RT-PCR 法によって、上皮特異的な新規 KLF ファミリー遺伝子 KLF5 を分離・同定した。また、マウス胎児の各発生段階における発現の分布を解析し、同じく上皮特異的で細胞の最終分化に関与することで知られているファミリー遺伝子 KLF4 と比較検討した。

【方法と結果】

胎生 14.5 日のマウス肝臓の total RNA を抽出し、上述の degenerate primer を用いて RT-PCR を行い、133bp の PCR 産物をサブクローニングした。シークエンスの結果から新規と思われるクローンを選び、3'-RACE、cRACE および BLAST サーチによりマウス KLF5 の全長をクローニングした。また、マウス KLF5 の塩基配列を基にしてプライマーを設計し、ヒト胃から KLF5 の全長をクローニングした。アミノ酸配列からこの遺伝子は KLF ファミリーの一つである BTEB2 (Basic transcription element binding protein 2) と同一と思われたが、全長が 219 アミノ酸とされていた BTEB2 よりも長く、マウス KLF5 で 446 アミノ酸、ヒト KLF5 で 457 アミノ酸であった。

次に、マウス胎児の各発生段階におけるパラフィン切片を作成し、 $[^{35}\text{S}]$ -UTP で標識したヒトおよびマウス KLF4 および KLF5 に特異的な cRNA プローブを用いて *in situ* hybridization を行った。胎児初期の E10.5 では、KLF5 は原腸と尿排泄溝に非常に強く発現していたが、KLF4 は第一鰓弓に発現していた。E15.5 では、KLF4 と KLF5 はともに消化管および皮膚に類似した発現分布を示した。KLF5 は髄膜にも発現を認めた。一方で KLF4 は軟骨にも発現を認めた。E16.5 になると発現は次第に異なる分布を示した。KLF4 の発現は皮膚では依然強いが、消化管での発現は減弱していた。しかし、KLF5 の発現は消化管でも皮膚でも依然強かった。また、KLF5

は髄膜、気管および気管支の上皮にも強く発現していた。また、KLF4 も KLF5 も舌表面に強い発現を示した。E17.5 になるとさらに発現分布の相違は大きくなった。KLF4 の発現は消化管ではほとんど認められず、皮膚でも減弱し、舌表面に強い発現を示した。KLF5 の発現は消化管でやや減弱したが皮膚、気管および気管支上皮、舌表面では依然強く発現していた。皮膚および消化管における KLF5 の発現を強拡大で観察すると、皮膚では表皮の基底層に、消化管では crypt の深層で発現していた。

最後に、ヒトおよびマウス KLF5 の遺伝子座を radiation hybrid 法および FISH 法にて解析した。その結果、ヒト KLF5 は 13q21 に存在し、マウス KLF5 はヒト染色体 13q21 に相当する 14E2-E4 領域に位置していることが明らかになった。

【考案】

著者らが分離・同定した KLF5 は、BTEB2 の全長を C 末端側に含んでおり、それが発生過程における変化なのか、塩基配列の誤読に由来するものなのかは今まで不明であったが、著者らが独立した 12 クローンすべての塩基配列を解析した結果より、後者によるものであると判明した。

KLF4 は皮膚と消化管の最終分化を遂げている表層に発現していることで知られている遺伝子である。KLF5 も皮膚と消化管の上皮に強い発現を認め、KLF ファミリーのなかではこの二つの遺伝子が上皮特異的に発現していることが判明したが、KLF5 は皮膚でも消化管でも増殖細胞に富む深層に発現しており、その増殖および分化における役割は互いに異なることが推測された。また、マウス胎児の各発生段階における上皮での発現は、KLF4 は E15.5～16.5 にのみ強い発現を認めるが、KLF5 は胎児初期の段階ですでに強い発現を示し、胎児後期になると次第に上皮の深層へ局限して強い発現を維持した。これらのことから、上皮特異的な KLF ファミリーである KLF4 と KLF5 は、皮膚および消化管の形態形成において、互いに独立しながらも相補的な役割を果たしていると推察された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 今 村 雅 寛

副 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 武 蔵 学

副 査 教 授 畠 山 昌 則

学 位 論 文 題 名

Developmental expression of the mouse gene coding for the Krüppel-like transcription factor KLF5

(Krüppel 型転写因子 KLF5 のマウス胎児における発現の検討)

Krüppel 型転写因子 (Krüppel-like transcription factor: KLF) は転写因子ファミリーを構成し、C 末側には DNA 結合ドメインとしてよく保存された 3 つの zinc finger domain をもち、N 末側には proline や glutamine に富む転写活性化ドメインを持つ。これまでに赤芽球に特異的な発現を示す EKLF (Erythroid KLF) をはじめとして、7 つの KLF が同定されている。これらは組織特異的な発現を示すものが多く、また造血系など発生や分化と深く関わっている可能性の高い転写因子である。申請者は、KLF の zinc finger 部分をコードする部分の degenerate primer を利用した RT-PCR 法によって、マウス胎児肝から新規 KLF ファミリー遺伝子 KLF5 を分離・同定した。また、その相同性からヒト BTEB2 (Basic transcription element binding protein 2) のホモログと考えられたが、ORF の長さが大きく異なるため、ヒトの KLF5 も分離・同定し、BTEB2 がその断片であることを確認した。RNA ブロット解析では、KLF5 は消化管、肺に強い発現を認め、同じく消化管に発現が強いことで知られる KLF4 とよく似た発現分布を示したため、マウス胎児の各発生段階における発現の分布を *in situ* hybridization 法を用いて詳細に検討した。胎児初期の E10.5 では、KLF5 は原腸と尿排泄溝に非常に強く発現していたが、KLF4 は第一鰓弓に発現していた。E15.5 では、KLF4 と KLF5 はともに消化管および皮膚に類似した発現分布を示した。KLF5 は髄膜にも発現を認めた。一方、KLF4 は軟骨にも発現を認めた。E16.5 になると両者の発現は次第に異なる分布を示した。KLF4 の発現は皮膚では依然強いが、消化管での発現は減弱していた。しかし、KLF5 は消化管でも皮膚でも依然強く発現していた。また、KLF5 は髄膜、気管および気管支の上皮にも強く発現していた。また、KLF4 も KLF5 も舌表面に強い発現を示した。E17.5 になるとさらに発現分布の相違は大きくなった。KLF4 の発現は消化管ではほとんど認められず、皮膚でも減弱し、舌表面に強い発現を示した。KLF5 の発現は消化管でやや減弱したが、皮膚、気管および気管支上皮、舌表面では依然強く発現していた。皮膚および消化管における KLF5 の発現を強拡大で観

察すると、皮膚では表皮の基底層に、消化管では crypt の深層で発現していた。最後に、ヒトおよびマウス KLF5 の遺伝子座を radiation hybrid 法および FISH 法にて解析した。その結果、ヒト KLF5 は 13q21 に存在し、マウス KLF5 はヒト染色体 13q21 に相当する 14E2-E4 領域に位置していることが明らかになった。以上の結果から、上皮特異的な KLF ファミリーである KLF4 と KLF5 は、皮膚および消化管の形態形成において、互いに独立した役割をになっていることが示唆された。

公開発表に際し、副査の畠山教授より、KLF4 および KLF5 の機能についての質問があった。申請者は、KLF4 も KLF5 も詳細な機能は解明されていないが、KLF4 は growth arrest に関与し、標的遺伝子として p21 や cyclin D1 などが知られているが、KLF5 に関しては細胞の増殖や分化に対する役割はまだ何も明らかにされていないと答えた。続いて副査の浅香教授より、KLF4 および KLF5 とがんとのかかわりについての質問があった。申請者は、KLF5 とがんとの関係は不明だが、KLF4 は食道がん、大腸がん、膀胱がんで発現が著明に低下しており、これらのがん由来細胞株に強発現させると細胞の増殖が抑えられたので、機能的にがん抑制遺伝子として働く可能性があると答えた。その後副査の武蔵教授より、KLF5 と接着分子との関係についての質問があった。申請者は、今までの報告では明らかではないが、KLF5 を crypt 由来の細胞株に強発現させると、細胞の遊走がおこり、現在そのメカニズムについて検討中であると答えた。最後に、主査の今村教授より、GATA ファミリーなどの他の転写因子と KLF ファミリーとの関係についての質問があった。申請者は、ほとんど解析されておらず、文献的には報告がないと答えた。

本研究では、上皮特異的な二つの KLF 遺伝子が、上皮組織の形態形成において互いに独立した役割を持つ可能性があることをみだし、がんとの関連性を示唆する結果も得ており、今後がんの遺伝子治療に寄与していく可能性も期待される。以上より、審査員一同はこの研究を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。